

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD



Mast. biohem. Milena Vujanović

Hemijski sastav, biološke i funkcionalne karakteristike novih proizvoda od zove

-DOKTORSKA DISERTACIJA-

Mentor: Prof. dr Marija Radojković

Novi Sad, 2020.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET NOVI SAD

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Milena Vujanović, mast. biohem.
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Marija Radojković, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Hemijski sastav, biološke i funkcionalne karakteristike novih proizvoda od zove
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje:	AP Vojvodina

UGP	
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 238 stranica, 25 slika, 77 tabela, 46 histograma, 1 dijagram, 324 referenci, 15 priloga
Naučna oblast: NO	Tehničko-tehnološke nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambena tehnologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Sambucus nigra</i> L., plod zove, cvet zove, ekstrakcija, liofilizacija, matični sok, voćno vino, etarsko ulje, novi proizvodi, hemijski sastav, antioksidativno, neuroprotektivno delovanje, antitirozinazna, antidijabetogena aktivnost
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
Izvod: IZ	Glavni cilj ove doktorske disertacije je određivanje hemijskog sastava, bioloških i funkcionalnih karakteristika novih proizvoda od zove. Dobijanje proizvoda na bazi zove zasniva se na primeni tradicionalnih i savremenih tehnoloških procesa proizvodnje. Iskorišćenje prirodnog potencijala zove započeto je primenom tradicionalne i savremene (lioofilizacija) tehnike sušenja. U cilju dobijanja visokovrednih ekstrakata ploda i cveta zove primenjene su tradicionalna (maceracija) i savremene (ultrazvučna i mikrotalasna) ekstrakcione tehnike sa dva ekstragensa (50% etanol i voda). Dobijanje matičnog soka od

	<p>plodova zove podrazumevalo je primenu tradicionalnog načina ceđenja, dok je vino od plodova zove dobijeno po standardnom postupku proizvodnje vina. Vino je izloženo različitim temperaturnim tretmanima u različitom vremenskom periodu (60 °C u toku 5 minuta, 60 °C u toku 10 minuta, 70 °C u toku 5 minuta i bez toplotnog tretmana) u cilju evaluacije biološke aktivnosti dobijenog proizvoda. Etarsko ulje ploda i cveta zove je dobijeno hidrodestilacijom. Ispitivanje efikasnosti primenjenih tehnoloških postupaka sušenja i ekstrakcije je zasnovano na određivanju bioloških i funkcionalnih karakteristika dobijenih ekstrakata ploda i cveta zove. U ispitivanim ekstraktima ploda i cveta zove dominantne fenolne kiseline su hlorogenska i protokatehinska kiselina, a rutin i kvercetin-3-O-heksozid su dominantna flavonoidna jedinjenja. Biološke i funkcionalne karakteristike su ispitane primenom različitih <i>in vitro</i> antioksidativnih, neuroprotektivnih, antitirozinaznih i antidijabetogenih testova. Primenom liofilizacije kao savremene tehnike sušenja i mikrotalasne ekstrakcije kao savremene ekstrakcione tehnike povećava se biopotencijal ispitivanih ekstrakata. Matični sok od plodova zove kao potencijalno novi funkcionalni proizvod je analiziran u cilju definisanja hemijskog, fitohemijskog i nutritivnog sastava, biološkog potencijala i senzorskih karakteristika. Ispitivanja dobijenog vina su bila usmerena na utvrđivanje optimalnih uslova za proizvodnju voćnog vina. Definisanjem hemijskog i fitohemijskog sastava i evaluacijom biopotencijala vina određen je optimalan temperaturni profil za dobijanje jednog od novih funkcionalnih proizvoda. Na osnovu utvrđenog hemijskog sastava etarsko ulje ploda i cveta zove se pokazalo kao potencijalno novi prirodni agens za održavanje svežine i produženja roka trajanja prehrambenih proizvoda. Zova je nesumnjivo samonikla biljna vrsta koja u budućnosti osnovano može biti polazna sirovina za kreiranje i dobijanje novih prehrmabenh proizvoda na domaćem i inostranom tržištu.</p>
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	19.11.2018.
Datum odbrane:	

DO	
Članovi komisije: KO	Vladimir Tomović, dr, redovni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, predsednik Marija Radojković, dr, vanredni profesor, Tehnološki fakultet Novi Sad, mentor Aleksandra Cvetanović, dr, naučni saradnik, Tehnološki fakultet Novi Sad, član Ivana Beara, dr, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, član

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	MSc Milena Vujanović
Mentor: MN	Marija Radojković, PhD, Associate professor
Title: TI	Chemical composition, biological and functional characteristics of new elderberry products
Language of text: LT	Serbian (Latin script)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina

Publication year: PY	2020
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1
Physical description: PD	7 chapters, 238 pages, 25 pictures, 77 tables, 46 charts, 1 diagram, 324 references, 15 appendices
Scientific field SF	Technical - technological sciences
Scientific discipline SD	Food technology
Subject, Key words SKW	<i>Sambucus nigra</i> L., elderberry, elderflower, extraction techniques, lyophilization, mature juice, fruit wine, essential oil, new food products, chemical composition, antioxidant, neuroprotective, antityrosinase, antidiabetic activity
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology of Novi Sad
Note: N	None
Abstract: AB	The main goal of this doctoral dissertation is to determine the chemical composition, biological and functional characteristics of new elderberry products. Elderberry products were obtained via traditional and modern technological processes. The exploitation of the natural potential of the elderberry started with the application of traditional and modern (lyophilization) drying techniques. To obtain high-value extracts of fruits and flowers, traditional (maceration) and modern (ultrasonic and microwave) extraction techniques with two solvents (50% ethanol and water) were applied. Obtaining the juice from the elderberry fruits implied

	<p>the application of the traditional cold pressing method, whereas wine from the elderberry fruits was obtained in accordance with the standard procedure of wine production. The wine was exposed to different temperature treatments in different periods (60°C for 5 minutes, 60°C for 10 minutes, 70°C for 5 minutes and without heat treatment) to evaluate the biological activity of the product. The essential oil of the fruit and flower was obtained by hydrodistillation. The examination of the efficiency of the applied technological procedures of drying and extraction is based on observing the biological and functional characteristics of the obtained extracts of the said fruits and flowers. In the examined fruit and flower extracts, the dominant phenolic acids are chlorogenic and protocatechuic acid, while rutin and quercetin-3-O-hexoside are the dominant flavonoid compounds. Biological and functional characteristics were examined using various in vitro antioxidant, neuroprotective, antityrosinase, and antidiabetic tests. The application of lyophilization and microwave extraction (as modern drying and extraction techniques) increased the biopotential of the analyzed extracts. Elderberry juice, a potentially new functional product, was analyzed to define the chemical, phytochemical and nutritional composition, biological potential, and sensory characteristics. The wine was tested in order to determine the optimal conditions for the production of fruit wine. By defining the chemical and phytochemical composition and evaluating the biopotential of wine, the optimal temperature profile for obtaining one of the new functional products was determined. Based on the obtained chemical composition, it is determined that the essential oil of fruits and flowers is a potentially new natural agent for maintaining freshness and extending the shelf life of food products. Without a doubt, elderberry is a wild plant species that could be used in the future as the starting material for creating and obtaining new food products on the domestic and foreign markets.</p>
<p>Accepted on Senate on: AS</p>	<p>19.11.2018.</p>

Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Vladimir Tomović, PhD, Full professor, Faculty of Technology of Novi Sad</p> <p>Marija Radojković, PhD, Associate Professor, Faculty of Technology of Novi Sad, mentor</p> <p>Aleksandra Cvetanović, PhD, Research Associate, Faculty of Technology of Novi Sad, member</p> <p>Ivana Beara, PhD, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, member</p>

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. Novi prehrambeni proizvodi	3
2.1.1. Trendovi u prehrambenoj industriji.....	4
2.1.2. Proizvodnja funkcionalne hrane	5
2.1.3. Funkcionalne komponente.....	7
2.2. Novi prehrambeni proizvodi na bazi bobičastog voća	10
2.3. Bioaktivne komponente i zdravstveni benefiti bobičastog voća	11
2.3.1. Antioksidativna aktivnost	16
2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost	18
2.3.3. Antitirozinazna aktivnost.....	19
2.3.4. Antidijabetogena aktivnost	21
2.4. Perspektiva i izazovi u kreiranju novih prehrambenih proizvoda na bazi bobičastog voća	22
2.5. Mogućnosti prerade bobičastog voća.....	23
2.5.1. Sušenje.....	23
2.5.1.1. Tradicionalne tehnike sušenja.....	23
2.5.1.2. Savremene tehnike sušenja	24
2.5.2. Ekstrakcija	28
2.5.2.1. Tradicionalne tehnike ekstrakcije	28
2.5.2.2. Savremene tehnike ekstrakcije.....	29
2.5.3. Ceđenje/presovanje.....	35
2.5.3.1. Matični sok.....	35
2.5.3.2. Voćna vina	37
2.5.4. Destilacija	39
2.5.5. Senzorska analiza prehrambenih proizvoda	41

2.6. ZOVA.....	43
2.6.1. Taksonomija i rasprostranjenost.....	43
2.6.2. Opis biljke.....	44
2.6.3. Biološki aktivna jedinjenja zove.....	45
3. EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1. Sušenje plodova zove liofilizacijom	53
3.2. Ekstrakcija biljnog materijala (ploda i cveta zove).....	54
3.2.1. Tradicionalna tehnika ekstrakcije.....	54
3.2.2. Savremene tehnike ekstrakcije	54
3.3. Dobijanje matičnog soka od plodova zove	54
3.4. Dobijanje vina od plodova zove.....	55
3.5. Određivanje osnovnih parametara kvaliteta matičnog soka i vina od zove	56
3.5.1. Određivanje relativne gustine vina od plodova zove na 20 °C.....	56
3.5.2. Određivanje stvarnog alkohola u vinu od plodova zove	56
3.5.3. Određivanje sadržaja ukupnog ekstrakta u vinu od plodova zove	57
3.5.4. Određivanje pH vrednosti matičnog soka i vina od plodova zove.....	57
3.5.5. Određivanje sadržaja isparljivih kiselina u vinu od plodova zove	57
3.5.6. Određivanje sadržaja ukupnog sumpor-dioksida u vinu od plodova zove.....	58
3.5.7. Određivanje sadržaja metanola u vinu od plodova zove	58
3.5.8. Određivanje sadržaja minerala u matičnom soku i vinu od plodova zove	58
3.5.9. Određivanje sadržaja organskih kiselina i šećera u matičnom soku i vinu od plodova zove i ugljenih hidrata, lipida, proteina i energetske vrednosti u matičnom soku	59
3.6. Hidrodestilacija biljnog materijala (ploda i cveta zove)	60
3.7. Fitohemijaska analiza proizvoda na bazi zove.....	60
3.7.1. Određivanje sadržaja suve materije.....	60
3.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	60
3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	61
3.7.4. Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana	61
3.7.5. Određivanje sadržaja ukupnih tanina	61

3.7.6. Određivanje polifenolnog profila	62
3.8. Hemijska analiza etarskog ulja ploda i cveta zove.....	64
3.9. Određivanje bioloških i funkcionalnih karakteristika proizvoda na bazi zove	65
3.9.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti	65
3.9.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH• radikala	65
3.9.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS ^{•+} radikala	66
3.9.1.3. Određivanje redukcionog potencijala	67
3.9.1.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije •NO radikala	68
3.9.1.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije	69
3.9.1.6. Određivanje sposobnosti heliranja jona metala	69
3.9.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti.....	70
3.9.2. Određivanje neuroprotektivne aktivnosti - inhibicija enzima holinesteraza AChE i BChE	70
3.9.3. Određivanje antitirozinazne aktivnosti - inhibicija enzima tirozinaze	70
3.9.4. Određivanje antidijabetogene aktivnosti - inhibicija enzima α -amilaze i α -glukozidaze	71
3.10. Instrumentalno određivanje boje soka od zove.....	71
3.11. Određivanje kvaliteta soka od plodova zove.....	72
3.11.1. Senzorska ocena profila soka od zove – kvantitativna deskriptivna analiza od strane senzorskog panela.....	72
3.11.2. Određivanje stepena prihvatljivosti soka od plodva zove dobijenog senzorskim testiranjem potrošača	74
3.11.3. Određivanje senzorske ocene boje soka od zove.....	75
3.12. Statistička obrada podataka.....	75

4. REZULTATI I DISKUSIJA	76
4.1. Hemijski sastav ekstrakata plodova zove.....	76
4.1.1 Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida.....	78
4.1.2. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana	82
4.1.3. Sadržaj ukupnih tanina	83
4.1.4. Polifenolni profil ekstrakata plodova zove	84
4.1.4.1. PCA analiza polifenolnog profila vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove..	90
4.1.2. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove.....	93
4.1.2.1. Antioksidativna aktivnost	93
4.1.2.2. Neuroprotektivna aktivnost.....	102
4.1.2.3. Antitirozinazna aktivnost	105
4.1.2.4. Antidijabetogena aktivnost	106
4.1.2.5. PCA analiza antioksidativnih i enzim inhibitornih testova i vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove.....	110
4.2. Hemijski sastav ekstrakata cveta zove	111
4.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida.....	112
4.2.2. Polifenolni profil ekstrakata cveta.....	114
4.2.2.1. PCA analiza polifenolnog profila vodenih i etanolnih ekstrakata cveta zove	119
4.2.3. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove	120
4.2.3.1. Antioksidativna aktivnost	120
4.2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost.....	127
4.2.3.3. Antitirozinazna aktivnost	129
4.2.3.4. Antidijabetogena aktivnost	130
4.3. Proizvodi od plodova zove.....	134
4.3.1. Matični sok od plodova zove.....	134
4.3.1.1. Hemijski sastav matičnog soka.....	134
4.3.1.2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i polifenolni profil matičnog soka.....	138
4.3.1.3. Biološke i funkcionalne karakteristike matičnog soka	140
4.3.1.3.1. Antioksidativna aktivnost.....	140
4.3.1.3.2. Enzim inhibitorna aktivnost	141
4.3.1.4. Boja matičnog soka.....	143

4.3.1.5. Senzorski profil matičnog soka od plodova zove - Kvantitativna deskriptivna analiza matičnog soka	143
4.3.1.6. Stepen senzorske prihvatljivosti matičnog soka	144
4.3.1.7. Senzorska ocena boje matičnog soka.....	145
4.3.2. Vino od plodova zove.....	146
4.3.2.1. Hemijski sastav vina	146
4.3.2.2. Fitohemijski sastav vina.....	150
4.3.2.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida.....	150
4.3.2.2.2. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana.....	152
4.3.2.2.3. Sadržaj ukupnih tanina	153
4.3.2.2. Polifenolni profil vina	153
4.3.2.3. Biološke i funkcionalne karakteristike vina.....	157
4.3.2.3.1. Antioksidativna aktivnost.....	157
4.3.2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost	166
4.3.2.3.3. Antitirozinazna aktivnost	168
4.3.2.3.4. Antidijabetogena aktivnost.....	169
4.3.3. Etarsko ulje ploda i cveta zove	173
5. ZAKLJUČCI.....	178
6. LITERATURA	185
7. PRILOZI.....	212

1. UVOD

Istraživanja iz oblasti prehrambene tehnologije pokazuju da je funkcionalna hrana sve popularnija širom sveta i da zauzima značajno mesto u ishrani ljudi (Kaur i Singh, 2017). Globalno tržište funkcionalne hrane drastično se proširilo tokom poslednje decenije i procenjuje se da će neprestano rasti i dostići 255,10 milijardi USD do 2024. godine (Grand View Research, Inc., 2016), povećavajući konkurenciju između proizvođača kako bi potražnja potrošača bila još intenzivnija (Annunziata i Vecchio, 2013). Ovaj rast je vođen ne samo inovacijama u prehrambenoj industriji, već i promenom životnog stila i povećanjem svesti potrošača o vlastitom zdravlju i prednostima prehrambenih proizvoda. S obzirom na činjenicu da zdravlje postaje sve važnija lična i društvena vrednost, nije iznenađujuće da su potrošači počeli više da usmeravaju pažnju na zdravstvene benefite hrane (Vecchio, Van Loo i Annunziata, 2016). Inovacije u okviru prehrambene industrije uključuju dobijanje novih i unapređenje i poboljšanje kvaliteta već postojećih proizvoda primenom alternativnih rešenja koja se najčešće odnose na upotrebu biljaka, kao lako dostupnih polaznih sirovina. Mnoge kompanije na domaćem i inostranom tržištu pokazuju sve veće interesovanje za proizvodnju prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću dodavanjem ekstrakata biljaka u već postojeće proizvode ili kreiranjem novih proizvoda na biljnoj osnovi, namenjenih različitim grupama potrošača.

Samonikle ili gajene biljne vrste mogu biti polazna sirovina za dobijanje novih proizvoda. Balkansko poluostrvo predstavlja biodiverzitet lekovitih biljnih vrsta od kojih veliki broj raste u netaknutim planinskim predelima i nije u potpunosti iskorišćen i istražen. I pored velike rasprostranjenosti biljne vrste roda *Sambucus*, do sada u literaturi postoji mali broj podataka o biološkom potencijalu i hemijskom sastavu proizvoda dobijenih upotrebom ove biljne sirovine.

U svetlu navedenih činjenica neophodno je usmeriti istraživanja ka dobijanju i proučavanju proizvoda na bazi zove, koji još uvek nisu zastupljeni na tržištu. Na osnovu istaknutih činjenica došlo se do ideje efikasnije eksploatacije aktivnih principa iz prirodnih izvora i njihove primene kako u prehrambenoj tako i u drugim granama industrije. Stoga, cilj ove doktorske disertacije je bio dobijanje proizvoda na bazi biljne vrste roda *Sambucus*. Proces sušenja biljne vrste roda *Sambucus* odvijao se primenom tradicionalne tehnike sušenja, kao i odabranom savremenom tehnikom sušenja (liofilizacija). Izolovanje bioaktivnih jedinjenja i dobijanje ekstrakata biljne vrste roda *Sambucus* je izvedeno tradicionalnom (maceracijom) i savremenim (ultrazvučnom i mikrotalasnom) ekstrakcionim tehnikama. Matični sok biljne vrste roda *Sambucus* je dobijen tradicionalnim načinom ceđenja, a fermentacijom matičnog soka, po standardnom postupku proizvodnje vina dobijeno je vino od plodova biljne vrste roda *Sambucus*. Primenom postupka hirodestilacije dobijeno je etarsko ulje.

Ciljevi istraživanja obuhvaćeni ovom doktorskom disertacijom su:

- Ispitivanje uticaja procesnih parametara i izabranih tehnologija i tehnika na kvalitet finalnih proizvoda.
- Ispitivanje hemijskog sastava, bioloških i funkcionalnih karakteristika svih dobijenih proizvoda na bazi zove.
- Analiza hemijskog sastava, identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita (fenolnih kiselina, flavonoida i terpena) u proizvodima dobijenim upotrebom ploda i cveta ispitivanog biljnog roda, tačnije hemijska karakterizacija biljne sirovine. Hemijske analize matičnog soka i vina, utvrđivanje parametara kvaliteta dobijenih proizvoda.
- Ispitivanje bioloških i funkcionalnih karakteristika, evaluacija antioksidativne, neuroprotektivne, antitirozinazne i antidijabetogene aktivnosti ispitivane vrste zove; utvrđivanje terapijskog potencijala procenom antioksidativne aktivnosti praćenjem sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (DPPH^{*}, ABTS⁺, *NO), redukcionog potencijala, inhibicije lipidne peroksidacije, heliranja jona metala i ukupne antioksidativne aktivnosti. Utvrđivanje neuroprotektivnog potencijala dobijenih proizvoda na bazi zove primenom metoda za ispitivanje inhibicije enzima acetilholinesteraze i butirilholinesteraze, dok je antitirozinazna aktivnost ispitana pomoću metode koja se zasniva na određivanju sposobnosti dobijenih proizvoda da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima tirozinaze, a antidijabetogena aktivnost je definisana metodama koje uključuju određivanje inhibitornog potencijala prekomerne aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze.
- Utvrđivanje efikasnosti primenjenih tehnologija i evaluacija njihove opravdanosti u procesu dobijanja novih, funkcionalnih proizvoda na bazi zove, na osnovu fitohemijske kompozicije i ispitivanja biološkog potencijala.
- Formulacija preporuke za plasman novih proizvoda na bazi zove na tržište prehrambenih proizvoda.

2. OPŠTI DEO

2.1. Novi prehrambeni proizvodi

Prehrambeni proizvodi i kreiranje novih prehrambenih proizvoda nikada nisu izgubili na popularnosti, bez obzira na veliki broj dostignuća i otkrića koje je čovečanstvo ostvarilo. Veliki broj studija danas potvrđuje da se razvojem čovečanstva menjaju navike i potrebe ljudi, a samim tim i potrebe tržišta koje je neophodno da zadovolji industrija. I pored velikog broja sprovedenih ispitivanja, znanja i veština, ciklus u proizvodnji novih prehrambenih proizvoda i dalje je veoma složen. U proces razvijanja novih proizvoda uključeno je više faktora: jedinstvena ideja, razvojna istraživanja, nove tehnologije, dobro poznavanje tržišta, marketing i potrošnja. Sistematska procena faktora koji utiču na performanse proizvoda može dovesti do poboljšanja i olakšanja proizvodnje. Dizajniranje odgovarajućih strategija za razvoj novih proizvoda i poslovanje proizvodnih kompanija, istraživači su prepoznali kao osnovne kriterijume koji su uslov za uspešnu proizvodnju (Dijksterhuis, 2016). Usled razvoja nauke i tehnologije u kreiranju novih prehrambenih proizvoda sve više se uključuje i naučna zajednica, naročito u oblasti analize i utvrđivanja porekla nutritivnih sastojaka (Mărcuță, Mărcuță i Mârza, 2014). U cilju realizacije savremenih načina u proizvodnji hrane, razvijaju se i proučavaju nove tehnologije. Implementacijom novih tehnologija ide se ka ispunjenju zahteva potrošača, kako bi se dobili proizvodi koji su zdravstveno prihvatljivi, koji obezbeđuju zdravstvenu korist i daju ekološku opravdanost proizvodnog procesa.

Optimalan dnevni unos nutritivnih i nenutritivnih komponenata hrane je potrebno podjednako zadovoljiti. Funkcionalni proizvodi kao jedna od kategorija prehrambenih proizvoda pospešuju antioksidativnu zaštitu organizma i smanjuju faktore rizika, koji učestvuju u etiologiji kardiovaskularnih oboljenja, dijabetesa i kancera. Da bi ostvarili pozitivne efekte na zdravlje, neophodno je da funkcionalni proizvodi u svom sastavu imaju biološki potentna jedinjenja, koja pozitivno deluju na odvijanje metaboličkih procesa u organizmu. Biološki aktivna jedinjenja mogu biti makronutrijenti, mikronutrijenti, fitohemikalije ili živi mikroorganizmi. Oslobođanje biološki aktivnih jedinjenja iz funkcionalnih proizvoda i njihov transport do ciljnih tkiva omogućava fitoterapijsko dejstvo na organizam (Yahya, Attan i Wahab, 2018).

Interesovanje za nauku o hrani i ishrani izlazi iz dosadašnjih okvira, primenjuju se novi postupci i principi za izolovanje prirodnih proizvoda i sve više se usmeravaju na zamenu tradicionalnih tehnika savremenim. Novi prehrambeni proizvodi se kreiraju i dodavanjem biljaka, njihovih delova ili ciljano izolovanih metabolita biljaka, čiji fitohemijski sastav utiče na fiziološka stanja ljudskog organizma. Postoje različiti trendovi u prehrambenoj industriji koji su nastali na osnovu potrebe i potražnje tržišta za određenim proizvodima.

2.1.1. Trendovi u prehrambenoj industriji

Kreiranje funkcionalnih proizvoda u prehrambenoj industriji podrazumeva prevođenje ideje u inovaciju, koja će biti prihvaćena od strane potrošača. Ideje se moraju prevesti u proizvode, usluge ili procese koji su integrisani u ekonomiju, kako bi bile društveno korisne. Transfer znanja iz istraživačkih centara i univerziteta u sektor prehrambene industrije predstavlja trend pogodan za integraciju ideja u proizvodnji prehrambenih proizvoda (Saguy i Taoukis, 2017). Evropska unija podstiče saradnju nauke i privrede sa idejom da se izađe iz nacionalnih okvira i da se proizvodi iz manje razvijenih zemalja nađu na evropskom tržištu (Moskowitz i Hartmann, 2008).

Potražnja potrošača za novim proizvodima, složeni profili ukusa i ekološki održive ponude u velikoj meri su oblikovali prehrambenu industriju. Imperativ vremena u kojem živimo diktira veći sklad sa prirodom, a u vreme savremenih tehnologija podrazumeva efikasno korišćenje prirodnih resursa. Prehrambena industrija se sve više orijentiše ka otkrivanju inovativnih načina proizvodnje, koji bi uticali na poboljšanje funkcionalnosti tradicionalnih proizvoda. Etnobotanički i etnofarmakološki značaj tradicionalnih biljaka je pružio nauci i industriji nove mogućnosti i izazove u otkrivanju novih potencijalnih prehrambenih i funkcionalnih proizvoda (Khan, Ahmad i Rashid, 2018). Tokom istorije, biljke su korišćene kao konzervansi, aromatični i terapijski agensi. Biljke su u starom Egiptu korišćene kao začini, a vekovima su upotrebljavane u Kini i Indiji. Usled utvrđenih nedostataka, nus pojava i sporednih efekata sintetičkih proizvoda, podstaknuta je povećana upotreba biljaka odnosno njihovih aktivnih komponenata u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, a samim tim i istraživanja o karakterizaciji, dejstvu i primeni kako bi se omogućila što veća efikasnost. Na osnovu istraživanja koje je sprovela Svetska zdravstvena organizacija, utvrđeno je da je 70-80% svetske populacije orijentisano na upotrebu biljaka kao glavnih izvora prirodnih medikamenata (Chan, 2005).

Dodavanje biljaka ili njihovih ekstrakata u različite proizvode, utiče na poboljšanje nutritivne vrednosti proizvoda, jer su biljke bogat izvor fitohemijskih jedinjenja (DeCorte, 2016).

Aditivi u prehrambenim proizvodima poboljšavaju kvalitet proizvoda, menjaju teksturu i strukturu, ali produžavaju rok trajanja proizvoda. Kvalitet, tekstura i struktura proizvoda su direktno povezani sa vizuelnim utiskom, kao i ukusom, dok je produžen rok trajanja rezultat zaštite proizvoda od kvarenja. Fitohemikalije koje se primenjuju u prehrambenoj industriji su uglavnom sekundarni metaboliti biljaka (Dillard i German, 2000). Prirodne funkcije sekundarnih metabolita uključuju zaštitu od UV zračenja, uklanjanje slobodnih radikala, odbranu od fitopatogena itd.

Uspešan razvoj novih proizvoda zahteva senzorsku procenu i razumevanje svih kriterijuma, koje treba ispuniti da bi proizvod dospelo na tržište (Guiné, 2012). Prihvatljivost proizvoda i opstanak na tržištu zahteva i ekonomsku prihvatljivost i opravdanost (Costa-Font, Gil i Traill, 2008). Razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda uključuje inkorporaciju određenih jedinjenja (ili sastojaka) sa utvrđenim zdravstvenim prednostima. Postoji veliki izbor strategija koje se mogu koristiti za modifikaciju prehrambenih proizvoda kako bi se postigli željeni uticaji na zdravlje. Primena

neinvazivnih tehnika ispitivanja za kontrolu kvaliteta i sigurnosti prehrambenih proizvoda može garantovati konzistentne i bezbedne, kao i hranjive proizvode za potrošače (Chen i Opara, 2013), čime se povećava njihova ekonomska vrednost (Opara i Pathare, 2014). Prilikom razvoja prehrambenih proizvoda zdravstvena bezbednost, nutritivna vrednost, senzorski atributi (miris, ukus, tekstura), stalan i ujednačen kvalitet ostaju presudni faktori za potrošače (Tahergorabi, Matak i Jaczynski, 2015).

2.1.2. Proizvodnja funkcionalne hrane

U cilju dobijanja funkcionalnog proizvoda od već postojećih prehrambenih proizvoda neophodno je primeniti određene strategije:

- uklanjanje supstanci za koje je poznato da izazivaju neželjene efekte ukoliko se konzumiraju,
- obogaćenje proizvoda mikronutrijentima do količine koja dovodi do pretpostavljenog efekta,
- dodavanje komponenata koje obično nisu prisutne u većini proizvoda, a čije je pozitivno dejstvo na biološki sistem dokazano,
- zamena pojedinih komponenata hrane, čiji je unos najčešće prekomeran, komponentom čije je pozitivno dejstvo dokazano,
- povećanje biodostupnosti ili stabilnosti komponente za koju je poznato da ima funkcionalno dejstvo ili da smanjuje rizik od oboljenja (Roberfroid, 2000).

Proizvodi obogaćeni mineralima i vitaminima bili su prvi funkcionalni proizvodi na tržištu (Sloan, 2000). Posebnu pažnju su privukli proizvodi obogaćeni omega-3-masnim kiselinama, rastvorljivim prehrambenim vlaknima i fitosterolima, jer utiču na unapređenje zdravlja i prevenciju kancerogenih oboljenja (Sloan, 2002). U novije vreme, prehrambene kompanije su otišle korak dalje u kreiranju novih prehrambenih proizvoda, u smislu da jedan proizvod nudi višestruko povoljno dejstvo na zdravlje (Sloan, 2004). Sa stanovišta proizvoda, funkcionalno svojstvo može biti uključeno na različite načine. Na osnovu toga, jedna od mogućih klasifikacija funkcionalne hrane prikazana je u Tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Vrste funkcionalnih proizvoda (Spence, 2006; Kotilainen i sar., 2006)

Vrsta funkcionalnog proizvoda	Definicija
Proizvod povećane vrednosti	Hrana sa povećanim sadržajem postojećeg nutrijenta
Obogaćen proizvod	Hrana sa dodatim novim nutrijentima ili komponentama koje nisu inače prisutne u određenoj vrsti hrane
Izmenjen proizvod	Hrana kod koje je štetna komponenta uklonjena, čiji je sadržaj smanjen ili je štetna komponenta zamenjena supstancom sa povoljnim biološkim dejstvom
Unapređen proizvod	Hrana kod koje je jedna od komponenata prirodno unapređena putem posebnih uslova gajenja, novog sastava hraniva, genetskim postupkom ili na neki drugi način

Sa tehnološkog stanovišta, postoje različite tehnologije za razvoj funkcionalne hrane i može se razviti širok spektar različitih vrsta funkcionalnih proizvoda. Trenutno se funkcionalna hrana na tržištu može podeliti u tri glavne kategorije:

- Prvu kategoriju čini funkcionalna hrana za koju proizvođači tvrde da njeno konzumiranje ima pozitivan uticaj na zdravlje. Različiti načini proizvodnje novih prehrambenih proizvoda utiču na zdravstvene benefite, tako da je moguće obogaćivanje postojećih proizvoda dodavanjem nutritivnih komponenata. U tom slučaju dodavanje hranljivih materija koje inače nisu prisutne u proizvodu obezbeđuje zamenu potencijalno štetnih ili nepoželjnih sastojaka nutritivnim komponentama (Spence, 2006),
- Drugu kategoriju funkcionalne hrane čine proizvodi, čije konzumiranje ima pozitivan uticaj na fizičko i psihičko zdravlje. U ovoj kategoriji proučavaju se specifične komponente hrane, kao što su holin, kofein i specifične aminokiseline radi određivanja njihovog uticaja na raspoloženje i kognitivne performanse (Ashvell, 2002),
- Treću kategoriju čine funkcionalni proizvodi, čije konzumiranje pre, tokom ili nakon fizičke aktivnosti utiče na oporavak organizma i poboljšanje fizičkih performansi. Uravnotežena ishrana sa preciznim sastavom određenih komponenata hrane, kao što su rehidratizovani proizvodi i dodaci mikrohranjivih sastojaka, mogla bi da igra važnu ulogu u poboljšanju nivoa performansi potrošača. U novu grupu prehrambenih proizvoda spadaju i široko korišćena energetska pića, sa visokim nivoom kofeina (Ashvell, 2002).

U cilju postizanja visokog kredibiliteta prehrambenih proizvoda, potrebno je voditi što kvalitetnija istraživanja, kako bi se ispunili svi kriterijumi potrošača i prehrambenih kompanija. Stoga, strateška povezanost medicine, prehrambene i farmaceutske industrije predstavlja osnov za pojavu novih funkcionalnih proizvoda na tržištu sa potencijalno većim prisustvom. Uvidom u nedostatke, potrebe, sklonosti tržišta i zahteve potrošača smanjuju se problemi prevođenja naučnih saznanja u proces proizvodnje hrane.

2.1.3. Funkcionalne komponente

Savremena ishrana je pretrpela drastične promene poslednjih godina, što je uticalo i na zdravlje ljudi. Promene životnog stila su uslovile konzumiranje hrane koja izaziva i promene u organizmu. Mnogi hronični zdravstveni problemi su uzrokovani nepravilnim načinom ishrane. Povezanost imunog sistema i ishrane predstavlja jednu od najaktuelnijih tema u svetu funkcionalne hrane, što je različite grane industrije podstaklo na razvoj novih proizvoda sa dodatkom i funkcionalnom vrednošću. Modifikacija postojećih i dizajniranje novih proizvoda ogleda se u dodavanju komponenti koje imaju fiziološko dejstvo na organizam (Tabela 2.2). Prisustvo funkcionalnih komponenata u strukturi prehrambenih proizvoda obezbeđuje proizvodima da tokom njihovog konzumiranja utiču na biološke funkcije, kao što su: smanjenje nivoa holesterola, antivirusno i antibakterijsko dejstvo, sprečavanje agregacije trombocita, regulisanje homeostaze organizma i sl.

Tabela 2.2. Pregled komponenti koje daju proizvodima funkcionalne karakteristike (IFIC - International Food Information Council, 2009)

Komponenta	Izvor	Dejstvo funkcionalnih komponenata
Fenolne kiseline (kafena kiselina, ferulna kiselina)	jabuke, kruške, citrusno voće, kafa	antioksidativna zaštita, očuvanje vida i rada srca
Flavonoidi Antocijanini (cijanidin, delphinidin, malvidin)	bobičasto voće, višnje, crno grožđe	podsticanje ćelijske antioksidativne zaštite, doprinos očuvanju funkcija mozga
Flavanoli (katehini, epikatehini, epigalokatehin, procijanidini)	čaj, kakao, čokolada, jabuke, grožđe	poboljšanje kardiovaskularnog sistema
Flavanoni (hesperetin, naringenin)	citrusno voće	antioksidativna zaštita i zaštita od slobodnih radikala
Flavonoli (kvercetin, kempferol, miricetin)	crni luk, jabuke, čaj, brokoli	antioksidativna zaštita i zaštita od slobodnih radikala

Biljni steroli (slobodni stanoli/sterol)	kukuruz, soja, pšenica, obogaćena hrana i piće	smanjenje rizika od nastanka srčanih oboljenja
Lignani	lan, raž, pojedino povrće	pozitivan uticaj na kardiovaskularni i imuni sistem
Sufidi/Tioli (dialil-sulfid, alil-metil-trisulfid)	beli luk, crni luk, praziluk	detoksikacija organizma, zaštita imunog sistema
Prehrambena vlakna Nerastvorljiva vlakna	pšenične mekinje, kukuruzne mekinje, kora voća	zaštita digestivnog trakta, smanjenje rizika od nastanka raka
Rastvorljiva vlakna	grašak, pasulj, jabuke, citrusno voće	smanjenje rizika od srčanih oboljenja i nekih vrsta raka
Integralne žitarice	zrno žitarica, integralni hleb, ovsena prekrupa, smeđi pirinač	doprinos očuvanju normalnog nivoa glukoze u krvi i zaštita organizma od hroničnih oboljenja
Mononezasićene masne kiseline	koštunjavo voće, maslinovo ulje, ulje repice	smanjenje rizika od nastanka srčanih oboljenja
Polinezasićene masne kiseline (omega-3-masne kiseline)	orasi, lan, riba, riblje ulje	poboljšanje mentalnih i vizuelnih funkcija
Prebiotici (inulin, frukto-oligosaharidi, polidekstroza)	integralne žitarice, crni luk, pojedino voće, beli luk, med	poboljšanje gastrointestinalnih funkcija i apsorpcije Ca
Probiotici (kvasac, <i>Lactobacilli</i>, <i>Bifidobacteria</i>, ostali specifični sojevi korisnih bakterija)	određeni jogurti i drugi mlečni proizvodi sa kulturama, nemlečni prilozi hrani	poboljšanje gastrointestinalnih funkcija i imuniteta
Vitamin A	iznutrice, mleko, jaja, šargarepa, indijski krompir	očuvanje vida, imunog sistema i zdravlja kostiju, poboljšanje integriteta ćelije
Vitamin B₁ (Tiamin)	spanać, sočivo, grašak, smeđi pirinač	
Vitamin B₂ (Riboflavin)	krto meso, jaja,	očuvanje mentalnih funkcija, regulacija metabolizma

	zeleno lisnato povrće	
Vitamin B₃ (Niacin)	mlečni proizvodi, svinjetina, riba, koštunjavo voće, jaja	pospešen rast ćelija i regulacija metabolizma
Vitamin B₅ (Pantotenska kiselina)	iznutrice, jastog, zrno soje, sočivo	učešće u regulaciji metabolizma i sintezi hormona
Vitamin B₆ (Piridoksin)	pasulj, koštunjavo voće, leguminoze, riba, meso, integralne žitarice	očuvanje zdravlja imunog sistema, regulacija metabolizma
Vitamin B₉ (Folna kiselina)	pasulj, leguminoze, citrusno voće, zeleno lisnato povrće	smanjenje rizika rađanja dece sa oštećenjem mozga ili kičmene moždine
Vitamin B₁₂ (Kobalamin)	jaja, meso, svinjetina, mleko	očuvanje mentalnih funkcija, regulacija metabolizma i procesa hematopoeze
Vitamin H	jetra, losos, mlečni proizvodi, jaja, ostrige	regulacija metabolizma i hormonalnog sistema
Vitamin C	biber, kivi, citrusno voće, jagode	antioksidativna zaštita, očuvanje imunog sistema i zdravlja kostiju
Likopen	paradajz, lubenica, grejpfrut	očuvanje zdravlja prostate
Vitamin D	riba, obogaćena hrana i piće	regulacija Ca i P, očuvanje zdravlja kostiju i imunog sistema, potpomognut rast ćelija
Vitamin E	seme suncokreta, badem, lešnik	antioksidativna zaštita, očuvanje imunog i kardiovaskularnog sistema

2.2. Novi prehrambeni proizvodi na bazi bobičastog voća

Naučna istraživanja i brojni zdravstveni centri širom sveta, kao osnovne zdravstvene smernice preporučuju povećanu upotrebu voća i povrća u ishrani. Bobičasto voće zauzima visoku poziciju sa prehrambenog i zdravstvenog aspekta, jer se sve više konzumira zbog svog karakterističnog ukusa i izgleda, a dokazano je da je bogat izvor fitohemikalija koje mogu da spreče različite bolesti i poremećaje (Zanini i sar., 2016).

Bobičasto voće se popularno koristi ne samo u svežem i zamrznutom obliku, već i u formi različitih prerađenih proizvoda, uključujući sušeno i konzervisano voće, jogurte, napitke, džemove i žele (Seeram, 2008). Plodovi bobičastog voća kao što su: kupina, malina, borovnica, brusnica, crvena ribizla, crna ribizla i jagoda popularno se koriste u ljudskoj ishrani u obliku sveže ili prerađene forme. Potražnja prerađivačke industrije inicira plantažno gajenje bobičastog voća, kako bi se dobile dovoljne količine sirovine ujednačenog kvaliteta i kvantiteta. Upotreba plodova bobičastog voća omogućila je proizvodnju novih proizvoda koji se mogu naći na policama trgovinskih lanaca. Pri poređenju plodova bobičastog voća koje je isključivo iz plantažne proizvodnje sa samoniklim voćem, može se zaključiti da samoniklo voće ima više prednosti. Samoniko voće raste slobodno u prirodi, bez neposrednog uticaja čoveka i ekonomskih troškova proizvodnje. U toku rasta i sazrevanja plodova, izbegnuto je zaprašivanje hemikalijama i đubrenje zemljišta, pa samoniklo voće ima veći prehrambeni potencijal. Plodovi samoniklog voća su bogatiji bioaktivnim materijama, jer se razvijaju u optimalnim prirodnim uslovima (Alam i sar., 2019).






Mineralna đubriva koja se koriste kod plantažno gajenih kultura indirektno štetno deluju na ljudski organizam, tako što se, na primer, nitrati iz đubriva kroz niz metaboličkih procesa i reakcija mogu prevesti u kancerogene oblike (Morugán-Coronado i sar., 2020).

Takođe, raste trend upotrebe ekstrakata plodova voća kao sastojaka funkcionalnih proizvoda i prehrambenih suplemenata. Ekstrakti različitih vrsta voća deluju kao efikasni inhibitori slobodnih radikala i štite organizam od razvoja patogenih stanja (Wang i Jiao, 2000). U okviru ove doktorske disertacije, sprovedeno je istraživanje na biljnoj vrsti *Sambucus nigra* L. Ova biljna vrsta, zove, je široko rasprostranjena kao samonikla biljka, a njeni plodovi do sada nisu našli primenu u prehrambenoj industriji. Sa ciljem razvoja novih proizvoda, zove je predstavljala izazov ovog istraživanja, usmerenog ka utvrđivanju biološkog potencijala. Do sada jedini proizvod od zove prisutan na tržištu je Sambukol. Sambukol je prirodni lek sa antivirusnim svojstvima, efikasan u borbi protiv virusa gripa. Glavni sastojak u formulaciji ovog proizvoda je ekstrakt plodova zove. Sambukol je prepoznat kao prirodni „antibiotski proizvod” (Ulbricht i sar., 2014). Sa idejom da se na tržištu pojave i novi i funkcionalni prehrambeni proizvodi od zove, detaljno istraživanje je vođeno u pravcu identifikacije bioaktivnih jedinjenja i analiziranja biološke i farmakološke aktivnosti, sa mogućnošću dodavanja zove već postojećim proizvodima ili njene upotrebe kao polazne sirovine za kreiranje novih proizvoda.

2.3. Bioaktivne komponente i zdravstveni benefiti bobičastog voća

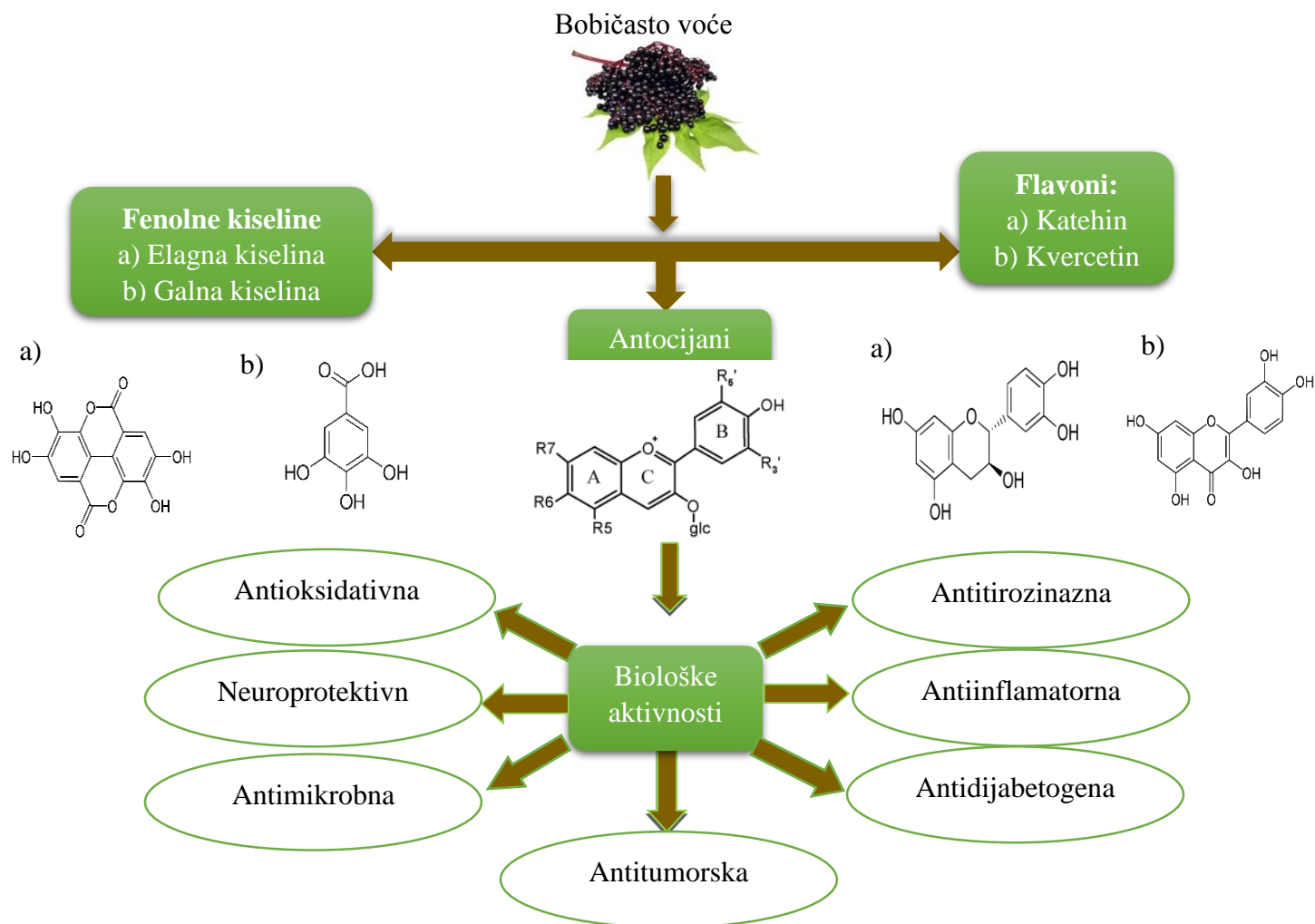
Kroz istoriju čovečanstva, samonikle biljke su se koristile i kao hrana i kao lekovi. Sve kulture u svetu poseduju tradicionalno znanje o hranjivim vrednostima biljaka i njihovim lekovitim svojstvima (Ali-Shtayeh, Jamous i Jamous, 2015). Podaci iz literature pokazuju da je više od 7000 samoniklih biljnih vrsta korišćeno kao hrana u toku razvoja ljudske civilizacije (Pinela, Carvalho i Ferreira, 2017). Uz dodatnu naučnu potvrdu onoga što je u etnofarmakologiji već poznato, očekuje se da će mnoge biljke steći status kandidata za funkcionalnu hranu. Važnost tradicionalnog znanja prepoznala je i Svetska zdravstvena organizacija koja ga je usmerila kao svetsku strategiju (WHO, 2015). Bobičasto voće obiluje i makro i mikrohranjivim sastojcima, pa je sadržaj minerala u plodovima od izuzetnog značaja. Glavni minerali koji se nalaze u plodovima bobičastog voća su: fosfor, kalijum, kalcijum, magnezijum, gvožđe, mangan, bakar, natrijum i aluminijum. Zbog akumulacije velike količine gvožđa, kalcijuma, fosfora i natrijuma, kao i drugih minerala, ovi plodovi zadržavaju liderstvo među svim ostalim plodovima voća (Hardisson i sar., 2001). Minerali imaju važnu ulogu u razvoju kostiju i zuba i daju snagu mišićima kod ljudi. Uključeni su u odvijanje važnih fizioloških i biohemijskih procesa, održavaju kiselobaznu ravnotežu, utiču na funkcije hormona i transmisiju nervnih impulsa. Naučne studije su pokazale da postoji velika raznolikost u pogledu fitohemijskog sastava i antioksidativnog kapaciteta plodova bobičastog voća (Manach i sar., 2004). U Tabeli 2.3 je dat pregled sadržaja mineralnih materija kod odabranih vrsta bobičastog voća.

Tabela 2.3. Sadržaj mineralnih materija kod odabranih vrsta bobičastog voća (mg/100 g svežeg voća) (Nile i Park, 2014).

Minerali u bobičastom voću					
	Kupina	Brusnica	Malina	Borovnica	Crna ribizla
Ca	20-30	3-5	15-30	15-35	35-45
Mg	17-20	3-7	0,5-1,0	6-10	15-18
Fe	1-2	0,16-0,40	0,4-0,6	0,15-0,60	1,3-2,5
P	25-30	1-4	20-22	10-15	35-40
K	100-150	24-30	200-225	56-80	300-320
Na	2-4	3-6	0,5-1,0	0,11-0,22	1,7-2,5
Zn	0,3-0,5	0,02-0,04	0,32-0,61	0,06-0,12	0,25-0,31
Mn	1,2-2,6	0,03-0,10	1,5-2,0	1,20-3,90	0,35-0,52
Cu	0,02-0,04	0,13-0,20	U tragovima	0,03-0,06	0,15-0,20
Literatura	Siriwoharn i sar., 2006.	Pappas i Schaich, 2009.	Nurmi i sar., 2009.	Fernandez-Panchon i sar., 2008.	Borges i sar., 2010.

Trenutno se iz biljaka dobija veliki broj aktivnih jedinjenja koja se nalaze u hrani (Fernandes i sar., 2019), a najčešće su to polifenolne komponente, koje zauzimaju sve važniju poziciju na tržištu fitopreparata. U bobičastom voću su najzastupljenije sledeće klase polifenolnih jedinjenja: derivati hidroksibenzoeve i hidroksicimetne kiseline, antocijanini, tanini, flavonoli, flavoni, flavanoli, flavanoni, izoflavoni, stilbeni i lignani.






Balkansko poluostrvo poseduje veliki biodiverzitet samoniklog bobičastog voća, sa rastom prilagođenim različitim ekološkim uslovima. Zahvaljujući bogatom hemijskom sastavu, samonikle vrste, kao što je već pomenuto, često imaju izraženiju biološku aktivnost od plantažno gajenog voća (Smith, Rowan i Tan, 2000). Sekundarni metaboliti biljaka uslovljavaju njihov biološki potencijal, koji je prikazan na Slici 2.1.



Slika 2.1. Vrste bioaktivnih jedinjenja i biološke aktivnosti odabranog bobičastog voća (Nile i Park, 2014)






Određivanje sadržaja sekundarnih metabolita u bobičastom voću je predmet izučavanja dugi niz godina, s obzirom da oni predstavljaju značajnu komponentu funkcionalne hrane, pregled sadržaja glavnih sekundarnih metabolita u odabranom bobičastom voću prikazan je u Tabeli 2.4.

Tabela 2.4. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijana u odabranom bobičastom voću (mg/100 g svežeg ploda) (Nile i Park, 2014).

Bobičasto voće	Fenoli	Flavonoidi	Antocijani	Literatura
 Kupina	486	276	82-326	Wang i Lin, 2000; Sellappan, Akoh i Krewer, 2002.
 Brusnica	315	157	67-140	Zheng i Wang, 2003; Määttä-Riihinen, Kamal- Eldin i Törrönen, 2004.
 Malina	121	6	99	Rauha i sar., 2000; Koponen i sar., 2007.
 Borovnica	261-585	50	25-495	Skupien i Oszmianski, 2004; Fernandez-Panchon i sar., 2008.
 Crna ribizla	29-60	46	44	Kaack i Austed, 1998; Ozgen i sar., 2010.

Vrsta jedinjenja koja utiču na funkcionalnost bobičastog voća i njihove biološke aktivnosti prikazane su u Tabeli 2.5.

Tabela 2.5. Vrsta fitohemikalija i biološke aktivnosti odabranog bobičastog voća (Nile i Park, 2014).

Bobičasto voće	Fitohemikalije	Biološka aktivnost	Literatura
 <p>Kupina</p>	Visok sadržaj antioksidanasa, polifenola, Mg, vitamina C. Silicilati i tanini.	Antiviralna, antikancerogena, antioksidativna, smanjenje holesterola.	Siriwoharn, Wrolstad i Durst, 2006.
 <p>Brusnica</p>	Vitamini A, C, minerali Ca, Fe, Mg, Mn, folna kiselina i fenoli.	Antibakterijska, antiseptična i antidiuretična. Uklanjanje masti iz limfnog sistema i zaštita kardiovaskularnog sistema.	Pappas i Schaich, 2009.
 <p>Malina</p>	Vitamini C, B, prehrambena vlakana, fenolna kiselina i jaki antioksidanti. Folati, Fe, K, Cu i lutein.	Antikancerogena, antimikrobna, antioksidativna.	Szajdek i Borowska 2008.
 <p>Borovnica</p>	Vitamini C, B kompleksa, E i A. Bogat izvor minerala Se, Zn, Fe i Mg. β -karoten, lutein i zeaksantin.	Antikancerogena, antiinflamatorna, antidijabetogena. Zaštita od Alchajmerove bolesti, usporava starenje.	Yi i sar., 2005.
 <p>Crna ribizla</p>	Antocijani, minerali Ca, Zn, Mg, K, vitamini A, B ₂ i giberelinska kiselina.	Antiinflamatorna, smanjenje nivoa holesterola, stimulacija procesa digestije, rada jetre, pankreasa i bubrega.	Slimestad i Solheim, 2002.

2.3.1. Antioksidativna aktivnost

U biološkim sistemima oksidativni stres je prirodni fiziološki proces, gde prisustvo slobodnih radikala nadvladava strategiju uklanjanja slobodnoradikalskih vrsta, usled čega dolazi do narušavanja ravnoteže. Oštećenje ćelija i molekula unutar ćelija ne izazivaju samo slobodni radikali. U ćeliji postoje i neradikalne forme, koje reaguju sa biomolekulima izazivajući modifikacije u njihovoj funkciji (Kumar, 2014). Na primer, najčešći radikalni oblici reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) su: hidrosil- (HO^\bullet), superoksid anjoj ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroksil- (ROO^\bullet) i alkoksil- (RO^\bullet) radikal, dok su najčešći neradikalni oblici: singletni kiseonik ($^1\text{O}_2$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hipohlorna kiselina (HClO) (Fasiku i sar., 2020).

Osim reaktivnih molekula kiseonika koji se formiraju tokom ćelijskog metabolizma, u procesu metabolizma nastaju i reaktivne vrste azota (RNS), koje takođe mogu imati radikalni i neradikalni oblik. Najčešći radikalni oblici azota su: azotmonoksidni radikal (NO^\bullet), azotdioksidni radikal (NO_2^\bullet) i nitratni radikal ($^\bullet\text{NO}_3$). Neradikalni oblici azota su: nitritna kiselina (HNO_2), nitrozil katjon (NO^+), nitrozil anjon (NO^-), azot (III)-oksid (N_2O_3), azot (IV)-oksid (N_2O_4) i peroksinitrit (ONOO^-) (Fasiku i sar., 2020).

ROS su definisane kao molekuli koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i deluju kao oksidaciono sredstvo u toku odvijanja redoks reakcija. Pokreću proizvodnju slobodnih radikala prenošenjem elektrona u hemijskoj reakciji. Ćelije koriste kiseonik za stvaranje energije u obliku adenozin-trifosfata (ATP) u mitohondrijama, ali i za produkciju slobodnih radikala (Blokina i Fagerstedt, 2010). Kao deo propagativne lančane reakcije, slobodni radikali reaguju sa drugim radikalima, sve dok lančanu reakciju ne zaustave antioksidanti. Slobodni radikali imaju kratak životni vek, koji traje mili-, mikro- ili nanosekundu, i reaguju sa lipidima, DNK, proteinima i ugljenim hidratima. U reakciji sa ćelijskim molekulima dovode do oštećenja i formiraju štetne proizvode kao što su na primer lipidni peroksidi i drugi produkti, koji uzrokuju oštećenje ćelijskih membrana, smanjenje aktivnosti enzima i sl. (Shah i sar., 2001). ROS transformišu DNK narušavanjem strukture jednog ili oba lanca DNK, razgrađuju azotne baze, učestvuju u transformaciji, translokaciji i umrežavanju sa proteinima. Promene na lancu DNK dovode do starenja, kancerogeneze i neurodegenerativnih, autoimunih, kardiovaskularnih i drugih bolesti. Reaktivne vrste kiseonika mogu oksidovati kičmu proteina, kao i bočne lance proteina (Birben i sar., 2012).

Slobodni radikali imaju dvojaku ulogu u organizmu, te osim negativnih efekata, mogu učestvovati i u biološki značajnim procesima. I ROS i RNS formiraju se na dobro kontrolisan način i učestvuju u regulaciji homeostaze ćelijskih procesa i kontrolišu ćelijsku aktivnost modulacijom signalnih puteva (Pal-Nath i sar., 2017). ROS imaju važnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa kao što su normalno funkcionisanje vaskularnih ćelija, izazivanje efikasnog imunog odgovora, deluju kao mogući signalni molekuli, regulišu unos glukoze u skeletni mišić (Salman i Ashraf, 2013). Oni imaju ulogu kao odgovor na stimulaciju faktora rasta i kontrolu inflamatornih reakcija. Neophodni su za ćelijsku homeostazu, signalizaciju i razne biološke odgovore, učestvuju u procesima

diferencijacije, migracije i proliferacije ćelija. Takođe, služe za transdukciju signala koje prenose do citokina i nuklearnog faktora-kB (NF-kB) (Gorin i Block, 2013).

Kao i ROS, tako i RNS učestvuju u odvijanju fizioloških procesa organizma. •NO reguliše funkciju intestinalnih epitelnih ćelija. •NO je veoma reaktivan signalni molekul i važan regulator ćelijskih funkcija, uključujući prenos nervnih impulse i regulaciju imunog odgovora (Bhatraju i sar., 2015). Smatra se da •NO učestvuje u procesu inhibicije rasta ćelija tumora i da sprečava rast mikroorganizama (Watanabe i sar., 2007).

Budući da slobodni radikali imaju sposobnost da reaguju na neselektivan način, što dovodi do oštećenja gotovo bilo koje ćelijske komponente, postoji širok spektar antioksidativne zaštite. Antioksidanti su supstance koje mogu sprečiti ili usporiti oštećenje ćelija prouzrokovanih nestabilnim molekulima koji se produkuju u organizmu, kao odgovor na različite faktore koji narušavaju homeostazu ćelijskih procesa.

Antioksidativni odbrambeni sistem čine endogeni antioksidanti, koji obuhvataju enzimske i nenzimske antioksidante. Pored endogenih antioksidanata, različite supstance ili agensi koji mogu ukloniti reaktivne metabolite kiseonika, inhibirati njihovo stvaranje ili povećati sposobnost endogenih antioksidanata deluju kao egzogeni antioksidanti.

Glavni enzimski antioksidanti u humanim ćelijama su: superoksid dismutaza, glutation peroksidaza, glutation-reduktaza i katalaza (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska i Zujko, 2018).

Endogeni neenzimski antioksidanti su:

- glutation - tripeptid koji se sastoji od glutamata, cisteina i glicina, nalazi se u svim eukariotskim ćelijama i predstavlja jedan od ključnih neenzimatskih antioksidanata u telu. U sluznici creva glutation ima ulogu antioksidativne barijere,
- tioredoksin sistem - koji se sastoji od tioredoksina i tioredoksin reduktaze. Ima sposobnost ukljanjanja slobodnih radikala i sprečava lančane reakcije oksidacije,
- melatonin - hormon epifize koji ispoljava veoma jaku antioksidativnu moć, posebno u mitohondrijama i jetri.

Prehrambene komponente, uključujući vitamine, minerale, polifenole, izotiocijanate i karotenoide, su najvažniji egzogeni antioksidanti. Činjenica da egzogeni antioksidanti ostvaruju odbrambeni mehanizam i nisu toksične prirode, njihova upotreba u vidu dodataka ishrani je efikasan način u prevenciji i terapiji bolesti (Hammond, Johnson i George, 2014).

2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost

Jedna od neurološki značajnih grupa enzima je svakako i grupa holinesteraza, enzima koji katalizuju hidrolizu neurotransmitera acetilholina (ACh) na holin i acetil koenzim A. U proces hidrolize neurotransmitera uključena su dva enzima:

- Acetilholinesteraza (AChE) je serin hidrolaza, nalazi se u različitim tkivima: nervnom i mišićnom tkivu, motornim i senzornim vlaknima, holinergičkim i neholinergičkim vlaknima (Massoulie i sar., 1993). AChE oslobađa sinapse od ACh, pa se na taj način zaustavlja prenos signala sa nervne na mišićnu ćeliju. AChE ima izuzetno visoku specifičnu katalitičku aktivnost, posebno za serin hidrolaze i svaki molekul AChE u sekundi razgradi 25000 molekula ACh (Taylor i sar., 1995).
- Butirilholinesteraza (pseudoholinesteraza, BChE) nalazi se prvenstveno u jetri, odakle prelazi u krvotok. Osim acetilholina, katalizuje hidrolizu i drugih bioloških estara, kao što su propionilholin i beznoilholin. Fiziološka uloga ovog enzima nije u potpunosti razjašnjena, ali je utvrđeno da njegova snižena aktivnost prati pojavu nekih patoloških stanja (anemija, karcinom, oboljenja jetre).

Acetilholin (ACh) je neurotransmiter koji se nalazi u centralnom i perifernom nervnom sistemu. Za ACh postoje dve grupe receptora, nikotinski i muskarinski. Tokom neurotransmisije ACh se oslobađa u sinaptičku pukotinu i vezuje za holinergički receptor na postsinaptičkoj membrani prenoseći signal iz neurona.

Ukoliko dođe do degeneracija neurona, usled nedostatka neurotransmitera ACh javlja se gubitak memorijskih funkcija mozga (Katzman i Bick, 2000). Nedostatak neurotransmitera acetilholina u mozgu, primećen je usled smanjene proizvodnje neurotransmitera ili povećane aktivnosti acetilholinesteraze (Arce i sar., 2009). Smanjeni nivo neurotransmitera dovodi do gubljenja intelektualnih sposobnosti, što uzrokuje i nastanak Alchajmerove bolesti (Honda i sar., 2004).

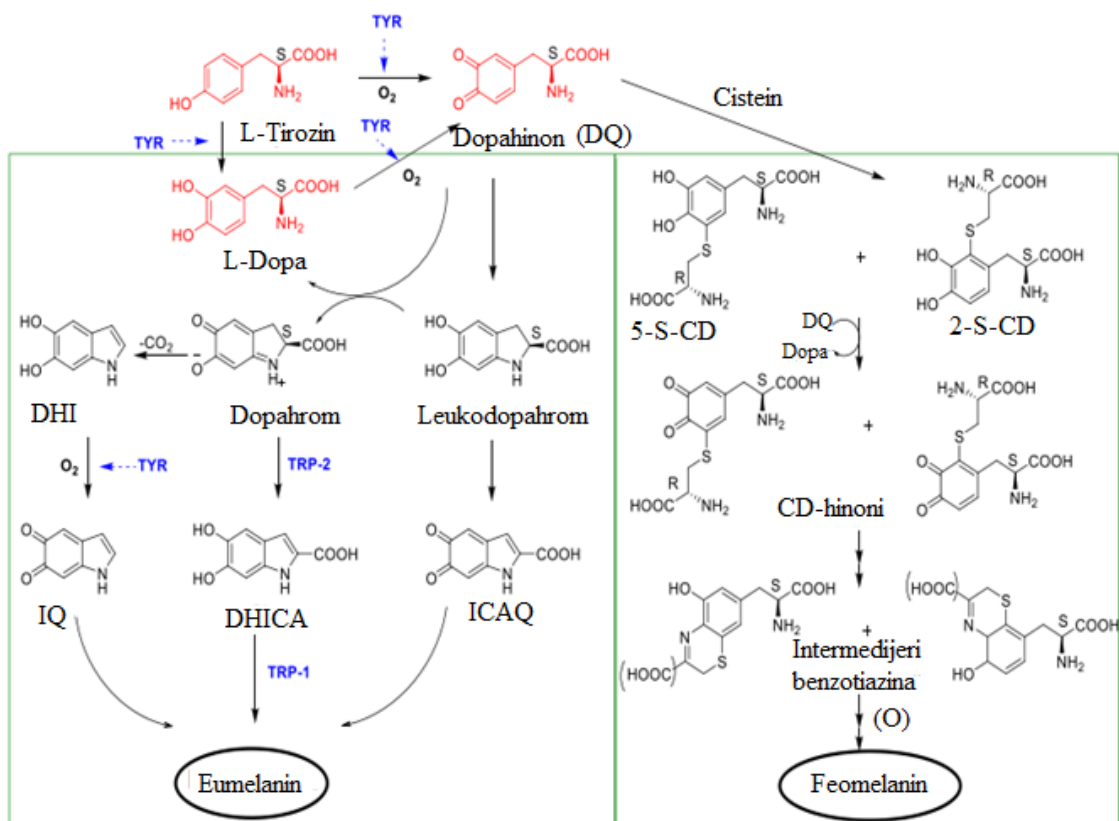
Za lečenje Alchajmerove bolesti i poboljšanja kvaliteta života obolelih, primenjivani su sintetički inhibitori acetilholinesteraze. Sintetička jedinjenja, osim inhibicije enzima, izazivaju i toksične efekte na organizam, zbog čega se sve više teži ka njihovoj zameni nesintetičkim, prirodnim jedinjenjima (WHO, 2015). Rezultati dosadašnjih istraživanja ukazuju da sekundarni metaboliti biljaka, pre svega polifenolna jedinjenja imaju sposobnosti inhibicije AChE. Flavonoidi i fenolne kiseline su pokazali značajnu anti-AChE aktivnost, a posebno: rutin, kvercetin, kempferol, galna, elagna, kafena i ruzmarinska kiselina (Borowiec i sar., 2014). Istraživanja koja su izvedena od strane Grossman i sar. (2013) i Ekin i sar. (2016) su pokazala da osim polifenolnih jedinjenja, alkaloidi i terpenoidi imaju sposobnost inhibicije AChE.

2.3.3. Antitirozinazna aktivnost

Melanin je pigment koji kod sisara uslovljava boju kože, kose i oči i ima važnu ulogu u zaštiti kože od UV zračenja i oksidativnog stresa prouzrokovanog uticajem različitih spoljašnjih faktora (Brenner i Hearing, 2008). Melanin se sintetise iz epidermalnih melanocita u procesu koji se naziva melanogeneza (Bonaventure, Domingues i Larue, 2013). Tokom produkcije melanin se deponuje u melanocitima, koji su smešteni u unutraćelijskim organelama melanozomima (Ito i Wakamatsu, 2008). U melanocitima se sintetisu dve vrste pigmenta melanina:

- eumelanin (smeđe-crni ili tamni nerastvorljivi polimer, koji se nalazi u tamnoj koži i crnoj kosi) i
- feomelanin (crveno-žuti rastvorljivi polimer), koji je povezan sa crvenom vrstom kose.

Melanogeneza je složen put koji uključuje niz složenih enzimskih i hemijskih reakcija. Tri enzima: tirozinaza (TYR), protein-1 povezan sa tirozinazom (TRP-1) i protein-2 povezan sa tirozinazom TRP-2 (inače poznat kao dopahrom tautomeraza, DCT), važni su posrednici melanogeneze, a enzim tirozinaza je neophodan za odvijanje procesa melanogeneze. Proces sinteze melanina prikazan je na Slici 2.2.



Slika 2.2. Biosintetski put melanina (Bonaventure, Domingues i Larue, 2013)

Sinteza melanina započinje oksidacijom L-tirozina i/ili L-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) u prisustvu enzima tirozinaze do dopahinona (DQ), koji je supstrat za sintezu eumelanina i feomelanina (Slika 2.2). Ubrzo nakon formiranja, dopahinon reaguje sa cisteinom, pri čemu se formira 2- ili 5-cistein DOPA, koji zatim oksiduju i polimeriziraju, stvarajući crveno-žute rastvorljive pigmente, poznate pod nazivom feomelanini.

Sa druge strane, dopahinon može da ciklizuje, usled čega dolazi do stvaranja narandžastih intermedijera, dopahroma. Spontanom dekarboksilacijom dopahroma, obrazuje se dihidroksindol (DHI), koji se brzo oksiduje i polimerizuje, stvara se nerastvorni polimer tamnosmeđe-crne boje, velike molekulske mase, poznat kao DHI-melanin.

Međutim, ako je TRP-2 dostupan, dopahrom će tautomerizovati bez gubitka svoje karboksilne kiseline i u procesu tautomerizacije se formira DHI-2-karboksilna kiselina (DHICA), koja može da bude podvrgnuta reakcijama oksidacije i polimerizacije, kako bi se obrazovao DHICA-melanin. Ovaj melanin je svetlosmeđe boje, umereno rastvorljiv i srednje veličine (Ito i Wakamatsu, 2003). TRP-1 i TRP-2 utiču na povećanje aktivnosti tirozinaze. Dostupnost enzima i supstrata koji učestvuju u procesu melanogeneze predstavlja glavni faktor od koga zavisi koja vrsta melanina će biti sintetisana.

Iako melanin ima važnu ulogu u zaštiti kože, nekontrolisana proizvodnja u melanocitima i akumulacija melanina u različitim delovima tela, dovodi do velikog broja ozbiljnih dermatoloških poremećaja, koji uključuju stečene hiperpigmentacije kao što su melazma, pege, solarni lentigo (starosne mrlje) (Ahn i sar., 2006). Tirozinaza je ključni enzim u procesu sinteze melanina u melanocitima, a hiperprodukcija i akumulacija melanina povezani su sa neurodegenerativnim bolestima, uključujući i Parkinsonovu, Alchajmerovu i Huntingtonovu bolest (Ghielen i sar., 2019).

Inhibitori tirozinaze postaju sve važniji u kozmetičkoj industriji, medicini (Kanost, Jiang i Yu, 2004) i prehrambenoj industriji (Lunadei i sar., 2011), prvenstveno zbog svog doprinosa efektu sprečavanja hiperpigmentacije.

Poslednjih godina zabeležen je veliki broj inhibitora tirozinaze sintetičke prirode, među kojima su najpoznatiji hidrohionon, arbutin i kojična kiselina. Ova jedinjenja su se u praksi pokazala kao štetni agensi zbog nuspojava koje se razvijaju kao posledica njihove primene: citotoksičnost, rak kože, dermatitis i neurodegenerativne bolesti (Wang sar., 2019). U cilju sprečavanja razvoja patoloških stanja zbog primene sintetičkih inhibitora, prirodni proizvodi se sve više ispituju kao potencijalni agensi u procesu inhibicije prekomerne aktivnosti enzima tirozinaze.

2.3.4. Antidijabetogena aktivnost

Dijabetes melitus je sve veći globalni zdravstveni problem. Očekuje se da će se do 2030. godine broj od 171 milion dijabetičara širom sveta povećati i do 366 miliona (Xu i sar., 2013). Oko 90% slučajeva dijabetesa u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju su neinsulinski zavisni dijabetes melitus, poznat kao dijabetes tipa 2, koji se najčešće sreće kod odraslih, a karakteriše se postprandijalnom hiperglikemijom i izrazito visokim nivoom glukoze u krvi nakon obroka. Sastavni faktori u procesu nastajanja dijabetesa su otpornost na insulin, hiperinsulinemija, oslabljeno lučenje insulina, smanjeno unošenje i iskorišćenje glukoze posredovano insulinom (Haas i sar., 2014).

U enterocitima tankog creva ugljeni hidrati mogu da se apsorbuju samo u obliku monosaharida (glukoza i fruktoza). Pankreasna α -amilaza je glavni enzim u digestivnom sistemu i uključen je u hidrolizu skroba, glikogena i različitih polisaharida do jednostavnijih oligosaharida, uključujući maltozu, maltotriozu i neke α -(1-6) i α -(1-4) oligoglukane. α -glukozidaza se nalazi u mikrovilima tankog creva, razgrađuje disaharide čineći ih dostupnim za crevnu apsorpciju. Proces digestije ugljenih hidrata odvija se veoma brzo i rezultira postprandijalnim porastom glukoze u krvi. Porast nivoa glukoze u krvi je povezan sa aktivnošću enzima, koji su ključni za metabolizam ugljenih hidrata, α -amilaze i α -glukozidaze koje su lokalizovane u tankom crevu (Gupta i sar., 2018). Inhibicijom glavnih enzima, koji su uključeni u metaboličke procese ugljenih hidrata u digestivnom traktu, smanjuje se rizik od nastajanja dijabetesa.

Akarboza je inhibitor enzima α -glukozidaze, koji utiče na smanjenje apsorpcije glukoze u krvi, tako što utiče na smanjenje proizvodnje ovog enzima u tankom crevu. Međutim, ovaj inhibitor, osim inhibicije digestivnih enzima, dovodi i do nastanka gastrointestinalnih poremećaja, zbog čega je ispitivano alternativno smanjenje aktivnosti digestivnih enzima upotrebom lekovitog bilja, kao odličnog prirodnog izvora velikog broja farmakološki aktivnih jedinjenja (Dhameja i Gupta, 2019). Na osnovu sprovedenih istraživanja od strane različitih istraživačkih grupa utvrđeno je da fenolna jedinjenja biljaka utiču na smanjenje proizvodnje glukoze, koja se oslobađa iz složenih ugljenih hidrata (Zengin i sar., 2018). Ovo saznanje je usmerilo dalja istraživanja ka pronalasku prirodnih inhibitora α -amilaze i α -glukozidaze, koji ne izazivaju neželjene efekte na zdravlje.

2.4. Perspektiva i izazovi u kreiranju novih prehrambenih proizvoda na bazi bobičastog voća

Sve veće interesovanje nauke i tržišta za prirodnim proizvodima otvara mogućnosti da se pored plantažno gajenih i samonikle kulture implementiraju u proizvodnju novih prehrambenih proizvoda, koji će ispunjavati kriterijume funkcionalne hrane. Sa ciljem da se izađe iz tradicionalnih okvira upotrebe pojedinih biljnih vrsta i prevazilaženja barijera na putu ka tržištu, neophodno je dati jak naglasak na istraživanjima interdisciplinarnog karaktera, kako kroz osnovne, tako i kroz kliničke studije. Uloga fitohemikalija bobičastog voća u promociji zdravlja i sprečavanja bolesti važan je korak u tačnom definisanju bioloških potencijala ovih jedinjenja (Stewart i sar., 2007). Buduće studije će se najverovatnije zasnivati na ispitivanju i analizi fitohemikalija na ćelijskom i molekularnom nivou.

Da bi se ostvario napredak u istraživanju potencijalnih zdravstvenih koristi plodova samoniklog voća, naučnici smatraju da je neophodno voditi studije i na nivou gena, što će obezbediti uočavanje i karakterizaciju varijacija u biološkim sistemima. Studije usredsređene na nutricionomiju (efekti hranljivih materija na genom, proteome i metabolomiku) i nutrigenetiku (efekti genetske varijacije na interakciju između ishrane i bolesti) biće od suštinske važnosti (Smith-Hall i sar., 2012). Buduće studije o metabolizmu bioaktivnih jedinjenja u plodovima bobičastog voća će se najverovatnije voditi ka proceni da li se sama jedinjenja ili metaboliti formirani *in vivo* akumuliraju u ciljnim tkivima i da li ispoljavaju biološke efekte u njima. Na primer, moguće je da prilikom unosa, jedinjenja ili njihovih metabolita, uključujući glukuronidizovane, sulfatizovane i metilovane derivate, deluju kao „lekovi” unutar ciljanog tkiva (Shukla i Matto, 2009). Metabolički produkti nastali usled dejstva mikroflore debelog creva iz plodova bobičastog voća mogu takođe značajno doprineti zdravstvenim koristima koja mogu biti rezultat konzumiranja voća (Stewart i sar., 2007). Takođe, moglo bi biti izuzetno važno utvrditi zdravstvene koristi i sinergističke interakcije bobičastog voća obogaćenog aditivnim fitohemikalijama iz drugih prehrambenih proizvoda. Fokus istraživanja na interakciji gena i nutritivnih komponenata i zdravstvenog rezultata nakon interakcije su osnov za sprečavanje hroničnih bolesti, poboljšanje kvaliteta života i promociju zdravlja.

2.5. Mogućnosti prerade bobičastog voća

Primena nerazornih tehnika u procesu prerade sitnog bobičastog voća može pružiti konzistentne i sigurne, kao i hranjive proizvode za potrošače (Chen i sar., 2013), čime se povećavaju njihove ekonomske vrednosti (Opara i Pathare, 2014). Za dobijanje proizvoda od bobičastog voća mogu se koristiti svi delovi biljke, jer su plod, cvet, list, kora i semenke izuzetno bogati biološki vrednim molekulima. Bobičasto voće se prerađuje na različite načine, ali u osnovi su: ceđenje, sušenje, sitnjenje, destilacija i ekstrakcija. Tehnološki postupak koji se primenjuje u obradi bobičastog voća mora biti ekološki opravdan, kako bi se izbegli štetni uticaji na životnu sredinu.

2.5.1. Sušenje

Za obradu materijala na putu prevođenja sirovine u proizvod u prehrambenoj, hemijskoj i farmaceutskoj industriji tehnološki postupak sušenja predstavlja osnovnu operaciju. Proces sušenja podrazumeva uklanjanje vlage iz vlažnog materijala, dovođenjem toplote i isparavanjem vode iz sirovine. Tehnika sušenja u prehrambenoj industriji je od izuzetnog značaja, jer se uklanjanjem vode iz proizvoda onemogućava rast mikroorganizama, kao glavnih kontaminenata hrane. Tehnika sušenja se sve više razvija, optimizuje i primenjuje na industrijskom nivou, u cilju dobijanja što kvalitetnijih proizvoda (Menon, Stojceska i Tassou, 2020).

Pokušaji da se poboljša energetska efikasnost procesa sušenja i kvalitet sušenog proizvoda doveli su do razvoja mnogih tehnika sušenja, što je uticalo da se tradicionalne tehnike sušenja postepeno zamenjuju savremenim. Sve veće interesovanje prehrambene industrije privlači liofilizacija, kojom se može obezbediti održiv kvalitet gotovih proizvoda. Pored liofilizacije mogu se primenjivati i drugi načini sušenja: sušenje u fluidizovanom sloju, sušenje raspršivanjem, sušenje iz smeše leda i vode, sušenje u peni, kao i eksplozivno sušenje (Mar i sar., 2020). U okviru ove doktorske disertacije, sušenje sirovine se odvijalo primenom liofilizacije, stoga će više pažnje biti posvećeno ovoj tehnici uklanjanja vode/vlage iz sirovog/vlažnog materijala.

2.5.1.1. Tradicionalne tehnike sušenja

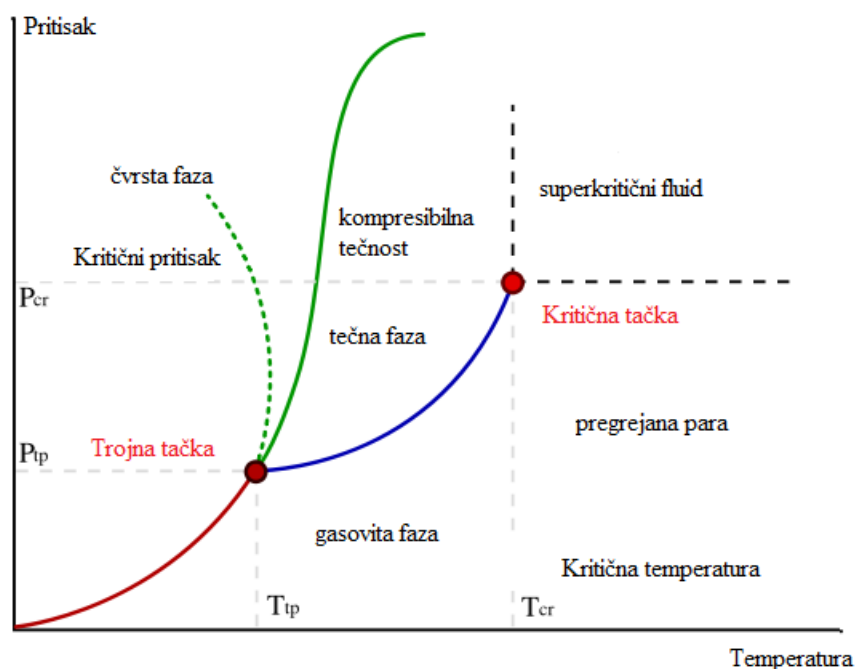
Sušenje kao tradicionalna tehnika se i danas primenjuje, ali u znatno manjem obimu. Tradicionalno sušenje se odvija napolju u posebno pripremljenom prostoru, u kome dolazi do strujanja vazduha, bez direktnog izlaganja suncu. Pripremljeni materijal za sušenje se postavlja na lese u rastresitom sloju i u toku sušenja biljni materijal treba povremeno okrenuti sa jedne na drugu stranu, radi efikasnijeg sušenja, a takođe je potrebno izbeći drobljenje i usitnjavanje materijala. Ukoliko se materija rasporedi u debelom sloju, neće doći do efikasnog sušenja, usled visoke temperature može doći do fermentacije, što izaziva kvarenje proizvoda. Kvalitet ovako osušenog biljnog materijala je različit. Prednost ove tehnike sušenja u odnosu na savremene se ogleda u ekonomskoj isplativnosti, izbegnuto je zagađenje životne sredine, dok glavni nedostatak predstavlja dugo trajanje procesa sušenja (Dehnad, Jafari i Afrasiabi, 2016).

2.5.1.2. Savremene tehnike sušenja

Sušenje zamrzavanjem ili liofilizacija je tehnika sušenja, koja se izvodi u vakuumu. Proces liofilizacije se zasniva na sublimaciji vode iz zamrznute sirovine, kontrolom kritičnih parametara temperature i pritiska. U cilju što boljeg odvijanja procesa sušenja potrebno je da temperatura u toku sušenja bude dovoljno niska i da se obezbedi dovoljno visok vakuum. Proces liofilizacije se zasniva na sublimaciji kristalnog oblika vode iz zamrznute sirovine, pri čemu se zagrevanjem obrazuje parna faza, bez stvaranja tečne faze (Grabowski i sar., 2005).

Kontrolisana primena toplote u toku liofilizacije je bitna karakteristika ovog procesa, jer je na taj način izbegnuta mogućnost degradacije visokovrednih jedinjenja koje sirovina sadrži, ali je vreme sušenja u visokom vakuumu dugo. Vreme trajanja liofilizacije može da bude i do 48 sati, u zavisnosti od sirovine koja se suši.

Prilikom kontrolisanog snižavanja temperature i pritiska voda može biti istovremeno u čvrstom, tečnom i gasovitom agregatnom stanju. Tačka u kojoj su sva tri stanja vode u ravnoteži naziva se trojna tačka, prikazana na faznom dijagramu za vodu (Slika 2.3). Vrednosti temperature i pritiska vode u trojnoj tački su 0°C i $611,657\text{ Pa}$. Kada su pritisak i temperatura ispod trojne tačke voda se nalazi u obliku leda i iz čvrste faze prelazi u gas, odnosno započinje proces sublimacije (Šumić, 2014).

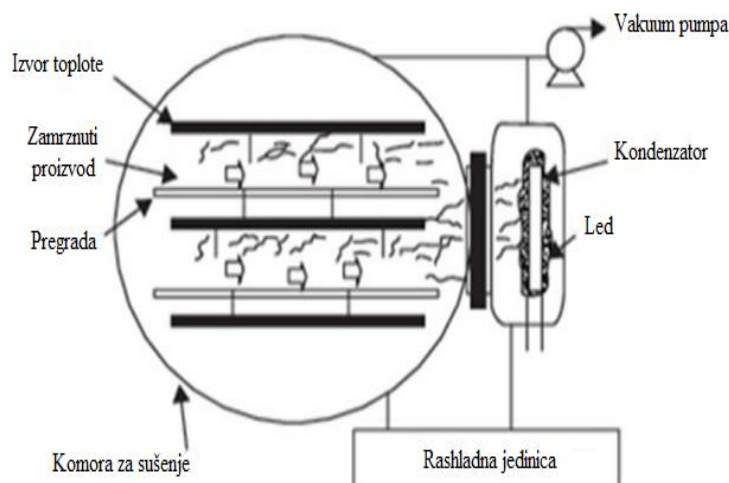


Slika 2.3. Fazni dijagram za vodu
(https://www.wikiwand.com/bs/Fazni_dijagram)

Atmosferski pritisak i temperatura okolne sredine ispod nule su takođe pogodni uslovi za odvijanje sublimacije vode, ali je tada brzina sušenja izuzetno mala, skoro neznatna.

Konstrukcija uređaja za liofilizaciju se može razlikovati u zavisnosti od načina rada i namene. U zavisnosti od načina rada uređaji za sušenje mogu biti konstruisani kao kontinualni i diskontinualni. Kontinualni tipovi uređaja podrazumevaju trakaste i tunelske sušnice, dok se diskontinualni uglavnom odnose na komorne sušnice.

U osnovi, svaki tip liofilizatora se sastoji od komore za sušenje, polica (lesa), na kojima se nalazi sirovina koja je spremna za sušenje, grejača, kondenzatora, vakuum pumpe i izvora toplote (Slika 2.4).



