



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΓΙΕΙΝΗΣ & ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Χ. ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ

Διδακτορική Διατριβή

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ GOJI-BERRY
(*L. BARBARUM* & *L. CHINENSE*) ΘΕΣΣΑΛΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

υπό

ΠΡΟΔΡΟΜΟΥ ΣΚΕΝΔΕΡΙΔΗ

Απόφοιτο της σχολής Τεχνολογίας Τροφίμων

Υπεβλήθη για την εκπλήρωση μέρους των

απαιτήσεων για την απόκτηση του

Διδακτορικού Διπλώματος

Λάρισα, 2018

© 2018 Πρόδρομος Σκενδερίδης

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (σύμφωνα με τις διατάξεις του άρθρου 202, παράγραφος 2 του Ν.5343/1932).

Εγκρίθηκε από τα Μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής (2^ο/29-10-2018 ΓΣΕΣ):

- 1^{ος} Εξεταστής**
(Επιβλέπων) **ΑΝΔΡΕΑΣ ΤΣΑΚΑΛΩΦ**
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 2^{ος} Εξεταστής** **ΧΡΗΣΤΟΣ ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ**
Καθηγητής Υγιεινής και Επιδημιολογίας, Τμήμα Ιατρικής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Πρόεδρος του Τμήματος Ιατρικής.
- 3^{ος} Εξεταστής** **ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΠΕΤΡΩΤΟΣ**
Αναπληρωτής Καθηγητής Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Μηχανικής
Βιοσυστημάτων, ΑΤΕΙ/Θεσσαλίας.
- 4^{ος} Εξεταστής** **ΕΥΤΥΧΙΑ ΑΣΠΡΟΔΙΝΗ**
Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Φαρμακολογίας,
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 5^{ος} Εξεταστής** **ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΛΙΑΚΟΣ**
Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- 6^{ος} Εξεταστής** **ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΡΑΧΙΩΤΗΣ**
Επίκουρος Καθηγητής Επιδημιολογίας & Επαγγελματικής υγιεινής
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- 7^{ος} Εξεταστής** **ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΑΓΚΟΣ**
Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών και
Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

“All models are wrong but some are useful”
Box, G. E. P. (1979)



*Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται στη σύζυγό μου Αθανασία,
στα παιδιά μου Ειρήνη και Ευαγγελία και σε όλους όσους με στήριξαν στην πορεία μου για
την ολοκλήρωση της.*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η επίτευξη αυτού του στόχου, μετά από μία δύσκολη και ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα ερευνητική πορεία, είναι το αποτέλεσμα μιας καλής και εποικοδομητικής συνεργασίας αρκετών ανθρώπων. Ολοκληρώνοντας τη συγγραφή αυτής της διατριβής θα πρέπει να ευχαριστήσω θερμά όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της.

Η επίβλεψη έγινε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Χημείας, κ. Ανδρέα Τσακάλωφ, τον οποίο και ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη και τη στήριξη που μου έδειξε σε όλη αυτήν την πορεία, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, την εποικοδομητική κριτική του, το αδιάλειπτο ενδιαφέρον του και τη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής εργασίας μου. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή μηχανικής τροφίμων κ. Κ. Πετρωτό για την υπομονή του, τις υποδείξεις του και την αδερφική του στήριξη όλα αυτά τα χρόνια και την συνεισφορά του στις επιστημονικές γνώσεις που αποκόμισα. Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Υγιεινής και Επιδημιολογίας κ. Χατζηχριστοδούλου Χρήστο ο οποίος μαζί με τον κ. Πετρωτό με εμπιστευθήκαν αρχικά και μου έδωσαν την ευκαιρία για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή Καθηγητή μικροβιολογίας τροφίμων Γιαβάση Ιωάννη και τον επίκουρο καθηγητή Δημήτρη Στάγκο για τις υποδείξεις τους, την αμέριστη συμπαράσταση και την άποψη συνεργασία.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, που την αποτελούσαν η Αν. Καθηγήτρια κα. Ε. Ασπροδίνη, ο Αν. Καθηγητής Π. Λιάκος, ο Επ. Καθηγητής κ. Γ. Ραχιώτης, ο Επ. Καθηγητής Δ. Στάγκος, ο Καθηγητής κ. Χ. Χατζηχριστοδούλου, ο Αν. Καθηγητής κ. Κ. Πετρωτός και ο Αν. Καθηγητής κ. Α. Τσακάλωφ, οι οποίοι δέχτηκαν να κρίνουν την παρούσα διδακτορική διατριβή.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Μηχανικής Τροφίμων – Βιοσυστημάτων, τα μέλη του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών της σχολής Βιοχημείας του πανεπιστημίου Θεσσαλίας, καθώς τα μέλη του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων του ΤΕΙ – Θεσσαλίας, για την άποψη και εποικοδομητική συνεργασία που είχαμε.

Πρόδρομος Σκενδερίδης

CURRICULUM VITAE

Skenderidis Prodromos

Personal Details	
	<ul style="list-style-type: none"> • Date of birth: 31 /01 /1969 • Tel: +30 2410 661687, +30 6973313565 • Marital status: Married • e-mail: mskenderidis@gmail.com • Postal address: Ammohostou 16, T.K. 41335, Larissa, Greece
Education	
9/2013-Nowadays	Doctor of Philosophy (Ph.D) candidate , Medicine school of Thessaly University “Phytochemicals and beneficial to human health association in goji berry fruits from Thessaly region.”
1/2/2003-1/7/2005	Master of Science (MSc.) in Management and Food Technology. The Open University, U.K.
9/2001- 9/2002	Master of Science (MSc.) in Management of industrial production. Technological Educational Institute of Piraeus, Greece.
2/1987-2/1995	BSc. In Food Technology. Technological Educational Institute of Athens, Greece.
22/10/15-11/06/16	Diploma. Pedagogical and Teaching Competence ASPETE of Volos.
2-6/6/1997	Attendance of the seminar titled: “ Lead auditor in ISO 9000:1994 & ISO 10011-1:1990 systems ”. cert. no. Q970119
13/10/1997	Attendance of the seminar titled: “ Study and development of HACCP system ”.
2006-Nowadays	Attendance of seminars on Quality mangment, Food allergens and genetically modified organisms, Food safety according to ISO 22000:2005, Organic farming, In ISO 14001:2004, In food labeling according to EC 1169/2011 e.t.c.
Work Experience	
01/2010-12/2011	- Self employed «Word Certification Cervices LTD» (Liverpool U.K.) Certification manager for Asia area
01/2010- Nowadays	- Self employed Lead auditor in ISO 9001:2018, ISO 22000:2005, FSSC 22000, Organic food processing companies for independent certification bodies.
11/2000-Nowdays	«Papaioannou Bros S.A.», Quality-production manager.

10/1996-11/2000	«Corpus S.A.», Quality-production manager.
8/1995-11/1995	«Greek sugar industry S.A.», Management of production lab in charge for the quality control of the produced sugar. Employee as Food technologist.
8/1991-1/1993	«Triantaphylou & Co», Planning designer and control of production procedure of meat products. Employee as Food technologist.
1997-Nowadays	– Self-employed «Quality, Food safety and organic food process systems auditor. » Certification manager of a certification Body
Teaching Experience	
2016-2017	<u>Teaching Experience in Higher Education.</u> Scientific Associate and Teaching Fellow at Technological Educational Institute of Larissa (T.E.I). Teaching modules such as: a) fruit and vegetable processing, and b) Food Additives and sweeteners.
2016-2017	<u>Teaching Experience in food technology</u> <u>Teaching Experience in Open mellon (privety Professional Training Institute).</u> Food safety and new technologies in food production. Initial design of the food technology department and selection of educators
7/2015- Nowadays	Teaching Experience in Food safety systems audit. Trainer of the auditors of Q-Check and WCS certification bodies.
06/2011-Nowadays	<u>Certified EFET trainer for Food involved employees.</u> Lecturer. Module: Food Safety regulations. Teaching hrs: 50.
Academic Books and Notes	
	Author in 2 Laboratory notes. i) Fruit and vegetable processing. ii) Food Additives and sweeteners.
Scientific Publications	
	https://www.researchgate.net/profile/Prodromos_Skenderidis <ul style="list-style-type: none"> ▪ Seven (7) publications in International Peer Reviewed Journals. ➤ Skenderidis, P., Petrotos, K., Giavasis, I., Hadjichristodoulou, C., & Tsakalof, A. (2017). Optimization of ultrasound assisted

extraction of of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity. *Journal of Food Process Engineering*, 40(5).

- **Skenderidis, P.**, Mitsagga, C., Giavasis, I., Hadjichristodoulou, C., Leontopoulos, S., Petrotos, K., & Tsakalof, A. (2017), Assessment of Antimicrobial Properties of Aqueous UAE Extracts of Goji Berry Fruit and Pomegranate Fruit Peels in vitro. In *International Conference on Food and Biosystems Engineering* (Vol. 1, p. 04).
- Leontopoulos, S., **Skenderidis, P.**, Anatolioti, V., Kokkora, M., Tsilfoglou, S., Petrotos, K., & Vagelas, I. (2017). Antifungal Activity of *Azadirachta indica* Aqueous and Non-Aqueous Extracts on *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botryodiplodia theobromae* and *Fusarium solani*. A First Approach. *International Journal of Food and Biosystems Engineering*, 38.
- Leontopoulos, S. V., Petrotos, K., Anatolioti, V., **Skenderidis, P.**, Tsilfoglou, S., & Vagelas, I. (2017). Chemotactic Responses of *Pseudomonas oryzae* and Second Stage Juveniles of *Meloidogyne javanica* on Tomato Root Tip Exudates. *International Journal of Food and Biosystems Engineering*, 5(1), 75-100.
- Leontopoulos, S., Petrotos, K., Anatolioti, V., **Skenderidis, P.**, Tsilfoglou, S., Papaioannou, & C., Vagelas, I. (2017). Preliminary studies on mobility and root colonization ability of *Pseudomonas oryzae*. *International Journal of Food and Biosystems Engineering*, 3(1), 73-89.
- Leontopoulos, S., Petrotos, K., Anatolioti, V., **Skenderidis, P.**, Tsilfoglou, S., & Vagelas, I. (2017). Effects of Cells and Cells-Free Filtrates Supernatant Solution of *Pseudomonas oryzae* on Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne javanica*). *International Journal of Food and Biosystems Engineering*, 23.
- Leontopoulos, S., **Skenderidis, P.**, Kalorizou, H., & Petrotos, K. (2017). Bioactivity Potential of Polyphenolic Compounds in Human Health and their Effectiveness Against Various Food

	<p>Borne and Plant Pathogens. A Review. <i>International Journal of Food and Biosystems Engineering</i>, 23.</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Skenderidis P., Kerasioti E., Karkanta E., Stagos D., Kouretas D., Petrotos K., Hadjichristodoulou C., Tsakalof A. (2018). Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. <i>Toxicology Reports</i> 5:251-257. ▪ Four (4) Presentations at International and National Conference Proceedings ➤ Oral presentation in 2nd International Conference on Food and Biosystems Engineering (2nd FABE 28-31 May 2015, Mykonos) “Optimization of ultrasound assisted (UAE) extraction of goji berries and evaluation of extracts’ phytochemistry” ➤ Oral presentation in Petet scientific Conference on “Technology-Innovation in Food Processing” (21/March 2016, Athens, http://www.petet.org.gr/pages/?cat=zphtquucrldzyz&pageid=29) ➤ Oral presentation in 1st International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods – Current Research in Nutrition and Food Science Journal (7-9 July 2016, Kalamata) “Antioxidant Potential of extracts from Greek origin goji berries” ➤ Poster presentation in 3rd International Conference on Food and Biosystems Engineering (3rd FABE 01-04 May 2017) “Assessment of antimicrobial properties of UAE extracts of goji berry fruit and pomegranate fruit peels in vitro”
<p>Member of scientific associations</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Hellenic Association of Food Technologist' (PETET) ▪ ISEKI food association ▪ European Federation of Food Science and Technology (EFFoST)

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΣΕ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΚΑΙ
ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ
ΚΑΡΠΟΥΣ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ GOJI-BERRY (L. BARBARUM &
L. CHINENSE) ΘΕΣΣΑΛΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ ΣΚΕΝΔΕΡΙΔΗΣ

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Ιατρικής, 2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων καθηγητής:

***A. ΤΣΑΚΑΛΩΦ:** Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.*

Μέλη:

***X. ΧΑΤΖΗΧΡΙΣΤΟΔΟΥΛΟΥ:** Καθηγητής Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας*

***K. ΠΕΤΡΩΤΟΣ:** Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Μηχανικής Βιοσυστημάτων,
ΤΕΙ/Θεσσαλίας.*

Περίληψη

Η επιμήκυνση του προσδόκιμου χρόνου ζωής και η υιοθέτηση του δυτικού βιομηχανοποιημένου τρόπου ζωής από τον σύγχρονο άνθρωπο έχει οδηγήσει στη μετάβαση του πληθυσμού προς γηραιότερες ηλικίες και συνεπώς στην επικράτηση ασθενειών όπως οι διάφοροι τύποι νεοπλασιών, οι εκφυλιστικές νόσοι κ.λ.π. Στο πλαίσιο αυτό έχει αρχίσει να γίνεται συνείδηση η ανάγκη αποδοχής ενός νέου τρόπου ζωής που θα περιλαμβάνει και την αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών που προέρχονται από φυσικές πηγές και για την προφύλαξη και ενδυνάμωση της υγείας του ανθρώπου.

Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν οι καρποί του φυτού goji berry που για πάνω από 2000 χρόνια η χρήση τους βρίσκει εφαρμογή στην Παραδοσιακή Κινεζική Ιατρική (*Traditional Chinese medicine TCM*). Οι καρποί goji berries κατέχουν μία κυρίαρχη θέση στην παραγωγή λειτουργικών τροφίμων και θεωρείται ότι σχετίζονται με ευεργετικές επιδράσεις στην πρόληψη και θεραπεία των διαφόρων χρόνιων παθήσεων όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, ο διαβήτης καθώς και στην πρόληψη του καρκίνου. Εκτός από την υψηλή περιεκτικότητα των καρπών σε πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες, μια πληθώρα ωφέλιμων για την υγεία ενώσεων έχει αναγνωριστεί σε αυτά όπως αμινοξέα, απαραίτητα λιπαρά οξέα, καροτενοειδή, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία. Οι ενώσεις αυτές, είναι πιθανώς υπεύθυνες για τις ευεργετικές ιδιότητες των καρπών. Έχοντας υπ' όψιν τα παραπάνω και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι στην Ελλάδα αλλά και ειδικότερα στον Θεσσαλικό χώρο, καλλιεργείται ένας μεγάλος αριθμός δένδρων goji berry, έγινε επιτακτική η συγκριτική αξιολόγηση των εγχώριων καρπών καθώς και η αξιοποίηση των βιοδραστικών συστατικών αυτών.

Στα πλαίσια της αξιολόγησης των εγχώριων καρπών και της αναζήτησης μεθόδων παραλαβής εκχυλισμάτων με συγκεκριμένη βιοδραστικότητα, διενεργήθηκε ένας πειραματικός σχεδιασμός και σχεδιάστηκαν 27 πειράματα υδατικής εκχύλισης με υπερήχους, που διενεργήθηκαν εις διπλούν για καρπούς Θεσσαλικής παραγωγής και εισαγωγής της ποικιλίας *Lycium barbarum*. Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ως σημαντική διαφορά το αυξημένο ποσοστό των ολικών σακχάρων στα εκχυλίσματα των εγχώριων καρπών, σε σχέση με τα εισαγόμενα. Επιπρόσθετα, τα εγχώρια εκχυλίσματα μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή χημειοπροστατευτικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν σημαντική ικανότητα να εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες και να παρεμποδίζουν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA. Ακόμη, το εκχύλισμα παρουσίασε προστατευτική ικανότητα για τα κύτταρα C2C12 έναντι της οξειδωτικής βλάβης βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες και πιο συγκεκριμένα αυξάνοντας τα επίπεδα της γλουταθειόνης. Επιπλέον, τα κύτταρα στα οποία χορηγήθηκε το εκχύλισμα παρουσίασαν μειωμένο οξειδωτικό στρες που προκαλείται από βλάβη σε λιπίδια και πρωτεΐνες, όπως φαίνεται από τις μειώσεις στα TBARS και στα καρβονύλια αντίστοιχα. Τέλος, αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα *in vitro*, καθώς και η πρεβιοτική δράση των εκχυλισμάτων έναντι προβιοτικών βακτηρίων.

Συνοπτικά, στην παρούσα διατριβή επιτεύχθηκαν:

1. Η ανάπτυξη μίας διαδικασίας απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων από τους καρπούς goji berry κάτω από βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που επιλέχθηκαν με τη διαδικασία πειραματικού σχεδιασμού Box – Benhken.

2. Διαπιστώθηκε ότι η περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ιδιότητες των καρπών goji berry Θεσσαλικής προέλευσης **είναι απολύτως συγκρίσιμες** με τις εισαγόμενες κινεζικής προέλευσης.

3. Αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα των καρπών goji berry της Θεσσαλικής παραγωγής διαθέτουν ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και πρεβιοτικές ιδιότητες.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα της συγκριτικής αξιολόγησης των εκχυλισμάτων goji berries θεσσαλικής παραγωγής **αποδείχθηκε ότι οι βιοδραστικές τους ιδιότητες είναι συγκρίσιμες με τις ανάλογες ιδιότητες των καρπών goji berry εισαγωγής της ποικιλίας *Lycium barbarum*. Επιπρόσθετα το αποτέλεσμα της αξιολόγησης των αντιοξειδωτικών, αντιμεταλλαξιογόνων αντιμικροβιακών αλλά και πρεβιοτικών ιδιοτήτων των καρπών αλλά και των εκχυλισμάτων θεσσαλικής προέλευσης επιβεβαίωσε ότι αποτελούν μία ιδανική λύση για τη δημιουργία βιολειτουργικών τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας.**

Summary

The lifespan enlargement and the adoption of Western industrialized lifestyles by modern humans, have led to the transition of the population to older ages and consequently to the prevalence of diseases such as various types of neoplasia, degenerative diseases, etc. In this context, the need to accept a new lifestyle that includes the exploitation of bioactive agents from natural sources and have a positive effect on human health, has begun to be realized. Such an example is the fruit of the goji berry plant, which has been used for more than 2,000 years in traditional Chinese medicine (*TCM*).

Goji berries have a dominant position in the production of functional foods and are believed to be associated with beneficial effects for the prevention and therapy of chronic diseases such as, cardiovascular disease and diabetes and various forms of cancer. In addition to the high content of fruits in polysaccharides and polyphenols, a plethora of beneficial for health compounds has been recognized in them as amino acids, essential fatty acids, carotenoids, vitamins and trace elements. These compounds are probably responsible for the beneficial properties of the fruits. Considering the above and in combination with the fact that in Greece and especially in Thessaly, a large number of goji berries are cultivated, the evaluation of domestic fruits as well as the exploitation of these bioactive agents has become imperative.