Slika 2.4. Konstrukcija uređaja za liofilizaciju (Šumić, 2014)

Za obezbeđivanje i održavanje vakuuma u komori i kondenzatoru zadužena je vakuum pumpa. Kada dođe do sublimacije čvrste faze vode, obrazuje se para velike zapremine, a da bi se vakuum održao u sistemu, neophodno je obezbediti vakuum pumpe velike snage.

Kada se između komore za sušenje i vakuum pumpe postavi kondenzator, dolazi do potpunog uklanjanja vodene pare, a vakuum pumpa usvaja samo nekondenzovane gasove. Razlika parcijalnih pritisaka iznad površine sirovine koja se suši i površine kondenzatora uslovljava brzinu kondenzacije. Kretanje molekula vode u pravcu kondenzatora se odvija zbog toga što je pritisak pare kondenzatora niži od parcijalnog pritiska pripremljene sirovine za sušenje. Na osnovu parcijalnih pritisaka zaključuje se da temperatura kondenzatora mora biti niža od temperature sirovine. Kada para stupi u kontakt sa površinom za kondenzovanje, hladi se i tada dolazi do formiranja kristala leda, koji se uklanjaju iz sistema. Temperatura površine kondenzatora zavisi od temperature sirovine koja se suši.

Grejači obezbeđuju toplotu koja je neophodna da bi se ubrzalo isparavanje vode, što direktno utiče na povećavanje brzine sušenja. Osim električnih grejača izvor toplote može da bude i medijum

koji struji kroz ploče, a sirovina koja se suši postavljena je na lese, koje se nalaze na zagrejanim nosačima.

Proces liofilizacije može biti potpomognut mikrotalasnim zagrevanjem, jer delovanjem mikrotalasa obezbeđuje se efikasnije i uniformnije zagrevanje. U toku procesa sušenja, unutar sirovine se odvija prenos mase i toplote. Prenos mase se odvija uvek kroz suvi sloj, dok se prenos toplote može sprovesti i kroz suvi i kroz zamrznuti sloj, a takođe u zamrznutom sloju postoji mogućnost generisanja toplote pomoću mikrotalasa (Wolti-Chanes i sar., 2005).

Proces liofilizacije odvija se u tri faze:

- a) zamrzavanje sirovine (solidifikacija),
- b) primarno sušenje (sublimacija leda) i
- c) sekundarno sušenje sirovine (desorpcija nezamrznute vode).

a) Zamrzavanje je glavni korak u procesu dehidracije sirovine tokom liofilizacije (Pikal i sar., 2016). Voda iz tečnog oblika prelazi u čvrstu fazu, što dovodi do koncentrisanja molekula vode u vidu kristala (Franks i Auffret, 2007). Zamrzavanje je kritični korak u pogledu biološke aktivnosti i stabilnosti aktivnih bioloških i farmakoloških sastojaka. Ukoliko se zamrzavanje odvija postepeno, obrazuju se veći kristali leda, pa pore u strukturi sirovine imaju grubu strukturu. Ovakva struktura leda omogućava lakši protok pare, pa se na taj način smanjuje vreme primarnog sušenja. Obrazovanje sitnijih kristala leda se javlja prilikom bržeg zamrzavanja, što dovodi do stvaranja fine strukture pora unutar sirovine, zbog čega proces primarnog sušenja duže traje (Schneid i sar., 2009). Pravilnim zamrzavanjem sirovine obezbeđuje se dugoročna stabilnost proizvoda, posebno lekova (Tang i Pikal, 2004). Oko 50% trenutno plasiranih biofarmaceutskih preparata su liofilizovani, što predstavlja najčešću strategiju u formulaciji ove vrste proizvoda (Anchordoquy i sar., 2004). U proizvodima koji su osušeni zamrzavanjem reakcije hemijske ili fizičke degradacije su inhibirane ili dovoljno usporene, što rezultuje većom stabilnošću proizvoda (Carpenter i sar., 1997). Pored prednosti u boljoj stabilnosti proizvoda, liofilizovane formulacije su jednostavnije za rukovanje tokom transporta i skladištenja (Tang i Pikal, 2004).

b) Tokom faze primarnog sušenja, pritisak u komori je snižen, kako bi se omogućila sublimacija čvrste kristalne strukture i izdvajanje slobodne vode. Da bi se primarno sušenje smatralo završenim, važno je da sirovina koja se suši sadrži 6-8% vode. Brzina sublimacije leda iz zamrznute sirovine zavisi od razlike pritiska pare iznad sirovine i u kondenzatoru. Migracija molekula se odvija iz oblasti višeg pritiska, odnosno iznad sirovine, ka oblasti nižeg pritiska, prema kondenzatoru. Veoma je važno da temperatura na kojoj se sirovina suši bude izbalansirana između temperature koja održava sirovinu u zamrznutom stanju i temperature koja maksimizuje pritisak isparavanja vode iz sirovine. Ovaj balans je ključ optimizacije sušenja zamrzavanjem. Dovod toplote sirovini mora se pažljivo kontrolisati, naročito tokom ranih faza sušenja. Sirovini je potrebno dovesti što je moguće više toplotne energije radi ubrzanja sušenja, ali tako da ne dođe do prelaska vode iz čvrstog u tečno stanje. Pored dovedene toplote, na brzinu sušenja utiče i odnos površine prema zapremini sirovine. Što je ovaj odnos veći i brzina sušenja je veća. Ovo je posledica

veće površine isparavanja u poređenju sa razdaljinom koju molekul mora da pređe do površine zamrznute sirovine. Sušenje se odvija od površine sirovine i inicijalno uklanjanje molekula vode je brzo. Međutim, kako se front sušenja pomera ka centru sirovine, sušenje postaje sve teže. Molekuli vode tada moraju proći kroz osušene delove proizvoda, što ometa njihov napredak. Kako se front sušenja pomera sve dalje u unutrašnjost sirovine, dovođenje toplote sirovini postaje sve važnije (Schneid i sar., 2009).

c) Sekundarnim sušenjem se iz sirovine desorpcijom izdvaja tzv. vezana (nezamrznuta) voda. Izdvajanje vezane vode zahteva nastavak sušenja na višoj temperaturi. Pošto na kraju primarnog sušenja u sirovini nema slobodne vode, temperatura sirovine može se povećavati, a da ne dođe do topljenja. Temperatura sirovine se povećava, da bi se desorbovala granična voda. Sirovina se suši sve dok sadržaj rezidualne vode ne opadne na nivo koji se zahteva za optimalnu stabilnost proizvoda. Temperatura sirovine ne sme se prebrzo povećavati, kako ne bi došlo do pregrevanja sirovine. Da bi se proces desorpcije ubrzao, vakuum u sistemu treba da bude što je moguće viši, a temperatura kondenzatora što je moguće niža. Dužinu sekundarne faze određuju karakteristike sirovine i performanse uređaja. Sekundarna faza sušenja zahteva od 30 do 50% vremena potrebnog za primarno sušenje (Schneid i sar., 2009). Razlog ovome je niži pritisak ostataka vezane vode od pritiska slobodne vode na istoj temperaturi. Na kraju sekundarnog sušenja dobija se proizvod koji ima niži sadržaj vode. Mnogi proizvodi, kao što su proteini i peptidi, zahtevaju vodu kako bi održali sekundarnu i tercijarnu strukturu. U ovom slučaju, sadržaj vode mora biti pažljivo kontrolisan. Prekomernim uklanjanjem vode materijal može izgubiti prirodna svojstva, odnosno, delimično ili potpuno, svoju aktivnost. Dodatno, prekomerna toplota može izazvati smanjivanje i ugljenisanje suvog ostatka (Schneid i sar., 2009). Uklanjanjem i tzv. vezane vode omogućava se uspešno čuvanje proizvoda i pri skladištenju na sobnoj temperaturi. Sušenje zamrzavanjem je završeno kada se ukloni sva slobodna voda i deo vezane vode do mere koja omogućava zaostajanje rezidualnog nivoa vode koji osigurava integritet željene strukture i stabilnost proizvoda (Pisano i sar., 2019).

Nakon liofilizacije dobijaju se proizvodi koji imaju veliki kapacitet rehidracije, malu gustinu i zadržavaju karakteristike, koju je sirovina imala u početnoj fazi sušenja, a to se pre svega odnosi na izgled, miris i ukus, što ovoj tehnici sušenja daje glavnu prednost. Ispitivanja su pokazala da je materijal dobijen ovim načinom sušenja stabilniji pri čuvanju u odnosu na materijale koji se suše tradicionalnim tehnikama. Važno je istaći da nije samo u pitanju mogućnost očuvanja izvornog kvaliteta sirovine koja se suši, već se mogu očekivati i poboljšanja svojstava na račun koncentracije nutritivno vrednih jedinjenja. Utrošak električne energije i vreme trajanja procesa se smatraju glavnim nedostacima ove tehnike sušenja.

2.5.2. Ekstrakcija

Ekstrakcija je difuziona tehnološka operacija kojom se iz različitog materijala izoluju bioaktivna jedinjenja primenom pogodnih ekstragenasa. Cilj ovog tehnološkog postupka je da se nakon uklanjanja rastvarača dobiju komponente u čistom stanju. Ekstrakti, odnosno izlovane komponente se primenjuju u svim granama industrije za unapređenje proizvoda. Za dobijanje što čistijih i visokovrednih ekstrakata naučna istraživanja su otišla korak dalje i na laboratorijskom nivou. Poslednjih godina razvile su se i savremene ekstrakcione tehnike koje su dobile primarnu ulogu u industriji, u procesu izolovanja fitohemikalija.

2.5.2.1. Tradicionalne tehnike ekstrakcije

Ekstrakcija je fundamentalni proces izolovanja sekundarnih metabolita iz biljnih sirovina i osim što zauzima posebno mesto u naučnim studijama, u svim granama industrije je neophodno izvođenje ove tehnološke operacije, čiji proizvodi (ekstrakti) imaju primenu u kozmetičke i terapijske svrhe, ali se sve više mogu naći kao prirodni dodaci prehrambenim proizvodima u cilju poboljšanja njihove funkcionalnosti (Belwal i sar., 2018).

Potražnja različitih grana industrije za biljnim sirovinama sa niskom cenom prerade eksponencijalno raste. Produkti biljne prerade se karakterišu kao visokokvalitetni proizvodi na kojima se zasniva biljna/tradicionalna medicina. U cilju povezivanja nauke i privrede i postizanja odgovora na sve zahteve industrije tradicionalne tehnike ekstrakcije, kao što su maceracija, perkolacija, Soxhlet ekstrakcija, se sve više zamenjuju savremenim tehnikama. Zamena tradicionalnih ekstrakcionih tehnika je usledila zbog velike količine rastvarača koju zahtevaju, veće količine biljnog materijala i dužeg vremena trajanja ekstrakcije, pri čemu je prinos ekstrakcije mali. Glavni trendovi izolacije analita uključuju manju potrošnju rastvarača, veći prinos, bolju reproduktivnost i ponovljivost (Belwal i sar., 2018).

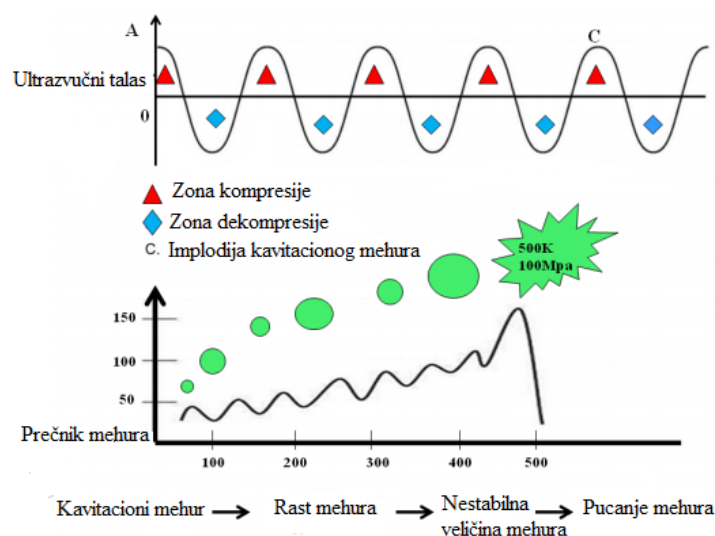
U tom kontekstu, razvijene su tehnike ekstrakcije, koje sve više zamenjuju tradicionalne tehnike, a među njima su ultrazvučna ekstrakcija (UAE) i mikrotalasna ekstrakcija (MAE) (Leonelli i Mason, 2010).

2.5.2.2. Savremene tehnike ekstrakcije

Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvuk je definisan kao frekvencija veća od 20 kHz i koja je veća od praga osetljivosti ljudskog sluha (Sanderson, 2002). Izvor ultrazvuka je obično vibrirajuće telo, zbog čega okolni medijum vibrira, usled čega ultrazvučni talas prenosi energiju na susedne čestice. Glavni fizički parametri u procesu ultrazvučne ekstrakcije su: snaga, frekvencija i amplituda ultrazvuka. Nivo energije na kojoj se ultrazvuk širi kroz medijum izražava se kao ultrazvučna snaga. Ultrazvuk može proizvesti kavitaciju, vibracije, drobljenje, mešanje i ovi efekti mogu razoriti ćelijski zid i obezbediti ekstrakciju prirodnih jedinjenja veoma uspešno (Ruiz-Jiménez, Priego-Capote i de Castro, 2004; Cravotto i sar., 2008). Efektivna frekvencija ultrazvuka se kreće od 20 do 50 kHz.

Veruje se da efekti kavitacije, kao i toplotni i mehanički efekti imaju značajan uticaj na ekstrakcioni postupak ultrazvukom. Ovi efekti dovode do razaranja ćelijske strukture, smanjuju veličinu čestica i povećavaju brzinu reakcija prenosa mase bez izazivanja promene strukture i funkcije ekstrakata (Ashokkumar, 2015). Pored frekvencije i intenziteta ultrazvuka, pojava kavitacije zavisi od osobina proizvoda, kao što su viskoznost, površinski napon i gustina sredine (Leighton, 2007). Odvijanje procesa ultrazvučne kavitacije prikazano je na Slici 2.5.



Slika 2.5. Proces ultrazvučne kavitacije (Wen i sar., 2018)

Ultrazvuk visoke frekvencije usled delovanja kavitacije na ćelijski zid materijala, omogućuje veće prodiranje rastvarača u materijal i povećava prenos mase (Patist i Bates, 2008). Na taj način se ubrzava ekstrakcija i povećava se njena efikasnost.

Poznata su dva oblika kavitacije: stabilan i prolazan. Stabilna kavitacija podrazumeva da mehuri osciluju oko svog ravnotežnog pložaja preko nekoliko ciklusa širenja i sabijanja. Kod prolazne kavitacije, mehuri rastu preko jednog akustičnog ciklusa do dvostruke veličine i na kraju se

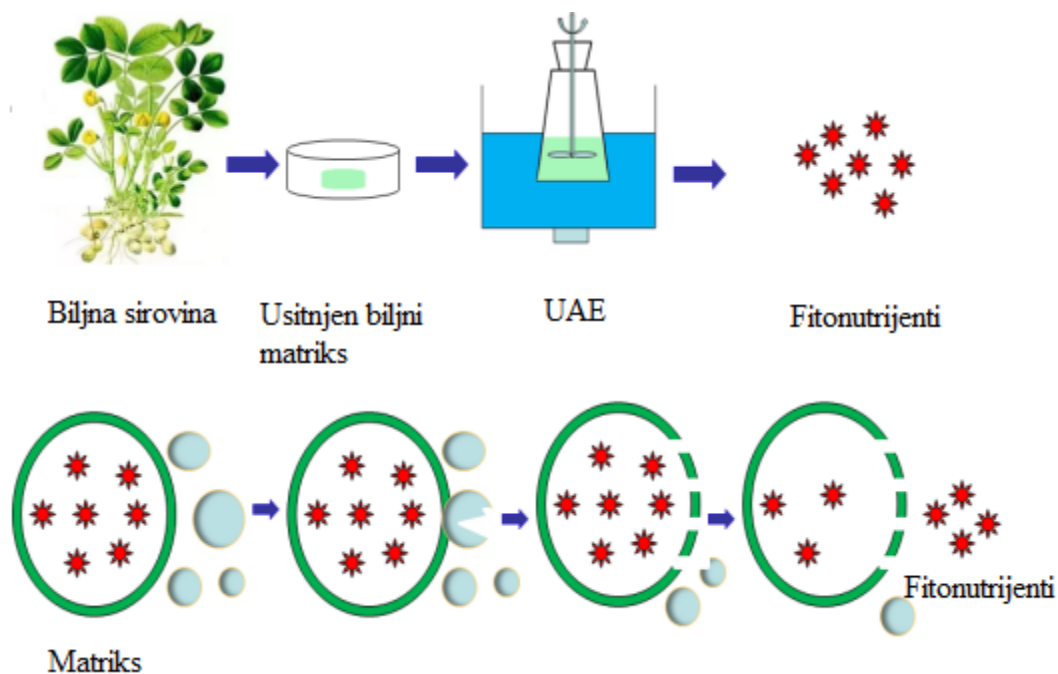
raspadaju u blizini ćelije i na taj način utiču na oslobađanje komponenti iz ćelije. Kavitacija može uticati na promenu hemijskih procesa u sistemu i povećati brzinu reakcije ili pokrenuti nove reakcione mehanizme formiranjem različitih vrsta slobodnih radikala. Ovi radikali su uglavnom hidroksil radikali, koji mogu da izazovu oštećenje ćelije (Arzeni i sar., 2012).

Veličina i masa kavitacionih mehurića je usko povezana sa odabirom frekvencije (Esclapez i sar., 2011). Dakle, izbor odgovarajuće frekvencije je važan korak za izvođenje ultrazvučne ekstrakcije (UAE eng. Ultrasound assisted extraction).

Pored toga, neke studije su pokazale da velika amplituda uzrokuje eroziju ultrazvučne sonde i smanjuje stvaranje kavitacije (Chemat i sar., 2017). Odabir rastvarača je od izuzetnog značaja, jer faktori koji utiču na efikasnost UAE uključuju: tip rastvarača, količinu i koncentraciju rastvarača, odnos rastvarača i rastvorka (Li, Pordesimo i Weiss, 2004). U većini slučajeva voda se koristi kao rastvarač tokom ultrazvučnog procesa. Pored toga, etanol, metanol i heksan se takođe koriste za ekstrakciju, posebno etanol, jer pospešuje ekstrahovanje bioaktivnih jedinjenja i zbog svoje bezbednosti (Stanisavljević, Lazić i Veljković, 2007). Visoka temperatura povećava brzinu difuzije komponenata iz matriksa, ali je neophodno kontrolisati temperaturu, jer može dovesti do narušavanja strukture fitohemijskih jedinjenja. Drugo, vreme ekstrakcije povećava prinos ekstrakcije, ali može izazvati neželjene promene u strukturi ekstrahovanih jedinjenja. Na prinos ekstrakcije takođe može uticati veličina čestica matrice zbog činjenice da je ekstrakcija povezana sa izloženom površinom i dužinom puta molekularne migracije (Sun i sar., 2011).

Potrebno je uzeti u obzir da prinos nije uvek jedini cilj procesa ekstrakcije. Štaviše, čisti, zeleni i održivi faktori na životnu sredinu veoma su značajni u izvođenju svakog procesa izolovanja.

Smatra se da je ultrazvučna ekstrakcija jedna od najjednostavnijih tehnika ekstrakcije, jer se lako izvodi u laboratoriji (najčešće u ultrazvučnom kupatilu). Nakon usitnjavanja, uzorak se pomeša sa odgovarajućim rastvaračem, stavlja u ultrazvučno kupatilo, u kom su unapred podešeni temperatura, frekvencija i vreme trajanja ekstrakcije (Garcia-Salas i sar., 2010). U poređenju sa standardnim metodama ekstrakcije, ultrazvučnom ekstrakcijom se dobija veći prinos željene komponente i smanjuje se vreme ekstrahovanja. Većina supstanci se ekstrahuje u toku prvih 10 minuta. Dobijanje visokovrednih biljnih ekstrakata primenom UAE ekstrakcije prikazano je na Slici 2.6.



Slika 2.6. Šematski prikaz procesa ultrazvučne ekstrakcije u dobijanju fitonutrijenata (Wen i sar., 2018)

Prednosti ultrazvučne ekstrakcije u odnosu na tradicionalne tehnike su:

- skraćeno vreme ekstrakcije,
- ekstrakcija se izvodi na nižim temperaturama (moguća ekstrakcija termolabilnih komponenata),
- smanjena upotreba rastvarača i
- ekološki prihvatljiva tehnika (Wang i Weller, 2006).

Mikrotalasna ekstrakcija

Mikrotalasna ekstrakcija (MAE eng. Microwave assisted extraction) je postupak koji se sastoji od prenosa analita iz čvrste matrice u rastvarač usled delovanja mikrotalasnog zračenja, koje omogućava bržu i efikasniju ekstrakciju u poređenju sa klasičnim tehnikama. MAE kombinuje upotrebu tradicionalne ekstrakcije (čvrsto-tečno) i rastvarača sa mikrotalasnom energijom, koja se koristi za zagrevanje rastvarača, koji je u kontaktu sa sirovinom iz koje se ekstrahuju ciljane jedinjenja. Efekat mikrotalasne energije zavisi od prirode rastvarača i matriksa. Mikrotalasi predstavljaju nejonizujuće elektromagnetno zračenje, frekvencije između 300 MHz i 300 GHz. Ovi talasi su rezultat delovanja električnog i magnetnog polja, koja su postavljena upravno jedno na drugo (Kappe, Stadler i Dallinger, 2012; Kaufmann i Christen, 2002). Grejanjem pod dejstvom mikrotalasa energija se prenosi molekulskom interakcijom sa elektromagnetnim poljem. Mikrotalasno zagrevanje predstavlja dielektrično zagrevanje koje se zasniva na sposobnosti nekih supstanci da prevedu elektromagnetno zračenje u toplotu. Sam proces zagrevanja mikrotalasa se može objasniti pomoću dva fenomena:

- jonske kondukcije i
- rotacije dipola.

Elektroforetska migracija jona se javlja usled dejstva električnog polja, što zapravo predstavlja fenomen jonske kondukcije. U toku migracije jona, javlja se otpor rastvora, pri čemu se generiše trenje, na osnovu čega se rastvor zagreva (Armstrong, 1999). To je odgovor zašto se rastvori koji sadrže jone brže zagrevaju pod dejstvom mikrotalasa u odnosu na polarne rastvarače. Primer uticaja polarnosti je i činjenica da se česmenska voda brže zagreva od destilovane (Kappe, Stadler i Dallinger, 2012; Lidstrom, Westman i Lewis, 2002).

Rotacija dipola je mehanizam kojim se takođe rastvor može zagrevati. Kada se izlože dejstvu mikrotalasa, dipolni molekuli se orijentišu prema električnom polju. Međutim, neprestanim praćenjem promene smera električnog polja, javljaju se gubici energije i rastvor se zagreva usled trenja (Mandal, Mohan i Hemalatha, 2007). Gasovi izloženi delovanju mikrotalasa ne mogu se zagrevati, jer je preveliko rastojanje između molekula gasa (Kappe, Stadler i Dallinger, 2012). Postoji mogućnost formiranja oblasti veoma visoke temperature, 'hotspot'-ova, što dovodi do neuniformnog zagrevanja. Pretpostavlja se da ovaj fenomen nastaje kada je nepolarna supstanca izložena dejstvu mikrotalasa u polarnom medijumu, usled čega se javlja toplotna nestabilnost, koja je uzrokovana nelinearnom zavisnošću toplotnih i elektromagnetnih osobina materijala od temperature (Kappe, Stadler i Dallinger, 2012).

MAE je tehnika koja korišćenjem mikrotalasne energije za zagrevanje rastvarača u kontaktu sa uzorkom povećava efikasnost ekstrakcije. Uzorak i rastvarač se smeštaju u hermetički zatvorene sudove i zagrevaju pomoću mikrotalasa (300-700 W). Ekstrakcija može da se izvodi na tački ključanja rastvarača, uz refluks, ili i na još višim temperaturama (Orčić, 2016).

Primenom mikrotalasa skraćuje se vreme ekstrakcije, povećava prinos i čistoća dobijenih produkata. Pored brojnih istraživanja usmerenih na primenu mikrotalasa u hemiji, još uvek nije u potpunosti razjašnjeno kako mikrotalasi utiču na kinetiku hemijskih reakcija. U odnosu na tradicionalne tehnike, zagrevanje putem mikrotalasa ima više prednosti (Chou i sar., 2009; Hayes, 2002; Jones, Faragher i Winkler, 2006):

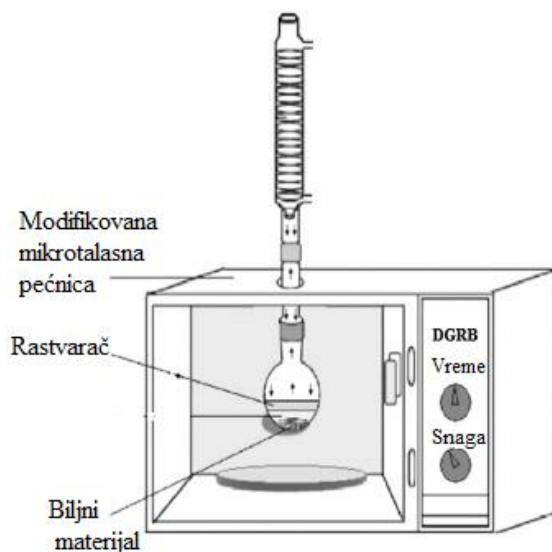
- veća brzina zagrevanja,
- izbegnut je direktan kontakt materije koja se greje sa izvorom toplote,
- lakša kontrola procesa,
- manje dimenzije uređaja i
- manja količina otpada.

Uzorci ili rastvarači koji sadrže dielektrični materijal (supstance koje imaju indukovani ili stalni dipolarni momenat) mogu da apsorbuju mikrotalasnno zračenje i kao posledica toga može doći do brzog i ujednačenog grejanja.

Sposobnost brzog i ujednačenog zagrevanja uzorka je glavna prednost ove tehnike, postupak ekstrakcije traje 15-30 minuta i zahteva male količine rastvarača (od 10-30 ml). Ove količine su oko deset puta manje od količina rastvarača koje zahtevaju tradicionalne tehnike ekstrakcije. Osim toga, moguća je paralelna obrada nekoliko uzoraka, fina regulacija i programiranje uslova ekstrakcije (za svaki od uzoraka) uz veći izbor rastvarača.

Rastvarači koji se najčešće koriste za MAE su metanol, etanol, aceton, heksan, voda i njihova smeša. Visoka temperatura koja se dostiže sa mikrotalasnim zagrevanjem povećava moć rastvaranja većine rastvarača, smanjenjem površinskog napona i viskoziteta rastvarača, što poboljšava kvašenje uzorka i prodiranje u matriks (Eskilsson i Björklund, 2000).

Abu - Samra i sar. (1975) su prvi istraživači koji se koristili kuhinjsku mikrotalasnú peć u laboratoriji prilikom analiza tragova metala iz bioloških uzoraka. Vremenom su razvijene mnoge tehnike MAE ekstrakcije za različite vrste uzoraka. Kuhinjske mikrotalasnne peći kod kojih nije uvek bilo jednostavno kontrolisati uslove ekstrakcije, zamenjene su odgovarajućim mikrotalasnim uređajima za laboratorijsku upotrebu (visoka cena je jedan od ograničavajućih faktora primene MAE u ove svrhe). Modifikovana mikrotalasnna pećnica namenjena procesu ekstrakcije prikazana je na Slici 2.7.



Slika 2.7. Uređaj za mikrotalasnu ekstrakciju (otvoren sistem)
(Huang i sar., 2011)

Sa gledišta zelene hemije, glavne prednosti MAE sastoje se u značajnom smanjenju potrebnih količina rastvarača i uzorka, kao i vremena ekstrakcije, potrošnje energije, odlaganje rastvarača u okolinu, kao i štetnih uticaja na ljude. Mikrotalasna ekstrakcija se često primenjuje za analizu organskih jedinjenja kod čvrstih uzoraka. Ovaj tip ekstrakcije značajan je za izolaciju prirodnih biomolekula kao što su: polifenolna jedinjenja, flavanoidi, pigmenti, vitamini i alkaloidi. Mikrotalasnom ekstrakcijom, moguće je dobiti slične udele ekstrahovanih komponenata kao i standardnim tehnikama, ali za kraće vreme, što je energetski i ekonomski isplativo (Vian i sar., 2008).

Međutim, postoje i negativna dejstva mikrotalasa, na termolabilne komponente, što za posledicu ima smanjenje kvaliteta ekstrahovanog materijala i narušavanje strukture bioaktivnih jedinjenja. Mikrotalasna ekstrakcija se smatra kao potencijalna alternativa tradicionalnoj čvrsto-tečnoj ekstrakciji za izolovanje aktivnih principa iz biljaka.

2.5.3. Ceđenje/presovanje

Ceđenje voća se zasniva na sitnjenju plodova, kako bi se dezintegrisale ćelije u kojima se nalazi sok, kako bi se povećala površina voća koja se izlaže pritisku. Ceđenje ima za cilj izdvajanje soka iz zrelih plodova voća primenom presa za ceđenje, koje mogu biti ručne ili industrijske, hidraulične prese. Prinos soka zavisi od stepena zrelosti ploda, ali i od biljne vrste koja se cedi, kao i od tipa prese koja se koristi. Meko bobičasto voće se ostavi da se samo cedi, a kada sok prestane da se izdvaja iz ploda, onda se pristupa ceđenju/presovanju.

2.5.3.1. Matični sok

Veća zastupljenost plodova biljaka u ishrani čoveka, uticala je da industrija pića favorizuje proizvodnju funkcionalnih proizvoda, posebno sokova, kao svežih napitaka. Voćni sokovi su bogati nutritivnim komponentama i nemaju alergene. Ova vrsta sokova predstavlja profil ukusa koji se smatra prijatnim za sve starosne grupe, percipiraju kao zdrava i osvežavajuća pića, i redovno se konzumiraju. Neki prirodni sokovi imaju visoku kiselost, mogu prirodno da sadrže inhibitore mikrobnog rasta i mogu se dodavati prehrambenim proizvodima (boje i arome). Aroma svežeg soka nastaje zbog kompleksnog sastava isparljivih jedinjenja, kao i prisustva polifenolnih komponenata (Zanini i sar., 2016).

Sadržaj jedinjenja koja daju karakterističan miris sokovima se menja u zavisnosti od zrelosti, kao i primenjene tehnike prerade plodova.

Miris sveže ceđenog soka se primetno razlikuje od toplotno obrađenih sokova, jer prilikom prerade dolazi do gubitaka aromatičnih jedinjenja ili nastajanja neprijatnih mirisa tokom zagrevanja i skladištenja proizvoda, što loše utiče na plasman soka, jer potrošačka očekivanja nisu ispunjena.

Zbog toga su neki proizvođači podstakli proizvodnju sveže ceđenih sokova bez aditiva, šećera, vode i tvrde da sadrže više nutritivnih komponenti i da se mogu čuvati duže od sokova koji su dobijeni u sokovnicima. Ova tvrdnja je zasnovana na činjenici da se u centrifugalnim sokovnicima plodovi voća sitne pomoću metalne oštrice i primenom centrifugalne sile, usled čega dolazi do odvajanja ekstrakta soka od voćnog mesa (pulpe). Metalna oštica se rotira velikom brzinom, u toku koje se razvija toplota koja negativno utiče na sadržaj bioaktivnih komponenata u soku. Suprotno tome, tradicionalno sveže ceđeni sokovi se dobijaju ručnim sitnjenjem plodova i pritiskanjem usitnjenih plodova iz kojih se oslobađa sok. Prilikom ručnog ceđenja soka ne dolazi do oslobađanja toplote i nutritivni sastav soka je očuvan, što opravdava i tržišna cena ručno ceđenih sokova, koja je veća od cene uobičajnih.

Uticaj temperature i vremenskog perioda skladištenja soka su važni parametri koji su povezani sa kvalitetom ovog proizvoda. U studiji koju su izveli Khaksar i sar. (2019) utvrđeno je da su sveže ceđeni sokovi koji nisu pasterizovani i u kojima ne postoje aditivi stabilni na temperaturi 4 °C u toku 5 dana, odnosno da ne gube na svojoj nutritivnoj vrednosti.

Sokovi od bobičastog voća poput aronije, borovnice, jagode, kupine i maline poslednjih godina zauzimaju sve veće pozicije na globalnom tržištu, zbog čega se veliki broj proizvođača okrenuo plantažnom uzgoju ovog voća. Ekonomske analize ukazuju na povećanu industrijsku proizvodnju voćnih sokova, uključuju i mogućnost upotrebe samoniklih biljaka koje su široko rasprostranjene i lako dostupne, kao što je zove. Netaknuti planinski predeli balkanskih zemalja obiluju ovom fitohemijski vrednom biljnom vrstom, o čijem se biopotencijalu govori kroz istoriju ljudske civilizacije. Sa ciljem da se dobiju novi proizvodi koji bi mogli da opravdaju očekivanja funkcionalnog proizvoda, u ovom slučaju zreli plodovi zove su bili polazna sirovina od koje je dobijen matični sok. Dobijeni sok od plodova zove na tradicionalan način prikazan je na Slici 2.8.

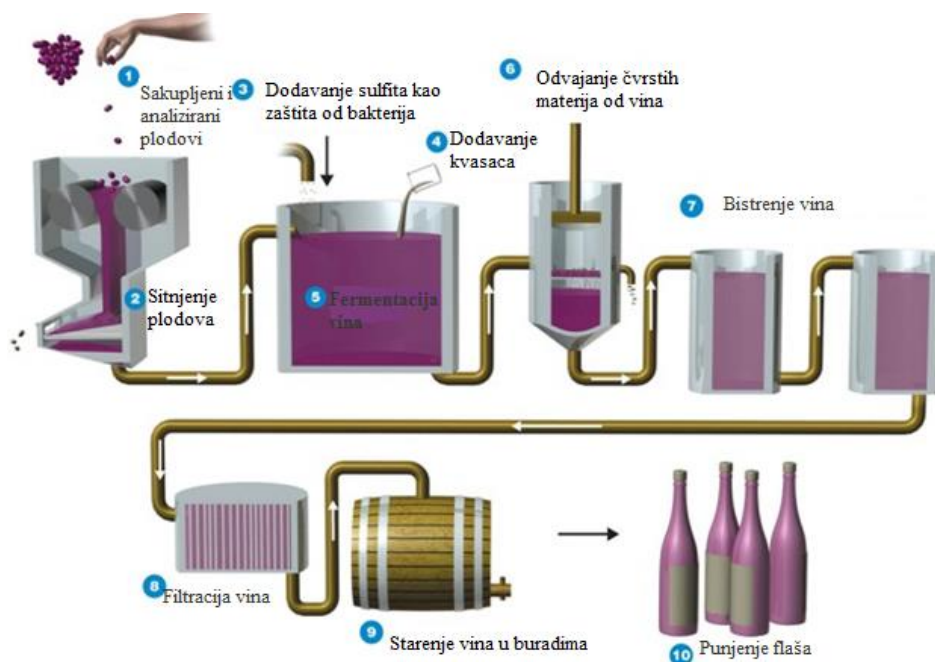


Slika 2.8. Matični sok od plodova zove

(<https://www.amazon.com/Organic-Elderberry-Sambucus-Certified-Supplement/dp/B07H3KWDDP>)

2.5.3.2. Voćna vina

Termin vino se uglavnom odnosi na vino od grožđa, međutim različite kulture u svetu koriste i druge sirovine u procesu proizvodnje vina. Istorija voćnih vina nije tako duga i prestižna kao istorija vina od grožđa. U naučnim studijama sve veću poziciju zauzimaju istraživanja posvećena voćnim vinima, u vidu komercijalnih mogućnosti i zdravstvenih koristi koje voćna vina poseduju (Rupasinghe i sar., 2017). Voćna vina se dobijaju po tehnološkom postupku koji se primenjuje za dobijanje vina od grožđa u procesu alkoholne fermentacija voćnog soka (Slika 2.9) (McKay i sar., 2015). Bilo koja vrsta bobičastog voća može da se koristi kao sirovina za dobijanje voćnih vina (Thilakarathna i Rupsasinghe, 2013).



Slika 2.9. Tehnološki postupak proizvodnje vina

U toku proizvodnje vina moguće je primenjivati različite tretmane, kao što je toplotni tretman zbog efikasnijeg izolovanja ćelijskih sastojaka. Uticaj temperature povećava sadržaj tečne faze i lakše izolovanje jedinjenja koja daju karakterističnu boju vinu (Sokolowsky, Rosenberger i Fischer, 2015). Međutim, temperatura dovodi i do degradacije termolabilnih komponenata, nizom reakcija pospešuje obrazovanje aromatičnih kompleksa koji vinu daju „miris i ukus na kuvano”.

Na tržištu su prisutna voćna vina od kultura koje se uglavnom plantažno gaje (borovnica, kupina, malina, jagoda i drugo bobičasto voće), dok vino od nekih vrsta samoniklih kultura još uvek nije prepoznato i dostupno kao komercijalni proizvod.

Hemijski sastav voćnih vina je složen i od glavnih sastojaka su prisutni voda, alkohol, šećeri, organske kiseline, minerali, ali i polifenolna jedinjenja, viši alkoholi, estri i druge komponente

(Johnson i Gonzalez de Mejia, 2012). Isparljive i neisparljive kiseline, estri, viši alkoholi, aldehidi i ketoni u velikoj meri doprinose konačnom senzorskom karakteru proizvoda.

Količina alkohola kao jednog od glavnih sastojaka u vinu zavisi od primenjene tehnologije u proizvodnji vina i obično se kreće između 5 i 15%. Stepem zrelosti voća utiče na sadržaj šećera, što se odnosi i na nivo alkohola. Ukoliko voće nije odgovarajućeg stepena zrelosti, u toku fermentacije neophodno je dodavanje šećera, čime se može definisati konačna slatkoća vina. Količina etanola je važna za stabilnost i senzorska svojstva vina. Tokom fermentacije porast sadržaja alkohola značajno ograničava rast kvasaca. Takođe, prisustvo alkohola je važno i sa aspekta diskusije o bioraspoloživosti sastojaka vina sa potencijalnim zdravstvenim prednostima. Pored etanola, u voćnim vinima je prisutan i metanol, koji je toksičan za ljude. Na osnovu zakonskih regulativa sadržaj metanola u komercijalnim crvenim vinima ne sme da prelazi 300 mg/l (Sl. glasnik RS br. 26/2015).

Sadržaj šećera je važan za rast i metabolizam kvasaca, jer vinski kvasci najveći deo svoje metaboličke energije dobijaju iz katabolizma glukoze i fruktoze (Jackson, 2008). Glavni nedostatak voćnih vina je niži sadržaj šećera, u odnosu na vino od grožđa. Dominantni šećeri u bobičastom voću su glukoza i fruktoza, sa različitim sadržajem u zavisnosti od biljne vrste kojoj pripadaju (Milivojević i sar., 2011; Mikulic-Petkovsek i sar., 2012). Ukupan sadržaj šećera u bobičastom voću je nešto niži od sadržaja šećera u grožđu, zbog čega je tokom proizvodnje vina od bobičastog voća poželjno dodati vodu. Dodata voda snižava kiselost kljuka bobičastog voća, ali nepovoljno utiče na senzorske karakteristike vina.

Sastav organskih kiselina u vinu od bobičastog voća potiče od njihovog sadržaja u plodovima. Najčešće organske kiseline koje su prisutne u bobičastom voću su: limunska, jabučna, sirćetna, vinska i fumarna i njihov sadržaj varira u zavisnosti od vrste i faze zrelosti ploda (Milivojević i sar., 2012). Na prisustvo organskih kiselina u voćnim vinima utiče i kvasac, jer ih kvasac proizvodi u toku fermentacije (Duarte i sar., 2010). Sadržaj isparljivih kiselina, konkretno sirćetne kiseline neophodno je održavati na minimalnom nivou, jer njihovo prisustvo u koncentraciji preko 1,2 g/l može razviti neželjenu aromu (Swiegers i Pretorius, 2005).

Vino sadrži i značajnu količinu minerala u lako dostupnim oblicima, posebno K i Fe, što vino klasifikuje kao važan prehrambeni proizvod. K je dominantan mineral u voćnim vinima, a prate ga Ca, S, P i Mg i male količine Na. Prekomerna konzumacija vina, zbog prisustva alkohola može da poremeti unos Ca, Mg, Se i Zn i povećava izlučivanje Zn putem bubrega (Rupasinghe i Clegg, 2007). Prekomerni unos alkohola negativno utiče na apsorpciju, metabolizam i izlučivanje, zbog čega se javlja poremećaj homeostaze mikroelemenata koji su neophodni za pravilno odvijanje biohemijjskih procesa u organizmu.

2.5.4. Destilacija

Toplotni tretman se široko primenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, za različite namene, u cilju jednostavnijeg izolovanja komponenata ili konzervisanja proizvoda. Konvencionalne tehnike se obično zasnivaju na konvektivnim prenosima toplote koji su vremenski i energetski intenzivni i mogu negativno uticati na kvalitet proizvoda usled neravnomernog zagrevanja (Kaur i Singh, 2016). Destilacija je difuziona operacija koja podrazumeva isparavanje rastvarača zagrevanjem smeše u laboratorijskom sudu i kondenzaciju nakon isparenja. Hidrodestilacija kao standardni sistem destilacije za izolovanje etarskih ulja, obično je opremljena uređajem tipa Clevenger (Clevenger, 1928) za laboratorijske studije (Gavahian i sar., 2015; Preedi, 2015). Destilacija, kao energetski intenzivan proces, široko se koristi u nekoliko industrija, uključujući destilaciju fermentisanih rastvora i izolovanje etarskih ulja (Preedi, 2015). U XVII veku je započeta eksploatacija biljnog materija u svrhu dobijanja etarskih ulja, koja se uz neke modifikacije primenjuje i danas u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji, kao i u proizvodnji parfema (Slika 2.10) (Shaaban, El-Ghorab i Shibamoto, 2012).



Slika 2.10. Hidrodestilacija etarskog ulja (Samadi i sar., 2017)

Etarska ulja predstavljaju kompleksne smeše aromatičnih isparljivih jedinjenja koja imaju malu molekulska masu, a nastaju kao proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka. Sinteza etarskih ulja se odvija u sekretornim žlezdama cveta, lista, ploda, pa i semena biljke (Kalemba i Kunicka 2003). Ova vrsta biljnih produkata može se naći u slobodnom obliku, ali su najčešće prisutni u obliku bezmirisnih glikozida. Enzimskom degradacijom bezmirisnih glikozida dolazi do oslobađanja aglikona, koji daju karakterističan miris ulja (Sovilj i Spasojevic, 2001).

Etarska ulja biljaka imaju biološku i terapijsku ulogu, jer su od antičkih vremena do danas korišćena u prevenciji i lečenju bolesti (Lawless, 2013). Osim u naučnim istraživanjima, etarska ulja su našla i komercijalnu upotrebu.

Fitohemijski sastav etarskih ulja je veoma složen i sadržaj aromatičnih komponenata može da bude i do 60 koje su zastupljene u različitom kvantitativnom odnosu. U zavisnosti od koncentracije u kojoj su alifatične i aromatične komponente prisutne u etarskom ulju, mogu da se podele na tri grupe: glavne (20-95%), sporedne (1-20%) i zastupljene u tragovima (ispod 1%).

Glavne komponente etarskih ulja se mogu podeliti u dve osnovne grupe:

- grupa ugljovodonika sastavljena od monoterpena, seskviterpena, diterpena, triterpena i
- grupa jedinjenja sa kiseonikom: alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, fenoli i oksidi, a mogu sadržati i malu količinu kiselina, azotnih i sumpornih jedinjenja (Svoboda, Brooker i Zrustova, 2005).

2.5.5. Senzorska analiza prehrambenih proizvoda

Potreba za senzorskim ispitivanjem prehrambenih proizvoda, gde ulogu „instrumentalne tehnike” preuzima čovek sa svojim čulima, povezana je prvenstveno sa značajem koji senzorska svojstva imaju u pogledu prihvatljivosti i doživljavanja kvaliteta ovih proizvoda od strane potrošača. Dakle, kvalitet prehrambenih proizvoda mora da se posmatra kroz prizmu percepcije od strane potrošača, gde sada kontekstualni faktori i unapred formirana očekivanja imaju veliki uticaj na to u kojoj meri će proizvod da se dopadne ili ne dopadne potrošaču. Potrošači su ti koji pokreću i održavaju ekonomiju globalne industrije hrane i u tom smislu „prihvatljivost od strane potrošača” može da bude pokazatelj koji će da doprinese merenju ukupnog nivoa kvaliteta proizvoda (Tomić, 2016).

Pitanje koje se po pravilu postavlja kada je reč o kvalitetu prehrambenih proizvoda je „šta je to što čini da prehrambeni proizvod bude dobrog kvaliteta i kako se mere nivoi kvaliteta?”. Moskowitz (1995) kvalitet prehrambenih proizvoda u prvom redu vezuje za potrošače i način na koji oni doživljavaju i prihvataju senzorska svojstva. Molnár (1995), polazeći od prihvatljivosti prehrambenih proizvoda od strane potrošača i njihovih zahteva u pogledu kvaliteta, smatra da se kvalitet prehrambenih proizvoda određuje preko senzorskih svojstava, hemijskog sastava, fizičkih svojstava, nivoa mikrobiološke i toksikološke kontaminacije, perioda održivosti i pakovanja. Grunert (1995) definiše tri tipa kvaliteta hrane: kvalitet orijentisan na proizvod (hemijski sastav, fizička svojstva), kvalitet orijentisan na proces (stepen u kojem kvalitet vezan za proizvod, dat u određenom nivou, ostaje stabilan) i kvalitet orijentisan na korisnika (način na koji korisnik/potrošač doživljava kvalitet).

Lawless (1995) navodi različite dimenzije u okviru kojih se nalazi pojam „kvalitet prehrambenih proizvoda”, a to su: performanse, specifične odlike, usaglašenost, pouzdanost, trajnost, eksploatacija (iskoristljivost), reakcija kupca, estetika i reputacija (ugled).

Senzorsko ispitivanje ili senzorska analiza definiše se kao naučni metod koji se koristi u situacijama kada postoji potreba da se izazovu, mere, analiziraju i interpretiraju oni utisci (senzacije) koji nastaju opažanjem proizvoda od strane čovekovih čula i to na prvom mestu čulom vida, mirisa, dodira, ukusa i sluha (Stone i sar., 2012). Potrebe za senzorskim ispitivanjima u proizvodnji prehrambenih proizvoda javljaju se u različitim situacijama. Senzorsko ispitivanje se može primeniti: u kontroli kvaliteta, za ispitivanje senzorske održivosti, prilikom žalbi kupca, u razvoju novih proizvoda, u postupcima optimizacije postojećih proizvoda, prilikom izrade specifikacije. Promene u senzorskom kvalitetu proizvoda, sa aspekta njegove izrade, nastaju uglavnom pod uticajem sledeća tri faktora: sirovina (ingredijencija), procesa (operacija) i načina pakovanja (Lawless i Lawless, 2010).

Zadatak senzorskog analitičara je da odabere odgovarajući metod ispitivanja koji može da pruži odgovor na konkretno pitanje u vezi sa proizvodom koji je predmet ispitivanja. Testovi koji se koriste za senzorsko ispitivanje se klasifikuju u odnosu na njihovu primarnu svrhu i upotrebu. U skladu sa tim postoje tri osnovne grupe metoda senzorske analize, svaka sa različitim ciljem i svaka

sa učestvovanjem različitih kategorija ocjenjivača odabranih prema različitim kriterijumima. Prvu grupu čine diskriminatorski testovi koji su osmišljeni tako da mogu da daju odgovor na pitanje: „da li postoji osetna razlika između ispitivanih proizvoda u bilo kom pogledu?“. Za izvođenje ovih metoda senzorske analize generalno je potrebno angažovati ocjenjivače koji su odabrani samo na osnovu čulne osetljivosti, a ponekad je potrebno da budu i delimično obučeni (u pogledu prepoznavanja pojedinih senzorskih svojstava kod proizvoda). Drugu grupu čine testovi koji su osmišljeni tako da mogu da daju odgovor na pitanje: „na koji način i u kojoj meri se proizvodi razlikuju u pogledu specifičnih senzorskih svojstava?“. U ovu grupu spadaju deskriptivni testovi čiji je osnovni zadatak da se identifikuje prisustvo i izmeri intenzitet pojedinačnih senzorskih svojstava koja učestvuju u formiranju senzorskog profila proizvoda. Ovde takođe mogu da se uvrste i testovi koji se koriste za ispitivanje ukupnog kvaliteta proizvoda preko pojedinačnih senzorskih svojstava. Za izvođenje ovakvih deskriptivnih metoda potrebni su dobro uvežbani i obučeni ocjenjivači. Kod deskriptivne analize ocjenjivač mora: biti sposoban da prepozna pojedinačna senzorska svojstva proizvoda koji je predmet ispitivanja, da bude obučen i uvežban u pogledu razumevanja značaja ispitivanih svojstava i deskriptora koji se koriste tokom ispitivanja (deskriptori su pridevi koji se koriste za opisivanje svojstava: meko, vlažno, krto), da bude obučen i uvežban u pogledu korišćenja kvantitativnih skala i referentnih standarda za merenje intenziteta svojstava. Da bi mogao da da ocenu senzorskog kvaliteta ocjenjivač mora: dobro da poznaje i proizvod i tehnološki proces, da ima jasna saznanja o svojstvima standardnog proizvoda, da bude sposoban da identifikuje uobičajene greške i nedostatke kod proizvoda, da zna da vrednuje uticaj pojedinačnih grešaka i nedostataka, u pogledu stepena njihove izraženosti, na ukupan kvalitet proizvoda. Ove dve grupe testova spadaju u analitičke testove, zato što u njihovoj primeni učestvuju osobe koje su odabrane na osnovu pokazane čulne osetljivosti, koje u zavisnosti od potreba ispitivanja mogu biti obučene ili visoko obučene u pogledu primene pojedinih testova i u pogledu poznavanja ciljane grupe proizvoda i njihovih svojstava kvaliteta. Takve osobe imaju objektivni pristup prilikom ispitivanja i sposobne su da se fokusiraju na pojedinačna senzorska svojstva proizvoda. Treću grupu metoda senzorskog ocenjivanja čine afektivni ili hedonski testovi koji imaju za cilj: da utvrde u kom stepenu se proizvodi dopadaju određenoj populaciji potrošača (ispitivanje stepena prihvatljivosti) ili jednostavno da utvrde koji je od ponuđenih proizvoda prihvatljiviji potrošačima u odnosu na ostale (ispitivanje preferencije). Ocjenjivače kod ovih testova čine potrošači koji su neobučeni i neuvežbani i koji su odabrani samo na osnovu lične upotrebe proizvoda. To je osnovni kriterijum prema kojem se vrši odabir osoba za senzorsko ispitivanje primenom afektivnih testova. Uzimajući u obzir da u ovakvom vidu senzorskog ispitivanja učestvuju neobučene osobe (ciljana grupa potrošača) koje izražavaju svoje subjektivno mišljenje i koje doživljavaju proizvod u integrisanom obliku pojedinačnih stimulacija (kao jedinstveni doživljaj), ovi testovi se tretiraju kao hedonistički, a ne kao analitički (Lawless i Lawless, 2010; Tomić, 2016).

2.6. ZOVA

2.6.1. Taksonomija i rasprostranjenost

Zova danas pripada porodici Adoxaceae, što je utvrđeno na osnovu genetičkih eksperimenata, iako se u naučnim navodima može naći da pripada i porodici Caprifoliaceae. Međutim, vrste ovog roda je teško klasifikovati na osnovu morfoloških svojstava, još uvek se ne zna njihov tačan broj, a neki autori tvrde da ih ima oko 30 (Jabbari i sar., 2016). Na Slici 2.11 je prikazana biljna vrsta roda *Sambucus*.

Taksonomija roda *Sambucus* se ogleda u podeli:

Carstvo: *Plantae*

Razdeo: *Tracheophyta*

Klasa: *Magnoliopsida*

Red: *Dipsacales*

Porodica: *Adoxaceae*

Rod: *Sambucus*

Vrsta: *Sambucus nigra* L.



Slika 2.11. *Sambucus nigra* L.

Od 30 vrsta zove koliko ih ima u svetu, devet vrsta ima upotrebnu vrednost, dok se samo dve vrste *Sambucus nigra* L. (crna zova) i *Sambucus canadensis* L. (kanadska, američka zova) koriste u komercijalne svrhe. Na području Balkanskog poluostrva rastu tri vrste:

- *Sambucus nigra* L.,
- *Sambucus ebulus* L. (smrdljiva zova, burjan) i
- *Sambucus racemosa* L. (divlja, crvena zova).

Zova je veoma rasprostranjena u zapadnoj i srednjoj Evropi, može da raste i na nadmorskoj visini od 1200 metara, prisutna je i na jugu Evrope, na Siciliji i u kontinentalnim predelima Grčke. Prirodna granica za rast biljne vrste *Sambucus nigra* je Škotska i južna Skandinavija. Pored evropskog kontinenta zova raste i u Aziji, Severnoj Africi i Severnoj Americi.

Za pogodan rast zove potrebno je plodno humusno i vlažno zemljište bogato azotom, pa se može naći u selima, po poljima, šikarama, na obalama reka, u svetlijim šumama.

2.6.2. Opis biljke

Zova (*Sambucus nigra* L.) je samonikli listopadni grm ili manje drvo, koje raste do 5 metara, dok starija stabla mogu dostići visinu i do 10 metara. Grane ove biljke su ispunjene belom srži, pa otuda i naziv *Sambucus*, od grčke reči *sambuke* ili latinske *sambuca*, koji označava flautu izrađenu od grane zove. Lista vrlo rano, a listovi su raspoređeni naspramno i oni su neparno perasti. Cvetovi su sitni, mlečnobeli, jakog mirisa, udruženi u cvasti slične štitu. Plodovi su sitne, zelene, a kada su zreli tamnoljubičaste bobice, koje sadrže crveno-modri sok. Zova cveta u periodu od maja do juna (Tucakov, 2010), ima izuzetne lekovite sposobnosti i svi delovi biljke su korišćeni za lečenje bolesti još od drevnog Rima. Najčešće se upotrebljavala za lečenje oboljenja disajnih puteva, tumora, reumatskih stanja, a poznato je da ima diuretičko i laksativno dejstvo (Charlebois, 2007). Cvet i plod zove prikazani su na Slici 2.12.



Slika 2.12. Cvet i plod zove

(<http://www.treesplease.co.uk/product/sambucus-nigra-elder-elderberries>),

(<https://pngio.com/images/png-a1363104.html>)

Poslednjih nekoliko decenija povećava se broj naučnih publikacija o ovoj biljnoj vrsti, zbog njenog izuzetnog hemijskog sastava, zahvaljujući kome zova ima izuzetan biopotencijal (Salvador, Silvestre i Rocha, 2018).

2.6.3. Biološki aktivna jedinjenja zove

Fitohemijski sastav zove zavisi od različitih faktora, kao što su: vrsta, stepen zrelosti, ekološki i klimatski uslovi, kao i sastav zemljišta na kome biljka raste (Kader i Barrett, 1996). Zova je veoma dobar izvor proteina, čiji se sadržaj u plodovima kreće 2,7-2,9%, dok je u cvetu nešto niži i iznosi 2,4%. Aminokiseline se mogu naći u slobodnom i konjugovanom obliku. Od ukupno 16 prisutnih aminokiselina u plodovima zove, sedam pripada grupi esencijalnih amino-kiselina, a u cvetu je prisutno devet amino-kiselina. Lipidi kao gradivni blokovi ćelijskih zidova su prisutni u zovi, a njihov najveći sadržaj je zabeležen u semenkama. Sadržaj ulja u semenkama je utvrđen na oko 22,4% (Dulf i sar., 2013). U profilu masnih kiselina dominiraju nezasićene masne kiseline, od kojih su najzastupljenije: linolna (40,7 g/100 g ulja), linoleinska (34,3 g/100 g ulja) i oleinska (13,8 g/100 g ulja) (Dulf i sar., 2013). Sadržaj ugljenih hidrata u plodovima zove iznosi 18,4%, od čega 7,4% su prehrambena vlakna (Bender, 2006). Prehrambena vlakna koja se nalaze u plodovima su pektin, pektinska kiselina, protopektin i kalcijum-pektinat (Vulić, Vračar i Šumić, 2008). U plodovima zove 95% šećera čine redukujući šećeri, glukoza i fruktoza, a ukupan sadržaj šećera se kreće između 6,8-11,5%. Glukoza i fruktoza su prisutne u približno sličnim količinama, dok je sadržaj saharoze manji od 0,33% (Veberic i sar., 2009). Od vitamina u plodovima zove su dominantni vitamini grupe B, vitamin A, tokoferoli i vitamin C. U svežim plodovima zove vitamin C je prisutan u količini 6-35 mg/100 g (Akbulut, Ercisli i Tosun, 2009). Ulje semenki zove je bogato tokoferolima, od kojih su dominantni γ - i α -tokoferol (12,44 i 0,96 mg/100g, redom), dok su β - i δ -tokoferoli zastupljeni u nižim koncentracijama (0,31 i 0,16 mg/100 g, redom) (Helbig i sar., 2008). Pored vitamina u plodovima su prisutni i minerali: K, Na, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Se, Cr, Ni, Cd (Kolodziej i sar., 2012).

Od sekundarnih metabolita, pre svega polifenolnih jedinjenja zova sadrži flavonole, fenolne kiseline, proantocijanidine i antocijane, koji plodu daju crveno-ljubičastu boju (Anton i sar., 2013). Antocijani zove su derivati cijanidina i u plodu je prisutan: cijanidin-3-glukozid, dok su u manjoj količini prisutni cijanidin-3-sambubiozid, cijanidin-3-sambubiozid-5-glukozid, cijanidin-3,5-diglukozid, cijanidin-3-rutinozid, pelargonidin-3-glukozid, pelargonidin-3-sambubiozid i delfinidin-3-rutinozid (Labun i sar., 2011).

Najzastupljeniji antocijani su cijanidin-3-glukozid (204,6-481,4 mg CGE/100 g ploda) i cijanidin-3-sambubiozid (122,2-269,1 mg CGE/100 g ploda) (Lee i Fin, 2007).

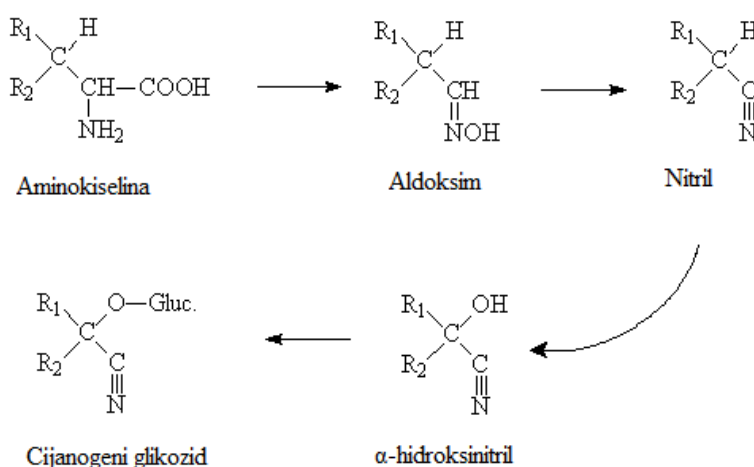
Dominantni flavonoli su kvercetin, kempferol i izoramnetin, ali i rutin koji u svom sastavu ima kvercetin i glukozu (Christensen, Kaack i Fretté, 2008). Od fenolnih kiselina prisutne su hlorogenska kiselina, derivati kafene i *p*-kumarinske kiseline, a u malim koncentracijama mogu da sadrže i elaginsku kiselinu (Fazio i sar., 2013).

Iako je upotreba zove ograničena, potražnja za proizvodima na bazi zove raste paralelno sa novim informacijama o farmakološkim atributima biljke koje pružaju naučna istraživanja. Pored

bioloških i farmakoloških aktivnosti zove, toksikološki efekti za koje se smatra da su izazvani konzumacijom ove biljke nisu u potpunosti razjašnjeni. Pored navedenih metabolita, zova sadrži i cijanogene glikozide.

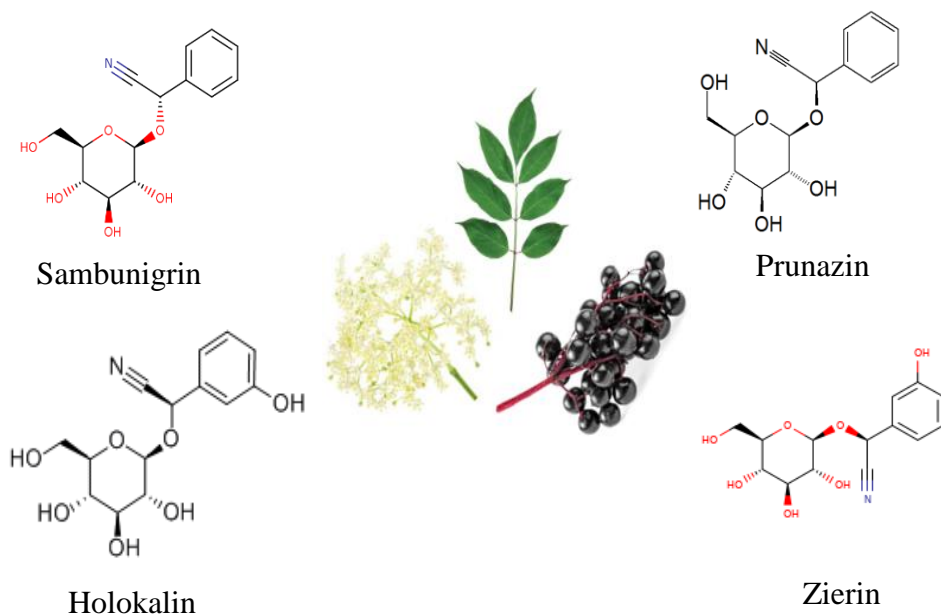
Cijanogeni glikozidi su jedinjenja koja su pronađena kod 2500 biljnih vrsta. Neke studije su pokazale da svi delovi biljke sadrže cijanogene glikozide, uključujući nezrele i toplotno ne tretirane plodove, listove, koru i koren biljke, pa mogu prouzrokovati mučninu i povraćanje, prvenstveno zbog oslobađanja toksične komponente cijanovodinične kiseline (HCN) (Duke, 2002; Valle i sar., 2004). Međutim, usled toplotne obrade plodova i svih delova biljke koji se koriste kao hrana, dolazi do narušavanja hemijske strukture cijanogenih glikozida, usled čega gube sposobnost da izazovu neželjene uticaje na zdravlje (Pogorzelski, 1992).

Sinteza cijanogenih glikozida i njihovo prisustvo u zovi prikazana je na Slici 2.13.



Slika 2.13. Sinteza cijanogenih glikozida

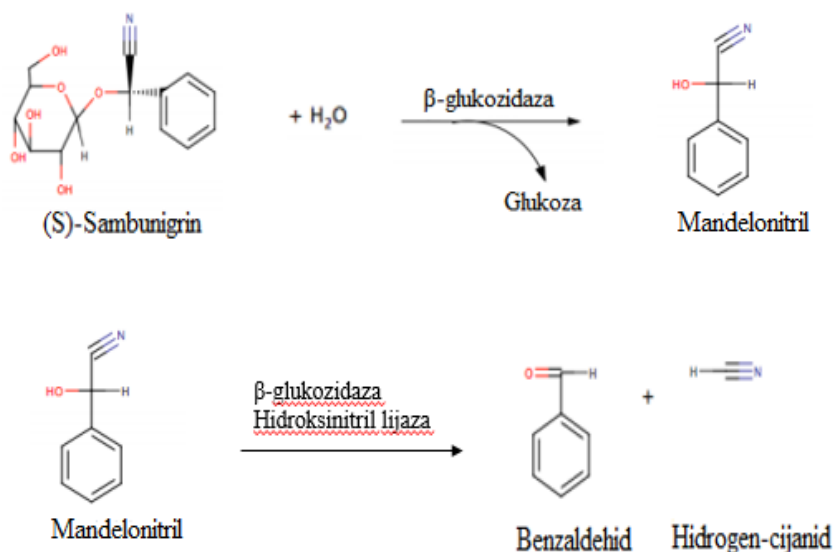
Aminokiseline su prekursori u biosintezi cijanogenih glikozida i podležu reakciji hidroksilacije, a kao rezultat te reakcije obrazuju se aldoksimi. Aldoksimi, intermedijeri u procesu biosinteze, prevode se u nitrile. Reakcija hidroksilacije nitrila uslovljava formiranje α-hidroksinitrila, koji se u reakciji glikozilacije prevode u cijanogene glikozide. Strukture cijanogenih glikozida koji se nalaze u zovi su prikazane na Slici 2.14.



Slika 2.14. Cijanogeni glikozidi prisutni u plodu, cvetu i listu zove

Dewick (2002) navodi da konzumiranje nezrelih delova biljke dovodi do dezintegracije strukture biljne sirovine, pa cijanogeni glikozidi reaguju sa vodom i endogenom β -glikozidazom i α -hidroksinitril lijazom, oslobađajući HCN sve dok ne dođe do inaktivacije enzima usled niske pH vrednosti u stomaku (Evered i Harnett, 2008). Ovaj proces je potpomognut u gastrointestinalnom traktu, jer egzogena β -glikozidaza crevnih bakterija katalizuje stvaranje HCN. Nakon apsorpcije u crevima, oslobođeni toksin se vezuje za eritrocite, usled čega se cijanid vezuje za hemoglobin i methemoglobin. U toku transporta kroz krvotok, cijanid se apsorbuje u celom telu i inhibira proces oksidativne fosforilacije koji je od izuzetnog značaja za ćelijski metabolizam (Rathi, 2015). Na ovaj način kiseonik je sprečen da bude krajnji akceptor elektrona, zbog čega se razvija stanje poznato kao histotoksična anoksija.

Humani organizam može da podnese nizak nivo HCN, jer se u prisustvu enzima tiosulfat-sumporttransferaze HCN konvertuje u tiocijanat u tom obliku se putem urina izlučuje iz organizma (Evered i Harnett, 2008). Slika 2.15 predstavlja degradaciju cijanogenih glikozida i oslobađanje HCN u plodovima zove. Sambunigrin i prunazin su diastereoizomeri, pa su reakcije usled kojih se oslobađa HCN veoma slične.



Slika 2.15. Degradacija cijanogenih glikozida (Hughes, 1999)

Oslobađanje HCN nakon degradacije cijanogenih glikozida i njegovih štetnih uticaja na zdravlje, uzrokovalo je izbegavanje upotrebe zove. Zbog izuzetnog biopotencijala koji poseduje, Zahmanov i sar. (2015) su započeli studiju u kojoj su utvrdili da zreli plodovi zove sadrže manje cijanogenih glikozida od nezrelih plodova, što je povezano sa različitim katabolizmom u biljnim tkivima. Takođe, studije koje su izveli Onyeike i Omubo-Dede (2002) i Akande i Fabiyi (2010) potvrđuju da se kuvanjem plodova smanjuje sadržaj cijanogenih glikozida i do 70%. U cilju dodatnih potvrda Senica i sar. (2016) su u istraživanju koje su sprovedli u cilju evaluacije različitih proizvoda od zove došli do zaključka, da svi proizvodi koji su dobijeni od zrelih plodova imaju izuzetno nizak nivo cijanogenih glikozida i da je upotreba proizvoda na bazi zove opravdana.

U maju 2013. godine, Evropska agencija za sigurnost hrane (EFSA) objavila je novu verziju zbornika za biljke za koje se navodi da sadrže toksične, zavisne, psihotropne ili druge supstance u kome se na zovu odnose sledeće informacije:

- svi delovi biljke poseduju cijanogene glikozide,
- sambunigrin je dominantan i upotreba nezrelih plodova ili semenki može da izazove gastrointestinalne poremećaje,
- nema dostupnih podataka, niti naučnih potvrda o akutnoj toksičnosti i genotoksičnosti zove.

Istraživanja koja su se bavila evaluacijom bioloških aktivnosti vrste roda *Sambucus* bila su usmerena na pripremanje ekstrakata od ploda i cveta primenom više različitih rastvarača i tehnika izolacije, u cilju izdvajanja jedinjenja koja poseduju farmakološki potencijal. Na dobijanje proizvoda bio je usmeren mali broj istraživača, tako da je broj publikacija u ovom polju ograničen. Pregled naučne literature osim antioksidativne, antiinflamatorne i antiproliferativne aktivnosti nije dao rezultate u sposobnosti proizvoda i ekstrakata zove u inhibiciji enzima: AChE, BChE,

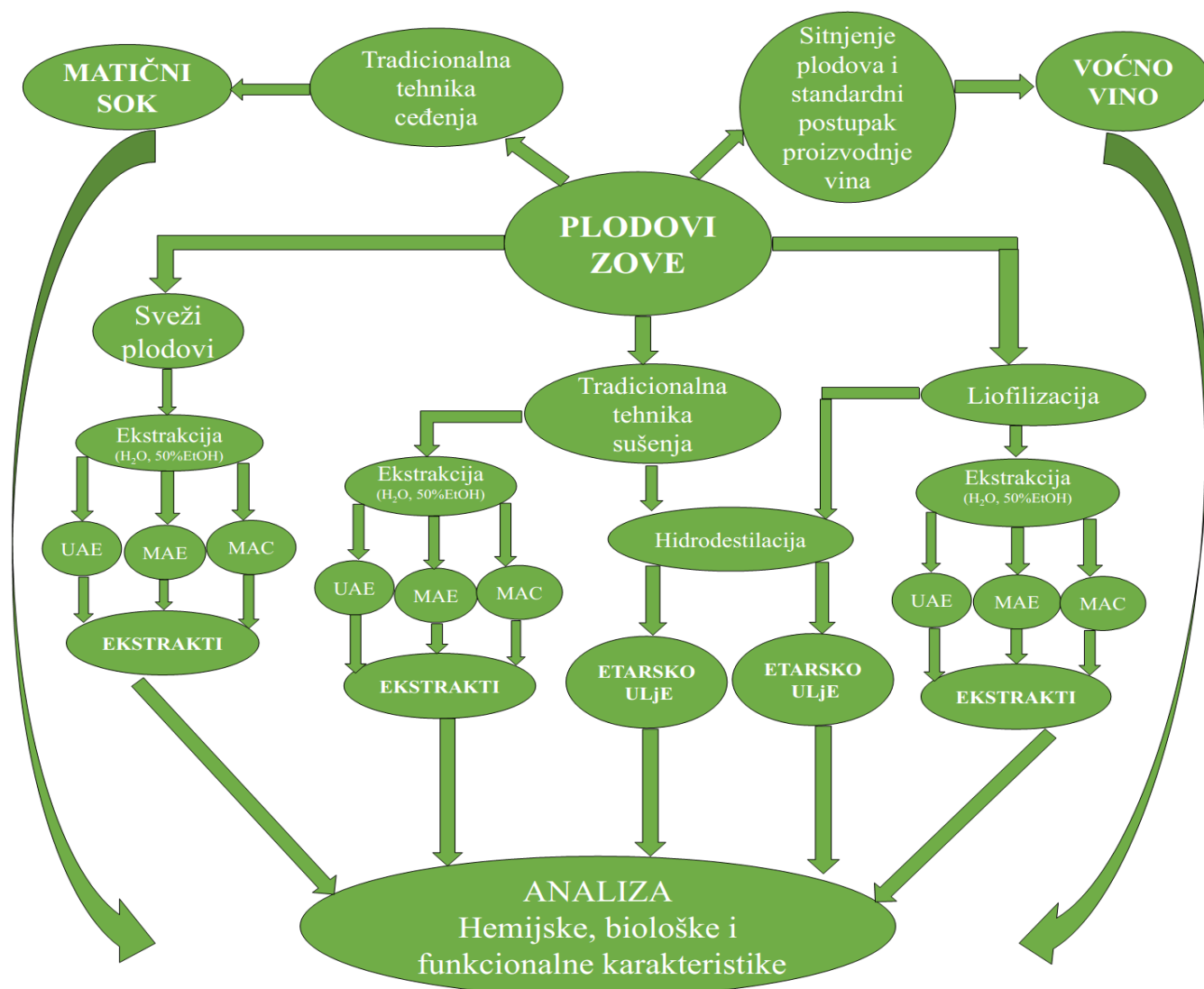
tirozinaze, α -amilaze i α -glukozidaze, čija je prekomerna aktivnost uzrok za nastanak različitih oboljenja. U dosadašnjim studijama skoro da ne postoje laboratorijska istraživanja o neuroprotektivnom, antitirozinaznom i antidijabetogenom dejstvu ploda i cveta zove. Takođe, i u pogledu fitohemijske karakterizacije postoje oskudni literaturni podaci. Mikulic-Petkovsek i sar. (2015) i Senica i sar. (2016) su okarakterisali sadržaj flavonida i fenolnih kiselina u soku, čaju i liker u od zove. U Tabeli 2.6. su prikazana dosadašnja istraživanja i bioaktivnosti biljne vrste *S. nigra*.

Tabela 2.6. Literaturni pregled ispitivanja biološke aktivnosti biljne vrste *S. nigra*

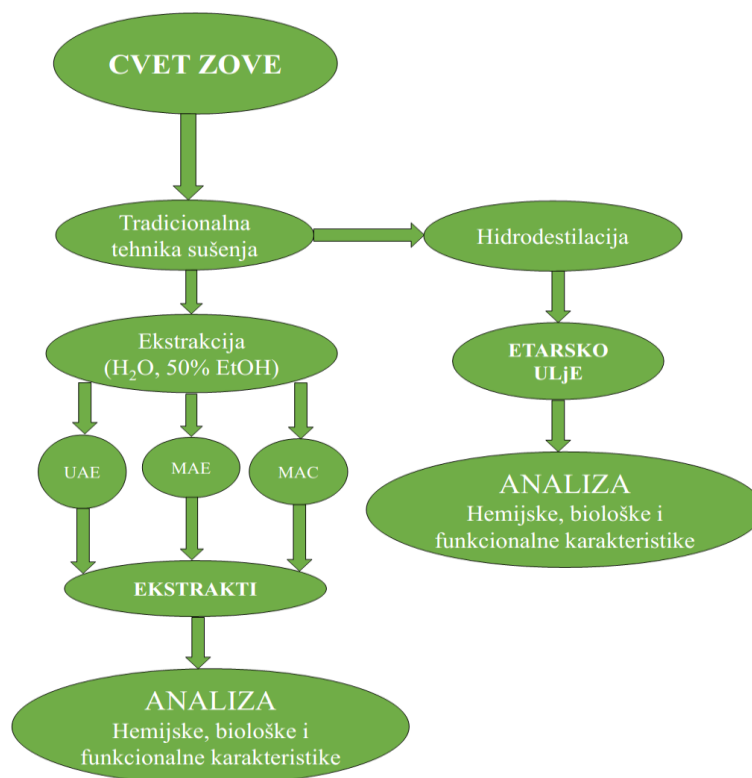
Deo biljke	Tip ekstrakta/proizvoda	Biološka aktivnost	Literatura
CVET	Etanol	Antioksidativna	Dawidowicz i sar., 2006; Buřičová i Réblová, 2008.
	Voda	Antiinflamatorna, antioksidativna, antivirusna	Harokopakis i sar., 2006; Mikulic-Petkovsek i sar., 2015; Torabian i sar., 2019.
	Rastvarač nije naveden	Antioksidativna	Stoilova i sar., 2007.
	Metanol	Antioksidativna	Rieger i sar., 2008; Esin Çelik i sar., 2014.
PLOD	Sok („spray-dried“)	Antioksidativna	Abuja, Murkovic i Pfannhauser, 1998.
	Izolacija antocijana	Antioksidativna	Pool-Zobel i sar., 1999; Youdim, Martin i Joseph, 2000; Nakajima i sar., 2004.
	Sok	Antioksidativna, antivirusna	Lugasi i Hóvári, 2003; Lichtenthäler i Marx, 2005; Torabian i sar., 2019.
	Heksan-dihlormetan Aceton-voda-sirćetna kiselina	Antioksidativna	Wu i sar., 2004.
	Metanol	Antioksidativna	Ciocoiu i sar., 2012; Natić i sar., 2019.
	Heksan	Antioksidativna, antiinflamatorna	Fazio i sar., 2013.
	Voda, etanol, metanol, aceton	Antioksidativna	Duymuş, Göger i Başer, 2014.
Liker, čaj, sok, prah	Hemijski sastav	Senica i sar., 2016.	
Etanol i etil-acetat	Antioksidativna, antiinflamatorna	Simonyi i sar., 2015.	
Presovanje ploda	Antiproliferativna aktivnost	Lamy, Muhire i Annabi, 2018.	

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije realizovan je u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Katedre za hemijsko inženjerstvo i Katedre za inženjerstvo konzervisane hrane, Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu. Deo istraživanja je urađen u laboratorijama Katedre za Biohemiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, kao i na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu, Instituta za opštu i fizičku hemiju, Univerziteta u Beogradu, laboratoriji Enološke stanice u Vršcu i Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Seldžuku, Konija, Turska. Tok eksperimentalnog rada prikazan je na Slici 3.1 i na Slici 3.2.



Slika 3.1. Šematski prikaz dobijanja i analize proizvoda na bazi plodova zove



Slika 3.2. Šematski prikaz dobijanja i analize proizvoda na bazi cveta zove

Biljni materijal je sakupljen tokom 2017. godine. Materijal je pregledan i kolektovan u kolekciji primeraka jemstva (eng. *Voucher collection*) Herbarijuma BUNS. Determinaciju je izvršila dr Milica Rat na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Univerziteta u Novom Sadu. U Tabeli 3.1. prikazani su osnovni podaci o broju vaučera, lokalitetu i datumu sakupljanja biljnog materijala.

Tabela 3.1. Podaci iz vaučera ispitane vrste roda *Sambucus*

Broj vaučera	Vrsta	Lokalitet	Način uzgajanja	Datum determinacije
2-1512	<i>Sambucus nigra</i> L.	Pljevlja, Crna Gora	Samoniklo bilje	Jun 2017.

Cvet zove je nakon sakupljanja osušen tradicionalno (u hladu, na promaji) i nakon toga čuvan u papirnim vrećama na sobnoj temperaturi, zaštićen od vlage i svetlosti.

Plod zove je nakon sakupljanja podeljen na dva dela. Prvi deo je osušen tradicionalno (u hladu, na promaji), dok je drugi deo osušen liofilizacijom. Takođe, određena količina sveže sakupljenog ploda je zamrznuta na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a određena količina je iskorišćena za dobijanje matičnog soka i vina od zove.

Osušen plod je čuvan u adekvatnoj ambalaži na sobnoj temperaturi, zaštićen od vlage i svetlosti.

3.1. Sušenje plodova zove liofilizacijom

Nakon sakupljanja plodovi zove su zamrznuti na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i osušeni liofilizacijom na temperaturi $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pritisku manjem od 1 mbar. Liofilizacija je uslužno urađena na liofilizatoru, koji je specijalno izgrađen za potrebe sušenja voća, za prehrambene namene, po zaštićenoj tehničkoj specifikaciji. U toku liofilizacije praćena je kinetika sušenja plodova zove, praćenjem temperaturnih kriva platoa, kondenzatora i proizvoda koji je sušen (ploda zove). Kinetika je vođena tako da je primenjen temperaturni režim $-25\text{ }^{\circ}\text{C}/0\text{--}5\text{ h}/-15\text{ }^{\circ}\text{C}/23\text{ h}/10\text{ }^{\circ}\text{C}/27\text{ h}/30\text{ }^{\circ}\text{C}/31\text{ h}$.

3.2. Ekstrakcija biljnog materijala (ploda i cveta zove)

3.2.1. Tradicionalna tehnika ekstrakcije

Za ekstrakciju ploda i cveta zove primenjena je konvencionalna tehnika ekstrakcije, maceracija (MAC). MAC je izvedena tako što je usitnjen biljni materijal pomešan sa ekstragensima (voda i 50% etanol) u odnosu 1:15 (g/ml) u erlenmajeru i smeša je ostavljena da stoji tri dana uz povremeno mešanje (Ph. Jug. IV, 1984).

3.2.2. Savremene tehnike ekstrakcije

Od savremenih ekstrakcionih tehnika za izolovanje bimolekula iz ploda i cveta zove primenjene su ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija.

UAE ekstrakcija je izvedena u ultrazvučnom kupatilu (Euinstruments, EUP540A, France), gde je odnos biljnog materijala i rastvarača bio isti, kao kod MAE i MAC ekstrakcionih tehnika. UAE je izvedena na konstantnoj frekvenciji od 40 kHz u trajanju od 30 minuta, dok je jačina ultrazvuka bila 156 W.

MAE je izvedena u otvorenom sistemu, u modifikovanoj komercijalnoj mikrotalasnoj pećnici koja je prilagođena za laboratorijske uslove (Panasonic, Germany). Usitnjen biljni materijal pomešan je sa ekstragensima (voda i 50% etanol) u odnosu 1:15 (g/ml). Proces ekstrahovanja bioaktivnih komponenata je trajao 30 minuta, dok je jačina mikrotalasa bila 450 W.

Prilikom ekstrakcije plodova zove 1 ml 1% sirćetne kiseline dodat je u uzorke pre početka ekstrakcije, u cilju efikasnije izolacije biljnih pigmenata prisutnih u sirovini.

3.3. Dobijanje matičnog soka od plodova zove

Zreli plodovi zove su nakon sakupljanja očišćeni, uklonjene su grančice, peteljke i lišće, isprani su vodom i nakon toga ručno ceđeni. Sveži plodovi (1 kg) su pripremljeni za ceđenje, tako što su stavljeni u tkaninu za ceđenje, nakon čega je pritiskanjem iz plodova dobijeno 0,5 l svežeg matičnog soka. Ceđenje se odvijalo postepeno, dobijeni sok je sakupljen u prihvatne sudove i čuvan na -20 °C do analize.

3.4. Dobijanje vina od plodova zove

Zreli plodovi zove su nakon sakupljanja očišćeni, uklonjene su grančice, peteljke i lišće, isprani su vodom i homogenizovani u blenderu. Dobijena masa nakon sitnjenja je raspoređena u četiri prihvatna suda. U svaki prihvatni sud je dodato 0,01 g pektolitičkih enzima, 10% rastvor kalijum metabisulfita i 50 mg/l sumpor dioksida, od čega je smeša u tri prihvatna suda toplotno tretirana, na različitim temperaturnim režimima, dok smeša u četvrtom prihvatnom sudu nije izložena uticaju temperature. Temperaturni tretman je izveden u cilju utvrđivanja promene hemijskog sastava i biološke aktivnosti vina u zavisnosti od temperature. Pripremljeni uzorci su podvrgnuti različitim temperaturnim tretmanima u različitim vremenskim intervalima:

- vino 1: temperatura 60 °C tokom 5 minuta,
- vino 2: temperatura 60 °C tokom 10 minuta,
- vino 3: temperatura 70 °C tokom 5 minuta,
- vino 4: bez temperaturnog tretmana (BTT).

Nakon temperaturnog tretmana u sva četiri pripremljena uzorka dodato je 50 ml limunske kiseline, 25 g/hL kvasca *Saccharomyces bariamis*, kako bi započeo proces fermentacije. Proces fermentacije je trajao 5 dana na ambijentalnoj temperaturi 22 °C. Po završetku fermentacije filtriranjem je kljuk odvojen od vina i u dobijeno vino je dodat 1 ml kalijum metabisulfita, kao konzervansa.

3.5. Određivanje osnovnih parametara kvaliteta matičnog soka i vina od zove

3.5.1. Određivanje relativne gustine vina od plodova zove na 20 °C

Relativna gustina vina najčešće ima vrednosti između 0,9850 i 0,9970. Kod vina koja imaju visok sadržaj šećera relativna gustina može biti veća od 1,0000 (Sl. glasnik RS 107/2014).

Baždareni piknometar je ispran tri puta sa po malo vina, a zatim je napunjen vinom do oznake. Piknometar sa vinom je inkubiran na vodenom kupatilu na 20 °C, 20 minuta. Nakon inkubacije piknometar je izmeren na analitičkoj vagi.

Relativna gustina vina je dobijena iz formule:

$$\rho = \frac{m_1 - m_{pp}}{m_{vp}}$$

m_1 – masa piknometra sa vinom (g),

m_{pp} – masa praznog piknometra (g),

m_{vp} – masa piknometra sa vodom (g).

3.5.2. Određivanje stvarnog alkohola u vinu od plodova zove

Nakon određivanja relativne gustine, vino iz piknometra je kvantitativno preneseno u kolbu za destilaciju, uz ispiranje piknometra destilovanom vodom. Destilacija je trajala sve dok se u piknometru nije sakupilo 3/4 destilata od ukupne zapremine piknometra. Nakon destilacije, piknometar je napunjen destilovanom vodom do crte i stavljen na temperiranje u vodeno kupatilo na temperaturi od 20 °C. Merenjem mase piknometra dobijena je gustina destilata.

Gustina destilata je izračunata iz formule:

$$\rho = \frac{m_{pd} - m_{pp}}{m_{vp}}$$

m_{pd} – masa piknometra sa destilatom (g),

m_{pp} – masa praznog piknometra (g),

m_{vp} – masa piknometra sa vodom (g).

Na osnovu izračunate gustine destilata iz standardizovanih tablica po Windisch-u je očitana vrednost sadržaja stvarnog alkohola u vinu. Sadržaj stvarnog alkohola u vinu je izražen u procentima (% , v/v) (Sl. glasnik 107/2014).

3.5.3. Određivanje sadržaja ukupnog ekstrakta u vinu od plodova zove

Ukupan suvi ekstrakt ili ukupna suva materija uključuje sve materije koje nisu isparljive pod specifičnim fizičkim uslovima. Ovi fizički uslovi moraju biti takvi da materije koje čine ekstrakt pretrpe što je moguće manje promene u toku ispitivanja. Ukupan suvi ekstrakt izračunava se indirektno iz relativne gustine šire, a za vino iz relativne gustine bezalkoholnog vina.

Gustina ukupnog ekstrakta je izračunata iz formule:

$$\rho = (\rho_1 - \rho_2) + 1$$

ρ_1 - relativna gustina vina na 20 °C (korigovana za isparljive kiseline),

ρ_2 - relativna gustina smeše voda - alkohol iste alkoholne jačine kao i vino na 20 °C.

Na osnovu izračunate gustine iz standardizovanih tablica je očitana vrednost za sadržaj ukupnog ekstrakta u vinu (Sl. glasnik 107/2014). Sadržaj ukupnog ekstrakta u vinu je izražen u gramima po litru (g/l).

3.5.4. Određivanje pH vrednosti matičnog soka i vina od plodova zove

Za određivanje pH matičnog soka i vina korišćen je pH metar, čije su elektrode uronjene u ispitivane uzorke, na temperaturi 20 °C. pH vrednost je očitana direktno sa skale pH metra. Merenje je ponovljeno tri puta, a konačan rezultat je izražen kao aritmetička sredina tri merenja.

3.5.5. Određivanje sadržaja isparljivih kiselina u vinu od plodova zove

Sadržaj isparljivih kiselina u vinu je određen tako što je u tikvicu za destilaciju vina otpipetirano 20 ml vina i dodato 0,5 g vinske kiseline. Destilacija vina vodenom parom je trajala dok količina destilata u prihvatnom sudu nije dostigla zapreminu od 250 ml. Dobijeni destilat je zagrejan do ključanja i ohlađen, nakon čega su dodate 2 - 3 kapi rastvora fenolftaleina, nakon čega je urađena titracija 0,1 M rastvorom natrijum hidroksida do pojave ružičaste boje.

Sadržaj isparljivih kiselina izračunat je iz formule:

$$X = n \times 0,12$$

n (ml) - zapremina utrošenog natrijum hidroksida za titraciju.

Sadržaj isparljivih kiselina u vinu je izražen u gramima po litru (g/l), kao sirćetna kiselina.

3.5.6. Određivanje sadržaja ukupnog sumpor-dioksida u vinu od plodova zove

Sadržaj ukupnog sumpor-dioksida je određen jodometrijskom titracijom (OIV, 2013). Jodometrijskom titracijom je određen slobodni sumpor-dioksid. Nakon dvostruke alkalne hidrolize, jodometrijski je određen i vezani sumpor dioksid. Zahvaljujući sposobnosti joda da oksiduje i druge materije iz vina, u istom uzorku vina, izvedena je titracija kako bi se utvrdila količina joda koja je utrošena za oksidaciju. Slobodni sumpor dioksid se veže u potpunosti etanalom, a zatim je izvedena titracija jodom. Sadržaj ukupnog sumpor-dioksida izražen je u miligramima po litru vinu (mg/l).

3.5.7. Određivanje sadržaja metanola u vinu od plodova zove

Sadržaj metanola određen je standardizovanom metodom (OIV, 2013) koja se zasniva na oksidaciji metanola do fomaldehida (metanala), u prisustvu kalijum-permanganata, koji je zakišeljjen fosfornom kiselinom. Merenjem intenziteta boje formiranog ljubičastog kompleksa na talasnoj dužini 575 nm, određen je sadržaj formaldehida. Sadržaj metanola u vinu dobija se interpolacijom očitane apsorbancije na kalibracionu krivu pripremljenu pomoću rastvora metanola različitih koncentracija, a rezultat je izražen u miligramima po litru vina (mg/l).

3.5.8. Određivanje sadržaja minerala u matičnom soku i vinu od plodova zove

Sadržaj minerala (Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu, Mn, Zn, Cr, Sn i Ni) je određen u matičnom soku i vinu od zove. U analizirani uzorak dodata je određena zapremina (1+1) azotne kiseline tako da bude 1% (v/v). Za razblaživanje uzoraka korišćeni su normalni sudovi od 25, 50 ili 100 ml, koji su zatim dopunjeni do crte ultra čistom vodom i analizirani ICP-OES metodom. Rastvori su uvedeni u plazmu ICP-OES spektrometra (Agilent 5100) preko peristaltičke pumpe, koja obezbeđuje stalan protok rastvora, i pneumatičkog raspršivača koji rastvor prevodi u aerosol, koji se uvodi strujom inertnog gasa argona u indukovanu spregnutu plazmu sa optičkim emisionim spektrometrom (ICP-OES), gde se emituje karakteristično zračenje za svaki element, pri čemu se analizira dobijeni signal („Office of public Health Science,” 2018). Sadržaj minerala u matičnom soku i vinu od plodova zove je izražen u miligramima po litru soka, odnosno vina (mg/l soka, mg/l vina, redom).

3.5.9. Određivanje sadržaja organskih kiselina i šećera u matičnom soku i vinu od plodova zove i ugljenih hidrata, lipida, proteina i energetske vrednosti u matičnom soku

Sadržaj organskih kiselina je određen u matičnom soku i vinu od zove pomoću HPLC Sistema "Waters Alliance" sa UV/VIS detektorom. U toku analize korišćena je kolona Atlantis C18 (4,6 x 150 mm, 5 mm) sa temperaturnim režimom u pećnici od 45 °C. NaH₂PO₄ x H₂O (20 mmol/l) je predstavljao mobilnu fazu, sa protokom od 0,5 ml/min, dok je UV detektor postavljen na 210 nm. Upotrebljena zapremina uzorka je bila 10 µl. Sadržaj organskih kiselina izražen je u gramima po litru soka, odnosno vina (g/l).

Sadržaj šećera je određen u matičnom soku i vinu od zove pomoću HPLC sistema "Waters Alliance" sa indeksom refrakcije Waters 2414. Korišćena je kolona "Carbohydrate analysis column – Waters" (3,9 x 300 mm), a temperaturni režim u pećnici je odgovarao sobnoj temperaturi. Mobilna faza je bila ACN/H₂O (80/20%) sa protokom od 1,5 ml/min. Konačni sadržaj šećera izražen je u gramima po litru soka, odnosno vina (g/l).

Analiza nutritivnog sastava soka od zove obuhvatala je određivanje sadržaja ukupnih ugljenih hidrata, lipida, proteina i određivanje energetske (kalorijske) vrednosti.

Sadržaj ugljenih hidrata je određen metodom koju su opisali Trajković i sar. (1983). Metoda se zasniva na odmeravanju 1 ml ispitivanog uzorka soka u koji je dodato 20 ml destilovane vode, nakon čega je smeša zagrejana do ključanja u toku 5 minuta. Nakon hlađenja ispitivani uzorak soka je kvantitativno prebačen u normalni sud od 100 ml i dopunjen vodom do crte. Zagrevanjem uzorka sa sumpornom kiselinom pospešuje se reakcija dehidracije, heksoze prelaze u hidroksimetilfurfurol. Kao proizvod razgradnje hidroksimetilfurfurola, pod dejstvom kiseline, nastaju furfurol i formaldehid. Formaldehid sa hromotropnom kiselinom daje ljubičasto obojen proizvod. Intenzitet nastalog obojenja zavisi od koncentracije heksoza u uzorku i određuje se merenjem apsorbancije rastvora na talasnoj dužini 570 nm. Sadržaj ugljenih hidrata je izražen u miligramima po mililitru soka (mg/ml).

Određivanje sadržaja lipida se zasniva na ekstrakciji masti iz pripremljenog uzorka soka uz pomoć organskog rastvarača na aparaturi po "Soxletu" primenom metode koja je propisana Pravilnicima Sl. list SFRJ 41/1987, Sl. list SFRJ 74/1988, Sl. list SFRJ 41/1985. Sadržaj lipida je izražen u miligramima po mililitru soka (mg/ml).

Sadržaj proteina u soku od zove ispitan je primenom metode koju su opisali Trajković i sar. (1983), a koja je modifikovana i prilagođena metodi propisanoj Pravilnikom o metodama uzoraka i metodama izvođenja fizičko-hemijskih analiza belančevinastih proizvoda za prehrambenu industriju (Sl. list SFRJ 41/1985). Sadržaj proteina je izražen u miligramima po mililitru soka (mg/ml).

Energetska vrednost proizvoda je izračunata na osnovu konverzionih faktora propisanih Pravilnikom o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (Sl. glasnik RS 17/2020) i dobijenih laboratorijskih rezultata sadržaja ugljenih hidrata, lipida i proteina. Energetska vrednost je izražena kao broj kilokalorija u 100 mililitara soka (kcal/100 ml).

3.6. Hidrodestilacija biljnog materijala (ploda i cveta zove)

Etarsko ulje je izolovano iz tradicionalno osušenog ploda i cveta i liofilizovanog ploda zove, u aparaturi po Clavenger-u (1928). Odmereni biljni materijal je prenet u balon za destilaciju, balon je postavljen na grejnu podlogu i dodata je voda kao rastvarač. Odnos biljnog materijala i rastvarača bio je 1:10 (g/ml). Proces destilacije je trajao 4 sata, a etarsko ulje je izolovano u 1 ml n-heksana. Heksanski sloj je ispušten u čašicu i sušen anhidrovanim natrijum sulfatu. Nakon 24 sata heksanski rastvor je filtriran, a filtrat prebačen u prethodno izmeren balon. Zaostali rastvarač je uparen na vakuum uparivaču. Sadržaj lako isparljivih komponenata u etarskom ulju izražen je u procentima (% , m/m).

3.7. Fitohemijska analiza proizvoda na bazi zove

3.7.1. Određivanje sadržaja suve materije

Sadržaj suve materije u ispitivanim uzorcima određen je primenom standardne metode po Ph. Jug. IV (1984). Nakon filtracije od dobijenog tečnog ekstrakta, otpipetirano je 10 ml, preneseno u prethodno izmeren balon i upareno do suva na rotacionom vakuum uparivaču. Upareni ekstrakt se sušio u sušnici na temperaturi od 105 °C u toku 3 sata i do konstantne mase. Za svaki uzorak postupak je ponovljen tri puta, a rezultat dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija. Prinos ekstrakcije je izražen kao gram suvog ekstrakta/100 g droge (% , m/m).

3.7.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola je određen spektrofotometrijski prema metodi po Folin-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965). Ekstrakt ili njegovo razblaženje je pomešano sa 7,9 ml vode, nakon čega je dodato je 0,5 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,5 ml 20% rastvora natrijum-karbonata. U slepu probu je umesto uzorka dodata odgovarajuća zapremina vode. Smeša je inkubirana 60 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je izmerena apsorbancija na 750 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg GAE/ml E; mg GAE/ml soka; mg GAE/ml vina, redom).

3.7.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određen spektrofotometrijski prema Markham-u (Harborne, 1989; Markham, 1989). Određena zapremina uzorka ili njegovog razblaženja (1 ml) je pomešana sa 4 ml vode, zatim je dodato 0,3 ml 3% rastvora natrijum-nitrita, nakon čega je inkubacija trajala 5 minuta. Nakon isteka vremena inkubacije, dodato je 0,3 ml 10% aluminijum-hlorida i ponovna inkubacija je trajala 6 minuta. Nakon drugog perioda inkubacije dodato je 1 ml 1 M rastvora natrijum-hidroksida i 3,4 ml vode, zatim je merena apsorbancija na 510 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta rutina po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg RU/ml E; mg RU/ml soka; mg RU/ml vina, redom).

3.7.4. Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana određen je primenom pH diferencijalne metode koju su opisali Lee i sar. (2005). Ova metoda se zasniva na osobini antocijana da pri promeni pH vrednosti sredine reverzibilno menjaju svoju strukturu, pri čemu dolazi i do promene apsorpcionog spektra. Obojeni oksonijum oblik sa maksimumom apsorbancije na 520 nm, postoji na pH = 1, a bezbojna hemiketalna forma dominira na pH = 4,5.

Koncentracija monomernih antocijana proporcionalna je razlici između apsorbancije očitane pri pH = 1 i pri pH = 4,5 na 520 nm.

Zapremina pripremljenih uzoraka 10 μ l je dodata u 390 μ l pufera pH = 1 i pH = 4,5 koji su se nalazili u otvorima mikroploča. Apsorbancija pripremljenih uzoraka merena je spektrofotometrijski na 520 i 700 nm nakon 40 minuta inkubacije. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta cijanidin-3-*O*-glukozida po mililitru ekstrakta, miligram ekvivalenta cijanidin-3-*O*-glikozida po mililitru soka, miligram-ekvivalenta cijanidin-3-*O*-glukozida po mililitru vina (mg CGE/ml E; mg CGE-3-G/ml soka; mg CGE/ml vina, redom).

3.7.5. Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Sadržaj ukupnih tanina određen je po spektrofotometrijskoj metodi Singleton, Orthofer i Lamuela-Raventós (1999) prilagođenoj za mikroploče. Ova metoda se zasniva na osobini fenola da u reakciji sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom daju obojeni kompleks, čija se apsorbancija određuje na 760 nm. Nakon određivanja sadržaja fenola, tanini se istalože. Sadržaj tanina u uzorcima predstavlja razliku sadržaja ukupnih fenola pre i posle taloženja tanina. Tanini su istaloženi dodatkom 50 mg PVPP (polivinilpolipirolidon) i 0,5 ml natrijum citratnog pufera (0,1 M, pH = 3) na 0,5 ml ekstrakta. Smeša je vorteksirana, inkubirana 15 minuta na 4 °C, ponovo vorteksirana i centrifugirana 15 minuta na 4500 g. Sve radne probe rađene su u tri ponavljanja, a njihova

apsorbancija merena je spektrofotometrijski nakon dva sata. Rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenata katehina po mililitru ekstrakta, miligram ekvivalenata katehina po mililitru soka, miligram ekvivalenata katehina po mililitru vina (mg CA/ml E; mg CA/ml soka; mg CA/ml vina, redom).

3.7.6. Određivanje polifenolnog profila

Odabrane fenolne komponente u ispitivanim uzorcima kvantifikovane su primenom LC-MS/MS (tečna hromatografija/masena spektrometrija) tehnike. Korišćen je *Agilent Technologies 1200 Series Rapid Resolution* tečni hromatograf, kuplovan sa G6410A QqQ MS-MS detektorom sa elektrosprej jonskim izvorom (ESI), kontrolisan od strane *MassHunter* ver. B.03.01. softvera (Agilent Technologies). Za hromatografsko razdvajanje korišćena je Zorbax Eclipse XDB-C18 RR 4,6 mm \times 50 mm \times 1,8 μ m (Agilent Technologies) reverzo-fazna kolona pri temperaturi od 45 °C; binarna mobilna faza 0,05% mravlje kiseline (A) i metanola (B), protok 1 ml/min. Primenjen je gradijentni mod, koji je podrazumevao sledeći odnos faza: 0 minuta 30% B, 6 minuta 70% B, 9 minuta 100% B, 12 minuta 100% B, sa vremenom reekvilibracije od 3 minuta. Injektovana zapremina svih uzoraka bila je 5 μ l. ESI parametri bili su: gas za sušenje (N₂) temperature 350 °C, protok 10 l/min, pritisak gasa nebulajzera 50 psi, napon na kapilari 4 kV, negativan polaritet. Jedinjenja su praćena u dinamičkom MRM (*multiple reactions monitoring*) modu.

Ostali optimizovani parametri dati su u Tabeli 3.2. Metoda obuhvata praćenje 45 fenolnih jedinjenja i hinske kiseline kao prekursora fenola, koji čine osnovni miks (Orčić i sar., 2014), sa dodatkom 3 nova fenolna jedinjenja (rezveratrol, morin i elagna kiselina), koja su snimljena pri istim uslovima. Kalibracioni standardi koncentracija od 0,0015 μ g/ml do 25,0 μ g/ml pripremljeni su sekvencijalnim razblaživanjem (1:1) osnovnog miksa koncentracije 100 μ g/ml, i dodatnih jedinjenja, smešom metanol-voda (3:7). Određivanje sadržaja standardnih fenolnih komponenata u ispitivanim uzorcima urađeno je na osnovu standardne kalibracione krive [funkcija logaritma površine pika u zavisnosti od logaritma koncentracije standarda, $\log(A) = f \log(C)$], snimljene iz serije razblaženja miksa standarda. Rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u mikrogramima po mililitru ekstrakta, soka i vina (μ g/ml E, μ g/ml soka, μ g/ml vina, redom).

Tabela 3.2. LC-MS/MS parametri za kvantifikaciju standardnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim uzorcima

Jedinjenje	Retenciono vreme (min)	Napon fragmentora (V)	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Kolizijska energija (V)
Osnovni miks					
Galna kiselina	0,58	90	169	125	10
Katehin	0,74	150	289	245	10
Protokatehinska kiselina	0,79	105	153	109	9
Hlorogenska kiselina	0,80	100	353	191	10
Epigalokatehin galat	0,81	165	457	169	16
Epikatehin	0,95	150	289	245	10
2,5-Dihidroksibenzojeva kiselina	1,03	100	153	109	9
<i>p</i> -Hidroksibenzojeva kiselina	1,08	80	137	93	10
Eskuletin	1,13	105	177	133	15
Kafena kiselina	1,18	100	179	135	10
Vanilinska kiselina	1,24	100	167	108	15
Siringinska kiselina	1,31	90	197	182	7
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,69	90	163	119	9
Umbeliferon	1,73	120	161	133	19
Skopoletin	1,77	80	191	176	8
Ferulna kiselina	1,90	90	193	134	11
Viteksin	1,90	200	431	311	22
Sinapinska kiselina	1,92	100	223	193	17
Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	2,13	230	447	285	30
Hiperozid	2,16	200	463	300	30
Kvercetin-3- <i>O</i> -glukozid	2,25	210	463	300	30
Rutin	2,33	135	609	300	42
Apin	2,60	250	563	269	36
<i>o</i> -Kumarinska kiselina	2,62	100	163	119	5
Miricetin	2,67	150	317	179	20
Kvercitrin	2,75	190	447	300	27
Kemferol-3- <i>O</i> -glukozid	2,80	190	447	284	30
Apigenin-7- <i>O</i> -glukozid	2,81	135	431	268	41
Sekoizolaricirezinol	2,90	130	361	165	26

3,4-Dimetoksicimetna kiselina	2,99	110	207	103	7
Bajkalin	3,40	140	445	269	22
Daidzein	3,43	145	253	208	31
Datairezinol	3,66	130	357	122	24
Kvercetin	3,74	130	301	151	15
Naringenin	3,87	130	271	151	16
Cimetna kiselina	3,91	100	147	103	5
Luteolin	4,03	135	285	133	25
Genistein	4,12	145	269	133	32
Kemferol	4,55	130	285	285	0
Apigenin	4,71	130	269	117	25
Izoramnetin	4,79	160	315	300	21
Krizoeriol	4,82	125	299	284	20
Bajkalein	5,15	165	269	269	0
Amentoflavon	5,78	220	537	375	35
Hinska kiselina	0,52	150	191	85	20
Dodatno					
Rezveratrol	2,26	130	227	185	15
Morin	2,92	120	301	149	29
Elagna kiselina	2,23	152	301	301	0

3.8. Hemijska analiza etarskog ulja ploda i cveta zove

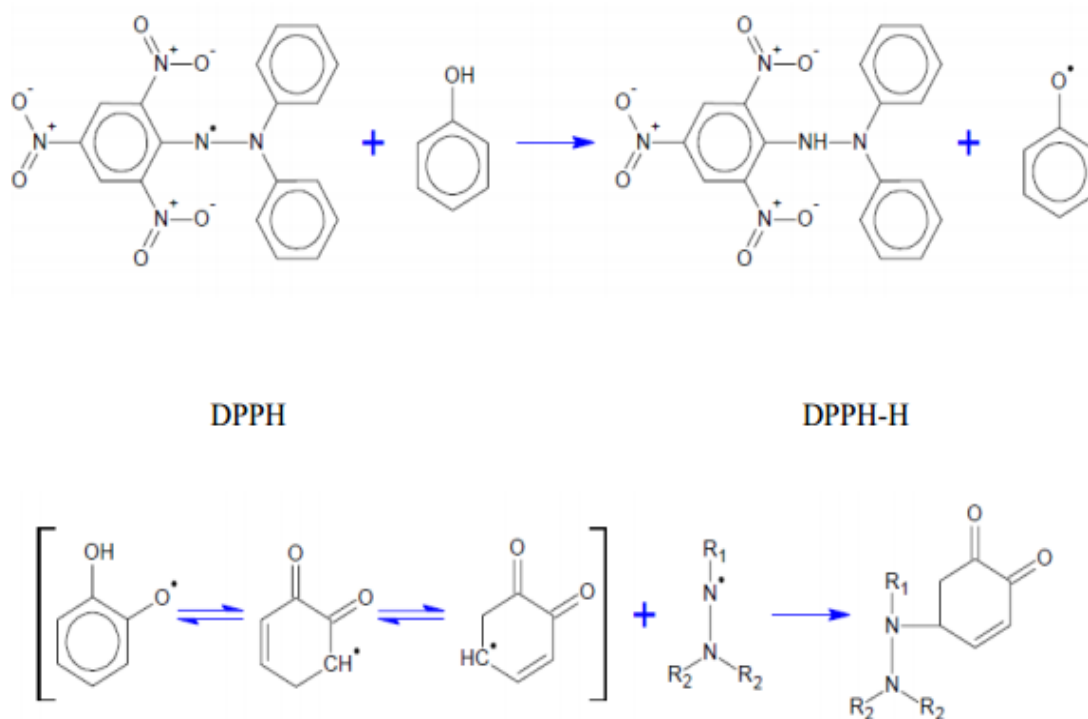
Analiza etarskog ulja zove obuhvatala je kvalitativni i kvantitativni sastav ulja tradicionalno sušenog i liofilizovanog ploda i tradicionalno sušenog cveta, koji je određen pomoću GC/MS (gasna hromatografija/masena spekrometrija) metode. Za analizu je upotrebljena kolona TR WAX-MS (30 mm x 0,25 mm x 0,25 μ m) uz sledeći temperaturni program: 45 °C (8 min) sa porastom temperature od 8 °C/min do 230 °C (10 min). Temperatura injektora je bila 250 °C, a jonskog izvora 220 °C. Kao noseći gas korišćen je helijum (1 ml/min) u split modu (80:1). Dobijeni rezultat je izražen u procentima (% m/m).

3.9. Određivanje bioloških i funkcionalnih karakteristika proizvoda na bazi zove

3.9.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti

3.9.1.1. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH• radikala

Sposobnost neutralizacije DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala ispitivanih uzoraka određena je spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na praćenju promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog azot-centriranog DPPH• radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H (Slika 3.3). Pojava žute boje objašnjava se sposobnošću pojedinih komponenata da deluju kao donori vodonika ili elektrona, pri čemu DPPH• prelazi u redukovani neutralni DPPH-H oblik. Neutralizacija DPPH• fenolnim jedinjenjima odvija se pomoću dva simultana mehanizma. Najpre, fenolno jedinjenje deluje kao donor H-atoma, pri čemu nastaje redukovani, neutralni DPPH-H oblik i ariloksi radikal koji je rezonantno stabilizovan, a zatim nastali ariloksi radikal može da reaguje sa još jednim DPPH• radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije i prelaska u neutralan molekul (Singh i Thakur, 2018).

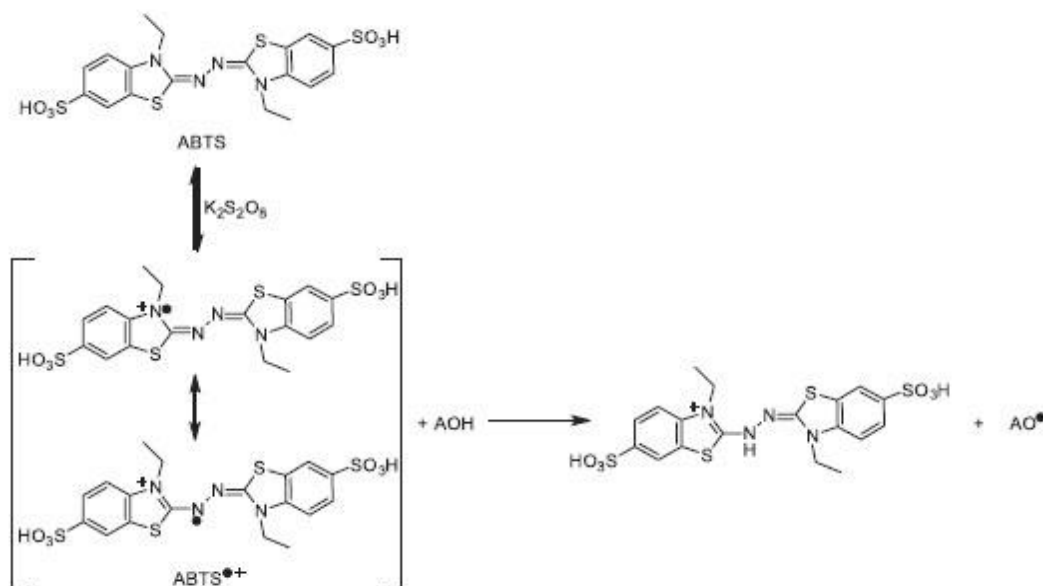


Slika 3.3. Mehanizam neutralizacije DPPH• radikala
(Singh i Thakur, 2018)

Rastvor uzoraka, zapremine 1 ml je dodat u 4 ml 0,004% rastvora metanola DPPH. Apsorbancija uzorka je očitana na 517 nm nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi u mraku. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka, mg TE/ml vina, redom) (Uysal i sar., 2017).

3.9.1.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije $ABTS^{\bullet+}$ radikala

Određivanje sposobnosti uklanjanja $ABTS^{\bullet+}$ slobodnog radikala [2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-sulfonsku kiselinu] se zasniva na reakciji 7 mM rastvora ABTS sa 2,45 mM kalijum-persulfata (Slika 3.4). Rastvor nastalog radikala se ostavi da stoji 12-16 h u mraku na sobnoj temperaturi, pri čemu se rastvor oboji tamnoplavo.



Slika 3.4. Reakcija oksidacije ABTS kalijum-persulfatom, nastavak reakcije ABTS radikala katjona i antioksidansa (AOH) (Oliveira i sar., 2014).

Pre početka izvođenja testa, rastvor ABTS je razblažen metanolom dok apsorbancija na 734 nm ne bude $0,7 \pm 0,02$. Rastvor uzoraka zapremine 1 ml je dodat u 2 ml rastvora ABTS uz mešanje smeše. Apsorbancija uzorka je očitana na 734 nm nakon inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi.

Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka; mg TE/ml vina, redom) (Uysal i sar., 2017).

3.9.1.3. Određivanje redukcionog potencijala

Redukcija moć je veoma važan antioksidativni mehanizam koji se ogleda u sposobnosti antioksidanta da doniraju elektron (Llorent-Martínez i sar., 2017). Redukcioni potencijal ispitivanih uzoraka u okviru ove doktorske disertacije ispitan je primenom FRAP i CUPRAC testova.

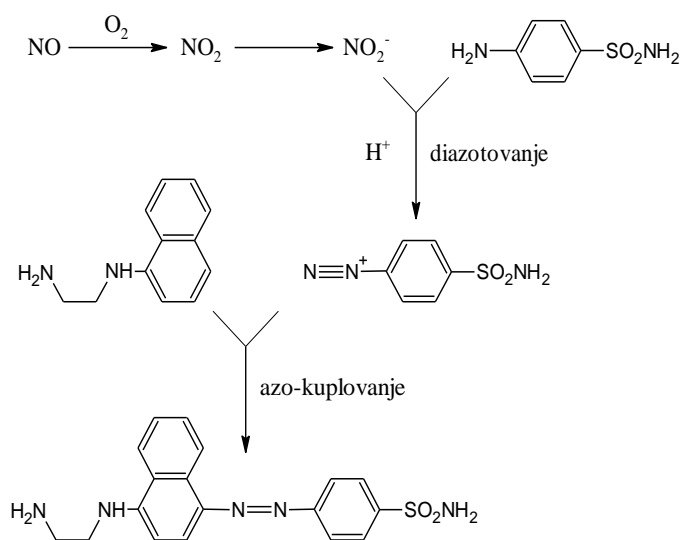
Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona - FRAP (eng. Ferric Reducing Antioxidant Power) je kolorimetrijski test koji se zasniva na sposobnosti antioksidanata da redukuju gvožđe(III)-2,4,6-tripiridil-S-triazin kompleks $[\text{Fe(III)-(TPTZ)}_2]^{3+}$ do intenzivno plavo obojenog kompleksa $[\text{Fe(II)-(TPTZ)}_2]^{2+}$ u kiseloj sredini (Badarinath i sar., 2010).

Rastvori uzoraka zapremine 0,1 ml su dodati u 2 ml pripremljenog FRAP reagensa, koji sadrži acetatni pufer (0,3 M, pH 3,6), 2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazin (TPTZ) (10 mM) u 40 mM hlorovodoničnoj kiselini i gvožđe(III)-hlorid (20 mM) u odnosu 10:1:1 (v/v/v). Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je apsorbancija očitana na 593 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija, a redukciona sposobnost ispitivanih uzoraka primenom FRAP testa izražena je u miligramima ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka; mg TE/ml vina, redom) (Uysal i sar., 2017).

Sposobnost redukcije Cu^{2+} jona - CUPRAC (eng. Cupric Reducing Antioxidant Capacity) metoda se zasniva na praćenju redukcije Cu^{2+} jona koji sa neokuproinom (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), pri pH = 7 gradi bezbojan bis(neokuproin)-bakar(II) helatni kompleks, Cu(II)-Nc. Cu(II)-Nc predstavlja redoks reagens u CUPRAC metodi. Rastvori pripremljenih uzoraka su ispitivani i kao redukciono agensi Cu^{2+} jona primenom CUPRAC testa. Zapremina 0,5 ml uzorka je dodata u reakcionu smešu koja sadrži bakar(II) hlorid (1 ml, 10 mM), neokuprion (1 ml, 7,5 mM) i amonijum-acetatni pufer (1 ml, 1 M, pH 7,0). Slepa proba je pripremljena dodavanjem rastvora uzorka (0,5 ml) u reakcionu smešu, zapremine 3 ml, bez bakar(II) hlorida. Inkubacija je trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi, a vrednosti apsorbancije su očitane na 450 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka, mg TE/ml vina, redom) (Uysal i sar., 2017).

3.9.1.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije •NO radikala

Određivanje sposobnosti neutralizacije •NO radikala pripremljenih uzoraka biljne vrste *S. nigra* zasniva se na spektrofotometrijskom merenju neutralizacije generisanih nitritnih jona. U ovu svrhu korišćen je vodeni rastvor natrijum nitroprusida (SNP) koji predstavlja izvor •NO radikala pri fiziološkom pH. Nastali •NO reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone, čija koncentracija se određuje po metodi Green-a i sar. (1982), a koja se zasniva na spektrofotometrijskom određivanju purpurno-ružičastog diazo kompleksa koji nastaje nakon reakcije NO_2^- i Griess-ovog reagensa na sobnoj temperaturi (Slika 3.5).



Slika 3.5. Nastajanje diazo kompleksa
(Schatzschneider, 2017)

Od uzoraka početne koncentracije napravljene su serije razblaženja, tako da je dobijen raspon početnih koncentracija uzoraka 0,07-4,80 mg/ml. U pripremljene uzorake, zapremine 70 μl dodato je 10 μl SNP-a i 80 μl fosfatnog pufera pH = 7,4, a nakon inkubacije dodato je 150 μl Griess-ovog reagensa. Apsorbancija je merena (546 nm) nakon 60 minuta inkubacije. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenta troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka; mg TE/ml vina, redom).

3.9.1.5. Određivanje inhibicije lipidne peroksidacije

Određivanje sposobnosti vina od plodova zove da inhibiraju lipidnu peroksidaciju urađeno je TBA (tiobarbiturna kiselina) metodom (Halliwell i Gutteridge, 1986), pri čemu su polinezasićene masne kiseline iz lanenog ulja korišćene kao supstrat za lipidnu peroksidaciju. Fe^{2+} joni mogu reagovati sa kiseonikom iz vazduha, pri čemu se obrazuju reaktivne vrste kiseonika (ROS), kao npr. superoksid anjon (O^{2-}), za koji se pretpostavlja da je inicijator lančane radikalne reakcije lipidne peroksidacije.

Za određivanje inhibicije lipidne peroksidacije analiziranih uzoraka, napravljena je serija razblaženja tako da je dobijen raspon početnih koncentracija soka i vina 0,20-0,70 mg/ml. Pripremljeni su odgovarajući rastvori i inkubirani 60 minuta na 37 °C. Nakon dodatka 3,72% EDTA i TBA reagensa, smeša je zagrevana 15 minuta na 100 °C, a zatim ohlađena do sobne temperature i centrifugirana tokom 15 minuta na 3500 o/min. Apsorbancija rastvora je merena spektrofotometrijski na 532 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenta troloksa po mililitru soka i vina (mg TE/ml soka; mg TE/ml vina, redom).

3.9.1.6. Određivanje sposobnosti heliranja jona metala

Sposobnost ispitivanih uzoraka u kompleksiranju Fe^{2+} jona je određena primenom metode koju su opisali Carter i sar. (1971) i Lim, Lim i Tee (2006). Ferozin omogućava kvantitativno građenje kompleksa sa Fe^{2+} jonima. U prisustvu helirajućih agenasa dolazi do razlaganja ovog kompleksa, odnosno smanjenja intenziteta crvene boje koja potiče od ferozinskog kompleksa. Smanjenje intenziteta boje je praćeno spektrofotometrijski na 562 nm.

Zapremina 1 ml uzoraka za analizu je upotrebljena za pripremu reakcione smeše. Reakciona smeša je pripremana mešanjem sa 1 ml, 0,125 mM gvožđe(II) sulfata, nakon čega je dodat 1 ml ferozina (0,3125 mM). Ovako pripremljenoj reakcionoj smeši merena je apsorbancija (na 562 nm) posle 10 minuta inkubacije. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenta etilendiaminotetrasirćetne kiseline po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg EDTA/ml E; mg EDTA/ml soka; mg EDTA/ml vina, redom). U daljem tekstu za ovaj antioksidativni test će se koristiti skraćenica HM.

3.9.1.7. Određivanje ukupne antioksidativne aktivnosti

Ukupna antioksidativna aktivnost uzoraka na bazi zove određena je fosfomolibdenskom metodom (Prieto, Pineda i Aguilar, 1999). Za potrebe izvođenja analize od pripremljenih uzoraka napravljena je serija razblaženja u opsegu koncentracija od 0,20 do 0,65 mg/ml. Od svake koncentracije uzimano je po 0,30 ml uzorka i pomešano sa 3 ml smeše reagenasa. Smešu reagenasa sačinjavali su: 0,6 M sumporna kiselina, 28 mM natrijum fosfat i 4 mM amonijum molibdat. Reakciona smeša reagensa i uzoraka je inkubirana na 95 °C u trajanju od 90 minuta. Nakon hlađenja merena je apsorbancija na 695 nm. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen u miligramima ekvivalenta troloksa po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg TE/ml E; mg TE/ml soka; mg TE/ml vina, redom). U daljem tekstu za ovaj antioksidativni test će se koristiti skraćenica PM.

3.9.2. Određivanje neuroprotektivne aktivnosti - inhibicija enzima holinesteraza AChE i BChE

Pripremljeni uzorci za analizu zapremine 50 μ l su pomešani sa 125 μ l DTNB (5,5-ditio-bis2-nitrobenzoeva) kiseline, AChE (acetilholinesterazom) i BChE (butirilholinesterazom) u Tris-HCl puferu (pH 8) na mikroploči, inkubirani su 15 minuta na 25 °C. Nakon isteka vremena inkubacije reakcija je pokrenuta dodatkom 25 μ L acetiltioholin-jodida i butiriltioholin-hlorida. Slepa proba je pripremljena dodavanjem uzoraka u sve reakcione sisteme bez rastvora enzima. Apsorbancije uzoraka su očitane na 405 nm nakon 10 minuta inkubacije na 25 °C. Apsorbancija slepe probe je oduzeta od apsorbancije uzoraka, merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija. Inhibitorna aktivnost holinesteraza izražena je kao miligram ekvivalenta galantamina po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg GALAE/ml E; mg GALAE/ml soka, mg GALAE/ml vina, redom) (Uysal i sar., 2017).

3.9.3. Određivanje antitirozinazne aktivnosti - inhibicija enzima tirozinaze

Sposobnost ispitivanih uzoraka da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima tirozinaze određena je po modifikovanoj metodi (Orhan i sar., 2012) koristeći L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin) kao supstrat. Proizvodi i ekstrakti na bazi zove (2 mg/ml; 25 μ l) pomešani su sa rastvorom tirozinaze (40 mM, 40 μ l) i fosfatnim puferom (100 μ l, pH 6,8). Reakcija je inicirana dodatkom 40 μ l rastvora L-DOPA (10 mM), nakon čega je smeša inkubirana u trajanju od 15 minuta na 25 °C. Slepa proba je pripremljena na isti način, ali bez dodavanja enzimskog rastvora. Apsorbancija slepe probe i uzoraka izmerena je na 492 nm. Na osnovu razlike apsorbancije uzoraka i slepe probe izračunata je aktivnost inhibicije tirozinaze. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen kao miligram ekvivalenta kojične kiseline po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg KAE/ml E; mg KAE/ml soka; mg KAE/ml vina, redom).

3.9.4. Određivanje antidijabetogene aktivnosti - inhibicija enzima α -amilaze i α -glukozidaze

Sposobnost inhibicije α -amilaze određena je pomoću Caraway-Somogyi metode (Zengin i sar., 2014). Pripremljeni uzorci zapremine 25 μ l pomešani su sa 50 μ l rastvora α -amilaze u fosfatnom puferu (pH = 6,9 sa 6 mM rastvorom natrijum hlorida) i naneseo na mikroploču. Reakcija je inicirana dodavanjem rastvora skroba (50 μ l, 0,05%). Reakciona smeša je inkubirana 10 minuta na 37 °C, a slepa proba je pripremljena bez dodatka rastvora enzima. Reakcija je zaustavljena dodatkom 25 μ l, 1 M hlorovodonične kiseline, nakon čega je dodato 100 μ l rastvora joda u kalijum jodidu (5/1, v/v). Apsorbancije su očitane na talasnoj dužini od 630 nm. Sposobnost inhibicije α -amilaze dobijena je oduzimanjem apsorbancije slepe probe od apsorbancije uzorka. Merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak, a rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen je kao miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg ACAE/ml E; mg ACAE/ml soka; mg ACAE/ml vina, redom).

Za određivanje sposobnosti inhibicije α -glukozidaze korišćena je metoda koji su opisali Zengin i sar. (2014). Zapremina od 50 μ l pripremljenih uzoraka, koncentracije 2 mg/ml je pomešana sa 50 μ l glutationa, koncentracije 0,5 mg/ml, rastvorom α -glukozidaze u fosfatnom puferu (0,1 M, pH = 6,8) i 50 μ l PNPG-a (10 mM) (4-N-trofenil- α -D-glukopiranozid) u mikroploči. Inkubacija reakcione smeše je izvedena na 37 °C u trajanju od 15 minuta, a slepa proba je pripremljena bez dodatka rastvora enzima. Reakcija je prekinuta dodavanjem rastvora natrijum-karbonata (50 μ l, 0,2 M), nakon čega je izmerena apsorbancija na talasnoj dužini od 400 nm. Od apsorbancije uzorka oduzeta je apsorbancija slepe probe, a merenje je ponovljeno tri puta za svaki uzorak. Rezultat je dobijen kao srednja vrednost tri merenja \pm standardna devijacija i izražen je kao miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta, soka i vina (mg ACAE/ml E; mg ACAE/ml soka; mg ACAE/ml vina, redom).

3.10. Instrumentalno određivanje boje soka od zove

Boja soka od zove izmerena je u staklenoj kiveti prečnika 20 mm (CM-A99), ukupno osam puta. CIE $L^*a^*b^*C^*h\lambda$ koordinate boje (CIE, 1976) određene su korišćenjem Konica Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan) u D-65 osvetljenju, standardnim uglom zaklona od 2° i sa 8 mm otvorom na mernoj glavi. L^* vrednost ukazuje na svetloću (crno bela osovina), a^* vrednost ukazuje na udeo crvene boje (crveno zeleni spektar), b^* vrednost ukazuje na udeo žute boje (žuto plavi spektar), C^* vrednost ukazuje na zasićenost boje, h vrednost („hju” ugao) ukazuje na nijansu boje i λ vrednost ukazuje na dominantnu talasnu dužinu (nm).

3.11. Određivanje kvaliteta soka od plodova zove

3.11.1. Senzorska ocena profila soka od zove – kvantitativna deskriptivna analiza od strane senzorskog panela

Senzorska ocena soka od zove obavljena je korišćenjem kvantitativne deskriptivne analize. Senzorsku analizu obavio je obučeni panel od 12 ocenjivača (6 žena i 6 muškaraca), koji je utreniran prema standardu za odabir, obuku i praćenje ocenjivača (ISO 8586, 2012). Ocenjivači su bili starosti između 25 i 50 godina. Svi ocenjivači su bili zaposleni na Tehnološkom fakultetu Novi Sad, Univerziteta u Novom Sadu i imali su prethodno iskustvo u senzorskoj analizi hrane. Senzorska ocena ponovljena je dva puta u razmaku od jednog dana, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost iz dve sesije. Senzorska ocena obavljena je u Laboratoriji za senzorska ispitivanja (Tehnološki fakultet Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu) koja je opremljena u skladu sa važećim ISO standardom (ISO 8589, 2007) i koja je pod konstantnim i kontrolisanim uslovima temperature, vlažnosti, buke i mirisa, kako bi uticaj psiholoških činilaca na sposobnosti rada ocenjivača bio minimalan.

Svi uzorci su prezentovani ocenjivačima na sobnoj temperaturi i bili su pripremljeni za ocenjivanje 15 minuta pre ocenjivanja. Sok od zove je sipan u plastične čaše zapremine 90 ml, tako da je svaki ocenjivač dobio 50 ml soka za ocenjivanje. Ocenjivačima su uzorci soka od zove dostavljani u pojedinačnim kabinama, u kojima se pored uzorka soka od zove nalazio i pribor za ocenjivanje (ocenjivački list, pribor za pisanje, ubrus) i čaša za ispiranje usta vodom. Uzorci su dostavljani svim ocenjivačima u isto vreme i bili su označeni nasumično odabranim trocifrenim šiframa.

U cilju dobijanja senzorskog profila soka od zove, prvo su u više sesija od strane senzorskog panela obavljena preliminarna senzorska ispitivanja kako bi se ustanovile važne senzorske osobine (rečnik termina) uzorka koji se ispituje (ISO 11035, 1994). U toku ovih sesija ocenjivačima su bili dostupni uzorci odgovarajućih referentnih materijala. Metodom konsezusa je formirana lista i dat opis pojedinačnih senzorskih svojstava koji daju opšti (ukupan) karakter uzorka (Tabela 3.3). Kvantitativno ocenjivanje pojedinačnih senzorskih osobina soka od zove, korišćenjem termina koji su prethodno utvrđeni, izvedeno je na linijskoj skali za markiranje, dužine 100 mm, na kojoj su utvrđeni samo krajnji stepeni (0 – odsustvo svojstva ili veoma mali intenzitet; 100 – veoma veliki intenzitet) (ISO 4121, 2003; Lawless i Heymann, 2010).

Tabela 3.3. Lista i opis senzorskih atributa i referentnih materijala koji su korišćeni za opisnu analizu soka od zove

Atributi	Opis	Referentni materijal
Mirisi		
Po cvekli	Vlažni, gusti/zemljani i blago slatki aromati koji asociraju na cveklu	Sok od cvekle
Po kupini	Slatki, kiseli i voćni aromati koji asociraju na kupine	Sok od kupine
Po višnji	Kiseli, voćni i blago gorki aromati koje asociraju na višnje	Sok od višnje
Po sirću	Kiseli, opori i blago oštri aromati koji asociraju na sirće	Jabukovo sirće
Po grejpfrutu	Karakteristični aromati koji asociraju na grejpfrut	Svež grejp
Po kokosu	Karakteristični aromati koji asociraju na kokos	Mleko od kokosa
Po karanfiliću	Karakteristični aromati koji asociraju na karanfilić	Karanfilić – sušeni cvet
Po jasminu, jorgovanu	Slatko, lagano i blago parfemski utisak koji asocira na cveće	Benzil acetat
Po suvim šljivama	Karakteristični aromati koji asociraju na suve šljive	Suve šljive-dimljene
Ukusi		
Gorko	Osnovni ukus rastvora kofeina ili kinina	Kofein
Slatko	Osnovni ukus rastvora saharoze	Saharoza
Slano	Osnovni ukus rastvora natrijum hlorida	Natrijum hlorid
Kiselo	Osnovni ukus rastvora limunske kiseline	Limunska kiselina
Osećaji u ustima		
Oporo	Sakupljanje usta, rastvori aluminijuma (tanini)	Alum
Abrazija i suvoća	Osećaj abrazije i isušivanja grla	Sveža dunja
Perzistencija	Percepcija nejasne senzacije u uskoj šupljini nakon gutanja uzorka	

3.11.2. Određivanje stepena prihvatljivosti soka od plodva zove dobijenog senzorskim testiranjem potrošača

Za ispitivanje stepena prihvatljivosti soka od zove korišćena je skala za merenje stepena prihvatljivosti tzv. hedonska skala. U ovom ispitivanju je korišćena kategorijska bipolarna hedonska skala u formi sa 9 podeoka. Centralni podeok na skali, koji deli skalu na dve oblasti, odnosi se na indiferentan (neutralan) stav prema ispitivanom proizvodu: „niti mi se dopada, niti mi se ne dopada” – ocena 5. Od ovog centralnog podeoka u jednu stranu raste stepen dopadanja, tako da podeoci na skali imaju vrednosti od „malo mi se dopada” – ocena 6, do „izuzetno mi se dopada” – ocena 9, a u drugu stranu raste stepen nedopadanja, u kom smislu podeoci imaju vrednosti od „malo mi se ne dopada” – ocena 4, do „izuzetno mi se ne dopada” – ocena 1 (Slika 3.6). Senzorsko ispitivanje stepena prihvatljivosti obavljeno je pod identičnim uslovima kao i kvantitativna deskriptivna analiza, s tim da su ocenjivači ($n = 70$) bili studenti Tehnološkog fakulteta Novi Sad, Univerziteta Novi Sad. Pitanja koja su bila postavljena ocenjivačima glasila su „U kom stepenu Vam se: dopada izgled proizvoda / dopada ukusnost proizvoda / dopada osećaj u ustima koji stvara proizvod / dopada ukus koji ostaje u ustima / sveukupno dopada proizvod?” (Lawless i Heymann, 2010).

ISPITIVANJE STEPENA PRIHVATLJIVOSTI – Hedonska skala

- | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| IZUZETNO MI SE DOPADA | <input type="checkbox"/> | |
| VEOMA MI SE DOPADA | <input type="checkbox"/> | |
| UMERENO MI SE DOPADA | <input type="checkbox"/> | |
| MALO MI SE DOPADA | <input type="checkbox"/> | |
| NITI MI SE DOPADA- | <input type="checkbox"/> | -NITI MI SE NE DOPADA |
| | <input type="checkbox"/> | MALO MI SE NE DOPADA |
| | <input type="checkbox"/> | UMERENO MI SE NE DOPADA |
| | <input type="checkbox"/> | VEOMA MI SE NE DOPADA |
| | <input type="checkbox"/> | IZUZETNO MI SE NE DOPADA |

Slika 3.6. Hedonska skala od 9 podeoka (kategorijska)

3.11.3. Određivanje senzorske ocene boje soka od zove

Senzorsku ocenu boje soka od zove (metoda konsenzusa) obavili su takođe utrenirani ocenjivači (panel od 12 ocenjivača) korišćenjem NCS atlasa boja (Natural Color System®© - The international language of colour communication™, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden, www.ncscolour.com).

3.12. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka dobijenih rezultata je rađena u Microsoft Office Excel 2016 i korišćenjem programa STATISTICA (StatSoft, Dell) za Windows verzija 13.2. Kao mera centralne tendencije neke grupe korišćena je aritmetička sredina, a mera varijacije među podacima izražena je standardnom devijacijom. Statističke hipoteze su testirane na nivou statističke značajnosti od 0,05. Statistički značajnim smatrane su se razlike na nivou značajnosti (pouzdanosti) $p \leq 0,05$. Stepenn zavisnosti pojava među uzorcima određivan je koeficijentom linearne korelacije (R) ili regresionom analizom. Analiza glavnih komponentata (*Principal component analysis – PCA*) primenjena na normalizovane rezultate, izvršena je korišćenjem softvera PAST, verzija 3.14 (Hammer, Harper i Ryan, 2001).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

Ispitivanja biljne vrste *S. nigra* obuhvatala su sušenje polaznog biljnog materijala (ploda i cveta), tradicionalnim i savremenim tehnikama sušenja, ali i upotrebu svežih plodova zove za različita istraživanja koja su izvedena u okviru ove doktorske disertacije. Polazni biljni materijal je iskorišćen za dobijanje ekstrakata upotrebom dva ekstragensa (voda i 50% etanol). Ispitivanje fitohemijskog sastava vodenih i etanolnih ekstrakata ploda i cveta zove obuhvatalo je određivanje ukupnih sadržaja fenola, flavonoida, monomernih antocijana, tanina, kvalitativni i kvantitativni sastav pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, kao i analize delovanja dobijenih ekstrakata. Plodovi zove su iskorišćeni za dobijanje soka i vina, kao novih proizvoda na bazi zove. Analize soka su uključivale ispitivanje sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja, kvalitativni i kvantitativni sastav pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, određivanje nutritivnog profila, biološkog potencijala, kao i senzorsku analizu soka. Vino od plodova zove je dobijeno standardnim postupkom dobijanja crvenih vina, tretirano različitim temperaturnim tretmanima, u cilju degradacije cijanogenih glikozida prisutnih u biljnoj vrsti *S. nigra*. Analize dobijenog vina su uključivale ispitivanje hemijskog i fitohemijskog sastava vina, kao i evaluaciju biološke aktivnosti. Osušeni biljni materijal je upotrebljen za dobijanje etarskog ulja, čiji je kvalitativni sastav određen.

4.1. Hemijski sastav ekstrakata plodova zove

Analiza hemijskog sastava ploda i cveta zove je od posebnog značaja za određivanje kvaliteta dobijenih proizvoda upotrebom ovih biljnih organa. Voće ima složen hemijski sastav koji zavisi od različitih faktora, posebno klimatskih uslova, pedoloških osobina zemljišta, stepena zrelosti koji u velikoj meri utiču na sadržaj materija u biljnoj sirovini (Di Vitori i sar., 2018). U Tabeli 4.1 prikazan je sadržaj suve materije u ekstraktima plodova zove koji su dobijeni primenom različitih tehnika ekstrakcije. U daljem opisu rezultata i diskusiji radi preglednosti predstavljenih rezultata korišćene su skraćenice:

S vodeni UAE – vodeni ekstrakt svežih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,

S vodeni MAE – vodeni ekstrakt svežih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,

S vodeni MAC – vodeni ekstrakt svežih plodova dobijen MAC ekstrakcijom,

TS vodeni UAE – vodeni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,

TS vodeni MAE – vodeni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,

TS vodeni MAC – vodeni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen MAC ekstrakcijom,

L vodeni UAE – vodeni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,

L vodeni MAE – vodeni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,

L vodeni MAC – vodeni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen MAC ekstrakcijom,

S etanolni UAE – etanolni ekstrakt svežih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,

S etanolni MAE – etanolni ekstrakt svežih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,

S etanolni MAC – etanolni ekstrakt svežih plodova dobijen MAC ekstrakcijom,

TS etanolni UAE – etanolni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,

TS etanolni MAE – etanolni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,
 TS etanolni MAC – etanolni ekstrakt tradicionalno sušenih plodova dobijen MAC ekstrakcijom,
 L etanolni UAE – etanolni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen UAE ekstrakcijom,
 L etanolni MAE – etanolni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen MAE ekstrakcijom,
 L etanolni MAC – etanolni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen MAC ekstrakcijom

Tabela 4.1. Sadržaj suve materije u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove

Ekstrakti	Suva materija (%)
S vodeni UAE	0,46±0,01 ⁱ
S vodeni MAE	0,54±0,02 ^h
S vodeni MAC	0,40±0,01 ^k
TS vodeni UAE	1,13±0,04 ^f
TS vodeni MAE	1,26±0,04 ^e
TS vodeni MAC	1,08±0,02 ^f
L vodeni UAE	2,52±0,06 ^b
L vodeni MAE	3,12±0,07 ^a
L vodeni MAC	2,60±0,06 ^b
S etanolni UAE	0,44±0,01 ^{ij}
S etanolni MAE	0,47±0,01 ⁱ
S etanolni MAC	0,40±0,01 ^k
TS etanolni UAE	0,96±0,02 ^g
TS etanolni MAE	1,11±0,03 ^f
TS etanolni MAC	1,10±0,03 ^f
L etanolni UAE	2,05±0,05 ^d
L etanolni MAE	2,50±0,06 ^b
L etanolni MAC	2,40±0,05 ^{b,c}

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-k) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

Najveći sadržaj suve materije zabeležen je u vodenim i etanolnim ekstraktima liofilizovanih plodova zove. U L vodenom MAE ekstraktu utvrđen je statistički najveći procenat suve materije (3,12%), dok između L vodenih MAC i UAE ekstrakata nije utvrđena statistički značajna razlika u sadržaju suve materije (2,60 i 2,52%, redom). L etanolni MAE i MAC ekstrakti su imali sličan udeo suve materije, koji se statistički nije značajno razlikovao (2,50 i 2,40%, redom), za razliku od L etanolnog UAE ekstrakta koji se odlikovao statistički najnižim sadržajem suve materije u ovoj grupi ekstrakata.

Kada je reč o ekstraktima tradicionalno sušenih plodova uočava se da TS vodeni MAE ekstrakt ima statistički najveći procenat suve materije (1,26%), dok između ostalih ekstrakata tradicionalno sušenih plodova ne postoji statistički značajna razlika, izuzev TS etanolnog UAE ekstrakta koji je okarakterisan statistički najnižim sadržajem suve materije (0,96%).

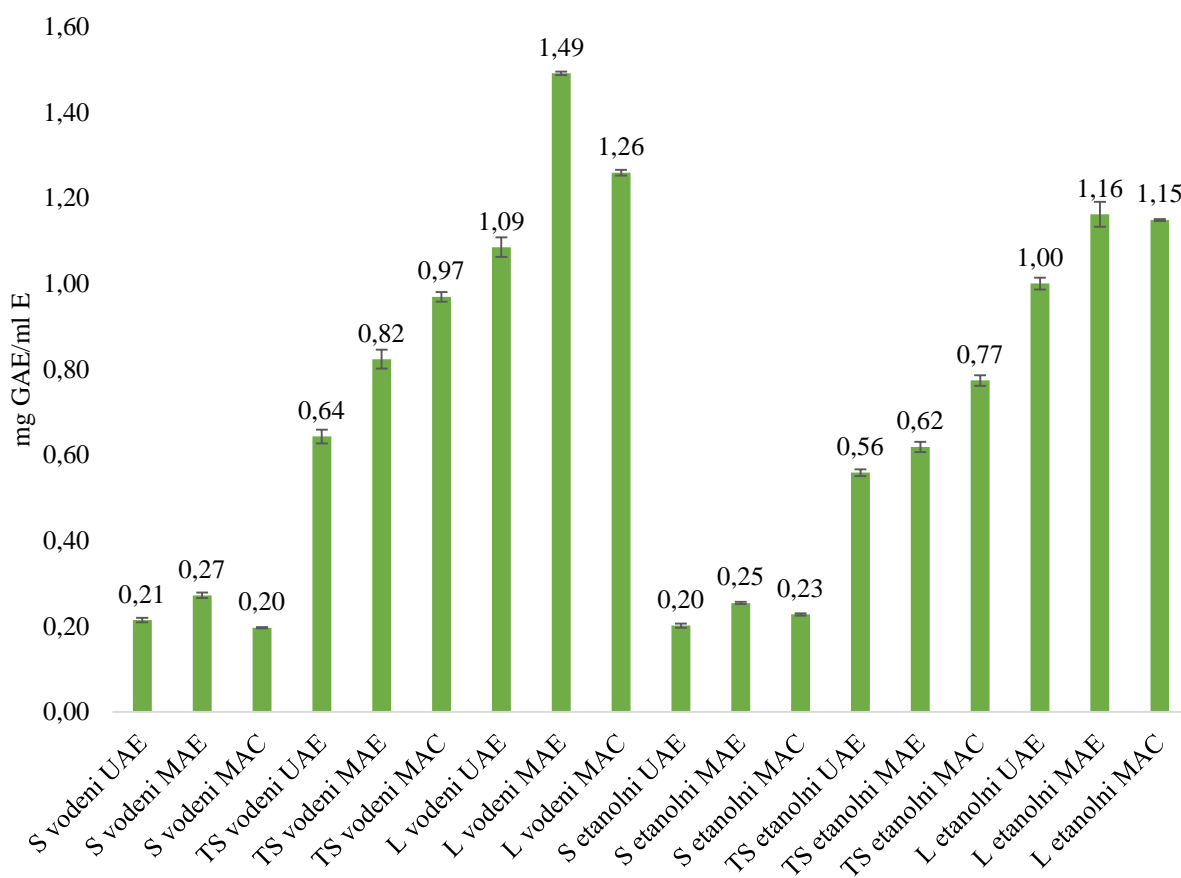
Ekstrakti svežih prate trend sušenih plodova zove, pa je statistički najveći sadržaj suve materije zabeležen kod S vodenog MAE ekstrakta (0,54%), dok se sadržaj suve materije kod ostalih ekstrakata kretao od 0,40 do 0,47%.

4.1.1 Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Biljni materijal koji se podvrgava procesu izolovanja biološki aktivnih molekula je obično prethodno osušen i usitnjen. U okviru ove doktorske disertacije, pored osušenih plodova zove, za dobijanje ekstrakata upotrebljeni su i sveži plodovi zovi, kako bi se napravilo poređenje između sadržaja bioaktivnih molekula u svežoj i sušenoj biljnoj sirovini.

Određivanje sadržaja sekundarnih metabolita u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove je od posebnog značaja za utvrđivanje biološkog i funkcionalnog potencijala zove i definisanja stepena korelacije biološke aktivnosti i ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja.

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih fenola izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline/ml ekstrakta prikazani su na Histogramu 4.1 i Prilogu 7.1, Tabela 1.



Histogram 4.1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove

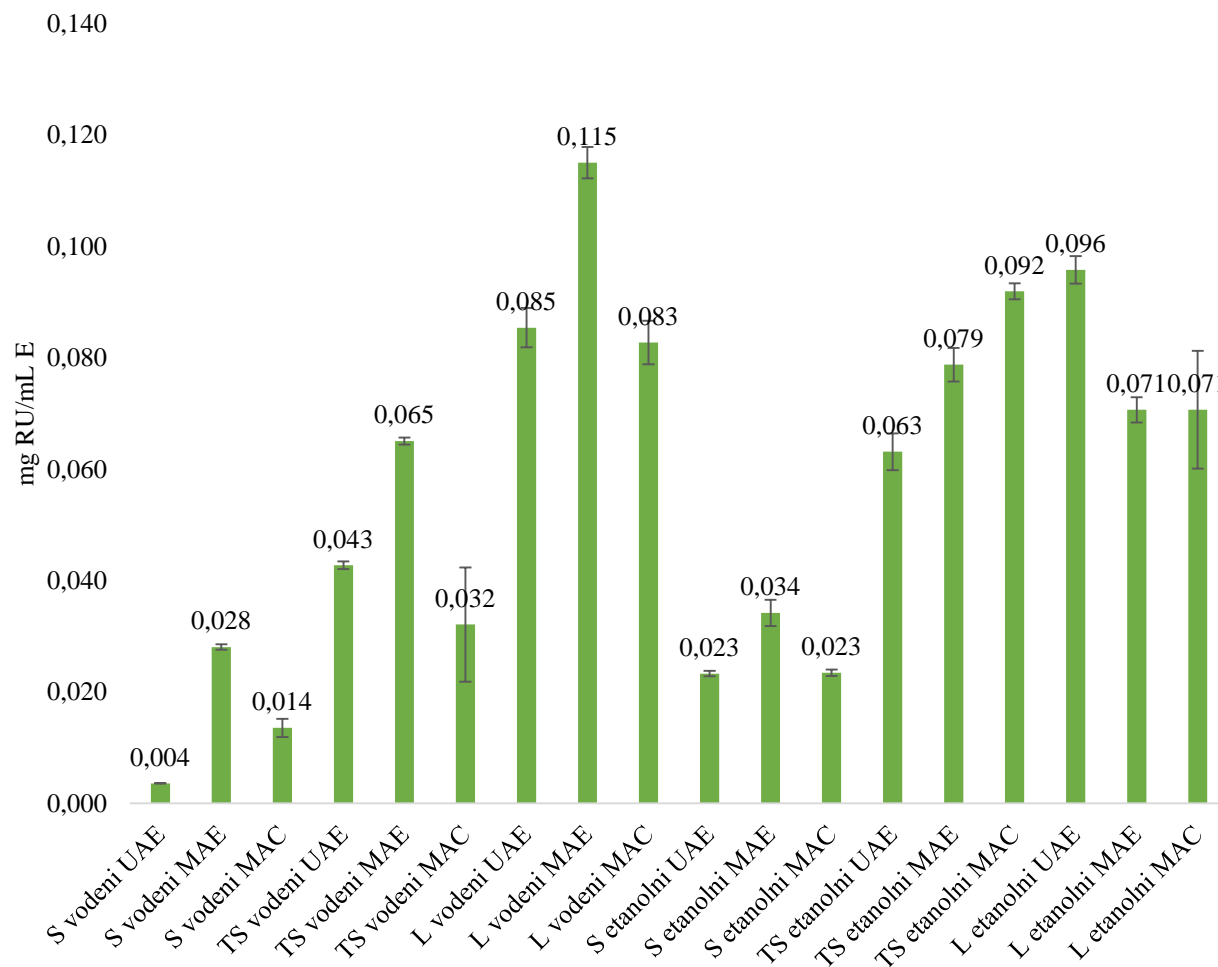
Vodeni i etanolni ekstrakti svežih plodova zove su se odlikovali najnižim sadržajem ukupnih fenola. Na osnovu dobijenih rezultata jasno se uočava da se sadržaj ukupnih fenola u vodenim i etanolnim ekstraktima svežih plodova zove koji su dobijeni tradicionalnim i savremenim ekstrakcionim tehnikama nije značajno razlikovao.

Ekstrakti tradicionalno sušenih plodova su se pokazali kao bolji izvor ukupnih fenola od ekstrakata svežih plodova zove. TS vodeni MAC i MAE ekstrakti su dominantni u sadržaju ukupnih fenola (0,97 i 0,82 mg GAE/ml E, redom), dok se kod TS etanolnih ekstrakata izdvojio MAC ekstrakt (0,77 mg GAE/ml E).

Najveći sadržaj ukupnih fenolnih molekula utvrđen je u L vodenim i L etanolnim ekstraktima liofilizovanih plodova zove koji su dobijeni MAE i MAC ekstrakcionim tehnikama (1,49 i 1,26 mg GAE/ml E, redom), s tim da je veći sadržaj fenolnih jedinjenja prisutan u vodenim ekstraktima u odnosu na etanolne.

Rezultati analize ukazuju da je proces sušenja značajno uticao na sadržaj sekundarnih metabolita u ekstraktima, pa su ekstrakti liofilizovanih plodova zove najbogatiji izvor ukupnih fenolnih jedinjenja, jer je liofilizacijom koncentrisan sadržaj plodova, uklonjena je voda i smanjena mogućnost kontaminacije biljnog materijala, čime se ističe prednost savremene u odnosu na tradicionalnu tehniku sušenja. Takođe, primenjena ekstrakciona tehnika je jedan od faktora koji doprinosi ostvarenim rezultatima, jer omogućava efikasno izdvajanje sekundarnih metabolita iz biljne sirovine, pa se u ovom slučaju MAE izdvojila kao najbolji način dobijanja ekstrakata. Naučna istraživanja sprovedena na drugim biljnim vrstama su pokazala da se sadržaj fenolnih jedinjenja u plodovima bobičastog voća smanjuje u fazi potpune zrelosti plodova (Majić i sar., 2015), što objašnjava generalno niži sadržaj ispitivanih jedinjenja u ekstraktima plodova zove.

Sadržaj ukupnih flavonoida je izražen kao mg ekvivalenata rutina/ml ekstrakta i prikazan je na Histogramu 4.2 i u Prilogu 7.1, Tabela 2.



Histogram 4.2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove

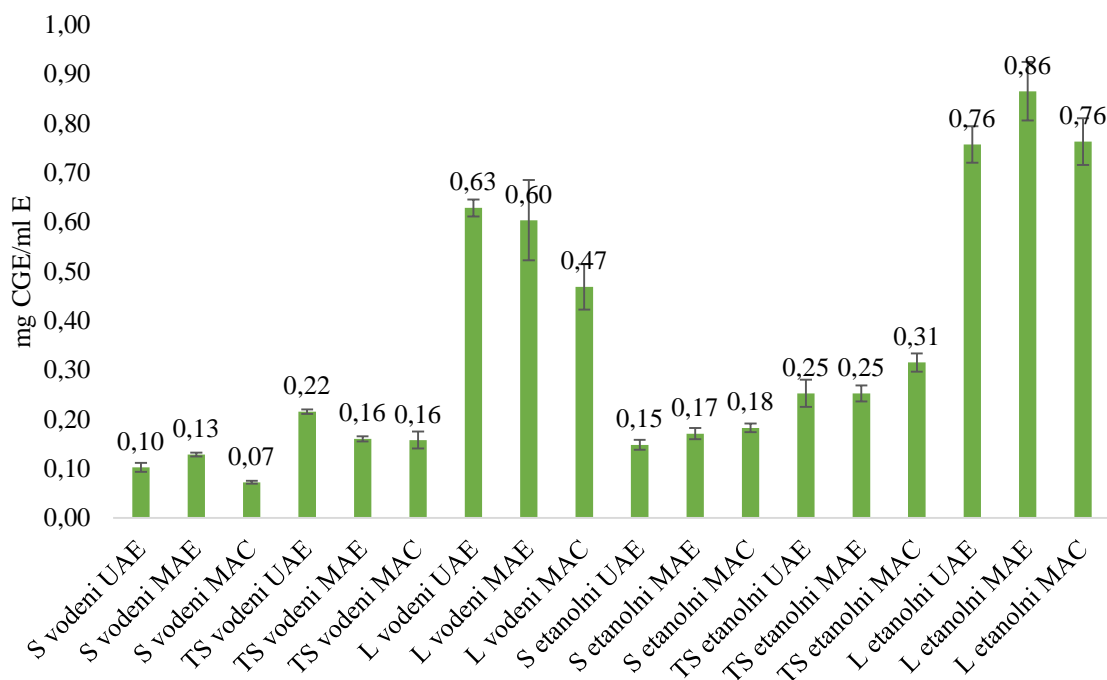
Na osnovu dobijenih rezultata analize utvrđeno je da je najveći sadržaj ukupnih flavonoida zabeležen kod vodenih i etanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova. Kao najbolji izvor ukupnih flavonoida pokazao se L vodeni MAE ekstrakt (0,115 mg RU/ml E), koji se statistički značajno razlikovao od sadržaja ukupnih flavonoida koji je zabeležen u drugim vodenim ekstraktima. Od etanolnih ekstrakata, L etanolni UAE ekstrakt se istakao kao najbolji izvor ukupnih flavonoida (0,096 mg RU/ml E). Takođe, etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova zove su se pokazali kao dobri prirodni izvori ukupnih flavonoida, posebno TS etanolni MAC ekstrakt (0,092 mg RU/ml E), čiji se sadržaj ukupnih flavonoida statistički nije značajno razlikovao od sadržaja koji je zabeležen u L etanolnom UAE ekstraktu. Vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova (TS vodeni UAE, TS vodeni MAE i TS vodeni MAC) su okarakterisani nižim koncentracijama

ukupnih flavonoida, dok su vodeni ekstrakti svežih plodova zove najsiromašniji prirodni izvor ukupnih flavonoida.

Rezultati analize ukazuju da se ispitivani ekstrakti biljne vrste *S. nigra* ne odlikuju velikim prisustvom ukupnih flavonoida, što može biti posledica uticaja procesa sušenja usled koga je došlo do smanjenja ukupnih flavonoida u zrelih plodovima. Poznato je da sušenje bobičastog voća tradicionalnom tehnikom dovodi do smanjenja sadržaja flavonoida (Asami i sar., 2003). Temperatura kojoj su plodovi izloženi u toku sušenja, kao i vreme skladištenja značajno utiču na prisustvo sekundarnih metabolita u biljnim sirovinama. Biološki procesi koji se odvijaju unutar sirovine (enzimske reakcije) predstavljaju faktore koji mogu da izazovu narušavanje strukture flavonoida i na taj način dovedu do smanjenja njihove koncentracije u analiziranim ekstraktima (Tomás-Barberán i Espín, 2001). Kroz literaturne podatke može se zapaziti da su se naučne studije koje su za istraživanje koristile zovu kao polaznu biljnu sirovinu bazirale na dobijanju ekstrakata upotrebom organskih rastvarača (najčešće n-heksana), dok je istraživanje koje su sprovedi Lee i Finn (2007) zasnovano na dobijanju ekstrakata primenom metanola kao ekstragensa. Prisustvo flavonoida u ekstraktima plodova zove u pomenutoj studiji je 364 mg GAE/100 g ploda, što jasno ukazuje da na sadržaj flavonoidnih komponenata u velikoj meri utiče izbor ekstragensa.

4.1.2. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana

Određivanje sadržaja ukupnih monomernih antocijana kao biljnih pigmentata je od posebnog značaja, jer je ova grupa fenolnih jedinjenja odgovorna za tamnoljubičastu boju plodova zove. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ispitivanim ekstraktima plodova zove izražen je kao mg ekvivalenata cijanidin-3-*O*-glukozida/ml ekstrakta i prikazan je na Histogramu 4.3 i u Prilogu 7.1, Tabela 3.



Histogram 4.3. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove

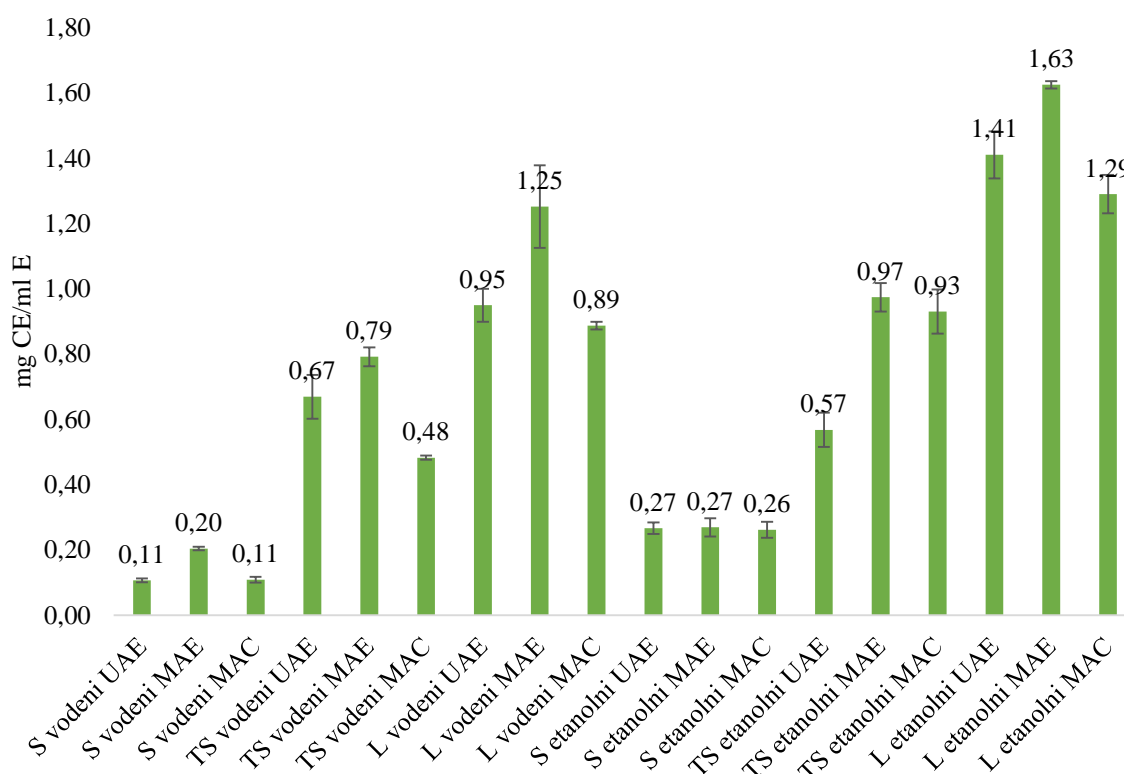
Rezultati analize su pokazali dominantnost savremenih tehnologija i tehnika koje su primenjene za dobijanje ekstrakata, stoga su etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove najbogatiji izvor monomernih antocijana, a najveća koncentracija je utvrđena kod L etanolnog MAE ekstrakta (0,86 mg CGE/ml E). UAE ekstrakciona tehnika se pokazala kao najbolji način izolovanja ukupnih monomernih antocijana kod vodenih ekstrakata liofilizovanih plodova zove, jer je u njima zapažen najveći sadržaj (0,63 mg CGE/ml E) ove grupe fenolnih jedinjenja. Niže vrednosti ukupnih monomernih antocijana zabeležene su kod ekstrakata tradicionalno sušenih plodova, čija se koncentracija kretala između 0,16 i 0,31 mg CGE/ml E. Ekstrakti svežih plodova su se pokazali kao najsiromašniji izvor ukupnih antocijana, što može da bude posledica mehaničkog narušavanja strukture plodova u toku sakupljanja, a samim tim i gubljenje biljnih pigmentata.

Studije koje su se zasnivale na analizi sadržaja monomernih antocijana u drugim prirodnim proizvodima ustanovile su da je ekstrakcija antocijana etanolom efikasnija od ekstrakcije vodom,

pa su rezultati ovog istraživanja u skladu sa dosadašnjim istraživanjima, čime se i objašnjava veće prisustvo ovih jedinjenja u etanolnim ekstraktima. Osim polarnosti i odabira rastvarača na izolovanje antocijana utiču i kiseonik, temperatura i odvijanje hemijskih i biohemijskih procesa unutar ploda. Pretpostavlja se da su neki od navedenih parametara, kao i prisustvo veće količine vode uticali na snižen sadržaj ove grupe fenolnih komponenata u ekstraktima svežih plodova zove (Castañeda-Ovando i sar., 2009). Prisustvo antocijana u svežim plodovima zove je u saglasnosti sa podacima publikovanim od strane Anton i sar. (2013), čije vrednosti se kreću 242-283 mg CGE/100 g svežeg ploda, dok je sadržaj antocijana u ekstraktima osušenih plodova zove veći.

4.1.3. Sadržaj ukupnih tanina

Tanini su grupa fenolnih jedinjenja koja je rasprostranjena u biljnom svetu i pored bioloških funkcija, imaju sposobnost zaštite od herbivora i patogenih infekcija. Često se koriste u industriji vina i piva, kao agensi za taloženje proteina koji izazivaju zamućenje proizvoda (Vermerris i Nicholson, 2006). Sadržaj ukupnih tanina je određen u proizvodima dobijenim na bazi zove, a izražen je kao mg katehina/ml ekstrakta. Rezultati analize su prikazani je na Histogramu 4.4 i u Prilogu 7.1, Tabela 4.



Histogram 4.4. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove

Vodeni ekstrakti svežih plodova zove se odlikuju najnižom koncentracijom tanina, što je i očekivano, zbog prisustva vode u plodovima, što je posebno izraženo dodatkom vode kao ekstragensa. Zbog preovladavanja vode u ekstraktima, koncentracija bioaktivnih molekula se smanjuje. Zamenom vode, 50% etanolom kao ekstragensom koncentracija tanina se povećava, pa su etanolni ekstrakti svežih plodova bolji izvor ove grupe fenolnih jedinjenja od vodenih ekstrakata.

Sušenjem svežih plodova uklonjena je voda, sadržaj u plodu je koncentrovaniji, zbog čega se prisustvo tanina povećava u ekstraktima tradicionalno sušenih plodova. Takođe, primećuje se da je i u ovom slučaju 50% etanol bio efikasniji ekstragens od vode i najveća koncentracija tanina utvrđena je u TS etanolnom MAE ekstraktu (0,97 mg CE/ml E) i TS etanolnom MAC ekstraktu (0,93 mg CE/ml E), u kojima se zabeleženi sadržaj tanina statistički nije značajno razlikovao.

Primenom savremenih tehnika sušenja i ekstrakcije plodova zove umesto tradicionalnih tehnika, ostvareni rezultati ističu njihovu prednost, pa su L etanolni MAE i L etanolni UAE ekstrakti najbogatiji izvor tanina (1,63 i 1,41 mg CE/ml E, redom).

Vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su se pokazali kao dobar prirodni resurs ukupnih tanina, gde se posebno izdvojio L vodeni MAE ekstrakt (1,25 mg CE/ml E), dok je sadržaj ukupnih tanina u L vodenom UAE i L vodenom MAC ekstraktu bio sličan (0,95 i 0,89 mg CE/ml E, redom) sadržaju koji je određen u TS etanolnom MAE i TS etanolnom MAC ekstraktu. Ovakav rezultat ukazuje na prednosti savremene tehnike sušenja u odnosu na tradicionalnu tehniku sušenja plodova zove, gde je bez obzira na upotrebljeni ekstragens koncentracija ispitivanih biomolekula između L vodenih i TS etanolnih ekstrakata uglavnom nije statistički značajno razlikovala.

Dosadašnji rezultati istraživanja biljne vrste *S. nigra* nisu obuhvatali ispitivanje prisustva ukupnih tanina u plodovima zove, pa su ovi rezultati prvi put publikovani u okviru ove teze.

U cilju karakterizacije ekstrakata plodova zove i njihovog fitohemijskog sastava dalji tok analize usmeren je na ispitivanje fitohemijske kompozicije ekstrakata plodova zove primenom visokoselektivne LC-MS/MS metode.

4.1.4. Polifenolni profil ekstrakata plodova zove

Ispitivanje fitohemijskog sastava ekstrakata plodova biljne vrste *S. nigra* obuhvatalo je analizu 47 jedinjenja. Sadržaj identifikovanih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova zove prikazan je u Tabeli 4.2 i Tabeli 4.3.

Tabela 4.2. Fitohemijski skrining vodenih ekstrakata plodova biljne vrste *S. nigra*

Fenolna jedinjenja	Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja ($\mu\text{g/ml E}$)								
	EKSTRAKTI			EKSTRAKTI			EKSTRAKTI		
	S UAE	S MAE	S MAC	TS UAE	TS MAE	TS MAC	L UAE	L MAE	L MAC
<i>p</i> -OH benzoeva kis.	0,44±0,03 ^{g,h,i}	0,60±0,01 ^{e,f}	0,51±0,03 ^{f,g,h}	0,39±0,05 ^{h,i}	0,86±0,03 ^{b,c,d}	1,19±0,19 ^a	0,36±0,02 ⁱ	0,94±0,13 ^b	0,77±0,05 ^{c,d}
Protokatehinska kis.	1,48±0,12 ^j	6,43±0,38 ⁱ	1,14±0,08 ^j	9,44±1,59 ^h	20,93±0,99 ^b	13,08±0,48 ^{d,f,g}	14,60±1,17 ^d	36,31±0,13 ^a	12,27±0,98 ^{f,g}
<i>p</i> -Kumarinska kis.	0,19±0,02 ^{g,h,i}	0,30±0,03 ^{e,f}	0,20±0,02 ^{g,h,i}	0,11±0,01 ^j	0,34±0,03 ^e	0,34±0,03 ^e	0,46±0,04 ^d	0,87±0,08 ^a	0,74±0,07 ^b
Galna kis.	1,38±0,12 ^a	1,04±0,09 ^a	0,92±0,08 ^a	0,16±0,01 ^b	0,07±0,01 ^b	0,04±0,00 ^b	<LoD	<LoD	<LoD
Kafena kis.	0,10±0,01 ⁱ	0,14±0,01 ^{g,h,i}	0,32±0,02 ^d	0,16±0,01 ^{g,h,i}	0,18±0,01 ^{f,g}	0,50±0,04 ^b	0,31±0,02 ^d	0,30±0,02 ^{d,e}	1,41±0,10 ^a
Hinska kis.	100,76±10,08 ^f	114,41±11,44 ^f	82,66±8,27 ^f	225,01±22,50 ^e	272,74±27,27 ^e	226,74±22,67 ^e	687,26±68,73 ^{c,d}	872,48±87,25 ^a	784,57±78,46 ^b
Hlorogenska kis.	4,11±0,43 ^{h,i}	5,06±1,51 ^h	2,58±0,01 ^j	6,70±0,42 ^g	9,10±0,61 ^f	6,95±0,24 ^g	32,32±0,02 ^e	42,68±0,20 ^a	36,12±0,66 ^d
Ursolna kis.	0,01±0,00 ^k	<LoD	<LoD	0,03±0,00 ^k	1,81±0,05 ^k	<LoD	0,04±0,00 ^k	5,32±0,16 ^j	0,04±0,00 ^k
Naringenin	0,02±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
Epikatehin	0,06±0,01	0,05±0,01	0,04±0,00	<LoD	<LoD	<LoD	1,24±0,12	1,80±0,18	1,26±0,13
Kvercetin	0,68±0,05 ^f	1,02±0,08 ^f	0,67±0,05 ^f	6,88±1,02 ^c	3,76±0,11 ^e	0,75±0,22 ^f	3,95±0,32 ^{d,e}	1,95±0,59 ^f	7,76±0,33 ^{b,c}
Izoramnatin	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD
Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,11±0,00 ^{i,j}	0,09±0,00 ^j	0,10±0,00 ^j	0,25±0,01 ^h	0,39±0,02 ^f	0,21±0,01 ^h	0,70±0,03 ^c	0,63±0,03 ^d	0,72±0,03 ^c
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	1,28±0,01 ^h	1,57±0,04 ^h	1,10±0,10 ^h	5,45±0,33 ^{f,g}	8,04±0,45 ^{d,e}	4,47±0,63 ^g	9,06±1,13 ^d	11,51±1,41 ^c	13,31±0,53 ^{a,b}
Rutin	33,90±0,46 ^{g,h}	34,09±1,91 ^{g,h}	20,47±0,58 ^{g,h}	23,11±4,02 ^{g,h}	86,37±1,06 ^e	0,37±0,23 ^h	191,42±6,16 ^c	228,56±7,90 ^{a,b}	141,88±4,33 ^d
Bajkalein	0,13±0,01 ^d	0,23±0,02 ^d	0,16±0,02 ^d	0,94±0,28 ^{a,b}	0,46±0,46 ^c	<LoD	0,75±0,23 ^{b,c}	<LoD	<LoD
Kempferol	0,02±0,00 ^f	0,02±0,00 ^f	0,01±0,00 ^f	0,12±0,01 ^c	0,08±0,01 ^d	<LoD	<LoD	<LoD	0,17±0,01 ^b

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-e) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

<LoD (limit detekcije).