The evaluation of domestic fruits and the search for extraction methods with specific bioactivity, an experimental design was carried out and 27 ultrasonic aqueous extraction experiments were designed, performed in duplicate for the Thessalian production and imported from China *Lycium Barbarum* variety. According to the results, a significant difference was observed from the increased percentage of total sugars in domestic fruit extracts, in relation to the import ones. In addition the domestic extracts can be an important source of chemoprotective agents. In particular, they exhibited significant ability to neutralize free radicals and inhibit free-radical induced single-stranded DNA fragments. Additionally, the extract exhibited a protective capability for C2C12 cells against oxidative damage by improving oxidative stress markers and more specifically by increasing the rate of glutathione. Further to this, the cells treated with the extract showed reduced oxidative stress caused by damage to lipids and proteins, as evidenced by reduction in TBARS and carbonyls respectively.

Finally, the antimicrobial and the prebiotic activity of the extracts were evaluated in vitro, where the results of the measurements showed high activity.

In summary, this scientific study has achieved:

1. Developing a process of isolating bioactive compounds from goji berry fruits under optimal extraction conditions selected on the basis of Box-Behnken experimental design method.

2. It was found that the bioactivity content of goji berry fruit of the Thessalian origin is quite comparable to the imported Chinese origin.

3. It has been shown that extracts of goji berry fruit of the Thessalian production have beneficial for human health antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties.

In conclusion, based on the results of the comparative assessment of goji berries fruits and extracts origin from Thessaly region proved that their bioactive properties are comparable with the goji berry fruit import of variety *Lycium barbarum*. Additionally the results of the antioxidant, antimutagenic, antimicrobial and prebiotic properties evaluation, of the fruit and the origin from Thessaly extracts confirmed that represent an ideal solution to the creation of bio-functional foods with high added value.

Δημοσιεύσεις

Από την παρούσα διδακτορική διατριβή προέκυψαν οι εξής δημοσιεύσεις που επισυνάπτονται στο παράρτημα 1.:

Skenderidis P, Petrotos K, Giavasis I, Hadjichristodoulou C, Tsakalof A (2017). Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity. *J Food Process Eng.* 40:e12522. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12522>

Skenderidis P., Kerasioti E., Karkanta E., Stagos D., Kouretas D., Petrotos K., Hadjichristodoulou C., Tsakalof A. (2018). Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation. *Toxicology Reports* 5:251-257. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.001>

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Ευχαριστίες.....	v
Περίληψη.....	x
Κεφάλαιο 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ – Επισκόπηση Ερευνητικού Πεδίου.....	1
1.1. Το φυτό Goji berry.....	03
1.1.1. Η σημαντικότητα των goji berry και οι χρήσεις του στην Παραδοσιακή Ιατρική.....	05
1.1.2. Σύγχρονη έρευνα και αξιοποίηση του goji berry.....	06
1.2. Χημική σύσταση των goji berry.....	09
1.2.1. Υδατάνθρακες.....	11
1.2.2. Πολυφαινόλες.....	21
1.2.3. Οι πολυφαινόλες των goji berries.....	28
1.2.4. Λιπαρά οξέα.....	30
1.2.5. Καροτενοειδή.....	45
1.2.6. Άλλα βιοδραστικά συστατικά.....	48
1.3. Ελεύθερες ρίζες - Οξειδωτικό Στρες.....	48
1.3.1. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O ₂	50
1.3.2. Πρόκληση βλαβών στο DNA.....	52
1.3.3. Υπεροξείδωση λιπιδίων.....	54
1.3.4. Πρόκληση βλαβών στις πρωτεΐνες.....	55
1.3.5. Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας	56
1.3.6. Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας	58
1.4. Προβιοτικά βακτήρια.....	57
1.4.1. Πρεβιοτικά και συμβιοτικά.....	61
1.4.2. Η μικροβιακή χλωρίδα εντέρου.....	62
1.4.3. Η μικροβιακή χλωρίδα εντέρου.....	63
1.5. Βιολογικές ιδιότητες των goji berry.....	64
1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ.....	72
Κεφάλαιο 2:	73
2.1. Βελτιστοποίηση της εκχύλισης του Goji berry (<i>Lycium barbarum</i>), υποβοηθούμενης από υπερήχους και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων.....	74
2.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	74

2.2.1. Διαδικασία εκχύλισης.....	74
2.2.2. Προσδιορισμός συνολικής περιεκτικότητας υδατανθράκων.....	76
2.2.3. Προσδιορισμός % περιεκτικότητας ολικών στερεών.....	76
2.2.4. Προσδιορισμός % της απόδοσης εκχύλισης.....	76
2.2.5. Προσδιορισμός ολικών πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων.....	77
2.2.6. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (μέθοδος DPPH).....	77
2.2.7. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken.....	78
2.2.8. Στατιστική ανάλυση.....	79
2.3. Αποτελέσματα.....	80
2.3.1. Αποτελέσματα σχεδιασμού Box-Behnken.....	80
2.3.2. Προκαταρκτικά πειράματα για την αξιολόγηση της κλίμακας μεταβλητών εκχύλισης.....	81
2.3.3. Προγνωστικά μοντέλα δεικτών βιοδραστικότητας και απόδοση εκχύλισης επί τοις %, με την μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης.....	84
2.3.4. Βελτιστοποίηση παραμέτρων εκχύλισης goji berry.....	88
2.4. Συζήτηση.....	90
Κεφάλαιο 3:	93
3.1. Φυσικοχημικές ιδιότητες, σύνθεση των λιπαρών οξέων και αντιοξειδωτική δράση των Goji berries (<i>Lycium barbarum</i> και <i>Lycium chinense</i>).	94
3.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	94
3.2.1. Δείγματα goji berry.....	94
3.2.2. Ολικό υδατανθρακικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων.....	94
3.2.3. Ολικό φαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων.....	94
3.2.4. Προσδιορισμός ολικής αντιοξειδωτικής δράσης.....	95
3.2.5. Φασματοσκοπία υπερύθρου.....	96
3.2.6. Σύνθεση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων.....	101
3.2.7. Ανάλυση αέριας χρωματογραφίας.....	102
3.2.8. Χημικά αντιδραστήρια.....	105
3.2.9. Στατιστική ανάλυση.....	105
3.3. Αποτελέσματα.....	105
3.3.1. Ολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και πολυφαινόλες.....	105
3.3.2. Αντιοξειδωτική δράση με βάση τις ρίζες DPPH [•] και ABTS ^{•+}	106

3.3.3. Προφίλ λιπαρών οξέων των goji berries.....	108
3.3.4. Φασματοσκοπία FT-IR.....	110
3.4. Συζήτηση.....	113
Κεφάλαιο 4:	117
4.1. Αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των Ελληνικών εκχυλισμάτων goji berries.	118
4.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	119
4.2.1. Χημικά Αντιδραστήρια.....	119
4.2.2. Διαδικασία εκχύλισης.....	119
4.2.3. Διάσπαση πλασμιδιακού DNA, που επάγεται από οξειδωτικούς και μεταλλαξιγόνους παράγοντες.....	120
4.2.4. Κυτταρική καλλιέργεια.....	123
4.2.5. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων.....	123
4.2.6. Αξιολόγηση των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία.....	124
4.2.7. Αξιολόγηση των επιπέδων TBARS με φασματοφωτομετρία.....	125
4.2.8. Αξιολόγηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων.....	126
4.2.9. Στατιστική ανάλυση.....	128
4.3. Αποτελέσματα.....	128
4.3.1. Ολικό φαινολικό και υδατανθρακικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων goji berries.....	128
4.3.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας ελευθέρων ριζών χρησιμοποιώντας τις μεθόδους DPPH [•] και ABTS ^{•+}	130
4.3.3. Προστατευτική δράση κατά των βλαβών DNA.....	130
4.3.4. Επιδράσεις εκχυλίσματος goji berry στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12.....	131
4.3.5. Αντιοξειδωτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος No5 των goji berries, σε μυϊκά κύτταρα C2C12.....	132
4.4. Συζήτηση.....	134
Κεφάλαιο 5:	140
5.1. Η εκτίμηση in vitro της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων goji berries (<i>Lycium barbarum</i>)	141
5.2. Υλικά και Μέθοδοι.....	142
5.2.1. Διαδικασία εκχύλισης.....	142
5.2.2. Ενθυλάκωση και λυοφιλοποίηση των εκχυλισμάτων goji berry..	142
5.2.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες (TPC) των εκχυλισμάτων.....	145
5.2.4. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.....	145

5.2.5. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν, για προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης.....	146
5.2.6. Μέθοδος MIC / MBC.....	146
5.2.7. Έλεγχος θολερότητας (<i>Turbidity assay</i>).....	147
5.2.8. Έλεγχος διάχυσης (<i>Well diffusion assay</i>).....	148
5.2.9. Φασματοσκοπία υπερύθρου.....	149
5.2.10. Στατιστική ανάλυση.....	149
5.3. Αποτελέσματα.....	150
5.3.1. Ολικό φαινολικό, υδατανθρακικό περιεχόμενο και IC ₅₀ των ριζών DPPH [•] και ABTS ^{•+} των ενθυλακωμένων goji berries.....	150
5.3.2. Αποτελέσματα MIC/MBC.....	150
5.3.3. Αποτελέσματα ελέγχου διάχυσης.....	151
5.3.4. Αποτελέσματα ελέγχου θολερότητας.....	153
5.3.5. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας υπερύθρου	155
5.4. Συζήτηση.....	158
Κεφάλαιο 6:	162
6.1. Η εκτίμηση in vitro της επίδρασης έναντι προβιοτικών βακτηρίων των εκχυλισμάτων goji berries (<i>Lycium barbarum</i>)	163
6.2.Υλικά και Μέθοδοι.....	163
6.2.1. Επιλογή δειγμάτων	163
6.2.2. Προβιοτικά Στελέχη	163
6.2.3. Καλλιέργεια σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα	164
6.2.4. Μέτρηση pH.....	165
6.2.5. Καταμέτρηση log cfu/mL.....	165
6.2.6. Πρεβιοτικές ουσίες.....	166
6.2.7. Παρασκευή διαλυμάτων προσομοίωσης γαστρικών & εντερικών υγρών.....	166
6.3. Αποτελέσματα πρεβιοτικής δράσης.....	168
6.4. Συζήτηση.....	175
Κεφάλαιο 7:	178
ΣΥΝΟΨΗ.....	179
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	180
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	185
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	218

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:	Φύλλα και άνθη του <i>L. Barbarum</i> (a) και <i>L. Chinense</i> (b).	5
Εικόνα 2:	<i>Lycium barbarum</i> .	5
Εικόνα 3:	<i>Lycium chinense</i> .	5
Εικόνα 4:	Οι εναντιομερής μορφές της αραβινόζης.	11
Εικόνα 5:	Δημιουργία μορφών πυρανόζης και φουρανόζης από D-γλυκόζη.	12
Εικόνα 6:	Δημιουργία μορφών α και β ανωμερών πυρανόζης από D-γλυκόζη	13
Εικόνα 7:	Δομές των σακχάρων που απαντούν συχνότερα στα goji berry.	14
Εικόνα 8:	Γενική χημική δομή φλαβονοειδούς.	22
Εικόνα 9:	Χημικές δομές Φλαβονοειδών	22-23
Εικόνα 10:	Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων.	25
Εικόνα 11:	Χημική δομή στυλβενίων	27
Εικόνα 12:	Χημική δομή λιγνανίου	28
Εικόνα 13:	Δομή και ονοματολογία λιπαρών οξέων	32
Εικόνα 14:	Σύνθεση παλμιτικού οξέως.	34
Εικόνα 15:	Μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέως.	39
Εικόνα 16:	Μονοπάτια βιοσύνθεσης εικοσανοειδών από το αραχιδονικό οξύ.	41
Εικόνα 17:	Διαγραμματική απεικόνιση των αντιδράσεων, μέσω των οποίων, το O_2^- μπορεί να προκαλέσει την οξειδωση των βασικών	50
Εικόνα 18:	Διαγραμματική απεικόνιση των αντιδράσεων, μέσω των οποίων, το O_2^- μπορεί να προκαλέσει την οξειδωση των βασικών	54
Εικόνα 19:	Μηχανισμός της Λιπιδικής Υπεροξειδωσης.	55
Εικόνα 20:	Κύριες ευεργετικές δράσεις των goji berries.	66
Εικόνα 21:	Στάδια διαδικασίας εκχύλισης.	75
Εικόνα 22:	Στάδια διαδικασίας εκχύλισης.	75
Εικόνα 23:	Στάδια διαδικασίας εκχύλισης.	75
Εικόνα 24:	Στάδια διαδικασίας εκχύλισης.	75
Εικόνα 25:	Αποχρωματισμός ρίζας DPPH'	78
Εικόνα 26:	Οξειδωση του ABTS σε Δραστική ρίζα.	95
Εικόνα 27:	Αναγωγή της ρίζας ABTS ⁺⁺	96
Εικόνα 28:	Σχηματική παράσταση ιντερφερομέτρου Michelson	96
Εικόνα 29:	Σχηματική αναπαράσταση των κυμάτων και των φάσεων τους, είσοδος, έξοδος και οι δύο βραχίονες του ιντερφερομέτρου	98
Εικόνα 30:	Ένα ιντερφερόγραμμα FTIR	99
Εικόνα 31:	Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR φασματοφωτόμετρο.	100

Εικόνα 32:	Σχηματική παράσταση της βασικής διάταξης του GS-MS.	103
Εικόνα 33:	Χρωματογράφος GC-MS, Agilent 7890A GC.	104
Εικόνα 34:	Στήλη τύπου πυριτίου μήκους 100 m.	104
Εικόνα 35:	GC-MS προφίλ των <i>L. barbarum</i> (a) and <i>L. chinense</i> (b).	110
Εικόνα 36:	FTIR του <i>L. barbarum</i> L (a) και του <i>L. chinense</i> (b).	112
Εικόνα 37:	FTIR του <i>L barbarum</i> L (c) που καλλιεργήθηκαν στην κεντρική Ελλάδα και εισαγόμενων από την Κίνα καρπών (d).	112
Εικόνα 38:	Μετατροπή ενός υπερελικωμένου δίκλωνου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (<i>supercoiled</i>) σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA	121
Εικόνα 39:	Σύστημα Alpha Imager EC (Alpha Innotech, Νότια Αφρική).	123
Εικόνα 40:	Συσκευή ανάγνωσης απορρόφησης μικροπλακιδίων Bio-Tek ELx800.	124
Εικόνα 41:	Κυτταρόμετρο ροής FACS (Fluorescence-activated cell sorting) Calibur.	125
Εικόνα 42:	Η αντίδραση της μαλονδιαλδεΐδης (MDA), με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA).	126
Εικόνα 43:	Ο σχηματισμός καρβονυλίων ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 δινιτριφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό 2,4 δινιτωιωαινυλδραζονίου.	127
Εικόνα 44:	IC ₅₀ των εκχυλισμάτων goji berries έναντι ROO ^{•-} (επαγωγή βλάβης DNA).	131
Εικόνα 45:	Προστατευτική δράση του εκχυλίσματος Νο5 κατά της επαγόμενης από ROO ^{•-} βλάβης του DNA	131
Εικόνα 46:	Βιωσιμότητα κυττάρων C2C12, μετά από επεξεργασία με το	132
Εικόνα 47:	Επίπεδα ROS, GSH, TBARS και CARB, σε κύτταρα C2C12, με την προσθήκη του εκχυλίσματος Νο5 των goji berries.	132
Εικόνα 48:	Επιδράσεις του εκχυλίσματος Νο5 των goji berries, μετά από αγωγή για 24 ώρες, σε κύτταρα C2C12 και με προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής	133
Εικόνα 49:	Αφαίρεση Νερού από το Freeze Dryer.	142
Εικόνα 50:	Freeze Dryer τύπου Zirbus GmbH Sublimator 4x5x6.	145
Εικόνα 51:	Μετρητής νεφελομετρικής θολερότητας Eutech TN 100.	148
Εικόνα 52:	Νεφελομετρική θολερότητα (δηλ. κυτταρική πυκνότητα), του μέσου ανάπτυξης παθογόνων βακτηρίων που μετρήθηκε με μονάδες (NTU).	144
Εικόνα 53	Δείγμα Νο6 της σκόνης εκχυλίσματος των goji berries, μετά από ενθυλάκωση και λυοφιλοποίηση & Ζώνες αναστολής των μικροοργανισμών <i>L.monocytogenes</i> και <i>S. aureus</i>	154

Εικόνα 54: Φάσματα απορρόφησης FT-IR όλων των δειγμάτων.	156
Εικόνα 55: Συσχέτιση ύψους κορυφής μήκους κύματος 1720-1732 cm ⁻¹ , με τοIC ₅₀ της ρίζας DPPH.	157
Εικόνα 56: Φάσματα του δείγματος Νο6, του διοξειδίου του πυριτίου και της μαλτοδεξτρίνης DE 18.	158
Εικόνα 57: Καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων	165
Εικόνα 58: Διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης τους σε τριβλία για την καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία	166

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Θρεπτικά στοιχεία 85 g. ξηρών goji berries.	10
Πίνακας 2: Καταγεγραμμένοι πολυσακχαρίτες στους καρπούς <i>L.barbarum</i> και <i>L. chinense</i>	19-21
Πίνακας 3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων.	26
Πίνακας 4: Φαινολικό προφίλ των goji berry (<i>L. barbarum</i>)	29-30
Πίνακας 5: Ονοματολογία λιπαρών οξέων.	32-33
Πίνακας 6: Κορεσμένα λιπαρά οξέα.	34
Πίνακας 7: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.	36
Πίνακας 8: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.	36
Πίνακας 9: Προφίλ λιπαρών οξέων στα goji berry (<i>L. barbarum</i>)	38
Πίνακας 10: Προφίλ κύριων καροτενοειδών στους καρπούς των goji berry (<i>L. Barbarum</i>)	47
Πίνακας 11: Βιολογικές ιδιότητες των goji berry.	67-68
Πίνακας 12: Πρόσφατες μελέτες για το goji berry.	70
Πίνακας 13: Σχεδίαση επιφανειών απόκρισης από το λογισμικό Minitab 17.	80
Πίνακας 14: Ο κεντρικός σχεδιασμός των επιφανειών απόκρισης και τα αποτελέσματα του.	85
Πίνακας 15: Οι τετραγωνικές εξισώσεις για την πρόβλεψη κάθε απόκρισης	86
Πίνακας 16: Η σημαντικότητα του μοντέλου και κάθε μεταβλητή, με βάση την ανάλυση ANOVA.	87
Πίνακας 17: Προβλεπόμενες τιμές για τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης.	88
Πίνακας 18: Βιοδραστικές ιδιότητες των καρπών <i>L. barbarum</i> και <i>L. chinense</i> που καλλιεργούνται στην κεντρική Ελλάδα και των εισαγόμενων	107
Πίνακας 19: Σύνθεση λιπαρών οξέων.	109
Πίνακας 20: Ανάλυση κορυφών φάσματος FTIR των λειτουργικών ομάδων των goji berries (<i>L. barbarum</i> <i>L.</i> και <i>L. chinense</i>)	111

Πίνακας 21: Παράμετροι εκχύλισης και βιοδραστικότητα δειγμάτων εκχύλισμα, καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση, όπως	129
Πίνακας 22: Διαλύτες εκχύλισης και ποσοστά μαλτοδεξτρίνης και διοξειδίου του πυριτίου που χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση.	144
Πίνακας 23: Αποτελέσματα της ανάλυσης MIC / MBC των δειγμάτων εκχυλίσματος goji berry, έναντι παθογόνων βακτηρίων.	151
Πίνακας 24: Ζώνες αναστολής (mm) βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών	152
Πίνακας 25: FT-IR ανάλυση κορυφών φάσματος, των λειτουργικών ομάδων του δείγματος Νο6.	155
Πίνακας 26: Αποτελέσματα μετρήσεων pH προβιοτικών καλλιιεργειών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία ενθυλακωμένων	169
Πίνακας 27: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία πιθανών	171
Πίνακας 28: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοίωση γαστρικών συνθηκών.	172
Πίνακας 29: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών σε προσομοίωση εντερικών συνθηκών.	174

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Αριθμός μελετών για το goji berry	7
Γράφημα 2: Αριθμός αναφορών για το goji berry, ανά χώρα.	8
Γράφημα 3: Χημικές ενώσεις και % ποσοστό αυτών στα goji berry εκτός των πολυσακχαριτών	10
Γράφημα 4: Επίδραση της αναλογίας νερού προς την πρώτη ύλη στην απόδοση.	82
Γράφημα 5: Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην απόδοση.	83
Γράφημα 6: Επίδραση της ισχύος των υπέρηχων στην απόδοση.	83
Γράφημα 7: Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση.	85
Γράφημα 8: T-test και U-test στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	89
Γράφημα 9: Η διεγερτική επίδραση μείωσης του pH στα ελεγχόμενα προβιοτικά βακτήρια.	170
Γράφημα 10: Η προστατευτική επίδραση σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών στα ελεγχόμενα προβιοτικά βακτήρια..	173
Γράφημα 11: Η προστατευτική επίδραση σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών στα ελεγχόμενα προβιοτικά βακτήρια..	174

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ABTS	2,2'-Azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline- sulphonic acid	2,2'-αζινο-δισ-3-αιθυλβενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ)
ALA	(Alpha-linolenic acid)	α-λινολενικό οξύ

ATR	(Attenuated total reflectance)	Τεχνική δειγματοληψίας που χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με υπέρυθρη φασματοσκοπία.
ATP	(Adenosine triphosphate)	Τριφωσφορική αδενοσίνη
CAT	(Catalase)	Καταλάση
DHA	(Docosaehaenoic acid)	Δοκοσαεξανοϊκό οξύ
DNPH	(Dinitrophenylhydrazine)	Δίνιτροφαινυλδραζίνη
DPPH	(Diphenyl-picrylhydrazyl)	Διφαινυλ-πικρυλδραζύλιο
EPA	(Eicosapentaenoic acid)	Εικοσαπεντανοϊκό οξύ
FAME	(Fatty acid methyl ester)	Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων
GPx	(Glutathione peroxidase)	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
GSH	(Glutathione)	Γλουταθειόνη
GSSG	(Glutathione disulfide)	Δισουλφιδική γλουταθειόνη
H ₂ O ₂	(Hydrogen peroxide)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
HOCl	(Hypochlorous acid)	υποχλωριώδες οξύ
LDL	(Low density lipoprotein)	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
MDA	(Malondialdehyde)	Μαλινοδιαλδεύδη
MUFA	(Monounsaturated fatty acids)	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NADH	(Nicotinamide adenine dinucleotide)	Δινουκλεοτιδίο αδενίνης
NO [•]	(Nitrogen monoxide)	Νικοτιναμίδης
O ₂ ^{•-}	(Super oxide radical)	Μονοξείδιο του αζώτου
-OH [•]	(Hydroxyl radical)	Ρίζα σουπεροξειδίου
PUFA	(Polyunsaturated fatty acids)	Ρίζα υδροξυλίου
ROS	(Reactive oxygen species)	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SFA	(Saturated fatty acids)	Αντιδραστικά είδη οξυγόνου
SOD	(Superoxide dismutase)	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
TCM	(Traditional Chinese medicine)	Υπεροξείδιο της δισμουτάσης
TBA	(Thiobarbituric acid)	Παραδοσιακή Κινέζικη Ιατρική
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances	Θειοβαρβιτουρικό οξύ
		Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΕΠΙΣΚΟΠΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΕΔΙΟΥ.

Η συσχέτιση της τροφής με τα φάρμακα καθώς επίσης και η φυτική προέλευση αυτών αποτέλεσε το θεμελιώδη λίθο στο ξεκίνημα της Ιατρικής επιστήμης και της παραδοσιακής φαρμακοποιίας (Ελληνική & Κινεζική φαρμακοποιία). Οι άνθρωποι χρησιμοποιούν τις δρόγες για φαρμακευτικούς σκοπούς από την αρχαιότητα. Ο όρος δρόγες στη φαρμακογνωσία συμπεριλαμβάνει όλα τα φάρμακα που προέρχονται από τη φύση και περιλαμβάνει διάφορες ορυκτές, ζωικές αλλά κυρίως φυτικές ουσίες. Τα προϊόντα αυτά χρησιμοποιούνται παραδοσιακά με την μορφή φαρμακευτικών φυτών ή μυκήτων, και η ανάπτυξη της τεχνολογίας τα τελευταία έχει συντελέσει στην παραγωγή πιο δραστικών φαρμάκων που προέρχονται από την απομόνωση των δραστικών συστατικών από τα φυτά ή τους μύκητες (*Luo et al., 2014*). Τα δραστικά συστατικά μιας δρόγης αποτελούν θεμελιώδη συστατικά για τη ζωή του φυτού (π.χ. σάκχαρα, πρωτεΐνες, λιπίδια) αλλά και προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού όπως οι πολυφαινόλες. Η απομόνωση της μορφίνης από την οπιούχα παπαρούνα (*Papaver somniferum*), το 1804 αποτέλεσε το πρώτο φυσικό προϊόν και η χρήση των καθαρών ενώσεων σύντομα εξαπλώθηκε σε όλο τον Δυτικό κόσμο. Η επίτευξη νέων τεχνολογιών εκχύλισης και μεθόδων απομόνωσης έχει όντως αυξήσει τον αριθμό φαρμάκων φυσικής προέλευσης. Έτσι από το 1990, το 80% περίπου των φαρμάκων που έχουν εγκριθεί στις ΗΠΑ είναι φυσικά προϊόντα. Επιπρόσθετα σε δημοσιευμένα άρθρα υποστηρίζεται ότι ιστορικά, τα περισσότερα νέα φάρμακα έχουν παραχθεί από φυσικά προϊόντα (δευτερογενείς μεταβολίτες) και από ενώσεις που προέρχονται από φυσικά προϊόντα (*Li & Vederas, 2009*). Στη διάρκεια των τελευταίων 15 ετών, η έρευνα της φαρμακευτικής βιομηχανίας σε φυσικά προϊόντα έχει μειωθεί, εν μέρει λόγω της ανάπτυξης συνθετικής φαρμακευτικής χημείας

Επί του παρόντος, υπάρχει σημαντική μείωση των νέων εγκρίσεων φαρμάκων και επικείμενη απώλεια της προστασίας των διπλωμάτων ευρεσιτεχνίας για σημαντικά φάρμακα. Ωστόσο, οι αναξιοποίητοι βιολογικοί πόροι, οι μέθοδοι "έξυπνης διαλογής", ο ρομποτικός διαχωρισμός με δομική ανάλυση, η μεταβολική μηχανική και η συνθετική βιολογία προσφέρουν συναρπαστικές τεχνολογίες για την ανακάλυψη νέων φυσικών προϊόντων. Η πρόοδος στην ταχεία γενετική αλληλούχιση, σε συνδυασμό με τη χειραγώγηση των βιοσυνθετικών μονοπατιών, μπορούν να αποτελέσουν έναν τεράστιο πόρο για τη μελλοντική ανακάλυψη φαρμακευτικών παραγόντων.

Υπάρχουν εκατοντάδες παραδείγματα σύγχρονων φαρμάκων προερχόμενων από τη φύση: αντιβιοτικά όπως η πενικιλίνη ή η ερυθρομυκίνη, αντικαρκινικά φάρμακα όπως η τραβεκτεδίνη και η βινβλαστίνη, ανοσοκατασταλτικά όπως η κυκλοσπορίνη και η ραπαμυκίνη που διευκολύνουν τη διαδικασία μεταμόσχευσης οργάνων, αναλγητικά όπως η μορφίνη και η κωδεΐνη. Αυτά τα νέα φάρμακα προέκυψαν: είτε μέσω απόδειξης της αποτελεσματικότητας ορισμένων παραδοσιακών θεραπειών μέσω κλινικών μελετών (Watt & Hayes, 2013) είτε με την ανακάλυψη νέων ιατρικά χρήσιμων φυσικών ουσιών. Η προσθήκη αυτών των φυτικών φαρμάκων «στη φαρέτρα» της σύγχρονης Ιατρικής έχει συμβάλει στην επέκταση του προσδόκιμου ζωής μας από περίπου 50 χρόνια στις αρχές του 20ου αιώνα στα σχεδόν 80 χρόνια που είναι σήμερα.

Από την άλλη πλευρά τη σημερινή εποχή, όλο και περισσότεροι καταναλωτές στρέφονται σε φυσικές πηγές τροφίμων όπως είναι τα φυτά και τα βότανα. Η αύξηση της ζήτησης των καταναλωτών, έφερε ως αποτέλεσμα στην αγορά τη δημιουργία τροφίμων που προάγουν την υγεία του ανθρώπου. Τέτοια είναι τα σχεδιασμένα τρόφιμα, τα σούπερ τρόφιμα, τα θρεπτικά – θεραπευτικά τρόφιμα, καθώς και τα λειτουργικά τρόφιμα (Childs & Poryzees, 1997). Τα λειτουργικά τρόφιμα δεν είναι φάρμακα όπως τα χάπια αλλά πρόκειται για τρόφιμα και ποτά τα οποία αποδεδειγμένα παρέχουν οφέλη στην υγεία μας πέρα από τη βασική θρεπτική τους (Grajek, Olejnik, & Sip, 2005). Στα λειτουργικά τρόφιμα περιλαμβάνονται:

1. Συνηθισμένα τρόφιμα με φυσικές βιοδραστικές ουσίες (π.χ. διαιτητικές ίνες)
2. Τροφές εμπλουτισμένες με βιοδραστικές ουσίες (π.χ. αντιμικροβιακά, προβιοτικά, αντιοξειδωτικά).
3. Συστατικά τροφίμων που εισάγονται σε συμβατικά τρόφιμα (π.χ. πρεβιοτικά).

Οι καρποί των φυτών *Lycium barbarum* και *chinensis* αποτελούν ένα τέτοιο παράδειγμα που ανήκουν στην πρώτη από τις προαναφερόμενες τρεις κατηγορίες. Το γένος *Lycium* (Solanaceae) συγκεντρώνει περίπου 70 εκπροσώπους που βλαστάνουν σε ξεχωριστές περιοχές και διανέμονται από τις εύκρατες έως τις υποτροπικές περιοχές της Ευρασίας, της Βόρειας Αμερικής, της Νότιας Αμερικής, της Νότιας Αφρικής και της Αυστραλίας. (Fukuda et al., 2001).

Το επιστημονικό ενδιαφέρον σχετικά με το φυτοχημικό προφίλ του φυτού goji berry, είναι ιδιαίτερα αυξημένο και αυτό ισχύει διότι προσδίδονται σε αυτό σημαντικές βιολογικές ιδιότητες, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με την πρόληψη των ασθενειών

του ανθρώπου (*Kulczyński et al., 2016; Kocyigit and Sanlier, 2017*). Στην ελληνική χλωρίδα πλέον συμπεριλαμβάνονται μετά την εισαγωγή τους δύο εκπροσώποι του είδους το *Lycium, L. barbarum* και το *L. chinense*. Το *L. barbarum* έχει γίνει εξαιρετικά δημοφιλές τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στην δημόσια αποδοχή του ως τροφή με εξαιρετικά θρεπτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Οι καρποί του έχουν μελετηθεί εκτενώς για την αντιγηραντική, νευροπροστατευτική, ενάντια στην κόπωση, υπογλυκαιμική, αντικαρκινική, κυτταροπροστατευτική, ανοσορρυθμιστική και αντιοξειδωτική δράση. (*Amagase et al., 2011*).

Η Κοινή Αγροτική Πολιτική (ΚΑΠ) η οποία και εφαρμόζεται στην Ελλάδα ως μέλος της Ευρωπαϊκής Ένωσης, περιλαμβάνει ένα σύνολο κανονισμών που αφορούν την αγροτική παραγωγή, τις ενισχύσεις των γεωργών, την ανάπτυξη της υπαίθρου και τις ρυθμίσεις στην αγορά των γεωργικών προϊόντων, φροντίζοντας παράλληλα και την περιβαλλοντική συμβατότητα της γεωργικής δραστηριότητας, στη διακίνηση αγροτικών προϊόντων, με στόχο τη σταθερότητα των τιμών, την επιλογή και την υψηλή ποιότητα των προϊόντων, τη χρήση του εδάφους και την απασχόληση στον αγροτικό τομέα. Μία λύση, όπως θα δούμε, προτείνεται εδώ με την δικαιολόγηση ανάπτυξης εγχώριων φυτειών goji berry με σκοπό τη μείωση της εισαγωγής στους καρπούς αυτούς και ταυτόχρονα, σε μία περίοδο που απαιτεί διεξόδους ανάπτυξης στη χώρα μας, να δοθούν εναλλακτικές λύσεις καλλιέργειας και μεταποίησης στον αγροτικό και μεταποιητικό τομέα.

1.1. Το φυτό goji berry.

Έρευνες με βάση την ανάλυση του DNA των χλωροπλαστών έδειξαν ως χώρα αρχικής προέλευσης του φυτού την Αμερική από την οποία και στη συνέχεια έγινε μεταφορά του και σε άλλες ηπείρους όπως της Αυστραλίας, της νότιας Αφρικής, της Ευρώπης και της Ασίας, στην οποία και είναι και πιο πολύ διαδεδομένο. (*Yao et al., 2018*)

Η ονομασία του γένους *Lycium*, προέρχεται από την περιοχή της νότιας αρχαίας Ανατολίας της Λυκίας. Η κοινή ονομασία goji προέρχεται από τον εθνοβοτανολόγο Bradley Dobos που ήταν ειδικός στην Θιβητιανή παραδοσιακή ιατρική αλλά υπάρχουν και διάφορα άλλα ονόματα που χρησιμοποιούνται για τα goji όπως για παράδειγμα τα Wolfberry, Boxthorn, Kuko(Ιαπωνικό), Gouqizi(Κινεζικό) κλπ. Το σύννηθες όνομα του goji στα κινέζικα είναι Ningxia gouqi, δηλαδή «λύκιο του Ningxia» που είναι μία επαρχία της Κίνας. Ο καρπός είναι γνωστός στις φαρμακολογικές αναφορές ως *Lycii*

fructus, το οποίο στα Λατινικά σημαίνει «καρπός *Lycium*». Το γένος *Lycium* (*Solanaceae*) συγκεντρώνει περίπου 80 εκπροσώπους που βλαστάνουν σε ξεχωριστές περιοχές και διανέμονται από τις εύκρατες έως τις υποτροπικές περιοχές της Ευρασίας, της Βόρειας Αμερικής, της Νότιας Αμερικής, της Νότιας Αφρικής και της Αυστραλίας. (*Fukuda et al., 2001*). Το βοτανικό όνομα *L. barbarum* δόθηκε από Σουηδό βοτανολόγο Carolus Linnaeus το 1753, ενώ ο βοτανολόγος Philip Miller περιέγραψε το *Lycium chinense* 15 χρόνια αργότερα. (*Amagase et al., 2011*)

Οι μεγαλύτερες ποσότητες των εμπορικά παραγομένων καρπών goji προέρχονται από τις αυτόνομες περιοχές *Ningxia Hui* στη βόρειο-κεντρική Κίνα και την Σιντζιάνγκ της δυτικής Κίνας, υπάρχουν φυτείες συνολικής έκτασης 200.000 στρεμμάτων.

Τα είδη goji berry, είναι φυλλοβόλα ξυλώδη πολυετή φυτά, που αναπτύσσονται σε ύψος 1–3 μ. Τα φύλλα των goji berry σχηματίζονται στο βλαστό, σε εναλλασσόμενη διάταξη ή σε δεσμίδες μέχρι και τρία φύλλα, έχοντας σχήμα ωοειδές ή λογχοειδές. Τα άνθη αναπτύσσονται σε ομάδες από μια έως τρεις, στις μασχάλες των φύλλων. Ο κάλυκας (που τελικά διαρρηγνύεται από το αυξανόμενο μούρο), αποτελείται από κωδωνοειδούς σχήματος ή σωληνοειδή σέπαλα, τα οποία σχηματίζουν κοντούς, τριγωνικούς λοβούς. Οι στεφάνες των ανθέων, έχουν το χρώμα της λεβάντας ή του μωβ, πλάτους 9–14 χιλ. με πέντε ή έξι λοβούς κοντότερους του σωλήνα. Οι στήμονες είναι διαρθρωμένοι με μακρύτερα νημάτια απ' ό,τι οι ανθήρες. Οι ανθήρες διανοίγουν σε διαμήκη κατεύθυνση.



Εικόνα 1: Φύλλα και άνθη του *L. Barbarum* (a) και *L. Chinense* (b).

Στο βόρειο ημισφαίριο, η ανθοφορία εμφανίζεται από τον Ιούνιο έως τον Σεπτέμβριο και η ωρίμανση των μούρων, από τον Αύγουστο έως τον Οκτώβριο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος, το υψόμετρο και το κλίμα.