Tabela 4.3. Fitohemijski skrining etanolnih ekstrakata plodova biljne vrste *S. nigra*

Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja ($\mu\text{g/ml E}$)									
EKSTRAKTI									
Fenolna jedinjenja	S UAE	S MAE	S MAC	TS UAE	TS MAE	TS MAC	L UAE	L MAE	L MAC
<i>p</i> -OH benzoeva kis.	0,50±0,03 ^{f,g,h}	0,53±0,03 ^{f,g}	0,48±0,03 ^{f,g,h,i}	0,52±0,03 ^{f,g,h}	0,72±0,04 ^{d,e}	0,79±0,10 ^{c,d}	0,47±0,03 ^{f,g,h,i}	0,86±0,05 ^{b,c}	0,19±0,01 ^j
Protokatehinska kis.	1,08±0,09 ^j	2,46±0,12 ^j	1,64±0,13 ^j	14,17±0,24 ^{d,f}	16,77±2,84 ^c	12,96±0,63 ^{d,f,g}	5,11±0,41 ⁱ	11,56±0,93 ^{g,h}	6,66±0,53 ⁱ
<i>p</i> -Kumarinska kis.	0,15±0,01 ^{ij}	0,29±0,03 ^{e,f}	0,17±0,02 ^{h,ij}	0,12±0,01 ^j	0,23±0,02 ^{f,g,h}	0,21±0,02 ^{g,h,i}	0,24±0,02 ^{f,g}	0,82±0,07 ^a	0,61±0,06 ^c
Galna kis.	1,14±0,10 ^a	0,95±0,09 ^a	0,90±0,08 ^a	0,11±0,01 ^b	0,05±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	<LoD	<LoD	<LoD
Kafena kis.	0,12±0,01 ^{g,h,i}	0,12±0,01 ^{h,i}	0,10±0,01 ⁱ	0,13±0,01 ^{g,h,i}	0,13±0,01 ^{g,h,i}	0,18±0,01 ^{f,g,h}	0,30±0,02 ^{d,e}	0,39±0,03 ^c	0,24±0,02 ^{e,f}
Hinska kis.	76,19±7,62 ^f	107,14±10,71 ^f	87,51±8,75 ^f	202,67±20,27 ^e	242,22±24,22 ^e	251,94±25,19 ^e	626,19±62,62 ^d	740,55±74,06 ^{b,c}	679,71±67,97 ^d
Hlorogenska kis.	3,17±0,58 ^{ij}	3,52±0,07 ^{i,j}	3,32±0,06 ^{ij}	6,86±0,14 ^g	7,42±0,29 ^g	9,54±0,01 ^f	38,43±0,92 ^c	40,80±1,93 ^b	37,09±0,23 ^{c,d}
Ursolna kis.	11,04±0,33 ⁱ	31,72±1,22 ^f	20,06±0,60 ^h	35,04±1,05 ^e	51,76±1,55 ^b	41,62±1,25 ^c	37,87±1,14 ^d	77,64±2,33 ^a	26,22±0,79 ^g
Naringenin	0,03±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00	0,02±0,00	0,03±0,00	0,14±0,01	0,19±0,01	
Epikatehin	0,39±0,04	0,33±0,03	0,32±0,03	<LoD	0,12±0,01	0,13±0,01	2,83±0,28	3,30±0,33	3,31±0,33
Kvercetin	1,48±0,12 ^f	1,89±0,09 ^f	1,88±0,15 ^f	7,20±0,24 ^c	8,75±1,11 ^b	10,84±0,42 ^a	5,22±0,42 ^d	7,08±1,82 ^c	4,98±0,40 ^{d,e}
Izoramnetin	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	0,19±0,01	<LoD	<LoD
Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,11±0,00 ^{ij}	0,14±0,01 ⁱ	0,10±0,00 ^j	0,30±0,01 ^g	0,37±0,01 ^f	0,56±0,02 ^e	0,81±0,03 ^b	0,93±0,04 ^a	0,65±0,03 ^d
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	1,30±0,13 ^h	1,63±0,08 ^h	1,50±0,16 ^h	6,83±0,02 ^{e,f}	7,36±0,14 ^e	7,80±0,72 ^{d,e}	11,89±0,83 ^{b,c}	14,11±1,37 ^a	13,63±1,75 ^a
Rutin	32,80±4,24 ^{g,h}	38,73±4,12 ^{f,g}	35,49±4,32 ^{g,h}	73,89±0,08 ^{e,f}	78,62±6,73 ^e	90,71±11,74 ^e	225,56±25,89 ^{a,b,c}	220,95±29,40 ^{b,c}	260,32±41,30 ^a
Bajkalein	0,16±0,02 ^d	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	<LoD	1,36±0,41 ^a	1,01±0,30 ^{a,b}	<LoD
Kempferol	0,05±0,00 ^e	0,06±0,00 ^e	0,09±0,01 ^d	0,14±0,01 ^c	0,17±0,01 ^b	0,26±0,02 ^a	<LoD	<LoD	<LoD

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-e) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

<LoD (limit detekcije).

Rezultati fitohemijske analize su pokazali da su ekstrakti koji su dobijeni modernim tehnologijama ostvarili izuzetan rezultat u pogledu sadržaja biološki aktivnih jedinjenja. U vodenim i etanolnim ekstraktima plodova biljne vrste *S. nigra* utvrđeno je prisustvo 17 fenolnih jedinjenja od kojih su: hlorogenska kiselina, protokatehinska kiselina, rutin, kvercetin, kvercetin-3-*O*-heksozid, kao i ursolna kiselina identifikovani u najvećoj koncentraciji.

Ekstrakti liofilizovanih plodova zove su veoma bogati sadržajem hlorogenske kiseline. Najveća koncentracija ove kiseline zabeležana je u L vodenom MAE ekstraktu (42,68 µg/ml E), koje je dobijen MAE ekstrakcijom. Hlorogenska kiselina je i do deset puta u većoj koncentraciji prisutna u ekstraktima liofilizovanih plodova u odnosu na ekstrakte svežih plodova i osam puta većoj koncentraciji kada se upoređi sa vodenim ekstraktima tradicionalno sušenih plodova. Hlorogenska kiselina je karakteristična za biljnu vrstu *S. nigra* i u istraživanjima koja su izveli Kaack i sar. (2008), Ochmian, Oszmiański i Skupień (2009) i Wibisono i sar. (2009) uočeno je njeno prisustvo, ali je sadržaj hlorogenske kiseline bio niži u odnosu na biljnu vrstu *S. nigra* na kojoj je urađeno ovo istraživanje.

Nakon hlorogenske kiseline, protokatehinska kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u ekstraktima ispitivane biljne vrste. Protokatehinska kiselina prati isti trend kao i sadržaj hlorogenske kiseline, pa je u najvećoj koncentraciji detektovana u L vodenom MAE ekstraktu (36,31 µg/ml E). U klasi benzoevih kiselina, u nižoj koncentraciji od protokatehinske kiseline prisutne su galna i *p*-hidroksibenzoeva kiselina. Galna kiselina je dominantna u ekstraktima svežih plodova zove (0,92-1,38 µg/ml E), koncentracija ove kiseline se smanjuje u ekstraktima tradicionalno sušenih plodova zove (0,04-0,16 µg/ml E), dok u ekstraktima liofilizovanih plodova zove nije detektovano prisustvo ove fenolne kiseline. Za razliku od galne kiseline, prisustvo *p*-hidroksibenzoeve kiseline je veće u ekstraktima tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova, nego u ekstraktima svežih plodova zove.

Od cimetnih kiselina u vodenim ekstraktima plodova zove identifikovane su *p*-kumarinska kiselina i kafena kiselina. Vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su se odlikovali najvećim sadržajem *p*-kumarinske kiseline (0,46-0,87 µg/ml E), niži sadržaj je zapažen u ekstraktima svežih plodova zove (0,19-0,30 µg/ml E), dok je kafena kiselina najviše prisutna u ekstraktima tradicionalno sušenih plodova zove (0,16-0,50 µg/ml E). Nizak sadržaj fenolnih kiselina u ekstraktima svežih plodova se može objasniti prisustvom veće količine vode u plodovima, kao i uticajem spoljašnjih faktora sredine (temperatura, UV zračenje, način sakupljanja biljne sirovine) usled čijeg dejstva može doći do narušavanja strukture ploda i hemijske strukture aktivnih principa u plodovima. Analizom sadržaja fenolnih kiselina u vodenim ekstraktima, ekstrakti liofilizovanih, tradicionalno sušenih i svežih plodova zove koji su dobijeni MAE ekstrakcionom tehnikom su se pokazali kao najbolji izvor fenolnih kiselina.

Fenolne kiseline su prisutne i u etanolnim ekstraktima plodova zove, ali u nižim koncentracijama, što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima

Etanolni ekstrakti plodova zove predstavljaju bogatiji izvor flavonoida, gde je sadržaj rutina zabeležen u najvećim koncentracijama, zatim kvercetin i kvercetin-3-*O*-heksozida.

Rutin kao glavni flavonoid je najviše zastupljen u L etanolnom ekstraktu plodova zove, koji je dobijen MAC ekstrakcionom tehnikom (260,32 µg/ml E), dok je sadržaj rutina u ekstraktima dobijenim savremenim ekstrakcionim tehnikama nešto niži i ostvarene vrednosti su 225,56 µg/ml E za L etanolni UAE ekstrakt i 220,95 µg/ml E za L etanolni MAE ekstrakt, koji se statistički značajno razlikuju. Važno je istaći da se i vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova odlikuju izuzetnim sadržajem rutina, a najveće prisustvo je zapaženo u L vodenom MAE ekstraktu (228,56 µg/ml E), što ne predstavlja značajnu razliku kada se uporedi sa količinom rutina koja je identifikovana u L etanolnom MAE ekstraktu. Niže vrednosti rutina u L vodenim ekstraktima su ostvarene primenom UAE i MAC ekstrakcionih tehnika (191,42 i 141,88 µg/ml E, redom).

Prisustvo rutina u ekstraktima svežih i tradicionalno sušenih plodova zove je niže, u odnosu na ekstrakte liofilizovanih plodova. Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova pokazali su se kao dobar izvor rutina, posebno TS etanolni MAC ekstrakt (90,71 µg/ml E). Slična vrednost je zabeležena u TS vodenom MAE ekstraktu (86,37 µg/ml E), što pokazuje da su i voda i 50% etanol veoma dobri ekstragensi koji su u velikoj meri doprineli ostvarenom rezultatu. U ovom slučaju se može istaći prednost MAE kao savremene ekstrakcione tehnike, iako je MAC ekstrakt ostvario bolji rezultat, jer je vreme izolovanja znatno kraće, a sadržaj rutina približno isti. Voda je bila efikasniji ekstragens, a na njenu ekstrakcionu moć uticala je MAE ekstrakcija, kao savremena tehnika izolovanja sekundarnih metabolita. U toku MAC etanol nije u potpunosti ispoljio svoje solvatacione sposobnosti, jer proces ekstrahovanja nije potpomognut dejstvom temperature, što je uticalo na krajnji rezultat. Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova (TS etanolni UAE i TS etanolni MAE) koji su dobijeni primenom UAE i MAE ekstrakcionih tehnika imali su približno sličan sadržaj rutina (73,89 i 78,62 µg/ml E, redom), koji se na osnovu statističke obrade rezultata nisu značajno razlikovali.

Kada je reč o ekstraktima svežih plodova biljne vrste *S. nigra* u sadržaju rutina, nije utvrđena velika razlika između S vodenih i S etanolnih ekstrakata, a dobijene vrednosti su se kretale između 20,47 i 38,73 µg/ml E. MAE ekstrakciona tehnika je predstavljala najbolji način izolovanja rutina, što su pokazali i ostvareni rezultati. Suprotno tome, MAC je ostvarila najniže vrednosti, što je i očekivano.

Pored rutina, prisustvo kvercetina u ispitivanim ekstraktima je od izuzetnog značaja zbog njegovog biološkog potencijala. Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova se odlikuju najvećom koncentracijom ovog flavonoida, gde se njegovo prisustvo posebno ističe u TS etanolnom MAC ekstraktu (10,84 µg/ml E). TS etanolni MAE ekstrakt je bolji izvor kvercetina od TS etanolnog UAE ekstrakta, a sadržaj kvercetina u vodenim ekstraktima se takođe posebno izdvojio u L vodenom MAC ekstraktu (7,76 µg/ml E), dok su niže vrednosti zabeležene u L vodenim MAE i UAE ekstraktima (1,95 i 3,95 µg/ml E, redom).

Etanolni i vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova biljne vrste *S. nigra* su ostvarili veoma dobre rezultate kada je reč o prisustvu heksozida kvercetina. U sadržaju kvercetin-3-*O*-heksozida posebno se ističe L etanolni MAE ekstrakt (14,11 µg/ml E), prate ga L etanolni MAC i L etanolni UAE ekstrakti (13,63 i 11,89 µg/ml E, redom), između kojih je utvrđena statistički značajna razlika. Vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova su ostvarili sličan rezultat, sa dominantnim sadržajem kvercetin-3-*O*-heksozida u L vodenom MAC ekstraktu (13,31 µg/ml E). L vodeni MAE i L vodeni UAE ekstrakti su se takođe istakli u sadržaju heksozida kvercetina, a detektovane koncentracije su 11,51 i 9,06 µg/ml E, redom.

Kada se pogleda prisustvo kvercetin-3-*O*-heksozida u ekstraktima tradicionalno sušenih plodova uočava se niža koncentracija, dok se ekstrakti svežih plodova odlikuju najnižim sadržajem kvercetin-3-*O*-heksozida.

Posebna razlika između etanolnih i vodenih ekstrakata je naglašena prisustvom ursolne kiseline. Kao triterpensko jedinjenje, ursolna kiselina nije rastvorna u polarnim rastvaračima, stoga je njeno prisustvo očekivano u etanolnim ekstraktima. Ursolna kiselina je veoma potentan fitohemijski agens i u najvećoj koncentraciji je prisutna u etanolnim ekstraktima liofilizovanih plodova zove. Ursolna kiselina je dominantna u L etanolnom MAE ekstraktu u kome je zabeležena vrednost 77,64 µg/ml E, dok je znatno niža u L etanolnom UAE ekstraktu (37,87 µg/ml E). U pogledu prisustva ursolne kiseline u MAC ekstraktima, TS etanolni MAC ekstrakt se pokazao kao veoma dobar izvor ursolne kiseline, čija je vrednost iznosila 41,62 µg/ml E, što je jedan i po put više od koncentracije koja je detektovana kod L etanolnog MAC ekstrakta (26,22 µg/ml E).

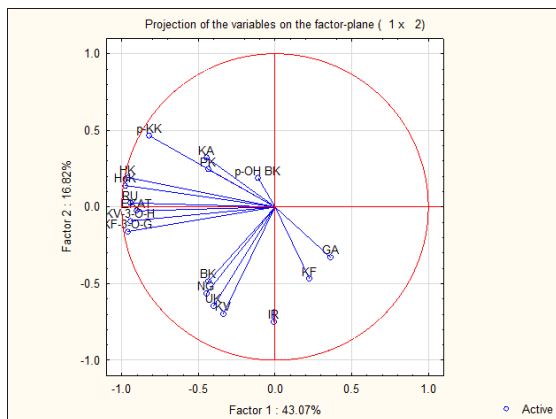
Kod ekstrakata svežih plodova sadržaj ursolne kiseline se posebno ističe u ekstraktima dobijenim MAE i MAC ekstrakcionim tehnikama, dok je u UAE ekstraktu zapažen dva puta niži sadržaj ursolne kiseline.

U vodenim i etanolnim ekstraktima plodova zove u velikoj koncentraciji je prisutna i hinska kiselina. Hinska kiselina je organska kiselina koja je prekursor u sintezi fenolnih jedinjenja. Visok sadržaj hinske kiseline ukazuje da su pored ispitanih i detektovanih fenolnih jedinjenja prisutni i drugi molekuli fenolne prirode koji nisu obuhvaćeni u okviru ovog istraživanja. Ispitivanjem fenolnog profila roda *Sambucus* autora Młynarczy, Walkowiak-Tomczak i Łysiak (2018) iz Poljske nađeno je prisustvo hlorogenske kiseline, rutina i kvercetina, ali u nižim koncentracijama u odnosu na njihovo prisustvo u ekstraktima zove koji su analizirani u okviru ove teze, dok sadržaj drugih fenolnih kiselina nije rađen.

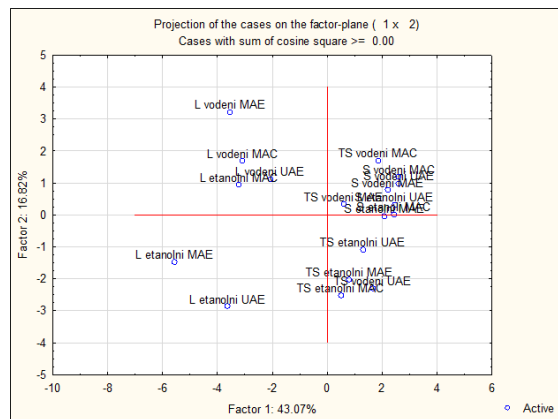
4.1.4.1. PCA analiza polifenolnog profila vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove

Primenom Analize glavnih komponenta (PCA analiza) na rezultate polifenolnog profila ekstrakata plodova zove, može se uočiti prisustvo određenih fenolnih komponenta u ispitivanim ekstraktima (Slika 4.1). Prva i druga glavna komponenta (Faktor 1 i 2) objašnjavaju 43,07 i 16,82% ukupne varijanse, redom.

a)



b)



Slika 4.1. PCA analiza polifenolnog profila vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove

- grafički prikaz raspodele fenolnih jedinjenja;
- grafički prikaz raspodele ispitivanih ekstrakata.

Na prikazanom biplotu može se uočiti posebno izdvajanje etanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova zove, dobijeni savremenim ekstrakcionim tehnikama i oni su lokalizovani u donjem levom delu dijagrama. Na osnovu njihovog položaja na dijagramu može se zaključiti da se u njihovom hemijskom sastavu nalaze kvercetin, naringenin, kempferol-3-*O*-glukozid, kvercetin-3-*O*-heksozid, ursolna kiselina i bajkalein.

Za razliku od etanolnih ekstrakata, vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova se nalaze u gornjem levom delu dijagrama, a za njihovo dobijanje su primenjene savremene i tradicionalne tehnike ekstrakcije. Takođe, u istom delu dijagrama se nalazi i etanolni ekstrakt liofilizovanih plodova dobijen maceracijom. Položaj ovih ekstrakata na dijagramu odgovara sadržaju fenolnih kiselina koje su u najvećoj koncentraciji detektovane u ovim ekstraktima, a to su hinska kiselina, protokatehinska kiselina, *p*-kumarinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina. Ono što se može zapaziti na dijagramu je prisustvo rutina. Ovaj flavonoid je u najvećoj koncentraciji detektovan u L etanolnom MAC ekstraktu, koji se nalazi u istom delu dijagrama što opravdava njegovo prisustvo u delu dijagrama na kome su prisutni vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova (L vodeni UAE, L vodeni MAE i L vodeni MAC).

Pored etanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova, izdvojili su se i etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova zove, koji su lokalizovani u donjem desnom delu dijagrama, što u najvećoj meri odgovara sadržaju kempferola i galne kiseline.

Vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova, kao i vodeni i etanolni ekstrakti svežih plodova zove grupisani su u gornjem desnom delu dijagrama, pa se može zapaziti da se odlikuju niskim sadržajem bioaktivnih molekula prisutnih u plodovima biljne vrste *Sambucus*.

Rezultati LC/MS analize ukazuju da na sadržaj fenolnih komponenata u ekstraktima plodova zove utiču odabrana tehnika sušenja biljne sirovine, izbor pogodnog ekstragensa i proces ekstrakcije. Odabir tehnološke operacije za preradu biljnog materijala utiče na fitohemijsku kompoziciju ekstrakata plodova zove. Ekstrakti liofilizovanih plodova pokazuju veći sadržaj biološki aktivnih molekula od ekstrakata tradicionalno sušenih plodova, što se ogleda u prednosti liofilizacije kao savremene tehnike sušenja. Na osnovu sprovedene analize ekstrakata plodova zove dobijeni rezultati se mogu obrazložiti da je primena inovativne tehnologije sušenja liofilizacijom pozitivno uticala na sadržaj biološki vrednih molekula koji su detektovani u ispitivanim ekstraktima. Faza zamrzavanja u procesu liofilizacije, obezbeđuje čuvanje komponenata i sprečava mikrobiološku kontaminaciju, modifikaciju njihove hemijske strukture, ali i praćenje kinetike procesa sušenja što je posebna prednost u odnosu na tradicionalno sušenje sirovine. Sušenje liofilizacijom je primenjeno sa idejom ispitivanja i utvrđivanja opravdanosti i potencijalne primene savremene tehnike sušenja biljnog materijala i na industrijskom nivou.

Izbor odgovarajućih rastvarača je od izuzetnog značaja za fitohemijski sastav ispitivanih ekstrakata. Polarni rastvarači imaju visoku dielektričnu konstantu, pa omogućavaju efikasno izolovanje polarnih komponenata iz biljnog matriksa. Međutim, kroz brojna naučna istraživanja je potvrđeno da se za izdvajanje biološki vrednih jedinjenja najčešće koristi smeša etanol-voda. U ovom slučaju vrednosti dielektrične konstante se menjaju u različitom opsegu, pa je oslobađanje biološki potentnih molekula iz biljnog tkiva olakšano, čime se objašnjava veći sadržaj fenolnih komponenata u pojedinim etanolnim ekstraktima plodova zove (Cvetanović i sar., 2018).

U procesu prerade biljnog materijala odabir ekstrakcione tehnike je veoma važan, što se pokazalo i u ovoj studiji. Fenolne kiseline su u nižim koncentracijama zastupljene u ekstraktima koji su dobijeni UAE ekstrakcijom, što ukazuje da sam proces izolovanja, kao i procesni parametri utiču na rezultate analize. Usled odvijanja UAE moguće je obrazovanje slobodnih radikala koji imaju sposobnost da narušavaju strukturu ispitivanih jedinjenja i na taj način smanjuju i sam prinos ekstrakcije. Ekstrakti dobijeni MAC kao tradicionalnom tehnikom izolovanja, odlikovali su se najnižim sadržajem fenolnih kiselina, što je i očekivano, zbog dužine trajanja procesa, manje intenzivnog „intimnog” kontakta rastvarača i biljnog matriksa.

Biodostupnost rutina u analiziranim ekstraktima se menja primenom različite ekstrakcione tehnike, jer se kontrolom procesnih parametara u velikoj meri utiče na sadržaj bioaktivnih komponenata u ispitivanim uzorcima (Sharma i sar., 2015). Rutin pokazuje dobru toplotnu

stabilnost prilikom prerade biljnog materijala iz kojeg je izolovan, jer se smatra da je otporan i na temperaturu od 100 °C, što opravdava dobijene rezultate (Chua, 2013).

Veće prisustvo pojedinih komponenata u MAC ekstraktima, u odnosu na MAE u UAE ekstrakte može se objasniti uticajem temperature i ultrazvuka koji mogu dovesti do degradacije ili narušavanja strukture biološki aktivnih principa, zbog čega je u MAC ekstraktima registrovana veća koncentracija pojedinih fenolnih komponenata.

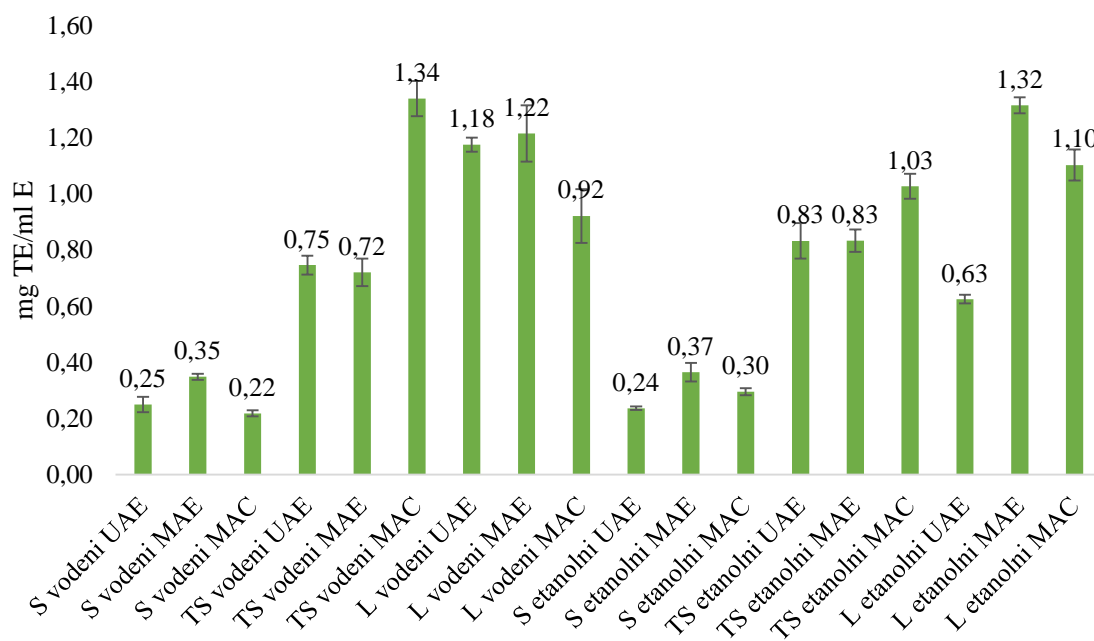
4.1.2. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove

4.1.2.1. Antioksidativna aktivnost

Za prehrambenu tehnologiju je od izuzetnog značaja razumevanje hemije antioksidanata i analitičkih metoda koje se koriste u njihovom određivanju. Istraživanja o uticaju prerade i skladištenja proizvoda na aktivnost antioksidanata su dragoceni u praksi. Stoga je u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan antioksidativni kapacitet ekstrakata svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove primenom više antioksidativnih testova, koji se zasnivaju na različitim mehanizmima. Pošto ne postoji nijedna metoda koja bi mogla da pruži nedvosmislen rezultat, najbolje rešenje je sprovođenje više različitih ispitivanja umesto korišćenja samo jednog testa (Moharram i Youssef, 2014).

Sposobnost neutralizacije slobodnog DPPH• radikala

Rezultati procene sposobnosti neutralizacije slobodnog DPPH• radikala ekstrakata plodova zove su prikazani na Histogramu 4.5 i u Prilogu 7.2, Tabela 5.



Histogram 4.5. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala

Ekstrakti plodova biljne vrste *Sambucus* su postigli dobre rezultate u procesu neutralizacije slobodnog DPPH• radikala, gde se na osnovu dobijenih vrednosti posebno ističu TS vodeni MAC ekstrakt (1,34 mg TE/ml E) i L etanolni MAE ekstrakt (1,32 mg TE/ml E), a razlika u ostvarenom antioksidativnom potencijalu između ova dva ekstrakta nije statistički značajna. U ovom slučaju dolazi do izražaja uticaj procesa sušenja i primenjene ekstrakcione tehnike na dobijeni rezultat.

Tradicionalan način sušenja biljne sirovine i izolovanja bioaktivnih jedinjenja u poređenju sa savremenim je ostvario veoma dobar rezultat, pa se pretpostavlja da je u toku tradicionalnog sušenja pospešeno odvijanje hemijskih transformacija grupa jedinjenja koja se nalaze u biljnom materijalu u prisustvu kiseonika i svetlosti, što je uticalo na ostvarenu aktivnost. Za razliku od TS vodenog MAC ekstrakta, TS vodeni UAE i TS vodeni MAE ekstrakti ispoljili su znatno nižu aktivnost u procesu neutralizacije DPPH• radikala, a koje se statistički nisu značajno razlikovale (0,75 i 0,72 mg TE/ml E, redom).

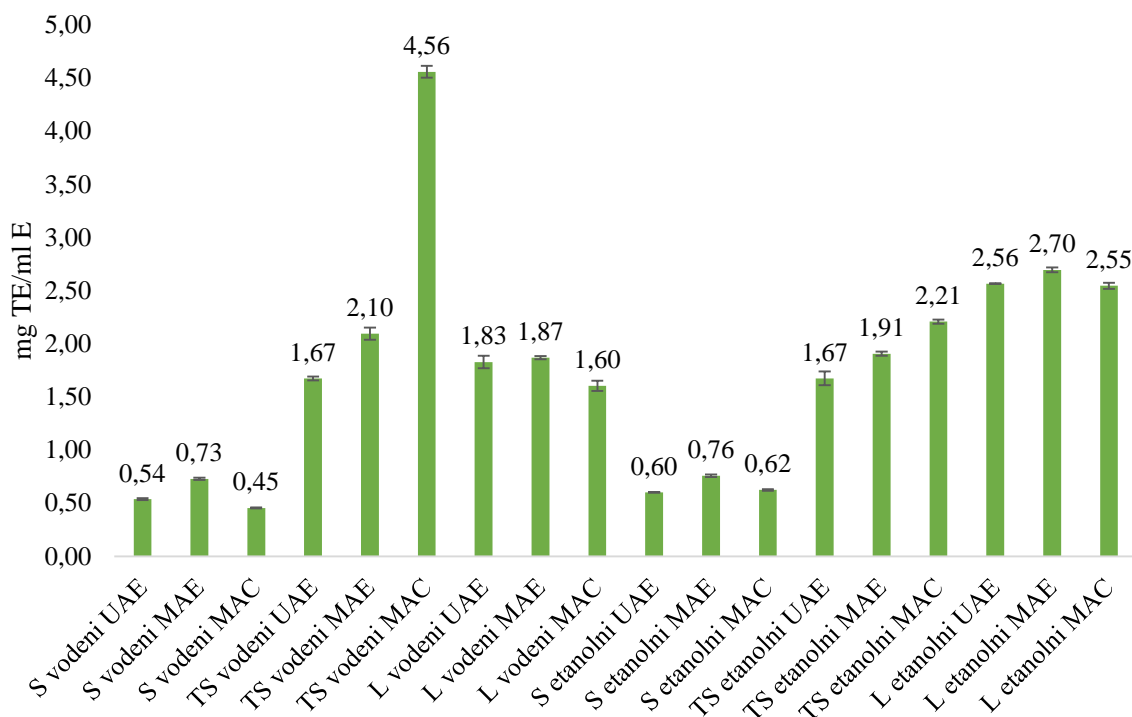
Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova prate trend vodenih ekstrakata tradicionalno sušenih plodova, pa je TS etanolni MAC ekstrakt bio najefikasniji agens (1,03 mg TE/ml E), dok su TS etanolni UAE i TS etanolni MAE ekstrakti pokazali jednaku aktivnost u neutralizaciji DPPH• radikala (0,83 mg TE/ml E).

L etanolni MAC i L etanolni UAE ekstrakti su imali nižu aktivnost u odnosu na L etanolni MAE ekstrakt, što jasno govori o uticaju primenjene tehnike ekstrakcije na izolovanje potentnih prirodnih proizvoda. Kod vodenih ekstrakata liofilizovanih plodova ekstrakti dobijeni savremenim postupcima izdvajanja bioaktivnih jedinjenja (L vodeni MAE i L vodeni UAE) su statistički značajno ostvarili bolji rezultat u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala od L vodenog MAC ekstrakta.

Ekstrakti svežih plodova zove imaju sposobnost da neutrališu DPPH• radikal, ali je njihova aktivnost i do šest puta slabija u poređenju sa aktivnošću ekstrakata tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove.

Sposobnost neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala

Rezultati procene sposobnosti neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala ekstrakata plodova zove su prikazani na Histogramu 4.6 i u Prilogu 7.2, Tabela 6.



Histogram 4.6. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala

Kao najpotentniji ekstrakt u procesu neutralizacije ABTS^{•+} radikala pokazao se TS vodeni MAC ekstrakt. Vrednost ostvarenog antioksidativnog potencijala je 4,56 mg TE/ml E, što je statistički najznačajnija aktivnost ispitivanih ekstrakata. Vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova dobijeni savremenim ekstrakcionim tehnikama ostvarili niže vrednosti: 2,10 mg TE/ml E za TS vodeni MAE ekstrakt i 1,67 mg TE/ml E za TS vodeni UAE ekstrakt. Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova zove prate isti trend koji su ostvarili vodeni ekstrakti, pa je na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno da je najbolji agens u procesu neutralizacije ABTS^{•+} radikala TS etanolni MAC ekstrakt (2,21 mg TE/ml E), a prate ga TS etanolni MAC i TS etanolni UAE ekstrakti (1,91 i 1,67 mg TE/ml E, redom).

Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su ispoljili približno sličnu aktivnost, s tim da se L etanolni MAE ekstrakt izdvojio kao najpotentniji (2,70 mg TE/ml E), dok između L etanolnog UAE i L etanolnog MAC ekstrakata nije zapažena statistički značajna razlika (2,56 i 2,55 mg TE/ml E, redom). Vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su ostvarili niže vrednosti u procesu neutralizacije ABTS^{•+} radikala od etanolnih ekstrakata, gde između L vodenog MAE i L

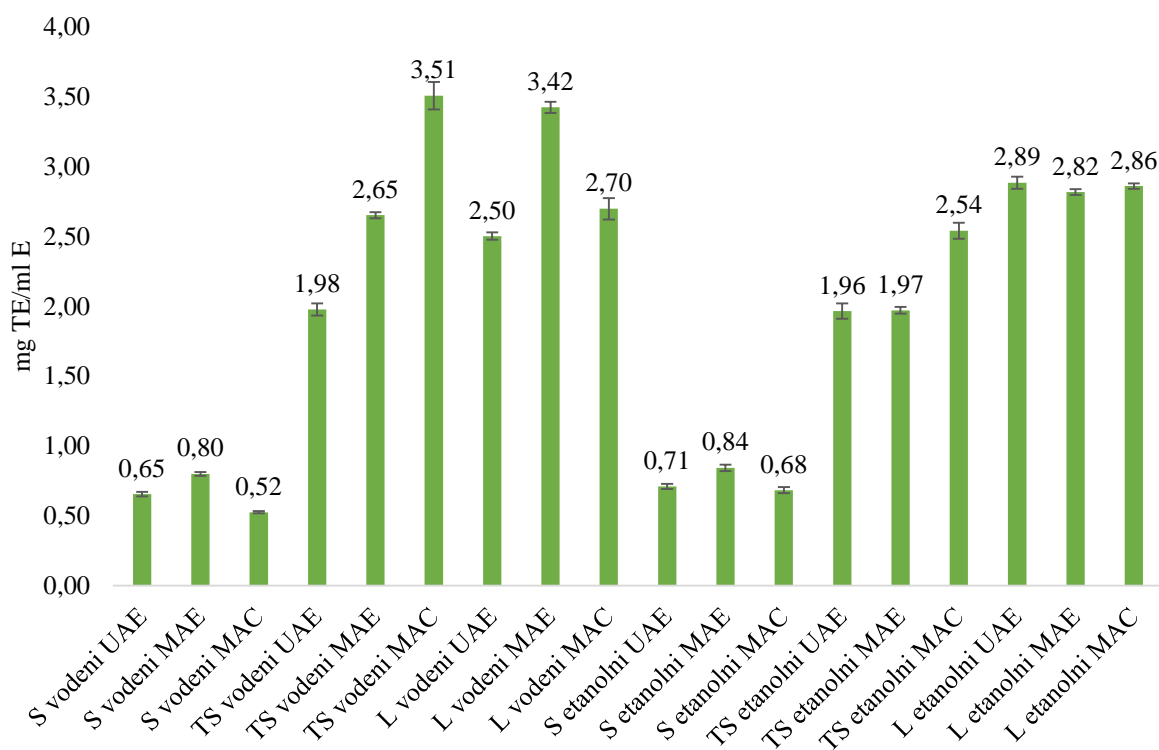
vodenog UAE nema statistički značajne razlike (1,87 i 1,83 mg TE/ml E), dok je L vodeni MAC ekstrakt ispoljio statistički značajno nižu vrednost (1,60 mg TE/ml E).

Ekstrakti svežih plodova zove su ostvarili najniži potencijal u neutralizaciji ABTS^{•+} slobodnog radikala kada se uporede sa ekstraktima tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove. Od ekstrakata svežih plodova zove kao potencijalni prirodni antioksidanti su se istakli S vodeni MAE i S etanolni MAE ekstrakti, dok su vodeni i etanolni ekstrakti dobijeni UAE i MAC ekstrakcijama ispoljili sličan antioksidativni potencijal.

Redukciona sposobnost

Sposobnost redukcije Fe³⁺ jona

Redukciona sposobnost ekstrakata plodova zove prema Fe³⁺ jonu prikazana je na Histogramu 4.7 i u Prilogu 7.2, Tabela 7.



Histogram 4.7. Sposobnost ekstrakata plodova zove u redukciji Fe³⁺ jona

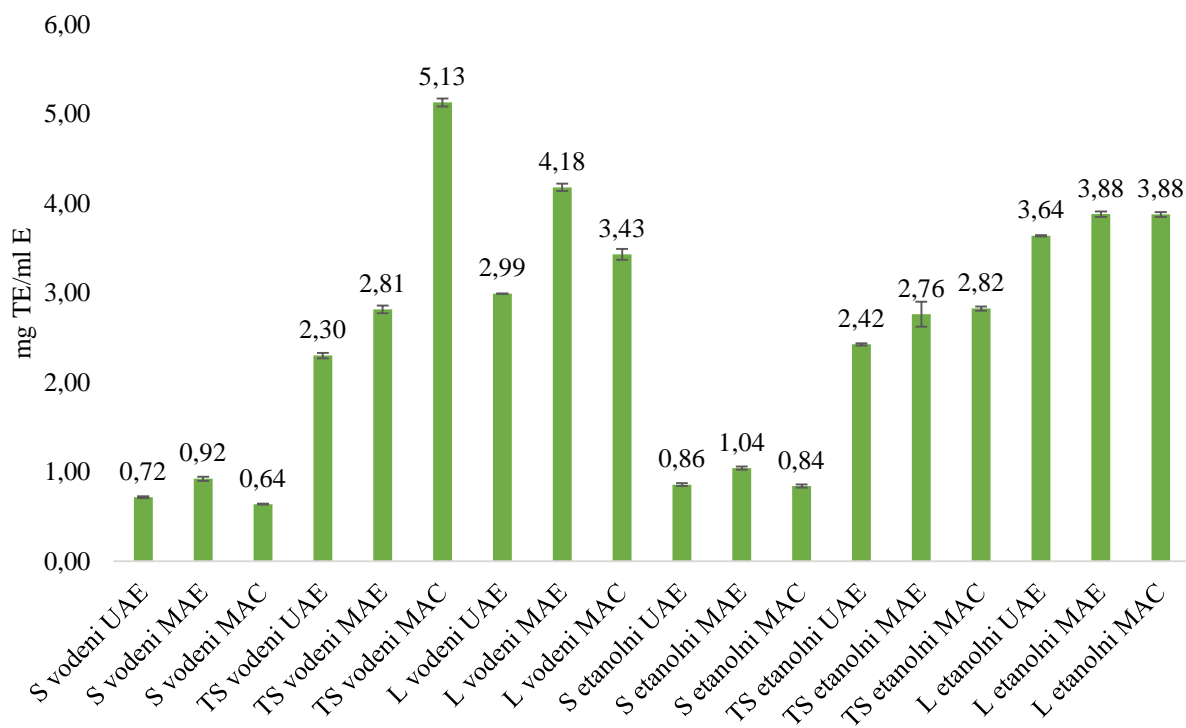
TS vodeni MAC ekstrakt je ostvario najbolju moć redukcije Fe³⁺ jona i na taj način obezbedio statistički značajnu razliku u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte (3,51 mg TE/ml E), dok su TS vodeni MAE i TS vodeni UAE ekstrakti ispoljili redukcionu moć zabeleženih vrednosti 2,65 i 1,97 mg TE/ml E, redom.

Kada je reč o ekstraktima liofilizovanih plodova zove L vodeni MAE ekstrakt je ispoljio najbolji redukcionni potencijal (3,42 mg TE/ml E), dok su L vodeni MAC i L vodeni UAE ekstrakti liofilizovanih plodova registrovani kao slabiji redukcionni agensi (2,70 i 2,50 mg TE/ml E, redom). Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova dobijeni i savremenim i tradicionalnim ekstrakcionim tehnikama su ostvarili približno slične vrednosti u sposobnosti redukcije Fe^{3+} jona i statističkom odbradom dobijenih rezultata utvrđeno je da između njih ne postoji statistički značajna razlika. Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova su se pokazali kao potentniji redukcionni agensi od etanolnih ekstrakata tradicionalno sušenih plodova.

U poređenju sa ekstraktima tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove, ekstrakti svežih plodova su ostvarili najniži redukcionni potencijal, gde su se etanolni i vodeni MAE ekstrakti izdvojili kao bolji redukcionni agensi od etanolnih i vodenih UAE i MAC ekstrakata.

Sposobnost redukcije Cu^{2+} jona

Redukcionna sposobnost ekstrakata plodova zove prema Cu^{2+} jonu prikazana je na Histogramu 4.8 i u Prilogu 7.2, Tabela 8.



Histogram 4.8. Sposobnost ekstrakata plodova zove u redukciji Cu^{2+} jona

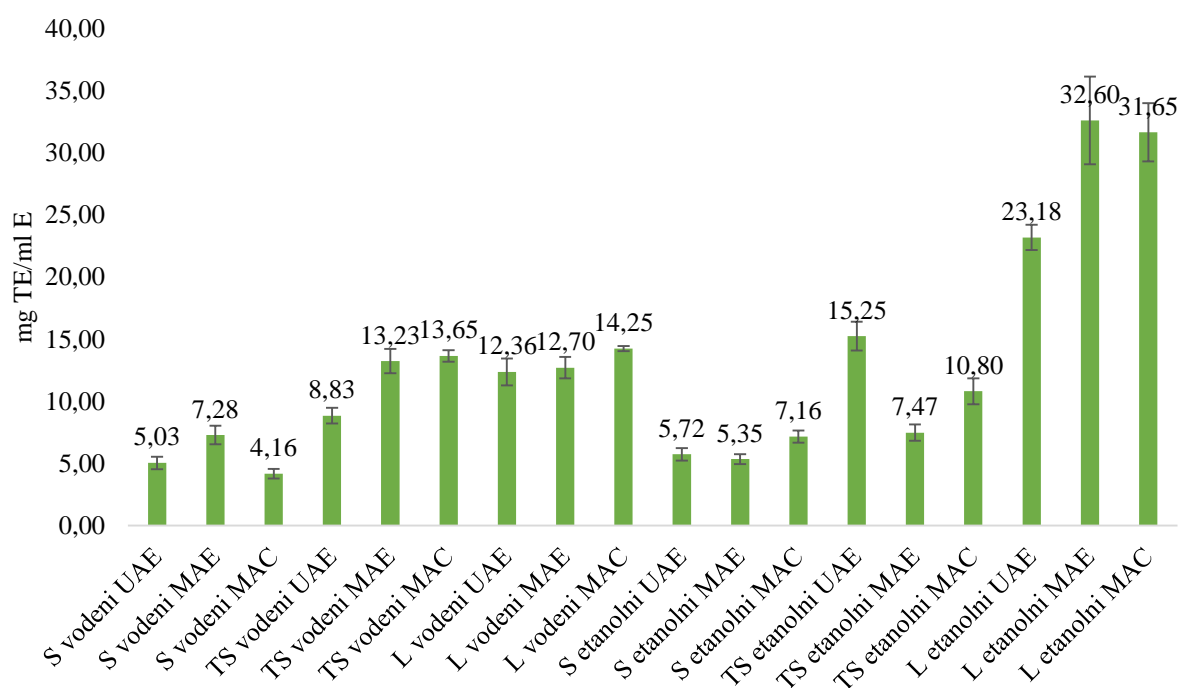
Ispitivani ekstrakti plodova zove u sposobnosti redukcije Cu^{2+} jona prate trend rezultata koji su dobijeni u redukciji Fe^{3+} jona, stoga su se kao najpotentniji redukcionni agensi Cu^{2+} jona pokazali TS vodeni MAC ekstrakt (5,13 mg TE/ml E) koji je statistički ostvario najbolji rezultat i L vodeni MAE ekstrakt (4,18 mg TE/ml E).

Takođe, i u ovom slučaju etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su ostvarili sličan redukcionni potencijal, pa između L etanolnih MAE i MAC ekstrakata nije utvrđena statistički značajna razlika (3,88 mg TE/ml E), dok je L etanolni UAE ekstrakt ispoljio niži redukcionni potencijal (3,64 mg TE/ml E). Poređenjem ostvarene aktivnosti etanolnih ekstrakata uočava se da su etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove jači redukcionni agensi od ekstrakata tradicionalno sušenih plodova zove.

Ekstrakti svežih plodova zove su pokazali najniži redukcionni kapacitet prema Cu^{2+} jonu, a zapaža se da su S etanolni i S vodeni MAE ekstrakti svežih plodova zove jači redukcionni činiooci od S etanolnih i S vodenih UAE i MAC ekstrakata.

Sposobnost neutralizacije •NO slobodnog radikala

Rezultati ispitivanja neutralizacije •NO radikala prikazani su na Histogramu 4.9 i u Prilogu 7.2, Tabela 9.



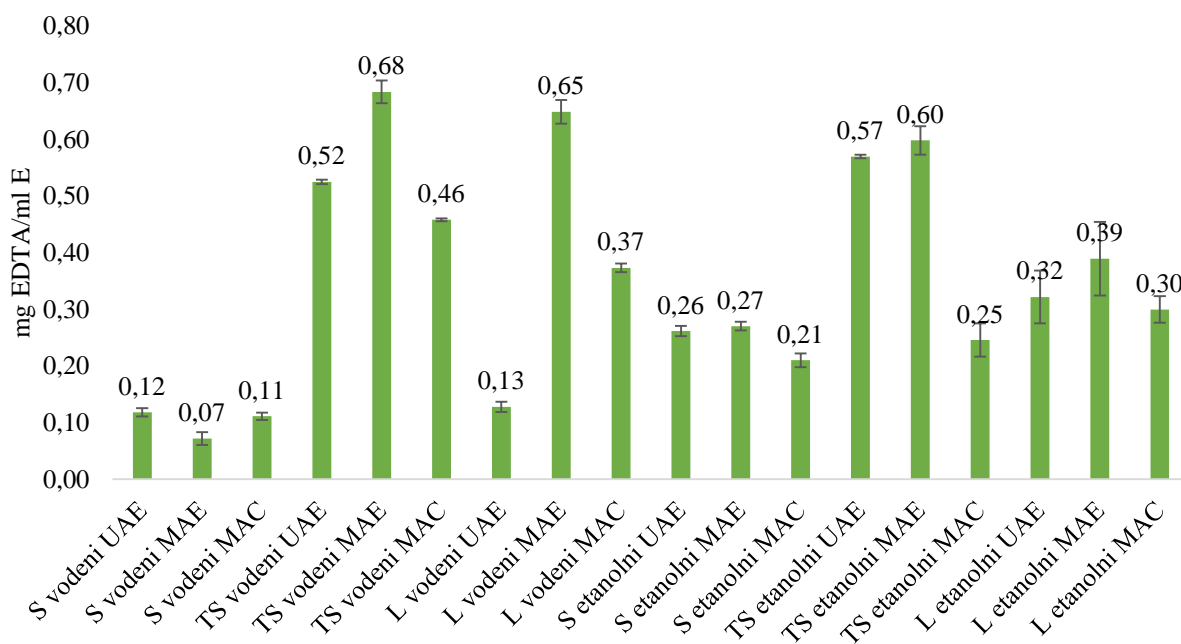
Histogram 4.9. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji •NO radikala

Kada je reč o evaluaciji inhibicije •NO radikala, ekstrakti plodova biljne vrste *S. nigra* su ostvarili vrednosti u rasponu širokih koncentracija 4,16-32,60 mg TE/ml E. Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su imali najbolju sposobnost da inhibiraju •NO radikal, posebno L etanolni MAE i L etanolni MAC ekstrakti (32,60 i 31,65 mg TE/ml E, redom), koji se statistički nisu značajno razlikovali, dok je statistički značajno niža vrednost ostvarena kod L etanolnog UAE ekstrakta (23,18 mg TE/ml E). Od etanolnih ekstrakata tradicionalno sušenih plodova kao dobar prirodni agens u neutralizaciji •NO radikala istakao se TS etanolni UAE ekstrakt (15,25 mg TE/ml E), dok su TS etanolni MAC i TS etanolni MAE ekstrakti okarakterisani kao slabiji inhibitorni agensi (10,80 i 7,47 mg TE/ml E, redom). Etanolni ekstrakti svežih plodova su pokazali nisku sposobnost u neutralizaciji •NO radikala, a ostvarene vrednosti u procesu neutralizacije su se kretale između 5,35 i 7,16 mg TE/ml E.

Analizom vodenih ekstrakata zapaženo je da su vodeni ekstrakti liofilizovanih i tradicionalno sušenih plodova ispoljili sličnu sposobnost da neutrališu •NO radikal, između kojih postoji statistički značajna razlika. Vodeni ekstrakti svežih plodova su pokazali kao prirodni agensi sa najnižim inhibitornim potencijalom •NO radikala i na taj način predstavljaju najslabije antioksidativne agense.

Heliranje jona metala

Antioksidativni kapacitet je okarakterisan i određivanjem sposobnosti ekstrakata plodova zove da heliraju jone metala. Dobijeni rezultati su prikazani na Histogramu 4.10 i u Prilogu 7.2, Tabela 10.



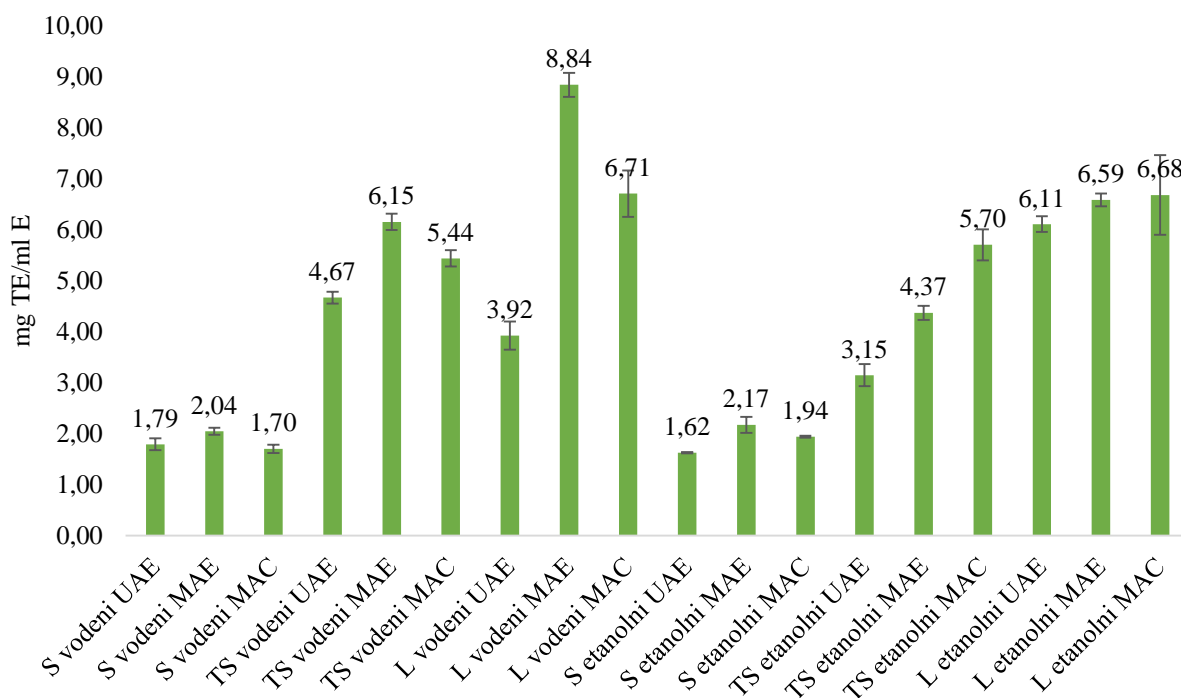
Histogram 4.10. Sposobnost ekstrakata plodova zove u heliranju jona metala

Ispitivanje sposobnosti ekstrakata svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova biljne vrste *S. nigra* u procesu heliranja jona metala je sprovedeno sa ciljem da se utvrdi da li biljna vrsta *S. nigra* ima mogućnost da spreči razvoj reakcija u toku kojih se obrazuju slobodni radikali. U tom slučaju je TS vodeni MAE ekstrakt plodova zove realizovao najveću i statistički najznačajniju sposobnost da helira jone metala (0,68 mg EDTA/ml E), a nešto niži potencijal je uočen kod L vodenog MAE ekstrakta liofilizovanih plodova (0,65 mg EDTA/ml E), ali je statističkom analizom dobijenih rezultata utvrđeno da između njih ne postoji statistički značajna razlika. Ostali vodeni ekstrakti su ispoljili nižu sposobnost heliranja jona metala.

Kada se pogledaju etanolni ekstrakti, zapaža se vrlo dobra sposobnost ekstrakta tradicionalno sušenih plodova u procesu heliranja jona metala, dok su ekstrakti svežih plodova zove imali najnižu helatacionu moć. Zajednička karakteristika ekstrakata koji su se pokazali kao najefikasniji agensi u heliranju jona metala je da su dobijeni MAE ekstrakcionom tehnikom, koja se kao i u prethodnim testovima istakla kao najpogodniji način dobijanja ekstrakata i izolovanja sekundarnih metabolita koji su nosioci biološke aktivnosti.

Ukupna antioksidativna aktivnost

Rezultati ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata plodova prikazani su na Histogramu 4.11 i u Prilogu 7.2, Tabela 11.



Histogram 4.11. Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata plodova zove

Ekstrakti liofilizovanih plodova su pokazali najviši nivo ukupne antioksidativne aktivnosti, dok su ekstrakti svežih plodova ostvarili najnižu aktivnost. Uticaj ekstrakcione tehnike na ukupnu antioksidativnu aktivnost je posebno izražen kod vodenog ekstrakta liofilizovanih plodova, gde je najbolji i statistički najznačajniji rezultat ostvaren primenom MAE ekstrakcione tehnike (8,84 mg TE/ml E). Osim L vodenog MAE ekstrakta, ostali vodeni i etanolni ekstrakti liofilizovanih i tradicionalno sušenih plodova zove su imali približno sličnu ukupnu antioksidativnu aktivnost, sa malim varijacijama u u pogledu statistički značajne razlike. Iako su ekstrakti svežih plodova zove imali najnižu aktivnost, posebno su se istakli S vodeni MAE i S etanolni MAE ekstrakti kao dobri nosioci ukupne antioksidativne aktivnosti (2,04 i 2,17 mg TE/ml E). Međutim, sprovedena statistička obrada dobijenih rezultata je pokazala da se između vodenih i etanolnih ekstrakata svežih plodova zove ne uočava statistički značajna razlika, pa se može smatrati da su i vodeni i etanolni UAE i MAC ekstrakti prirodni agensi koji imaju dosta dobar ukupni antioksidativni kapacitet.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u ekstraktima plodova zove i antioksidativne aktivnosti

Uticaj ukupnih fenolnih jedinjenja i detektovanih fenolnih kiselina, flavonoida i terpenke kiseline na biološku aktivnost ekstrakata biljne vrste *S. nigra* najbolje je objašnjen utvrđivanjem njihove korelacije sa antioksidativnim kapacitetom, prikazanim u Tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima i antioksidativne aktivnosti

	Faktor determinacije R ²						
	DPPH•	ABTS•+	•NO	FRAP	CUPRAC	PM	HM
Ukupni fenoli	0,94	0,85	0,83	0,96	0,97	0,97	0,76
Ukupni flavonoidi	0,87	0,75	0,75	0,90	0,87	0,92	0,77
Ukupni monomerni antocijani	0,79	0,68	0,90	0,80	0,79	0,81	0,55
Ukupni tanini	0,93	0,79	0,89	0,89	0,88	0,92	0,72
Hlorogenska kiselina	0,71	0,59	0,79	0,74	0,75	0,78	0,48
Rutin	0,73	0,60	0,84	0,75	0,74	0,79	0,52
Ursolna kiselina	0,44	0,42	0,57	0,40	0,42	0,41	0,39
Kvercetin	0,60	0,59	0,61	0,65	0,62	0,65	0,61
Kvercetin-3-O-heksozid	0,80	0,76	0,89	0,89	0,88	0,92	0,70

Rezultati regresione analize pokazuju da ukupni fenoli odlično koreliraju sa antioksidativnim potencijalom ispitivanih ekstrakata plodova zove, a najbolja korelacija je ostvarena sa sposobnošću ekstrakata u procesu redukcije Fe³⁺ i Cu²⁺ jona. Nešto nižu, ali veoma dobru korelaciju sa antioksidativnim potencijalom ostvarili su i ukupni flavonoidi ekstrakata plodova zove. Ukupni flavonoidi najbolje koreliraju sa ukupnim antioksidativnim kapacitetom i sa

sposobnošću redukcije Fe^{3+} jona. Ukupni monomerni antocijani su najbolju korelaciju ostvarili sa sposobnošću neutralizacije $\bullet\text{NO}$ radikala, ali veoma dobro koreliraju i sa ostalim ispitanim antioksidativnim aktivnostima. Tanini kao fenolni molekuli najbolje koreliraju sa sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala i ukupnim antioksidativnim potencijalom.

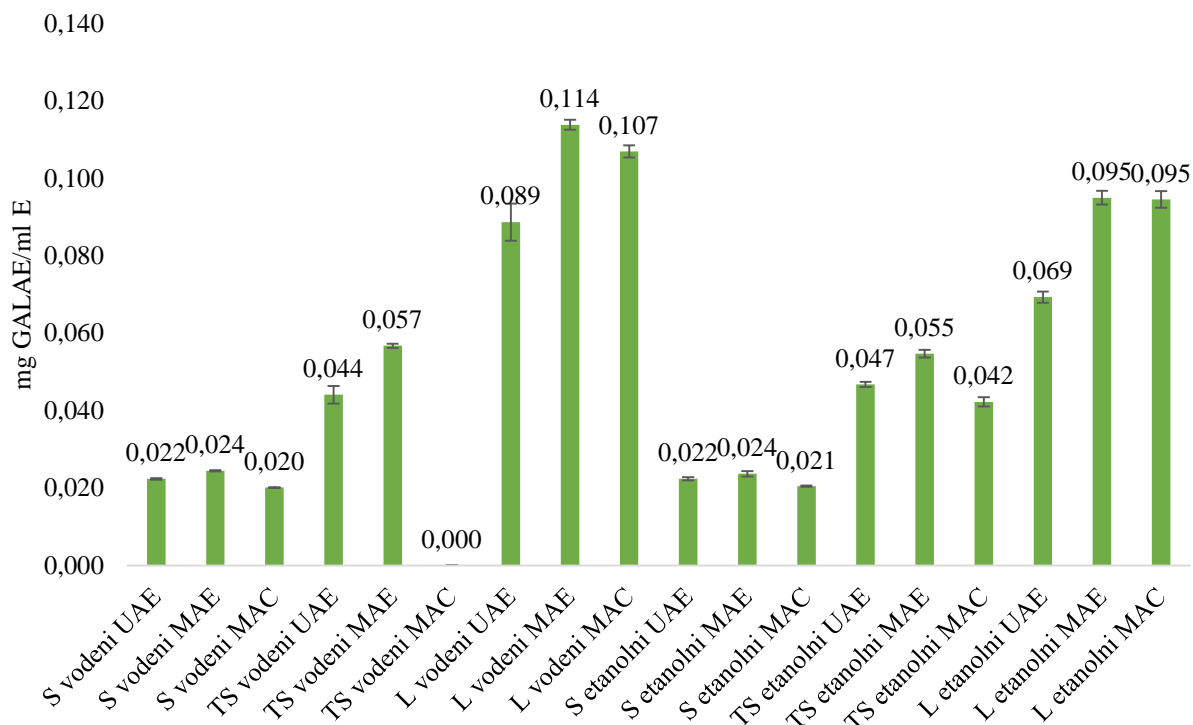
Pored ukupnih fenolnih komponenata korelacija između pojedinačnih fenolnih jedinjenja i antioksidativne aktivnosti je od posebnog značaja, zato što ova jedinjenja kako u samostalnom, tako i u sinergističkom svojstvu sa drugim komponentama doprinose boljoj antiradikalnoj aktivnosti. Hlorogenska kiselina je u dobroj korelaciji sa antioksidativnom sposobnošću analiziranih ekstrakata u svim primenjenim testovima, dok je rutin u odličnoj korelaciji sa sposobnošću ekstrakata da neutrališu $\bullet\text{NO}$ radikal. Ursolna kiselina i kvercetin umereno koreliraju sa antioksidativnim potencijalom, dok je kvercetin-3-*O*-heksozid u odličnoj korelaciji sa neutralizacijom $\bullet\text{NO}$ radikala, redukcijom Fe^{3+} i Cu^{2+} jona i ukupnim antioksidativnim kapacitetom. Prisustvo fenolnih kiselina, flavonoida, njihovih heksozida i terpenskih jedinjenja u ispitivanim uzorcima doprinosi jačem biološkom kapacitetu ispitivane biljne vrste.

4.1.2.2. Neuroprotektivna aktivnost

Inhibicija enzima AChE

Jedna od najfascinantnijih farmakoloških aktivnosti prirodnih proizvoda je njihova sposobnost da deluju na centralni nervni sistem (CNS), da utiču na funkcionisanje ljudskog uma i na raspoloženje. Poremećaji u funkcionisanju CNS-a se najčešće povezuje sa oboljenjima kao što su Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, ataksija, *Myasthenia gravis* (Kobus-Cisowska i sar., 2019). Lečenje neuroloških poremećaja se najčešće zasniva na inhibiciji prekomerne aktivnosti enzima AChE, kao i BChE koji učestvuju u razgradnji neurotransmitera ACh. Povećanje broja naučnih publikacija iz oblasti inhibicije neuroloških enzima prirodnim proizvodima je iskorak u nauci, koji vodi ka zameni sintetičkih lekova prirodnim (Masondo i sar., 2019).

Sa idejom da se ispita sposobnost prirodnih proizvoda sa teritorije Balkanskog poluostrva u procesu inhibicije prekomerne aktivnosti enzima, pripremljeni su ekstrakti biljne vrste *S. nigra* koja do sada nije bila predmet naučnih ispitivanja u ovoj oblasti. Rezultati analize koja je sprovedena u cilju određivanja inhibicije enzima AChE su predstavljeni na Histogramu 4.12 i u Prilogu 7.3, Tabela 12.



Histogram 4.12. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije AChE

Ekstrakti liofilizovanih plodova zove su ostvarili najjaču inhibiciju prekomerne aktivnosti enzima AChE. Najpotentniji inhibitori su L vodeni MAE i L vodeni MAC ekstrakti (0,114 i 0,107 mg GALAE/ml E, redom), s tim da je statistički jači inhibitorni potencijal ispoljio L vodeni MAE ekstrakt. Za razliku od L vodenih MAE i MAC ekstrakata, L vodeni UAE ekstrakt je ostvario statistički značajno nižu inhibitornu aktivnost (0,089 mg GALAE/ml E). L etanolni MAE i MAC ekstrakti su pokazali isti inhibitorni potencijal (0,095 mg GALAE/ml E), dok je L etanolni UAE ekstrakt imao niži inhibitorni potencijal (0,069 mg GALAE/ml E).

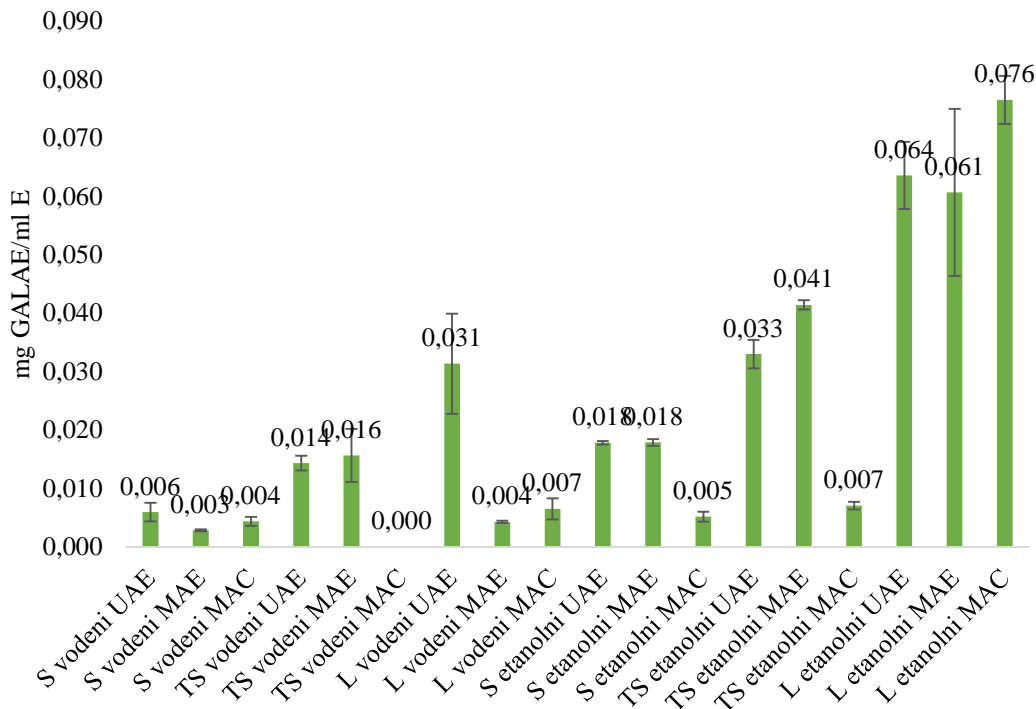
Kada je reč o ekstraktima tradicionalno sušenih plodova, vodeni i etanolni MAE ekstrakti su se istakli kao najbolji inhibitori enzima AChE i ostvareni rezultat TS vodenih i TS etanolnih MAE ekstrakata se statistički nije značajno razlikovao (0,057 i 0,055 mg GALAE/ml E, redom). Takođe, TS vodeni i TS etanolni UAE ekstrakti su imali sličan inhibitorni potencijal, a ostvarena inhibitorna moć je 0,044 i 0,047 mg GALAE/ml E, redom.

Ekstrakti svežih plodova zove su najslabiji inhibitori enzima AChE u poređenju sa ekstraktima liofilizovanih i tradicionalno sušenih plodova. S vodeni i S etanolni MAE ekstrakti su ostvarili najbolji inhibitorni potencijal u odnosu na S vodene i S etanolne UAE i MAC ekstrakte, koji su pokazali slabiji inhibitorni kapacitet.

Zahvaljujući fitohemijskom skriningu ekstrakata plodova zove uočeno je da se ekstrakti svežih plodova odlikuju najnižim sadržajem sekundarnih metabolita, pa su ostvareni rezultati inhibicije enzima AChE očekivani.

Inhibicija enzima BChE

Sposobnost ekstrakata plodova zove da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima BChE prikazana je na Histogramu 4.13 i u Prilogu 7.3, Tabela 13.



Histogram 4.13. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije BChE

Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su pokazali najbolju sposobnost da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima BChE, gde je statistički najdominantniji L etanolni MAC ekstrakt (0,076 mg GALAE/ml E), dok su ekstrakti dobijeni savremenim ekstrakcionim tehnikama L etanolni UAE i L etanolni MAE imali nižu inhibitornu sposobnost (0,064 i 0,061 mg GALAE/ml E, redom), koja se statistički nije značajno razlikovala.

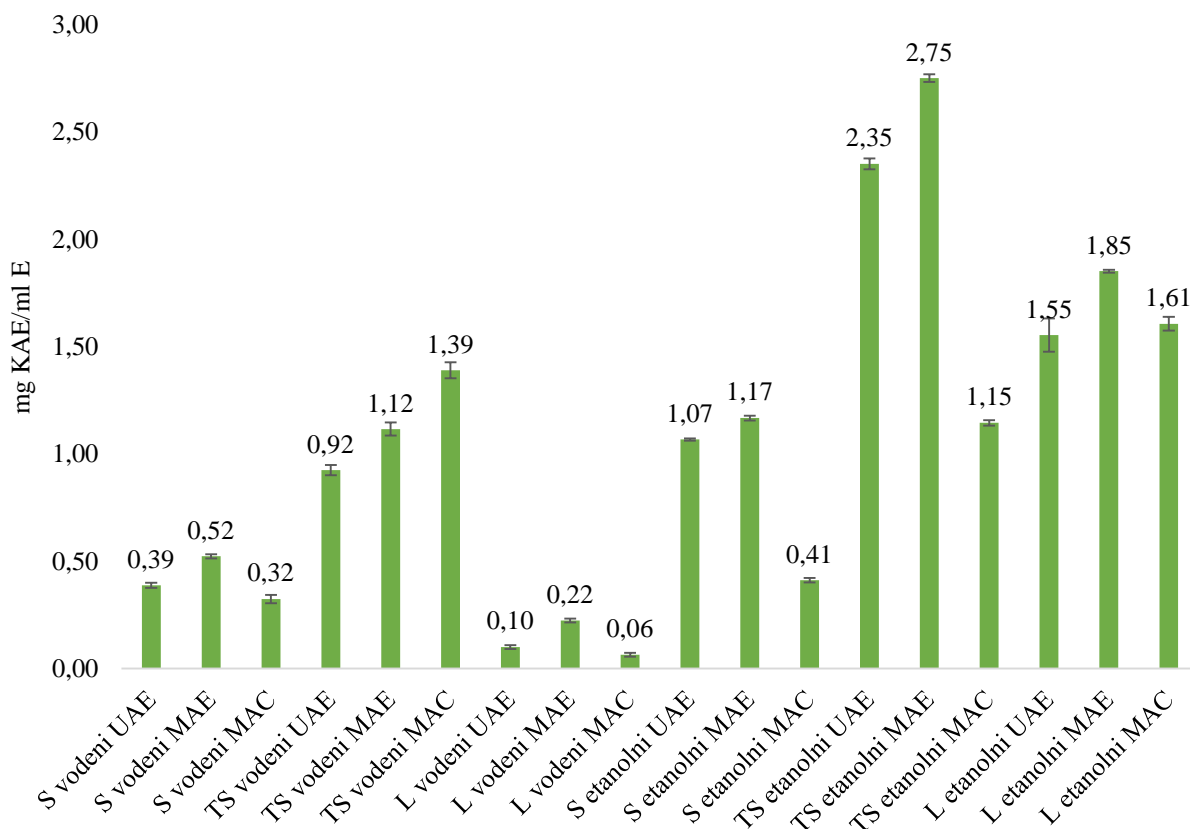
Takođe, etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova zove se istakli kao bolji inhibitorni agensi od vodenih ekstrakata, a TS etanolni MAE i TS etanolni UAE su ostvarili najbolji inhibitorni potencijal (0,041 i 0,033 mg GALAE/ml E, redom), dok su etanolni ekstrakti svežih plodova zove imali najniži inhibitorni potencijal.

Kada je reč o vodenim ekstraktima, vodeni ekstrakt liofilizovanih plodova zove dobijen UAE ekstrakcionom tehnikom je ostvario najbolji rezultat u enzimskoj inhibiciji (0,031 mg GALAE/ml E), dok su TS vodeni MAE i TS vodeni MAC ekstrakti pokazali sličan inhibitorni potencijal, koji se statistički značajno ne razlikuje (0,014 i 0,016 mg GALAE/ml E). Niske vrednosti inhibitornog potencijala zabeležene su kod ekstrakata svežih plodova zove koje su se kretale u rasponu koncentracija 0,003-0,006 mg GALAE/ml E.

4.1.2.3. Antitirozinazna aktivnost

Inhibicija enzima tirozinaze

Odvijanje enzimskih reakcija u voću i povrću potpomognuto je prisustvom enzima tirozinaze, gde usled niza nekontrolisanih reakcija može doći do narušavanja nutritivnog sastava voća i povrća. Različite grane industrije se bave pronalaženjem prirodnih izvora kao potencijalnih agenasa u cilju zaštite od nastanka i razvoja različitih poremećaja izazvanih prekomernom aktivnošću enzima tirozinaze (Mukherjee i sar., 2018). Rezultati analize inhibitornog potencijala ekstrakata plodova zove predstavljani su na Histogramu 4.14 i u Prilogu 7.4, Tabela 14.



Histogram 4.14. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije tirozinaze

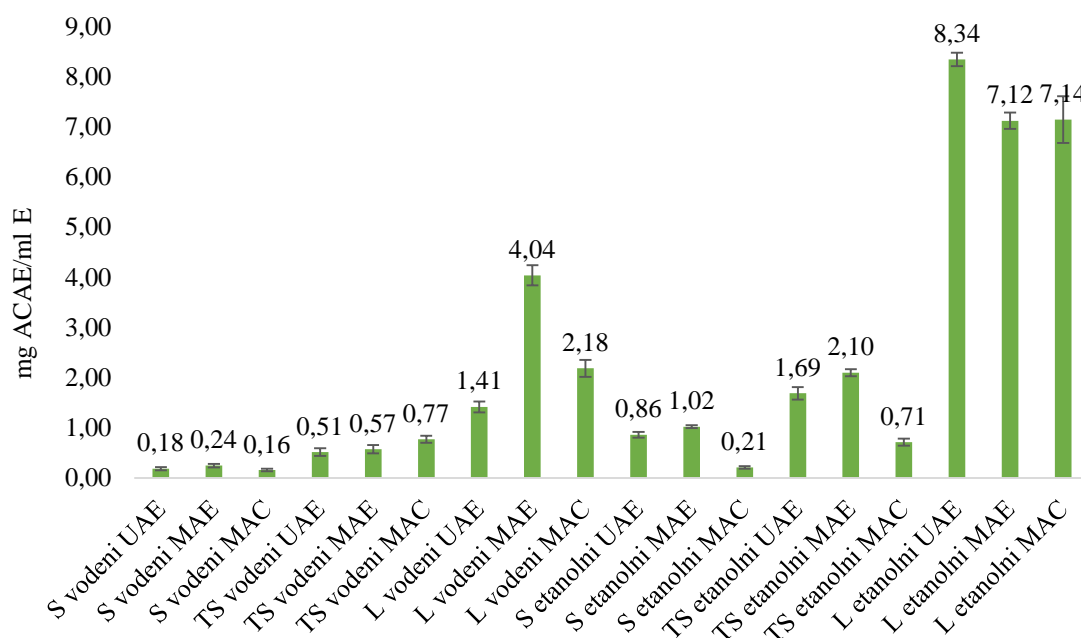
Ekstrakti plodova zove pripremljeni i savremenim i tradicionalnim ekstrakcionim tehnikama su ostvarili veoma dobru inhibiciju enzima tirozinaze. TS etanolni MAE i TS etanolni UAE ekstrakti su imali najveću sposobnost u procesu smanjenja prekomerne aktivnosti enzima tirozinaze (2,75 i 2,35 mg KAE/ml E, redom), dok je TS etanolni MAC ekstrakt imao niži potencijal da utiče na smanjenje enzimske aktivnosti. Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova su u velikoj meri inhibirali tirozinazu, a najbolju inhibitornu moć je postigao L etanolni MAE ekstrakt (1,85 mg KAE/ml E), dok su L etanolni MAC i L etanolni UAE ekstrakti ostvarili nešto niži inhibitorni

kapacitet (1,61 i 1,55 mg KAE/ml E, redom), između čijeg inhibitornog potencijala nije utvrđena statistički značajna razlika. Takođe, i vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova zove su pokazali veoma dobar rezultat u sprečavanju prekomerne aktivnosti enzima tirozinaze, a posebno se istakao TS vodeni MAC ekstrakt (1,39 KAE/ml E), zatim TS vodeni MAE i TS vodeni UAE ekstrakti (1,12 i 0,92 mg KAE/ml E, redom). Ono što je važno istaći je da su vodeni ekstrakti svežih plodova zove imali jači inhibitorni karakter od vodenih ekstrakata liofilizovanih plodova. Razlog ovakvoj aktivnosti mogu biti eksperimentalni uslovi na kojima je vođeno određivanje inhibicije tirozinaze, izloženost ekstrakata svetlosti, kao i uticaju kiseonika koji narušavaju fitohemijsku kompoziciju ekstrakata.

4.1.2.4. Antidijabetogena aktivnost

Inhibicija enzima α -amilaze

Poslednjih godina istraživačke grupe su se usmerile na ispitivanje prehrambenih proizvoda i biljnih ekstrakata kao potentnih inhibitora prekomerne aktivnosti enzima digestivnog trakta α -amilaze i α -glukozidaze, čiji poremećaji u radu najčešće uzrokuju razvoj dijabetesa (Sun, Gidley i Warren, 2018). Inhibicija α -amilaze i α -glukozidaze polifenolima je usko povezana sa njihovom hemijskom strukturom, jer inhibicija proizilazi iz interakcije vezanja polifenola i enzima (Sun i sar., 2016). Rezultati istraživanja koje se zasniva na sposobnosti ekstrakata plodova zove da inhibiraju enzim α -amilazu predstavljeni su na Histogramu 4.15 i u Prilogu 7.5, Tabela 15.

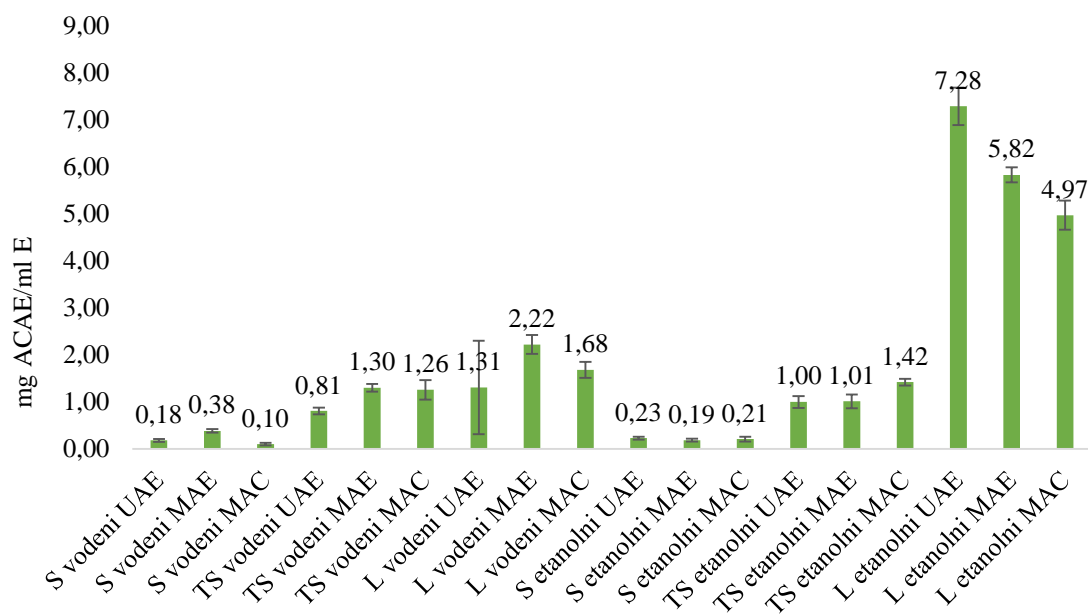


Histogram 4.15. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije α -amilaze

Ispitivanje sprovedeno na smanjenju prekomerne aktivnosti enzima α -amilaze rezultovalo je posebnim isticanjem etanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova. L etanolni UAE ekstrakt se izdvojio kao najpotentniji agens u smanjenju aktivnosti α -amilaze, a zabeležena vrednost je 8,34 mg ACAE/ml E. L etanolni MAE i L etanolni MAC ekstrakti su ostvarili približno sličnu inhibitornu moć (7,12 i 7,14 mg ACAE/ml E, redom), bez statistički značajne razlike. Etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova su ostvarili do četiri puta jači inhibitorni potencijal prema α -amilazi u odnosu na etanolne ekstrakte tradicionalno sušenih plodova. Očekivano, etanolni ekstrakti svežih plodova zove su ispoljili najniže vrednosti inhibitornog potencijala prema ispitivanom enzimu. Kod vodenih ekstrakata zabeležena je znatno niža inhibitorna moć, a rezultati analize su pokazali da se L vodeni MAE ekstrakt izdvojio kao dobar prirodni agens u inhibiciji α -amilaze (4,04 mg ACAE/ml E), dok su L vodeni MAC i L vodeni UAE ekstrakti uticali na smanjenje aktivnosti ispitivanog enzima u zabeleženim koncentracijama 2,18 i 1,41 mg ACAE/ml E, redom i između njih nije zabeležena statistički značajna razlika. Ostali vodeni ekstrakti svežih i tradicionalno sušenih plodova zove su ispoljili vrlo nisku inhibitornu sposobnost, koja se kretala u opsegu koncentracija 0,16-0,77 mg ACAE/ml E.

Inhibicija enzima α -glukozidaze

Sposobnost ekstrakata plodova zove da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima α -glukozidaze prikazana je na Histogramu 4.16 i u Prilogu 7.5, Tabela 16.



Histogram 4.16. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije α -glukozidaze

Analizom inhibicije α -glukozidaze uočeno je da ispitivani ekstrakti prate isti trend inhibitorne moći kao i kada je reč o inhibiciji enzima α -amilaze. Stoga, etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove su ostvarili najbolji inhibicioni potencijal sa naglaskom na L etanolni UAE ekstrakt čija je inhibitorna moć 7,28 mg ACAE/ml E, dok je inhibicioni kapacitet L etanolnog MAE i L etanolnog MAC ekstrakata nešto niži, a utvrđene vrednosti inhibicije su 5,82 i 4,97 mg ACAE/ml E, redom, između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika. Etanolni ekstrakti tradicionalno sušenih i svežih plodova zove su ispoljili nisku inhibicionu moć, koja se kretala u rasponu koncentracija 1,00-1,42 mg ACAE/ml E.

Osim etanolnih i vodeni ekstrakti liofilizovanih plodova su se izdvojili kao potentni prirodni proizvodi sa mogućnošću inhibicije prekomerne aktivnosti α -glukozidaze. L vodeni MAE ekstrakt je ostvario najbolji rezultat (2,22 mg ACAE/ml E), a zatim L vodeni MAC i L vodeni UAE ekstrakti (1,68 i 1,31 mg ACAE/ml E), bez statistički značajne razlike. Vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova su bolji inhibitori α -glukozidaze od vodenih ekstrakata svežih plodova zove.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u ekstraktima plodova zove i enzim inhibitorne aktivnosti

Na sposobnosti ekstrakata plodova zove da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima α -amilaze i α -glukozidaze osim primenjenih tehnika sušenja i ekstrakcije, kao i upotrebljenih ekstragenasa uticao je i fitohemijski sastav na osnovu koga su se izdvojila dominantna fenolna jedinjenja, zbog čega je urađena i regresiona analiza koja pokazuje najbolju korelaciju između sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja i inhibicije odabranih enzima, a rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima i enzim inhibitorne sposobnosti

	Faktor determinacije R ²				
	AChE	BChE	Tirozinaza	α -amilaza	α -glukozidaza
Ukupni fenoli	0,91	0,54	0,50	0,63	0,64
Ukupni flavonoidi	0,90	0,57	0,58	0,60	0,60
Ukupni monomerni antocijani	0,89	0,77	0,49	0,85	0,84
Ukupni tanini	0,90	0,74	0,62	0,78	0,79
Hlorogenska kiselina	0,90	0,61	0,32	0,80	0,77
Rutin	0,91	0,73	0,42	0,84	0,80
Ursolna kiselina	0,40	0,64	0,72	0,55	0,53
Kvercetin	0,61	0,53	0,67	0,39	0,43
Kvercetin-3-O- heksozid	0,94	0,69	0,55	0,75	0,75

Rezultati regresione analize pokazuju da je sadržaj ukupnih fenola u najboljoj korelaciji sa sposobnošću inhibicije AChE enzima, dok sa ostalim enzim inhibitornim aktivnostima dobro koreliraju. Kao i ukupni fenoli, tako i ukupni flavonoidi, najbolju korelaciju su ostvarili sa inhibicijom AChE enzima i dobru korelaciju sa ostalim enzim inhibitornim aktivnostima. Ukupni monomerni antocijani veoma dobro koreliraju sa sposobnošću inhibicije AChE enzima, kao i sa sposobnošću inhibicije enzima digestivnog sistema (α -amilaza i α -glukozidaza). Ukupni tanini su najbolju korelaciju ostvarili sa inhibicijom enzima AChE, a veoma dobro koreliraju sa inhibitornim potencijalom enzima α -amilaze, α -glukozidaze i BChE enzima.

Hlorogenska kiselina kao dominantna fenolna kiselina najbolje korelira sa inhibitornim kapacitetom AChE enzima, dok je sa inhibicijom α -amilaze ostvarila veoma dobru korelaciju. Dobru korelaciju hlorogenska kiselina je realizovala i sa inhibicijom enzima α -glukozidaze.

Rutin kao i hlorogenska kiselina, odličnu korelaciju ima sa inhibicijom AChE enzima i veoma dobro korelira sa inhibicijom enzima digestivnog trakta. Dobra korelacija je ostvarena i kada je reč o inhibiciji BChE enzima.

Ursolna kiselina dobro korelira sa inhibicijom enzima tirozinaze, dok je sa ostalim enzim inhibitornim aktivnostima ostvarena umerena korelacija.

Kvercetin umoreno korelira sa svim ispitanim enzim inhibitornim aktivnostima, dok je heksozid kvercetina ostvario odličnu korelaciju sa inhibicijom AChE enzima i vrlo dobru korelaciju sa inhibitornim kapacitetom enzima α -amilaze, α -glukozidaze, dok je umeren stepen korelacije ostvaren sa sposobnošću inhibicije enzima BChE i tirozinaze.

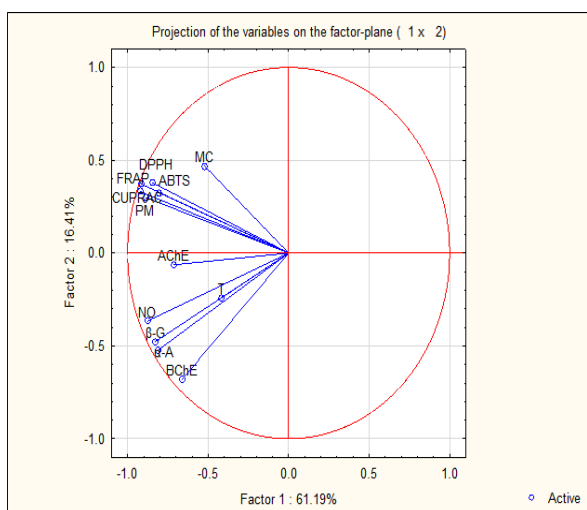
Korelacija fenolnih jedinjenja sa inhibicijom prekomerne aktivnosti enzima uslovljena je hemijskom strukturom fenolnih komponenata. Usled uticaja temperature koja se razvija u toku procesa izolovanja biološki potentnih molekula, može doći do modifikacije hemijske strukture, što rezultira slabijom korelacijom sa biološkom potencijalom ispitivanih uzoraka.

4.1.2.5. PCA analiza antioksidativnih i enzim inhibitornih testova i vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove

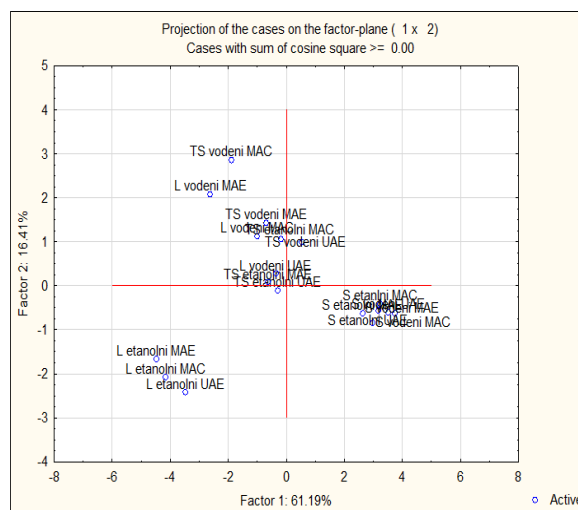
Primenom Analize glavnih komponenta (PCA analiza) na rezultate antioksidativnih i enzimskih *in vitro* testova za ispitivane ekstrakte plodova zove, konstruisan je grafik prikazan na Slici 4.2.

PCA analizom su utvrđene sličnosti i razlike između biološkog potencijala ekstrakata na osnovu ispoljene aktivnosti u antioksidativnim i enzimskim testovima. Prva i druga glavna komponenta (Faktor 1 i 2) objašnjavaju 61,19%, odnosno 16,14% ukupne varijanse, redom.

a)



b)



Slika 4.2. PCA analiza antioksidativnih, neuroprotektivnih, antitirozinaznog i antidijabetogenih testova i vodenih i etanolnih ekstrakata plodova zove

- grafički prikaz raspodele antioksidativnih testova i enzim inhibitornih testova;
- grafički prikaz raspodele ispitivanih ekstrakata.

Na prikazanom biplotu se može uočiti izdvajanje etanolnih ekstrakata liofilizovanih plodova (L etanolni UAE, L etanolni MAE, L etanolni MAC) što je u pozitivnoj korelaciji sa sposobnošću inhibicije analiziranih enzima i neutralizacije •NO radikala. Vodeni ekstrakti tradicionalno sušenih plodova su grupisani na središnjem delu grafika i doprineli su ostvarenom antioksidativnom potencijalu. Izdvajanje i posebno grupisanje ekstrakata svežih plodova zove na desnoj polovini grafika je u skladu sa dobijenim rezultatima, jer su ovi ekstrakti okarakterisani sa najnižom biološkom aktivnošću koju su postigli. Na osnovu sprovedene PCA analize može se zaključiti da su se etanolni ekstrakti liofilizovanih plodova zove pokazali kao najpotentniji ispitivani ekstrakti, jer u najvećoj meri utiču na sprečavanje razvoja neuroloških oboljenja i dijabetesa (inhibicija enzima AChE, BChE, α -amilaza i β -glukozidaza). Takođe, ovi ekstrakti deluju i kao veoma potentni agensi u procesu inhibicije •NO radikala.

4.2. Hemijski sastav ekstrakata cveta zove

Od istorijskih predanja, pa do naučnih dokaza biljna vrsta *S. nigra* je korišćena na različite načine kao fitopreparat zbog lekovitih svojstava koja poseduje. Prirodni potencijal i lekovito dejstvo ove biljne vrste ogleda se u upotrebi svih delova biljke o kojima se podaci mogu naći i u Farmakopejama. Za potrebe ove doktorskse disertacije dalji tok istraživanja usmeren je na ispitivanje cveta zove koji je osušen tradicionalnom tehnikom sušenja i u ovom slučaju iskorišćen za dobijanje ekstrakata primenom modernih i tradicionalnih tehnika ekstrakcije i njihovu analizu. Sadržaj suve materije u ekstraktima cveta zove prikazan je u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Sadržaj suve materije u vodenim i etanolnim ekstraktima cveta zove

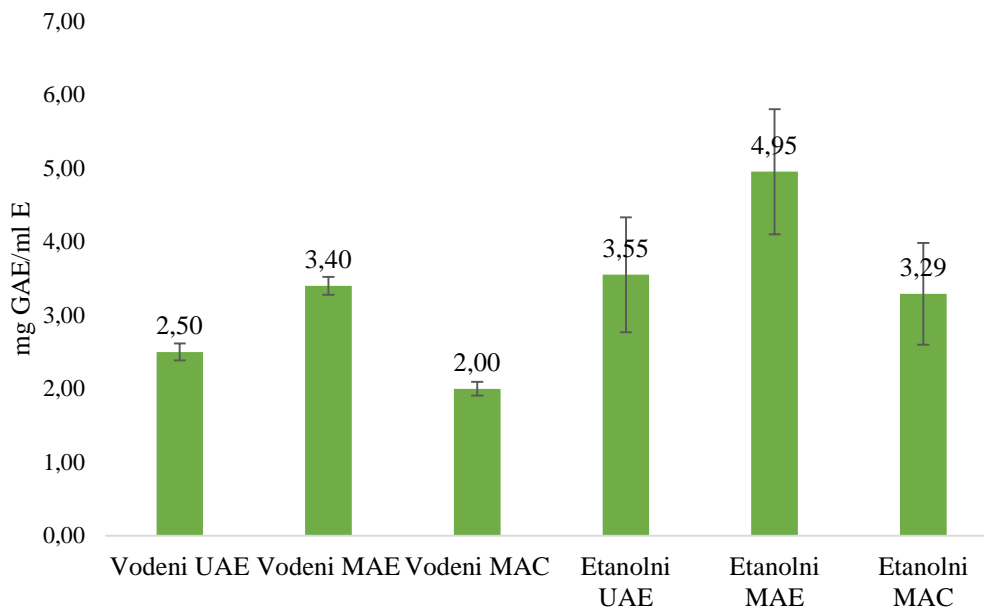
Ekstrakti	Suva materija (% , m/m)
Vodeni UAE	0,46±0,02 ^d
Vodeni MAE	0,54±0,01 ^c
Vodeni MAC	0,40±0,01 ^e
Etanolni UAE	1,13±0,03 ^b
Etanolni MAE	1,26±0,03 ^a
Etanolni MAC	1,08±0,02 ^b

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-e) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

Etanolni ekstrakti cveta zove su imali veći sadržaj suve materije u odnosu na vodene ekstrakte. Najveći sadržaj suve materije zapažen je kod etanolnog MAE ekstrakta (1,26%), dok je udeo suve materije u etanolnim UAE i MAC ekstraktima bio sličan (1,13 i 1,08%, redom), bez statistički značajne razlike. Kod vodenih ekstrakata, najveći sadržaj suve materije imali su ekstrakti dobijeni savremenim tehnikama ekstrakcije (vodeni MAE 0,54% i vodeni UAE 0,46%), dok je vodeni MAC ekstrakt okarakterisan najnižim sadržajem suve materije (0,40%).

4.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima cveta zove prikazan je na Histogramu 4.17 i u Prilogu 7.6, Tabela 17.

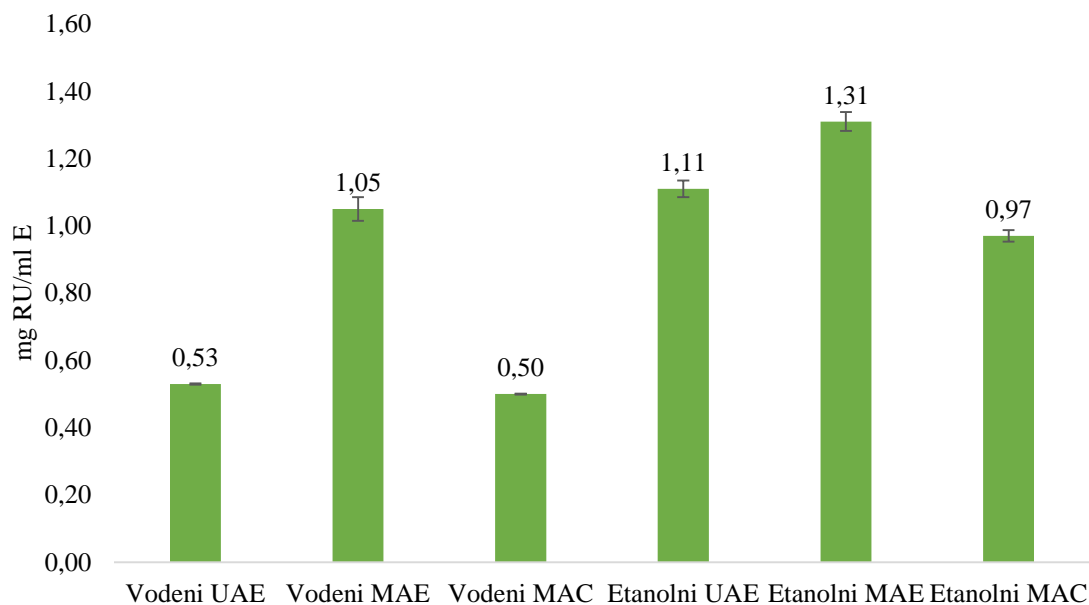


Histogram 4.17. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima cveta zove

Rezultati analize su pokazali da su ekstrakti cveta zove veoma bogati fenolnim molekulima. Etanolni ekstrakti su bolji izvor ukupnih fenola od vodenih ekstrakata. Najveći sadržaj ukupnih fenola zabeležen je u etanolnom ekstraktu koji su dobijen MAE ekstrakcionom tehnikom (4,95 GAE/ml E), dok je sadržaj ukupnih fenola niži u etanolnim ekstraktima koji su dobijeni UAE i MAC ekstrakcijama (3,55 i 3,29 mg GAE/ml E, redom), između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika.

Najveće prisustvo ukupnih fenola u vodenim ekstraktima zapaženo je takođe u ekstraktu koji je dobijen MAE ekstrakcionom tehnikom (3,40 mg GAE/ml E), dok su niže vrednosti ukupnih fenola ostvarene u ekstraktima za čije dobijanje su primenjene UAE i MAC ekstrakcione tehnike (2,50 i 2,00 mg GAE/ml E, redom). Dobijeni rezultati ukazuju na razliku u sadržaju sekundarnih metabolita na osnovu primenjenih tehnika izolovanja bioaktivnih jedinjenja iz biljne sirovine, pa se jasno uočava da je MAE ekstrakciona tehnika u ovom slučaju bila najbolji izbor prilikom izdvajanja ukupnih fenolnih jedinjenja iz cveta biljne vrste *S. nigra*, a zatim UAE ekstrakcija, koja je pored MAE ekstrakcije predstavlja pogodan način za izolovanje bioaktivnih komponeneta, dok je MAC ekstrakcija očekivano imala najniži rezultat u sadržaju ukupnih fenola.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima cveta zove prikazan je na Histogramu 4.18 i u Prilogu 7.6, Tabela 18.



Histogram 4.18. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima cveta zove

Sadržaj ukupnih flavonoida i u vodenim i u etanolnim ekstraktima cveta zove prati isti trend kao i kod sadržaja ukupnih fenola. Ukupni flavonoidi su u najvećoj koncentraciji zastupljeni u etanolnom MAE ekstraktu (1,31 mg RU/ml E), dok su etanolni UAE i MAC ekstrakti imali niži sadržaj ukupnih flavonoida (1,11 i 0,97 mg RU/ml E).

Kada je reč o vodenim ekstraktima, vodeni MAE ekstrakt je najbolji izvor ukupnih flavonoida, a zabeležena koncentracija je 1,05 mg RU/ml E, dok su se vodeni UAE i MAC ekstrakti odlikovali nešto nižim sadržajem ove grupe sekundarnih metabolita (0,53 i 0,50 mg RU/ml E, redom), koji se statistički značajno razlikuju.

MAE ekstrakciona tehnika se i u ovom slučaju istakla kao najbolji način izolovanja ukupnih flavonoida iz cveta zove, dok su niže vrednosti izdvojenih aktivnih principa zapažene primenom UAE i MAC ekstrakcije.

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja nije u potpunosti okarakterisao kvalitativni i kvantitativni sadržaj fenolnih komponenti u ispitivanim ekstraktima, jer primenjena metoda nije u potpunosti selektivna, pa u toku izvođenja analize mogu biti uključene i nefenolne komponente, koje svojim prisustvom utiču na krajnje rezultate analize (Sakakibara i sar., 2003). U cilju utvrđivanja tačnih razlika u sadržaju polifenolnih komponenata između dobijenih ekstrakta, dalja analiza je obuhvatala primenu LC-MS/MS metode za određivanje polifenolnog profila.

4.2.2. Polifenolni profil ekstrakata cveta

Ispitivanje fitohemijskog sastava ekstrakata cveta zove obuhvatalo je analizu 47 komponenata. Sadržaj identifikovanih polifenolnih jedinjenja prikazan je u Tabeli 4.7.

LC-MS/MS analizom ekstrakata cveta biljne vrste *S. nigra* utvrđeno je prisustvo 23 fenolna jedinjenja, od kojih su hlorogenska kiselina, protokatehinska kiselina, rutin, kvercetin-3-*O*-heksozid, naringenin i ursolna kiselina detektovani u najvećim koncentracijama.

Tabela 4.7. Fitohemijski skrining ekstrakata cveta biljne vrste *S. nigra*

Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja (µg/ml E)						
Fenolna jedinjenja	Ekstrakti					
	Vodeni UAE	Vodeni MAE	Vodeni MAC	Etanolni UAE	Etanolni MAE	Etanolni MAC
<i>p</i> -OH benzoeva kis.	0,64 ± 0,004 ^b	0,16 ± 0,001 ^c	2,00 ± 0,011 ^a	0,09 ± 0,001 ^c	0,08 ± 0,000 ^c	0,10 ± 0,001 ^c
Protokatehinska kis.	1,16 ± 0,010 ^b	0,84 ± 0,006 ^c	2,35 ± 0,018 ^a	0,52 ± 0,004 ^d	0,69 ± 0,005 ^d	0,65 ± 0,005 ^d
Gentizinska kis.	0,07 ± 0,001 ^c	0,11 ± 0,001 ^a	0,06 ± 0,000 ^f	0,07 ± 0,000 ^c	0,09 ± 0,001 ^d	0,10 ± 0,001 ^b
<i>p</i> -Kumarinska kis.	4,65 ± 0,036 ^a	0,44 ± 0,004 ^b	0,27 ± 0,002 ^b	0,27 ± 0,003 ^b	0,41 ± 0,002 ^b	0,33 ± 0,003 ^b
Vanilinska kis.	0,87 ± 0,010 ^a	<LoD	0,97 ± 0,009 ^a	<LoD	<LoD	<LoD
Galna kis.	0,09 ± 0,001 ^d	0,22 ± 0,002 ^c	0,95 ± 0,008 ^a	0,080 ± 0,001 ^d	0,35 ± 0,003 ^b	0,05 ± 0,000 ^d
Kafena kis.	1,37 ± 0,019 ^c	1,98 ± 0,026 ^b	2,91 ± 0,022 ^a	0,79 ± 0,002 ^d	1,53 ± 0,008 ^c	1,60 ± 0,013 ^c
Ferulna kis.	1,43 ± 0,002 ^a	0,13 ± 0,001 ^c	<LoD	0,01 ± 0,001 ^d	0,10 ± 0,001 ^e	0,13 ± 0,001 ^b
Hinska kis.	64,85 ± 0,721 ^b	49,92 ± 0,404 ^d	89,82 ± 0,840 ^a	37,07 ± 0,122 ^e	49,57 ± 0,674 ^{d,e}	57,60 ± 0,561 ^c
Elagna kis.	0,57 ± 0,001 ^f	2,27 ± 0,004 ^d	0,99 ± 0,002 ^e	2,85 ± 0,006 ^a	3,03 ± 0,005 ^c	2,83 ± 0,005 ^b
Hlorogenska kis.	25,49 ± 0,142 ^d	474,88 ± 2,248 ^b	173,23 ± 0,810 ^c	545,67 ± 2,762 ^a	669,97 ± 2,825 ^a	560,19 ± 2,730 ^a
Ursolna kis.	<LoD	18,52 ± 0,000 ^d	<LoD	235,14 ± 0,000 ^b	335,99 ± 0,000 ^a	215,97 ± 0,000 ^c
Eskuletin	0,03 ± 0,000 ^e	0,05 ± 0,000 ^d	0,08 ± 0,000 ^a	0,05 ± 0,001 ^c	0,08 ± 0,000 ^b	0,08 ± 0,000 ^a
Naringenin	2,26 ± 0,014 ^d	17,88 ± 0,019 ^c	3,75 ± 0,025 ^d	20,35 ± 0,145 ^c	52,39 ± 0,447 ^a	27,19 ± 0,199 ^b
Katehin	<LoD	0,31 ± 0,003 ^c	<LoD	0,50 ± 0,005 ^b	1,22 ± 0,010 ^a	0,38 ± 0,004 ^c
Epikatehin	<LoD	0,20 ± 0,002 ^d	<LoD	0,68 ± 0,007 ^b	1,40 ± 0,012 ^a	0,34 ± 0,003 ^c
Kvercetin	0,92 ± 0,010 ^{b,c}	0,36 ± 0,004 ^d	5,99 ± 0,056 ^a	0,66 ± 0,007 ^{c,d}	0,90 ± 0,008 ^{b,c,d}	1,27 ± 0,012 ^b
Izoramnetin	1,27 ± 0,008 ^b	0,07 ± 0,000 ^e	4,62 ± 0,026 ^a	0,33 ± 0,002 ^{d,e}	0,73 ± 0,004 ^c	0,59 ± 0,003 ^{c,d}
Kempferol 3- <i>O</i> -glukozid	0,487 ± 0,043 ^b	13,64 ± 0,047 ^a	3,03 ± 0,020 ^c	14,45 ± 0,108 ^a	15,99 ± 0,171 ^a	14,36 ± 0,189 ^a
Kvercetin 3- <i>O</i> -heksozid	4,37 ± 0,030 ^c	42,98 ± 0,244 ^a	15,40 ± 0,086 ^b	42,78 ± 0,260 ^a	51,33 ± 0,260 ^a	44,04 ± 0,258 ^a
Rutin	14,49 ± 0,048 ^e	650,91 ± 1,849 ^d	23,41 ± 0,066 ^e	902,93 ± 2,742 ^b	910,49 ± 2,303 ^a	831,67 ± 2,432 ^c
Morin	<LoD	<LoD	1,14 ± 0,001 ^a	0,26 ± 0,000 ^c	0,29 ± 0,000 ^c	0,33 ± 0,000 ^b
Kempferol	0,36 ± 0,003 ^b	0,05 ± 0,00 ^e	0,77 ± 0,001 ^a	0,24 ± 0,002 ^d	0,41 ± 0,002 ^c	0,40 ± 0,002 ^b

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-e) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

<LoD (limit detekcije).

Hlorogenska kiselina je dominantna u etanolnom MAE ekstraktu (669,97 µg/ml E), dok su niže koncentracije hlorogenske kiseline detektovane u etanolnom MAC (560,19 µg/ml E) i etanolnom UAE (545,67 µg/ml E) ekstraktu. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u sadržaju hlorogenske kiseline između etanolnih ekstrakata cveta. Prisustvo hlorogenske kiseline u vodenim ekstraktima cveta kretalo se u rasponu koncentracija 25,49-474,88 µg/ml E. U slučaju vodenih ekstrakata cveta zove izolovanje hlorogenske kiseline najbolje je ostvareno MAE ekstrakcionom tehnikom (474,88 µg/ml E). Iako tradicionalna tehnika izdvajanja biomolekula iz biljnih sirovina, MAC je ostvarila bolji rezultat u procesu izolovanja hlorogenske kiseline (173,23 µg/ml E) od UAE ekstrakcije (25,49 µg/ml E). Veće prisustvo hlorogenske kiseline u MAC ekstraktu, u odnosu na UAE ekstrakt pretpostavlja se da je posledica delovanja ultrazvuka i fenomena kavitacije, koji mogu biti uzročnici degradacije fenolnih jedinjenja (Belwal i sar., 2018).

Protokatehinska kiselina je zastupljena u ekstraktima cveta zove, ali u mnogo nižim koncentracijama u odnosu na hlorogensku kiselinu. Koncentracija protokatehinske kiseline u vodenim ekstraktima cveta je veća u odnosu na njeno prisustvo u etanolnim ekstraktima i sadržaj protokatehinske kiseline se kretao u rasponu koncentracija 0,84-2,35 µg/ml E, dok je kod etanolnih ekstrakata detektovan niži sadržaj ove fenolne kiseline, zabeleženih vrednosti 0,52-0,69 µg/ml E.

Elagna kiselina se karakteriše većim prisustvom u etanolnim ekstraktima cveta biljne vrste *S. nigra*, a najveći sadržaj ove fenolne kiseline utvrđen je u etanolnom MAE ekstraktu (3,03 µg/ml E).

Derivati cimetine kiseline: *p*-kumarinska kiselina, kafena kiselina i ferulna kiselina su više zastupljene u vodenim ekstraktima cveta zove, *p*-kumarinska kiselina je detektovana u koncentraciji 4,65 µg/ml E u vodenom UAE ekstraktu, dok su kafena kiselina i ferulna kiselina zapažene u nižim koncentracijama (1,37 i 1,43 µg/ml E, redom). Na osnovu podataka iz literature i studija koje su izveli Barros i sar. (2011) i Christensen, Kaack i Fretté (2008) utvrđeno je da je hlorogenska kiselina dominantna fenolna kiselina u ekstraktima cveta zove, pa su rezultati istraživanja dobijeni u okviru ove doktorske disertacije u skladu sa dosadašnjim studijama. Sadržaj hlorogenske kiseline u analiziranim ekstraktima je niži u odnosu na rezultate koje je objavila grupa pomenutih istraživača, što se može objasniti uticajem geografskog područja na kome je biljka rasla, sastava zemljišta, genotipa kao i zrelosti biljke na sadržaj fenolnih kiselina (Orhan i sar., 2007).

Pored fenolnih kiselina u ekstraktima cveta zove zapažena je i flavonoidna grupa jedinjenja. Dominantan flavonoid u ekstraktima cveta zove je rutin, a najveći sadržaj ovog biomolekula uočen je u etanolnom MAE ekstraktu (910,49 µg/ml E), zatim u UAE (902,93 µg/ml E) i MAC (831,67 µg/ml E) ekstraktima. Vodeni ekstrakti takođe sadrže rutin, ali u nižim koncentracijama u odnosu na etanolne ekstrakte, pa je u vodenom MAE ekstraktu prisustvo rutina detektovano u koncentraciji 650,91 µg/ml E, dok su vodeni UAE i vodeni MAC ekstrakti imali manji sadržaj rutina (14,49 i 23,41 µg/ml E, redom).

Prisustvo kvercetin-3-*O*-heksozida u ekstraktima cveta zove je od izuzetnog značaja zbog njegovog biopotencijala, jer ispoljava antioksidativnu, citotoksičnu i antimikrobnu aktivnost (Razavi i sar., 2009). Etanolni ekstrakti cveta zove su bogat izvor kvercetin-3-*O*-heksozida, a utvrđene koncentracije su 51,33, 44,04 i 42,78 $\mu\text{g/ml}$ E za MAE, MAC i UAE ekstrakt, redom. Statističkom analizom dobijenih rezultata pokazano je da između etanolnih ekstrakata ne postoji statistički značajna razlika u sadržaju heksozida kvercetina. Kada se pogleda sadržaj kvercetin-3-*O*-heksozida u vodenim ekstraktima zapaža se da je vodeni MAE ekstrakt najbogatiji izvor ovog biomolekula (42,98 $\mu\text{g/ml}$ E). Fitohemijskim skriningom vodenih MAC i UAE ekstrakata utvrđeno je da je MAC ekstrakt bogatiji izvor kvercetin-3-*O*-heksozida od vodenog UAE ekstrakta (15,40 i 4,37 $\mu\text{g/ml}$ E, redom).

Naringenin je flavonoid koji je rastvorljiv uglavnom u organskim rastvaračima, a manje je rastvorljiv u vodi, čime se i objašnjava njegova dominantnost u etanolnim ekstraktima cveta zove. Biopotencijal naringenina se ogleda u sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije, uklanjanju slobodnih radikala, modulaciji aktivnosti imunog sistema i pospešivanju metabolizma ugljenih hidrata što je od velikog značaja za pravilno funkcionisanje organizma (Zeng i sar., 2020). Dostupnost naringenina u etanolnim ekstraktima cveta zove u koncentracijama 20,35-52,39 $\mu\text{g/ml}$ E daje važnost biljnoj vrsti *S. nigra* na daljoj upotrebi i eksploataciji njenog prirodnog potencijala. Vodeni ekstrakti cveta zove u svom fitohemijskom profilu poseduju naringenin, ali je njegov sadržaj manji i kreće se u rasponu koncentracija 2,26-17,88 $\mu\text{g/ml}$ E.

Razlika između etanolnih i vodenih ekstrakata cveta zove zasniva se i na sadržaju ursolne kiseline. Ursolna kiselina je identifikovana u etanolnim ekstraktima, a najviše je zastupljena u etanolnom MAE ekstraktu, u koncentraciji 335,99 $\mu\text{g/ml}$ E. Etanolni UAE i MAC ekstrakti su veoma dobri izvori ursolne kiseline, s tim da je ursolna kiselina u ovim ekstraktima detektovana takođe u veoma visokim koncentracijama 235,14 i 215,97 $\mu\text{g/ml}$ E, redom. Međutim, LC-MS/MS analizom je dokazano prisustvo ursolne kiseline i u vodenom MAE ekstraktu, ali u mnogo nižoj koncentraciji u odnosu na etanolne ekstrakate (18,52 $\mu\text{g/ml}$ E). Pojava ursolne kiseline u vodenom MAE ekstraktu može se objasniti snagom mikrotalasnog zračenja. Povećana snaga mikrotalasnog zračenja uzrokuje lokalno zagrevanje uzorka, što dovodi do narušavanja konzistencije zida biljnih ćelija i olakšane difuzije unutarćelijskog sadržaja (Chan i sar., 2011). Pretpostavlja se da snaga ultrazvuka kod UAE ekstrakcije nije bila dovoljno jaka da obezbedi izolovanje ursolne kiseline i u malim količinama, dok MAC kao vid tradicionalnog načina izolovanja bioaktivnih molekula, nema jake mehanizme kojima bi bilo potpomognuto izdvajanje ove terpenske kiseline. Važno je istaći da su različite naučne studije izvele *in vitro* i *in vivo* istraživanja koja su okarakterisala ursolnu kiselinu kao hemoprotektivni agens (Iqbal i sar., 2018), pa je njeno prisustvo u ekstraktima biljne vrste *S. nigra* od izuzetnog značaja.

Efikasnost ekstrakcionih tehnika se ogleda u sposobnosti izolovanja pojedinih fenolnih jedinjenja. Vodeni MAE ekstrakt sadrži katehin i epikatehin, dok njihovo prisustvo nije zabeleženo u vodenim UAE i MAC ekstraktima. Za razliku od katehina i epikatehina, prisustvo vanilinske kiseline je zapaženo u vodenim UAE i MAC ekstraktima, dok u vodenom MAE ekstraktu nije uočeno prisustvo ove fenolne kiseline. Pretpostavlja se da za ekstrakovanje vanilinske kiseline nije pogodna visoka temperatura, kao i snaga mikrotalasa, zbog čega je moguća degradacija vanilinske kiseline u toku izvođenja MAE ekstrakcije.

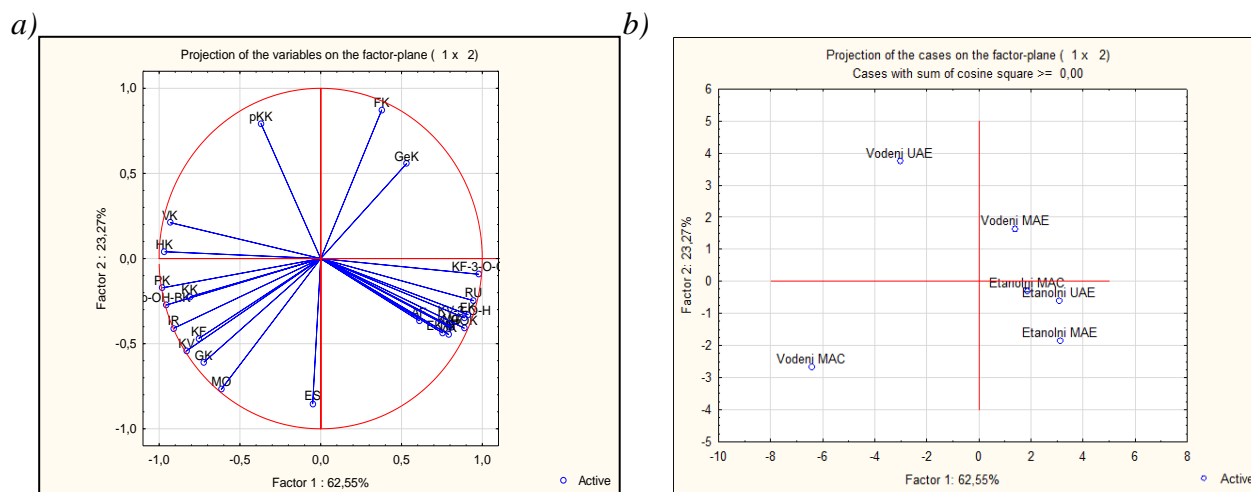
Rezultat ovog istraživanja naglašava razliku u efikasnosti između primenjenih ekstrakcionih tehnika i upotrebljenih rastvarača za izdvajanje određene grupe fenolnih jedinjenja.

Polifenolni profil biljne vrste *S. nigra* u varijaciji rastvarača i tradicionalnih i savremenih tehnika ekstrakcije u cilju efikasnijeg izolovanja fenolnih jedinjenja bio je predmet malobrojnih istraživanja. Studija koju su sproveli Mikulic-Petkovsek i sar. (2012) zasniva se na kvantifikaciji fenolnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove. Poređenjem dobijenih rezultata utvrđeno je da su dominantna jedinjenja hlorogenska kiselina i rutin, dok prisustvo naringenina i ursolne kiseline nije identifikovano. Sadržaj hlorogenske kiseline i rutina bio je niži u studiji koju je grupa istraživača sprovela, što je najverovatnije posledica različitog načina izolovanja fenolnih jedinjenja, upotrebe različitih ekstragenasa, ali i faktora kao što su temperatura, vlaga i sastav zemljišta na kome je biljka rasla (Nantongo i sar., 2018). Na prisustvo terpenskih jedinjenja u biljnim vrstama najveći uticaj imaju ekološki faktori, pa se procenjuje da su različiti ekološki faktori uslovlili odsustvo ursolne kiseline u istraživanju pomenute grupe istraživača.

Dobijeni rezultati fitohemijskog skrininga mogu biti od velike vrednosti u proceni lekovitih svojstava roda *Sambucus* i njihovoj daljoj eksploataciji kao veoma dobrog izvora biološki vrednih molekula. Prisustvo aktivnih principa u ekstraktima cveta zove ukazuje na njihov biološki potencijal i potrebu za daljim istraživanjima koja se baziraju na utvrđivanju bioloških i funkcionalnih karakteristika.

4.2.2.1. PCA analiza polifenolnog profila vodenih i etanolnih ekstrakata cveta zove

Da bi se dobio opšti zaključak da li se određene fenolne komponente mogu okarakterisati za naglašavanje razlike između vodenih i etanolnih ekstrakata cveta zove, izvedena je PCA analiza (Slika 4.3).



Slika 4.3. PCA analiza glavnih komponenti fenolnih kiselina i flavonoida u ekstraktima cveta biljne vrste *S. nigra*

- grafički prikaz raspodele fenolnih jedinjenja,
- grafički prikaz raspodele ispitivanih ekstrakata.

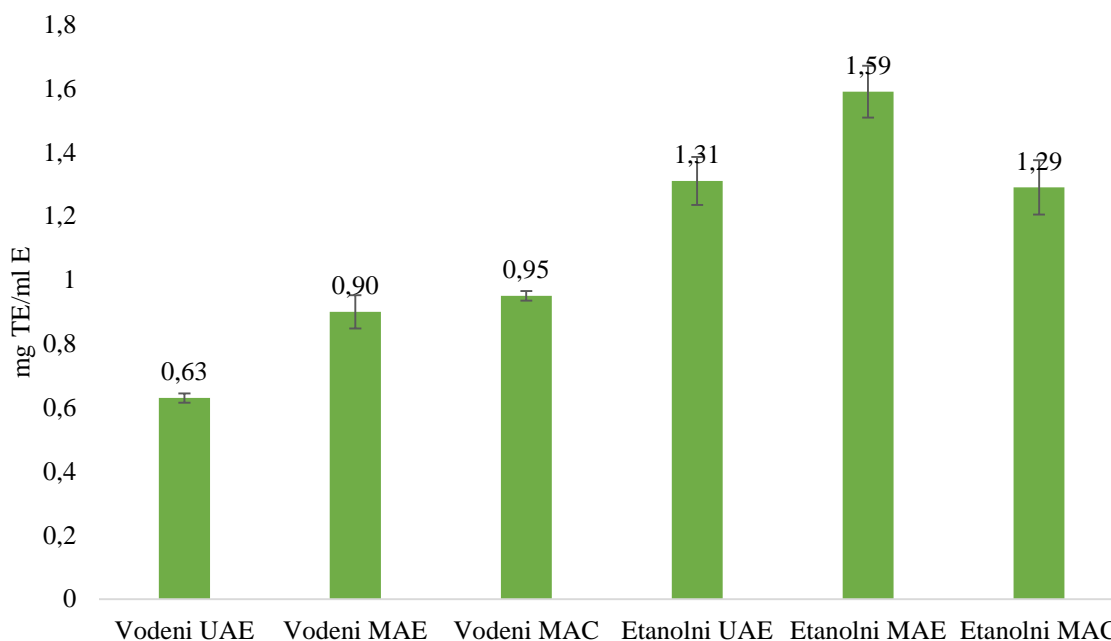
Prve dve komponente (F1 i F2) činile su 85,82% objašnjavane varijanse ako se uzme u obzir sadržaj određenih fenolnih kiselina i flavonoida. Etanolni ekstrakti su se grupisali u istom delu dijagrama (donja desna strana), što je u skladu sa izdvojenim sadržajem kvercetin-3-*O*-heksozida, rutina i kempferol-3-*O*-glukozida, koji bi mogli potencijalno da se definišu kao faktori diferencijacije, jer su kao grupa flavonoida više zastupljeni u etanolnim ekstraktima cveta zove. Ova grupacija podrazumeva razdvajanje na osnovu rastvarača koji su upotrebljeni za ekstrakciju. Udaljenost vodenih od etanolnih ekstrakata na grafiku je posledica različitog sadržaja fenolnih kiselina. Položaj vodenog MAE ekstrakta uslovljen je prisustvom ferulne i gentizinske kiseline, jer su u sličnoj koncentraciji detektovane u vodenom MAE ekstraktu. *p*-kumarinska kiselina je dominantna fenolna kiselina u vodenom UAE ekstraktu, zbog čega se ovaj ekstrakt izdvaja u gornjem levom delu dijagrama. Prisustvo *p*-hidroksibenzoeve kiseline, protokatehinske kiseline, galne kiseline i kafene kiseline u najvećoj koncentraciji u vodenom MAC ekstraktu, odredile su položaj ovog ekstrakta, koji je lokalizovan u donjem levom delu dijagrama. Ovakav način diferencijacije na osnovu sadržaja fenolnih kiselina pokazuje da odabir ekstrakcione tehnike za izolaciju u velikoj meri određuje njihovo prisustvo u vodenim ekstraktima zove.

4.2.3. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove

4.2.3.1. Antioksidativna aktivnost

Sposobnost neutralizacije slobodnog DPPH• radikala

Ekstrakti cveta zove kao bogati izvori sekundarnih metabolita analizirani su u sposobnosti neutralizacije slobodnog DPPH• radikala, a rezultati istraživanja su prikazani na Histogramu 4.19 i u Prilogu 7.7, Tabela 19.



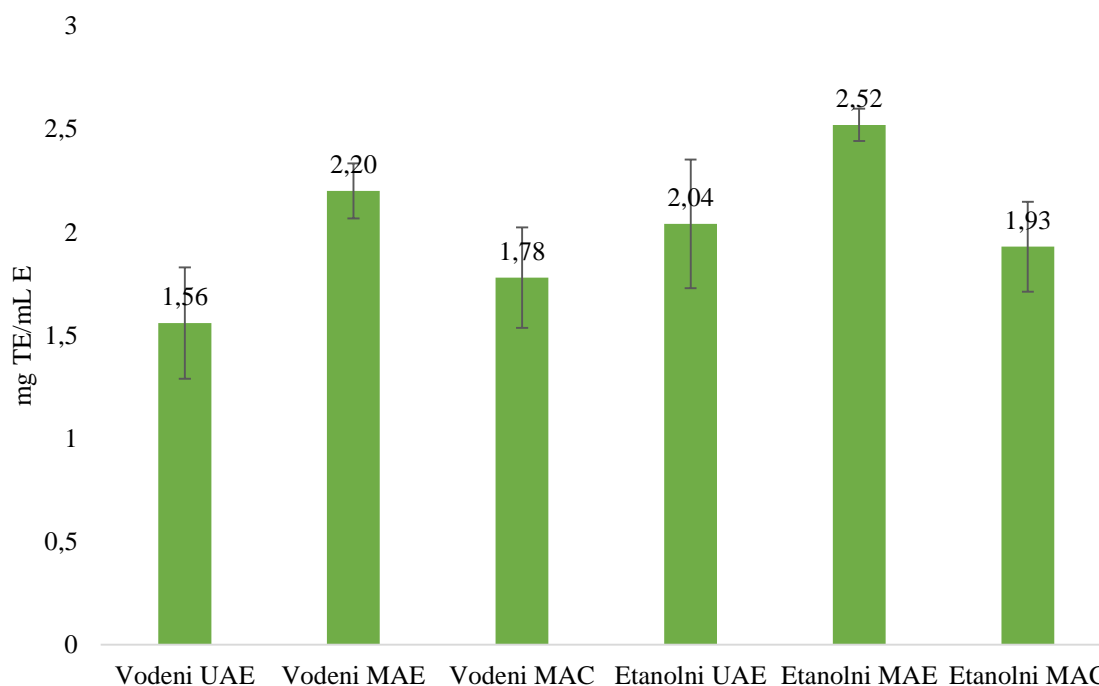
Histogram 4.19. Sposobnost ekstrakata cveta zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala

Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu neutralizacije DPPH• radikala je od izuzetnog značaja za utvrđivanje antioksidativnog potencijala biljne vrste *Sambucus*. Upotreba različitih rastvarača i primenjenih tehnika izolovanja aktivnih principa iz biljaka je uticala na konačan rezultat sprovedenog istraživanja. Etanolni ekstrakti su pokazali da imaju bolju sposobnost da doniraju elektron DPPH• slobodnom radikal, prevodeći ga u neradikalni oblik od vodenih ekstrakata cveta zove. Etanolni ekstrakti za čije dobijanje su primenjene savremene ekstrakcione tehnike su ostvarili najbolji antioksidativni kapacitet. Etanolni MAE ekstrakt je imao najveću sposobnost da donira elektron slobodnom DPPH• radikal (1,59 mg TE/ml E), zatim etanolni UAE ekstrakt (1,31 mg TE/ml E), čiji se kapacitet na osnovu statističke obrade dobijenih rezultata nije statistički značajno razlikovao od kapaciteta koji je ostvario etanolni MAC ekstrakt (1,29 mg TE/ml E). Kod vodenih ekstrakata cveta zove uočava se da su vodeni MAE i vodeni MAC ekstrakti imali sličnu sposobnost u procesu neutralizacije DPPH• radikala (0,90 i 0,95 mg TE/ml E, redom). Ostvarene

vrednosti ovih ekstrakata se statistički nisu značajno razlikovale, dok je ekstrakt dobijen UAE ekstrakcijom rezultovao nižim antioksidativnim potencijalom (0,63 mg TE/ml E).

Sposobnost neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala

Ekstrakti cveta zove su podvrgnuti proceni neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala, a rezultati istraživanja su prikazani na Histogramu 4.20 i u Prilogu 7.7, Tabela 20.



Histogram 4.20. Sposobnost ekstrakata cveta zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala

Na osnovu analize antioksidativnog potencijala ekstrakata cveta zove primenom ABTS testa, uočava se da su etanolni ekstrakti nešto bolji potencijalni antioksidativni agensi u procesu neutralizacije ABTS^{•+} radikala od vodenih ekstrakata cveta zove. Etanolni MAE ekstrakt je imao statistički najbolji antioksidativni potencijal (2,52 mg TE/ml E), zatim etanolni UAE i etanolni MAC ekstrakti (2,04 i 1,93 mg TE/ml E, redom), u čijoj aktivnosti nije uočena statistički značajna razlika. Kod vodenih ekstrakata takođe se vodeni MAE ekstrakt izdvojio kao najpotentniji donor elektrona ABTS^{•+} radikal (2,20 mg TE/ml E), dok je vodeni MAC ekstrakt bolji antioksidativni agens (1,78 mg TE/ml E) od vodenog UAE ekstrakta (1,56 mg TE/ml E). Sličan zaključak izveden je i za iste ekstrakte u pogledu neutralizacije DPPH[•] radikala. U tom pogledu naročito potentnim se mogu smatrati etanolni MAE ekstrakt cveta zove koji pokazuje izuzetno veliku sposobnost neutralizacije kako DPPH[•] radikala, tako i sposobnost neutralizacije ABTS^{•+} radikala.

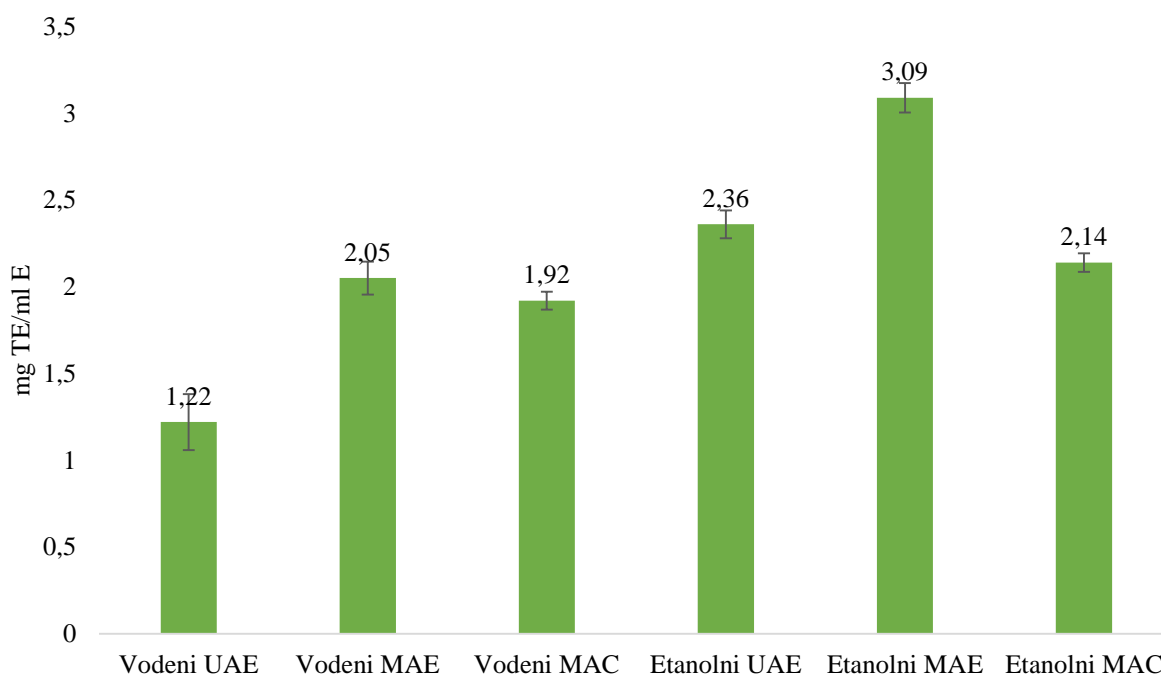
Na sposobnost neutralizacije slobodnih radikala veliki uticaj je imao sadržaj polifenolnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima. Pošto je fitohemijskim skriningom u vodenom i etanolnom

MAE ekstraktu detektovana najveća koncentracija najzastupljenijih fenolnih jedinjenja, može se zaključiti da su fenolne komponente prisutne u ispitivanim ekstraktima u najvećoj meri doprinele ovakvom rezultatu.

Redukciona sposobnost

Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona

Procena redukcionne sposobnosti ekstrakata cveta zove utvrđena je primenom FRAP testa, a rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.21 i u Prilogu 7.7, Tabela 21.



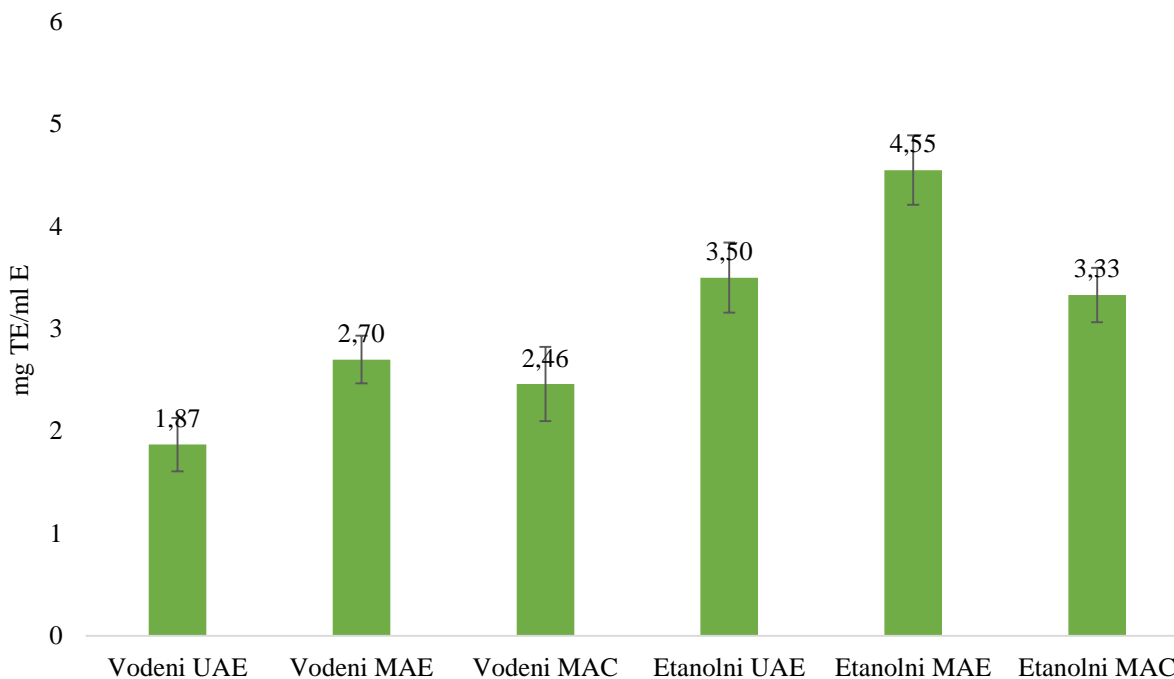
Histogram 4.21. Sposobnost ekstrakata cveta zove u redukciji Fe^{3+} jona

Redukcioni potencijal ekstrakata cveta biljne vrste *S. nigra* je potvrdio dominantnost MAE ekstrakcione tehnike, u odnosu na ostale primenjene tehnike izolovanja sekundarnih metabolita. Etanolni i vodeni MAE ekstrakti su ostvarili najbolji redukcioni potencijal primenom FRAP testa. Etanolni MAE ekstrakt je jedan i po put imao jači redukcioni kapacitet (3,09 mg TE/ml E) od vodenog MAE ekstrakta (2,05 mg TE/ml E). Takođe, etanolni UAE i MAC ekstrakti su ispoljili jaču redukcionu sposobnost (2,36 i 2,14 mg TE/ml E, redom) u odnosu na vodene UAE i MAC ekstrakte (1,22 i 1,92 mg TE/ml E, redom).

Vodeni MAC ekstrakt je ostvario bolji redukcioni potencijal od vodenog UAE ekstrakta i statistički je značajno aktivniji, iako je UAE ekstrakt dobijen savremenom tehnikom ekstrakcije.

Sposobnost redukcije Cu^{2+} jona

Procena redukcionog potencijala ekstrakata cveta zove utvrđena je i primenom CUPRAC testa, a rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.22 i u Prilogu 7.7, Tabela 22.

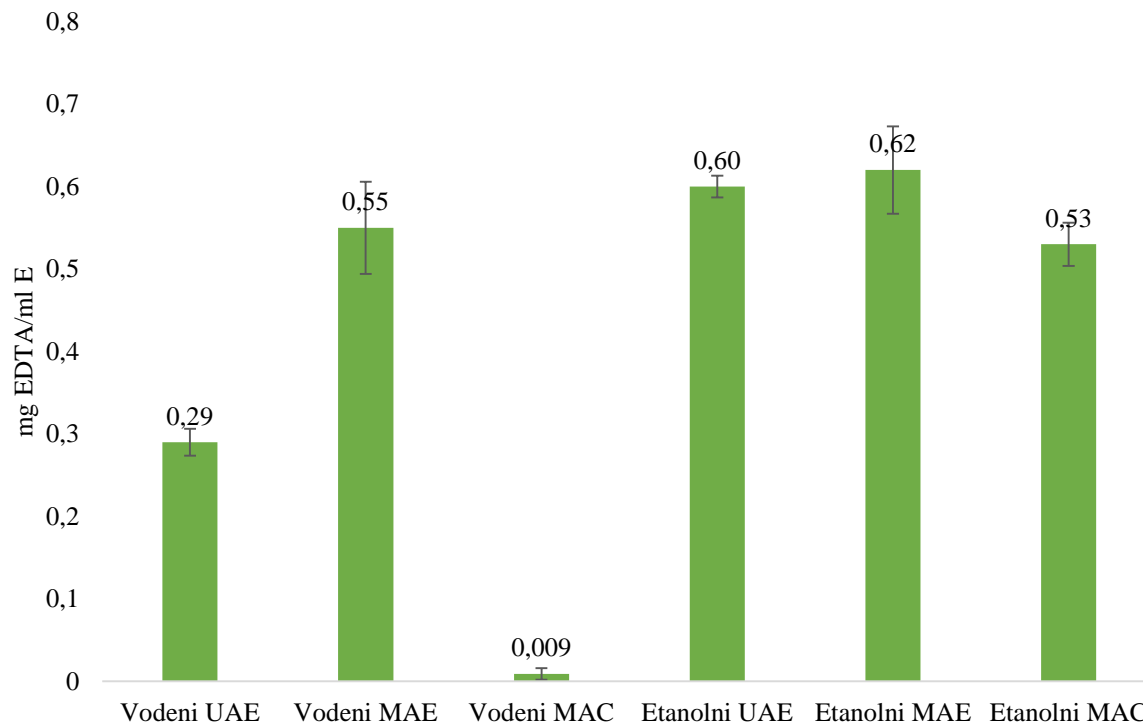


Histogram 4.22. Sposobnost ekstrakata cveta zove u redukciji Cu^{2+} jona

Rezultati dobijeni ispitivanjem redukcionog potencijala ekstrakata cveta zove primenom CUPRAC testa, prate trend redukcionog potencijala ekstrakata cveta zove koji je ostvaren primenom FRAP testa. Stoga, etanolni ekstrakti su se i u ovom slučaju pokazali kao bolji redukciono-agensi od vodenih ekstrakata cveta zove. Etanolni MAE ekstrakt je najpotentniji redukciono-agens (4,55 mg TE/ml E), dok su etanolni UAE i MAC ekstrakti ispoljili veoma dobar redukciono-potencijal koji se statistički nije značajno razlikovao (3,50 i 3,33 mg TE/ml E, redom). Rezultati redukcionog potencijala ispitivanih vodenih ekstrakata su niži, ali je i kod vodenih ekstrakata vodeni MAE ekstrakt najbolji redukciono-agens. U cilju naglašavanja ostvarene biološke aktivnosti, može se uočiti da je i tradicionalan način pripreme ekstrakata i izolovanja sekundarnih metabolita iz biljnog materijala u ovom slučaju ostvario veoma dobar rezultat, jer je utvrđeno da je vodeni MAC ekstrakt efikasniji redukciono-agens (2,46 mg TE/ml E) od vodenog UAE ekstrakta (1,87 mg TE/ml E), koji je dobijen savremenom ekstrakcionom tehnikom.

Heliranje jona metala

Evaluacija antioksidativne aktivnosti ekstrakata cveta zove procenjena je i testom heliranja jona metala. Rezultati analize prikazani su na Histogramu 4.23 i u Prilogu 7.7, Tabela 23.

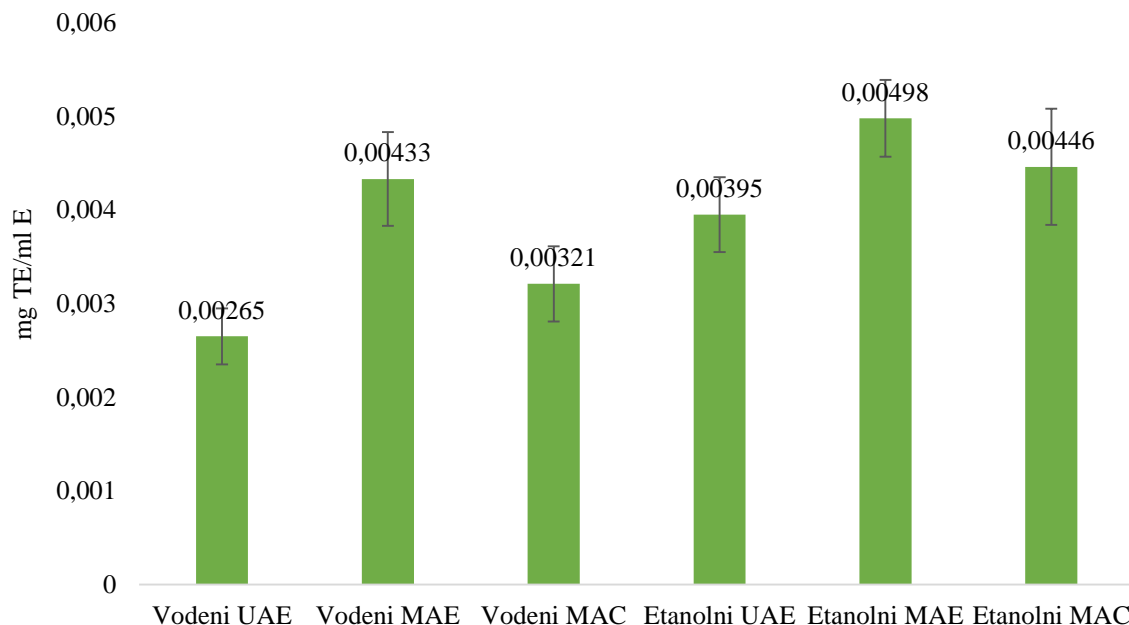


Histogram 4.23. Sposobnost ekstrakta cveta zove u heliranju jona metala

U toku metaboličkih procesa generišu se slobodni radikali koji u reakcijama sa jonima metala dovode do oštećenja ćelija. Određivanje heliranja jona metala ogleda se u sposobnosti ispitivanih ekstrakata da spreče promene na nivou ćelija i da deluju kao antioksidativni agensi. Svi ispitivani ekstrakti cveta zove su pokazali sposobnost heliranja jona metala. Posebno se izdvajaju ekstrakti koji su dobijeni savremenim tehnikama izolovanja prirodnih proizvoda. Etanolni MAE i UAE ekstrakti su pokazali skoro sličnu sposobnost heliranja jona metala (0,62 i 0,60 mg EDTA/ml E), bez statistički značajne razlike, dok je etanolni MAC ekstrakt postigao nižu vrednost (0,53 mg EDTA/ml E). Vodeni MAE ekstrakt je ispoljio najveći kapacitet u heliranju jona metala (0,55 mg EDTA/ml E), dok je vodeni MAC ekstrakt imao najnižu antioksidativnu sposobnost, što ga čini i najmanje efikasnim agensom koji ima potencijal da helira jone metala i na taj način spreči destruktivne procese u ćelijama. Važno je istaći da se sposobnost heliranja jona metala između vodenog MAE i etanolnog MAC ekstrakta nije statistički značajno razlikovala (0,55 i 0,53 mg TE/ml E, redom), pa se i na ovaj način jasno zapaža uticaj ekstragensa i ekstrakcione tehnike na biopotencijal analiziranih ekstrakata.

Ukupna antioksidativna aktivnost

Rezultati ukupnog antioksidativnog kapaciteta ekstrakata cveta zove prikazani su na Histogramu 4.24 i u Prilogu 7.7, Tabela 24.



Histogram 4.24. Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakta cveta zove

Ekstrakti cveta zove su dobri nosioci ukupne antioksidativne aktivnosti, ali bolju ukupnu antioksidativnu aktivnost su imali etanolni ekstrakti. Najveću aktivnost imao je etanolni MAE ekstrakt (0,0498 mg TE/ml E), zatim etanolni MAC i UAE ekstrakti (0,00446 i 0,00395 mg TE/ml E, redom). Kada je reč o vodenim ekstraktima, vodeni MAE ekstrakt je ostvario značajan rezultat u pogledu ukupne antioksidativne aktivnosti (0,00433 mg TE/ml E), koji se statistički nije značajno razlikovao od aktivnosti koju je realizovao etanolni MAC ekstrakt. U ovom slučaju se jasno vidi uticaj odabrane tehnike ekstrakcije, kao i ekstragensa koji u velikoj meri doprinose ispitivanom biopotencijalu. Vodeni UAE i MAC ekstrakti cveta zove su najslabiji nosioci ukupne antioksidativne aktivnosti.

Kao i u prethodnim testovima u kojima je urađena evaluacija antioksidativne aktivnosti, etanol se pokazao kao efikasniji rastvarač i etanolni ekstrakti su ostvarili bolji ukupni antioksidativni kapacitet od vodenih ekstrakata cveta zove. MAE ekstrakcija je u ovom slučaju najefikasniji način koji može da se primeni kako bi se dobili proizvodi koji ispoljavaju dobru antioksidativnu zaštitu.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove i antioksidativne aktivnosti

Uticaj ukupnih fenolnih jedinjenja i dominantnih fenolnih kiselina i flavonoida na antioksidativni potencijal ekstrakata cveta zove najbolje se može objasniti regresionom analizom, a rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i dominantnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove i antioksidativne aktivnosti

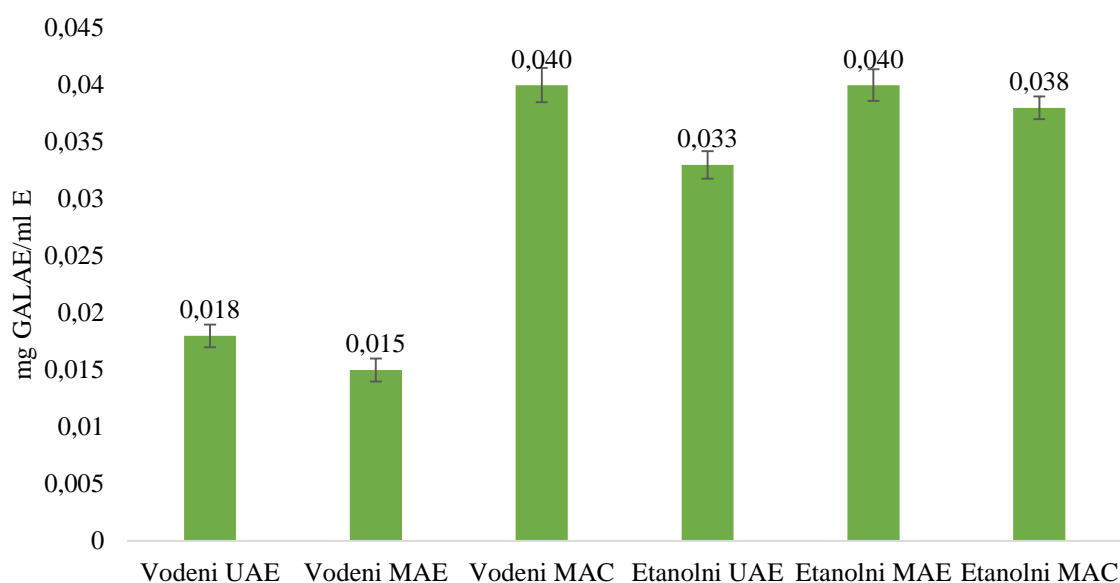
	Faktor determinacije R ²					
	DPPH•	ABTS• ⁺	FRAP	CUPRAC	PM	HM
Ukupni fenoli	0,64	0,81	0,73	0,80	0,73	0,71
Ukupni flavonoidi	0,65	0,82	0,73	0,77	0,84	0,83
Rutin	0,68	0,60	0,61	0,71	0,80	0,83
Hlorogenska kiselina	0,78	0,75	0,78	0,81	0,92	0,68
Ursolna kiselina	0,98	0,10	0,65	0,86	0,20	0,41
Kvercetin-3-O-heksozid	0,68	0,76	0,72	0,73	0,93	0,69
Naringenin	0,79	0,79	0,83	0,90	0,81	0,53

Rezultati regresione analize pokazuju da su ukupni fenoli u dobroj korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću, a najbolja korelacija je ostvarena između sadržaja ukupnih fenola i neutralizacije slobodnog ABTS•⁺ radikala i redukcionne sposobnosti Cu²⁺ jona. Ukupni flavonoidi su u najboljoj korelaciji sa ukupnom antioksidativnom aktivnošću i heliranjem jona metala, a dobro koreliraju sa neutralizacijom slobodnog ABTS•⁺ radikala. Rutin kao dominantan flavonoid u ispitivanim ekstraktima najbolje korelira sa heliranjem jona metala i ukupnom antioksidativnom aktivnošću. Hlorogenska kiselina je u najboljoj korelaciji sa ukupnim antioksidativnim kapacitetom i redukcijom Cu²⁺ jona i u umerenoj korelaciji sa antioksidativnom potencijalom ekstrakata cveta zove koji se zasnivaju na različitim mehanizmima. Ursolna kiselina je u direktonoj korelaciji sa neutralizacijom slobodnog DPPH• radikala, dok kvercetin-3-O-heksozid najbolje korelira sa ukupnim antioksidativnim kapacitetom, a naringenin je u najboljoj korelaciji sa redukcionom sposobnošću Cu²⁺ jona. Prisustvo fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima i njihova korelacija sa antioksidativnim potencijalom ukazuje na njihov pojedinačan i ukupan doprinos ostvarenoj biološkoj aktivnosti.

4.2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost

Inhibicija enzima AChE

U cilju pronalaska prirodnih inhibitora prekomerne aktivnosti enzima CNS-a ispitani su ekstrakti cveta zove kao potencijalni prirodni inhibitori, a rezultati inhibicije enzima AChE su prikazani na Histogramu 4.25 i u Prilogu 7.8, Tabela 25.

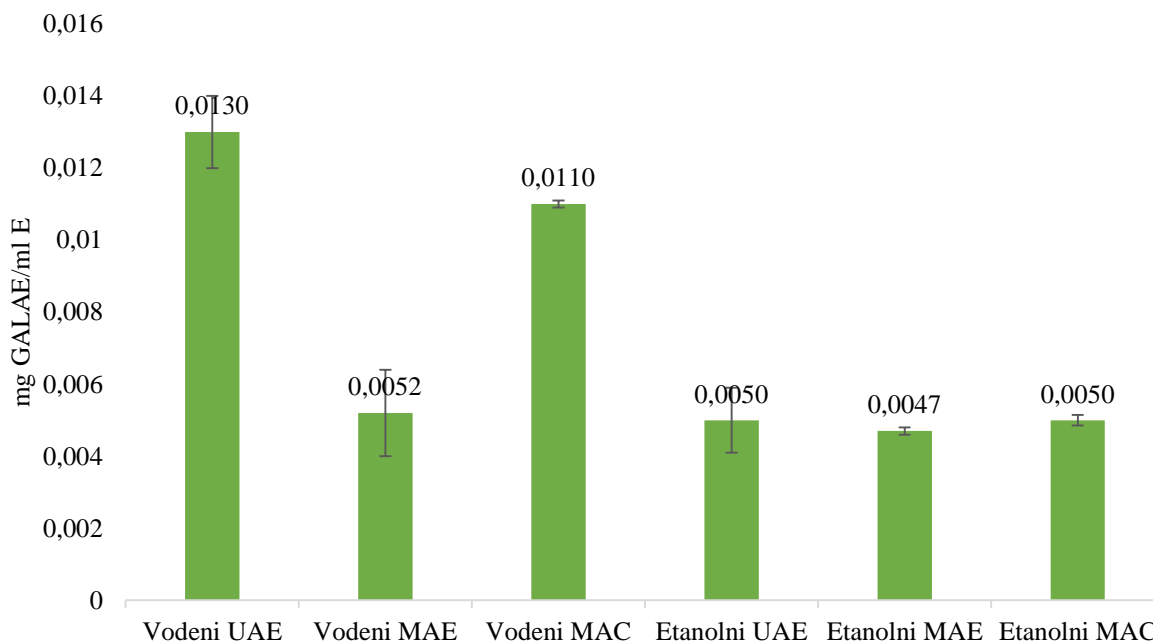


Histogram 4.25. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije AChE

Ekstrakti cveta zove su ostvarili značajne rezultate u pogledu inhibicije AChE enzima. Etanolni ekstrakti su imali jači inhibitorni potencijal od vodenih ekstrakata, a najjaču inhibitornu moć ostvarili su etanolni MAE i MAC ekstrakti, čije se dobijene vrednosti inhibicije nisu statistički značajno razlikovale (0,040 i 0,038 mg GALAE/ml E, redom). Takođe, vodeni MAC ekstrakt je ispoljio veoma dobru inhibitornu moć, čija je vrednost 0,040 mg GALAE/ml E i koja se statistički nije značajno razlikovala od aktivnosti koju su ostvarili etanolni MAE i MAC ekstrakti. Etanolni UAE ekstrakt je pokazao veoma dobar potencijal u procesu smanjenja prekomerne aktivnosti enzima AChE, ali je zabeležena vrednost inhibicije niža (0,033 mg GALAE/ml E) od inhibicije koju su ostvarili etanolni MAE i MAC ekstrakti. Vodeni ekstrakti dobijeni savremenim tehnikama ekstrakcije (UAE i MAE) ostvarili su slične rezultate u procesu smanjenje prekomerne enzimske aktivnosti (0,018 i 0,015 mg GALAE/ml E, redom), ali se statistički značajno razlikuju. Ostvareni rezultati su jasan pokazatelj uticaja same ekstrakcione tehnike i procesnih parametara na biopotencijal analiziranih ekstrakata.

Inhibicija enzima BChE

Rezultati sposobnosti ekstrakata cveta zove da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima BChE su prikazani na Histogramu 4.26 i u Prilogu 7.8, Tabela 26.



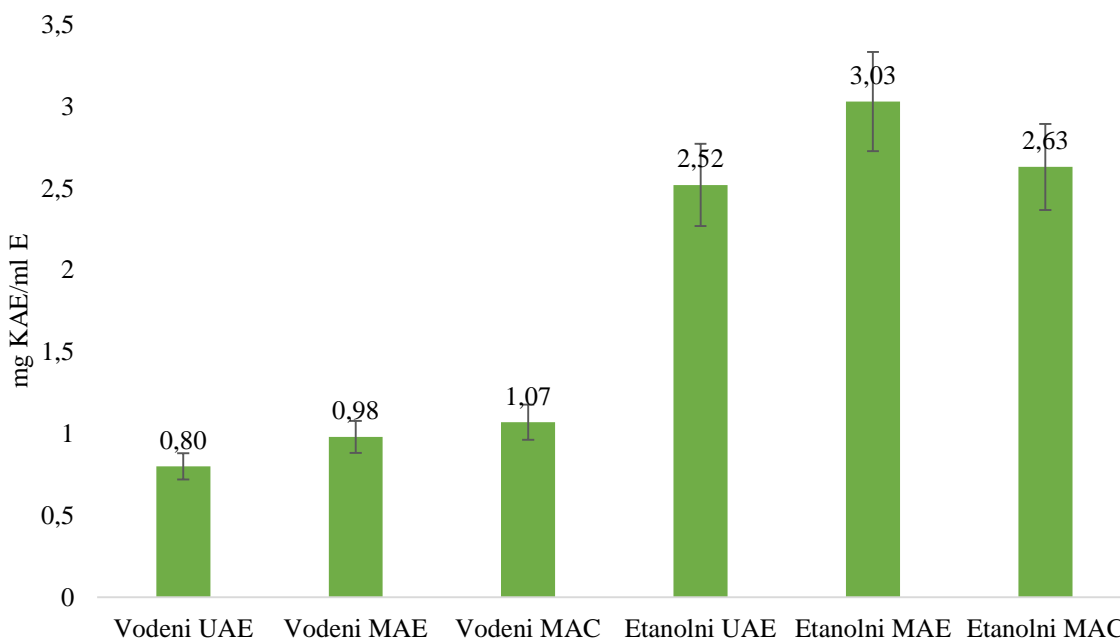
Histogram 4.26. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije BChE

Kada je u pitanju inhibicija enzima BChE dobijeni rezultati daju drugačiju sliku o inhibitornom potencijalu ekstrakata cveta zove. Vodeni ekstrakti cveta zove su ostvarili jači inhibitorni potencijal od etanolnih ekstrakata. U inhibiciji BChE najbolji inhibitorni kapacitet je postignut vodenim UAE ekstraktom (0,0130 mg GALAE/ml E), a niže vrednosti inhibicije su zabeležene kod vodenih MAE i MAC ekstrakata (0,0052 i 0,0110 mg GALAE/ml E, redm). Etanolni ekstrakti cveta zove su pokazali međusobno sličan inhibitorni potencijal (od 0,0047 do 0,0050 mg GALAE/ml E), a na osnovu statističke analize rezultata, uočeno je da se inhibitorni potencijal etanolnih ekstrakata statistički značajno razlikuje. Dosadašnja istraživanja su pokazala da ne postoji nijedan navod u literaturi koji se odnosi na analizu cveta biljne vrste *S. nigra* u pogledu inhibicije enzima centralnog nervnog sistema. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije predstavljaju izuzetan doprinos opštoj karakterizaciji vrste *S. nigra* sa područja Balkanskog poluostrva.

4.2.3.3. Antitirozinazna aktivnost

Inhibicija enzima tirozinaze

Tirozinaza osim što učestvuje u sintezi pigmenta melanina, nalazi se i u mrežnjači (retini) oka i omogućava normalan vid. Promene u aktivnosti ovog enzima povezane su sa nizom poremećaja koji se javljaju u organizmu. Ekstrakti cveta zove su analizirani sa ciljem ispitivanja biljne vrste *S. nigra* kao potencijalnog prirodnog inhibitora koji može da utiče na smanjenje promena u radu enzima tirozinaze. Rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.27 i u Prilogu 7.9, Tabela 27.



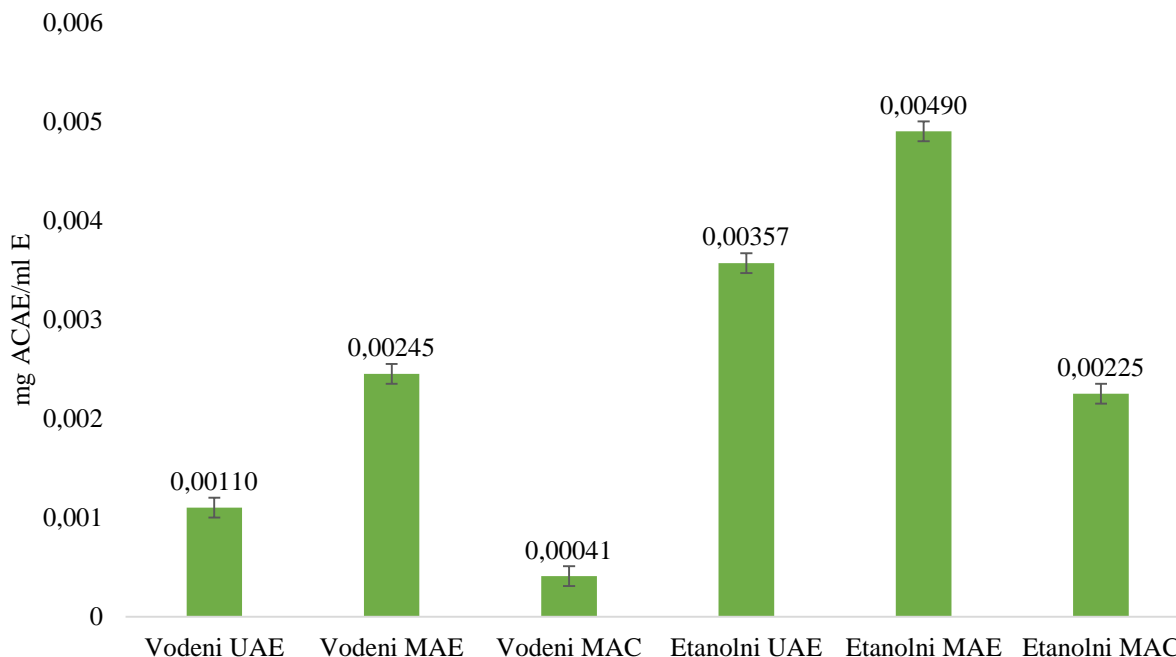
Histogram 4.27. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije tirozinaze

Dobijeni rezultati su pokazali da ekstrakti cveta zove imaju sposobnost da inhibiraju promene u radu enzima tirozinaze. Etanolni ekstrakti su ostvarili bolji inhibitorski potencijal od vodenih ekstrakata. Uticaj ekstrakcione tehnike i sadržaj bioaktivnih jedinjenja u analiziranim ekstraktima su važni faktori koji utiču na biološku i funkcionalnu moć ekstrakata cveta zove, pa je u ovom slučaju etanolni MAE ekstrakt najdominantniji i ostvario je statistički najbolji inhibitorski potencijal (3,03 mg KAE/ml E). Niže vrednosti u procesu inhibicije tirozinaze su ostvarene etanolnim UAE i MAC ekstraktima (2,52 i 2,63 mg KAE/ml E), između kojih statističkom analizom rezultata nije utvrđena statistički značajna razlika. Vodeni ekstrakti su ispoljili niži inhibitorski potencijal, a ostvarene vrednosti inhibicije su se kretale između 0,80 i 1,07 mg KAE/ml E. Vodeni MAC ekstrakt je pokazao najbolju inhibitorsku moć, dok je nešto niži potencijal ispoljio vodeni MAE ekstrakt. Vodeni UAE ekstrakt je okarakterisan kao najslabiji inhibitorski agens enzima tirozinaze.

4.2.3.4. Antidijabetogena aktivnost

Inhibicija enzima α -amilaze

Sprečavanje promena funkcije enzima digestivnog sistema sintetičkim molekulima izaziva neželjene efekte, zbog čega je u okviru ovog istraživanja ispitan potencijal ekstrakata cveta zove kao prirodna zamena sintetičkih molekula. Rezultati inhibicije enzima α -amilaze vodenim i etanolnim ekstraktima cveta zove prikazani su na Histogramu 4.28 i u Prilogu 7.10, Tabela 28.

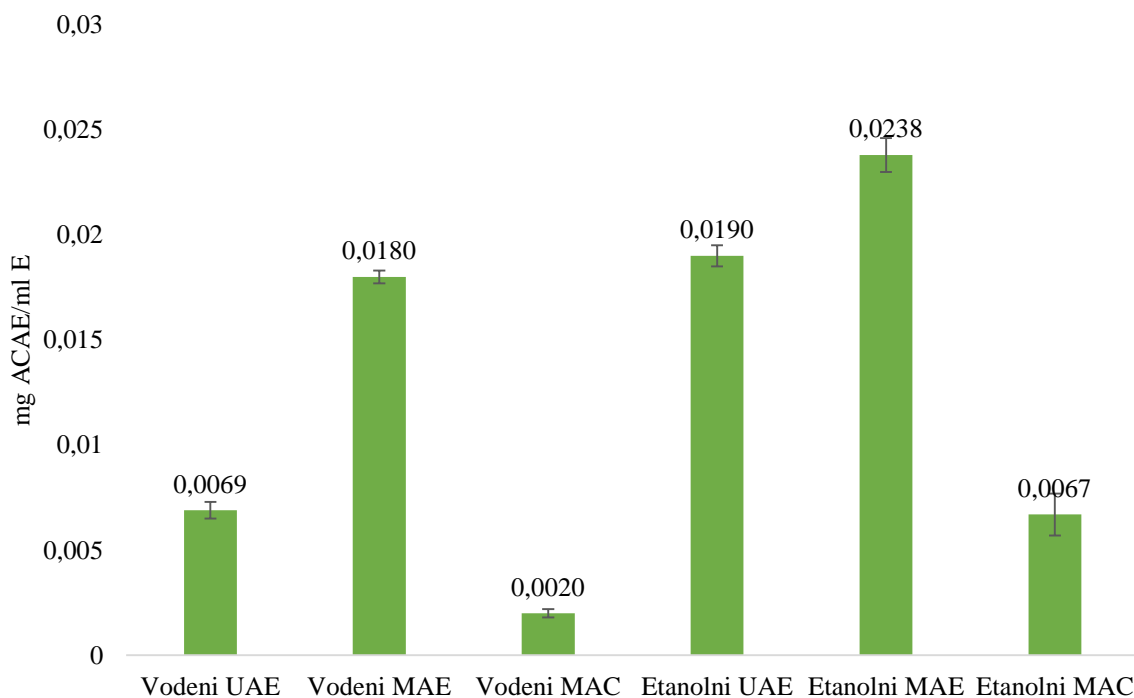


Histogram 4.28. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije α -amilaze

Etanolni ekstrakti su se pokazali kao potencijalno bolji prirodni agensi u smanjenju prekomerne aktivnosti enzima α -amilaze od vodenih ekstrakata cveta zove. Najbolji inhibitorni potencijal ostvario je etanolni MAE ekstrakt (0,00490 mg ACAE/ml E), a zatim etanolni UAE i MAC ekstrakti (0,00357 i 0,00225 mg ACAE/ml E, redom). Kod vodenih ekstrakata takođe se ističe ekstrakt dobijen MAE ekstrakcijom (0,00245 mg ACAE/ml E), dok su znatno niži inhibitorni kapacitet ostvarili vodeni UAE i MAC ekstrakti (0,00110 i 0,00041 mg ACAE/ml E). Upotreba dva različita rastvarača u ovom istraživanju uslovlila je dobijeni rezultat, pa se može uočiti da je 50% etanol kao ekstragens efikasniji od vode, bez obzira da li se za izdvajanje biomolekula iz biljaka primenjuju savremene ili tradicionalne tehnike izolovanja. Takođe, zapaža se da izbor ekstrakcione tehnike u velikoj meri utiče na rezultate analize, pa se pretpostavlja da je u ovom slučaju jačina mikrotalasa uticala na jače narušavanje ćelijske strukture biljne sirovine i na taj način omogućila efikasnije izolovanje biomolekula odgovornih za inhibitorni potencijal analiziranih ekstrakata.

Inhibicija enzima α -glukozidaze

Rezultati inhibicije enzima α -glukozidaze ekstraktima cveta zove prikazani su na Histogramu 4.29 i u Prilogu 7.10, Tabela 29.



Histogram 4.29. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije α -glukozidaze

Uopšteno, poređenjem etanolnih i vodenih ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije enzima α -glukozidaze utvrđeno je da su etanolni ekstrakti potentniji prirodni agensi, koji deluju na smanjenje prekomerne aktivnosti ovog enzima. Etanolni MAE ekstrakt je ostvario najbolju inhibitornu vrednost (0,0238 mg ACAE/ml E), dok su niže vrednosti zabeležene kod etanolnih UAE i MAC ekstrakata (0,0190 i 0,0067 mg ACAE/ml E, redom).

Analizom vodenih ekstrakata cveta zove uočava se da je MAE ekstrakt ispoljio mnogo jači inhibitorni potencijal (0,0180 mg ACAE/ml E) od UAE i MAC ekstrakata (0,0069 i 0,0020 mg ACAE/ml E). Budući da su etanolni i vodeni MAC ekstrakti postigli najniže vrednosti inhibicije, zaključuje se da MAC kao tehnika izolacije aktivnih principa nije optimalno rešenje za dobijanje potentnih inhibitora enzima α -glukozidaze. Povremeno mešanje, odsustvo uticaja temperature koja utiče na odvijanje hemijskih i biohemijskih reakcija između prisutnih molekula u ekstraktu uticalo je na dobijeni rezultat sprovedenog istraživanja.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove i enzim inhibitorne aktivnosti

Primenom regresione analize izračunati su korelacioni faktori koji pokazuju najbolju korelaciju između sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih jedinjenja i inhibicije odabranih enzima, a rezultati regresione analize su prikazani u Tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove i inhibicije odabranih enzima

	Faktor determinacije R ²				
	AChE	BChE	Tirozinaza	α -amilaza	α -glukozidaza
Ukupni fenoli	0,04	0,59	0,59	0,95	0,79
Ukupni flavonoidi	0,03	0,86	0,59	0,90	0,79
Rutin	0,07	0,93	0,69	0,75	0,55
Hlorogenska kiselina	0,14	0,95	0,70	0,73	0,53
Ursolna kiselina	0,90	0,93	0,96	0,56	0,05
Kvercetin-3-O- heksozid	0,08	0,98	0,59	0,69	0,54
Naringenin	0,20	0,58	0,72	0,82	0,54

Ukupni fenoli i flavonoidi su u direktnoj korelaciji sa inhibicijom α -amilaze i veoma dobro koreliraju sa inhibicijom α -glukozidaze. Rutin je u dobroj korelaciji sa inhibicijom enzima BChE i u umerenoj korelaciji sa inhibicijom ostalih ispitivanih enzima. Hlorogenska kiselina je u direktnoj korelaciji sa inhibicijom enzima BChE, veoma dobro korelira sa inhibicijom α -amilaze, dok je u umerenoj korelaciji sa inhibicijom tirozinaze i α -glukozidaze. Ursolna kiselina direktno korelira sa inhibicijom enzima CNS-a i enzima tirozinaze, dok je umeren stepen korelacije primećen sa inhibicijom α -amilaze, a izuzetno slaba korelacija je realizovana sa inhibicijom α -glukozidaze. Kvercetin-3-O-heksozid veoma dobro korelira sa inhibicijom BChE enzima, dok je naringenin u veoma dobroj korelaciji sa inhibicijom α -amilaze, dok je sa inhibicijom ostalih analiziranih enzima ostvario umerenu korelaciju.

Rezultati regresione analize pokazuju da je inhibicija odabranih enzima pozitivno povezana sa sadržajem ukupnih fenola i flavonoida, kao i sa sadržajem dominantnih fenolnih jedinjenja. Imajući u vidu da fenolne komponente detektovane u ekstraktima cveta zove imaju izuzetan biološki potencijal i da su prisutni u visokim koncentracijama u ispitivanim ekstraktima, inhibicija prekomerne aktivnosti enzima može se objasniti prisustvom ovih jedinjenja u njihovom sastavu, koji sinergistički sa drugim fenolnim komponentama doprinose boljim biološkim i funkcionalnim karakteristikama ekstrakata cveta biljne vrste *S. nigra*.