Ο καρπός έχει σχήμα μακρόστενο, το χρώμα του είναι κόκκινο έως πορτοκαλί και έχει ευχάριστη γεύση. Η ωρίμανση των καρπών πραγματοποιείται μεταξύ Αυγούστου και Οκτωβρίου. Το κάθε φυτό παράγει περίπου στην συμβατική καλλιέργεια 0,8- 1 κιλό ξηρούς καρπούς ετησίως ενώ στην βιολογική περίπου 0,5 κιλά.



Εικόνα 2: *Lycium barbarum*.



Εικόνα 3: *Lycium chinense*.

Διατίθενται συνήθως στην αγορά είτε ως νωποί καρποί ή φρέσκοι χυμοί αλλά και μετά από ξήρανσή τους ή άλλες επεξεργασίες συντήρησής τους. Εκτός από τα φρούτα όμως, καταναλώνονται και τα φύλλα τους ως λαχανικά σε φαγητά και σαλάτες. Επίσης, τα φύλλα και ο φλοιός των δέντρων χρησιμοποιούνται ως αφεψήματα.

1.1.1. Η σημαντικότητα των goji berry και οι χρήσεις του στην Παραδοσιακή Ιατρική.

Η πρώτη αναφορά στις ιδιότητες του γίνεται το 2800 π.χ. στο αρχαίο βιβλίο *bencao jing* (root and herbals classic) του μυθικού κινέζου αυτοκράτορα και βοτανολόγου Shennong, όπου εκεί αξιολόγησε και κατέταξε σε 3 κατηγορίες 356 βότανα. Τα goji berry συμπεριλήφθησαν μαζί με άλλα 119 στην πρώτη κατηγορία με την υψηλότερη βαθμολογία και θεωρούνταν ότι έχουν αξιοθαύμαστες ευεργετικές ιδιότητες και ότι ήταν ακίνδυνα για τον άνθρωπο. Σύμφωνα με το Shennong η μακροχρόνια κατανάλωση goji berry παρατείνει τη διάρκεια ζωής ενισχύοντας τον οργανισμό.

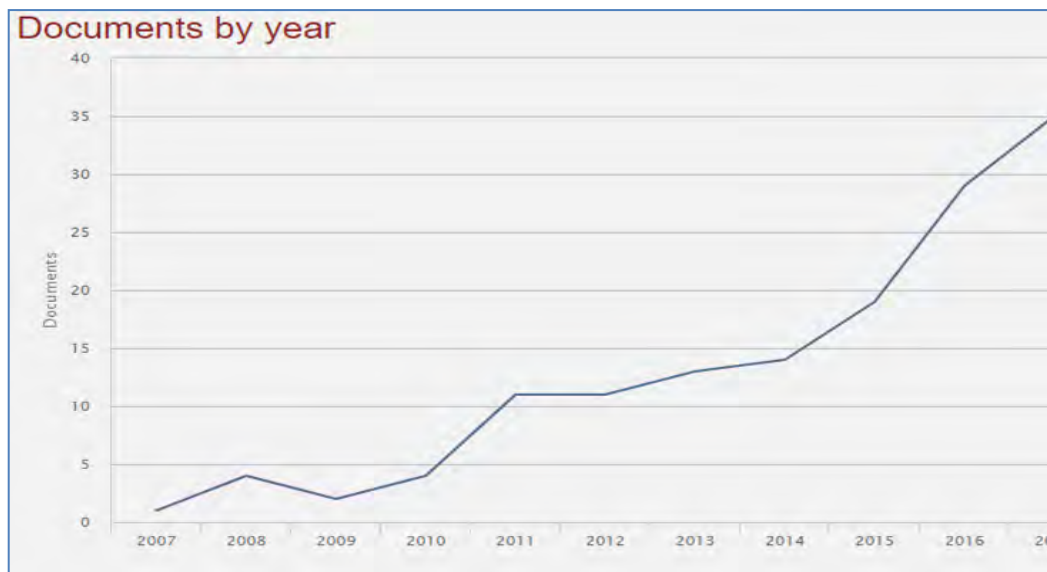
Η δεύτερη αναφορά των goji berry στην παραδοσιακή κινεζική ιατρική γίνεται τον 16ο αιώνα στη συλλογή βιβλίων του Li Shi-Zhen που αποτελεί τον πρώτο οδηγό φαρμακοποιίας παγκοσμίως. Στον συγκεκριμένο οδηγό εκτός των καρπών (*Fructus Lycii*) αναφέρεται η χρήση και τμημάτων του φυτού όπως των λουλουδιών, των φύλλων και του φλοιού της ρίζας (*Cortex Lycii radices*). Η χρήση των αποξηραμένων

καρπών goji έγινε ευρέως γνωστή εκτός από της Κίνας και στις περισσότερες Ασιατικές παραδοσιακές ιατρικές όπως π.χ. της Ιαπωνίας, του Θιβέτ, της Κορέας του Βιετνάμ και της Ταϊλάνδης στις οποίες και χρησιμοποιείται ευρέως ως φάρμακο αλλά και ως λειτουργικό τρόφιμο από την πρώτη γνωστή αναφορά του έως και σήμερα εδώ και 2500 χρόνια.

Η ευεργετική δράση σύμφωνα με την παραδοσιακή κινεζική ιατρική έχει να κάνει με την ικανότητά του να συμβάλλει στην ανάπλαση και τόνωση του ήπατος, των νεφρών, τη βελτίωση της λειτουργίας της όρασης και του jing (των βασικών στοιχείων που αποτελούν το ανθρώπινο σώμα και το διατηρούν στη ζωή). (Chinese Pharmacopoeia 2010). Οι βοτανικές φαρμακευτικές συνταγές Kogikujougan (杞菊地黄丸) και Kogikumyoken-gan (杞菊妙見丸) είναι χαρακτηριστικές της Ιαπωνικής Παραδοσιακής Φαρμακοποιίας γνωστής επίσης και ως “kampro”. Σε αυτές με τη χρήση goji berry, ανθέων χρυσάνθεμων (λόγω της ευεργετικής δράσης στην όραση του καροτενοειδούς λουτεΐνης που περιέχουν) και άλλων βοτάνων προσδίδονται θεραπευτικές ιδιότητες για την ίαση προβλημάτων όρασης, του ουροποιητικού συστήματος και για την αύξηση της φυσικής αντοχής σε ανθρώπους στους οποίους δεν συντρέχουν αλλά παθολογικά αίτια.

1.1.2. Σύγχρονη έρευνα και αξιοποίηση του goji berry.

Από τη δεκαετία του '80 και μέχρι σήμερα ένας μεγάλος αριθμός επιστημονικών μελετών, προερχόμενες κυρίως από τον επιστημονικό χώρο της ιατρικής, έχουν πραγματοποιηθεί για την αξιολόγηση των ευεργετικών δράσεων από την κατανάλωση των goji berry, καθώς και των πολυσακχαριτών τους (Lycium Barbarum Polysaccharides), όπως φαίνεται και στο Γράφημα 1.



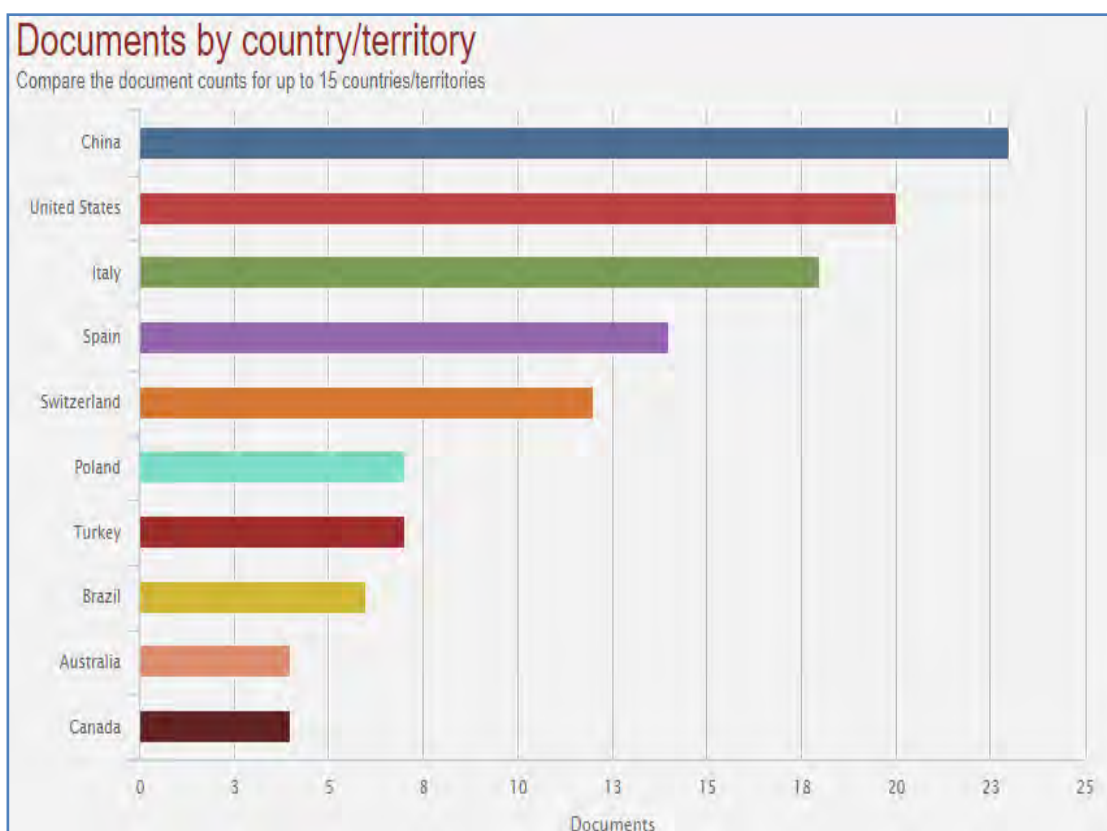
Γράφημα 1: Από το 2007 έως και σήμερα υπάρχουν 146 αναφορές για το goji berry. (www.scopus.com Δεκέμβριος 2017).

Αυτές, μελέτησαν κυρίως τις αντιοξειδωτικές, και αντικαρκινικές ιδιότητες καθώς και την επίδραση στο ανοσοποιητικό σύστημα. Ειδικότερα, περιγράφουν ότι η κατανάλωση goji berry συμβάλλει στην προστασία του αμφιβληστροειδή χιτώνα των ματιών (Yang *et al.*, 2017), στην προστασία του ήπατος (Liu *et al.*, 2017) στη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος (Chao *et al.*, 2006; Amagase *et al.*, 2009) και τη μείωση της κόπωσης του οργανισμού (Amagase & Nance, 2008). Τέλος σε άλλες μελέτες, έχει καταγραφεί ότι η κατανάλωση goji berry συμβάλλει στην καλή λειτουργία του οργανισμού προσδίδοντας του ιδιότητες όπως της αντιγήρανσης, της νευροπροστασίας, της προστασίας από το γλαύκωμα και τον διαβήτη, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές (Amagase and Farnsworth, 2011a; Zhao *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2011).

Η καλλιέργεια των goji berry άγνωστη για τους περισσότερους αγρότες στην Ελλάδα, τα τελευταία χρόνια φαίνεται πως κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος και αποτελεί μία εναλλακτική καλλιέργεια για την οποία ενδιαφέρον επιδεικνύουν κυρίως οι νέοι αγρότες. Δεδομένου ότι οι σημερινές οικονομικές συνθήκες στη χώρα μας πλήττουν το αγροτικό εισόδημα, αυξάνοντας το κόστος παραγωγής και μειώνοντας την παραγωγικότητα οδηγούν στο αποτέλεσμα να διευρύνονται οι ανισότητες μεταξύ των τιμών από τον παραγωγό στο 'ράφι' και να επιδρούν αρνητικά στην ανταγωνιστικότητα της αγροτικής οικονομίας, που σε μεγάλο μέρος της οποίας συμμετέχουν ο τομέας της βιομηχανίας και του εμπορίου. Έτσι, γίνεται επιτακτική ανάγκη, εύρεσης νέων εναλλακτικών καλλιεργειών (μεγαλύτερης οικονομικής

απόδοσης αλλά μικρότερης κλίμακας) και καινοτόμων μεθόδων μεταποίησης των νέων αυτών παραγόμενων προϊόντων.

Το goji berry άρχισε να καλλιεργείται αρχικά σε πειραματικό στάδιο σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας και μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν ασφαλή συμπεράσματα, καθώς τα δέντρα είναι μικρά. Στο πλαίσιο της βελτιστοποίησης της παραγωγής και επεξεργασίας των καρπών δημιουργήθηκε στην περιοχή της Θεσσαλίας ο πρώτος πανελλήνιος συνεταιρισμός καλλιεργητών goji berry, με σκοπό την παραγωγή νωπού, αποξηραμένου καρπού και μαρμελάδων.



Γράφημα 2: Αριθμός αναφορών για το goji berry, ανά χώρα. (www.scopus.com Δεκέμβριος 2017).

Όπως φαίνεται και από το Γράφημα 2 **δεν υπήρχαν έρευνες από την Ελλάδα με εγχώριους καρπούς στο ξεκίνημα αυτής της διδακτορικής διατριβής** ενώ μέχρι τη συγγραφή της (Μάρτιος 2018) καταγράφηκαν τρεις δημοσιευμένες έρευνες) (*Benchennouf et al., 2017; Kafkaletou et al. 2017,2018*) γεγονός που αποδεικνύει το αυξανόμενο ενδιαφέρον.

Αν και αρκετές μελέτες έχουν εστιαστεί στην παραγωγή βιοδραστικών στοιχείων από φυσικά προϊόντα υψηλής διατροφικής αξίας, εντούτοις τα αποτελέσματά τους

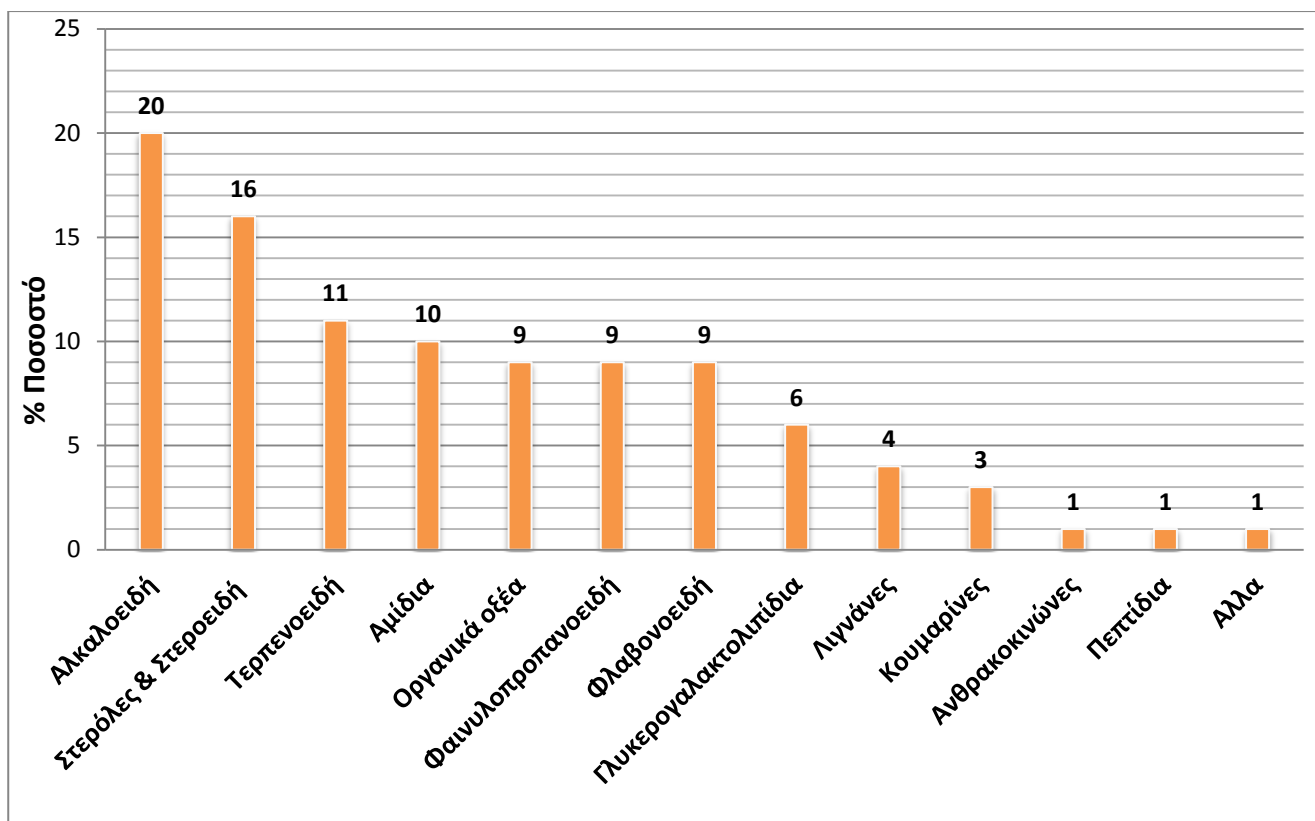
παρέχουν μία αποσπασματική πληροφόρηση, ενώ μία ολοκληρωμένη έρευνα που να λαμβάνει υπ' όψιν παραμέτρους όπως την περιοχή προέλευσης των καρπών, την μέθοδο ξήρανσης, την αξιολόγηση των παραμέτρων εκχύλισης και τελικώς την αξιολόγηση των παραγόμενων σταθεροποιημένων βιοδραστικών σκονών από καρπούς goji berry δεν έχει πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα.

Εδώ έρχεται η παρούσα διδακτορική διατριβή, όπου:

- Διαπιστώνει επίσης ότι η περιεκτικότητα σε βιοδραστικές ιδιότητες των καρπών goji berry Θεσσαλικής προέλευσης, είναι απολύτως συγκρίσιμες με τις εισαγόμενες κινεζικής προέλευσης.
- Αναπτύσσει μία διαδικασία απομόνωσης βιοδραστικών ενώσεων, από τους καρπούς goji berry και επιλέγει με πειραματικό σχεδιασμό, τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης.
- Αποδεικνύει ότι τα εκχυλίσματα των καρπών goji berry της Θεσσαλικής παραγωγής διαθέτουν ευεργετικές για την υγεία του ανθρώπου αντιοξειδωτικές, αντιμεταλλαξιογόνες, αντιμικροβιακές και πρεβιοτικές ιδιότητες.

1.2 Χημική σύσταση των goji berry

Από την βιβλιογραφική έρευνα προέκυψε ότι η χημική σύσταση των goji berries εκτός των πολυσακχαριτών περιλαμβάνει πάνω από **345** χημικές ενώσεις. Σε αυτές ανήκουν και ενώσεις που έχουν απομονωθεί εκτός από τους καρπούς, στα φύλλα και στις ρίζες των δυο σημαντικότερων ποικιλιών *Barbarum* και *Chinense* του γένους *Lycium*.



Γράφημα 3 .Χημικές ενώσεις και % ποσοστό αυτών στα goji berry εκτός των πολυσακχαριτών .(Qian et al., 2017)

Το % ποσοστό αυτών των χημικών ενώσεων εκτός των μακρομορίων των πολυσακχαριτών παρουσιάζεται στο γράφημα 3.Ενώ η διατροφική αξία 85 g ξηρών goji berries σύμφωνα με την Nutrition Data Bank παρουσιάζεται στον (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Θρεπτικά στοιχεία 85 g ξηρών goji berries. Πηγή: Nutrition Data Bank.

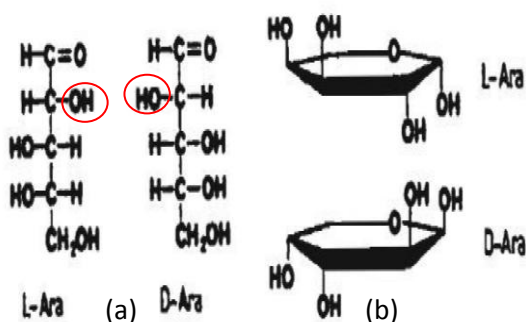
Θερμίδες	349 kcal
Σάκχαρα	45.61 g.
Πρωτεΐνη	14.26 g.
Ίνες	13 gr.
Λίπος	0.39 g.
Βιταμίνη Α	150% της RDI (Recommended Daily Intake)
Χαλκός	84% της RDI
Σελήνιο	75% της RDI
Βιταμίνη Β2	63% της RDI
Σίδηρος:	42% της RDI
Βιταμίνη C	27% της RDI
Κάλιο:	21% της RDI
Ψευδάργυρος:	15% της RDI

1.2.1 Υδατάνθρακες

1.2.1.1 Μόρια πολυσακχαριτών -Μονοσακχαρίτες

Οι μονοσακχαρίτες που αποτελούν τα δομικά μόρια των πολυσακχαριτών είναι συνήθως αλδόζες (πολυυδροξυαλδόζες) ή κετόζες (πολυυδροξυκετόνες).

Οι μονοσακχαρίτες περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύμμετρα άτομα άνθρακα. Αυτό το ασύμμετρο άτομο άνθρακα προσδίδει την ιδιότητα της στερεοϊσομέρειας. Τα ισομερή αυτά ονομάζονται εναντιομερή ή οπτικά ισομερή, επειδή έχουν σχέση ειδώλου-αντικειμένου. Έτσι για παράδειγμα η Αραβινόζη όταν το υδροξύλιο το έχει αριστερά ονομάζεται L - Αραβινόζη ενώ όταν το έχει δεξιά D - Αραβινόζη (Εικόνα 4).

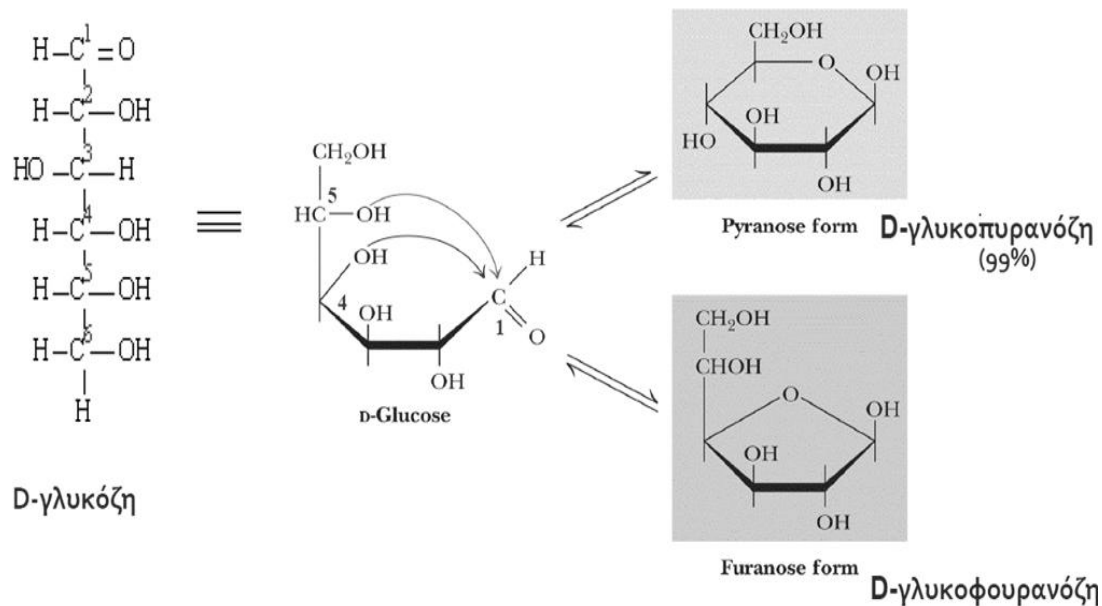


Εικόνα 4: Οι εναντιομερές μορφές της αραβινόζης (α) Προβολή σύμφωνα με Fischer (β) Προβολή σύμφωνα με Haworth.

Οι D και L-αραβινόζη συμπεριφέρονται το ίδιο στις χημικές αντιδράσεις, αλλά ένα συγκεκριμένο ένζυμο δρα μόνο στο ένα από τα δύο.

Οι μονοσακχαρίτες, οι οποίοι συμμετέχουν στο σχηματισμό των πολυσακχαριτών όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 5, έχουν συνήθως κυκλική μορφή στην ανθρακική αλυσίδα τους και όχι “ανοιχτή”. Αυτοί οι κυκλικοί δακτύλιοι έχουν τη μορφή φουρανόζης (δακτύλιος πέντε άτομα άνθρακα) ή πυρανόζης (δακτύλιος έξι άτομα άνθρακα). Η μορφή της πυρανόζης είναι στη φύση ή πιο διαδεδομένη λόγω του ότι αποτελεί το πιο πιθανό αποτέλεσμα κατά την κυκλοποίηση της ανοικτής αλυσίδας

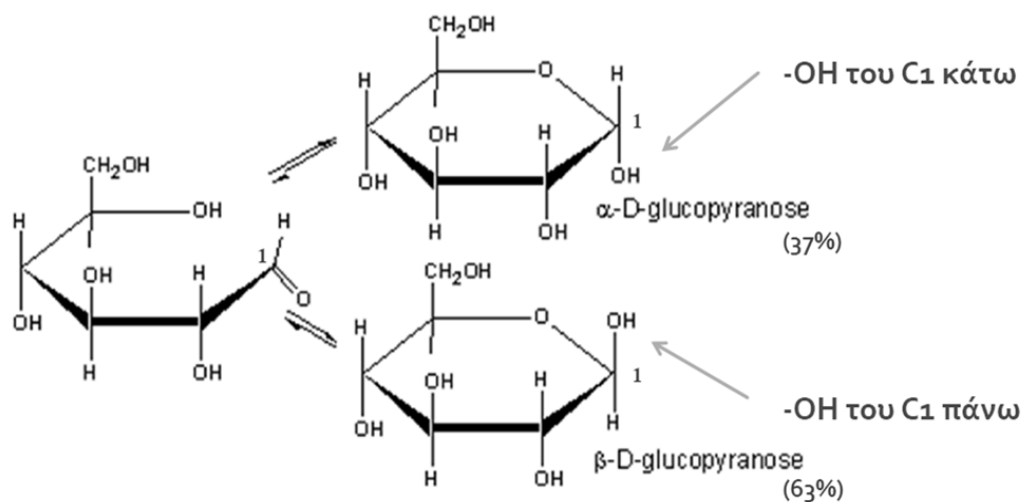
και είναι επίσης πιο σταθερή μορφή από τη φουρανόζη. (Taiz and Zeiger, 1998).



Εικόνα 5: Δημιουργία μορφών πυρανόζης και φουρανόζης από D-γλυκόζη με τα ανάλογα ποσοστά επίτευξης κατά την κυκλοποίηση.

1.2.1.2 Διαχωρισμός σακχάρων σε α και β ανωμερή μορφές.

Ο σχηματισμός δακτυλίου οδηγεί σε ένα επιπλέον ασύμμετρο άτομο άνθρακα λόγω των 4 διαφορετικών πλέον υποκατάστατων στον άνθρακα που ήταν συνδεδεμένο το -OH). Με τον τρόπο αυτόν επέρχεται ένας επιπλέον διαχωρισμός σε α και β ανωμερή. Έτσι όταν το -OH του νέου ασύμμετρου ατόμου άνθρακα βρίσκεται προς τα κάτω ονομάζεται **α ανωμερές** και προς τα πάνω στο **β ανωμερές**.



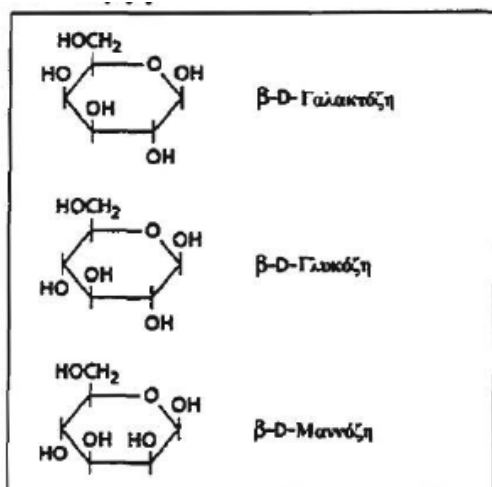
Εικόνα 6: Δημιουργία μορφών α και β ανωμερών πυρανόζης από D-γλυκόζη με τα ανάλογα ποσοστά επίτευξης κατά την κυκλοποίηση.

Σύμφωνα με τα παραπάνω υπάρχουν, για παράδειγμα, οκτώ πιθανοί τύποι γλυκόζης σε μορφή δακτυλίου.

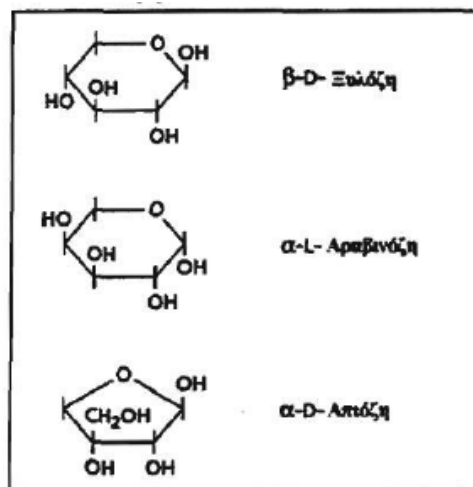
- Η α-D-γλυκοπυρανόζη,
- η α-L-γλυκοπυρανόζη,
- η β-D-γλυκοπυρανόζη,
- η β-L-γλυκοπυρανόζη,
- η α-D-γλυκοφουρανόζη,
- η α-L-γλυκοφουρανόζη,
- η β-D-γλυκοφουρανόζη και
- η β-L-γλυκοφουρανόζη

Οι μονοσακχαρίτες των goji berry έχουν είτε πέντε είτε έξι άτομα άνθρακα. Επίσης, οι περισσότεροι μονοσακχαρίτες του κυτταρικού τοιχώματος όπως παρουσιάστηκε και στην Εικόνα 5 δεν βρίσκονται με τη μορφή της φουρανόζης, η οποία είναι ασταθής, αλλά με αυτή της πυρανόζης.

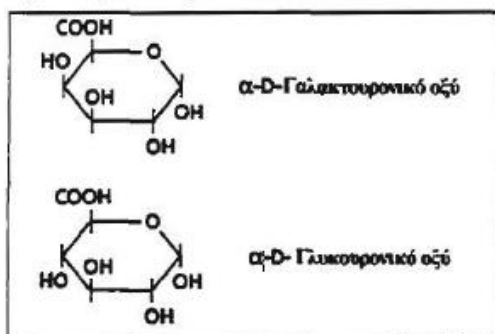
I. Εξόζες



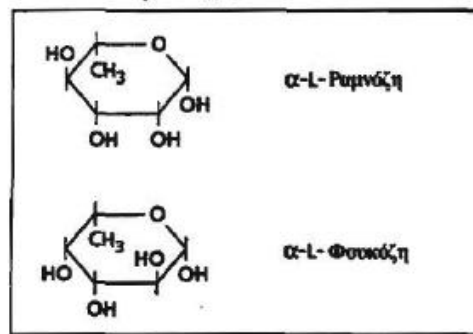
II. Πεντόζες



III. Ουρονικά οξέα



IV. Δεοξυ-σάκχαρα



Εικόνα 7: Δομές των σακχάρων που απαντούν συχνότερα στα goji berry.

Από τις αλδόζες που αναφέρθηκαν, στην σύνθεση των πολυσακχαριτών goji berry βρίσκουμε συχνότερα τις εξόζες (Εικόνα 7.I)

- ✓ D-γλυκόζη (D-Glc),
- ✓ D-μαννόζη (D-Man),
- ✓ D-γαλακτόζη (D-Gal) και σπανιότερα
- ✓ L-γαλακτόζη (L-Gal)

και τις πεντόζες (Εικόνα 7.II)

- ✓ D-ξυλόζη (D-Xyl) και
- ✓ L-αραβινόζη (L-Ara).

Επίσης βρίσκουμε παράγωγα μονοσακχαριτών όπως τα ουρονικά οξέα (Εικόνα 7.III) τα οποία και έχουν τη δομή της D-γαλακτόζης και της D-γλυκόζης, αντίστοιχα, με αντικατάσταση της ομάδας -CH₂OH από την ομάδα - COOH

- ✓ το D-γαλακτουρονικό οξύ (D-GalA) και

- ✓ το D-γλυκουρονικό οξύ (D-GlcA)

καθώς και δεοξυ-σάκχαρα (Εικόνα 7.IV) τα οποία είναι σάκχαρα στα οποία μία –OH ομάδα έχει αντικατασταθεί με ένα άτομο –H και που έχουν στη δομή τους την L-γαλακτόζη και της L-μαννόζη, αντίστοιχα, με αντικατάσταση της -CH₂OH ομάδας από -CH₃ όπως :

- ✓ Η L-φουκόζη (L-Fuc) και
- ✓ η L-ραμνόζη (L-Rha) (6-δεοξυεξόζες)

1.2.1.3 Γλυκοζιτικοί δεσμοί

Η σύνδεση των μορίων των μονοσακχαριτών για τη δημιουργία των πολυσακχαριτών πραγματοποιείται με γλυκοζιτικούς δεσμούς στους οποίους ένα άτομο άνθρακα (αυτό που, στη μορφή του δακτυλίου, ενώνεται με δύο άτομα οξυγόνου) συνδέεται, μέσω ενός ατόμου οξυγόνου, με ένα άτομο άνθρακα σε έναν άλλο μονοσακχαρίτη. Έτσι ένας μονοσακχαρίτης μπορεί να ενωθεί με ένα άλλον μονοσακχαρίτη που φέρει 6 άτομα άνθρακα στο υδροξυλικό οξυγόνο σε τέσσερις διαφορετικές θέσεις (0-2, 0-3, 0-4 ή 0-6).

Επίσης οι γλυκοζιτικοί δεσμοί ανάλογα του είδους της ανωμέρειας του σακχάρου που συμμετέχει στο δεσμό διακρίνονται

- σε α γλυκοζιτικό δεσμό, όταν συμμετέχει το α- ανωμερές και
- σε β γλυκοζιτικό δεσμό όταν συμμετέχει το β ανωμερές

Η διαφορά του είδους του γλυκοζιτικού δεσμού μεταξύ ομοπολυσακχαριτών (ύπαρξη ενός μόνου μονοσακχαρίτη) που στη δομή τους έχουν τον ίδιο μονοσακχαρίτη οδηγεί και σε διαφορετικές φυσικές και βιοχημικές ιδιότητες των δύο αυτών πολυσακχαριτών.

Χαρακτηριστικό τέτοιο παράδειγμα αποτελούν η κυτταρίνη και το άμυλο στα οποία υπάρχει στη δομή τους ο ίδιος μονοσακχαρίτης (D-γλυκόζη) και συνδέονται με γλυκοζιτικό δεσμό στον οποίο ο άνθρακας της θέσης ένα (C-1) ενός μορίου D-γλυκόζης συνδέεται με τον άνθρακα της θέσης τέσσερα C-4 ενός δεύτερου μορίου γλυκόζης. Στην κυτταρίνη όμως ο γλυκοζιτικός δεσμός είναι β, ενώ στο άμυλο είναι α.

Αυτή η μοναδική διαφορά στη δομή τους έχει ως αποτέλεσμα οι δύο αυτοί πολυσακχαρίτες να διαφέρουν σημαντικά στις φυσικές και βιοχημικές τους ιδιότητες.

1.2.1.4 Ονοματολογία πολυσακχαριτών.

Η ονομασία των πολυσακχαριτών γίνεται με βάση τους κύριους μονοσακχαρίτες, που περιέχουν. Έτσι με την ονομασία «γλυκάνη» ονομάζεται ένας πολυσακχαρίτης που περιέχει μόρια γλυκόζης, με την ονομασία «ξυλάνη» ένας πολυσακχαρίτης με μόρια ξυλόζης, ενώ τέλος με την ονομασία «γαλακτάνη» ονομάζεται ένας πολυσακχαρίτης με μόρια γαλακτόζης.

Όταν οι πολυσακχαρίτες φέρουν διακλαδώσεις, τα μόρια που συνιστούν το σκελετό του πολυσακχαρίτη συνήθως εμφανίζονται στο δεύτερο συνθετικό του ονόματος του ενώ τα μόρια που συνιστούν τις διακλαδώσεις στο πρώτο μέρος του συνθετικού του ονόματος. Έτσι μία γαλακτομαννάνη φέρει σκελετό από μόρια μαννόζης με πλευρικά διακλαδιζόμενα μόρια γαλακτόζης ενώ μία ξυλογλυκάνη σκελετό από μόρια γλυκόζης με μόρια ξυλόζης στις πλευρικές αλυσίδες. Σαφώς υπάρχουν και εξαιρέσεις όπως αυτή της γλυκομαννάνης, που ο σκελετός του μορίου αποτελείται και από μόρια γλυκόζης και από μόρια μαννόζης (*Brett and Waldron, 1996*).

1.2.1.5 Οι πολυσακχαρίτες των goji berry.