Rezultati ispitivanja koje su ostvarili ekstrakti tradicionalno sušenog cveta i ploda zove ukazuju da je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vodenim i etanolnim ekstraktima cveta zove veći u odnosu na njihovo prisustvo u vodenim i etanolnim ekstraktima ploda zove. Kroz ovakav rezultat ogleda se uticaj faktora sredine. Cvetovi zove se sakupljaju u junu mesecu, kada temperature nisu

izuzetno visoke, dok se plodovi zove sakupljaju tokom avgusta i septembra meseca, pa su sunčani periodi u ovom delu godine u znatnoj meri uticali na njihovo prisustvo u analiziranim ekstraktima cveta i ploda biljne vrste *S. nigra*.

Poređenjem rezultata koji su dobijeni LC-MS/MS analizom ekstrakata ploda i cveta biljne vrste *S. nigra* uočava se da fenolne kiseline: gentizinska, vanilinska, ferulna, elagna kiselina i flavonoidi katehin i morin nisu prisutni u ekstraktima plodova. Sadržaj dominantnih jedinjenja: hlorogenske kiseline, rutina, kvercetin-3-*O*-heksozida i ursolne kiseline je značajno veći u ekstraktima cveta zove. Sadržaj protokatehinske kiseline je detektovan u većoj koncentraciji u ekstraktima plodova zove. Iako se zova smatra "prirodnom laboratorijom" biološki aktivnih molekula, različiti delovi iste biljke ne poseduju isti sadržaj biološki vrednih komponenata. Varijacija fenolnih jedinjenja u cvetu i plodu zove potiče od uticaja broja sunčanih dana, očuvanosti biljnih organa, uticaja UV zračenja, hemijskog sastava zemljišta, kao i nadmorske visine na kojoj biljka raste. Pretpostavlja se da je sadržaj vode u plodu veći od sadržaja vode u cvetu zove, što takođe doprinosi konačnoj slici polifenolnog profila ispitivanih biljnih organa. Poređenjem biološke aktivnosti ekstrakata cveta i ploda zove jasno se uočava da su vodeni MAE ekstrakti cveta zove ostvarili bolju sposobnost u procesu neutralizacije slobodnih ABTS^{•+} i DPPH[•] radikala od TS vodenog MAE ekstrakta ploda dobijenog istom ekstrakcionom tehnikom. Za razliku od TS vodenog MAE ekstrakta, TS vodeni UAE i TS vodeni MAC ekstrakti plodova zove su ispoljili bolju sposobnost kada je reč o neutralizaciji slobodnih ABTS^{•+} i DPPH[•] radikala u odnosu na vodene UAE i MAC ekstrakte cveta zove. Vodeni ekstrakti plodova zove dobijeni primenom savremenih i tradicionalnih ekstrakcionih tehnika su efikasniji agensi u redukciji Fe³⁺ i Cu²⁺ jona od vodenih ekstrakata cveta zove. Za razliku od vodenih, etanolni ekstrakti cveta zove su ispoljili jači kapacitet u redukciji jona Fe³⁺ i Cu²⁺ od etanolnih ekstrakata plodova zove. Vodeni ekstrakti plodova zove i etanolni ekstrakti cveta zove u heliranju jona metala prate isti trend kao i kod ispitivanja redukcionne sposobnosti. Ukupna antioksidativna aktivnost je jača i kod vodenih i kod etanolnih ekstrakata plodova zove u odnosu na vodene i etanolne ekstrakte cveta. U pogledu neuroprotektivne aktivnosti vodeni ekstrakti plodova su bolji inhibitori prekomerne aktivnosti enzima AChE i BChE od vodenih ekstrakata cveta, dok su etanolni ekstrakti i plodova i cveta zove imali približno isti inhibicioni potencijal. Razlika u aktivnosti ekstrakata različitih biljnih organa iste biljke, koji su dobijeni upotrebom dva rastvarača ispitana je i analizom antitirozinazne aktivnosti. U ovom slučaju vodeni ekstrakti plodova zove su jači inhibitori enzima tirozinaze od vodenih ekstrakata cveta, dok su etanolni ekstrakti cveta jače inhibirali ovaj enzim od etanolnih ekstrakata plodova zove. Međutim, i vodeni i etanolni ekstrakti plodova zove su potentniji inhibicioni agensi prema enzimama α -amilazi i α -glukozidazi od vodenih i etanolnih ekstrakata cveta zove. Dobijeni rezultati predstavljaju veliki značaj i naučni doprinos, jer je dokazano da je zova veoma dobar izvor sekundarnih metabolita, koji poseduju biološke i farmakološke efekte. S obzirom na malu zastupljenost u ishrani, analizirani ekstrakti se mogu smatrati potencijalnim prirodnim agensima koji se mogu dodavati u već postojeće proizvode kako bi se poboljšao njihov kvalitet i kako bi stekli status funkcionalne hrane.

4.3. Proizvodi od plodova zove

Ispitivanjem polifenolnog profila, bioloških i funkcionalnih karakteristika ekstrakata plodova zove može se zaključiti da su zdravstveni benefiti plodova bobičastog voća posledica visoke koncentracije polifenolnih jedinjenja. Sve veći broj naučnih izveštaja ukazuje da su bobičasto voće i ekstrakti bobičastog voća bogati polifenolnim komponentama koje pokazuju širok spektar pozitivnih efekata na zdravlje ljudi (Kong i sar., 2003). Kao rezultat mnogih blagotvornih efekata, bobičasto voće i ekstrakti bobičastog voća danas se sve više koriste kao deo funkcionalne hrane, ili u vidu prehrambenih suplemenata, što je bila ideja za dobijanje i analizu proizvoda od zove, kao novih, funkcionalnih proizvoda. Dalji tok doktorske disertacije je usmeren na analize soka i vina koji su dobijeni od plodova zove, kao proizvoda koji još uvek nisu zastupljeni na domaćem tržištu.

4.3.1. Matični sok od plodova zove

4.3.1.1. Hemijski sastav matičnog soka

Bobičasto voće privlači potrošače svojim senzorskim karakteristikama, kao što su boja, miris i ukus (Toaldo i sar., 2016). Plodovi bobičastog voća se smatraju izvorima esencijalnih minerala i vitamina, koji zajedno sa senzorskim svojstvima čine ovo voće poželjnim za konzumaciju (Amagase i Farnsworth, 2011), uz kombinaciju sadržaja šećera i organskih kiselina koje su odgovorne za njihove senzorske karakteristike. Ove karakteristike su podstakle komercijalizaciju bobičastog voća kao svežeg ili osušenog u formulaciji različitih vrsta prehrambenih proizvoda. Zahtevi tržišta su sve veći i teže da odgovore na sve izazove koje postavljaju potrošači. Zbog izuzetnog biološkog potencijala biljne vrste *S. nigra* koji je dokazan u ovoj doktorskoj tezi, zreli plodovi zove su upotrebljeni za pripremu matičnog soka od zove, čiji hemijski sastav je analiziran. Hemijski sastav matičnog soka od zove prikazan je u Tabeli 4.10.

Tabela 4.10. Hemijski sastav matičnog soka od plodova zove

Parametri	Vrednosti
pH vrednost	4,11±0,02
Sadržaj suve materije (%)	7,69±0,19
Sadržaj organskih kiselina (mg/ml)	
Jabučna kiselina	3,63±1,06
Sirćetna kiselina	0,69±0,17
Limunska kiselina	0,49±0,14
Sadržaj šećera (mg/ml)	
Glukoza	29,11±3,92
Fruktoza	22,60±3,18
Nutritivni profil	
Sadržaj ugljenih hidrata (mg/ml)	37,40±0,21
Sadržaj lipida (mg/ml)	0,20±0,01
Sadržaj proteina (mg/ml)	0,20±0,01
Energetska vrednost (kcal/100 ml)	15,20±3,14
Sadržaj mineralnih materija (mg/l)	
Na	7,69±0,36
K	3955,56±475,73
Mg	280,41±1,22
Ca	163,79±4,90
Fe	1,27±0,04
Cu	0,13±0,02
Mn	1,16±0,07
Zn	0,48±0,01
Cr	0,01±0,01
Sn	<LoD
Ni	0,01±0,01

±3SD.

<LoD (limit detekcije).

Analizom hemijskog sastava utvrđeno je da je pH vrednost soka dobijenog tradicionalnim postupkom ceđenja plodova zove 4,11. pH vrednost soka od zove ukazuje da kiselost nije izražena i da na osnovu pH vrednosti može se smatrati da je sok prihvatljiv za potrošače, bez korekcije njegove kiselosti. Poređenjem pH vrednosti analiziranog soka sa pH vrednošću soka od aronije koji su ispitivali Siddiq i sar. (2018) zapaža se da je pH vrednost soka od aronije 3,55. Razlika u pH vrednostima sokova od bobičastog voća može se objasniti različitim stepenom zrelosti plodova, kao i različitim sadržajem šećera i organskih kiselina u sokovima. Analiza hemijskog sastava je uključivala i određivanje sadržaja suve materije matičnog soka od zove i dobijena vrednost je iznosila 7,69%.

Dalje analize uključivale su prisustvo organskih kiselina i šećera, ali i evaluaciju nutritivnog i mineralnog profila soka. Na osnovu sprovedenog istraživanja utvrđeno je da je u soku od zove najzastupljenija jabučna kiselina u koncentraciji 3,63 mg/ml, dok su sirćetna i limunska kiselina prisutne u nižim koncentracijama.

U poređenju sa istraživanjem koje je sprovedeno na soku od aronije, utvrđeno je da analizirani sok ima veći sadržaj jabučne i limunske kiseline (Daskalova i sar., 2019).

Pored organskih kiselina sadržaj šećera u sokovima je povezan sa kvalitetom soka. Prisustvo šećera u voćnim sokovima utiče na senzorska svojstva soka. Glukoza i fruktoza su glavni šećeri koji su prisutni u voćnim sokovima. Koncentracija glukoze je nešto veća od koncentracije fruktoze u analiziranom soku, a vrednosti su iznosile 29,12 i 22,60 mg/ml, redom, što je u skladu sa studijom koju su izveli Sidor i Gramza - Michalovska (2015) na sokovima od drugog bobičastog voća. Sadržaj glukoze u soku od aronije je približno isti, dok je koncentracija fruktoze u soku od zove nešto niža kada se uporedi sa sokom od aronije (Daskalova i sar., 2019).

Evaluacijom nutritivnog profila soka utvrđeno je prisustvo ugljenih hidrata u vrednosti 37,40 mg/ml, dok je sadržaj proteina i lipida bio znatno niži, čija je zabeležena vrednost 0,20 mg/ml. Procenjena je i energetska vrednost soka, koja je iznosila 15,20 kcal na 100 ml soka, od čega najveći deo kalorija potiče od ugljenih hidrata prisutnih u soku. Nutritivni profil soka je jasan pokazatelj da način dobijanja soka u velikoj meri utiče na prisustvo ispitivanih komponentata. Pretpostavlja se da zbog tradicionalnog načina ceđenja zrelih plodova zove nije došlo do efikasnijeg izolovanja proteina i lipida, pa je njihov sadržaj u soku niži, u odnosu na prisustvo proteina i lipida u komercijalnim sokovima bobičastog voća.

Minerali pripadaju grupi građivnih i funkcionalnih komponenti, jer su prisutni u ćelijama, tkivima i organima. Oni imaju višestruke uloge u telu: uključeni su u metaboličke procese, učestvuju u regulaciji osmotskog pritiska, u prenosu nervnih impulsa, utiču na rast i razvoj, regulišu koagulaciju krvi, deluju kao kofaktori itd. Prirodni izvori bogati mineralima su povrće, žitarice, voće, kao i bobičasto voće (Gharibzahedi i Jafari, 2017), stoga je ispitano njihovo prisustvo u soku od zove. Sok od zrelih plodova zove u najvećoj koncentraciji sadrži makroelemente K i Mg (3955,56 i 280,40 mg/l, redom), dok su Ca i Na prisutni u nižim koncentracijama (163,80 i 7,69 mg/l, redom). Relativno veliki sadržaj K i Mg karakterističan je za biljnu vrstu *S. nigra*, pa je očekivano njihovo prisustvo u većim koncentracijama u soku od zove (Vulić, Vračar i Šumić, 2008). Sadržaj mikroelemenata u ispitivanom soku kretao se između 0,01 i 1,27 mg/l, gde su Fe i Mn bili najzastupljeniji (1,27 i 1,16 mg/l, redom), dok su Cr i Ni kvantifikovani u najnižim koncentracijama (0,01 mg/l), a koncentracija Sn je bila ispod limita detekcije. Zdravstvena bezbednost dobijenog soka analizirana je na osnovu prisustva toksičnih elemenata: Pb, Cd, Hg i As, čije su koncentracije u matičnom soku od plodova zove bile ispod limita detekcije (<0,001 mg/ml soka). Prisustvo toksičnih elemenata u analiziranom soku čije su koncentracije bile ispod limita detekcije ukazuje na to da ispitivana biljna vrsta raste u ekološkom području i na nezagađenom zemljištu.

Rezultati istraživanja koje su sprovedi Konić-Ristić i sar. (2011), potvrđuju da su minerali K i Fe dominantni u sokovima koji su dobijeni od različitog bobičastog voća. Sadržaj minerala u matičnom soku od zove bio je veći nego u voćnim sokovima koje su ispitali Konić-Ristić i sar. (2011). Prisustvo makro- i mikroelemenata, posebno K i Fe u soku od zove treba posebno istaći, jer su ovi minerali važni faktori u prevenciji različitih bolesti. Konzumacija hrane koja nije bogata gvoždem ili veliki gubitak krvi može da prouzrokuje nedostatak Fe, što uzrokuje insuficijenciju hemoglobina i anemiju. K je mineral koji je najvažniji za rad srca, ali i drugih mišića i nervnih ćelija, pa manja promena nivoa ovog minerala u ćelijama može izazvati negativne efekte na mišićni, nervni i kardiovaskularni sistem. Preporučena dnevna doza K za pravilno funkcionisanje organizma za muškarce iznosi 3400 mg, dok je za žene optimalno 2600 mg. Sadržaj K u soku od plodova zove je malo veći od preporučenih dnevnih doza, tako da čaša soka od zove od 1 dl obezbeđuje dnevne potrebe organizma za K. Preporučene dnevne doze Fe za muškarce iznosi 8 mg, a za žene 18 mg (Gharibzahedi i Jafari, 2017). Sadržaj Fe u soku od zove u čaši od 1 dl nije dovoljan za obezbeđivanje dnevnih potreba organizma za Fe, ali svakako predstavlja veoma pogodan izvor ovog minerala za normalno odvijanje metaboličkih procesa.

U dosadašnjim naučnim publikacijama sadržaj minerala u soku od zrelih plodova zove koji je dobijen tradicionalnim načinom ceđenja voća nije analiziran, pa rezultati predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji daju korisne podatke i smernice za karakterizaciju i mogućnosti dalje upotrebe soka od zove u ishrani, u cilju prevencije bolesti i promocije zdravlja.

4.3.1.2. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i polifenolni profil matičnog soka

Polifenoli kao biološki, farmakološki aktivne komponente su odgovorni za boju voća, a takođe utiču na fizičke, hemijske i senzorske (gorčina i gipkost) karakteristike sokova (Mikulic-Petkovsek i sar., 2016). Sadržaj bioaktivnih jedinjenja u soku od zove predstavljen je u Tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Sadržaj ukupnih biološki aktivnih jedinjenja i polifenolni profil soka od zove

Sadržaj ukupnih biološki aktivnih jedinjenja	
Ukupni fenoli (mg GAE/ml soka)*	3,68 ± 1,01
Ukupni flavonoidi (mg CE/ml soka)**	0,37 ± 0,10
Ukupni monomerni antocijani (mg CGE/ml soka)***	0,023 ± 0,010
Ukupni tanini (mg CE/ml soka)****	1,19 ± 2,17
Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja (µg/ml)	
<i>p</i> -Hidroksibezoeva kiselina	3,45 ± 0,03
Protokatehinska kiselina	42,7 ± 0,85
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	1,82 ± 0,01
Galna kiselina	3,93 ± 0,29
Hlorogenska kiselina	7,52 ± 0,23
Kafena kiselina	3,07 ± 0,06
Hinska kiselina	310,00 ± 1,86
Kvercetin	6,17 ± 0,20
Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,46 ± 0,02
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	18,0 ± 0,90
Amentoflavon	0,36 ± 0,01
Rutin	5,11 ± 0,05
Eskuletin	0,27 ± 0,02

* mg ekvivalenata galne kiseline po ml soka

** mg ekvivalenata rutina po ml soka

*** mg ekvivalenata cijanidin-3-*O*-glukozida po ml soka

**** mg ekvivalenata katehina po ml soka

±3SD.

Determinacija ukupnih polifenolnih komponenata izvedena je spektrofotometrijski, a dobijeni rezultati su pokazali da sok od zove u najvećoj meri sadrži ukupne fenole 3,68 mg GAE/ml soka, dok je prisustvo ukupnih flavonoida, monomernih antocijana i tanina zabeleženo u nižim koncentracijama. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u soku od zove je niži od prisustva fenola u komercijalno dostupnim sokovima od drugog bobičastog voća, dok je sadržaj ukupnih flavonoida i monomernih antocijana veći (Bermudez-Soto i Tomas- Barberan, 2004). Razlike koje se javljaju u prisustvu bioaktivnih jedinjenja u komercijalnom i tradicionalno dobijenom soku mogu se objasniti različitim načinom pripreme, prisustvom aditiva u komercijalnim sokovima, čime se povećava stabilnost proizvoda, ali i interakcijom sa drugim fitohemikalijama (nefenolna jedinjenja) i Folin-Ciocalteu reagensom. U cilju utvrđivanja kvalitativnog i kvantitativnog sastava fenolnih kiselina i flavonoida sok od zove je analiziran LC-MS/MS metodom.

Od analiziranih, šest fenolnih kiselina kvantifikovano je u soku od zove, a najdominantnije su protokatehinska kiselina i hlorogenska kiselina (42,70 i 7,52 µg/ml, redom). Ovakav rezultat je očekivan i opravdan, jer je u ekstraktima plodova zove zabeleženo najveće prisustvo ovih fenolnih kiselina.

Prisustvo protokatehinske kiseline u soku od zove je od izuzetnog značaja zbog njenih farmakoloških svojstava. Naučne studije su pokazale da protokatehinska kiselina pokazuje neuroprotektivnu i antioksidativnu aktivnost, jer je u koncentracijama od 100 µM moćan inhibitor agregacije β-amiloidnih fibrila i pokazuje snažan antioksidativni kapacitet (Hornedo-Ortega i sar., 2016). Pretpostavlja se da protokatehinska kiselina, kao glavna fenolna kiselina u koncentraciji koja je detektovana u soku od zove, doprinosi biopotencijalu analiziranog soka, ali i njegovoj potencijalnoj upotrebi u prehrambenoj industriji kao novog i funkcionalnog proizvoda.

U studiji koju su sproveli Lee i sar. (2012), utvrđeno je da hlorogenska kiselina ima pozitivan uticaj na kardiovaskularni i nervni sistem, zbog čega prisustvo hlorogenske kiseline soku od zove daje poseban značaj. Pored fenolnih kiselina, identifikovano je šest flavonoida, a u najvećoj koncentraciji su detektovani: kvercetin-3-*O*-heksozid, kvercetin i rutin (18,00, 6,17 i 5,11 µg/ml, redom). Prisustvo ovih jedinjenja kao glavnih flavonoida u soku od zove je posledica njihovog prisustva u najvećim koncentracijama u ekstraktima koji su dobijeni od plodova zove. Ekstrakti plodova zove su bolji izvor flavonoida, jer su dobijeni primenom modernih ekstrakcionih tehnika, pa je izolovanje fenolnih jedinjenja bolje, za razliku od ručnog ceđenja, gde su određene količine fenolnih jedinjenja zaostale u koži plodova. U poređenju sa komercijalnim sokovima koji su bili izloženi uticaju temperature i u koje su dodati aditivi, analizirani sok je imao veći sadržaj flavonoida, posebno kvercetin-3-*O*-heksozida, dok kvercetin i rutin nisu detektovani u studiji koju su sproveli Senica i sar. (2016). Istraživanja iz oblasti prirodnih proizvoda su pokazala da su kvercetin i rutin veoma moćni bioflavonoidi koji imaju izražen antioksidativni potencijal. Kvercetin i njegovi konjugovani oblici sprečavaju oštećenje membrana eritrocita usled delovanja slobodnih radikala. Ovi bioflavonoidi štite ćelije mozga od oksidativnog stresa, pa na taj način sprečavaju razvoj Alchajmerove bolesti i drugih neuroloških poremećaja. Značajno je napomenuti da oni inhibiraju oslobađanje histamina iz mastocita i drugih alergijskih komponenata i na taj način deluju kao prirodni antihistaminici. Sposobnost kvercetina da spreči alergijske reakcije ima ogromne implikacije na lečenje i prevenciju astme i bronhitisa (Gullon i sar., 2017). Prisustvo kvercetina i rutina, kao dominantnih i veoma potentnih flavonoida, čini sok od zove veoma bogatim izvorom biološki važnih jedinjenja.

Proizvodi pripremljeni na tradicionalan način su bolji izvor polifenolnih jedinjenja od komercijalnih proizvoda, jer je tokom pripreme izbegnut uticaj temperature, enzima, dodatog šećera i drugih aditiva. Primećeno je da dodavanje enzima tokom pripreme soka utiče na biološku aktivnost proizvoda smanjujući sadržaj fenolnih jedinjenja. Takođe, u poređenju sadržaja fenolnih kiselina u komercijalnim sokovima koje su analizirali McKai i sar. (2015) i tradicionalno dobijenom soku od zove, moglo se uočiti da analizirani sok ima veći sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida od komercijalnih sokova. Veće prisustvo fenolnih kiselina u soku od zove u odnosu na

flavonoide može se objasniti činjenicom da su flavonoidi skoncentrisani u koži plodova, pa se pretpostavlja da tokom ceđenja nije došlo do potpunog oslobađanja flavonoida, zbog mehaničkog načina ceđenja plodova, bez upotrebe uređaja koji se najčešće koriste za ceđenje voća (prese), dok su se fenolne kiseline izdvojile u većoj koncentraciji. Sprovedeno istraživanje ukazuje da su kvercetin-3-*O*-heksozid, kvercetin, rutin, protokatehinska kiselina i hlorogenska kiselina, prisutni u najvećim koncentracijama u soku od zove, i u interakciji sa drugim fenolnim jedinjenjima mogu pozitivno uticati na zdravlje potrošača i funkcionalne karakteristike samog proizvoda.

4.3.1.3. Biološke i funkcionalne karakteristike matičnog soka

4.3.1.3.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost soka od zove određena je primenom više *in vitro* testova, a rezultati su prikazani su u Tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Antioksidativna aktivnost matičnog soka od zove

Antioksidativni testovi	Antioksidativna aktivnost
DPPH (mg TE/ml soka)*	2,16 ± 0,79
ABTS (mg TE/ml soka)*	5,38 ± 0,30
FRAP (mg TE/ml soka)*	7,26 ± 1,63
CUPRAC (mg TE/ml soka)*	10,98 ± 0,46
PM (mg TE/ml soka)*	29,63 ± 2,31
HM (mg EDTA/ml soka)**	0,11 ± 29,20
•NO (mg TE/ml soka)*	53,06 ± 17,40
LP (mg TE/ml soka)*	0,18 ± 0,04

*mg ekvivalenata troloksa po ml soka

**mg ekvivalenata etilendiaminotetrasirćetne kiseline po ml soka
±3SD.

Sok od plodova zove ispoljava jako antioksidativno delovanje u svim primenjenim testovima, a veoma dobar rezultat je ostvaren u pogledu neutralizacije slobodnih DPPH• i ABTS•⁺ radikala. Bolji antioksidativni potencijal sok je ispoljio prema ABTS•⁺ radikalu, čija je aktivnost dva puta veća (5,38 mg TE/ml soka) kada se uporedi sa aktivnoću koju je realizovao prema DPPH• radikalu (2,16 mg TE/ml soka).

Rezultati u antioksidativnim testovima koji se zasnivaju na redukciji Fe³⁺ i Cu²⁺ jona su pokazali da je sok od zove potentan agens u redukciji ovih jona, s tim da je jača redukciona sposobnost ostvarena u redukciji Cu²⁺ jona (10,98 mg TE/ml soka). Sok od zove je ostvario dobru ukupnu antioksidativnu aktivnost primenom fosfomolibdenskog testa (29,63 mg TE/ml soka), dok je ostvarena sposobnost heliranja jona metala 0,11 mg EDTA/ml soka.

Matični sok od zove se pokazao kao veoma moćan agens u procesu neutralizacije •NO radikala, a ostvarena vrednost inhibicije je zabeležena u koncentraciji 53,06 mg TE/ml soka. Reaktivne vrste azota (RNS), kao endogeni intermedijari koji se neprekidno obrazuju u živim ćelijama, igraju suštinsku ulogu u regulaciji fizioloških procesa, zbog čega su različite biološke aktivnosti •NO radikala uslovljene njegovim radikalskim karakterom (Shadyro i Lisovskaya, 2019). U ovom slučaju sok od zove kao potencijalno novi proizvod poseduje važnu funkciju u održavanju homeostaze između oksidativnog i antioksidativnog sistema, obezbeđujući na taj način nesmetano odvijanje fizioloških procesa. Tradicionalno proizvedeni sok od zove ima sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije (0,18 mg TE/ml soka), što je od izuzetnog značaja, jer na taj način sprečava oksidaciju lipida i oštećenje ćelijskih membrana. Oksidativno oštećenje lipida slobodnim radikalima rezultira stvaranjem produkata lipidne peroksidacije, koji svojim delovanjem mogu da izazovu različite neželjene efekte unutar ćelijskog sistema.

Pregledom podataka iz literature zapaženo je da je ispitivani sok pokazao je nešto nižu aktivnost uklanjanja slobodnih radikala od komercijalnog soka od bobičastog voća (Bermudez-Soto i Tomas-Barberan, 2004), dok je ukupni antioksidativni potencijal, sposobnost heliranja jona metala, kao i sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije soka od zove prvi put ispitana u okviru ove doktorske disertacije.

4.3.1.3.2. Enzim inhibitorna aktivnost

Dobijeni sok od plodova zove je potencijalno novi funkcionalni proizvod i u cilju evaluacije njegovih bioloških i funkcionalnih karakteristika ispitan je neuroprotektivni, antitirozinazni i antidijabetogeni potencijal. Dobijeni rezultati istraživanja prikazani su u Tabeli 4.13.

Tabela 4.13. Neuroprotektivni, antitirozinazni i antidijabetogeni potencijal matičnog soka od zove

Enzim inhibitorni testovi	Enzim inhibitorna aktivnost
AChE (mg GALAE/ ml soka)*	3,91 ± 0,12
BChE (mg GALAE/ml soka)*	1,11 ± 0,48
Tirozinaza (mg KAE/ml soka)**	42,12 ± 3,05
α-amilaza (mg ACAE/ml soka)***	0,009 ± 0,001
α-glukozidaza (mg ACAE/ml soka)***	0,004 ± 0,001

* mg ekvivalenata galatamina po ml soka

** mg ekvivalenata kojične kiseline po ml soka

*** mg ekvivalenata akarboze po ml soka

±3SD.

Neuroprotektivna aktivnost

Sok od zove je ostvario veoma dobar potencijal u inhibiciji prekomerne aktivnosti enzima AChE i BChE, s tim da je jaču inhibitornu moć pokazao prema AChE (3,91 mg GALAE/ml soka), dok je prema BChE ostvarena inhibitorna vrednost 1,11 mg GALAE/ ml soka. Na osnovu ranijih studija utvrđeno je da se fenolne kiseline (*p*-hidroksibezoeva, protokatehinska, *p*-kumarinska, galna i kafena kiselina) ili molekuli sa fenolnim prstenom i hidrofobnim ostacima u svojoj strukturi smatraju potencijalnim inhibitorima AChE i BChE (Greig i sar., 2005). Fitohemijским skriningom je dokazano da je sok od zove veoma dobar izvor fenolnih kiselina, koji su potentni inhibitori AChE i BChE enzima. Ova činjenica ukazuje na to da su fenolne kiseline detektovane u soku, u najvećoj meri doprinele sposobnosti soka da učestvuje u inhibiciji enzima i da na taj način utiče na sprečavanje razvoja neurodegenerativnih poremećaja.

Antitirozinazna aktivnost

Antitirozinazna aktivnost soka od zove je prvi put ispitana u ovom istraživanju i sok je ostvario veoma dobar inhibitorni potencijal, čija je zabeležena vrednost 42,12 mg KAE/ml soka. Postignuta vrednost je rezultat biopotencijala biljne vrste *S. nigra*, čiji proizvodi bi mogli da budu potencijalni i farmakološki agensi. Sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju najvažnije komponente kako same biljne vrste, tako i njenih proizvoda i u velikoj meri utiču na njihov biološki i farmakološki kapacitet. Prisustvo fenolnih kiselina, flavonoida i terpenkih jedinjenja u najvećoj meri doprinose biološkoj aktivnosti ove biljne vrste. Pored detektovanih metabolita, pretpostavlja se da sok sadrži i druge aktivne principe, koji međusobnim interakcijama čine sok od plodova zove moćnim inhibitorom tirozinaze (Vujanović i sar., 2019).

Antidijabetogena aktivnost

Analizom soka od zove u procesu inhibicije enzima digestivnog trakta utvrđeno je da sok ima sposobnost da smanji prekomernu aktivnost enzima α -amilaze i α -glukozidaze, a ostvarene vrednosti inhibicije su 0,009 i 0,004 mg ACAE/ml soka, redom. S obzirom da je fitohemijska kompozicija soka od zove veoma dobra, očekivana je jača inhibicija enzima digestivnog trakta. Način pripreme soka, faza zrelosti ploda i metoda koja je primenjena za ispitivanje mogu da doprinesu konačnim rezultatima analize, što je u ovom slučaju rezultovalo nižom aktivnošću. Pretpostavlja se, da u toku ceđenja plodova nije došlo do potpunog izolovanja biološki potentnih jedinjenja koja bi mogla da utiču na povećanje inhibicije enzima α -amilaze i α -glukozidaze (Orhan i sar., 2016). Rezultat koji je realizovan u ovoj studiji predstavlja veoma značajan korak u naučnom istraživanju tradicionalnog proizvoda, koji zahvaljujući svojim farmakološkim i biološkim svojstvima bi mogao da izađe iz etnofarmakoloških okvira i mogao bi da se deklarise kao potencijalni novi funkcionalni proizvod.

4.3.1.4. Boja matičnog soka

Instrumentalnom karakterizacijom boje soka od zove utvrđene su sledeće srednje vrednosti za L^* (svetloću), a^* (udeo crvene boje), b^* (udeo žute boje), C^* (zasićenost boje), h („hju” ugao) i λ (dominantnu talasnu dužinu): 19,68, 0,63, 1,66, 1,81, 69,84 i 581,71 nm, redom (Tabela 4.14).

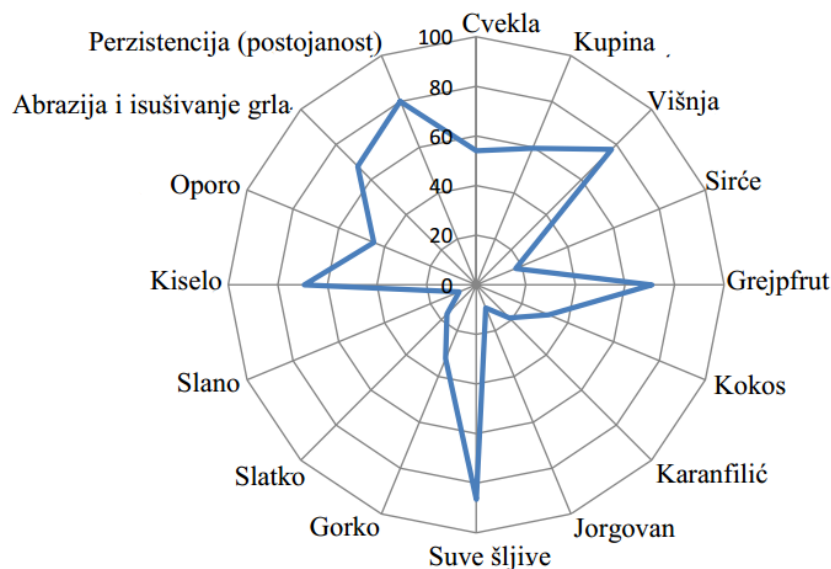
Tabela 4.14. Instrumentalno određeni parametri boje matičnog soka od zove

L^*	a^*	b^*	C^*	h	λ (nm)
19,68 ± 0,11	0,63 ± 0,38	1,66 ± 0,09	1,81 ± 0,17	69,84 ± 10,58	581,71 ± 3,38

±3SD.

4.3.1.5. Senzorski profil matičnog soka od plodova zove - Kvantitativna deskriptivna analiza matičnog soka

Na Radar dijagramu (Radar dijagram 4.1) prikazane su srednje vrednosti intenziteta 16 identifikovanih senzorskih svojstava soka od zove. Kod soka od zove senzorsko svojstvo identifikovano kao ‘suva šljiva’ kvantifikovano je sa najvećim intenzitetom 86,5, a zatim, sa takođe visoko kvantifikovanim intenzitetom, slede senzorska svojstva identifikovana kao ‘višnja’ - kvantifikovano sa 77,3, senzorsko svojstvo identifikovano kao ‘grejpfrut’ - kvantifikovano je sa 70,9, senzorsko svojstvo identifikovano kao ‘kiselo’ - kvantifikovano je sa 69,3 i senzorsko svojstvo identifikovano kao ‘abrazija i isušivanje grla’ - kvantifikovano je sa 67,6. Senzorska svojstva identifikovana kao ‘kupina’, ‘cvekla’ i ‘skupljanje usta’ kvantifikovani su sa intenzitetom 59,6, 54,0 i 44,7, redom. Sa najmanjim intenzitetom kvantifikovana su senzorska svojstva identifikovana kao ‘gorko’ (32,2), ‘kokos’ (31,7), ‘karanfilić’ (18,8), ‘sirće’ (17,3), ‘slatko’ (16,7), ‘jorgovan’ (10,1) i ‘slano’ (7,5). ‘Perzistencija’ (postojanost) soka od zove kantifikovana je sa 80,1. Identifikacijom i kvantifikacijom 16 senzorskih svojstava soka od zove u potpunosti je urađena senzorska karakterizacija ovog proizvoda, odnosno definisan je senzorski profil matičnog soka od zove.



Radar dijagram 4.1. Senzorski profil matičnog soka

4.3.1.6. Stepen senzorske prihvatljivosti matičnog soka

Prihvatljivosti izgleda, ukusnosti, osjećaja u ustima, ukusa koji ostaje u ustima i ukupne prihvatljivosti matičnog soka od zove koji su dobijeni senzorskim testiranjem potrošača prikazani su u Tabeli 4.15. Izračunate srednje ocene za prihvatljivost izgleda, ukusnosti, osećaja u ustima, ukusa koji ostaje u ustima i za ukupnu prihvatljivost iznosile su: 7,4 (između umereno mi se dopada i veoma mi se dopada), 5,7 (između niti mi se dopada - niti mi se ne dopada i malo mi se dopada), 6,1 (između malo mi se dopada i umereno mi se dopada), 5,9 (između niti mi se dopada - niti mi se ne dopada i malo mi se dopada) i 6,1 (između malo mi se dopada i umereno mi se dopada), redom. Sve srednje ocene za prihvatljivost soka od zove numerički su veće od kategorije niti mi se dopada - niti mi se ne dopada, odnosno veće su od indiferentnog (neutralnog) stava potrošača, tako da se može konstatovati da ocene potrošača pokazuju da im se sok od zove dopada - u manjem ili većem stepenu.

Tabela 4.15. Senzorska prihvatljivost matičnog soka od zove od strane potrošača

Prihvatljivost izgleda	Prihvatljivost ukusnosti	Prihvatljivost osećaja u ustima	Prihvatljivost ukusa koji ostaje u ustima	Ukupna prihvatljivost
7,4	5,7	6,1	5,9	6,1

4.3.1.7. Senzorska ocena boje matičnog soka

Prema NCS atlasu boja (Natural Color System®© - The international language of colour communication™, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden, www.ncscolour.com), metodom konsenzusa ocenjivača, boja soka od zove vizuelno je identifikovana kao boja S 5040-R20B karta u boji (Slika 4.4), što je samo još jedna karakteristika ovog proizvoda koja dodatno doprinosi boljem definisanju senzorskog profila soka od zove.



Slika 4.4. S 5040-R20B karta u boji

4.3.2. Vino od plodova zove

4.3.2.1. Hemijski sastav vina

Četiri tipa vina koja su dobijena od plodova zove pri različitim temperaturnim tretmanima u različitim vremenskim intervalima su analizirana sa ciljem određivanja kvaliteta dobijenog proizvoda. Rezultati ispitivanja hemijskog sastava vina od zove su prikazani u Tabeli 4.16.

Tabela 4.16. Hemijski sastav vina od plodova zove

Parametri	BTT	60 °C, 5 min.	60 °C, 10 min.	70 °C, 5 min.
Relativna gustina	1,03±0,02 ^a	1,03±0,02 ^a	1,03±0,01 ^a	1,03±0,02 ^a
Etanol (% , v/v)	1,41±0,01 ^c	2,21±0,02 ^b	2,17±0,01 ^b	2,35±0,03 ^a
pH vrednost	4,11±0,01 ^a	4,00±0,00 ^a	4,06±0,02 ^a	4,19±0,01 ^a
Isparljive kiseline (g/l)	0,75±0,02 ^a	0,46±0,01 ^c	0,49±0,02 ^c	0,60 ±0,02 ^b
Organske kiseline (mg/ml)				
Jabučna kiselina				
Sirćetna kiselina	5,52±0,04 ^a	5,20±0,02 ^b	4,87±0,05 ^c	4,93±0,03 ^c
Limunska kiselina	0,023±0,003 ^a	0,019±0,001 ^c	0,021±0,001 ^{a,b}	0,022±0,001 ^{a,b}
	1,04 ±0,01 ^a	0,82±0,03 ^c	0,74±0,02 ^d	0,90±0,03 ^b
Sadržaj glukoze (mg/ml)	0,61±0,23	<LoD	<LoD	<LoD
Ukupni ekstrakt (g/l)	78,20±3,05 ^b	82,90±2,78 ^a	77,70±2,51 ^b	76,90±2,43 ^b
Suva materija (% , m/m)	6,90±0,42 ^{a,b}	7,22±0,56 ^a	6,75±0,48 ^b	6,79±0,51 ^b
Metanol (mg/l)	503,97±7,98 ^a	519,44±6,48 ^a	404,65±9,67 ^b	500,05±5,50 ^a
Ukupni sumpor dioksid (mg/l)	67,20±1,53 ^a	46,08±1,07 ^b	69,76±0,30 ^a	43,84±1,28 ^c
Mineralne materije (mg/l)				
Na	10,28±0,42 ^c	14,20±0,55 ^c	16,77±0,68 ^b	19,48±0,80 ^a
K	5225,62±628,48 ^b	5742,00±690,59 ^a	5597,45±673,20 ^a	5657,14±680,38 ^a
Mg	327,95±4,26 ^c	345,29±4,54 ^{a,b}	354,82±4,72 ^a	370,58±5,03 ^a
Ca	175,45±3,66 ^d	204,01±3,85 ^b	214,66±3,93 ^a	185,84±3,71 ^c
Fe	3,65±0,21 ^c	4,12±0,27 ^b	4,63±0,32 ^a	4,58±0,30 ^a
Cu	0,95±0,11 ^c	1,12±0,13 ^a	1,12±0,15 ^a	1,03±0,10 ^b
Mn	2,12±0,05 ^d	2,24±0,06 ^c	2,52±0,06 ^b	2,76±0,07 ^a
Zn	1,12±0,06 ^b	0,92±0,04 ^c	1,12±0,05 ^b	1,57±0,09 ^a
Cr	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a
Sn	0,06±0,01 ^d	0,07±0,01 ^c	0,15±0,02 ^b	0,25±0,03 ^a
Ni	0,04±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b	0,04±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-d) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

<LoD (limit detekcije).

Jedan od pokazatelja složenih hemijskih i fizičko-hemijskih promena u vinu je relativna gustina. Vrednosti relativne gustine zavise od sadržaja alkohola, šećera i ukupnog ekstrakta u vinu. Relativna gustina za četiri tipa vina od zove je 1,03. Dobijena vrednost je malo veća u odnosu na vrednosti koje su propisane pravilnikom za vino od grožđa, ali su u skladu sa vrednostima relativne gustine za voćna vina (Sl. glasnik RS, 107/2014).

Sadržaj alkohola je jedan od ključnih parametara koji utiče na kvalitet vina. Kao glavni proizvod alkoholne fermentacije, sadržaj etil alkohola u ispitivanim vinima od zove je u opsegu 1,41-2,35%. Niži sadržaj alkohola je zapažen u uzorku vina koji nije izložen toplotnom tretmanu, dok je najveći procenat alkohola utvrđen kod vina koje je toplotno tretirano temperaturom 70 °C u toku 5 minuta. Vina koja su toplotno tretirana imala su veći sadržaj alkohola, pa se pretpostavlja da je usled temperaturnog tretmana povećan sadržaj alkohola zbog fermentacije zaostalog šećera. Temperaturni tretman u trajanju od 5 minuta na 60 i 70 °C rezultovao je povećanjem sadržaja alkohola u vinu, što se može objasniti uticajem kvasaca, odnosno njihove aktivnosti u toku fermentacije.

pH vrednost vina koje nije izloženo uticaju temperature je bila 4,11. Izlaganjem vina temperaturnom tretmanu 60 °C toku 5 minuta i 60 °C u toku 10 minuta, vrednost pH vina se malo smanjila (4,00 i 4,06, redom), dok je temperaturni profil 70 °C u trajanju od 5 minuta uticao na blago povećanje pH vrednosti (4,19). Na osnovu statističke obrade dobijenih rezultata, utvrđeno je da razlika pH vrednosti između analiziranih vina nije statistički značajna.

Isparljive kiseline u vinu nastaju kao sekundarni proizvodi alkoholne fermentacije, a mogu se javiti naknadno kao posledica kvarenja vina. Osim uticaja na senzorska svojstva vina, isparljive kiseline predstavljaju indikator biološke stabilnosti. Rezultati analize su pokazali da je najveća koncentracija isparljivih kiselina primećena u vinu bez toplotnog tretmana (0,75 g/l), a zatim u vinu koje je izloženo uticaju temperature 70 °C u trajanju od 5 minuta (0,60 g/l). Vina koja su izložena uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta i 10 minuta imala su niži sadržaj isparljivih kiselina (0,46 i 0,49 g/l), koje se statistički nisu značajno razlikovale. Sam proces alkoholne fermentacije, kao i vrsta i soj kvasaca koji su uključeni u proces fermentacije vina utiču na stvaranje isparljivih kiselina (posebno sirćetne kiseline). Isparljive kiseline se u vinu mogu obrazovati u toku čuvanja vina, uticajem kiseonika i usled oksidacije etanola (Schelezki i sar., 2020).

Organske kiseline koje su najčešće prisutne u voćnim vinima su jabučna, limunska i sirćetna kiselina. Njihova koncentracija se menja tokom razvoja plodova voća, što zavisi od stepena zrelosti plodova, vrmenskih uslova i alkoholne fermentacije (Zeravik i sar., 2016). Prisustvo jabučne kiseline je u najvećoj koncentraciji uočeno u vinu koje nije izloženo temperaturnom tretmanu. Usled uticaja temperature sadržaj jabučne kiseline u vinu od zove se smanjio. Podaci iz literature ukazuju da tokom sazrevanja plodova voća, a posebno usled toplih perioda, sadržaj jabučne kiseline se smanjuje, pa su dobijeni rezultati u saglasnosti sa literaturnim navodima (Del Torno-de Román i sar., 2013). Limunska kiselina je dominantna kiselina u vinu koje nije izloženo uticaju

temperature, dok se njen sadržaj smanjuje u vinima koja su toplotno tretirana. Usled alkoholne fermentacije i delovanja temperature sadržaj organskih kiselina u vinu se smanjuje. Sirćetna kiselina je prisutna u vinima od zove u opsegu koncentracija 0,019-0,023 mg/ml, pa se nalazi u okvirima koji su propisani pravilnikom za voćna vina (Sl. list SCG, 24/2004).

Prisustvo šećera u vinu je jedino zapaženo kod vina koje nije izloženo uticaju temperature. Glukoza je detektovana u vinu bez toplotnog tretmana u koncentraciji 0,61 mg/ml. Ostali tipovi vina od zove ne sadrže šećere, pa se mogu okarakterisati da pripadaju suvim vinima.

Ukupan ekstrakt predstavljaju neisparljivi sastojci vina koji imaju veliki značaj u formiranju ukusa vina. Vino koje je tretirano temperaturom 60 °C u toku 5 minuta se odlikovalo najvećim sadržajem ukupnog ekstrakta 82,90 g/l. Između ostalih vina ne postoji statistički značajna razlika, a vrednosti se kreću od 76,90 do 78,20 g/l. Viša temperatura i duže vreme trajanja temperaturnog tretmana uzrokuju smanjenje ukupnog ekstrakta, što pokazuje da delovanjem temperature 60 °C u trajanju od 5 minuta dovodi do povećanja ukupnog ekstrakta u vinu od zove.

U okviru hemijskog sastava vina od plodova zove ispitan je i sadržaj suve materije. Najveći i statistički najznačajniji procenat suve materije zabeležen je u vinu koje je izloženo uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta (7,22%), niži procenat suve materije je uočen u vinu koje nije izloženo temperaturnom tretmanu (6,90%), dok je sadržaj suve materije u vinima temperaturnog profila 60 °C i 10 minuta i 70 °C i 5 minuta iznosio 6,75 i 6,79%, redom, između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika.

Koncentracija metanola u vinu bez toplotnog tretmana je iznosila 503,97 mg/l, ali se usled delovanja temperature 60 i 70 °C koncentracija metanola povećala. Najveća koncentracija metanola je detektovana u vinu koje je izloženo uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta (519,44 mg/l), dok je koncentracija metanola u vinu temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta iznosila 500,05 mg/l i između ova tri tipa vina nije utvrđena statistički značajna razlika. Najniža koncentracija metanola izmerena je u vinu koje je dobijeno delovanjem temperature 60 °C u toku 10 minuta (404,65 mg/l), pa se može zaključiti da se sadržaj metanola u vinu smanjuje sa povećanjem vremena temperaturnog tretmana. Pošto metanol nastaje razgradnjom pektina, pretpostavlja se da su pektinske materije u najvećoj meri uticale na prisustvo metanola u ispitivanim vinima. Prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića maksimalna dozvoljena koncentracija metanola u voćnim vinima je 250 mg/l (Sl. list SCG, 24/2004). Naučne studije su pokazale da voćna vina dobijena od trešnje (335 mg/l), kruške (691 mg/l) i šljive (504 mg/l) imaju veći sadržaj metanola u odnosu na vina od grožđa (Francot i Geoffroy, 1956).

Ukupni sumpor dioksid predstavlja sredstvo koje olakšava proizvodnju i čuvanje vina, olakšava izolovanje biljnih pigmenta iz plodova voća, sprečava aktivnost nekih mikroorganizama. Međutim, sumpor dioksid ima i neželjena dejstva ukoliko je njegova koncentracija u vinu premašena. Povećano prisustvo sumpor dioksida negativno utiče na miris i ukus vina, onemogućava transformaciju jabučne u mlečnu kiselinu, nakon oslobađanja u želucu prelazi u krvotok i oduzima kiseonik, vezuje se za vitamin B₁ (Li, Guo i Wang, 2008).

Pored napora da se zameni drugim konzervansom sumpor dioksid je ostao nezaobilazan u vinarstvu. Sumpor dioksid je najviše prisutan u vinu od zove koje je 10 minuta izloženo delovanju temperature 60 °C (69,76 mg/l), dok je najniža vrednost zabeležena u vinu koje je bilo izloženo temperaturi 70 °C u trajanju od 5 minuta (43,84 mg/l). Kada je temperaturni tretman duže trajao sadržaj sumpor dioksida se povećavao, u odnosu na vino bez toplotog tretmana. Uticaj vremena tretmana na sadržaj sumpor dioksida u vinu se može povezati sa dužinom trajanja temperaturnog tretmana. Izloženost vina uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta smanjio je sadržaj sumpor dioksida (46,08 mg/l).

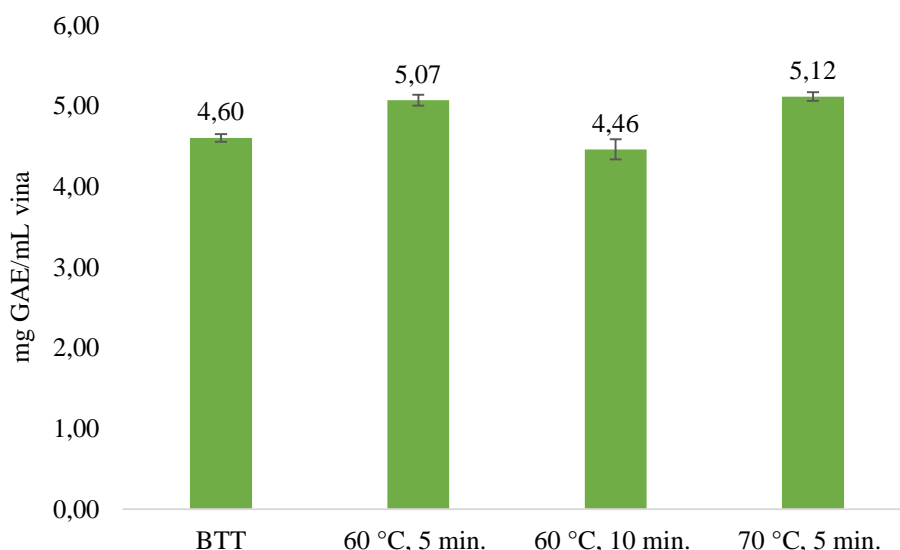
Zbog nemogućnosti organizma da sintetiše mineralne materije, neophodne količine za pravilno funkcionisanje organa se obezbeđuju putem ishrane. Konzumacijom vina kao prehranbenog proizvoda i „novog terapijskog agensa” obezbeđuje se potrebna količina minerala za normalno odvijanje fizioloških i biohemijskih procesa. Minerali u vinu od zove potiču od ploda, jer rast i razvoj biljka zahteva određenu količinu minerala, koje biljka usvaja iz zemljišta.

Analizom mineralnog profila vina od zove utvrđeno je da je kalijum najdominantniji mineral. U manjoj koncentraciji su zastupljeni magnezijum, kalcijum i natrijum. Vino izloženo temperaturnom tretmanu 60 °C u toku 5 minuta se pokazalo kao najbolji izvor kalijuma (5742,00 mg/l), dok su vrednosti kalijuma u vinima koja su tretirana temperaturom 70 °C u toku 5 minuta i 60 °C u toku 10 minuta iznosile 5657,14 i 5597,45 mg/l, redom, između kojih nije utvrđena statistički značajna razlika. Vino bez toplotnog tretmana je imalo najniži sadržaj kalijuma (5225,62 mg/l). Povećanje temperature i vremena trajanja temperaturnog tretmana vina od zove olakšalo je oslobađanje mineralnih materija iz plodova ove biljne vrste, koja predstavlja veoma bogat izvor kalijuma. Najzastupljeniji mikroelementi u vinu od zove su gvožđe, mangan i cink. Složenost interakcija i promena koje nastaju tokom uticaja temperature na vina od zove dovele su do varijacija u njihovom sadržaju. Povećanjem temperature biodostupnost pojedinih minerala u vinima se povećala u odnosu na vino koje nije toplotno tretirano. Ova pojava se može objasniti da temperature 60 i 70 °C pozitivno utiču na oslobađanje mikro- i makroelemenata iz biljne sirovine, usled narušavanja strukture ćelije temperaturnim tretmanom.

4.3.2.2. Fitohemijski sastav vina

4.3.2.2.1. Sadržaj ukupnih fenola i flavonoida

Vina imaju veoma složen fenolni sastav koji zavisi od vrste biljne sirovine koja se koristi za dobijanje vina, ali takođe i od primenjenih tehnologija za dobijanje vina i enoloških postupaka analize vina (Baiano i sar., 2009). Prisustvo fenolnih jedinjenja u vinu od grožđa i voćnim vinima utiče na biološke i funkcionalne karakteristike vina. Sadržaj ukupnih fenola u vinu od zove je prikazan na Histogramu 4.30 i u Prilogu 7.11, Tabela 30.



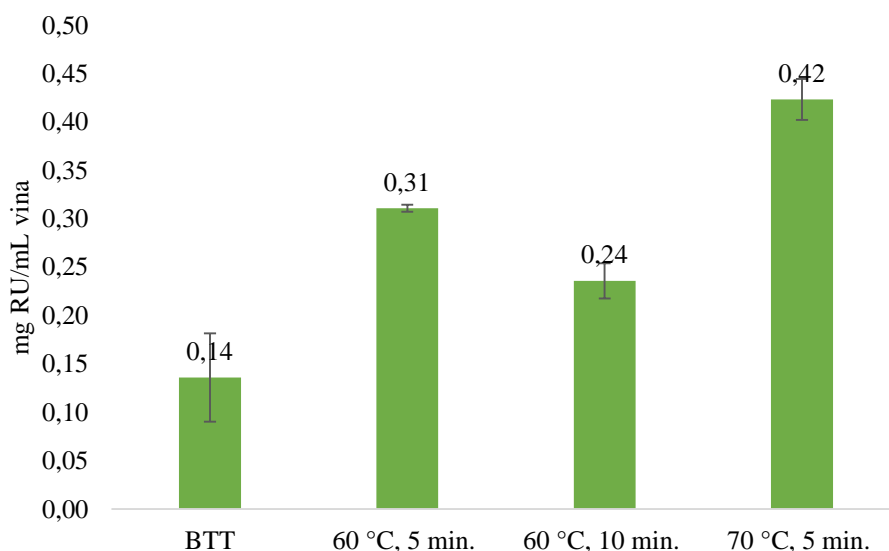
Histogram 4.30. Sadržaj ukupnih fenola u vinima od plodova zove

Sadržaj ukupnih fenola u vinima od zove se povećao kada je reč o temperaturnim profilima 70 i 60 °C u trajanju od 5 minuta (5,12 i 5,07 mg GAE/ml vina, redom) i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja između ova dva tipa vina se statistički značajno ne razlikuje. Vino koje nije izloženo uticaju temperature odlikuje se manjim sadržajem ukupnih fenola (4,60 mg GAE/ml vina), dok je najniža koncentracija ukupnih fenola zapažena kod vina koje je izloženo delovanju temperature 60 °C u trajanju od 10 minuta (4,46 mg GAE/ml vina), pa se pretpostavlja da je duži temperaturni tretman uticao na smanjenje ukupnih fenolnih molekula u vinu. Veće prisustvo ukupnih fenola u vinima koja su izložena uticaju temperaturnog tretmana u trajanju od 5 minuta ukazuje da je na povišenim temperaturama efikasnije izolovanje fenolnih jedinjenja iz biljne vrste *S. nigra* u odnosu na izdvajanje ukupnih fenola bez uticaja temperature, jer temperatura pospešuje odvijanje reakcija između biološki aktivnih molekula prisutnih u vinu. Može se primetiti da se sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja smanjuje sa povećanjem vremena izloženosti vina temperaturnom tretmanu. Smatra se da produženo delovanje temperature na vino uzrokuje degradaciju fenolnih

komponentata koje nisu toplotno stabilne, pa se sadržaj ukupnih fenola u vinu smanjuje. Temperature 70 i 60 °C utiču na isti način na osobađanje ćelijskog sadržaja iz biljnog materijala.

Za industrijsku primenu i proizvodnju vina od plodova zove ovaj rezultat je značajan kako bi se pronašao optimalan i najprihvatljiviji način dobijanja vina.

Sadržaj ukupnih flavonoida u vinima od zove prikazan je na Histogramu 4.31 i u Prilogu 7.11, Tabela 31.

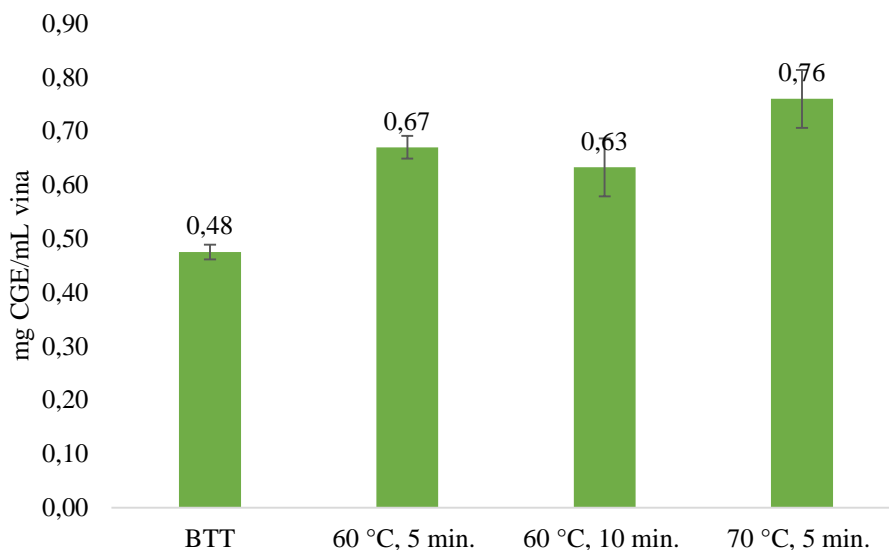


Histogram 4.31. Sadržaj ukupnih flavonoida u vinima od plodova zove

Prisustvo ukupnih flavonoida prati isti trend kao i kod sadržaja ukupnih fenola. Vina izložena uticaju temperature 70 i 60 °C u trajanju od 5 minuta, predstavljaju najbolji izvor ukupnih flavonoida (0,42 i 0,31 mg RU/ml vina, redom). Niži sadržaj ukupnih flavonoida je zabeležen u vinu koje je tretirano temperaturom 60 °C u trajanju od 10 minuta (0,24 mg RU/ml vina). Uticaj temperature na vino od zove u toku 10 minuta smanjuje prisustvo ukupnih flavonoida. Flavonoidi koji su otporni na temperaturu 60 °C kada su duže izloženi dejstvu temperature podležu različitim hemijskim reakcijama u toku kojih dolazi do transformacije i narušavanja njihove strukture, što prati smanjenje ove grupe fenolnih jedinjenja u ispitivanom vinu. Očekivano je da sadržaj ukupnih flavonoida bude najniži u vinu koje nije izloženo uticaju temperature (0,14 mg RU/ml vina), jer nisu obezbeđeni adekvatni uslovi na kojima bi moglo doći do ekstrakcije flavonoida iz korišćenog biljnog materijala.

4.3.2.2.2. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana

Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u vinima od zove prikazan je na Histogramu 4.32 i u Prilogu 7.11, Tabela 32.



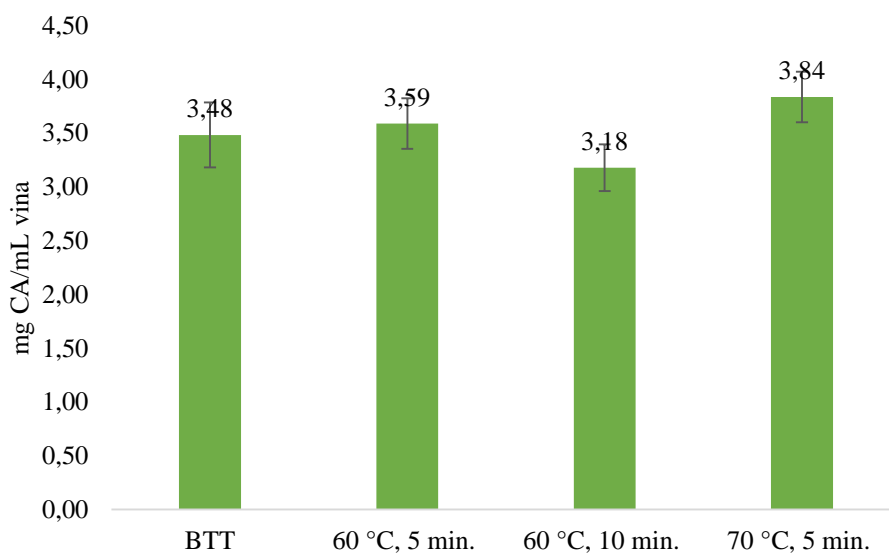
Histogram 4.32. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u vinima od plodova zove

Rezultati analize su pokazali da je vino od zove koje je tretirano temperaturom 70 °C u toku 5 minuta najbolji izvor monomernih antocijana (0,76 mg CGE/ml vina), dok su u ostali uzorci vina odlikovali nižim koncentracijama ovih biljnih pigmenata. Vino koje je izloženo uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta je veoma dobar izvor antocijana (0,67 mg CGE/ml vina) i statističkom obradom podataka utvrđena je statistički značajna razlika u odnosu na vino čiji tretman je trajao 10 minuta na temperaturi 60 °C (0,63 mg CGE/ml vina). Uzorak vina koji nije izložen dejstvu temperature se očekivano karakteriše najnižim sadržajem antocijana (0,48 mg CGE/ml vina).

Izolovanje monomernih antocijana iz plodova zove počinje još u predfermentativnoj fazi maceracije, i od prisustva antocijana u koži plodova zavisi njihova koncentracija u dobijenom vinu. Ekstrakcija antocijana je jednostavna, zbog njihove lokalizacije u plodu. Međutim, mehanička oštećenja plodova mogu da dovedu do smanjenja sadržaja ovih polifenolnih jedinjenja. Osim mehaničkih oštećenja, na prisustvo antocijana u vinu u velikoj meri utiču temperatura u toku maceracije, sadržaj alkohola, kiseonik i prisustvo sumpor dioksida. Odsustvo delovanja temperature na uzorak vina koji je imao najnižu koncentraciju monomernih antocijana objašnjava se uticajem uslova maceracije, gde izolovanje ovih biljnih pigmenata nije potpomognuto delovanjem temperature.

4.3.2.2.3. Sadržaj ukupnih tanina

Sadržaj ukupnih tanina u vinu od zove prikazan je na Histogramu 4.33 i u Prilogu 7.11, Tabela 33.



Histogram 4.33. Sadržaj ukupnih tanina u vinima od plodova zove

Analizirana vina su imala sličan sadržaj ukupnih tanina i statističkom obradom dobijenih rezultata utvrđeno je da između njih ne postoji statistički značajna razlika. Najniža koncentracija tanina prisutna je u vinu čiji je temperaturni profil zasnovan na delovanju temperature 60 °C u toku 10 minuta (3,18 mg CE/ml vina). Količina tanina u vinu zavisi od vrste voća koje se koristi za preradu i dobijanje vina, dužine kontakta s kožicom u fermentaciji i prisustva peteljki plodova. Pošto je kožica bobičastih plodova bogata taninima, pretpostavlja se da je u toku fermentacije vina od zove došlo do oslobađanja veće količine tanina, bez obzira na uticaj temperature. Osim što utiču na senzorska svojstva vina, tanini kao biološki aktivna jedinjenja mogu da obezbede održanje kvaliteta vina, pa na taj način deluju na funkcionalne karakteristike proizvoda.

4.3.2.2. Polifenolni profil vina

U cilju karakterizacije vina od zove i procene bioloških i funkcionalnih karakteristika urađen je fitohemijski skrining fenolnih jedinjenja koja su prisutna u dobijenom proizvodu. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Fitohemijski skrining vina od plodova biljne vrste *S. nigra*

Sadržaj kvantifikovanih polifenolnih jedinjenja (µg/ml)				
Fenolna jedinjenja	Vina			
	BTT	60 °C, 5 min.	60 °C, 10 min.	70 °C, 5 min.
<i>p</i> -OH benzoeva kis.	42,96±1,68 ^a	40,96±3,01 ^{a,b}	38,68±1,53 ^b	39,47±0,11 ^b
Protokatehinska kis.	52,46±4,20 ^a	24,21±1,94 ^b	20,60±1,65 ^c	20,03±1,60 ^c
2,5-dihidroksibenzoeva kis.	2,21±0,18 ^c	2,42±0,19 ^b	2,24±0,18 ^c	2,65±0,21 ^a
<i>p</i> -kumarinska kis.	0,61±0,05 ^b	0,50±0,05 ^b	0,50±0,05 ^b	1,39±0,13 ^a
Galna kis.	0,93±0,08 ^b	<LoD	0,55±0,05 ^b	5,36±0,48 ^a
Kafena kis.	4,86±0,00 ^a	0,60±0,04 ^c	0,58±0,04 ^c	1,04±0,07 ^b
Hinska kis.	1674,77±167,48 ^c	2053,98±205,40 ^a	1915,77±191,58 ^b	966,45±96,64 ^d
Hlorogenska kis.	17,67±0,32 ^b	24,86±3,44 ^a	14,35±0,64 ^{b,c}	11,13±2,97 ^c
Ursolna kis.	0,34±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,16±0,01 ^d	0,70±0,02 ^a
Eskuletin	0,68±0,04 ^a	0,35±0,02 ^c	0,54±0,03 ^b	0,28±0,02 ^d
Naringenin	0,42±0,03 ^b	0,56±0,04 ^a	0,39±0,03 ^c	0,41±0,03 ^b
Epikatehin	1,96±0,20 ^b	1,85±0,18 ^b	1,55±0,16 ^c	3,36±0,34 ^a
Kvercetin	43,35±3,00 ^c	149,48±14,84 ^a	69,94±2,98 ^b	158,89±17,67 ^a
Izoramnetin	0,54±0,03 ^d	1,85±0,11 ^a	0,99±0,06 ^c	1,71±0,10 ^b
Kempferol-3- <i>O</i> -glukozid	0,65±0,03 ^b	0,77±0,03 ^a	<LoD	0,49±0,02 ^c
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	17,67±0,32 ^b	24,86±3,44 ^a	14,35±0,64 ^b	11,13±2,97 ^c
Rutin	4,20±0,13 ^c	3,77±0,11 ^c	12,27±0,37 ^b	52,71±1,58 ^a
Kempferol	0,28±0,02 ^c	2,63±0,18 ^a	0,92±0,06 ^b	2,82±0,20 ^a

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene različitim slovima (a-d) značajno se razlikuju ($p \leq 0,05$).

<LoD (limit detekcije).

LC-MS/MS analizom vina od zove utvrđeno je prisustvo 18 fenolnih jedinjenja (8 fenolnih kiselina, ursolna kiselina i 9 flavonoida). Dominantne fenolne kiseline u vinu od zove su *p*-hidroksibenzoeva kiselina, protokatehinska kiselina i hlorogenska kiselina. Protokatehinska i *p*-hidroksibenzoeva kiselina su prisutne u većim koncentracijama od hlorogenske kiseline. Sadržaj protokatehinske kiseline u vinu bez toplotnog tretmana je 52,46 µg/ml, dok je koncentracija *p*-hidroksibenzoeve kiseline 42,96 µg/ml. *p*-hidroksibenzoeva kiselina je pokazala veću stabilnost prilikom temperaturnog tretmana od protokatehinske kiseline, jer se koncentracija *p*-hidroksibenzoeve kiseline smanjuje usled dejstva temperature, ali ne u velikoj meri, kao sadržaj protokatehinske kiseline. Povećanjem temperature i vremena trajanja temperaturnog tretmana, u vinima zove zabeležen je dva puta niži sadržaj protokatehinske kiseline. Smanjeni sadržaj ove fenolne kiseline je utvrđen sledećim redosledom: temperaturni profil 60 °C i 5 minuta (24,21 µg/ml), temperaturni profil 60 °C i 10 minuta (20,60 µg/ml) i temperaturni profil 70 °C i 5 minuta (20,03 µg/ml). Isti trend prati i *p*-hidroksibenzoeva kiselina, s tim da se uticajem temperature 60 °C u toku 5 minuta koncentracija ove fenolne kiseline (40,96 µg/ml) nije statistički značajno razlikovala od koncentracije koja je detektovana u vinu koje nije izloženo dejstvu temperature (42,96 µg/ml). Dužim temperaturnim tretmanom, 10 minuta na temperaturi 60 °C (38,68 µg/ml) i višom temperaturom, 70 °C u toku 5 minuta (39,47 µg/ml), u vinu od zove se statistički značajno smanjuje prisustvo *p*-hidroksibenzoeve kiseline u poređenju sa vinom koje nije izloženo dejstvu temperature. Kada je reč o hlorogenskoj kiselini dejstvo temperature 60 °C u toku 5 minuta pozitivno utiče na izdvajanje hlorogenske kiseline iz plodova zove u procesu dobijanja vina, pa je koncentracija hlorogenske kiseline u ovom tipu vina od zove veća (24,86 µg/ml) u odnosu na koncentraciju koja je utvrđena u uzorku vina bez toplotnog tretmana (17,67 µg/ml). Sa povećanjem temperature i vremena izloženosti temperaturnom tretmanu, prisustvo hlorogenske kiseline se smanjuje, posebno na temperaturi 70 °C u toku 5 minuta (11,13 µg/ml). Od prisutnih fenolnih kiselina u vinima od zove, jedino se koncentracija hlorogenske kiseline povećala prilikom uticaja temperature 60 °C u toku 5 minuta i omogućena je bolja izolacija iz biljne sirovine, dok je kod ostalih detektovanih fenolnih kiselina uočeno smanjenje sadržaja povećanjem temperature i vremena temperaturnog delovanja, što ukazuje da njihova hemijska struktura nema veliku otpornost i da se narušava kada dođe do promene ambijentalnih uslova.

Za razliku od fenolnih kiselina ostvareni rezultati su pokazali da su flavonoidi ispoljili veću temperaturnu stabilnost. Od detektovanih flavonoida u vinima od zove, dominantni flavonoidi su: kvercetin, kvercetin-3-*O*-heksozid i rutin.

Najveća koncentracija kvercetina uočena je u vinima koja su izložena uticaju temperature 60 i 70 °C u trajanju od 5 minuta (149,48 i 158,89 µg/ml, redom), dok je najniža koncentracija zabeležena u uzorku vina koji nije toplotno tretiran (43,35 µg/ml). Vremenski period od 10 minuta i temperatura 60 °C uticali su na smanjenje koncentracije kvercetina (69,94 µg/ml), pa se pretpostavlja da duže vreme izlaganja temperaturnom tretmanu dovodi do narušavanja strukture kvercetina i smanjenja njegovog prisustva u ispitivanom uzorku.

Povećanje koncentracije kvercetina nakon temperaturnog tretmana 60 i 70 °C u trajanju od 5 minuta može se objasniti stabilnošću ovog flavonoida na višim temperaturama i pozitivnim uticajem temperature na efikasniju izolaciju kvercetina iz plodova zove u toku fermentacije vina, ali u toku kraćeg vremenskog perioda.

Za razliku od kvercetina, njegov heksozid je pokazao manju temperaturnu stabilnost, pa se prisustvo kvercetin-3-O-heksozida smanjuje povećanjem temperature i vremena izloženosti vina od zove temperaturnom tretmanu. Temperatura 60 °C u trajanju od 5 minuta se pokazala kao najbolji uslov na kome dolazi do efikasnog izolovanja heksozida kvercetina (24,86 µg/ml), dok se povećanjem temperature i vremena delovanja temperaturnog tretmana sadržaj kvercetina u vinu od zove smanjuje, kod temperaturnog profila 60 °C i 10 minuta 14,35 µg/ml, a kod temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta 11,13 µg/ml, u odnosu na vino koje nije izloženo dejstvu temperature (17,67 µg/ml).

Za izolovanje pojedinih fenolnih komponenata neophodno je obezbediti veću temperaturu kako bi se podstakla hemijska reakcija u cilju efikasnije ekstrakcije prirodnih proizvoda, a da se izbegne njihova degradacija. Rutin je flavonoid čija se struktura ne narušava i usled dejstva temperature 100 °C. U ispitivanom vinu od zove koncentracija rutina se povećava sa povećanjem temperature i vremena izloženosti temperaturnom uticaju. Vino koje je izloženo uticaju temperature 70 °C u toku 5 minuta predstavlja najbogatiji izvor rutina (52,71 µg/ml), dok je vino dobijeno bez uticaja temperature najsiromašniji izvor rutina (4,20 µg/ml). Uticaj temperature 60 °C u toku 5 minuta i 10 minuta rezultovao je postepenim povećanjem rutina u vinu (3,77 i 12,27 µg/ml).

Kada je reč o terpenskim biomolekulima, uočeno je da temperatura utiče na njihovo prisustvo. U tom slučaju temperatura 60 °C u trajanju od 5 i 10 minuta dovodi do smanjenja koncentracije ursolne kiseline u vinu u odnosu na vino koje nije izloženo dejstvu temperature (0,34 µg/ml). Veće smanjenje koncentracije ove triterpenske kiseline zapaženo je nakon 10 minuta temperaturnog tretmana od 60 °C (0,16 µg/ml), dok je sadržaj ursolne kiseline u vinu dobijenom usled dejstva temperature 60 °C u toku 5 minuta iznosio 0,26 µg/ml. Dobijeni rezultat ukazuje da su se u toku tehnološkog postupka vinifikacije, u fazi maceracije pored terpenskih jedinjenja ekstrahovala i fenolne komponente, polisaharidi, azotna jedinjenja i mineralne materije koji mogu da predstavljaju ometajuće faktore u procesu izolovanja ursolne kiseline. Povećanjem temperature na 70 °C pretpostavlja se da je došlo do degradacije ostalih metabolita i da je ursolna kiselina najbolje izolovana na primenjenoj temperaturi. Izloženost vina delovanju temperature 70 °C u trajanju od 5 minuta rezultovalo je povećanim sadržajem ursolne kiseline (0,70 µg/ml), što ukazuje da povećanjem temperature dolazi do boljeg ekstrahovanja ove triterpenske kiseline iz plodova zove, ali da vremenski period temperaturnog tretmana ne bude duži od 5 minuta.

Hinska kiselina kao organska kiselina u vinima od zove je detektovana u opsegu koncentracija 966,45-2053,98 µg/ml. Naučne publikacije su utvrdile da hinska kiselina ispoljava antiviralnu, citotoksičnu, antioksidativnu aktivnost (Lee i sar., 2013), što pozitivno utiče na njeno prisustvo u vinima od zove, jer na taj način doprinosi i boljoj bioaktivnosti dobijenog proizvoda. Takođe, hinska kiselina je indikator prisustva fenolnih jedinjenja, pa visoke koncentracije ove kiseline u vinima od zove ukazuju na prisustvo jedinjenja koja nisu obuhvaćena ovim istraživanjem.

Sadržaj fenolnih jedinjenja u vinu od zove, pored temperaturnog dejstva zavisi i od odnosa čvrste i tečne faze kljuka, intenziteta muljanja plodova zove, prisustva kiseonika, alkohola, sumpor dioksida, kao i od kvasca (Morata i sar., 2003). Izbor kvasca u toku procesa vinifikacije može da utiče na koncentraciju nekih grupa fenolnih jedinjenja (Gil-Muñoz i sar., 2010). Tokom čuvanja dobijenog vina dolazi do različitih strukturnih transformacija fenolnih jedinjenja koje nastaju u toku oksidacionih i kondenzacionih reakcija. U cilju povećanja sadržaja fenolnih jedinjenja u vinima, pribegava se modifikaciji dobijanja vina i uvode se nove tehnike kao što su zaleđivanje šire, dodatak peteljki ili semenki plodova upotrebljene biljne sirovine, kao i produžene maceracije i termovinifikacije (Gris i sar., 2011). Poređenjem rezultata sadržaja fenolnih jedinjenja koja su detektovana u vinu od zove u okviru ove doktorske disertacije sa podacima iz literature, zapaža se razlika u sadržaju fenolnih jedinjenja. U vinu od zove koje je analizirala grupa naučnika Schmitzer i sar. (2010) uočava se manji broj detektovanih fenolnih jedinjenja. Hlorogenska kiselina, rutin i kvercetin su dominantna jedinjenja, dok ostale fenolne komponente nisu detektovane. Koncentracija hlorogenske kiseline i rutina je veća u vinu koje je ispitano od strane pomenute istraživačke grupe, dok je koncentracija kvercetina veća u vinima od zove koja su ispitana u okviru ove doktorske disertacije. Razlike koje se javljaju u sadržaju fenolnih jedinjenja između vina koja potiču od iste biljne sirovine mogu se objasniti različitom pripremom vina, odsustvom temperaturnog tretmana u studiji Schmitzer i sar. (2010) kao i različitim stepenom zrelosti ploda i uticajem različitih klimatskih uslova. Zajednička karakteristika je da su ista jedinjenja dominantna u biljnoj vrsti *S. nigra* koja raste na geografski različitim predelima.

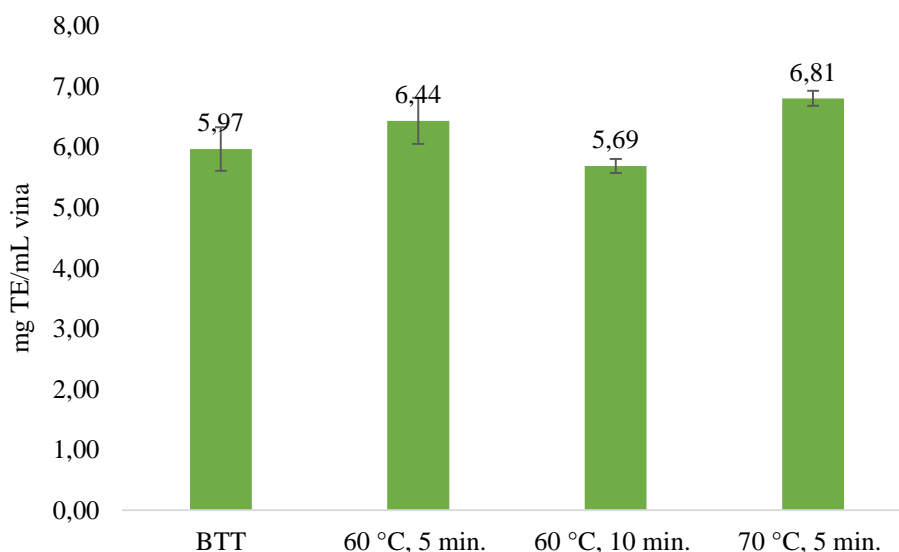
Ispitivanje biološkog dejstva fenolnih jedinjenja je u fokusu mnogih naučnih studija, zbog njihove sposobnosti da inhibiraju proliferaciju ćelija tumora (Kim i sar., 2013), sprečavanja inflamacije (Kleemann i sar., 2011) i neutralizacije slobodnih radikala (Caddeo i sar., 2019). Prisustvo fenolnih kiselina i flavonoida u vinima od zove je od izuzetnog značaja, zbog njihovog biološkog potencijala. Zbog potencijalnih zdravstvenih efekata protokatehinske kiseline, *p*-hidroksibenzoeve kiseline, hlorogenske kiseline, ursolne kiseline, kvercetina, kvercetin-3-*O*-heksozida i rutina u prehrambenoj industriji se sve više koriste biljne sirovine bogate fenolnim molekulima u cilju njihove eksploatacije i dobijanja različitih proizvoda sa dodatom vrednošću. Karakterizacija polifenolnog profila vina od zove je od izuzetnog značaja, jer je utvrđeno prisustvo komponenata koje imaju blagotvorno dejstvo na funkcionisanje organizma, pa se vino od zove može posmatrati kao prehrambeni proizvod koji potencijalno ima karakteristike funkcionalnog proizvoda.

4.3.2.3. Biološke i funkcionalne karakteristike vina

4.3.2.3.1. Antioksidativna aktivnost

Sposobnost neutralizacije slobodnog DPPH• radikala

Četiri tipa vina dobijena od plodova zove kao bogati izvori sekundarnih metabolita analizirana su u sposobnosti neutralizacije slobodnog radikala primenom DPPH testa, a rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.34 i u Prilogu 7.12, Tabela 34.

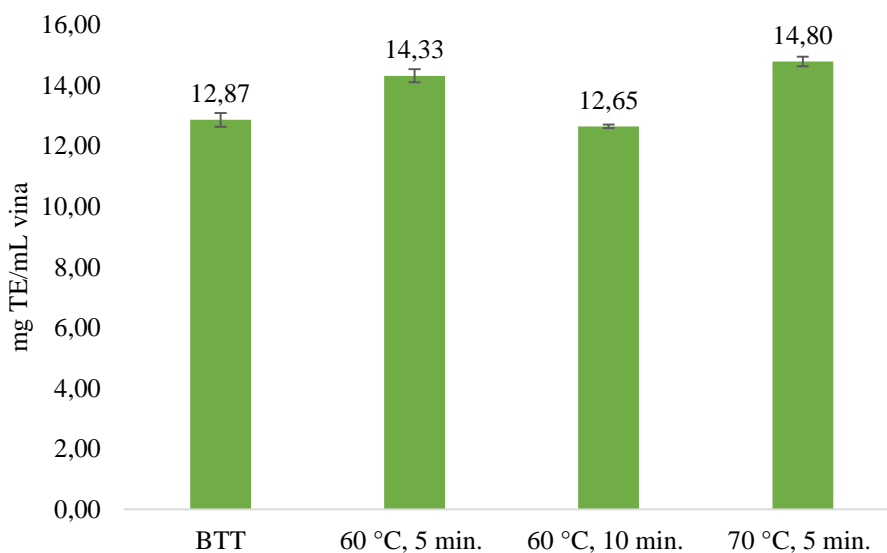


Histogram 4.34. Sposobnost vina od plodova zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala

Vina od plodova zove imaju veoma dobru sposobnost u procesu neutralizacije slobodnog DPPH• radikala. Najveći potencijal u neutralizaciji slobodnog radikala imala su vina koja su izložena delovanju temperature 70 i 60 °C u trajanju od 5 minuta (6,81 i 6,44 mg TE/ml vina, redom) i između njih nema statistički značajne razlike. Sa druge strane, vino koje nije podvrgnuto temperaturnom tretmanu i vino koje je izloženo delovanju temperature 60 °C u trajanju od 10 minuta su pokazali niži kapacitet neutralizacije slobodnog radikala (5,97 i 5,69 mg TE/ml vina, redom) i između ova dva tipa vina nije utvrđena statistički značajna razlika. Objašnjenje ovakvog rezultata se temelji na pretpostavci da je uticaj temperature pogodan za izdvajanje aktivnih principa vina, ali do određenog stepena, pa se može primetiti da je temperaturni tretman u trajanju od 5 minuta obezbedio bolji rezultat, dok su odsustvo temperature ili izloženost temperaturi u trajanju od 10 minuta ostvarili niži rezultat, zbog čega se smatra da je duže delovanje temperaturnog tretmana dovelo do degradacije termolabilnih jedinjenja prisutnih u vinu, a odsustvo uticaja temperature kod vina koje nije temperaturno tretirano onemogućilo je izdvajanje aktivnih principa iz unutrašnjosti biljne ćelije i na taj način doprinelo krajnjoj slici bioloških karakteristika vina.

Sposobnost neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala

Antioksidativni potencijal vina je ispitan i u procesu neutralizacije slobodnog ABTS^{•+} radikala, a dobijeni rezultati su prikazani na Histogramu 4.35 i u Prilogu 7.12, Tabela 35.



Histogram 4.35. Sposobnost vina od plodova zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala

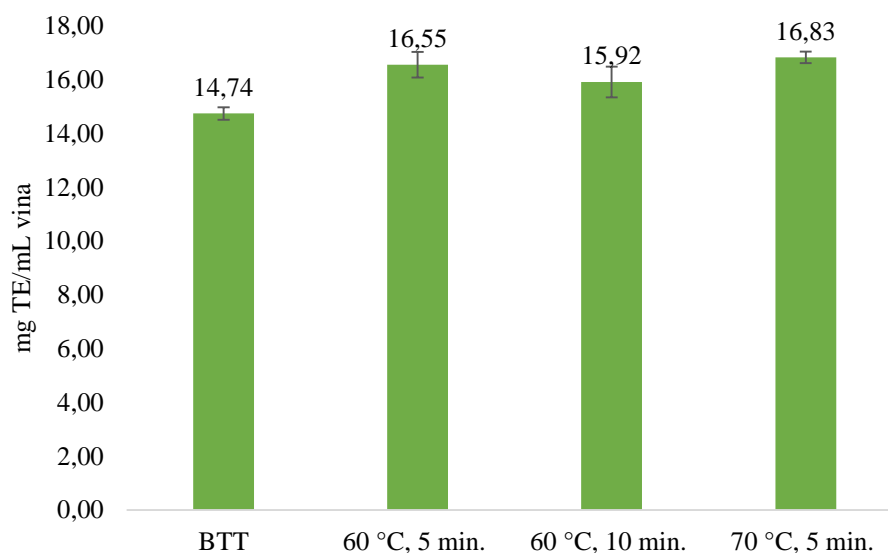
Najbolju sposobnost doniranja elektrona slobodnom ABTS^{•+} radikalu pokazalo je vino koje je dobijeno usled dejstva temperature 70 °C u toku 5 minuta (14,80 mg TE/ml vina), dok je značajno niži kapacitet imalo vino koje je dobijeno usled dejstva temperature 60 °C u toku 5 minuta (14,33 mg TE/ml vina). Vino koje je dobijeno bez primene temperaturnog tretmana i vino koje je tretirano temperaturom 60 °C u trajanju od 10 minuta su takođe pokazali osobine prirodnih antioksidanasa, s tim da je ostvaren niži rezultat (12,87 i 12,65 mg TE/ml vina, redom) u pogledu neutralizacije ABTS^{•+} radikala. Na osnovu statističke obrade dobijenih rezultata, kod ova dva tipa vina nije utvrđena statistički značajna razlika.