Οι πολυσακχαρίτες των goji berry είναι από τα πιο διερευνημένα για τη βιοδραστικότητά τους και θεωρούνται από τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά. Πρόκειται στην ουσία για γλυκοσυζευμένα μακρομόρια, υδατοδιαλυτά κατά το μεγαλύτερο ποσοστό τους και ένα κλάσμα αυτών που διαχωρίστηκε με αντιδραστήριο Yagin έχει προσδιοριστεί πιο συγκεκριμένα ως πρωτεϊνικές Αραβινογαλακτάνες (AGPs) (*Redgwell et al., 2011*). Στη βιβλιογραφία συνήθως αναφέρονται συνολικά ως πολυσακχαρίτες του *L. barbarum* (LBP) και το μοριακό βάρος τους έχει καταγραφεί από 10-2300 KDa (*Wang et al., 2014*). Περιέχονται σε ποσοστό 5-8.5 % των αποξηραμένων καρπών ενώ στους φρέσκους καρπούς το ποσοστό είναι 1.02–2.48% .

Η μέχρι τώρα βιβλιογραφία για τους LBP έχει καταγράψει ότι αποτελούνται από:

- 9 μονοσακχαρίτες : arabinose (Ara), galactose (Gal), glucose (Glc), fucose (Fuc), mannose (Man), rhamnose (Rha) xylose (Xyl), fructose(Fru) και ribose (Rib)
- γαλακτουρονικό οξύ (GalA) και γλυκουρονικό οξύ (GlcA) και
- είκοσι αμινοξέα.

Aspartic acid , Glutamic acid , Hydroxyproline , Serine , Alanine , Glycine , Histidine, Arginine ,Threonine, Proline ,Tyrosine, Valine, Methionine ,Cystine, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine , Tryptophan, Ornithine και Lysine.

Η σύνδεση των υδατανθρακικών τμημάτων με τα πρωτεϊνικά έχει καταγραφεί με O-γλυκοζιτικό δεσμό με τη σερίνη/θρεονίνη των πρωτεϊνικών τμημάτων.

Η ραχοκοκαλιά των LBP έχει καταγραφεί ότι αποτελείται με συνδέσεις κυρίως (1 → 3) – β πολυγαλακτουρονών (Galp) (1 → 4) – β Galp, (1 → 6) – β Galp, (1 → 6) – α Galp και (1 → 6) – α γλυκάνης (glucans) με διαφορετικές αλυσίδες και διακλαδώσεις.

Για την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των δομών των LBPs έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία η χρήση των παρακάτω τεχνικών:

- Υψηλής απόδοσης χρωματογραφίας διαπερατότητας πηκτής (για προσδιορισμό μοριακού βάρους πολυσακχαριτών και ομοιογένειας αυτών).
- Μερική υδρόλυσης με χρήση οξέων ή ενζύμων, υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, αέρια χρωματογραφία, ανάλυση πολυσακχαριτών με ηλεκτροφόρηση πηκτής και υψηλής απόδοσης χρωματογραφίας λεπτού φιλμ (για τον προσδιορισμό των μονοσακχαριτών που τους αποτελούν και την ανάλυση του γλυκοζιτικού τμήματος).
- Φασματογραφία υπερήχων (IR) για τον προσδιορισμό και τον διαχωρισμό πυρανοζών από τις φουρανόζες, α & β ανωμερών.
- Προσδιορισμός ατόμων H και C με φασματογραφία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού βάση της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί η αναλογία των LBP μονοσακχαριτών και των ανωμερικών τους δεσμών.
- Αέρια χρωματογραφία με φασματογραφία μάζας για τον προσδιορισμό της θέσης του γλυκοζιτικού δεσμού.

Από τη βιβλιογραφική έρευνα καταγράφηκαν 30 διαφορετικοί πολυσακχαρίτες στους καρπούς *L.barbarum* και 10 πολυσακχαρίτες στους καρπούς *L. chinense* (Πίνακας 2).

Από τις πρώτες έρευνες καταγράφεται η έρευνα των Zhao et al., (1996) στην οποία και καταγράφηκε ο πολυσακχαρίτης LPBC4 του οποίου ο "σκελετός" αποτελείται από γλυκόζη ενώ μετά από ένα χρόνο η μελέτη του Zhao et al., (1997)

παρουσιάζει την απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των πολυσακχαρικών μορφών LBPC2, LBPC4, LBPA1 και LBPA3.

Οι Huang et al. το 1998 & 1999 σε έρευνες τους απομόνωσαν χαρακτήρισαν τις ανοσοβιολογικές ιδιοτήτων των πολυσακχαριτών κλασμάτων LbGr3, LbGr4 και LbGr5. Ενώ στη μελέτη των Peng et al. το 2001 αναφέρονται ξανά τα πολυσακχαρικά κλάσματα LbGr3, LbGr4 και LbGr5 και προστίθενται τα κλάσματα LbGr1, LbGr2.

Το ίδιο έτος οι Duan et al., (2001) μελέτησαν τα απομόνωσαν και χαρακτήρισαν πολυσακχαρικά κλάσματα LBP1a-1, LBP1a-2, LBP3a-1 και LBP3a-2 ενώ οι Chen et al. (2008) στη μελέτη τους με στόχο την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων από πολυσακχαρίτες *L. barbarum* χρησιμοποίησαν αφού πρώτα τα απομόνωσαν τα κλάσματα LBPF1, LBPF2, LBPF3 και LBPF4.

Οι Peng et al., (2001a) πρόσθεσαν ακόμη ένα πολυσακχαρικό κλάσμα το LbGr5b και χαρακτήρισαν τη μονοσακχαρική σύνθεσή του ως Rha:Ara:Glc:Gal σε αναλογία 0.1:1.1:2.0:3 σε αντίθεση με την LbGr5 που έχει Rha:Ara:Xyl:Gal:Man:Glc σε αναλογία 0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1. Το ίδιο έτος οι Zou et al., (2010) και οι Zhu et al., (2013) μελέτησαν την υπογλυκαιμική ιδιότητα του κλάσματος LBP-1 και LBP-s-1 με σύνθεση και αναλογίες μονοσακχαριτών Rha:Ara:Xyl:Gal:Man:GalA = 1:7.85:0.37:0.65:3.01:8.16 και Rha:Ara:Xyl:Man:Glu:Gal:Gal A = 1.00:8.34:1.25:1.26:1.91:7.05:15.28 αντίστοιχα.

Οι Redgwell et al., το 2011 παρουσίασαν την εργασία τους σε 2 άρθρα της απομόνωσης των κυτταρικών πολυσακχαριτών του *L. barbarum*. Από την κλασματοποίηση που πραγματοποίησαν παρελήφθησαν 2 υδατοδιαλυτά (WSP1 & WSP2), ένα μη υδατοδιαλυτό (CWM) και το κλάσμα των αραβινο-γαλακτανών (AGP).

Στην έρευνά τους πραγματοποιήθηκε απομόνωση και χαρακτηρισμός τους ως προς τη σύνθεση και την αναλογία των μονοσακχαριτών καθώς επίσης και του ποσοστού των AGPs.

Το 2012 σε μία έρευνα σχετικά με την επίδραση των LBP σε σπληνοκύτταρα παρουσίασαν τον LBP-IV με σύνθεση Rha:Ara:Xyl:Glc:Gal = 1.61:3.82:3.44:7.54:1.00. Ενώ τα κλάσματα LbGr1 και p-LBP παρουσιάστηκαν από τους Sun et al., (2015) και τους Wei et al., (2016).

Η ανάλυση των πολυσακχαριτών της ποικιλίας *chinense* πραγματοποιήθηκε από το ερευνητή Qin και τους συνεργάτες του (Qin et al., 2000) και παρουσιάστηκαν δέκα κλάσματα πολυσακχαριτών σε 3 άρθρα από το 2000 έως το 2003. Για παράδειγμα η

Cp-1-C (AGPs) με μοριακό βάρος 4.2×10^4 Da αποτελείται από αραβινόζη και γαλακτόζη σε αναλογία 3:1 και που είναι συνδεδεμένα σε αυτά με Ο-γλυκοζιτικά με σερίνη και θρεονίνη. Ενώ η Cp-1-D (AGPs) με μοριακό βάρος 2.3×10^4 Da αποτελείται από αραβινόζη και γαλακτόζη σε αναλογία 1:1 και που είναι συνδεδεμένα σε αυτά με Ο-γλυκοζιτικά με σερίνη .

Από την άλλη η Cp-2-B (AGPs) με μοριακό βάρος 7.1×10^4 Da αποτελείται από αραβινόζη και γαλακτόζη σε αναλογία 1:1 και που είναι συνδεδεμένα σε αυτά με Ο-γλυκοζιτικά με σερίνη .

Τέλος η Hp-2-C (AGPs) με μοριακό βάρος 1.2×10^5 Da αποτελείται από αραβινόζη και γαλακτόζη σε αναλογία 1:1 και που είναι συνδεδεμένα σε αυτά με Ο-γλυκοζιτικά με σερίνη και θρεονίνη.

Πίνακας 2: Πολυσακχαρίτες στους καρπούς *L. barbarum* και *L. chinense*, όπως έχουν καταγραφεί από τη βιβλιογραφική έρευνα.

A/A	Ονομασία Πολυσακχαρίτη	Ποικιλία καρπού	Αναλογική σύνθεση μονοσακχαριτών	Βιβλιογραφική Πηγή
1	LbGp1	<i>L. barbarum</i>	Ara:Gal = 5.6:1.0	<i>Wang et al., 2014; Peng et al., 2001a.</i>
2	LbGp2	<i>L. barbarum</i>	Ara:Gal = 3:4	<i>Peng et al., 2001a.</i>
3	LbGp3	<i>L. barbarum</i>	Ara:Gal = 1:1	<i>Huang et al., 1999; Peng et al., 2001b.</i>
4	LbGp4	<i>L. barbarum</i>	Ara:Gal:Rha:Glc = 1.5:2.5:0.43:0.23	<i>Huang et al., 1998; Peng et al., 2001b.</i>
5	LbGp5	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Xyl:Gal:Man:Glc = 0.33:0.52:0.42:0.94:0.85:1	<i>Huang et al., 1998.</i>
6	LbGp5B	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Glc:Gal = 0.1:1:1.2:0.3	<i>Peng et al., 2001a.</i>
7	LBPC2	<i>L. barbarum</i>	Xyl:Rha:Man = 8.8:2.3:1	<i>Zhao et al., 1997.</i>
8	LBPC4	<i>L. barbarum</i>	Glc	<i>Zhao et al., 1997.</i>
9	LBPA1	<i>L. barbarum</i>	Heteroglycan	<i>Zhao et al., 1997.</i>
10	LBPA3	<i>L. barbarum</i>	Heteroglycan	<i>Zhao et al., 1997.</i>
11	LBP1a-1	<i>L. barbarum</i>	Glc	<i>Duan et al., 2001.</i>
12	LBP1a-2	<i>L. barbarum</i>	Glc	<i>Duan et al., 2001.</i>
13	LBP3a-1	<i>L. barbarum</i>	GalA	<i>Duan et al., 2001.</i>

14	LBP3a-2	<i>L. barbarum</i>	GalA	<i>Duan et al., 2001.</i>
15	LBPF1	<i>L. barbarum</i>	-	<i>Chen et al., 2008 .</i>
16	LBPF2	<i>L. barbarum</i>	-	<i>Chen et al., 2008 .</i>
17	LBPF3	<i>L. barbarum</i>	-	<i>Chen et al., 2008 .</i>
18	LBPF4	<i>L. barbarum</i>	-	<i>Chen et al., 2008 .</i>
19	LBPF5	<i>L. barbarum</i>	Ara, Man, Xyl, Glu, Rha	<i>Chen et al., 2008;Ke et al., 2011.</i>
20	LBPF6	<i>L. barbarum</i>	-	<i>Ke et al., 2011.</i>
21	LPBC4	<i>L. barbarum</i>	Glc	<i>Zhao et al., 1996;</i>
22	LBP-1	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Xyl:Gal:Man:GalA= 1:7.85:0.37:0.65:3.01:8.16]	<i>Zou et al., 2010</i>
23	WSP1	<i>L. barbarum</i>	Rha:Fuc:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 1.6:0.2:51.4:4.8:1.2:25.9:7.3	<i>Redgwell et al., 2011</i>
24	WSP2	<i>L. barbarum</i>	Rha:Fuc:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 1.4:0.1:12.3:1.8:0.2:6.3:1.5	<i>Redgwell et al., 2011</i>
25	CWM	<i>L. barbarum</i>	Rha:Fuc:Ara:Xyl:Man:Gal:Glc = 11.6:1:115.6:67.7:17.1:35.8:64.5	<i>Redgwell et al., 2011</i>
26	AGP	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Xyl:Gal:Glc:GalA:Gl cA= 3.3:42.9:0.3:44.3:2.4:7.0	<i>Redgwell et al., 2011.</i>
27	LBP-IV	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Xyl:Glc:Gal= 1.61:3.82:3.44:7.54:1.00	<i>Liu et al., 2012.</i>
28	LbGp1	<i>L. barbarum</i>	Ara:Gal = 5.6:1	<i>Sun et al., 2015</i>
29	LBP-s-1	<i>L. barbarum</i>	Rha:Ara:Xyl:Man:Glu:Gal:Gal A = 1.00:8.34:1.25:1.26:1.91:7.05: 15.28	<i>Zhu et al., 2013.</i>
30	p-LBP	<i>L. barbarum</i>	Fuc:Rha:Ara:Gal:Glc:Xyl:Gal A:Glc A = 1.00:6.44:54.84:22.98:4.05:2.9 5:136.98:3.35	<i>Wei et al., 2016.</i>
1	Cp-2-A	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal:Man:Rha:Glu= 6.02:2.71:1.00:0.70:0.67	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>
2	Cp-2-B	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 1:0.96	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>

3	Hp-2-A	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 5.2:1	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>
4	Hp-2-B	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 7.9:1	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>
5	Hp-0-C	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 1.2:1	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>
6	Hp-0-A	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 14:1	<i>Qin et al., 2001; Qin, 2003.</i>
7	Cp-1- A	<i>L. chinense</i>	Ara:Xyl = 1:1	<i>Qin et al., 2000.</i>
8	Cp-1-B	<i>L. chinense</i>	Ara	<i>Qin et al., 2000.</i>
9	Cp-1-C	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 3:1	<i>Qin et al., 2000.</i>
10	Cp-1-D	<i>L. chinense</i>	Ara:Gal = 3:1	<i>Qin et al., 2000.</i>

1.2.2. Πολυφαινόλες.

Οι πολυφαινόλες αποτελούν μία πολυσύνθετη ομάδα με περισσότερες από 8000 γνωστές ενώσεις (μέχρι σήμερα), που απαντώνται στην καθημερινή διατροφή του ανθρώπου. Οι ενώσεις αυτές τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολύ δημοφιλής λόγω των βιολογικών ιδιοτήτων που τους αποδίδονται (*Manach et al., 2004; Crozier et al., 2006; Dew et al., 2005*).

Πρόκειται για φυτικής προέλευσης ενώσεις οι οποίες προκύπτουν κατά τον φυτικό μεταβολισμό και ειδικότερα μετά από την έκθεση σε στρεσογόνες κλιματικές συνθήκες καθώς επίσης και σε παθογόνους μικροοργανισμούς. (*Manach et al., 2004; Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006*).

1.2.2.1 Πηγές προέλευσης και ταξινόμηση των πολυφαινολών

Η βιοσύνθεση των πολυφαινολών έχει αποδειχθεί ότι πραγματοποιείται μέσω των βιοσυνθετικών μονοπατιών, του οξικού και του σικιμικού οξέος (*Harborne, 1989*).

Στον ορισμό «πολυφαινόλη» περιλαμβάνεται ένα μεγάλο φάσμα σύνθετων ουσιών με φυτική προέλευση που φέρει έναν τουλάχιστον βενζοϊκό δακτύλιο καθώς και μία τουλάχιστον υδροξυλική ομάδα ενωμένη σε άνθρακα του κυκλικού μορίου της.

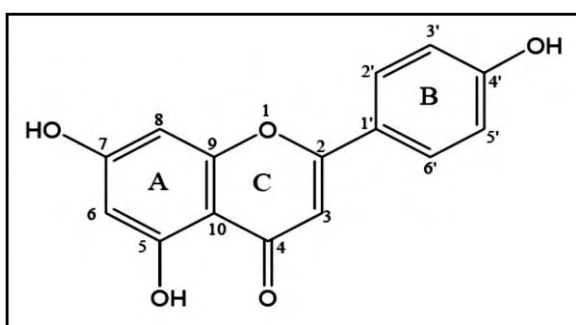
Η συνήθης μορφή τους με τη οποία απαντώνται στη φύση είναι η γλυκοζιτική και η διαλυτότητά τους ποικίλει (*Vermeris & Nicholson, 2006*).

Η κύρια ταξινόμηση των πολυφαινολών η οποία και πραγματοποιείται βάση του αριθμού των βενζοϊκών δακτυλίων αλλά και των στοιχείων που συνδέουν τους δακτυλίους αυτού είναι σε φλαβονοειδή και μη φλαβονοειδή τα οποία και

διακρίνονται σε φαινολικά οξέα, λιγνάνια και στυλβένια (Vermeris & Nicholson, 2006; Crozier et al., 2006).

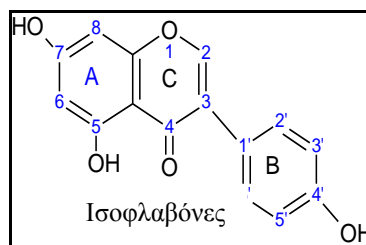
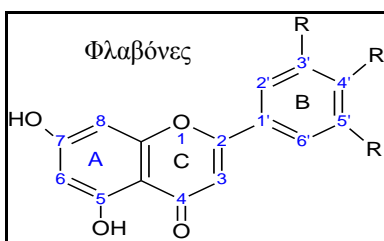
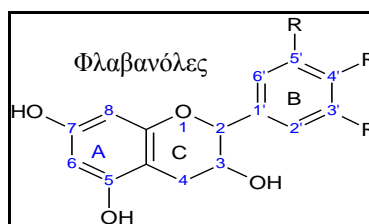
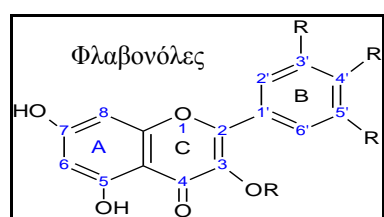
1.2.2.2 Φλαβονοειδή.

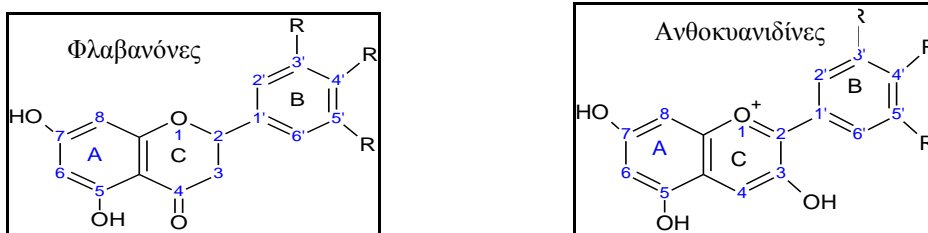
Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών στις περιλαμβάνονται πάνω από 5000 ενώσεις (Harborne, 2000) και διακρίνονται με βάση το χαρακτηριστικό των δύο βενζοϊκών δακτυλίων (A και B), που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο (C6-C3-C6) (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Γενική χημική δομή φλαβονοειδούς.

Τα φλαβονοειδή διακρίνονται σε φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόλες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, και οι ανθοκυανιδίνες (Εικόνα 9).





Εικόνα 9: Χημικές δομές Φλαβονοειδών (R: -OH ή -H).

1.2.2.2.1. Φλαβονόλες.

Οι φλαβονόλες είναι τα πιο διαδεδομένα φλαβονοειδή καθώς και αυτά που απαντώνται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση στα τρόφιμα. Οι πιο χαρακτηριστικές φλαβονόλες είναι η κουερσετίνη, η καμφερόλη και η μυρικετίνη. Η συνήθης μορφή τους είναι η γλυκοσυλιωμένη και απαντούν ως O-γλυκοσίδια, τα οποία συνήθως είναι συνδεδεμένα με την υδροξυλική ομάδα στη θέση 3 της γέφυρας του πυρανικού δακτυλίου C. Ωστόσο τα σάκχαρα μπορεί να είναι συνδεδεμένα στις υδροξυλικές ομάδες στις θέσεις 5, 7, 4', 3' και 5' στον βασικό ανθρακικό σκελετό (Εικόνα 9) (Crozier *et al.*, 2006). Συσσωρεύονται κυρίως στους εξωτερικούς φυτικούς ιστούς (επιδερμίδα και φύλλα), γιατί η βιοσύνθεσή τους επάγεται από το φως. Βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα βατόμουρα, τα μπρόκολα, στο κρασί, τα κρεμμύδια, τα πράσα, και το τσάι (Manach *et al.*, 2004). Χαρακτηριστικές πολυφαινόλες που ανήκουν στην κατηγορία αυτή και βρίσκονται και σε γλυκοζυλιωμένες μορφές στα goji berry είναι η κουερσετίνη, η καμφερόλη και η μυρισετίνη.

1.2.2.2.2 Φλαβανόλες.

Οι φλαβανόλες μαζί με τις φλαβάνες αποτελούν την κατάταξη των φλαβονοειδών όταν ο ετεροκυκλικός βενζοϊκός δακτύλιος είναι κορεσμένος. Είναι η πιο πολύπλοκη κατηγορία και διακρίνονται περαιτέρω ανάλογα με το μοριακό τους βάρος σε ολιγομερή στα οποία ανήκουν η κατεχίνη και η επικατεχίνη) και σε πολυμερή που ονομάζονται επίσης προανθοκυανιδίνες (Crozier *et al.*, 2006). Τα μονομερή σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή δεν υπάρχουν ως γλυκοσυλιωμένες μορφές (Manach *et al.*, 2004). Οι προανθοκυανιδίνες που ονομάζονται επίσης και συμπυκνωμένες ταννίνες είναι μια ετερογενής ως προς την χημική τους δομή και το μοριακό τους βάρος ομάδα ενώσεων και αποτελείται από διμερή, ολιγομερή, πολυμερή μιας φλαβαν-3-όλης. Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η κατεχίνη, η επικατεχίνη, η επιγαλλοκατεχίνη, επιγαλλοκατεχίνη του γαλλικού

εστέρα και η επικατεχίνη του γαλλικού εστέρα που βρίσκονται σε φρούτα και λαχανικά καθώς και σε σοκολάτα τσάι και κρασί.

1.2.2.2.3 Φλαβόνες.

Η χημική δομή των φλαβονών είναι παρόμοια των φλαβονολών αλλά διαφέρουν στην απουσία υδροξυλικής ομάδας στον C3 του βασικού ανθρακικού σκελετού της δομής των φλαβονοειδών (Εικόνα 9). Οι κυριότερες φλαβόνες που είναι γλυκοζίδια της λουτεολίνης, της χρυσίνης και της απιγενίνης και βρίσκονται σε φρούτα, λαχανικά, σιτηρά και βότανα. Οι υδροξυλομάδες των φλαβονών μπορούν να μεθυλιωθούν ή να αλκυλιωθούν εκτός από τη σύνδεσή τους με σάκχαρα (Crozier et al., 2006). Οι πολυμεθοξυλιωμένες μορφές των φλαβονών είναι από τα πιο υδρόφοβα φλαβονοειδή (Manach et al., 2004).

1.2.2.2.4 Φλαβανόνες.

Οι φλαβανόνες χαρακτηρίζονται από την μη ύπαρξη διπλού δεσμού ανάμεσα στους C2-C3 στη γέφυρα του πυρανικού δακτυλίου (Εικόνα 9). Στη φύση βρίσκονται συνήθως γλυκοζυλιωμένες με ένα δισακχαρίδιο στη θέση 7. Οι φλαβανόνες βρίσκονται κυρίως στα εσπεριδοειδή με χαρακτηριστικούς αντιπροσώπους την ναριγκίνη, την εσπεριδίνη και την ναρινεγκίνη (Rangel-Huerta et al., 2015).

1.2.2.2.5 Ισοφλαβόνες.

Στις ισοφλαβόνες, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα φλαβονοειδή στην χημική τους δομή ο δεύτερος αρωματικός δακτύλιος (B-δακτύλιος) είναι συνδεδεμένος με τον C3 παρά στον C2 του βασικού ανθρακικού σκελετού (Εικόνα 9) (Crozier et al., 2006). Η αποκλειστική πηγή προέλευσής τους είναι τα ψυχανθή με κύριους εκπροσώπους τις ντετζεΐνης και γενιστεΐνης που βρίσκονται στη σόγια. Οι ισοφλαβόνες έχουν χαρακτηριστεί ως φυτοοιστρογόνα καθώς εμφανίζουν ψευδο-ορμονικές ιδιότητες (Manach et al., 2004).

1.2.2.2.6 Ανθοκυανιδίνες.

Οι ανθοκυανιδίνες είναι η μη γλυκοζυλιωμένη μορφή των ανθοκυανινών. Η πιο συνηθισμένη ανθοκυανιδίνη είναι η κυανιδίνη. Οι ανθοκυανιδίνες είναι χρωμοφόρα φλαβονοειδή των φυτών και βρίσκονται σε διάφορες χημικές μορφές έγχρωμες (σκούρες, μπλέ, μωβ, κόκκινες) ανάλογα με το pH και απαντώνται κυρίως στον φλοιό

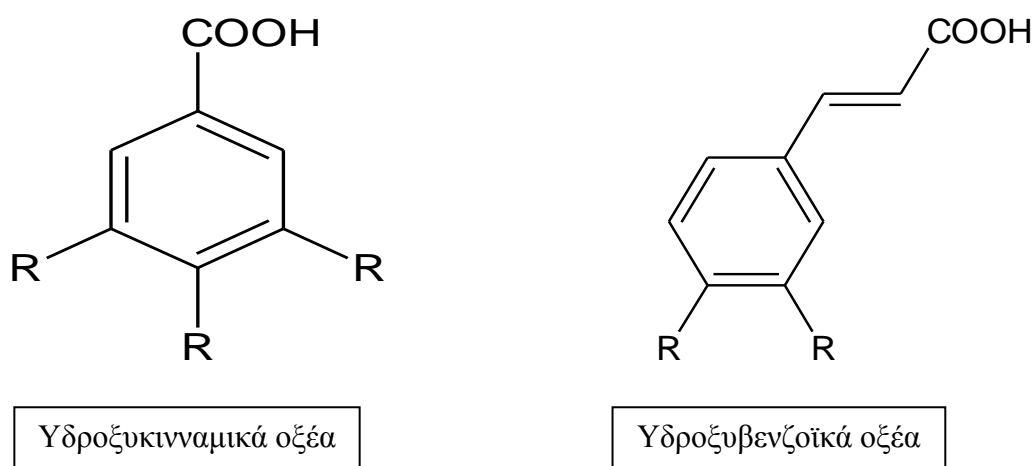
των καρπών. (Manach et al., 2004). Βρίσκονται συνήθως στη γλυκοζυλιωμένη τους μορφή, η οποία πραγματοποιείται στη θέση 3, με εστεροποίηση με φαινολικά οξέα και διάφορα οργανικά καθώς επίσης και μέσω σύνδεσης τους με άλλα φλαβονοειδή.

1.2.2.3. Μη φλαβονοειδή

1.2.2.3.1 Φαινολικά οξέα

Τα πολυφαινολικά οξέα αποτελούν τη δεύτερη μεγαλύτερη και πιο διαδεδομένη κατηγορία πολυφαινολών στα φυτά οι οποίες βρίσκονται ελεύθερες, με τη μορφή εστέρων αλλά και γλυκοζυλιωμένες. Τα φαινολικά οξέα έχουν απλούστερη δομή (όπως φαίνεται και στην Εικόνα 10) από τα φλαβονοειδή και χωρίζονται στα υδροξυβενζοϊκά (παράγωγα του βενζοϊκού οξέως) με σκελετό C6-C1 και στα υδροξυκινναμικά οξέα (παράγωγα του κινναμικού οξέως) με σκελετό C6-C3 (Πίνακας 3). Από τα πιο χαρακτηριστικά υδροξυβενζοϊκά οξέα είναι το γαλλικό (τριδροξυβενζοϊκό οξύ), το πρωτοκατεχοϊκό και το ελλαγικό οξύ, ενώ από τα υδροξυκινναμικά οξέα είναι το καφεϊκό και το φερουλικό οξύ (Crozier et al., 2006; Manach et al., 2004).

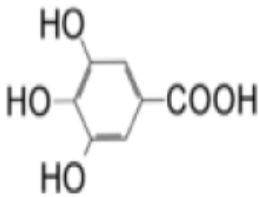
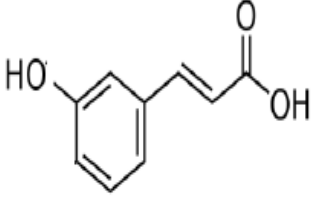
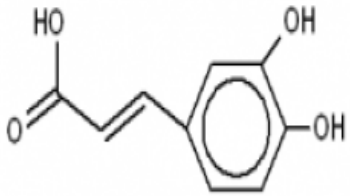
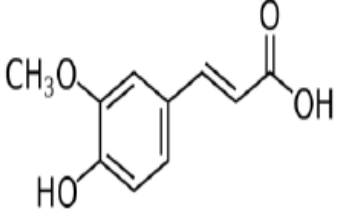
Τα παράγωγα του γαλλικού οξέως καθώς επίσης και του ελλαγικού οξέος (εξαϋδρόξυ διφαινικό οξύ) αποτελούν τις υδρολυόμενες ταννίνες. Οι πολυμερές αυτές ενώσεις περιέχουν στο μόριο τους ένα σάκχαρο (κυρίως γλυκόζη) καθώς και άφθονα μόρια υδροξυβενζοϊκών οξέων, κυρίως του γαλλικού οξέος. Οι υδρολυόμενες ταννίνες είναι μικρότερα μόρια σε σχέση με τις συμπυκνωμένες ταννίνες (προανθοκυανιδίνες) και σε συνθήκες χαμηλού pH διασπώνται εύκολα στο σάκχαρο και τα φαινολικά οξέα.



Εικόνα 10: Χαρακτηριστικές δομές φαινολικών οξέων.

Τα παράγωγα των υδροξυβενζοϊκών οξέων (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται στο τσάι, στις μπανάνες, τα berries, σε μικρές συγκεντρώσεις ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολυόμενες ταννίνες (Zamora-Ros et al., 2013)

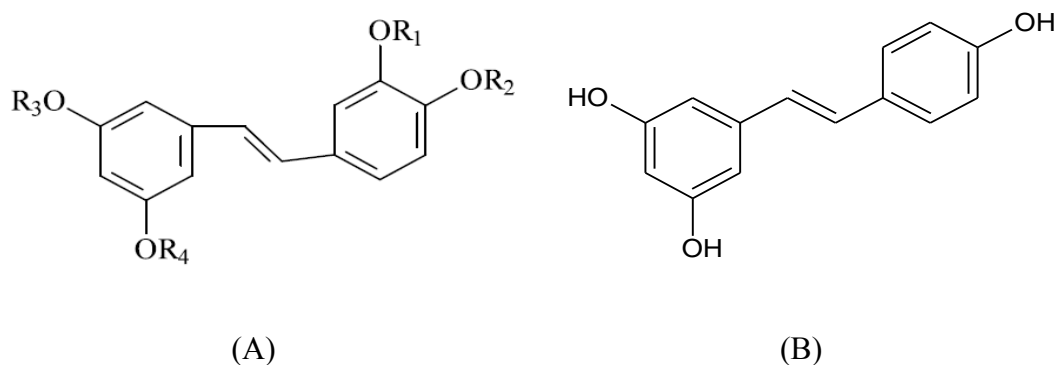
Πίνακας 3: Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων.

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
Γαλλικό Οξύ	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		C ₇ H ₆ O ₅
Κουμαρικό Οξύ	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		C ₉ H ₈ O ₃
Καφεϊκό οξύ	3 - (3,4-διυδροξυφαινυλο)-2-προπενοϊκό οξύ		C ₉ H ₈ O ₄
Φερουλικό οξύ	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ		C ₁₀ H ₁₀ O ₄

Από την άλλη τα παράγωγα των υδροξυκινναμικών οξέων(με κυριότερα μέλη τους το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα), βρίσκονται σε πολλά τρόφιμα σε υψηλές συγκεντρώσεις είτε ελεύθερα, είτε εστεροποιημένα με σάκχαρα (κύρια με τη γλυκόζη), οργανικά οξέα (όπως το τρυγικό με το κουνικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ) (Ludwig et al., 2014; Gazzani et al., 2012).

1.2.2.3.2. Στιλβένια

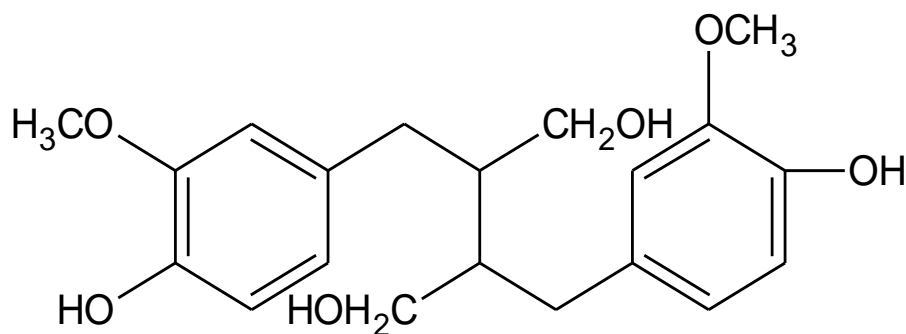
Τα στιλβένια αποτελούν ακόμη μια κατηγορία φαινολικών ενώσεων που ανήκουν στα μη φλαβονοειδή και περιέχονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα τρόφιμα. Τα στιλβένια ανήκουν στις φυτοαλεξίνες και είναι ενώσεις που τα φυτά παράγουν όταν βρεθούν σε καταστάσεις stress (περιβαλλοντικών συνθηκών (Schultz *et al.*, 1990). Η χημική δομή τους φέρει δύο αρωματικούς δακτυλίους οι οποίοι συνδέονται με μία γέφυρα μεθυλενίου. Το χαρακτηριστικότερο μέλος της ομάδας αυτής είναι η *trans*-ρεσβερατρόλη, που απαντάται κυρίως στον φλοιό των κόκκινων σταφυλιών και στο κρασί (Εικόνα 11).



Εικόνα 11 : Χημική δομή στιλβενίων (A) και δομή *trans*-ρεσβερατρόλης (B)

1.2.2.3.3. Λιγνάνες.

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες (Εικόνα 12) και αποτελούν ακόμη μια κατηγορία μη φλαβονοειδών πολυφαινολών η οποία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις στα τρόφιμα. Κύριοι εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη και η ματαιρεσινόλη. Στα φυτά βρίσκονται κυρίως στον λιναρόσπορο αλλά υπάρχουν και σε μικρότερες ποσότητες στις φακές στο σιτάρι, στο σκόρδο, τα σπαράγγια, τα καρότα, τα αχλάδια και τα δαμάσκηνα. (Manach *et al.*, 2004).



Εικόνα 12: Χημική δομή λιγνανίου (Σεκοΐσολαρισιρεσινόλη).

1.2.3. Οι πολυφαινόλες των goji berry

Από τη βιβλιογραφική διερεύνηση της πολυφαινολικής σύνθεσης των *L. barbarum* προκύπτει ότι διαθέτουν κυρίως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα (Πίνακας 7). Στη μελέτη των Wang et al., (2010) με τη χρήση διαλύτη αιθανόλης 80% για την εκχύλιση δείγματος *L. barbarum* σε μορφή σκόνης καταγράφηκαν 4 φαινολικά οξέα (Καφεϊκό, Κουμαρικό, Χλωρογενικό καθώς και Καφεοϋλκινικό) και 3 φλαβονοειδή (Διγλυκοζιτική κουερσετίνη, Ρουτίνη - quercetin-3-O-rutinoside και η Νικοτιφλορίνη). Για την απομόνωση των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών έγινε χρήση προπαρασκευαστικής χρωματογραφικής στήλης και για τον προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκε ανάλυση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Στην ίδια μελέτη καταγράφετε η αντιοξειδωτική ικανότητα του φλαβονοειδούς κλάσματος με τις μεθόδους DPPH, ABTS, μειούμενης δύναμης και χύλωσης ιόντων σιδήρου.

Σε μια άλλη έρευνα οι Mocan et al., (2014) διερεύνησαν το πολυφαινολικό προφίλ των φύλλων των φυτών *L. barbarum* & *L.chinense* Mill. με HPLC-UV-MS και βρήκαν ότι το ποσό των φλαβονοειδών στα φύλλα ήταν 43.73 ± 1.43 και 61.65 ± 0.95 mg g⁻¹ αντίστοιχα. Στη δεύτερη στήλη του πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας για την ποικιλία *L. Barbarum*.