I u ovom slučaju je dokazana tvrdnja da su odsustvo temperaturnog tretmana i delovanje temperature 60 °C u trajanju od 10 minuta uzrokovali najnižu antioksidativnu sposobnost vina. Prisustvo sekundarnih metabolita u ispitivanim vinima se smanjuje usled dužeg temperaturnog tretmana, a što se ogleda u konačnom rezultatu ispitivanog biološkog kapaciteta.

Redukciona sposobnost

Sposobnost redukcije Fe^{3+} jona

Procena redukcionne sposobnosti vina od zove utvrđena je primenom FRAP testa, a rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.36 i u Prilogu 7.12, Tabela 36.



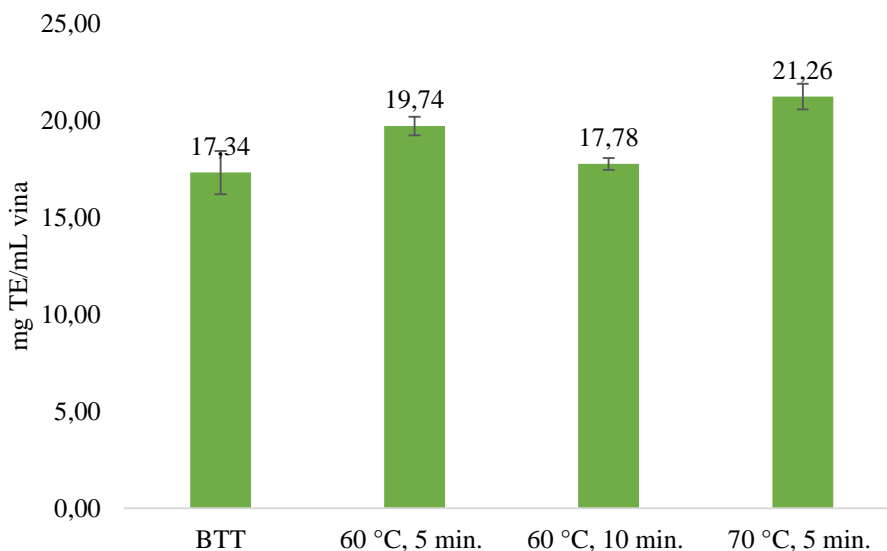
Histogram 4.36. Sposobnost vina od plodova zove u procesu redukcije Fe^{3+} jona

Najbolji redukcionni potencijal prema Fe^{3+} jonu ispoljila su vina izložena uticaju temperature 60 i 70 °C u trajanju od 5 minuta (16,83 i 16,55 mg TE/ml vina, redom) i statističkom obradom ostvarenih rezultata utvrđeno je da dobijene vrednosti redukcije ne pokazuju statistički značajnu razliku. Temperaturni tretman vina na uslovima 60 °C u toku 10 minuta je ispoljilo nižu redukcionu moć prema Fe^{3+} jonu (15,92 mg TE/ml vina), u odnosu na vina koja su temperaturno tretirana u toku 5 minuta, ali je bolji redukcionni agens od uzorka vina koji nije izložen uticaju temperature (14,74 mg TE/ml vina).

Pretpostvalja se da na dobijeni rezultat u velikoj meri doprinose polarne fenolne komponente koje su identifikovane u fenolnom skriningu (kvercetin, rutin, hlorogenska kiselina, protokatehinska kiselina). Ova činjenica ukazuje i da je odabir načina za dobijanje vina iz plodova biljne vrste *S. nigra* od izuzetnog značaja, jer se uticajem temperature ubrzava odvijanje hemijskih procesa.

Sposobnost redukcije Cu^{2+} jona

Procena redukcionne sposobnosti vina od zove utvrđena je i primenom CUPRAC testa, a rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.37 i u Prilogu 7.12, Tabela 37.



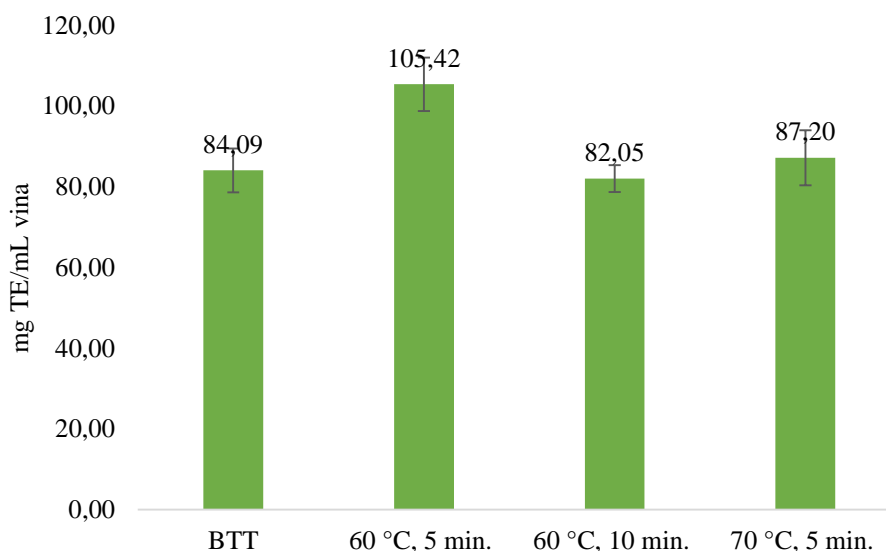
Histogram 4.37. Sposobnost vina od plodova zove u procesu redukcije Cu^{2+} jona

Ispitivanje antioksidativnog kapaciteta vina od zove zasnovano na redukciji Cu^{2+} jona rezultovalo je posebno izdvajanjem vina koja su izložena uticaju temperature 70 i 60 °C u trajanju od 5 minuta (21,26 i 19,74 mg TE/ml vina, redom). Dobijene vrednosti redukcije Cu^{2+} jona ne pokazuju statistički značajne razlike između ova dva tipa vina. Vino izloženo uticaju temperature 60 °C u trajanju od 10 minuta, ostvarilo je niži redukcionni potencijal (17,78 mg TE/ml vina), ali dobijena vrednost se statistički značajno ne razlikuje od redukcionne vrednosti koju je ostvarilo vino dobijeno bez uticaja temperaturnog tretmana (17,34 mg TE/ml vina).

Ostvareni redukcionni potencijal vina od zove u slučaju redukcije Cu^{2+} jona rezultovao je praćenjem rezultata ostvarenih u redukciji Fe^{3+} jona. Kada se uporedi redukcionni potencijal vina primenom dva različita testa, uočava se da je jači redukcionni potencijal vino od zove ostvarilo u procesu redukcije Cu^{2+} jona, dok je niži redukcionni kapacitet ostvaren u procesu redukcije Fe^{3+} jona.

Neutralizacija •NO radikala

U cilju evaluacije antioksidativne aktivnosti ispitana je sposobnost vina od zove u procesu neutralizacije •NO slobodnog radikala. Rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.38 i u Prilogu 7.12, Tabela 38.



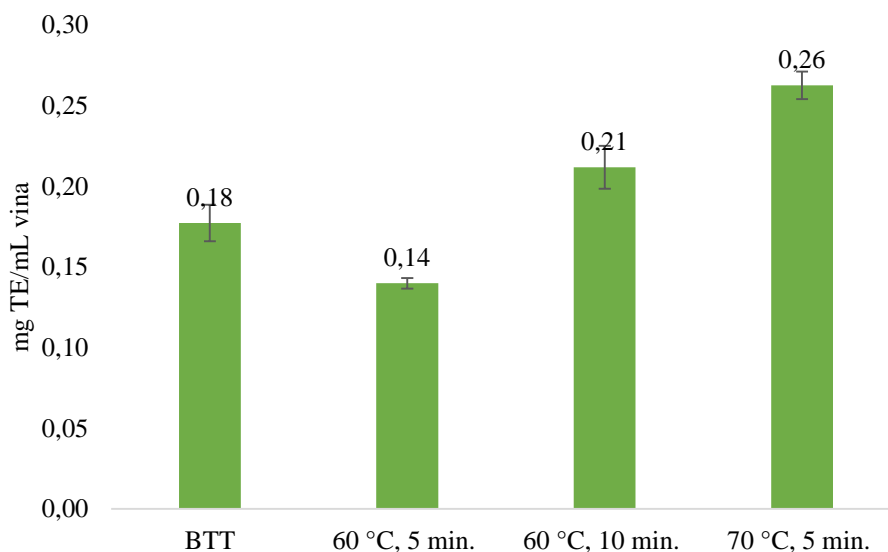
Histogram 4.38. Sposobnost vina od plodova zove u procesu neutralizacije •NO radikala

Uopšteno, svi uzorci vina od zove su se posebno istakli kada je u pitanju neutralizacija •NO slobodnog radikala. Uzorak vina koji je izložen dejstvu temperature 60 °C u toku 5 minuta je ispoljio najbolju moć neutralizacije •NO radikala (105,42 mg TE/ml vina), te je na taj način pokazao statistički značajno bolju aktivnost od ostalih uzoraka vina. Inhibitorni kapacitet uzoraka vina izloženih uticaju temperatura 60 °C u trajanju od 10 minuta, 70 °C u trajanju od 5 minuta i vina koje nije temperaturno tretirano kretao se u opsegu koncentracija 82,05-87,20 mg TE/ml vina i statističkom obradom dobijenih rezultata između njih nije utvrđena statistički značajna razlika.

Kod neutralizacije •NO radikala može se primetiti izdvajanje uzorka vina koje je tretirano temperaturom 60 °C u trajanju od 5 minuta, što predstavlja optimalan tehnološki parametar primenjen za dobijanje vina od zove. Modifikacijom parametara u procesu dobijanja nekog prehrambenog proizvoda može se uticati na biopotencijal ispitivanog proizvoda. U ovom slučaju promenom tehnoloških parametara, smanjuje se kapacitet proizvoda da neutrališe •NO radikal. U poređenju sa vinom koje nije temperaturno tretirano može se uočiti da se uticajem temperature poboljšavaju biološke i funkcionalne karakteristike dobijenog vina.

Lipidna peroksidacija

U pogledu ispitivanja prehrambenih proizvoda, određivanjem antioksidativnog statusa u biološkim sistemima može da se prati uticaj određenih prehrambenih proizvoda na oksidativni stres i doprinos u prevenciji različitih oboljenja čiji uzročnici su oksidativna oštećenja (Sánchez-Moreno, 2002). Imajući u vidu da vino od zove nije još uvek postalo komercijalni proizvod, sa idejom dobijanja statusa funkcionalnog proizvoda ispitana je sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije. Dobijeni rezultati istraživanja su prikazani na Histogramu 4.39 i u Prilogu 7.12, Tabela 39.

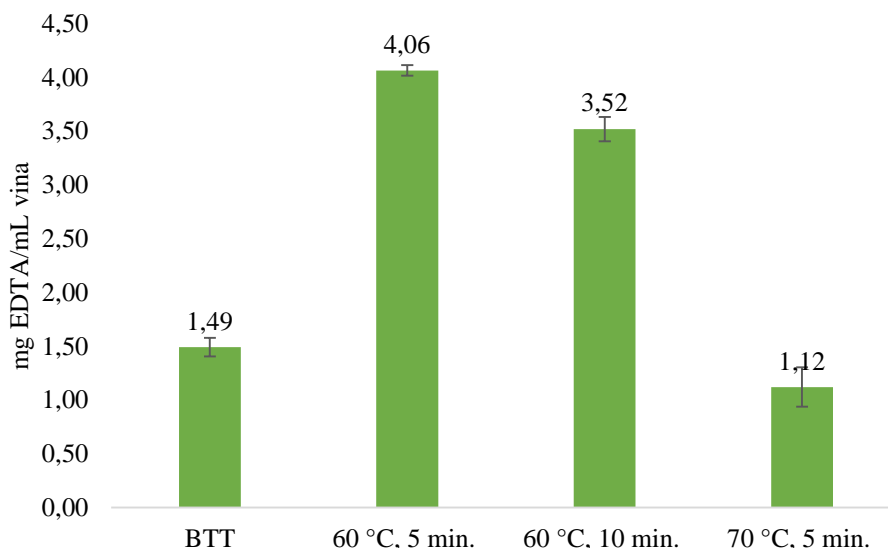


Histogram 4.39. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije lipidne peroksidacije

Uzorci vina od zove imaju sposobnost da inhibiraju proces lipidne peroksidacije, a posebno se ističe vino koje je izloženo dejstvu temperature 70 °C u trajanju od 5 minuta (0,26 mg TE/ml vina). Nešto nižu inhibiciju lipidne peroksidacije je ostvario uzorak vina na koji je delovala temperatura 60 °C u toku 10 minuta (0,21 mg TE/ml vina). U odnosu na prethodne testove primenjene za ispitivanje antioksidativnog potencijala, u slučaju lipidne peroksidacije vino koje je izloženo uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta realizovalo je najnižu inhibitornu moć (0,14 mg TE/ml vina), dok je uzorak vina koji nije toplotno tretiran imao veći potencijal da inhibira lipidnu peroksidaciju (0,18 mg TE/ml vina). Najniža sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije kod vina koje je tretirano temperaturom 60 °C u toku 5 minuta može se objasniti većim prisustvom termostabilnih flavonoida, fenolnih kiselina i triterpenske kiseline u vinu. Uzorak vina koji je podvrgnut tretmanu temperature 70 °C u trajanju od 5 minuta je imao dominantan sadržaj termostabilnih komponenata: rutina, kvercetina, epikatehina, ursolne kiseline i galne kiseline koji su u većoj koncentraciji ekstrahovani u ovom tipu vina što objašnjava i njegov najveći potencijal da inhibira proces lipidne peroksidacije.

Sposobnost heliranja jona metala

Antioksidativna aktivnost vina od zove je okarakterisana i određivanjem kapaciteta vina u procesu heliranja jona metala. Rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.40 i u Prilogu 7.12, Tabela 40.



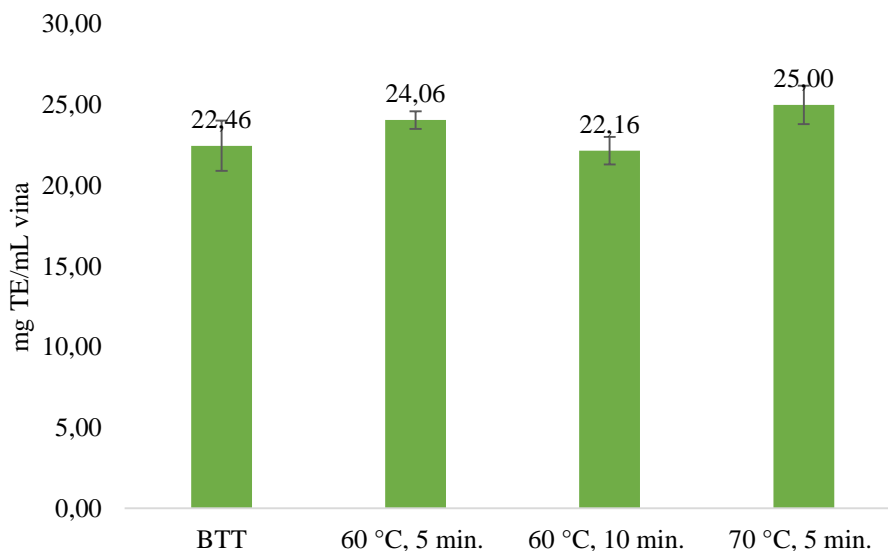
Histogram 4.40. Sposobnost vina od plodova zove u procesu heliranja jona metala

Analizom vina od zove u procesu heliranja jona metala utvrđen je drugačiji rezultat u odnosu na dosadašnje primenjene antioksidativne testove. Vino izloženo delovanju temperature 60 °C u toku 5 minuta se pokazalo kao najpotentniji agens u heliranju jona metala (4,06 mg EDTA/ml vina), zatim vino koje je tretirano temperaturom 60 °C u toku 10 minuta (3,52 mg EDTA/ml vina). U ovom slučaju vino koje je podvrgnuto dejstvu temperature 70 °C u toku 5 minuta je ostvarilo najnižu sposobnost heliranja jona metala (1,12 mg TE/ml vina).

Dobijeni rezultati ukazuju da za različite mehanizme antioksidativne aktivnosti pogoduju i različiti tehnološki postupci koji se primenjuju u pripremanju vina. Optimalni uslovi za efikasno heliranje jona metala podrazumeva temperaturni profil 60°C i 5 minuta. Produženjem vremena temperaturnog tretmana, smanjuje se potencijal heliranja jona metala, zbog kako se pretpostavlja narušavanja strukture fitohemijskih komponenata prisutnih u vinu i smanjenja njihovog biološkog potencijala. Takođe, povećanjem temperature za 10 stepeni i trajanju teperaturnog tretmana u istom vremenskom intervalu rezultuje značajnim smanjenjem biološkog kapaciteta. Rezistentnost prisutnih jedinjenja u vinu na različite temperaturne tretmane nije ista što je i dokazno u sprovedenom istraživanju.

Ukupna antioksidativna aktivnost

Rezultati ukupne antioksidativne aktivnosti vina od zove prikazani su na Histogramu 4.41 i u Prilogu 7.12, Tabela 41.



Histogram 4.41. Ukupna antioksidativna aktivnost vina od plodova zove

Vino od zove čiji je temperaturni profil 70°C i 5 minuta je ostvarilo najbolji ukupni antioksidativni potencijal (25,00 mg TE/ml vina). Veoma dobru ukupnu antioksidativnu aktivnost pokazao je uzorak vina tretiran temperaturom 60 °C u toku 5 minuta (24,06 mg TE/ml vina), dok je povećanjem vremena uticaja temperature 60 °C u toku 10 minuta došlo do smanjenja ukupnog antioksidativnog kapaciteta (22,16 mg TE/ml vina). Pretpostavlja se da je dužim temperaturnim tretmanom uzrokovana modifikacija hemijskih struktura biološki aktivnih jedinjenja koja utiču na ukupnu antioksidativnu aktivnost vina, stoga je antioksidativni kapacitet vina koje je izloženo dejstvu temperature 60 °C u toku 10 minuta manji od ukupne antioksidativne aktivnosti koju je realizovao uzorak vina bez uticaja toplotnog tretmana (22,46 mg TE/ml vina). Međutim, ostvarene vrednosti ukupne antioksidativne aktivnosti su obrađene zahvaljujući statističkoj analizi i utvrđeno je da razlika koja se javlja između vina izloženog dejstvu temperature 60 °C u toku 10 minuta i vina koje u toku pripreme nije temperaturno tretirano nije statistički značajna. Na osnovu rezultata statističke analize može se zaključiti da su i u ovom slučaju najbolji ukupni antioksidativni potencijal ostvarila vina za čije dobijanje su primenjeni temperaturni tretmani u dužini trajanja od 5 minuta.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u vinima od plodova zove i antioksidativne aktivnosti

U cilju utvrđivanja korelacije između sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih komponentata i ostvarenog antioksidativnog potencijala vina urađena je regresiona analiza, a rezultati su prikazani u Tabeli 4.18.

Tabela 4.18. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih komponentata u vinima od zove i antioksidativne aktivnosti

	Faktor determinacije R ²							
	DPPH•	ABTS ^{•+}	FRAP	CUPRAC	PM	HM	•NO	LP
Ukupni fenoli	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,79	0,99	0,95
Ukupni flavonoidi	0,91	0,91	0,90	0,92	0,90	0,68	0,89	0,90
Ukupni monomerni antocijani	0,98	0,98	0,98	0,99	0,98	0,79	0,97	0,95
Ukupni tanini	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,76	0,98	0,95
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,99	0,99	0,99	0,98	0,99	0,79	0,98	0,94
Hlorogenska kiselina	0,91	0,91	0,91	0,90	0,91	0,88	0,95	0,76
Protokatehinska kiselina	0,80	0,79	0,79	0,78	0,80	0,54	0,79	0,73
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	0,91	0,91	0,91	0,90	0,91	0,88	0,95	0,76
Rutin	0,49	0,49	0,47	0,51	0,48	0,15	0,41	0,63
Kvercetin	0,86	0,86	0,85	0,87	0,85	0,68	0,86	0,80

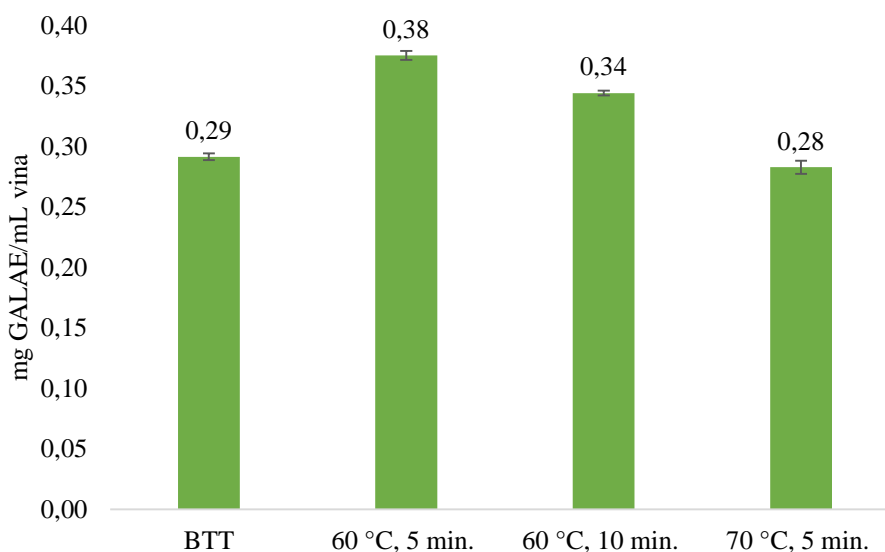
Rezultati regresione analize pokazuju da su ukupni fenoli u direktnoj korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću kod skoro svih primenjenih testova. Ukupni fenoli prisutni u vinu od zove pokazali su veoma dobru korelaciju sa inhibicijom lipidne peroksidacije, dok u procesu heliranja jona metala nisu ostvarili direktnu korelaciju. Ukupni flavonoidi su ostvarili dobru korelaciju sa antioksidativnim kapacitetom vina u svim primenjenim testovima. Ukupni monomerni antocijani su u direktnoj korelaciji sa redukcionim kapacitetom vina i veoma dobro koreliraju sa ostalim ispitanim antioksidativnim mehanizmima. Ukupni tanini su u direktnoj korelaciji sa antioksidativnim potencijalom kod većeg broja primenjenih antioksidativnih testova. Kada je u pitanju sposobnost inhibicije lipidne peroksidacije tanini iz vina od zove su u veoma dobroj korelaciji, dok se za sposobnost heliranja jona metala može reći da tanini dobro koreliraju. Regresionom analizom je utvrđeno da je *p*-hidroksibenzoeva kiselina ostvarila najbolju korelaciju u odnosu na ostala fenolna jedinjenja koja su dominantna u vinu od zove, kada je u pitanju antioksidativni potencijal. *p*-hidroksibenzoeva kiselina je u direktnoj korelaciji sa sposobnošću neutralizacije slobodnih radikala, redukcionim kapacitetom vina od zove, kao i ukupnom antioksidativnom aktivnošću. Regresiona analiza je pokazala da *p*-hidroksibenzoeva kiselina veoma dobro korelira sa neutralizacijom •NO slobodnog radikala i inhibicijom lipidne peroksidacije, a umereno korelira sa sposobnošću vina da helira jone metala. Hlorogenska kiselina najbolje korelira sa sposobnošću vina da neutrališe •NO radikal i dobro korelira kada je u pitanju neutralizacija slobodnih DPPH• i ABTS^{•+} radikala i redukcionim kapacitetom vina. Protokatehinska kiselina dobro korelira sa svim primenjenim mehanizmima antioksidativne aktivnosti. Kvercetin-3-*O*-heksozid je u veoma dobroj korelaciji sa antioksidativnim kapacitetom vina od zove, a najbolja korelacija je ostvarena sa

neutralizacijom •NO slobodnog radikala. Kvercetin i rutin koreliraju sa svim antioksidativnim mehanizmima analiziranog vina, s tim da je kvercetin ostvario bolju korelaciju od rutina.

4.3.2.3.2. Neuroprotektivna aktivnost

Inhibicija enzima AChE

Neuroprotektivna aktivnost vina od zove zasniva se na inhibiciji enzima AChE i BChE. Rezultati inhibicije enzima AChE su prikazani na Histogramu 4.42 i u Prilogu 7.13, Tabela 42.

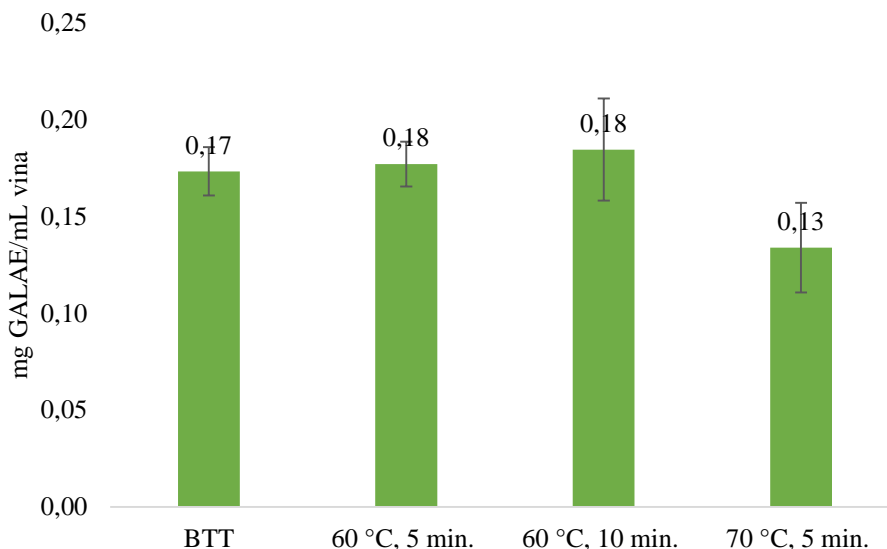


Histogram 4.42. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije AChE

Pripremljeno vino od zove je pokazalo da ima potencijal da smanji prekomernu aktivnost enzima AChE. Vino dobijeno delovanjem temperature 60 °C u toku 5 minuta je najpotentniji agens u inhibiciji ovog enzima (0,38 mg GALAE/ml vina). Uticaj iste temperature, ali u vremenskom periodu od 10 minuta dovelo je do smanjenja sposobnosti inhibicije enzima AChE (0,34 mg GALAE/ml vina). U slučaju povećanja temperature, a smanjenja vremena izloženosti uzorka temperaturnom tretmanu (70 °C u toku 5 minuta), takođe je dovelo do smanjenja neuroprotektivnog potencijala (0,28 mg GALAE/ml vina). U poređenju sa inhibitornim kapacitetom uzorka vina koje je pripremljeno bez temperaturnog tretmana (0,29 mg GALAE/ml vina) uočava se statistički značajna razlika između analiziranih tipova vina. Odabir pogodnih tehnoloških parametara u procesu proizvodnje vina u značajnoj meri utiče na sposobnost vina od zove da deluje kao terapijski agens i da smanjenjem prekomerne aktivnosti enzima AChE doprinese normalnom odvijanju kognitivnih funkcija.

Inhibicija enzima BChE

Rezultati inhibicije enzima BChE analizom četiri pripremljena vina od plodova zove prikazani su na Histogramu 4.43 i u Prilogu 7.13, Tabela 43.



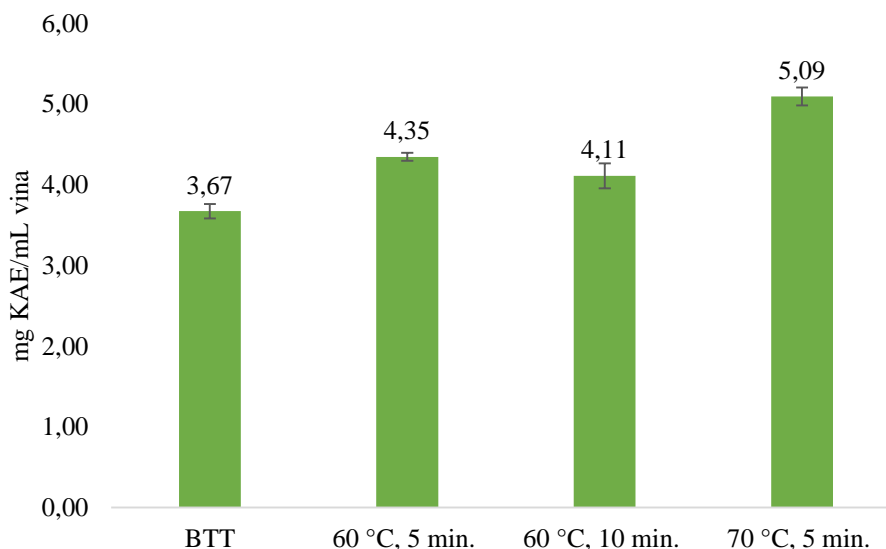
Histogram 4.43. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije BChE

Kada je u pitanju inhibicija BChE enzima svi uzorci vina su ostvarili veoma sličan rezultat, pa se inhibitorni potencijal kreće u opsegu koncentracija 0,13-0,18 mg GALAE/ml vina. Između uzoraka vina na koje je uticala temperatura 60 °C u toku 5 minuta i 10 minuta, kao i vina bez toplotnog tretmana, nije bilo statistički značajne razlike u smanjenju aktivnosti enzima. Statistički najniži inhibitorni potencijal realizovan je analizom vina izloženog dejstvu temperature 70 °C u toku 5 minuta (0,13 mg GALAE/ml vina). Ostvareni rezultati ukazuju da se povećanjem temperature smanjuje inhibitorni kapacitet vina od zove. Pretpostavlja se da se povećanjem temperature narušava hemijska struktura aktivnih principa koji se kao prirodni proizvodi vezuju za katalitičko mesto enzima i u najvećoj meri doprinose smanjenju njihove prekomerne enzimске aktivnosti. Pored odabranog tehnološkog postupka i procesnih parametara za dobijanje prehrambenih proizvoda, prisustvo različitih grupa bioaktivnih jedinjenja u proizvodima koja u svojoj strukturi poseduju različite funkcionalne grupe je od izuzetnog značaja za neuroprotektivnu aktivnost vina dobijenog od plodova zove.

4.3.2.3.3. Antitirozinazna aktivnost

Inhibicija enzima tirozinaze

Antitirozinazna aktivnost vina od zove zasniva se na inhibiciji enzima tirozinaze. Rezultati analize su prikazani na Histogramu 4.44 i u Prilogu 7.14, Tabela 44.



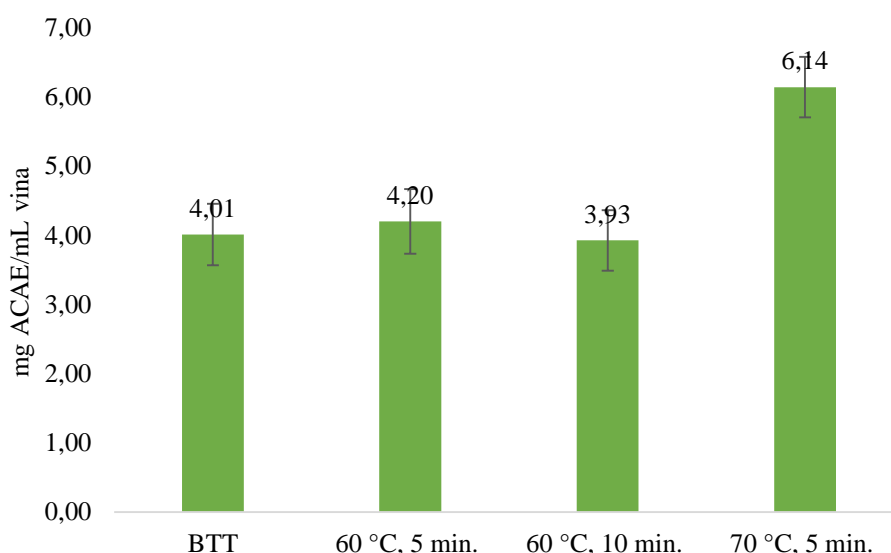
Histogram 4.44. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije tirozinaze

Vino od plodova zove je ostvarilo veoma jaku inhibitornu aktivnost prema enzimu tirozinazi. Tehnološki postupak koji je primenjen za dobijanje vina je u velikoj meri uticao na ostvareni rezultat. Temperaturni tretman na uslovima 70 °C u toku 5 minuta se u ovom slučaju pokazao kao najefikasniji način za dobijanje vina, jer je ovim uzorkom vina ostvarena najbolja inhibicija prekomernog delovanja enzima tirozinaze (5,09 mg KAE/ml vina). Smanjenjem temperature kojoj je vino izloženo na 60 °C opada i inhibitorna aktivnost vina. Vreme trajanja temperaturnog tretmana utiče na bioaktivni potencijal, jer je pri delovanju temperature 60 °C u toku 5 minuta ostvarena bolja aktivnost, u odnosu na uzorak vina koji je tretiran istom temperaturom u toku 10 minuta (4,35 i 4,11 mg KAE/ml vina, redom). Produženo trajanje temperaturnog tretmana smanjuje sposobnost vina da inhibira prekomernu aktivnost enzima tirozinaze. Uzorak vina koji nije toplotno tretiran pokazao se kao najslabiji inhibitor aktivnosti enzima tirozinaze (3,67 mg KAE/ml vina), što je i očekivano, jer je izostavljen uticaj temperature u toku dobijanja vina. U cilju efikasnijeg odvijanja maceracije u toku proizvodnje vina neophodno je obezbediti uticaj temperature kako bi se iz plodova biljne sirovine bolje ekstrahovale komponente koje su sastavni deo dobijenog proizvoda.

4.3.2.3.4. Antidijabetogena aktivnost

Inhibicija α -amilaze

Antidijabetogena aktivnost vina od zove zasniva se na inhibiciji enzima α -amilaze i α -glukozidaze. Rezultati analize inhibicije enzima α -amilaze su prikazani na Histogramu 4.45 i u Prilogu 7.15, Tabela 45.

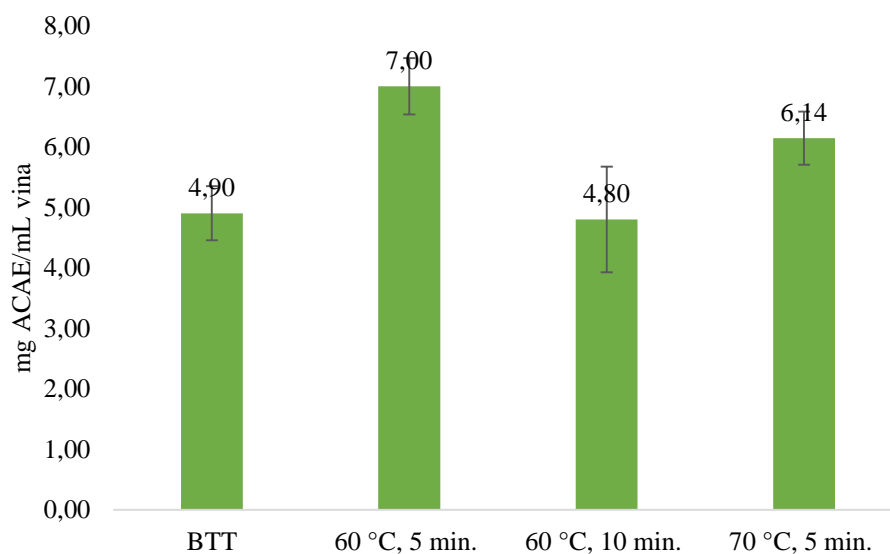


Histogram 4.45. Spособnost vina od plodova zove u procesu inhibicije α -amilaze

Analizom vina od zove u cilju evaluacije antidijabetogene aktivnosti utvrđeno je da pripremljeni uzorci vina predstavljaju veoma potentne agense kada je u pitanju inhibicija enzima α -amilaze. Temperaturni profil koji se zasniva na primeni temperature 70 °C u toku 5 minuta predstavlja najbolji tehnološki uslov za dobijanje vina, jer je pri ovim uslovima ostvarena najbolja inhibitorna moć prekomerne aktivnosti α -amilaze (6,14 mg ACAE/ml vina). Veoma dobru inhibitornu aktivnost je ispoljio i uzorak vina za čiju pripremu je primenjena temperatura 60 °C u toku 5 minuta (4,20 mg ACAE/ml vina), dok ja na istoj temperaturi, ali u trajanju od 10 minuta ostvaren niži inhibitorni kapacitet prema α -amilazi (3,93 mg ACAE/ml vina). Vrednost inhibicije koju je ostvario uzorak vina dobijen bez uticaja temperature je 4,01 mg ACAE/ml vina, što je veoma značajan inhibitorni potencijal, iako niz biohemijskih procesa nije potpomognut temperaturnim tretmanom. Poređenjem vrednosti koje su dobijene kao parametri antidijabetogene aktivnosti vina od zove, uočava se da temperatura 60 i 70 °C povoljno utiče na biopotencijal vina, ali produženjem trajanja temperaturnog tretmana, biopotencijal dobijenog proizvoda se smanjuje.

Inhibicija α -glukozidaze

Rezultati analize inhibicije enzima α -glukozidaze su prikazani na Histogramu 4.46 i u Prilogu 7.15, Tabela 46.



Histogram 4.46. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije α -glukozidaze

Vina koja su izložena dejstvu temperature 60 i 70 °C u periodu od 5 minuta ostvarila su veoma jak inhibitorski potencijal prema enzimu α -glukozidazi. Vino koje je izloženo uticaju temperature 60 °C u toku 5 minuta je ostvarilo najbolju sposobnost inhibicije α -glukozidaze (7,00 mg ACAE/ml vina), pa na taj način predstavlja veoma potentan agens u zaštiti organizma od razvoja dijabetesa. Niži inhibitorski potencijal ispoljilo je vino čiji je temperaturni profil 70°C i 5 minuta (6,14 mg ACAE/ml vina), što ukazuje da veća temperatura uzrokuje smanjenje antidiabetogene aktivnosti. Smanjenje antidiabetogene aktivnosti se nastavlja i prilikom tretiranja vina temperaturom 60 °C u toku 10 minuta (4,80 mg ACAE/ml vina), dok je kod vina koje nije izloženo dejstvu temperature zabeležen sličan inhibitorski potencijal prema α -glukozidazi (4,90 mg ACAE/ml vina). Statističkom analizom inhibitorskog potencijala utvrđeno je da se ova dva tipa vina statistički značajno ne razlikuju. Temperaturni profil 70 °C i 5 minuta je ostvario isti inhibitorski potencijal vina i prema enzimu α -amilazi i α -glukozidazi, dok su ostali temperaturni profili jaču antidiabetogenu aktivnost ostvarili kada je u pitanju inhibicija α -glukozidaze.

Poseban doprinos ovoj doktorskoj disertaciji daje evaluacija neuroprotektivne, antitirozinazne i antidiabetogene aktivnosti vina, jer je prvi put analiziran proizvod dobijen od biljne vrste *S. nigra* koja raste na području Balkanskog poluostrva, a koji još uvek nije komercijalno dostupan.

Regresiona analiza sadržaja ukupnih fenolnih komponenti i dominantnih jedinjenja u vinima od plodova zove i enzim inhibitorne aktivnosti

Uticaj ukupnih i pojedinačnih sekundarnih metabolita prisutnih u vinu od zove na smanjenje prekomerne aktivnosti odabranih enzima ispitan je primenom regresione analize, a rezultati su prikazani u Tabeli 4.19.

Tabela 4.19. Rezultati regresione analize između sadržaja ukupnih i pojedinačnih fenolnih komponenata u vinima od zove i sposobnosti inhibicije odabranih enzima

	Faktor determinacije R ²				
	AChE	BChE	Tirozinaza	α -amilaza	α -glukozidaza
Ukupni fenoli	0,98	0,97	0,99	0,97	0,98
Ukupni flavonoidi	0,86	0,81	0,94	0,95	0,92
Ukupni monomerni antocijani	0,96	0,93	0,99	0,98	0,98
Ukupni tanini	0,97	0,96	0,99	0,97	0,98
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,98	0,98	0,97	0,95	0,97
Hlorogenska kiselina	0,95	0,95	0,87	0,82	0,93
Protokatehinska kiselina	0,78	0,83	0,75	0,73	0,75
Kvercetin-3- <i>O</i> -heksozid	0,95	0,95	0,87	0,82	0,93
Rutin	0,37	0,33	0,55	0,63	0,46
Kvercetin	0,82	0,75	0,88	0,89	0,90

Rezultati regresione analize su pokazali da su ukupni fenoli u direktnoj korelaciji sa inhibicijom enzima tirozinaze i da veoma dobro koreliraju sa inhibicijom enzima AChE i BChE, kao i enzimima α -amilazom i α -glukozidazom. Ukupni flavonoidi veoma dobro koreliraju sa inhibicijom enzima α -amilaze, tirozinaze i α -glukozidaze, dok dobro koreliraju sa inhibicijom enzima AChE i BChE. Ukupni monomerni antocijani kao i ukupni fenoli su u direktnoj korelaciji sa inhibicijom enzima tirozinaze i veoma dobro koreliraju sa inhibicijom enzima koji su obuhvaćeni analizom. Takođe, i ukupni tanini su u direktnoj korelaciji sa inhibicijom enzima tirozinaze i ostvarili su veoma dobru korelaciju sa inhibicijom enzima koji učestvuju u kognitivnim funkcijama i inhibicijom enzima digestivnog trakta. *p*-hidroksibenzoeva kiselina je ostvarila najbolju korelaciju sa enzim inhibitornim potencijalom vina od zove u odnosu na ostale dominantne fenolne kiseline i flavonoide. *p*-hidroksibenzoeva kiselina je u veoma dobroj korelaciji sa inhibitornim potencijalom svih analiziranih enzima, dok hlorogenska kiselina veoma dobro korelira sa inhibicijom enzima AChE, BChE i α -glukozidazom, a u dobroj korelaciji je sa inhibicijom enzima tirozinaze i α -amilaze. Protokatehinska kiselina je u dobroj korelaciji sa enzim inhibitornom aktivnošću svih ispitivanih enzima. Kvercetin-3-*O*-heksozid je ostvario veoma dobru korelaciju sa inhibicijom AChE i BChE i α -glukozidazom, a takođe, veoma dobro korelira i sa procesom inhibicije enzima tirozinaze i α -amilaze. Osim kvercetin-3-*O*-heksozida i kvercetin veoma dobro korelira sa inhibicijom enzima α -glukozidaze, a dobro korelira i sa inhibicijom ostalih enzima. Rutin korelira sa inhibicijom analiziranih enzima, ali je korelacija manja u odnosu na ostala fenolna jedinjenja koja su dominantna u vinu od zove.

Istraživanje koje je sprovedeno na četiri tipa vina od zove, u okviru ove doktorske disertacije pokazalo je, da je vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta ostvarilo najbolje rezultate u pogledu hemijske i fitohemijske karakterizacije. Najveći sadržaj etanola i minerala utvrđen je kod vina dobijenog na uslovima koji podrazumevaju uticaj temperature 70 °C, u trajanju od 5 minuta. Takođe, ovaj tip vina se odlikovao i najnižim sadržajem organskih kiselina, što ga čini prihvatljivijim i manje kiselim od ostalih analiziranih vina. Uslovi na kojima je dobijeno vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta su se pokazali optimalnim u pogledu sadržaja ukupnih fenolnih molekula, kao i pojedinačnih fenolnih kiselina, flavonoida, ali i ursolne kiseline.

Kada je u pitanju antioksidativni potencijal, vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta je u većem broju sprovedenih *in vitro* antioksidativnih testova ostvarilo najbolji antioksidativni kapacitet.

U pogledu antitirozinazne i antidijabetogene aktivnosti vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta se pokazalo kao najbolje vino od plodova zove koje ima sposobnost da smanji prekomernu aktivnost enzima tirozinaze i enzima digestivnog sistema. Temperatura 70 °C podstiče odvijanje biohemijskih procesa u ubrzanje hemijskih reakcija, dok dužina trajanja temperaturnog tretmana od 5 minuta se pokazala optimalnom, jer se dužim izlaganjem delovanju temperature smanjuje sadžaj biomolekula.

4.3.3. Etarsko ulje ploda i cveta zove

Primarni i sekundarni metabolizam biljaka predstavljaju više različitih mehanizama i hemijskih reakcija, koji su povezani produkovanim metabolitima. Metaboliti koji se obrazuju u toku metaboličkih procesa su važni za rast, razvoj i reprodukciju živih organizama. Putevi regulacije metabolizma predstavljaju važno područje naučnih istraživanja, budući da su mnogi produkti sekundarnog biljnog metabolizma od vrlo velike važnosti, posebno za prehrambenu i farmaceutsku industriju. Etarsko ulje je proizvod sekundarnog metabolizma biljaka i svi delovi biljke sadrže različite količine etarskog ulja. Aromatična isparljiva jedinjenja su glavne komponente etarskog ulja koja mu daju karakterističan miris (Silvestre i sar., 2019). Hemijski sastav etarskog ulja izolovanog iz tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove prikazan je u Tabeli 4.20 i Tabeli 4.21.

Tabela 4.20. Hemijski sastav etarskog ulja dobijenog iz tradicionalno osušenih plodova zove

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Sadržaj (% m/m)
6,12	2-heksenol	5,19±0,21
7,09	4-heptin-3-ol	0,10±0,01
7,89	izopentil acetat	0,24±0,01
11,82	2-pentilfuran	0,33±0,02
11,93	ocimen	0,13±0,01
12,73	<i>p</i> -cimen	0,10±0,01
14,47	α -jonen	0,53±0,01
14,73	<i>cis</i> -roze oksid	0,41±0,01
15,04	<i>trans</i> -roze oksid	0,20±0,01
15,60	β -ciklocitral	1,63±0,06
16,46	etil kaprilat	3,22±0,26
16,57	β -jonen	4,46±0,17
17,93	2,5,5,8a-tetrametil-3,4,4a,5,6,8a-heksahidro-2H-hromen	5,20±0,16
18,44	linalil antranilat	24,15±2,31
20,74	α -terpineol	5,71±0,28
22,06	metil-hidrocinamat	1,66±0,07
22,55	β -damascenon	35,70±3,41
24,01	indan-4-karboksaldehid	2,45±0,15
25,82	5-metil-2-fenil-2-heksenal	8,58±0,26

±3SD.

Tabela 4.21. Hemijski sastav etarskog ulja dobijenog iz liofilizovanih plodova zove

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Sadržaj (% m/m)
10,50	limonen	0,04±0,01
11,77	2-pentilfuran	0,03±0,01
11,87	<i>cis</i> -β-ocimen	0,04±0,02
12,33	<i>trans</i> -β-ocimen	0,11±0,01
12,98	terpinolen	0,12±0,01
14,40	α-jonen	0,25±0,03
14,68	<i>cis</i> -roze oksid	0,12±0,01
14,98	<i>trans</i> -roze oksid	0,04±0,01
15,54	<i>trans-p</i> -menta-2,8-dienol	0,19±0,01
16,52	β-jonen	3,25±0,16
18,04	α-jonon	6,87±0,21
18,41	linalol	32,80±3,23
18,98	β-jonon	1,07±0,05
20,70	α-terpineol	9,59±0,18
22,51	β-damascenon	38,64±3,80
31,68	fitol	6,84±0,27

±3SD.

U etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova zove identifikovano je 19 komponenata, što je predstavljalo 99,99% etarskog ulja. Glavne komponente etarskog ulja tradicionalno sušenih plodova zove su: β-damascenon (35,70%), linalil antranilat (24,15%), 5-metil-2-fenil-2-heksenal (8,58%) i α-terpineol (5,71%).

U etarskom ulju liofilizovanih plodova zove identifikovano je 16 komponenata, što je predstavljalo 100% sastava etarskog ulja. Dominantno jedinjenje u etarskom ulju liofilizovanih plodova je takođe β-damascenon (38,64%), u nešto nižem procentu je prisutan linalol (32,80%). α-terpineol je zastupljen u procentu 9,59%, dok su α-jonon i fitol zabeleženi u procentu 6,87% i 6,84%, redom.

U etarskom ulju tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove dominantne komponente pripadaju ketonima ruža. Damascenoni i jononi su jedinjenja koja se nalaze u različitim etarskim uljima, uključujući i ulje ruža. Značajno doprinose aromi ruža, uprkos relativno niskoj koncentraciji i važne su hemijske supstance koje se koriste u parfimeriji (Leffingwell i Alford, 2005), a dobijaju se razgradnjom karotenoida.

Sedam istih komponenata je identifikovano u etarskom ulju tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove (2-pentilfuran, α-jonen, *cis*-roze oksid, *trans*-roze oksid, β-jonen, α-terpineol i β-damascenon). Izuzev α-terpineola i β-damascenona, ostala identifikovana jedinjenja su u većem procentu identifikovana u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova zove u poređenju sa hemijskim sastavom etarskog ulja liofilizovanih plodova zove.

Razlika u sadržaju pojedinih komponenata u etarskom ulju nastaje usled uticaja samog procesa hidrodestilacije, kao i uslova pod kojima se proces odvijao. Najveći prinos etarskog ulja se očekuje na početku hidrodestilacije, dok temperatura ne postane konstantna i dok ne dođe do uspostavljanja ravnoteže (Milojević i sar, 2008). Mehanizam hidrodestilacije je usko povezan sa anatomijom plodova bobičastog voća i njihovim stepenom usitnjenosti. Plodovi bobičastog voća u svojoj strukturi sadrže etarsko ulje, a sitnjenjem se razara struktura plodova i oslobađa se etarsko ulje na površinu čestice biljnog materijala. Ulje koje je dospelo na površinu čestice se brzo odnosi parom koja se obrazuje u toku destilacije i taj period u hidrodestilaciji je označen kao brza hidrodestilacija. Sitnjenjem plodova bobičastog voća nije u potpunosti obezbeđena izolacija etarskog ulja iz unutrašnjih delova biljnog materijala, pa je zbog toga difuzija etarskog ulja otežana i ovaj period hidrodestilacije je označen kao spora hidrodestilacija (Milojević, 2011). Razlika u sadržaju aromatičnih komponenata etarskog ulja potiče i od nemogućnosti regulacije temperature. Termolabilna aromatična jedinjenja podležu degradaciji usled uticaja temperature ključanja, osim hidrodestilacije na sastav etarskog ulja utiče i odabrana tehnika sušenja biljne sirovine. Komponente prisutne u etarskom ulju liofilizovanih plodova zove su u većem procentu zastupljene u odnosu na komponente koje se nalaze u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova zove. Poređenjem tehnika sušenja jasno se uočava razlika i efikasnost liofilizacije u odnosu na tradicionalan način sušenja, kao i veći udeo jedinjenja u etarskom ulju liofilizovanih plodova. Liofilizacijom se utiče na očuvanje strukture plodova, samim tim i na njihov hemijski sastav, što je povezano i sa kvalitetom osušene sirovine.

Osim ploda, za dobijanje etarskog ulja u okviru ove doktorske disertacije, korišćen je i tradicionalno osušen cvet zove, a rezultati istraživanja su prikazani u Tabeli 4.22.

Tabela 4.22. Hemijski sastav etarskog ulja dobijenog iz tradicionalno osušenog cveta zove

Retenciono vreme	Naziv jedinjenja	Sadržaj (% (m/m))
8,44	α -pinen	0,01 \pm 0,01
8,94	3-penten-2-ol	0,03 \pm 0,01
10,94	2-pentilfuran	0,06 \pm 0,02
13,07	4-pentin-2-ol	2,93 \pm 0,02
13,98	<i>cis</i> -roze oksid	4,20 \pm 0,05
14,28	<i>trans</i> -roze oksid	2,09 \pm 0,02
14,78	1,2-metil-1,4-pentadien	0,39 \pm 0,01
14,94	1-undecin	4,78 \pm 0,04
15,86	linalol oksid	0,84 \pm 0,02
16,37	3,6-dihidro-4-metilpiran	0,84 \pm 0,02
16,45	1,3-izopentil-ciklopenten	0,31 \pm 0,01
17,16	benzopiran	5,89 \pm 0,07
17,78	linalil antranilat	5,48 \pm 0,05
18,43	kariofilen	6,55 \pm 0,10
20,05	α -terpinol	2,97 \pm 0,04
20,67	epoksilinalol	2,30 \pm 0,03
20,80	α -farnzen	0,50 \pm 0,02
20,88	β -kadinen	0,18 \pm 0,01
21,07	karan	13,19 \pm 0,27
21,20	metil salicilat	7,00 \pm 0,37
21,54	α -limonen diepoksid	7,23 \pm 0,41
21,81	β -damascenon	1,68 \pm 0,12
22,00	6-metil-5-nonadien-2-on	3,99 \pm 0,23
22,18	<i>cis</i> -geraniol	5,78 \pm 0,30
22,29	<i>cis</i> -geranilaceton	1,39 \pm 0,15
23,81	γ -elemen	1,74 \pm 0,19
23,93	α -kariofilen oksid	2,91 \pm 0,21
24,02	1-benzil-1,2,3-triazol	2,51 \pm 0,17
24,42	<i>trans</i> -2-karen-4-ol	0,86 \pm 0,08
24,64	β -kariofilen oksid	0,93 \pm 0,08
24,77	α -kopaen-11-ol	0,58 \pm 0,03
24,89	β -metil jonon	1,57 \pm 0,10
26,39	metil 2-hidroksi-1,6-dimetilcikloheksankarboksilat	2,22 \pm 0,15
28,34	α -heksilcinamaldehyd	2,18 \pm 0,18
29,64	3- <i>p</i> -menten	3,88 \pm 0,26

\pm 3SD.

U etarskom ulju cveta zove je utvrđeno prisustvo 35 jedinjenja, gde osnovne komponente ulja predstavljaju monoterpeni i seskviterpeni. Najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju cveta zove su: karan (13,19%), α -limonen diepoksid (7,23%), metil salicilat (7,00%), kariofilen (6,55%), benzopiran (5,89%), *cis*-geraniol (5,78%) i linalil antranilat (5,48%), dok su ostale aromatične komponente prisutne u manjem procentu.

U poređenju sa hemijskim sastavom etarskog ulja plodova zove zapaža se da su monoterpeni *cis*-roze oksid i *trans*-roze oksid, kao i linalil antranilat koji pripada porodici terpena prisutni u etarskom ulju i ploda i cveta zove. Kvalitativnom analizom ulja utvrđeno je da su monoterpeni *cis*-roze oksid i *trans*-roze oksid u većem procentu detektovani u etarskom ulju cveta, dok je linalil antranilat četiri puta u većem procentu identifikovan kod etarskog ulja tradicionalno sušenih plodova zove. Na osnovu sprovedenog ispitivanja etarskog ulja iz ploda i cveta zove može se uočiti da su dominantna jedinjenja u etarskom ulju ploda prisutna u većem procentu, dok su komponente zastupljene u etarskom ulju cveta identifikovane i do tri puta u nižem procentu. Sastav i prinos etarskog ulja u različitim organima iste biljne vrste zavisi od biotičkih i abiotičkih faktora, genetike same biljke i uticaja okoline (Simoes i sar., 2010). U porodicama Lamiaceae, Apiaceae, Asteraceae, Rutaceae, Lauraceae, Myrtaceae su zastupljene biljne vrste koje su bogate etarskim uljem. Iz plodova bobičastog voća izolovanje etarskog ulja nije posebno interesantno, o čemu svedoče i malobrojna istraživanja. Etarsko ulje plodova zove nije bilo predmet naučnih publikacija, pretpostavlja se da je glavni razlog mali sadržaj etarskog ulja u biljnoj vrsti roda *Sambucus*. Etarsko ulje kao produkt sekundarnog metabolizma biljaka ima niz farmakoloških aktivnosti, fungicidno, antireumatsko, kao i antiseptično dejstvo. U prehrambenoj industriji etarsko ulje se sve više koristi kao prirodni konzervans i potencijalna alternativa sintetičkim konzervansima za poboljšanje ukusa proizvoda, ali i za zaštitu proizvoda od oksidacije i mikroorganizama prilikom pakovanja (Ju i sar., 2018). Dobijeni rezultati ukazuju da su etarska ulja ploda i cveta zove dobar izvor biopotentnih aromatičnih jedinjenja. Prisustvo ketona ruža i terpenskih molekula kao dominantnih komponenata u ispitivanim etarskim uljima daje mogućnost da se istraživanja u ovoj oblasti nastave u smeru njihove potencijalne primene u prehrambenoj industriji kao prirodni agensi za održavanje svežine proizvoda i produženja roka trajanja.

5. ZAKLJUČCI

U okviru ove doktorske disertacije dobijeni su različiti proizvodi (ekstrakti, matični sok, vino i etarska ulja) na bazi ploda i cveta zove (*S. nigra*) i ocenjene su njihove hemijske, biološke i funkcionalne karakteristike, kao i mogućnost upotrebe ove biljne sirovine na industrijskom nivou. Proces sušenja odvijao se primenom tradicionalne i savremene (liofilizacija) tehnike sušenja. Izolovanje biomolekula i dobijanje ekstrakata biljne vrste roda *Sambucus* je izvedeno tradicionalnom (maceracijom, MAC) i savremenim (ultrazvučnom, UAE i mikrotalasnom, MAE) ekstrakcionim tehnikama. Tradicionalnim načinom ceđenja plodova dobijen je matični sok, a po standardnom postupku proizvodnje crvenih vina dobijeno je vino od plodova zove. Primenom postupka hirodestilacije dobijeno je etarsko ulje iz ploda i cveta zove. Na osnovu ostvarenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- Vodeni i etanolni MAE ekstrakti liofilizovanih plodova su najbolji izvor ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i tanina. U slučaju izolovanja ukupnih fenola i flavonoida iz plodova, voda je bolji ekstragens, dok je 50% etanol efikasniji ekstragens kada je reč o ekstrahovanju ukupnih monomernih antocijana i tanina.
- U ekstraktima ploda i cveta zove dominantne fenolne kiseline su: hlorogenska kiselina i protokatehinska kiselina, dok su najzastupljeniji flavonoidi: rutin, kvercetin, kvercetin-3-O-heksozid i ursolna kiselina kao terpensko jedinjenje.
- Najbogatiji izvori sekundarnih metabolita su vodeni i etanolni MAE ekstrakti liofilizovanih plodova. Dominantne fenolne kiseline su u najvećoj koncentraciji prisutne u vodenom MAE ekstraktu liofilizovanih plodova zove (42,98 µg/ml E za hlorogensku kiselinu i 36,31 µg/ml E za protokatehinsku kiselinu), dok je njihov sadržaj u etanolnom MAE ekstraktu nešto niži (40,80 µg/ml E za hlorogensku kiselinu i 11,56 µg/ml E za protokatehinsku kiselinu). Najveća koncentracija rutina je detektovana u etanolnom MAC ekstraktu liofilizovanih plodova (260,32 µg/ml E), a sadržaj kvercetina i kvercetin-3-O-heksozida u najvećoj količini je prisutan u etanolnom MAE ekstraktu liofilizovanih plodova zove. Kao terpensko jedinjenje ursolna kiselina je dominantna u etanolnom MAE ekstraktu liofilizovanih plodova (77,64 µg/ml E).
- Uopšteno, sveži ekstrakti plodova zove se odlikuju najnižim sadržajem biološki aktivnih jedinjenja, što je i očekivano zbog većeg sadržaja vode u biljnoj sirovini.
- Ekstrakti cveta zove su bogatiji ukupnim fenolima i flavonoidima od ekstrakata ploda, a najveće prisustvo ovih sekundarnih metabolita je uočeno u vodenim i etanolnim MAE ekstraktima cveta. Za izolovanje ukupnih sekundarnih metabolita cveta zove 50% etanol je efikasniji ekstragens od vode.

- Ekstrakti cveta zove su bogatiji izvor dominantnih fenolnih i terpenskih jedinjenja od ekstrakata plodova zove. Etanolni MAE ekstrakt cveta zove se karakteriše kao najbogatiji izvor rutina koji je identifikovan u koncentraciji 910,49 µg/ml, a detektovano je i značajno prisustvo hlorogenske kiseline (669,97 µg/ml) i ursolne kiseline (335,99 µg/ml). Kvercetin-3-O-heksozid je prisutan u koncentraciji 51,33 µg/ml, dok je sadržaj kvercetina 15,99 µg/ml. Ekstrakti cveta zove se odlikuju prisustvom fenolnih kiselina kao što su: gentizinska kiselina, ferulna kiselina, elagna kiselina i vanilinska kiselina koje nisu identifikovane u ekstraktima plodova zove.
- Antioksidativni potencijal proizvoda na bazi zove je procenjen primenom *in vitro* testova koji se zasnivaju na različitim mehanizmima (transfer elektrona, neutralizacija slobodnih radikala, inhibicija lipidne peroksidacije, heliranje jona metala). Vodeni MAC ekstrakt tradicionalno sušenih plodova zove je imao najveći antioksidativni potencijal, ispitan svim testovima koji se zasnivaju na transferu elektrona.
- Vodeni UAE ekstrakt tradicionalno sušenih plodova zove je najbolji agens u procesu heliranja jona metala, dok je vodeni MAE ekstrakt liofilizovanih plodova pokazuje najveću ukupnu antioksidativnu aktivnost (8,84 mg TE/ml E).
- Za razliku od vodenih, etanolni ekstrakti plodova su ispoljili drugačiji trend antioksidativne aktivnosti. U ovom slučaju MAE ekstrakciona tehnika se pokazala kao najefikasniji način dobijanja ekstrakata, a liofilizacija kao veoma pogodna tehnika sušenja biljne sirovine. Stoga je etanolni MAE ekstrakt liofilizovanih plodova zove najjači antioksidativni agens u svim primenjenim testovima, sa izuzetkom u procesu heliranja jona metala, gde je etanolni MAE ekstrakt tradicionalno sušenih plodova zove jače helirao jone metala.
- Etanolni MAE ekstrakt cveta zove je najpotentniji agens kada je u pitanju antioksidativna aktivnost kod svih ispitivanih mehanizama, dok su ostali ekstrakti cveta zove dobijeni UAE i MAC ekstrakcionim tehnikama ostvarili niži antioksidativni potencijal.
- Neuroprotektivni potencijal ekstrakata ploda i cveta zove procenjen je ispitivanjem njihove sposobnosti da smanje prekomernu aktivnost enzima acetilholin esteraze (AChE) i butirilholin esteraze (BChE). U pogledu neuroprotektivne aktivnosti ekstrakata plodova zove, najjači inhibitorni kapacitet AChE enzima ostvarili su vodeni i etanolni MAE ekstrakti liofilizovanih plodova, s tim da je jači inhibitorni agens vodeni MAE ekstrakt (0,114 mg GALAE/ml E). Najbolji inhibitorni potencijal prema BChE enzimu su takođe ostvarili ekstrakti liofilizovanih plodova zove. U ovom slučaju UAE ekstrakcija se pokazala kao veoma dobar način za dobijanje najpotentnijeg vodenog ekstrakta koji je u najvećoj meri inhibirao BChE enzim, dok je MAC ekstrakcija uz prisustvo 50% etanola kao ekstragensa najpogodniji način za dobijanje najpotentnijeg etanolnog ekstrakta.

- Vodeni MAC i etanolni MAE ekstrakti cveta zove su pokazali istu sposobnost u procesu inhibicije enzima AChE, dok je na smanjenje prekomerne aktivnosti BChE enzima najbolje uticao vodeni UAE ekstrakt.
- Ispitivanje antitirozinaznog potencijala proizvoda dobijenih od ploda i cveta zove zasnovano je na njihovoj sposobnosti da inhibiraju prekomernu aktivnost enzima tirozinaze. Tradicionalna tehnika sušenja se u ovom slučaju pokazala kao najbolji način uklanjanja vode iz biljne sirovine, zbog čega su ekstrakti tradicionalno sušenih plodova i cveta zove ostvarili najbolju sposobnost u procesu inhibicije tirozinaze. 50% etanol je ispoljio bolje solvacione sposobnosti od vode, pa su etanolni MAE ekstrakti ploda i cveta zove jači antitirozinazni agensi (2,75 i 3,03 mg KAE/ml E, redom) od vodenih MAC ekstrakata tradicionalno sušenog ploda i cveta (1,39 i 1,07 mg KAE/ml E, redom).
- Procena antidijabetogenog kapaciteta usmerena je na ispitivanje sposobnosti proizvoda od zove da utiču na smanjenje prekomerne aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze. Savremene tehnike i tehnologije su se pokazale kao dobar način za dobijanje visoko vrednih ekstrakata sposobnih da inhibiraju enzime digestivnog sistema. Stoga je najpotentniji antidijabetogeni agens etanolni UAE ekstrakt liofilizovanih plodova zove, koji je u najvećoj meri inhibirao α -amilazu i α -glukozidazu (8,34 i 7,28 mg ACAE/ml E, redom). Vodeni MAE ekstrakt liofilizovanih plodova je takođe veoma dobar antidijabetogeni agens, ali je ostvario nižu inhibitornu moć prema analiziranim enzimima. Kada je reč o ekstraktima cveta zove etanolni MAE ekstrakt je jači antidijabetogeni agens od vodenog MAE ekstrakta.
- Primenjene tehnike i tehnologije kao načini za dobijanje proizvoda na bazi zove uticali su na rezultate koji su dobijeni hemijskom i fitohemijskom karakterizacijom, kao i ispitivanjem njihovog biološkog potencijala. Plod i cvet zove su se pokazali kao izuzetno potentna biljna sirovina za preradu i dobijanje novih proizvoda, gde je liofilizacija omogućila očuvanje visoko vrednih molekula u plodovima, a MAE ekstrakciona tehnika kao najbolji način izolovanja bioaktivnih komponenata iz prirodnih izvora. Važno je istaći da je tradicionalan način sušenja obezbedio veoma značajno prisustvo bioaktivnih jedinjenja u ekstraktima cveta, ali je u toku sušenja tradicionalnom tehnikom biljni materijal izložen delovanju faktora sredine koji utiču na krajnji kvalitet biljnog materijala. Poboljšanje procesa sušenja uvođenjem savremenih umesto tradicionalnih tehnika sušenja su važni aspekti u dobijanju novih proizvoda. Praćenjem kinetike liofilizacije utvrđeni su parametri procesa sušenja koji obezbeđuju kvalitet proizvoda, izbegavajući mogućnost kontaminacije i čuvajući nutritivne vrednosti proizvoda.
- Hemijskom analizom matičnog soka koji je dobijen tradicionalnim načinom ceđenja zrelih plodova zove utvrđeno je prisustvo organskih kiselina, od kojih je jabučna kiselina dominantna, dok je glukoza dominantan šećer u soku. Analizom nutritivnog profila soka zapažen je nizak sadržaj proteina i lipida (0,20 mg/ml), dok je energetska

vrednost matičnog soka 15,20 kcal/100 ml. Sok od zove je izuzetno bogat mineralima od kojih su najviše prisutni K, Mg, Ca, Na i Fe.

- Fitohemijskom analizom soka utvrđena su ista dominantna biološki aktivna jedinjenja kao i u ekstraktima plodova zove. Zapažen je visok sadržaj protokatehinske kiseline, kao dominantne fenolne kiseline (42,70 µg/ml), hlorogenske kiseline (7,52 µg/ml), kao i flavonoida kvercetin-3-O-heksozida, kvercetina i rutina (18,00, 6,17 i 5,11 µg/ml, redom).
- Analizom nutritivnog profila matičnog soka od plodova zove sadržaj ugljenih hidrata je iznosio 37,40 mg/ml, dok je zabeležena energetska vrednost soka 15,20 kcal na 100 ml soka.
- Biološke i funkcionalne karakteriste soka su ispitane kroz niz antioksidativnih testova u kojima je sok ostvario veoma značajan rezultat, posebno u procesu neutralizacije •NO slobodnog radikala (53,06 mg TE/ml soka), ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti (29,63 mg TE/ml soka), kao i redukcionalnoj sposobnosti (10,98 mg TE/ml soka). Sok od zove je ostvario dobru neuroprotektivnu aktivnost, posebno u inhibiciji prekomerne aktivnosti AChE enzima (3,91 mg GALAE/ml soka), a najbolje biološke i funkcionalne karakteristike soka su ocenjene u procesu inhibicije enzima tirozinaze (42,12 mg KAE/ml soka), dok je analizirani sok ostvario umerenu sposobnost u sprečavanju razvoja dijabetesa.
- Dobijanje soka tradicionalnim postupkom ceđenja ostvareni su značajni rezultati u pogledu hemijske i fitohemijske karakterizacije, kao i senzorske ocene novog proizvoda.
- Boja matičnog soka od zove definisana je instrumentalno (CIE $L^*a^*b^*C^*h\lambda$ koordinate boje) i senzorski (NCS atlas boja).
- Senzorski profil soka od zove identifikovan je i kvantifikovan deskriptivnom senzorskom analizom preko 16 senzorskih svojstava ('cvekla', 'kupina', 'višnja', 'sirće', 'grejpfrut', 'kokos', 'karanfilić', 'jorgovan', 'suva šljiva', 'gorko', 'slatko', 'slano', 'kiselo', 'skupljanje usta', 'abrazija, sušenje grla' i 'perzistencija').
- Senzorska prihvatljivost soka od zove (izgleda, ukusnosti, osećaja u ustima, ukusa koji ostaje u ustima i ukupna prihvatljivost) od strane potrošača verifikovana je ocenama koje ukazuju da im se sok od zove, u manjem ili većem stepenu, dopada, s tim da je ukupna prihvatljivost soka od zove ocenjena kao neznatno veća od 'malo mi se dopada'.

- Analizom hemijskog sastava četiri tipa vina koja su dobijena od plodova zove zapaženo je da je najveći sadržaj etanola prisutan u vinima čiji je temperaturni tretman trajao 5 minuta, s tim da je vino koje je izloženo uticaju temperature 70 °C u toku 5 minuta imalo najveći sadržaj etanola. Jabučna kiselina je dominantna organska kiselina, koja je u najvećoj koncentraciji detektovana u vinu bez toplotnog tretmana. Povećanjem uticaja temperature i vremena trajanja temperaturnog tretmana sadržaj jabučne kiseline se smanjivao. Prisustvo šećera (glukoze) detektovano je samo u vinu koje nije toplotno tretirano. Sadržaj suve materije, ukupnog ekstrakta i metanola je najveći u vinu čiji je temperaturni profil 60 °C i 5 minuta. Prisustvo metanola u vinima od zove se kreće od 404,65 do 519,44 mg/l, što je više, kada se pogleda vrednost metanola u vinu od grožđa (< 200 mg/l).
- Mineralne materije Na, K, Mg i Fe su najzastupljenije u vinu temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta, dok se vino bez toplotnog tretmana odlikuje najnižim sadržajem mineralnih materija.
- Karakterizacijom fitohemijskog sastava četiri tipa vina od zove utvrđeno je najveće prisustvo ukupnih fenola, flavonoida, monomernih antocijana i tanina u vinu koje je izloženo uticaju temperature 70 °C u toku 5 minuta. Takođe, vino koje je tretirano temperaturom 60 °C u toku 5 minuta je veoma dobar izvor ovih biomolekula, što je posledica njihovog efikasnijeg izolovanja iz biljnog matriksa, usled temperaturnog tretmana. Bioaktivne komponente dominantne u ekstraktima plodova zove su u najvećoj koncentraciji prisutne i u vinima od plodova zove. p-hidroksibenzojeva kiselina je najzastupljenija fenolna kiselina u vinu bez toplotnog tretmana (42,96 µg/ml), dok je u vinima koja su izložena uticaju temperature u različitim vremenskim intervalima skoro ujednačen sadržaj p-hidroksibenzojeve kiseline. Protokatehinska kiselina je u najvećoj koncentraciji identifikovana u vinu bez toplotnog tretmana (52,46 µg/ml), dok je hlorogenska kiselina dominantna u vinu temperaturnog profila 60 °C i 5 minuta. Kvercetin kao dominantan flavonoid u vinima od zove u najvećoj koncentraciji je identifikovan u vinima temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta i 60 °C i 5 minuta (158,89 i 149,48 µg/ml, redom). Temperaturni profil 60 °C i 5 minuta je najviše pogodan za prisustvo kvercetin-3-O-heksozida u analiziranom vinu, dok rutinu pogoduje temperaturni profil 70 °C i 5 minuta.
- Sprovedeno istraživanje u okviru ispitivanja vina od plodova zove ukazuje da je najjači antioksidativni kapacitet koji se zasniva na transferu elektrona i inhibiciji lipidne peroksidacije ostvarilo vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta.
- Kada je reč o heliranju jona metala i neutralizaciji •NO radikala temperaturni profil vina 60 °C i 5 minuta je najpogodniji za postizanje veoma efikasnog biološkog i funkcionalnog potencijala.

- Najjača neuroprotektivna aktivnost u procesu smanjenja prekomerne aktivnosti AChE ostvarena je vinom čiji je temperaturni tretman izveden na temperaturi 60 °C u toku 5 minuta (0,38 mg GALAE/ml vina), dok su u inhibiciji enzima BChE vino bez toplotnog tretmana, vina izložena dejstvu temperature 60 °C u toku 5 minuta i 10 minuta ostvarila ujednačen inhibitorni kapacitet (0,17, 0,18 i 0,18 mg GALAE/ml vina, redom).
- Veoma izraženu aktivnost kao inhibitor enzima tirozinaze imalo je vino koje je dobijeno na uslovima: uticaj temperature 70 °C, vremenski period 5 minuta. Ostvarena inhibitorna aktivnost je 5,09 mg KAE/ml vina, što ovom tipu vina i načinu dobijanja daje poseban značaj.
- Osim što je jak antitirozinazni agens vino temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta je najefikasniji i antidijabetogeni agens, koji je u najvećoj meri uticao na inhibiciju prekomerne aktivnosti enzima α -amilaze (6,14 mg ACAE/ml vina). Prekomernu aktivnost α -glukozidaze najbolje smanjuje vino koje je dobijeno primenom temperature 60 °C u toku 5 minuta (7,00 mg ACAE/ml vina), zbog čega su biološke i funkcionalne karakteristike ovog vina posebno došle do izražaja.
- Kreiranje temperaturnog profila za dobijanje vina od zove je od posebnog značaja zbog degradacije cijanogenih glikozida koji se nalaze u biljnom materijalu. Povećanjem temperature cijanogeni glikozidi su u potpunosti uklonjeni, a omogućena je efikasnija ekstrakcija biološki potentnih metabolita, koji doprinose jakom biološkom potencijalu vina.
- Analizom etarskog ulja tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove utvrđeno je prisustvo ukupno 35 različitih jedinjenja, od čega je 19 identifikovano u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova, a 16 u etarskom ulju liofilizovanih plodova. Rezultati analize ukazuju da ispitivana etarska ulja karakteriše visok sadržaj ketona ruža, od kojih je najzastupljeniji β -damascenon (38,64% u etarskom ulju liofilizovanih plodova i 35,70% u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova). Pored ketona ruža etarska ulja dobijena od plodova zove su veoma bogat izvor terpenskih jedinjenja, od koji je u etarskom ulju liofilizovanih plodova najzastupljeniji linalol (32,80%), dok je linalil antranilat dominantno terpensko jedinjenje u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova (24,15%). Veći sadržaj α -terpineola je zabeležen u etarskom ulju liofilizovanih plodova (9,59%), dok je u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova udeo ove komponente 5,71%. Razlika između etarskog ulja dobijenog od liofilizovanih i tradicionalno sušenih plodova zove ogleda se u sadržaju fitola koji je prekursor u sintezi hlorofila, kao i vitamina E i K. Ovaj aciklični diterpenski alkohol je prisutan u etarskom ulju liofilizovanih plodova (6,84%), dok njegovo prisustvo u etarskom ulju tradicionalno sušenih plodova nije utvrđeno.

- Etarsko ulje cveta zove se odlikuje najvećim sadržajem mono- i seskviterpena. Dominantne komponente u etarskom ulju cveta su: karan (13,19%), α -limonen diepoksid (7,23%) i metil salicilat (7,00%). β -damascenon je prisutan u veoma maloj količini u odnosu na etarsko ulje plodova zove (1,68%). Dobijeni rezultati ukazuju da etarska ulja biljne vrste *S. nigra* imaju jednostavan hemijski sastav u kome preovladavaju ketoni ruža i terpena jedinjenja. Varijabilnosti sadržaja istih komponenti u različitim organima iste biljne vrste zasniva se na uticaju klimatskih faktora kojima su biljni organi izloženi.
- Ispitivanjem hemijskog sastava, određivanjem bioloških i funkcionalnih karakteristika novih proizvoda od zove utvrđen je visok potencijal samonikle biljne vrste u pogledu definisanja prehrambenih proizvoda kojih nema na tržištu Srbije, regiona i sveta.
- Na osnovu sprovedenog istraživanja, dobijeni rezultati ukazuju na izuzetan biološki potencijal biljne vrste *S. nigra* i mogućnost izlaska iz laboratorijskih okvira upotrebe ploda i cveta zove u cilju njihove prerade za dobijanje proizvoda i na industrijskom nivou, sa naglaskom na primenu savremenih tehnika sušenja i ekstrakcije.
- Ukupni i sumirani rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pružaju smernice za pripremu novih, funkcionalnih proizvoda od plodova i cveta zove, imajući u vidu optimalan sadržaj biološki aktivnih jedinjenja i optimalan biološki potencijal:
 - priprema ekstrakata od plodova zove: preporučuje se primena mikrotalasne ekstrakcije liofilizovanih plodova i upotreba vode kao rastvarača,
 - priprema ekstrakata od cveta zove: preporučuje se primena mikrotalasne ekstrakcije tradicionalno sušenih cvetova i upotreba 50% etanola kao rastvarača,
 - priprema soka od plodova zove: preporučuje se tradicionalan način ceđenja zrelih plodova, bez dodatka šećera, aditiva i konzervansa,
 - priprema vina od plodova zove: preporučuje se standardni postupak proizvodnje vina, primenom temperaturnog profila 70 °C i 5 minuta,
 - priprema etarskog ulja od plodova zove: preporučuje se postupak hidrodestilacije liofilizovanih plodova u trajanju od 4 sata,
 - zova je samonikla biljna vrsta koja u budućnosti nesumnjivo i osnovano može biti polazna sirovina za kreiranje i dobijanje novih prehrambenih proizvoda na domaćem i inostranom tržištu.

6. LITERATURA

- Abuja, P. M., Murkovic, M., & Pfannhauser, W. (1998). Antioxidant and prooxidant activities of elderberry (*Sambucus nigra*) extract in low-density lipoprotein oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4091-4096.
- Abu-Samra, A., Morris, J. S., & Koirtiyohann, S. R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47(8), 1475-1477.
- Ahn, S. J., Koketsu, M., Ishihara, H., Lee, S. M., Ha, S. K., Lee, K. H., ... & Kima, S. Y. (2006). Regulation of melanin synthesis by selenium-containing carbohydrates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(3), 281-286.
- Akande, K. E., & Fabiyi, E. F. (2010). Effect of processing methods on some antinutritional factors in legume seeds for poultry feeding. *International Journal of Poultry Science*, 9(10), 996-1001.
- Akbulut, M., Ercisli, S., & Tosun, M. (2009). Physico-chemical characteristics of some wild grown European elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20), 320.
- Alam, M. K., Rana, Z. H., Islam, S. N., & Akhtaruzzaman, M. (2019). Total phenolic content and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild leafy vegetables grown in Bangladesh: A cheapest source of antioxidants. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 13(1), 287-293.
- Ali-Shtayeh, M. S., Jamous, R. M., & Jamous, R. M. (2015). Plants used during pregnancy, childbirth, postpartum and infant healthcare in Palestine. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 21(2), 84-93.
- Amagase, H., & Farnsworth, N. R. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44(7), 1702-1717.
- Armstrong, A. D. (1999). Microwave-Assisted Extraction for The Isolation of Trace Systemic Fungicides from Woody Plant Material. [Doctor dissertation]. *Virginia Polytechnic Institute and state University*.
- Anchordoquy, T. J., Armstrong, T. K., Molina Md, A. D., Zhang, Y., Patel, M. M., Lentz, Y. K., ... & Pikal, M. J. (2004). Lyophilization of biopharmaceuticals. *Arlington: AAPS*, 605-41.
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2013). Functional foods market and consumer perspective. *Current Nutrition & Food Science*, 9(4), 260-270.

- Anton, A. M., Pinteá, A. M., Rugină, D. O., Sconța, Z. M., Hanganu, D., Vlase, L., & Benedec, D. (2013). Preliminary studies on the chemical characterization and antioxidant capacity of polyphenols from *Sambucus* sp. *Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures (DJNB)*, 8(3).
- Arce, M. P., Rodríguez-Franco, M. I., González-Munoz, G. C., Pérez, C., López, B., Villarroya, M., ... & Conde, S. (2009). Neuroprotective and cholinergic properties of multifunctional glutamic acid derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(22), 7249-7257.
- Arzeni, C., Martínez, K., Zema, P., Arias, A., Pérez, O. E., & Pilosof, A. M. R. (2012). Comparative study of high intensity ultrasound effects on food proteins functionality. *Journal of Food Engineering*, 108(3), 463-472.
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., & Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 25, 17-23.
- Ashvell, M. (2002). Concepts of functional foods. Washington, DC ILSI Europe Concise Monograph Series ELSI Press.
- Badarinath, A. V., Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S. T. V. S. R., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on *in-vitro* antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285.
- Baiano, A., Terracone, C., Gambacorta, G., & La Notte, E. (2009). Phenolic content and antioxidant activity of Primitivo wine: comparison among winemaking technologies. *Journal of Food Science*, 74(3), C258-C267.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I. C., Carvalho, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Use of HPLC–DAD–ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chemistry*, 127(1), 169-173.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., ... & Anandharamakrishnan, C. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.
- Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., ... & Anandharamakrishnan, C. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for

- botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102.
- Bender, D. A. (2006). *Benders' dictionary of nutrition and food technology*. Woodhead Publishing.
- Bermúdez-Soto, M. J., & Tomás-Barberán, F. A. (2004). Evaluation of commercial red fruit juice concentrates as ingredients for antioxidant functional juices. *European Food Research and Technology*, 219(2), 133-141.
- Bhatraju, P., Crawford, J., Hall, M., & Lang Jr, J. D. (2015). Inhaled nitric oxide: current clinical concepts. *Nitric Oxide*, 50, 114-128.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Blokhina, O., & Fagerstedt, K. V. (2010). Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138(4), 447-462.
- Bonaventure, J., Domingues, M. J., & Larue, L. (2013). Cellular and molecular mechanisms controlling the migration of melanocytes and melanoma cells. *Pigment cell & Melanoma research*, 26(3), 316-325.
- Borges, G., Degeneve, A., Mullen, W., & Crozier, A. (2010). Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(7), 3901-3909.
- Borowiec, K., Sz wajgier, D., Targoński, Z., Demchuk, O. M., Cybulska, J., Czernecki, T., & Malik, A. (2014). Cholinesterase inhibitors isolated from bilberry fruit. *Journal of Functional Foods*, 11, 313-321.
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). Modifying skin pigmentation—approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 5(2), e189-e199.
- Buřičová, L., & Reblova, Z. (2008). Czech medicinal plants as possible sources of antioxidants. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(2), 132-8.
- Caddeo, C., Gabriele, M., Fernández-Busquets, X., Valenti, D., Fadda, A. M., Pucci, L., & Manconi, M. (2019). Antioxidant activity of quercetin in Eudragit-coated liposomes for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 64-69.
- Carpenter, J. F., Pikal, M. J., Chang, B. S., & Randolph, T. W. (1997). Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharmaceutical Research*, 14(8), 969.

- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry*, 40(2), 450-458.
- Castañeda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859-871.
- Chan, C. H., Yusoff, R., Ngoh, G. C., & Kung, F. W. L. (2011). Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6213-6225.
- Chan, K. (2005). Chinese medicinal materials and their interface with Western medical concepts. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2), 1-18.
- Charlebois, D. (2007). Elderberry as a medicinal plant. *Issues in New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, 284-292.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560.
- Chen, J., Gao, D., Yang, L., & Gao, Y. (2013). Effect of microfluidization process on the functional properties of insoluble dietary fiber. *Food Research International*, 54(2), 1821-1827.
- Chen, L., & Opara, U. L. (2013). Texture measurement approaches in fresh and processed foods-A review. *Food Research International*, 51(2), 823-835.
- Chou, S. Y., Lo, S. L., Hsieh, C. H., & Chen, C. L. (2009). Sintering of MSWI fly ash by microwave energy. *Journal of Hazardous Materials*, 163(1), 357-362.
- Christensen, L. P., Kaack, K., & Fretté, X. C. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids. *European Food Research and Technology*, 227(1), 293-305.
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 805-817.
- CIE (1976). International Commission on Illumination, Colorimetry: Official Recommendation of the International Commission on Illumination. Publication CIE No. (E-1.31) Bureau Central de la CIE, Paris, France.
- Ciociu, M., Badescu, L., Badulescu, O., & Badescu, M. (2012). Intervention of *Sambucus nigra* polyphenolic extract in experimental arterial hypertension. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 64, 244-247.

- Clevenger, J. F. (1928). Apparatus for the determination of volatile oil. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 17(4), 345-349.
- Costa-Font, M., Gil, J. M., & Traill, W. B. (2008). Consumer acceptance, valuation of and attitudes towards genetically modified food: Review and implications for food policy. *Food Policy*, 33(2), 99-111.
- Cravotto, G., Boffa, L., Mantegna, S., Perego, P., Avogadro, M., & Cintas, P. (2008). Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(5), 898-902.
- Cvetanović, A., Zeković, Z., Švarc-Gajić, J., Razić, S., Damjanović, A., Zengin, G., ... & Moreira, M. (2018). A new source for developing multi-functional products: biological and chemical perspectives on subcritical water extracts of *Sambucus ebulus* L. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(4), 1097-1104.
- Daskalova, E., Delchev, S., Topolov, M., Dimitrova, S., Uzunova, Y., Valcheva-Kuzmanova, S., ... & Denev, P. (2019). *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot fruit juice reveals neuroprotective effect and improves cognitive and locomotor functions of aged rats. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110674.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Baraniak, B. (2006). The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts). *LWT-Food Science and Technology*, 39(3), 308-315.
- DeCorte, B. L. (2016). Underexplored opportunities for natural products in drug discovery: miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9295-9304.
- Dehnad, D., Jafari, S. M., & Afrasiabi, M. (2016). Influence of drying on functional properties of food biopolymers: From traditional to novel dehydration techniques. *Trends in Food Science & Technology*, 57, 116-131.
- Del Torno-de Román, L., Alonso-Lomillo, M. A., Domínguez-Renedo, O., & Arcos-Martínez, M. J. (2013). Gluconic acid determination in wine by electrochemical biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 176, 858-862.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- Dhameja, M., & Gupta, P. (2019). Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview. *European Journal of Medicinal Chemistry*.
- Di Vittori, L., Mazzoni, L., Battino, M., & Mezzetti, B. (2018). Pre-harvest factors influencing the quality of berries. *Scientia Horticulturae*, 233, 310-322.

- Dijksterhuis, G. (2016). New product failure: Five potential sources discussed. *Trends in Food Science & Technology*, 50, 243-248.
- Dillard, C. J., & German, J. B. (2000). Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744-1756.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Vilanova, M., Teixeira, J. A., de Silva, J. B. A., & Schwan, R. F. (2010). Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. *Food Research International*, 43(9), 2303-2314.
- Duke, J. A. (2002). *Handbook of medicinal herbs*. CRC press, Boca Raton (2002).
- Dulf, F. V., Oroian, I., Vodnar, D. C., Socaciu, C., & Pintea, A. (2013). Lipid classes and fatty acid regiodistribution in triacylglycerols of seed oils of two *Sambucus* species (*S. nigra* L. and *S. ebulus* L.). *Molecules*, 18(10), 11768-11782.
- Duymuş, H. G., Göger, F., & Başer, K. H. C. (2014). *In vitro* antioxidant properties and anthocyanin compositions of elderberry extracts. *Food Chemistry*, 155, 112-119.
- EFSA - Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). (2013). Scientific Opinion on the re-evaluation of anthocyanins (E 163) as a food additive. *EFSA Journal*, 11(4), 3145.
- Ekin, H. N., Gokbulut, A., Aydin, Z. U., Donmez, A. A., & Orhan, I. E. (2016). Insight into anticholinesterase and antioxidant potential of thirty-four Rosaceae samples and phenolic characterization of the active extracts by HPLC. *Industrial Crops and Products*, 91, 104-113.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108.
- Esin Çelik, S., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E., & Apak, R. (2014). Identification and Anti-Oxidant Capacity Determination of Phenolics and their Glycosides in Elderflower by On-line HPLC–CUPRAC Method. *Phytochemical Analysis*, 25(2), 147-154.
- Eskilsson, C. S., & Björklund, E. (2000). Analytical-scale microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 902(1), 227-250.
- Evered, D., & Harnett, S. (Eds.). (2008). *Cyanide compounds in biology* (Vol. 140). John Wiley & Sons.
- Fasiku, V., Omolo, C. A., & Govender, T. (2020). Free radical-releasing systems for targeting biofilms. *Journal of Controlled Release*, 322, 248-273.
- Fazio, A., Plastina, P., Meijerink, J., Witkamp, R. F., & Gabriele, B. (2013). Comparative analyses of seeds of wild fruits of *Rubus* and *Sambucus* species from Southern Italy:

- Fatty acid composition of the oil, total phenolic content, antioxidant and anti-inflammatory properties of the methanolic extracts. *Food Chemistry*, 140(4), 817-824.
- Fernandes, S. S., Coelho, M. S., & de las Mercedes Salas-Mellado, M. (2019). Bioactive Compounds as Ingredients of Functional Foods: Polyphenols, Carotenoids, Peptides from Animal and Plant Sources New. In *Bioactive Compounds* (pp. 129-142). Woodhead Publishing.
- Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: from *in vitro* results to *in vivo* evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649-671.
- Francot, P., & Geoffroy, P. (1956). Le methanol dans les jus de fruits, les boissons, fermentees, les alcools et spiritueux. *Revue Des Fermentations Et des Industries Alimentaires*, 11, 279-86.
- Franks, F., & Auffret, A. D. (2007). Freeze-drying of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals—Principles and Practice.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples. *Molecules*, 15(12), 8813-8826.
- Gavahian, M., Farhoosh, R., Javidnia, K., Shahidi, F., & Farahnaky, A. (2015). Effect of applied voltage and frequency on extraction parameters and extracted essential oils from *Mentha piperita* by ohmic assisted hydrodistillation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 29, 161-169.
- Gharibzahedi, S. M. T., & Jafari, S. M. (2017). The importance of minerals in human nutrition: Bioavailability, food fortification, processing effects and nanoencapsulation. *Trends in Food Science & Technology*, 62, 119-132.
- Ghielen, I., Rutten, S., Boeschoten, R. E., Houniet-de Gier, M., van Wegen, E. E., van den Heuvel, O. A., & Cuijpers, P. (2019). The effects of cognitive behavioral and mindfulness-based therapies on psychological distress in patients with multiple sclerosis, Parkinson's disease and Huntington's disease: Two meta-analyses. *Journal of Psychosomatic Research*.
- Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Vila-López, R., & Martínez-Cutillas, A. (2010). Anthocyanin profile in *Monastrell* grapes in six different areas from Denomination of Origen Jumilla during ripening stage. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(9), 1870-1877.
- Gorin, Y., & Block, K. (2013). Nox as a target for diabetic complications. *Clinical Science*, 125(8), 361-382.

- Grabowski, S., Marcotte, M., Ramaswamy, H. (2005). Dehydrated Vegetables: Principles and Applications in Hui, Y. H., Sherkat, F. (ed.): Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume. CRC Press.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131-138.
- Greig, N. H., Utsuki, T., Ingram, D. K., Wang, Y., Pepeu, G., Scali, C., ... & Chen, D. (2005). Selective butyrylcholinesterase inhibition elevates brain acetylcholine, augments learning and lowers Alzheimer β -amyloid peptide in rodent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(47), 17213-17218.
- Gris, E. F., Mattivi, F., Ferreira, E. A., Vrhovsek, U., Pedrosa, R. C., & Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Proanthocyanidin profile and antioxidant capacity of Brazilian *Vitis vinifera* red wines. *Food Chemistry*, 126(1), 213-220.
- Grossman, M., Pelle, J. E., Smith, E. E., McMillan, C. T., Cook, P., Powers, J., ... & Camp, E. (2013). Category-specific semantic memory: converging evidence from bold fMRI and Alzheimer's disease. *Neuroimage*, 68, 263-274.
- Grunert, K.G. (1995). Food quality: A means-end perspective. *Food Quality and Preference*, 6(3), 171-176.
- Guiné, R. (2012). Sweet samosas: a new food product in the Portuguese market. *Academic Research International*.
- Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 220-235.
- Gupta, S., Pollack, T., Fulkerson, C., Schmidt, K., Oakes, D. J., Molitch, M. E., & Wallia, A. (2018). Hyperglycemia in the posttransplant period: NODAT vs Posttransplant Diabetes Mellitus. *Journal of the Endocrine Society*, 2(11), 1314-1319.
- Haas, B., Eckstein, N., Pfeifer, V., Mayer, P., & Hass, M. D. S. (2014). Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin. *Nutrition & Diabetes*, 4(11), e143-e143.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 246(2), 501-514.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9.

- Hammond, B. R., Johnson, B. A., & George, E. R. (2014). Oxidative photodegradation of ocular tissues: beneficial effects of filtering and exogenous antioxidants. *Experimental eye research*, 129, 135-150.
- Harborne, J. B. (1989). Methods in plant biochemistry. Volume 1. *Plant Phenolics*. Academic Press Ltd.
- Hardisson, A., Rubio, C., Báez, A., Martín, M. M., & Alvarez, R. (2001). Mineral composition in four varieties of avocado (*Persea gratissima*, L.) from the island of Tenerife. *European Food Research and Technology*, 213(3), 225-230.
- Harokopakis, E., Albzreh, M. H., Haase, E. M., Scannapieco, F. A., & Hajishengallis, G. (2006). Inhibition of proinflammatory activities of major periodontal pathogens by aqueous extracts from elder flower (*Sambucus nigra*). *Journal of Periodontology*, 77(2), 271-279.
- Hayes, B. L. (2002). Microwave synthesis: chemistry at the speed of light. Cem Corporation.
- Helbig, D., Böhm, V., Wagner, A., Schubert, R., & Jahreis, G. (2008). Berry seed press residues and their valuable ingredients with special regard to black currant seed press residues. *Food Chemistry*, 111(4), 1043-1049.
- Honda, K., Casadesus, G., Petersen, R. B., Perry, G., & Smith, M. A. (2004). Oxidative stress and redox-active iron in Alzheimer's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1012(1), 179-182.
- Hornedo-Ortega, R., Álvarez-Fernández, M. A., Cerezo, A. B., Richard, T., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2016). Protocatechuic acid: inhibition of fibril formation, destabilization of preformed fibrils of amyloid- β and α -synuclein, and neuroprotection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(41), 7722-7732.
- <http://www.treesplease.co.uk/product/sambucus-nigra-elder-elderberries/>
<https://pngio.com/images/png-a1363104.html>
- <https://www.amazon.com/Organic-Elderberry-Sambucus-Certified-Supplement/dp/B07H3KWDDP>
- https://www.wikiwand.com/bs/Fazni_dijagram
- Huang, T., Chen, N., Lai, Y., Wang, D., Yan, J., & Gu, J. (2011). Rapid determination of cinnamic acid and harpagoside in a traditional Chinese medicine of *Scrophularia ningpoensis* by microwave-assisted extraction followed by high performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1313-1320.
- Hughes, M. A. (1999). Biosynthesis and degradation of cyanogenic glycosides.

- IFIC - International Food Information Council Foundation. (2009). Background on Functional Foods: Food Insight. <http://www.foodinsight.org/Content/6/functionalfoodsbackgrounder.pdf>.
- Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ahmad, R., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., ... & Badshah, H. (2018). Ursolic acid a promising candidate in the therapeutics of breast cancer: Current status and future implications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *108*, 752-756.
- ISO 11035 (1994). Sensory analysis -- Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach
- ISO 4121 (2003). Sensory analysis - Guidelines for the use of quantitative response scales.
- ISO 8586 (2012). Sensory analysis - General guidelines for the selection, training and monitoring of selected assessors and expert sensory assessors.
- ISO 8589 (2007). Sensory analysis - General guidance for the design of test rooms.
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2003). Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Research*, *16*(5), 523-531.
- Ito, S., & Wakamatsu, K. (2008). Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, *84*(3), 582-592.
- Jabbari, M., Hashempur, M. H., Razavi, S. Z. E., Shahraki, H. R., Kamalinejad, M., & Emtiazy, M. (2016). Efficacy and short-term safety of topical Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L.) versus diclofenac for knee osteoarthritis: a randomized, double-blind, active-controlled trial. *Journal of Ethnopharmacology*, *188*, 80-86.
- Jackson, R. S. (2008). Wine science: principles and applications. Academic press.
- Johnson, M. H., & Gonzalez de Mejia, E. (2012). Comparison of chemical composition and antioxidant capacity of commercially available blueberry and blackberry wines in Illinois. *Journal of Food Science*, *77*(1), C141-C148.
- Jones, R. B., Faragher, J. D., & Winkler, S. (2006). A review of the influence of postharvest treatments on quality and glucosinolate content in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) heads. *Postharvest Biology and Technology*, *41*(1), 1-8.
- Ju, J., Xu, X., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. (2018). Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. *Food Chemistry*, *240*, 850-855.
- Kaack, K., & Austed, T. (1998). Interaction of vitamin C and flavonoids in elderberry (*Sambucus nigra* L.) during juice processing. *Plant Foods for Human Nutrition*, *52*(3), 187-198.

- Kaack, K., Fretté, X. C., Christensen, L. P., Landbo, A. K., & Meyer, A. S. (2008). Selection of elderberry (*Sambucus nigra* L.) genotypes best suited for the preparation of juice. *European Food Research and Technology*, 226(4), 843-855.
- Kader, A. A., & Barrett, D. M. (1996). Classification, composition of fruits, and postharvest maintenance of quality. *Processing fruits: Science and Technology*, 1, 1-24.
- Kalemba, D. A. A. K., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813-829.
- Kanost, M. R., Jiang, H., & Yu, X. Q. (2004). Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, 198(1), 97-105.
- Kappe, C. O., Stadler, A., & Dallinger, D. (2012). *Microwaves in organic and medicinal chemistry* (Vol. 52). John Wiley & Sons.
- Katzman, R., & Bick, K. (2000). *Alzheimer Disease: The Changing View: The Changing View*. Elsevier.
- Kaufmann, B., & Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13(17), 105-113.
- Kaur, M., & Singh, S. (2016). Physicochemical, morphological, pasting, and rheological properties of tamarind (*Tamarindus indica* L.) kernel starch. *International Journal of Food Properties*, 19(11), 2432-2442.
- Kaur, N., & Singh, D. P. (2017). Retracted: Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review.
- Khaksar, G., Assatarakul, K., & Sirikantaramas, S. (2019). Effect of cold-pressed and normal centrifugal juicing on quality attributes of fresh juices: do cold-pressed juices harbor a superior nutritional quality and antioxidant capacity? *Heliyon*, 5(6), e01917.
- Khan, M. T., Ahmad, L., & Rashid, W. (2018). Ethnobotanical documentation of traditional knowledge about medicinal plants used by indigenous people in Talash valley of Dir lower. *Northern Pakistan Journal Intercult Ethnopharmacol*, 7(1), 8-24.
- Kim, M. J., Nam, H. J., Kim, H. P., Han, S. W., Im, S. A., Kim, T. Y., ... & Bang, Y. J. (2013). OPB-31121, a novel small molecular inhibitor, disrupts the JAK2/STAT3 pathway and exhibits an antitumor activity in gastric cancer cells. *Cancer Letters*, 335(1), 145-152.
- Kleemann, R., Verschuren, L., Morrison, M., Zadelaar, S., van Erk, M. J., Wielinga, P. Y., & Kooistra, T. (2011). Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human *in vitro* and *in vivo* models. *Atherosclerosis*, 218(1), 44-52.

- Kobus-Cisowska, J., Szymanowska, D., Maciejewska, P., Kmiecik, D., Gramza-Michałowska, A., Kulczyński, B., & Cielecka-Piontek, J. (2019). *In vitro* screening for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition and antimicrobial activity of chia seeds (*Salvia hispanica*). *Electronic Journal of Biotechnology*, 37, 1-10.
- Kolodziej, B., Maksymiec, N., Drozdal, K., & Antonkiewicz, J. (2012). Effect of traffic pollution on chemical composition of raw elderberry (*Sambucus nigra* L.). *Journal of Elementology*, 17(1).
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933.
- Konić-Ristić, A., Šavikin, K., Zdunić, G., Janković, T., Juranic, Z., Menković, N., & Stanković, I. (2011). Biological activity and chemical composition of different berry juices. *Food Chemistry*, 125(4), 1412-1417.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1612-1619.
- Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C., & Pehu, E. (2006). Health enhancing foods. *World Bank*.
- Kumar, A. (2014). Correlation between anthropometric measurement, lipid profile, dietary vitamins, serum antioxidants, lipoprotein (a) and lipid peroxides in known cases of 345 elderly hypertensive South Asian aged 56–64 y—A hospital based study. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S189-S197.
- Labun, P., Fejér, J., Šalamon, I., & Ragác, P. (2011). Study of content and composition of anthocyanins in selected plants species. *Planta Medica*, 77(12), PL68.
- Lamy, S., Muhire, É., & Annabi, B. (2018). Antiproliferative efficacy of elderberries and elderflowers (*Sambucus canadensis*) on glioma and brain endothelial cells under normoxic and hypoxic conditions. *Journal of Functional Foods*, 40, 164-179.
- Lawless, H. (1995). Dimensions of sensory quality: A critique. *Food Quality and Preference*, 6(3), 191-199.
- Lawless, H.T., & Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food – Principles and Practices*, 2nd Ed. Springer, USA.
- Lawless, J. (2013). *The Encyclopedia of essential oils: the complete guide to the use of aromatic oils in aromatherapy, herbalism, health, and well being*. Conari Press.
- Lee, J., & Finn, C. E. (2007). Anthocyanins and other polyphenolics in American elderberry (*Sambucus canadensis*) and European elderberry (*S. nigra*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(14), 2665-2675.

- Lee, J., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 88(5), 1269-1278.
- Lee, K., Lee, J. S., Jang, H. J., Kim, S. M., Chang, M. S., Park, S. H., ... & Choi, H. Y. (2012). Chlorogenic acid ameliorates brain damage and edema by inhibiting matrix metalloproteinase-2 and 9 in a rat model of focal cerebral ischemia. *European Journal of Pharmacology*, 689(1-3), 89-95.
- Lee, Y. G., Cho, J. Y., Kim, C. M., Lee, S. H., Kim, W. S., Jeon, T. I., ... & Moon, J. H. (2013). Coumaroyl quinic acid derivatives and flavonoids from immature pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit. *Food Science and Biotechnology*, 22(3), 803-810.
- Leffingwell, J. C., & Alford, E. D. (2005). Volatile constituents of perique tobacco. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 4(2), 899-915.
- Leighton, T. G. (2007). What is ultrasound? *Progress in biophysics and molecular biology*, 93(1-3), 3-83.
- Leonelli, C., & Mason, T. J. (2010). Microwave and ultrasonic processing: now a realistic option for industry. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(9), 885-900.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food chemistry*, 108(1), 1-13.
- Li, H., Pordesimo, L., & Weiss, J. (2004). High intensity ultrasound-assisted extraction of oil from soybeans. *Food Research International*, 37(7), 731-738.
- Lichtenthäler, R., & Marx, F. (2005). Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 103-110.
- Lidstrom, P., Westman, J., & Lewis, A. (2002). Enhancement of combinatorial chemistry by microwave-assisted organic synthesis. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 5(6), 441-458.
- Lim, Y. Y., Lim, T. T., & Tee, J. J. (2006). Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. *Sunway Academic Journal*, 3, 9-20.
- Llorent-Martínez, E. J., Ortega-Barrales, P., Zengin, G., Mocan, A., Simirgiotis, M. J., Ceylan, R., ... & Aktumsek, A. (2017). Evaluation of antioxidant potential, enzyme inhibition activity and phenolic profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: potential sources of bioactive compounds for the food industry. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 609-619.

- Lugasi, A., & Hóvári, J. (2003). Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Food/Nahrung*, 47(2), 79-86.
- Lunadei, L., Galleguillos, P., Diezma, B., Lleó, L., & Ruiz-Garcia, L. (2011). A multispectral vision system to evaluate enzymatic browning in fresh-cut apple slices. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), 225-234.
- Määttä-Riihinen, K. R., Kamal-Eldin, A., & Törrönen, A. R. (2004). Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* species (family Rosaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(20), 6178-6187.
- Majić, B., Šola, I., Likić, S., Juranović Cindrić, I., & Rusak, G. (2015). Characterisation of *Sorbus domestica* L. bark, fruits and seeds: Nutrient composition and antioxidant activity. *Food Technology and Biotechnology*, 53(4), 463-471.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1(1), 7-18.
- Mar, J. M., da Silva, L. S., Lira, A. C., Kinupp, V. F., Yoshida, M. I., Moreira, W. P., ... & Campelo, P. H. (2020). Bioactive compounds-rich powders: Influence of different carriers and drying techniques on the chemical stability of the *Hibiscus acetosella* extract. *Powder Technology*, 360, 383-391.
- Mărcuță, L., Mărcuță, A., & Mârza, B. (2014). Modern tendencies in changing the consumers' preferences. *Procedia Economics and Finance*, 16, 535-539.
- Markham, K. R. (1989). Flavones, flavonols and their glycosides. *Methods in Plant Biochemistry*, 1, 197-235.
- Masondo, N. A., Stafford, G. I., Aremu, A. O., & Makunga, N. P. (2019). Acetylcholinesterase inhibitors from southern African plants: An overview of ethnobotanical, pharmacological potential and phytochemical research including and beyond Alzheimer's disease treatment. *South African Journal of Botany*, 120, 39-64.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., & Vallette, F. M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41(1), 31-91.
- McKay, D. L., Chen, C. Y. O., Zampariello, C. A., & Blumberg, J. B. (2015). Flavonoids and phenolic acids from cranberry juice are bioavailable and bioactive in healthy older adults. *Food Chemistry*, 168, 233-240.

- Menon, A., Stojceska, V., & Tassou, S. (2020). A systematic review on the recent advances of the energy efficiency improvements in non-conventional food drying technologies. *Trends in Food Science & Technology*.
- Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Schmitzer, V., Veberic, R., & Stampar, F. (2016). Comparison of major taste compounds and antioxidative properties of fruits and flowers of different *Sambucus* species and interspecific hybrids. *Food Chemistry*, 200, 134-140.
- Mikulic-Petkovsek, M., Ivancic, A., Todorovic, B., Veberic, R., & Stampar, F. (2015). Fruit phenolic composition of different elderberry species and hybrids. *Journal of Food Science*, 80(10), C2180-C2190.
- Mikulic-Petkovsek, M., Schmitzer, V., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. *Journal of Food Science*, 77(10), C1064-C1070.
- Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., & Veberic, R. (2012). HPLC–MSn identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. *Food Chemistry*, 135(4), 2138-2146.
- Milivojević, J., Maksimović, V., Nikolić, M., Bogdanović, J., Maletić, R., & Milatović, D. (2011). Chemical and antioxidant properties of cultivated and wild *Fragaria* and *Rubus* berries. *Journal of Food Quality*, 34(1), 1-9.
- Milivojevic, J., Slatnar, A., Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Nikolic, M., & Veberic, R. (2012). The influence of early yield on the accumulation of major taste and health-related compounds in black and red currant cultivars (*Ribes* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(10), 2682-2691.
- Milojević, S. Ž. (2011). Kinetika hidroddestilacije, karakterizacija i frakcionisanje etarskog ulja ploda kleke (*Juniperus communis* L.) (Doktorska disertacija, Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет).
- Milojević, S. Ž., Stojanović, T. D., Palić, R., Lazić, M. L., & Veljković, V. B. (2008). Kinetics of distillation of essential oil from comminuted ripe juniper (*Juniperus communis* L.) berries. *Biochemical Engineering Journal*, 39(3), 547-553.
- Mirończuk-Chodakowska, I., Witkowska, A. M., & Zujko, M. E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in medical sciences*, 63(1), 68-78.
- Młynarczyk, K., Walkowiak-Tomczak, D., & Łysiak, G. P. (2018). Bioactive properties of *Sambucus nigra* L. as a functional ingredient for food and pharmaceutical industry. *Journal of Functional Foods*, 40, 377-390.

- Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: a review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
- Molnár, P.J. (1995). A model for overall description of food quality. *Food Quality and Preference*, 6(3), 185-190.
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(14), 4084-4088.
- Morugán-Coronado, A., Linares, C., Gómez-López, M. D., Faz, Á., & Zornoza, R. (2020). The impact of intercropping, tillage and fertilizer type on soil and crop yield in fruit orchards under Mediterranean conditions: A meta-analysis of field studies. *Agricultural Systems*, 178, 102736.
- Moskowitz, H., & Hartmann, J. (2008). Consumer research: creating a solid base for innovative strategies. *Trends in Food Science & Technology*, 19(11), 581-589.
- Moskowitz, H.R. (1995). Food quality: Conceptual and sensory aspects. *Food Quality and Preference*, 6(3), 157-162.
- Mukherjee, P. K., Biswas, R., Sharma, A., Banerjee, S., Biswas, S., & Katiyar, C. K. (2018). Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. *Journal of Herbal Medicine*, 14, 1-16.
- Nakajima, J. I., Tanaka, I., Seo, S., Yamazaki, M., & Saito, K. (2004). LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *BioMed Research International*, 2004(5), 241-247.
- Nantongo, J. S., Odoi, J. B., Abigaba, G., & Gwali, S. (2018). Variability of phenolic and alkaloid content in different plant parts of *Carissa edulis* Vahl and *Zanthoxylum chalybeum* Engl. *BMC Research Notes*, 11(1), 125.
- Natić, M., Pavlović, A., Bosco, F. L., Stanisavljević, N., Zagorac, D. D., Akšić, M. F., & Papetti, A. (2019). Nutraceutical properties and phytochemical characterization of wild Serbian fruits. *European Food Research and Technology*, 245(2), 469-478.
- Natural Color System®© - The international language of colour communication™, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden, www.ncscolour.com
- Nile, S. H., & Park, S. W. (2014). Edible berries: Bioactive components and their effect on human health. *Nutrition*, 30(2), 134-144.
- Nurmi, T., Mursu, J., Heinonen, M., Nurmi, A., Hiltunen, R., & Voutilainen, S. (2009). Metabolism of berry anthocyanins to phenolic acids in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2274-2281.

- Ochmian, I., Oszmianski, J., & Skupien, K. (2009). Chemical composition, phenolics, and firmness of small black fruits. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 83(1), 64-69.
- OIV - Office Internationale de la Vigne et du Vin. (2013). Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Volume 1 and 2, Paris.
- Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... & Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- Onyeike, E. N., & Omubo-Dede, T. T. (2002). Effect of heat treatment on the proximate composition, energy values, and levels of some toxicants in African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) seed varieties. *Plant Foods for Human Nutrition*, 57(3-4), 223-231.
- Opara, U. L., & Pathare, P. B. (2014). Bruise damage measurement and analysis of fresh horticultural produce—a review. *Postharvest Biology and Technology*, 91, 9-24.
- Orčić, D. (2016). HPLC: Teorija i primena u biohemijskim naukama, Novi Sad.
- Orčić, D., Francišković, M., Bekvalac, K., Svirčev, E., Beara, I., Lesjak, M., & Mimica-Dukić, N. (2014). Quantitative determination of plant phenolics in *Urtica dioica* extracts by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 143, 48-53.
- Orhan, I. E., Senol, F. S., Gulpinar, A. R., Sekeroglu, N., Kartal, M., & Sener, B. (2012). Neuroprotective potential of some terebinth coffee brands and the unprocessed fruits of *Pistacia terebinthus* L. and their fatty and essential oil analyses. *Food Chemistry*, 130(4), 882-888.
- Orhan, I., Kartal, M., Tosun, F., & Şener, B. (2007). Screening of various phenolic acids and flavonoid derivatives for their anticholinesterase potential. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(11-12), 829-832.
- Orhan, N., İçöz, Ü. G., Altun, L., & Aslan, M. (2016). Anti-hyperglycaemic and antioxidant effects of *Bidens tripartita* and quantitative analysis on its active principles. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(10), 1114.
- Özgen, M., Scheerens, J. C., Reese, R. N., & Miller, R. A. (2010). Total phenolic, anthocyanin contents and antioxidant capacity of selected elderberry (*Sambucus canadensis* L.) accessions. *Pharmacognosy Magazine*, 6(23), 198.

- Pal-Nath, D., Didi-Cohen, S., Shtaida, N., Nath, P. R., Samani, T., Boussiba, S., & Khozin-Goldberg, I. (2017). Improved productivity and oxidative stress tolerance under nitrogen starvation is associated with the ablated $\Delta 5$ desaturation in the green microalga *Lobosphaera incisa*. *Algal Research*, 26, 25-38.
- Pappas, E., & Schaich, K. M. (2009). Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(9), 741-781.
- Patist, A., & Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 147-154.
- Pharmacopoeia Jugoslavica (1984). Editio quarta (Ph. Jug. IV). Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 77.
- Pikal, M. J., Bogner, R., Mudhivarthi, V., Sharma, P., & Sane, P. (2016). Freeze-drying process development and scale-up: scale-up of edge vial versus center vial heat transfer coefficients, Kv. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 105(11), 3333-3343.
- Pinela, J., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2017). Wild edible plants: Nutritional and toxicological characteristics, retrieval strategies and importance for today's society. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 165-188.
- Pisano, R., Arsiccio, A., Capozzi, L. C., & Trout, B. L. (2019). Achieving continuous manufacturing in lyophilization: Technologies and approaches. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- Pogorzelski, E. (1992). Studies on the formation of histamine in must and wines from elderberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 239-244.
- Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Schröder, N., & Rechkemmer, G. (1999). Anthocyanins are potent antioxidants in model systems but do not reduce endogenous oxidative DNA damage in human colon cells. *European Journal of Nutrition*, 38(5), 227-234.
- Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (2018). Službeni glasnik Republike Srbije, 16/2018.
- Pravilnik o deklarisanju, označavanju i reklamiranju hrane (2020). Službeni glasnik Republike Srbije, 17/2020.
- Pravilnik o enološkim postupcima i enološkim sredstvima za proizvodnju šire, vina i drugih proizvoda (2015). Službeni glasnik Republike Srbije, 26/2015.
- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića (2004). Službeni list Srbije i Crne Gore, 24/2004.

- Pravilnik o metodama fizičkih i hemijskih analiza (1988). Službeni list Savezne Federativne Republike Jugoslavije, 74/1988.
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama vršenja hemijskih i fizičkih analiza (1987). Službeni list Savezne Federativne Republike Jugoslavije, 41/1987.
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama vršenja hemijskih i fizičkih analiza (1985). Službeni list Savezne Federativne Republike Jugoslavije, 41/1985.
- Pravilnik o parametrima i metodama za analizu i utvrđivanje kvaliteta šire, vina i drugih proizvoda od grožđa, šire, kljuka i vina koji se koriste u proizvodnji vina (2014). Službeni glasnik Republike Srbije 107/2014.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2015). *Essential oils in food preservation, flavor and safety*. Academic Press.
- Prieto P, Pineda M, & Aguilar M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 7, 121-3.
- Rathi, A. (2015). Hydrogen Cyanide. Royalchemistrysociety.com (accessed on May 2, 2016).
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., ... & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1), 3-12.
- Razavi, S. M., Zahri, S., Zarrini, G., Nazemiyeh, H., & Mohammadi, S. (2009). Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 35(3), 376-378.
- Rieger, G., Muller, M. A. R. I. A., Guttenger, H., & Bucar, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9080-9086.
- Roberfroid, M. B. (2000). Concepts and strategy of functional food science: The European perspective. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1660S-1664S.
- Ruiz-Jiménez, J., Priego-Capote, F., & de Castro, M. L. (2004). Identification and quantification of trans fatty acids in bakery products by gas chromatography–mass spectrometry after dynamic ultrasound-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*.
- Rupasinghe, H. V., & Clegg, S. (2007). Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements, and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and analysis*, 20(2), 133-137.

- Rupasinghe, H. V., Joshi, V. K., Smith, A., & Parmar, I. (2017). Chemistry of fruit wines. In *Science and Technology of Fruit Wine Production* (pp. 105-176). Academic Press.
- Saguy, S., & Taoukis, P. S. (2017). From open innovation to enginomics: paradigm shifts. *Trends in Food Science & Technology*, 60, 64-70.
- Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., & Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 571-581.
- Salman, K. A., & Ashraf, S. (2013). Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 21, 41-49.
- Salvador, Â. C., Silvestre, A. J., & Rocha, S. M. (2018). Comprehensive Insight into the Elderflowers and Elderberries (*Sambucus nigra* L.) Mono and Sesquiterpenic Metabolites: Factors that Modulate Their Composition. *Secondary Metabolites: Sources and Applications*, 59.
- Samadi, M., Abidin, Z. Z., Yunus, R., Biak, D. R. A., Yoshida, H., & Lok, E. H. (2017). Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 25(2), 216-222.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sanderson, B. (2002). Applied sonochemistry—the uses of power ultrasound in chemistry and processing. By Timothy J Mason and John P Lorimer. *Wiley-VCH Verlag, Weinheim*, 22, 303.
- Schatzschneider, U. (2017). Metal Complexes as Delivery Systems for CO, NO, and H₂S to Explore the Signaling Network of Small-Molecule Messengers. *Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells*, 181-204.
- Schelezki, O. J., Antalick, G., Šuklje, K., & Jeffery, D. W. (2020). Pre-fermentation approaches to producing lower alcohol wines from Cabernet Sauvignon and Shiraz: Implications for wine quality based on chemical and sensory analysis. *Food Chemistry*, 309, 125698.
- Schmitzer, V., Veberic, R., Slatnar, A., & Stampar, F. (2010). Elderberry (*Sambucus nigra* L.) wine: a product rich in health promoting compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10143-10146.

- Schneid, S. C., Gieseler, H., Kessler, W. J., & Pikal, M. J. (2009). Non-invasive product temperature determination during primary drying using tunable diode laser absorption spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(9), 3406-3418.
- Seeram, N. P. (2008). Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 630-635.
- Sellappan, S., Akoh, C. C., & Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2432-2438.
- Senica, M., Stampar, F., Veberic, R., & Mikulic-Petkovsek, M. (2016). Processed elderberry (*Sambucus nigra* L.) products: A beneficial or harmful food alternative? *LWT-Food Science and Technology*, 72, 182-188.
- Shaaban, H. A., El-Ghorab, A. H., & Shibamoto, T. (2012). Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components. *Journal of Essential Oil Research*, 24(2), 203-212.
- Shadyro, O., & Lisovskaya, A. (2019). ROS-induced lipid transformations without oxygen participation. *Chemistry and physics of lipids*.
- Shah, K., Kumar, R. G., Verma, S., & Dubey, R. S. (2001). Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science*, 161(6), 1135-1144.
- Sharma, S., Sahni, J. K., Ali, J., & Baboota, S. (2015). Effect of high-pressure homogenization on formulation of TPGS loaded nanoemulsion of rutin–pharmacodynamic and antioxidant studies. *Drug Delivery*, 22(4), 541-551.
- Shukla, V., & Mattoo, A. K. (2009). Potential for engineering horticultural crops with high-antioxidant capacity.
- Siddiq, M., Dolan, K. D., Perkins-Veazie, P., & Collins, J. K. (2018). Effect of pectinolytic and cellulytic enzymes on the physical, chemical, and antioxidant properties of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) juice. *LWT--Food Science and Technology*, 92, 127-132.
- Sidor, A., & Gramza-Michałowska, A. (2015). Advanced research on the antioxidant and health benefit of elderberry (*Sambucus nigra*) in food—a review. *Journal of Functional Foods*, 18, 941-958.
- Silvestre, W. P., Livinalli, N. F., Baldasso, C., & Tessaro, I. C. (2019). Pervaporation in the separation of essential oil components: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 93, 42-52.
- Simões, C.M.O., Schenkel, E.P., Gosmann, G., Mello, J.C.P., & Mentz, L.A. (2010). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS.

- Simonyi, A., Chen, Z., Jiang, J., Zong, Y., Chuang, D. Y., Gu, Z., ... & Thomas, A. L. (2015). Inhibition of microglial activation by elderberry extracts and its phenolic components. *Life Sciences*, *128*, 30-38.
- Singh, G., & Thakur, K. (2018). Synthesis and Investigations on Antioxidant Behaviour of Chromone based Semicarbazones. *Oriental Journal of Chemistry*, *34*(6), 3095.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, *299*, 152-178.
- Siriwoharn, T., Wrolstad, R. E., & Durst, R. W. (2006). Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment. *Journal of Food Science*, *70*(3), C189-C197.
- Skupień, K., & Oszmiański, J. (2004). Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in northwest Poland. *European Food Research and Technology*, *219*(1), 66-70.
- Slimestad, R., & Solheim, H. (2002). Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(11), 3228-3231.
- Sloan, A. E. (2000). The top ten functional food trends. *Food Technology (Chicago)*, *54*(4), 33-62.
- Sloan, A. E. (2002). The top 10 functional food trends: the next generation. *Food Technology (Chicago)*, *56*(4), 32-57.
- Sloan, A. E. (2004). The top 10 functional food trends 2004. *Food Technology (Chicago)*, *58*(4), 28-51.
- Smith, J. E., Rowan, N. J., & Tan, K. K. (2000). Functional food science and the medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, *2*(4).
- Smith-Hall, C., Larsen, H. O., & Pouliot, M. (2012). People, plants and health: a conceptual framework for assessing changes in medicinal plant consumption. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, *8*(1), 43.
- Sokolowsky, M., Rosenberger, A., & Fischer, U. (2015). Sensory impact of skin contact on white wines characterized by descriptive analysis, time-intensity analysis and temporal dominance of sensations analysis. *Food Quality and Preference*, *39*, 285-297.
- Sovilj, M., & Spasojevic, M. (2001). Production and application of essential oils from the domestic [Yugoslav] medicinal plants. *PTEP (Yugoslavia)*.

- Spence, J. T. (2006). Challenges related to the composition of functional foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S4-S6.
- Stanisavljević, I. T., Lazić, M. L., & Veljković, V. B. (2007). Ultrasonic extraction of oil from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 14(5), 646-652.
- Stewart, D., McDougall, G. J., Sungurtas, J., Verrall, S., Graham, J., & Martinussen, I. (2007). Metabolomic approach to identifying bioactive compounds in berries: advances toward fruit nutritional enhancement. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(6), 645-651.
- Stoilova, I., Wilker, M., Stoyanova, A., Krastanov, A., & Stanchev, V. (2007). Antioxidant activity of extract from elder flower (*Sambucus nigra* L.). *Herba Polonica*, 53(1), 45-54.
- Stone, H., Bleibaum, R.N., Thomas, H.A. (2012). Sensory Evaluation Practices. Academic Press / Elsevier Inc., San Diego, USA.
- Šumić, Z. (2014). Optimizacija sušenja voća u vakuumu. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad.
- Sun, L., Chen, W., Meng, Y., Yang, X., Yuan, L., & Guo, Y. (2016). Interactions between polyphenols in thinned young apples and porcine pancreatic α -amylase: Inhibition, detailed kinetics and fluorescence quenching. *Food Chemistry*, 208, 51-60.
- Sun, L., Gidley, M. J., & Warren, F. J. (2018). Tea polyphenols enhance binding of porcine pancreatic α -amylase with starch granules but reduce catalytic activity. *Food Chemistry*, 258, 164-173.
- Sun, Y., Liu, D., Chen, J., Ye, X., & Yu, D. (2011). Effects of different factors of ultrasound treatment on the extraction yield of the all-trans- β -carotene from citrus peels. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 243-249.
- Svoboda, K., Brooker, J. D., & Zrustova, J. (2005, March). Antibacterial and antioxidant properties of essential oils: Their potential applications in the food industries. In *International Symposium on Natural Preservatives in Food Systems 709* (pp. 35-44).
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131-175.
- Szajdek, A., & Borowska, E. J. (2008). Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(4), 147-156.
- Tahergorabi, R., Matak, K. E., & Jaczynski, J. (2015). Fish protein isolate: Development of functional foods with nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 18, 746-756.

- Tang, X. C., & Pikal, M. J. (2004). Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21(2), 191-200.
- Taylor, P., Radic, Z., Hosea, N. A., Camp, S., Marchot, P., & Berman, H. A. (1995). Structural bases for the specificity of cholinesterase catalysis and inhibition. *Toxicology Letters*, 82, 453-458.
- Thilakarathna, S. H., & Rupasinghe, H. P. (2013). Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients*, 5(9), 3367-3387.
- Toaldo, I. M., Cruz, F. A., da Silva, E. L., & Bordignon-Luiz, M. T. (2016). Acute consumption of organic and conventional tropical grape juices (*Vitis labrusca* L.) increases antioxidants in plasma and erythrocytes, but not glucose and uric acid levels, in healthy individuals. *Nutrition Research*, 36(8), 808-817.
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876.
- Tomić, N. (2016). Senzorska analiza hrane – praktikum sa teorijskim osnovama. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.
- Torabian, G., Valtchev, P., Adil, Q., & Dehghani, F. (2019). Anti-influenza activity of elderberry (*Sambucus nigra*). *Journal of Functional Foods*, 54, 353-360.
- Trajković, J. E. A., Baras, J., Miric, M., & Iler, S. (1983). Food analysis. *Belgrade: Faculty of Technology and Metallurgy*.
- Tucakov, J. (2010). Lečenje biljem. Beograd. Zapis.
- Ulbricht, C., Basch, E., Cheung, L., Goldberg, H., Hammerness, P., Isaac, R., ... & Weissner, W. (2014). An evidence-based systematic review of elderberry and elderflower (*Sambucus nigra*) by the Natural Standard Research Collaboration. *Journal of Dietary Supplements*, 11(1), 80-120.
- United States Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science. (2018). Determination of Metals by ICP-MS and ICP-OES (Optical Emission Spectrometry).
- Uysal, S., Zengin, G., Locatelli, M., Bahadori, M. B., Mocan, A., Bellagamba, G., ... & Aktumsek, A. (2017). Cytotoxic and enzyme inhibitory potential of two *Potentilla* species (*P. speciosa* L. and *P. reptans* Willd.) and their chemical composition. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 290.
- Valle, T., Carvalho, C., Ramos, M., Mühlen, S. G., & Villela, V. (2004). Cyanide and acid content in progenies from crosses of bitter and sweet cassava cultivars. *Bragantia*, 63(2), 221-226.

- Veberic, R., Jakopic, J., Stampar, F., & Schmitzer, V. (2009). European elderberry (*Sambucus nigra* L.) rich in sugars, organic acids, anthocyanins and selected polyphenols. *Food Chemistry*, 114(2), 511-515.
- Vecchio, R., Van Loo, E. J., & Annunziata, A. (2016). Consumers' willingness to pay for conventional, organic and functional yogurt: evidence from experimental auctions. *International Journal of Consumer Studies*, 40(3), 368-378.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F., & Chemat, F. (2008). Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *Journal of Chromatography a*, 1190(1-2), 14-17.
- Vujanović, M., Majkić, T., Zengin, G., Beara, I., Cvetanović, A., Mahomoodally, M. F., & Radojković, M. (2019). Advantages of contemporary extraction techniques for the extraction of bioactive constituents from black elderberry (*Sambucus nigra* L.) flowers. *Industrial Crops and Products*, 136, 93-101.
- Vulić, J. J., Vračar, L. O., & Šumić, Z. M. (2008). Chemical characteristics of cultivated elderberry fruit. *Acta Periodica Technologica*, (39), 85-90.
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17(6), 300-312.
- Wang, S. Y., & Jiao, H. (2000). Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5677-5684.
- Wang, S. Y., & Lin, H. S. (2000). Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
- Wang, Y. X., Su, W. C., Wang, Q., Lin, Y. F., Zhou, Y., Lin, L. F., ... & Shi, Y. (2019). Antityrosinase and antioxidant activities of guanidine compounds and effect of guanylthiourea on melanogenesis. *Process Biochemistry*, 85, 84-96.
- Watanabe, S., Nagano, S., Duce, J., Kiaei, M., Li, Q. X., Tucker, S. M., ... & Culotta, V. C. (2007). Increased affinity for copper mediated by cysteine 111 in forms of mutant superoxide dismutase 1 linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(10), 1534-1542.
- Welti-Chanes, J., Bermúdez, D., Valdez-Fragoso, A., Mújica-Paz, H., Alzamora, S.M., (2005). Dehydrated Vegetables: Principles and Applications in Hui, Y. H., Sherkat, F. (ed.):

- Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume. CRC Press. pp. 1-61.
- Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., ... & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538-549.
- Wibisono, R., Zhang, J., Saleh, Z., Stevenson, D. E., & Joyce, N. I. (2009). Optimisation of accelerated solvent extraction for screening of the health benefits of plant food materials. *Health*, 1(03), 220.
- World Health Organization. (2015). International Health Regulations (2005) core capacity workbook: a series of exercises to assist the validation of core capacity implementation levels (No. WHO/HSE/GCR/2015.13). World Health Organization.
- Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12), 4026-4037.
- Xu, F., Tavintharan, S., Sum, C. F., Woon, K., Lim, S. C., & Ong, C. N. (2013). Metabolic signature shifts in type 2 diabetes mellitus revealed by mass spectrometry-based metabolomics. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(6), E1060-E1065.
- Yahya, N. A., Attan, N., & Wahab, R. A. (2018). An overview of cosmeceutically relevant plant extracts and strategies for extraction of plant-based bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 112, 69-85.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7320-7329.
- Youdim, K. A., Martin, A., & Joseph, J. A. (2000). Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(1), 51-60.
- Zahmanov, G., Alipieva, K., Simova, S., & Georgiev, M. I. (2015). Metabolic differentiations of dwarf elder by NMR-based metabolomics. *Phytochemistry Letters*, 11, 404-409.
- Zanini, B., Marullo, M., Villanacci, V., Salemme, M., Lanzarotto, F., Ricci, C., & Lanzini, A. (2016). Persistent intraepithelial lymphocytosis in celiac patients adhering to gluten-free diet is not abolished despite a gluten contamination elimination diet. *Nutrients*, 8(9), 525.

- Zeng, H., Shao, B., Zhuang, J., Peng, Y., Chen, H., Yu, Q., ... & Yu, X. (2020). Naringenin reduces early brain injury in subarachnoid hemorrhage (SAH) mice: The role of the AMPK/SIRT3 signaling pathway. *Journal of Functional Foods*, 72, 104043.
- Zengin, G., Mollica, A., Aumeeruddy, M. Z., Rengasamy, K. R., & Mahomoodally, M. F. (2018). Phenolic profile and pharmacological propensities of *Gynandris sisyrinchium* through *in vitro* and *in silico* perspectives. *Industrial Crops and Products*, 121, 328-337.
- Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.
- Zeravik, J., Fohlerova, Z., Milovanovic, M., Kubesa, O., Zeisbergerova, M., Lacina, K., ... & Skladal, P. (2016). Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. *Food chemistry*, 194, 432-440.
- Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 502-509.

7. PRILOZI

Rezultati statističke obrade ispitivanih uzoraka

PRILOG 7.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima plodova zove

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove, Histogram 4.1.

Ekstrakti	Ukupni fenoli (mg GAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,21±0,01 ^{l,m}
S vodeni MAE	0,27±0,01 ^k
S vodeni MAC	0,20±0,01 ^m
TS vodeni UAE	0,64±0,02 ⁱ
TS vodeni MAE	0,82±0,02 ^g
TS vodeni MAC	0,97±0,01 ^f
L vodeni UAE	1,09±0,02 ^d
L vodeni MAE	1,49±0,03 ^a
L vodeni MAC	1,26±0,01 ^b
S etanolni UAE	0,20±0,02 ^m
S etanolni MAE	0,25±0,02 ^k
S etanolni MAC	0,23±0,01 ^l
TS etanolni UAE	0,56±0,01 ^j
TS etanolni MAE	0,62±0,01 ⁱ
TS etanolni MAC	0,77±0,01 ^h
L etanolni UAE	1,00±0,01 ^e
L etanolni MAE	1,16±0,03 ^c
L etanolni MAC	1,15±0,02 ^c

*miligram ekvivalenata galne kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-m značano se razlikuju p≤0,05

Tabela 2. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove, Histogram 4.2.

Ekstrakti	Ukupni flavonoidi (mg RU/ml E)*
S vodeni UAE	0,004±0,002 ^k
S vodeni MAE	0,028±0,001 ^{h,i}
S vodeni MAC	0,014±0,001 ^j
TS vodeni UAE	0,043±0,003 ^g
TS vodeni MAE	0,065±0,003 ^f
TS vodeni MAC	0,032±0,002 ^{h,i}
L vodeni UAE	0,085±0,002 ^{c,d}
L vodeni MAE	0,115±0,003 ^a
L vodeni MAC	0,083±0,003 ^{c,d}
S etanolni UAE	0,023±0,002 ⁱ
S etanolni MAE	0,034±0,002 ^{g,h}
S etanolni MAC	0,023±0,002 ⁱ
TS etanolni UAE	0,063±0,003 ^f
TS etanolni MAE	0,079±0,002 ^{d,e}
TS etanolni MAC	0,092±0,002 ^{b,c}
L etanolni UAE	0,096±0,003 ^b
L etanolni MAE	0,071±0,002 ^{e,f}
L etanolni MAC	0,071±0,001 ^{e,f}

*miligram ekvivalenata rutina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-k značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 3. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove, Histogram 4.3.

Ekstrakti	Ukupni monomerni antocijani (mg CGE/ml E)*
S vodeni UAE	0,10±0,01 ^{h,i}
S vodeni MAE	0,13±0,02 ^{h,i}
S vodeni MAC	0,07±0,01 ⁱ
TS vodeni UAE	0,22±0,02 ^{f,g,h}
TS vodeni MAE	0,16±0,01 ^{g,h,i}
TS vodeni MAC	0,16±0,02 ^{g,h,i}
L vodeni UAE	0,63±0,02 ^c
L vodeni MAE	0,60±0,08 ^c
L vodeni MAC	0,47±0,05 ^d
S etanolni UAE	0,15±0,01 ^{g,h,i}
S etanolni MAE	0,17±0,01 ^{f,g,h}
S etanolni MAC	0,18±0,01 ^{f,g,h}
TS etanolni UAE	0,25±0,03 ^{e,f}
TS etanolni MAE	0,25±0,02 ^{e,f}
TS etanolni MAC	0,31±0,02 ^e
L etanolni UAE	0,76±0,04 ^b
L etanolni MAE	0,86±0,06 ^a
L etanolni MAC	0,76±0,05 ^b

*miligram ekvivalenata cijanidin-3-O-glukozida po mililitru ekstrakta.

3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-i značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 4. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima svežih, tradicionalno sušenih i liofilizovanih plodova zove, Histogram 4.4.

Ekstrakti	Ukupni tanini (mg CE/ml E)*
S vodeni UAE	0,11±0,01 ^j
S vodeni MAE	0,20±0,01 ^{ij}
S vodeni MAC	0,11±0,01 ^j
TS vodeni UAE	0,67±0,07 ^{f,g}
TS vodeni MAE	0,79±0,03 ^{e,f}
TS vodeni MAC	0,48±0,01 ^h
L vodeni UAE	0,95±0,05 ^d
L vodeni MAE	1,25±0,13 ^c
L vodeni MAC	0,89±0,01 ^{d,e}
S etanolni UAE	0,27±0,02 ⁱ
S etanolni MAE	0,27±0,03 ⁱ
S etanolni MAC	0,26±0,02 ⁱ
TS etanolni UAE	0,57±0,05 ^{g,h}
TS etanolni MAE	0,97±0,04 ^d
TS etanolni MAC	0,93±0,07 ^d
L etanolni UAE	1,41±0,07 ^b
L etanolni MAE	1,63±0,01 ^a
L etanolni MAC	1,29±0,06 ^{b,c}

*miligram ekvivalenata katehina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-j značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.2. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove (Antioksidativna aktivnost)

Tabela 5. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala, Histogram 4.5.

Ekstrakti	DPPH (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	0,25±0,03 ^j
S vodeni MAE	0,35±0,01 ⁱ
S vodeni MAC	0,22±0,01 ^j
TS vodeni UAE	0,75±0,03 ^g
TS vodeni MAE	0,72±0,05 ^g
TS vodeni MAC	1,34±0,06 ^a
L vodeni UAE	1,18±0,03 ^{b,c}
L vodeni MAE	1,22±0,10 ^b
L vodeni MAC	0,92±0,10 ^e
S etanolni UAE	0,24±0,01 ^j
S etanolni MAE	0,37±0,03 ⁱ
S etanolni MAC	0,30±0,01 ^{i,j}
TS etanolni UAE	0,83±0,06 ^f
TS etanolni MAE	0,83±0,04 ^f
TS etanolni MAC	1,03±0,04 ^d
L etanolni UAE	0,63±0,02 ^h
L etanolni MAE	1,32±0,03 ^a
L etanolni MAC	1,10±0,06 ^{c,d}

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-j značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 6. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala, Histogram 4.6.

Ekstrakti	ABTS (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	0,54±0,01 ^k
S vodeni MAE	0,73±0,01 ⁱ
S vodeni MAC	0,45±0,01 ^l
TS vodeni UAE	1,67±0,02 ^h
TS vodeni MAE	2,10±0,06 ^e
TS vodeni MAC	4,56±0,06 ^a
L vodeni UAE	1,83±0,06 ^g
L vodeni MAE	1,87±0,01 ^{f,g}
L vodeni MAC	1,60±0,05 ^h
S etanolni UAE	0,60±0,01 ^{j,k}
S etanolni MAE	0,76±0,01 ⁱ
S etanolni MAC	0,62±0,01 ^j
TS etanolni UAE	1,67±0,06 ^h
TS etanolni MAE	1,91±0,02 ^f
TS etanolni MAC	2,21±0,02 ^d
L etanolni UAE	2,56±0,03 ^c
L etanolni MAE	2,70±0,02 ^b
L etanolni MAC	2,55±0,03 ^c

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-l značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 7. Sposobnost ekstrakata plodova zove u redukciji Fe³⁺ jona, Histogram 4.7.

Ekstrakti	FRAP (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	0,65±0,02 ^h
S vodeni MAE	0,80±0,01 ^g
S vodeni MAC	0,52±0,01 ⁱ
TS vodeni UAE	1,98±0,04 ^f
TS vodeni MAE	2,65±0,02 ^d
TS vodeni MAC	3,51±0,10 ^a
L vodeni UAE	2,50±0,03 ^e
L vodeni MAE	3,42±0,04 ^b
L vodeni MAC	2,70±0,08 ^d
S etanolni UAE	0,71±0,02 ^h
S etanolni MAE	0,84±0,02 ^g
S etanolni MAC	0,68±0,02 ^h
TS etanolni UAE	1,96±0,05 ^f
TS etanolni MAE	1,97±0,02 ^f
TS etanolni MAC	2,54±0,06 ^e
L etanolni UAE	2,89±0,04 ^c
L etanolni MAE	2,82±0,02 ^c
L etanolni MAC	2,86±0,02 ^c

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-i značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 8. Sposobnost ekstrakata plodova zove u redukciji Cu^{2+} jona, Histogram 4.8.

Ekstrakti	CUPRAC (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	0,72±0,01 ^l
S vodeni MAE	0,92±0,02 ^k
S vodeni MAC	0,64±0,01 ^l
TS vodeni UAE	2,30±0,03 ⁱ
TS vodeni MAE	2,81±0,04 ^g
TS vodeni MAC	5,13±0,04 ^a
L vodeni UAE	2,99±0,02 ^f
L vodeni MAE	4,18±0,04 ^b
L vodeni MAC	3,43±0,06 ^e
S etanolni UAE	0,86±0,01 ^k
S etanolni MAE	1,04±0,02 ^j
S etanolni MAC	0,84±0,02 ^k
TS etanolni UAE	2,42±0,01 ^h
TS etanolni MAE	2,76±0,14 ^g
TS etanolni MAC	2,82±0,02 ^g
L etanolni UAE	3,64±0,01 ^d
L etanolni MAE	3,88±0,03 ^c
L etanolni MAC	3,88±0,03 ^c

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-l značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 9. Sposobnost ekstrakata plodova zove u neutralizaciji •NO radikala, Histogram 4.9.

Ekstrakti	NO (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	5,03±0,50 ^g
S vodeni MAE	7,28±0,75 ^{f,g}
S vodeni MAC	4,16±0,38 ^g
TS vodeni UAE	8,83±0,63 ^{e,f}
TS vodeni MAE	13,23±0,98 ^{c,d}
TS vodeni MAC	13,65±0,47 ^{c,d}
L vodeni UAE	12,36±1,08 ^{c,d}
L vodeni MAE	12,70±0,87 ^{c,d}
L vodeni MAC	14,25±0,21 ^c
S etanolni UAE	5,72±0,50 ^{f,g}
S etanolni MAE	5,35±0,40 ^g
S etanolni MAC	7,16±0,49 ^{f,g}
TS etanolni UAE	15,25±1,16 ^c
TS etanolni MAE	7,47±0,66 ^{f,g}
TS etanolni MAC	10,80±1,05 ^{d,e}
L etanolni UAE	23,18±1,02 ^b
L etanolni MAE	32,60±3,54 ^a
L etanolni MAC	31,65±2,33 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-g značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 10. Sposobnost ekstrakata plodova zove u heliranju jona metala, Histogram 4.10.

Ekstrakti	Heliranje jona metala (mg EDTA/ml E)*
S vodeni UAE	0,12±0,01 ^{k,l}
S vodeni MAE	0,07±0,01 ^l
S vodeni MAC	0,11±0,01 ^{k,l}
TS vodeni UAE	0,52±0,01 ^d
TS vodeni MAE	0,68±0,02 ^a
TS vodeni MAC	0,46±0,01 ^e
L vodeni UAE	0,13±0,01 ^k
L vodeni MAE	0,65±0,02 ^{a,b}
L vodeni MAC	0,37±0,01 ^f
S etanolni UAE	0,26±0,01 ^{h,i}
S etanolni MAE	0,27±0,01 ^{h,i}
S etanolni MAC	0,21±0,01 ^j
TS etanolni UAE	0,57±0,02 ^{c,d}
TS etanolni MAE	0,60±0,03 ^{b,c}
TS etanolni MAC	0,25±0,03 ^{i,j}
L etanolni UAE	0,32±0,05 ^g
L etanolni MAE	0,39±0,06 ^f
L etanolni MAC	0,30±0,02 ^{g,h}

*miligram ekvivalenata etilendiaminotetrasirćetne kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-l značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 11. Ukupna antioksidativna aktivnost ekstraktata plodova zove, Histogram 4.11.

Ekstrakti	Ukupna antioksidativna aktivnost (mg TE/ml E)*
S vodeni UAE	1,79±0,12 ^h
S vodeni MAE	2,04±0,07 ^{g,h}
S vodeni MAC	1,70±0,08 ^h
TS vodeni UAE	4,67±0,11 ^{c,d,e,f}
TS vodeni MAE	6,15±0,16 ^{b,c,d}
TS vodeni MAC	5,44±0,16 ^{b,c,d,e}
L vodeni UAE	3,92±0,28 ^{e,f,g}
L vodeni MAE	8,84±0,23 ^a
L vodeni MAC	6,71±0,46 ^b
S etanolni UAE	1,62±0,01 ^h
S etanolni MAE	2,17±0,16 ^{g,h}
S etanolni MAC	1,94±0,02 ^{g,h}
TS etanolni UAE	3,15±0,22 ^{f,g,h}
TS etanolni MAE	4,37±0,14 ^{d,e,f}
TS etanolni MAC	5,70±0,30 ^{b,c,d,e}
L etanolni UAE	6,11±0,15 ^{b,c,d}
L etanolni MAE	6,59±0,13 ^{b,c}
L etanolni MAC	6,68±0,78 ^b

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-h značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.3. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove (Neuroprotektivna aktivnost)

Tabela 12. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije AChE, Histogram 4.12.

Ekstrakti	AChE (mg GALAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,022±0,001 ^{ij}
S vodeni MAE	0,024±0,001 ⁱ
S vodeni MAC	0,020±0,001 ^j
TS vodeni UAE	0,044±0,002 ^{g,h}
TS vodeni MAE	0,057±0,003 ^f
TS vodeni MAC	0,000±0,000 ^k
L vodeni UAE	0,089±0,002 ^d
L vodeni MAE	0,114±0,005 ^a
L vodeni MAC	0,107±0,004 ^b
S etanolni UAE	0,022±0,001 ^{ij}
S etanolni MAE	0,024±0,002 ^{ij}
S etanolni MAC	0,021±0,001 ^j
TS etanolni UAE	0,047±0,002 ^g
TS etanolni MAE	0,055±0,003 ^f
TS etanolni MAC	0,042±0,003 ^h
L etanolni UAE	0,069±0,004 ^e
L etanolni MAE	0,095±0,005 ^c
L etanolni MAC	0,095±0,005 ^c

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-j značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 13. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije BChE, Histogram 4.13.

Ekstrakti	BChE (mg GALAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,006±0,002 ^{e,f}
S vodeni MAE	0,003±0,001 ^f
S vodeni MAC	0,004±0,001 ^{e,f}
TS vodeni UAE	0,014±0,003 ^{d,e}
TS vodeni MAE	0,016±0,003 ^{d,e}
TS vodeni MAC	0,000±0,000 ^f
L vodeni UAE	0,031±0,002 ^c
L vodeni MAE	0,004±0,001 ^{e,f}
L vodeni MAC	0,007±0,002 ^{d,e,f}
S etanolni UAE	0,018±0,001 ^d
S etanolni MAE	0,018±0,001 ^d
S etanolni MAC	0,005±0,001 ^{e,f}
TS etanolni UAE	0,033±0,002 ^c
TS etanolni MAE	0,041±0,002 ^c
TS etanolni MAC	0,007±0,001 ^{d,e,f}
L etanolni UAE	0,064±0,003 ^b
L etanolni MAE	0,061±0,001 ^b
L etanolni MAC	0,076±0,002 ^a

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-f značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.4. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove (Antitirozinazna aktivnost)

Tabela 14. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije tirozinaze, Histogram 4.14.

Ekstrakti	Tirozinaza (mg KAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,39±0,01 ^j
S vodeni MAE	0,52±0,01 ⁱ
S vodeni MAC	0,32±0,02 ^k
TS vodeni UAE	0,92±0,02 ^h
TS vodeni MAE	1,12±0,03 ^{f,g}
TS vodeni MAC	1,39±0,04 ^e
L vodeni UAE	0,10±0,01 ^m
L vodeni MAE	0,22±0,01 ^l
L vodeni MAC	0,06±0,01 ^m
S etanolni UAE	1,07±0,01 ^g
S etanolni MAE	1,17±0,01 ^f
S etanolni MAC	0,41±0,01 ^j
TS etanolni UAE	2,35±0,03 ^b
TS etanolni MAE	2,75±0,02 ^a
TS etanolni MAC	1,15±0,01 ^f
L etanolni UAE	1,55±0,08 ^d
L etanolni MAE	1,85±0,01 ^c
L etanolni MAC	1,61±0,03 ^d

*miligram ekvivalenata kojične kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-m značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.5. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata plodova zove (Antidiijabetogena aktivnost)

Tabela 15. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije α -amilaze, Histogram 4.15.

Ekstrakti	α -amilaza (mg ACAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,18±0,03 ^h
S vodeni MAE	0,24±0,03 ^{g,h}
S vodeni MAC	0,16±0,03 ^h
TS vodeni UAE	0,51±0,07 ^{g,h}
TS vodeni MAE	0,57±0,08 ^{g,h}
TS vodeni MAC	0,77±0,07 ^{f,g,h}
L vodeni UAE	1,41±0,11 ^{d,e,f}
L vodeni MAE	4,04±0,20 ^c
L vodeni MAC	2,18±0,17 ^d
S etanolni UAE	0,86±0,06 ^{f,g,h}
S etanolni MAE	1,02±0,03 ^{e,f,g}
S etanolni MAC	0,21±0,03 ^h
TS etanolni UAE	1,69±0,12 ^{d,e}
TS etanolni MAE	2,10±0,07 ^d
TS etanolni MAC	0,71±0,07 ^{g,h}
L etanolni UAE	8,34±0,13 ^a
L etanolni MAE	7,12±0,16 ^b
L etanolni MAC	7,14±0,16 ^b

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-h značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 16. Sposobnost ekstrakata plodova zove u procesu inhibicije α -glukozidaze, Histogram 4.16.

Ekstrakti	α-glukozidaza (mg ACAE/ml E)*
S vodeni UAE	0,18±0,03 ^{f,g}
S vodeni MAE	0,38±0,03 ^{e,f,g}
S vodeni MAC	0,10±0,03 ^g
TS vodeni UAE	0,81±0,07 ^{d,e,f,g}
TS vodeni MAE	1,30±0,08 ^d
TS vodeni MAC	1,26±0,21 ^{d,e}
L vodeni UAE	1,31±0,99 ^d
L vodeni MAE	2,22±0,20 ^c
L vodeni MAC	1,68±0,17 ^{c,d}
S etanolni UAE	0,23±0,03 ^{f,g}
S etanolni MAE	0,19±0,03 ^{f,g}
S etanolni MAC	0,21±0,05 ^{f,g}
TS etanolni UAE	1,00±0,12 ^{d,e,f}
TS etanolni MAE	1,01±0,14 ^{d,e,f}
TS etanolni MAC	1,42±0,07 ^{c,d}
L etanolni UAE	7,28±0,40 ^a
L etanolni MAE	5,82±0,16 ^b
L etanolni MAC	4,97±0,31 ^b

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-g značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.6. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima cveta zove

Tabela 17. Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima cveta zove, Histogram 4.17.

Ekstrakti	Ukupni fenoli (mg GAE/ml E)*
Vodeni UAE	2,50±0,12 ^c
Vodeni MAE	3,40±0,12 ^b
Vodeni MAC	2,00±0,09 ^d
Etanolni UAE	3,55±0,78 ^b
Etanolni MAE	4,95±0,85 ^a
Etanolni MAC	3,29±0,69 ^b

*miligram ekvivalenata galne kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 18. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima cveta zove, Histogram 4.18.

Ekstrakti	Ukupni flavonoidi (mg RU/ml E)*
Vodeni UAE	0,53±0,02 ^d
Vodeni MAE	1,05±0,04 ^b
Vodeni MAC	0,50±0,02 ^e
Etanolni UAE	1,11±0,03 ^b
Etanolni MAE	1,31±0,03 ^a
Etanolni MAC	0,97±0,02 ^c

*miligram ekvivalenata rutina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.7. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove (Antioksidativna aktivnost)

Tabela 19. Sposobnost ekstrakata cveta zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala, Histogram 4.19.

Ekstrakti	DPPH (mg TE/ml E)*
Vodeni UAE	0,63±0,01 ^d
Vodeni MAE	0,90±0,05 ^c
Vodeni MAC	0,95±0,02 ^c
Etanolni UAE	1,31±0,08 ^b
Etanolni MAE	1,59±0,08 ^a
Etanolni MAC	1,29±0,09 ^b

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 20. Sposobnost ekstrakata cveta zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala, Histogram 4.20.

Ekstrakti	ABTS (mg TE/ml E)*
Vodeni UAE	1,56±0,27 ^c
Vodeni MAE	2,20±0,22 ^b
Vodeni MAC	1,78±0,18 ^d
Etanolni UAE	2,04±0,31 ^c
Etanolni MAE	2,52±0,25 ^a
Etanolni MAC	1,93±0,19 ^c

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-e značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 21. Sposobnost ekstrakata cveta zove u redukciji Fe³⁺ jona, Histogram 4.21.

Ekstrakti	FRAP (mg TE/ml E)*
Vodeni UAE	1,22±0,16 ^e
Vodeni MAE	2,05±0,10 ^c
Vodeni MAC	1,92±0,05 ^d
Etanolni UAE	2,36±0,08 ^b
Etanolni MAE	3,09±0,09 ^a
Etanolni MAC	2,14±0,05 ^c

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-e značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 22. Sposobnost ekstrakata cveta zove u redukciji Cu²⁺ jona, Histogram 4.22.

Ekstrakti	CUPRAC (mg TE/ml E)*
Vodeni UAE	1,87±0,26 ^e
Vodeni MAE	2,70±0,23 ^c
Vodeni MAC	2,46±0,36 ^d
Etanolni UAE	3,50±0,36 ^b
Etanolni MAE	4,55±0,34 ^a
Etanolni MAC	3,33±0,26 ^b

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-e značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 23. Sposobnost ekstrakata cveta zove u heliranju jona metala, Histogram 4.23.

Ekstrakti	Heliranje jona metala (mg EDTA/ml E)*
Vodeni UAE	0,29±0,02 ^c
Vodeni MAE	0,55±0,06 ^b
Vodeni MAC	0,009±0,001 ^d
Etanolni UAE	0,60±0,01 ^a
Etanolni MAE	0,62±0,05 ^a
Etanolni MAC	0,53±0,03 ^b

*miligram ekvivalenata etilendiaminotetrasirćetne kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 24. Ukupna antioksidativna aktivnost ekstrakata cveta zove, Histogram 4.24.

Ekstrakti	Ukupna antioksidativna aktivnost (mg TE/ml E)*
Vodeni UAE	0,00265±0,0001 ^e
Vodeni MAE	0,00433±0,0002 ^b
Vodeni MAC	0,00321±0,0002 ^d
Etanolni UAE	0,00395±0,0002 ^c
Etanolni MAE	0,00498±0,0003 ^a
Etanolni MAC	0,00446±0,0003 ^b

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-e značano se razlikuju p≤0,05.

PRILOG 7.8. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove (Neuroprotektivna aktivnost)

Tabela 25. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije AChE, Histogram 4.25.

Ekstrakti	AChE (mg GALAE/ml E)*
Vodeni UAE	0,018±0,001 ^c
Vodeni MAE	0,015±0,001 ^d
Vodeni MAC	0,040±0,002 ^a
Etanolni UAE	0,033±0,002 ^b
Etanolni MAE	0,040±0,002 ^a
Etanolni MAC	0,038±0,002 ^a

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 26. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije BChE, Histogram 4.26.

Ekstrakti	BChE (mg GALAE/ml E)*
Vodeni UAE	0,0130±0,0002 ^a
Vodeni MAE	0,0052±0,0015 ^c
Vodeni MAC	0,0110±0,0010 ^b
Etanolni UAE	0,0050±0,0003 ^c
Etanolni MAE	0,0047±0,0002 ^d
Etanolni MAC	0,0050±0,0003 ^c

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.9. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove (Antitirozinazna aktivnost)

Tabela 27. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije tirozinaze, Histogram 4.27.

Ekstrakti	Tirozinaza (mg KAE/ml E)*
Vodeni UAE	0,80±0,08 ^e
Vodeni MAE	0,98±0,10 ^d
Vodeni MAC	1,07±0,11 ^c
Etanolni UAE	2,52±0,25 ^b
Etanolni MAE	3,03±0,30 ^a
Etanolni MAC	2,63±0,26 ^b

*miligram ekvivalenata kojične kiseline po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-e značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.10. Biološke i funkcionalne karakteristike ekstrakata cveta zove (Antidijabetogena aktivnost)

Tabela 28. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije α -amilaze Histogram 4.28.

Ekstrakti	α -amilaza (mg ACAE/ml E)*
Vodeni UAE	0,00110±0,00001 ^e
Vodeni MAE	0,00245±0,00001 ^c
Vodeni MAC	0,00041±0,00002 ^f
Etanolni UAE	0,00357±0,00002 ^b
Etanolni MAE	0,00490±0,00003 ^a
Etanolni MAC	0,00225±0,00001 ^d

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-f značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 29. Sposobnost ekstrakata cveta zove u procesu inhibicije α -glukozidaze Histogram 4.29.

Ekstrakti	α-glukozidaza (mg ACAE/ml E)*
Vodeni UAE	0,0069 \pm 0,0002 ^c
Vodeni MAE	0,0180 \pm 0,0001 ^b
Vodeni MAC	0,0020 \pm 0,0001 ^d
Etanolni UAE	0,0190 \pm 0,0001 ^b
Etanolni MAE	0,0238 \pm 0,0002 ^a
Etanolni MAC	0,0067 \pm 0,0001 ^c

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru ekstrakta.

\pm 3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.11. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu od plodova zove

Tabela 30. Sadržaj ukupnih fenola u vinima od plodova zove, Histogram 4.30.

Vina	Ukupni fenoli (mg GAE/ml vina)*
BTT	4,60±0,05 ^b
60 °C, 5 min.	5,07±0,07 ^a
60 °C, 10 min.	4,46±0,12 ^c
70 °C, 5 min.	5,12±0,05 ^a

*miligram ekvivalenata galne kiseline po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-c značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 31. Sadržaj ukupnih flavonoida u vinima od plodova zove, Histogram 4.31.

Vina	Ukupni flavonoidi (mg RU/ml vina)*
BTT	0,14±0,05 ^d
60 °C, 5 min.	0,31±0,03 ^b
60 °C, 10 min.	0,24±0,02 ^c
70 °C, 5 min.	0,42±0,02 ^a

*miligram ekvivalenata rutina po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 32. Sadržaj ukupnih monomernih antocijana u vinima od plodova zove, Histogram 4.32.

Vina	Ukupni monomerni antocijani (mg CGE/ml vina)*
BTT	0,48±0,01 ^d
60 °C, 5 min.	0,67±0,02 ^b
60 °C, 10 min.	0,63±0,05 ^c
70 °C, 5 min.	0,76±0,05 ^a

*miligram ekvivalenata cijanidin-3-O-glukozida po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 33. Sadržaj ukupnih tanina u vinima od plodova zove, Histogram 4.33.

Vina	Ukupni tanini (mg CE/ml vina)*
BTT	3,48±0,30 ^a
60 °C, 5 min.	3,59±0,24 ^a
60 °C, 10 min.	3,18±0,22 ^a
70 °C, 5 min.	3,84±0,24 ^a

*miligram ekvivalenata katehina po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovom a statistički se značano ne razlikuju.

PRILOG 7.12. Biološke i funkcionalne karakteristike vina od plodova zove (Antioksidativna aktivnost)

Tabela 34. Sposobnost vina od plodova zove u neutralizaciji slobodnog DPPH• radikala, Histogram 4.34.

Vina	DPPH (mg TE/ml vina)*
BTT	5,97±0,36 ^b
60 °C, 5 min.	6,44±0,38 ^a
60 °C, 10 min.	5,69±0,11 ^b
70 °C, 5 min.	6,81±0,12 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-b značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 35. Sposobnost vina od plodova zove u neutralizaciji slobodnog ABTS^{•+} radikala, Histogram 4.35.

Vina	ABTS (mg TE/ml vina)*
BTT	12,87±0,23 ^c
60 °C, 5 min.	14,33±0,22 ^b
60 °C, 10 min.	12,65±0,06 ^c
70 °C, 5 min.	14,80±0,16 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-c značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 36. Sposobnost vina od plodova zove u procesu redukcije Fe³⁺ jona, Histogram 4.36.

Vina	FRAP (mg TE/ml vina)*
BTT	14,74±0,23 ^c
60 °C, 5 min.	16,55±0,48 ^a
60 °C, 10 min.	15,92±0,57 ^b
70 °C, 5 min.	16,83±0,22 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-c značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 37. Sposobnost vina od plodova zove u procesu redukcije Cu²⁺ jona, Histogram 4.37.

Vina	CUPRAC (mg TE/ml vina)*
BTT	17,34±1,12 ^b
60 °C, 5 min.	19,74±0,48 ^{a,b}
60 °C, 10 min.	17,78±0,30 ^b
70 °C, 5 min.	21,26±0,67 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-b značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 38. Sposobnost vina od plodova zove u procesu neutralizacije •NO radikala, Histogram 4.38.

Vina	NO (mg TE/ml vina)*
BTT	84,09±5,43 ^b
60 °C, 5 min.	105,42±6,65 ^a
60 °C, 10 min.	82,05±3,31 ^b
70 °C, 5 min.	87,20±6,81 ^b

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-b značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 39. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije lipidne peroksidacije, Histogram 4.39.

Vina	Lipidna peroksidacija (mg TE/ml vina)*
BTT	0,18±0,01 ^c
60 °C, 5 min.	0,14±0,01 ^d
60 °C, 10 min.	0,21±0,01 ^b
70 °C, 5 min.	0,26±0,01 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 40. Sposobnost vina od plodova zove u procesu heliranja jona metala, Histogram 4.40.

Vina	Heliranje jona metala (mg EDTA/ml vina)*
BTT	1,49±0,09 ^c
60 °C, 5 min.	4,06±0,05 ^a
60 °C, 10 min.	3,52±0,11 ^b
70 °C, 5 min.	1,12±0,18 ^d

*miligram ekvivalenata etilendiaminotetrasirćetne kiseline po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 41. Ukupna antioksidativna aktivnost vina od plodova zove, Histogram 4.41.

Vina	Ukupna antioksidativna aktivnost (mg TE/ml vina)*
BTT	22,46±1,56 ^b
60 °C, 5 min.	24,06±0,54 ^a
60 °C, 10 min.	22,16±0,85 ^b
70 °C, 5 min.	25,00±1,19 ^a

*miligram ekvivalenata troloksa po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-b značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

PRILOG 7.13. Biološke i funkcionalne karakteristike vina od plodova zove (Neuroprotektivna aktivnost)

Tabela 42. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije AChE, Histogram 4.42.

Vina	AChE (mg GALAE/ml vina)*
BTT	0,29±0,01 ^c
60 °C, 5 min.	0,38±0,02 ^a
60 °C, 10 min.	0,34±0,02 ^b
70 °C, 5 min.	0,28±0,01 ^d

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju p≤0,05.

Tabela 43. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije BChE, Histogram 4.43.

Vina	BChE (mg GALAE/ml vina)*
BTT	0,17±0,01 ^a
60 °C, 5 min.	0,18±0,01 ^a
60 °C, 10 min.	0,18±0,03 ^a
70 °C, 5 min.	0,13±0,02 ^b

*miligram ekvivalenata galantamina po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-b značano se razlikuju p≤0,05.

PRILOG 7.14. Biološke i funkcionalne karakteristike vina od plodova zove (Antitirozinazna aktivnost)

Tabela 44. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije tirozinaze, Histogram 4.44.

Vina	Tirozinaza (mg KAE/ml vina)*
BTT	3,67±0,09 ^d
60 °C, 5 min.	4,35±0,05 ^b
60 °C, 10 min.	4,11±0,15 ^c
70 °C, 5 min.	5,09±0,11 ^a

*miligram ekvivalenata kojične kiseline po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju p≤0,05.

PRILOG 7.15. Biološke i funkcionalne karakteristike vina od plodova zove (Antidijabetogena aktivnost)

Tabela 45. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije α -amilaze, Histogram 4.45.

Vina	α -amilaza (mg ACAE/ml vina)*
BTT	4,01±0,45 ^c
60 °C, 5 min.	4,20±0,47 ^b
60 °C, 10 min.	3,93±0,44 ^d
70 °C, 5 min.	6,14±0,44 ^a

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

Tabela 46. Sposobnost vina od plodova zove u procesu inhibicije α -glukozidaze, Histogram 4.46.

Vina	α -glukozidaza (mg ACAE/ml vina)*
BTT	4,90±0,45 ^c
60 °C, 5 min.	7,00±0,47 ^a
60 °C, 10 min.	4,80±0,87 ^c
70 °C, 5 min.	6,14±0,44 ^b

*miligram ekvivalenata akarboze po mililitru vina.

±3SD. Srednje vrednosti u koloni označene slovima a-d značano se razlikuju $p \leq 0,05$.

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

План третмана података

Назив пројекта/истраживања
Хемијски састав, биолошке и функционалне карактеристике нових производа од зове
Назив институције/институција у оквиру којих се спроводи истраживање
а) Технолошки факултет Нови Сад, Нови Сад, Србија б) Природно-математички факултет, Нови Сад, Србија в) Природно-математички факултет, Конија, Турска
Назив програма у оквиру ког се реализује истраживање
Пројекат финансиран од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије
Назив пројекта: „Фармаколошки активне супстанце и производи на бази лековитог/ароматичног биља за примену у фармацији”
Евиденциони број пројекта: ТР31013 Трајање пројекта: 2011-2020.
1. Опис података
<p>1.1 Врста студије</p> <p><i>Укратко описати тип студије у оквиру које се подаци прикупљају</i> <u>Докторска дисертација</u></p> <p>1.2 Врсте података</p> <p><input type="checkbox"/> а) квантитативни <input type="checkbox"/> б) квалитативни</p> <p>1.3. Начин прикупљања података</p> <p>а) анкете, упитници, тестови б) клиничке процене, медицински записи, електронски здравствени записи в) генотипови: навести врсту _____ г) административни подаци: навести врсту _____ д) узорци ткива: <u>цвет и плод зове рода Sambucus (Sambucus nigra L.)</u> ђ) снимци, фотографије: навести врсту _____ е) текст: <u>литература</u> ж) мапа, навести врсту _____ з) остало: <u>експериментални подаци</u></p> <p>1.3 Формат података, употребљене скале, количина података</p> <p>1.3.1 Употребљени софтвер и формат датотеке:</p> <p><input type="checkbox"/> а) Excel фајл, датотека <u>.xlsx, csv.</u> <input type="checkbox"/> б) SPSS фајл, датотека _____ <input type="checkbox"/> с) PDF фајл, датотека <u>.pdf</u></p>

- d) Текст фајл, датотека .docx
 e) JPG фајл, датотека .jpg, .tif
f) Остало, датотека _____

1.3.2. Број записа (код квантитативних података)

- a) број варијабли 32
б) број мерења (испитаника, процена, снимака и сл.) велики број

1.3.3. Поновљена мерења

- а) да
 б) не

Уколико је одговор да, одговорити на следећа питања:

- a) временски размак између поновљених мера је 1 сат
б) варијабле које се више пута мере односе се на анализирање биолошких и функционалних карактеристика добијених производа
в) нове верзије фајлова који садрже поновљена мерења су именоване као _____

Напомене: _____

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

- а) Да
 б) Не

Ако је одговор не, образложити _____

2. Прикупљање података

2.1 Методологија за прикупљање/генерисање података

2.1.1. У оквиру ког истраживачког нацрта су подаци прикупљени?

- а) експеримент: анализа хемијских и биолошких карактеристика биљног материјала и добијених производа
 б) корелационо истраживање: регресиона анализа и анализа главних компоненти (PCA- Principal component analysis) резултата добијених експерименталним радом
ц) анализа текста: анализа и прикупљање података из доступне научне литературе
д) остало: _____

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

Спектрофотометар, течни хроматограф високих перформанси са масеним спектрометром, течни хроматограф високих перформанси са UV-VIS детектором, гасни хроматограф са масеним спектрометром, стандардне методе прописане ИСО стандардима и стандардне методе прописане од стране Југословенске Фармакопеје (Ph. Jug. IV)

2.2 Квалитет података и стандарди

2.2.1. Третман недостајућих података

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

Ако је одговор да, одговорити на следећа питања:

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

2.2.2. На који начин је контролисан квалитет података? Описати

Квалитет података је контролисан статистичком обрадом добијених резултата и одбацивањем екстремних вредности.

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

Контрола уноса података у матрицу је изведена на основу поређења добијених резултата истраживања са подацима из научне литературе

3. Третман података и пратећа документација

3.1. Третман и чување података

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

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

3.1.3. DOI _____

3.1.4. Да ли ће подаци бити у отвореном приступу?

а) Да

б) Да, али после ембарга који ће трајати до _____

в) Не

Ако је одговор не, навести разлог _____

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

Образложење

3.2 Метаподаци и документација података

3.2.1. Који стандард за метаподатке ће бити примењен? _____

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

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

3.3 Стратегија и стандарди за чување података

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

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

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

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

Да Не

Образложити

4. Безбедност података и заштита поверљивих информација

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

4.1 Формални стандарди за сигурност информација/података

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

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

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

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

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

а) Подаци нису у отвореном приступу

б) Подаци су анонимизирани

ц) Остало, навести шта

5. Доступност података

5.1. Подаци ће бити

а) јавно доступни

б) доступни само уском кругу истраживача у одређеној научној области

ц) затворени

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

Ако су подаци доступни само уском кругу истраживача, навести на који начин могу приступити подацима:

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

Ауторство - некомерцијално - без прераде

6. Улоге и одговорност

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

Милена Вујановић, milnavujanovic@uns.ac.rs, milena.vujanovic90@gmail.com

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

Милена Вујановић, milnavujanovic@uns.ac.rs, milena.vujanovic90@gmail.com

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

Милена Вујановић, milnavujanovic@uns.ac.rs, milena.vujanovic90@gmail.com