Οι Donno et al., (2015) πραγματοποίησαν μία ανάλυση των απλών ενώσεων τριών δειγμάτων καρπών goji berry που προέρχονταν από φυτά της βόρειας Ιταλία μετά από διασταύρωση των ποικιλιών *L. barbarum* & *L.chinense*. Η ανάλυση τους πραγματοποιήθηκε με HPLC συνδυασμένο με UV-Vis ανιχνευτή συστοιχίας διόδων και έδειξε ότι ο μέσος όρος των τριών δειγμάτων σε σιναμινικά οξέα, βενζοϊκά οξέα, φλαβονόλες, κατεχίνες, οργανικά οξέα και βιταμίνη C ήταν 461.14, 15.31, 116.27, 347.94, 4461.02 και 48.94 mg 100g⁻¹ φρέσκου καρπού. Ενώ σε μελέτη των Zhang et al., (2016) οι οποίοι έλεγξαν 8 δείγματα κινέζικων γενοτύπων goji berry καταγράφηκε

ότι οι φρέσκοι καρποί που προέρχονταν από τους 4 γενοτύπους της περιοχής Ningxia είχαν υψηλότερο φαινολικό περιεχόμενο καθώς επίσης ότι η Quercetin-rhamno-dihexoside (435–1065 $\mu\text{g g}^{-1}$) και η quercetin-3-O-rutinoside (159–629 $\mu\text{g g}^{-1}$) βρέθηκαν σε μεγαλύτερο από την ομάδα των φλαβονοειδών ενώ το χλωρογενικό οξύ ήταν στο μεγαλύτερο ποσοστό από τα φαινολικά οξέα (113–526 $\mu\text{g g}^{-1}$). Στον πίνακα 7 παρουσιάζετε το ποσοστό ενός (Ningji No.1) εκ των τεσσάρων δειγμάτων της περιοχής Ningxia.

Πίνακας 4: Φαινολικό προφίλ των goji berry (*Lycium barbarum*) βάση δημοσιευμένων ερευνών.

Πολυφαινόλη	mg g ⁻¹ ext. Wang et al. (2010)	μg g ⁻¹ pm Mocan et al (2014)	mg 100g ⁻¹ fw Donno et al. (2015)	μg g ⁻¹ fw Zhang et al (2016) Ningji No.1	μg g ⁻¹ dw (Brand 2) Protti et al. (2017)
Φλαβονοειδή					
Κουερσετίνη	N.E.	5.59	N.D.	89.6	1023
Παράγωγα της Κουερσετίνης					
Υπεροσίδη (3-O-galactoside of quercetin)	N.E.	N.E.	116,27	N.D.	N.E.
Ισοκουερσετίνη (3-O-glucoside of quercetin)	N.E.	<0.02	N.D.	N.D.	N.E.
Διγλυκοζιτική κουερσετίνη	66.00	N.E.	N.E.	N.D.	N.D.
Quercetin-rhamno-dihexoside	-	-	-	1024	-
Κουερσετρίνη (Quercetin 3-O-a-L-rhamnoside)	N.D.	13.00	N.D.	-	12.7
Ρουτίνη - quercetin-3-O-rutinoside	42.00	5646.66	N.D.	67.9 - 628.9	1283.5
Καμπφερόλη	N.E.	N.E.	N.E.	25.8	83.3
Παράγωγα της Καμπφερόλης					
Νικοτιφοροίνη(Kaempferol-3-O-rutinoside)	11.30	N.D.	N.E.	N.D.	83.3
Μυρισετίνη	N.E.	N.E.	N.E.	108.6	129.8
Απιγενίνη	N.E.	N.E.	N.E.	N.D.	521.2
Μυρισιτρίνη	N.E.	N.E.	N.E.	N.D.	10.1
Κατεχίνη	N.E.	N.E.	118.76	N.D.	1294.4
Επικατεχίνη	N.E.	N.E.	229.18	N.D.	2003.5
Φαινολικά οξέα					
Υδροξυκινναμικά					
Καφεϊκό οξύ (3-(3,4διδροξυ-φαινύλ)-2-προπενικό οξύ)	3.73	<0.02	110.84	56.8	931,2
Φερουλικό οξύ (4-υδροξυ-3-μεθοξυ-κινναμικό οξύ)	N.E.	<0.02	125.80	152.2	978.4
Κουμαρικό οξύ (4-υδροξυφαινυλο)-2-ακρυλικό	6.06	30.29	111.32	176.4	943.9
Χλωρογενικό οξύ	12.4	5899.29	113.18	525.5	11039
Καφεοϋλκινικό οξύ (CQA)	0.34	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Υδροξυβενζοϊκά					
Ελλαγικό οξύ	N.E.	N.E.	N.D.	N.D.	14.5
Γαλλικό οξύ	N.E.	N.E.	15.31	N.D.	129.6
Βανιλικό οξύ	N.E.	N.E.	N.E.	17.8	15.8

ext – extract; pm – plant material; fw – fresh weight; d.w. – dry weight ; N.D.-not detected; N.E.– not evaluated

Τελευταία σε μία ακόμη πρόσφατη μελέτη των Protti et al., (2017) με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και φασματογραφίας μάζας πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων σε καρπούς goji berry μετά από διαδικασία εκχύλισης στερεής φάσης. Στη συγκεκριμένη έρευνα η κουερσετίνη και η ρουτίνη μαζί με τις φλαβανόλες κατεχίνη και επικατεχίνη βρέθηκαν να είναι τα κύρια φλαβονοειδή ενώ από τα φαινολικά οξέα το χλωρογενικό οξύ βρέθηκε σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (στον Πίνακα 4 & παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ενός (Brand 2) από τα 3 εκχυλίσματα που ελέχθησαν .

1.2.4 Λιπαρά οξέα

Τα λιπαρά οξέα παράγονται από την υδρόλυση (με χρήση λιπάσης) των τριγλυκεριδίων ή φωσφολιπιδίων με ταυτόχρονη παραγωγή ενέργειας και αποτελούν το 35-50% των ημερήσιων προσλαμβανόμενων θερμίδων. Πρόκειται για αλειφατικά μονοκαρβοξυλικά οξέα με αριθμό ατόμων C μεγαλύτερο του τρία. Οι ευεργετικές ιδιότητες των λιπαρών οξέων στο ανθρώπινο σώμα σχετίζονται με το γεγονός ότι εμπλέκονται σε σημαντικές διεργασίες του μεταβολισμού (π.χ. στην παραγωγή, αποθήκευση και τη μεταφορά της ενέργειας) αποτελώντας δομικά στοιχεία των φωσφολιπιδίων - γλυκολιπιδίων σε βιολογικές μεμβράνες , είναι πρόδρομα μόρια για την βιοσύνθεση των στεροειδών ορμονών και μεταφέρουν ενδοκυττάρια μηνύματα. (Calder & Burdge, 2004; Calder, 2006; Christie, 2003; Mattos et al., 2000).

1.2.4.1. Περιγραφή - Ονοματολογία Λιπαρών Οξέων

Παράγονται συνήθως από τριγλυκερίδια ή φωσφολιπίδια. Η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων που γίνεται από τις λιπάσες, έχει ως αποτέλεσμα την έκλυση ενέργειας και διακρίνονται ανάλογα των αριθμό ατόμων C που φέρουν στο μόριο τους σε μικρής αλύσου (Short chain (SCFA):2 έως 4 άτομα C), μεσαίας αλύσου (Medium chain (MCFA) :6 έως 12 άτομα C) και μακράς αλύσου (Long chain (LCFA) :14 έως 24 άτομα C).

Ο μεταβολισμός τους παράγει σημαντικές ποσότητες ATP (τριφωσφορικός νουκλεοζίτης) γεγονός που συνεισφέρει στην μεταφορά στο εσωτερικό των κυττάρων αναγκαίας για το μεταβολισμό χημικής ενέργειας. Για παράδειγμα ένα μόριο παλμιτικού οξέος μπορεί μετά από πλήρη οξειδωση να παρέχει 106 μόρια ATP. Κάποιοι κυτταρικοί ιστοί όπως των σκελετικών μυών, της καρδιάς , καθώς και του

εγκεφάλου προτιμούν ως πηγή ενέργειας τα λιπαρά οξέα από τη γλυκόζη (*Ebert et al., 2003*), (*Marin-Valencia et al., 2013*).

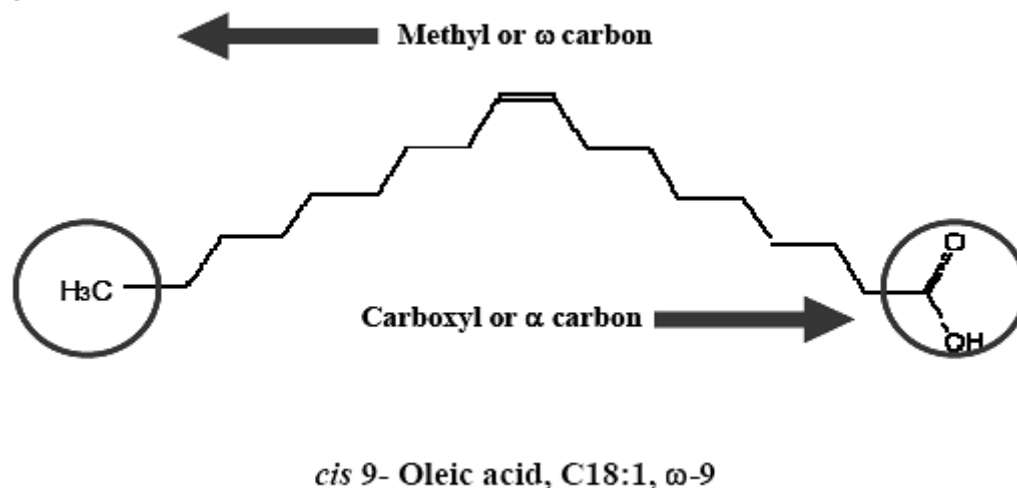
Τα μεσαία αλυσού λιπαρά οξέα οξειδώνονται ταχύτατα και χρησιμοποιούνται μόνο παρέχοντας την απαιτούμενη για τους κυτταρικούς ιστούς ενέργεια ενώ τα μακράς αλυσίδας λιπαρά οξέα παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον από ανοσολογική άποψη αν και τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί και ο βιολογικός ρόλος των SCFA (*Asarat et al., 2015*).

Ο διαχωρισμός των λιπαρών οξέων σε ακόρεστα (unsaturated) (χωρίς διπλό δεσμό) και κορεσμένα (saturated) έχει να κάνει με την ύπαρξη ή όχι διπλού δεσμού στο μόριο του ενώ η ύπαρξη πολλών διπλών δεσμών οδηγεί στο χαρακτηρισμό ως πολυακόρεστα (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFAs).

Τα γεγονότα της ύπαρξης άρτιου αριθμού ατόμων C στο μόριο τους είναι κυρίως λόγω του μηχανισμού της βιοσύνθεσης των μονάδων C₂ και υπάρχουν κυρίως με τη μορφή των εστέρων. Επίσης η δημιουργία, ο αριθμός καθώς και η θέση των διπλών δεσμών καθορίζονται από τα ένζυμα που καταλύουν τη βιοσύνθεση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.

Η θέση του διπλού δεσμού (στα πολυακόρεστα του πρώτου διπλού δεσμού) (*Εικόνα 13*) τα διαχωρίζει περαιτέρω σε

- Ωμέγα -3: Όταν βρίσκεται δίπλα στο τρίτο άτομο C.
- Ωμέγα -5: Όταν βρίσκεται δίπλα στο πέμπτο άτομο C.
- Ωμέγα -6: Όταν βρίσκεται δίπλα στο έκτο άτομο C.
- Ωμέγα -7: Όταν βρίσκεται δίπλα στο έβδομο άτομο C.
- Ωμέγα -9: Όταν βρίσκεται δίπλα στο ένατο άτομο C.



Εικόνα 13: Δομή και ονοματολογία λιπαρών οξέων.

Επιπρόσθετα, εκτός από την επίσημη συστηματική ονοματολογία τα λιπαρά οξέα αναφέρονται και με τα συνήθη ονόματα τους όπως αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.

Τα λιπαρά οξέα που βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι τα C16 και C18 (παλμιτικό, ελαϊκό, λινολεϊκό και στεαρικό οξύ). Οι ζωικοί οργανισμοί είναι σε θέση να εισάγουν διπλούς δεσμούς στα κορεσμένα λιπαρά οξέα και να τα μετατρέπουν σε μονοακόρεστα. Έτσι, μπορούν να μετατρέπουν το στεαρικό και το παλμιτικό οξύ σε ελαϊκό (18:1ω-9) και παλμιτελαϊκό (16:1ω-7) οξύ αντίστοιχα

Πίνακας 5: Ονοματολογία λιπαρών οξέων.

Κοινή	Συστηματική ονοματολογία	Σύντομη
Βουτυρικό οξύ	βουτανοϊκό οξύ	C4:0
Καπροϊκό οξύ	εξανοϊκό οξύ	C6:0
Καπρυλικό οξύ	οκτανοϊκό οξύ	C8:0
Μυριστικό οξύ	τέτραδεκανοϊκό οξύ	C14:0
Παλμιτικό οξύ	εξαδεκανοϊκό οξύ	C16:0
Στεαρικό οξύ	οκταδεκανοϊκό οξύ	C18:0
Μυριστολεϊκό οξύ	9-τετραδεκανοϊκό οξύ	C14:1 (ω-5)
Παλμιτολεϊκό οξύ	9-εξαδεκανοϊκό οξύ	C16:1 (ω-7)

Ολεϊκό οξύ	9-οκταδεκανοϊκό οξύ	C18:1 (ω-9)
Μυριστελαιϊδικό οξύ	<i>Trans</i> 9-τετραδεκανοϊκό οξύ	C14:1 (ω-5)
Παλμιτελαιϊδικό οξύ	<i>Trans</i> 9-εξαδεκανοϊκό οξύ	C16:1 (ω-7)
Ελαϊδικό οξύ	<i>Trans</i> 9-οκταδεκανοϊκό οξύ	C18:1 (ω-9)
Λινολεϊκό οξύ	9,12- οκταδεκαδιενοϊκό οξύ	C18:2 (ω-6)
Ρουμενικό οξύ	9, <i>trans</i> 11- οκταδεκαδιενοϊκό οξύ	C18:2 (ω-7)
α-Λινολενικό οξύ	9,12,15- οκταδεκατριενοϊκό οξύ	C18:3 (ω-3)
γ-Λινολενικό οξύ	6,9,12-οκταδεκατριενοϊκό οξύ	C18:3 (ω-6)
Αραχιδονικό οξύ	5,8,11,14- εικοσατετραενοϊκό οξύ	C20:4 (ω-6)
Εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA)	5,8,11,14,17-εικοσαπεντανοϊκό οξύ	C20:5 (ω-3)
Δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DPA)	7,10,13,16,19- δοκοσαπεντανοϊκό οξύ	C22:5 (ω-3)
Δοκοσαεξαενοϊκό οξύ (DHA)	4,7,10,13,16,19- δοκοσαεξαενοϊκό οξύ	C22:6 (ω-3)

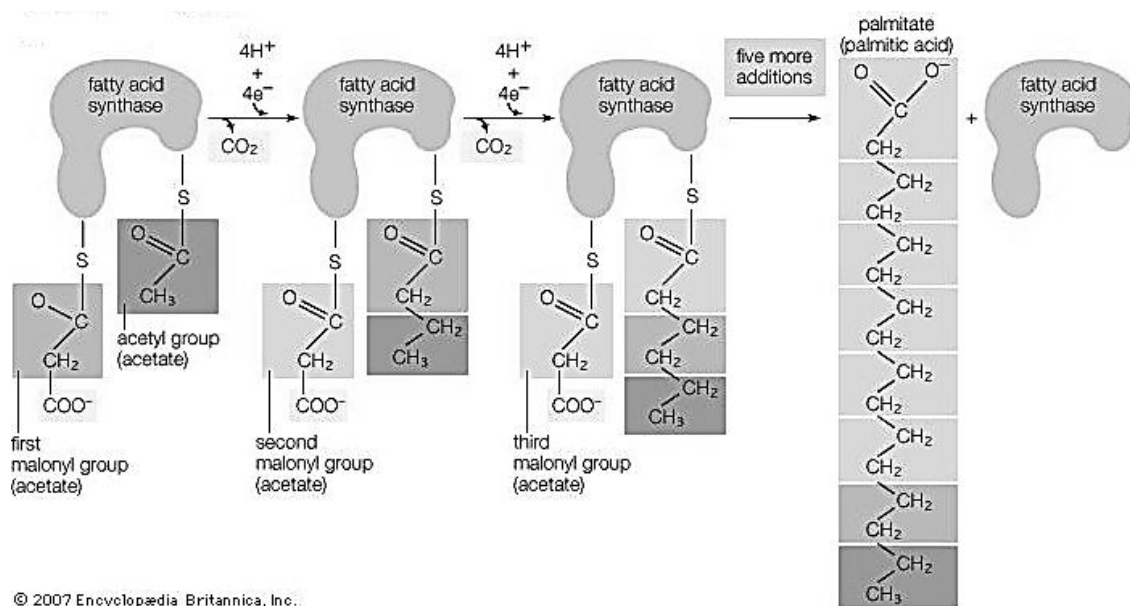
1.2.4.2. Βιοσύνθεση.

Τα λιπαρά οξέα βιοσυντίθενται στους ζωικούς οργανισμούς στο κυτταρόπλασμα, ενώ στους φυτικούς στους χλωροπλάστες των φύλλων ή στα προπλαστίδια των ριζών και των σπερμάτων. Η βιοσύνθεσή τους γίνεται από την περίσσεια ακετυλοσυνενζύμου Α, που προέρχεται από την αποδόμηση των υδατανθράκων.

1.2.4.3. Κορεσμένα Λιπαρά Οξέα.

Η σύνθεση των κορεσμένων λιπαρών πραγματοποιείται με την επαναλαμβανόμενη προσθήκη 2 ατόμων άνθρακα τα οποία προέρχονται από το ακετυλο-CoA γεγονός που εξηγεί την ύπαρξη άρτιου αριθμού ατόμων C στο μόριο τους.

Στην όλη διαδικασία σχηματισμού των κορεσμένων λιπαρών οξέων λαμβάνει μέρος ένα πολυενζυμικό σύμπλεγμα το οποίο ονομάζεται συνθάση των λιπαρών οξέων και σε όλη τη διάρκεια της βιοσύνθεσης η συνεχώς επιμηκνόμενη αλυσίδα του λιπαρού οξέως βρίσκεται συνδεδεμένη μια πρωτεΐνη (πρωτεϊνικός ακυλομεταφορέας, ACP). Έτσι η βιοσύνθεση του ξεκινά όπως φαίνεται και στην εικόνα 14 με την επιμήκυνση της αλυσίδας με δύο άτομα άνθρακα τα οποία παρέχονται από το μηλονυλο-ACP. Η αντίδραση για τη δημιουργία ενός νέου δεσμού άνθρακα-άνθρακα καταλύεται από ένα συμπυκνωτικό ένζυμο.



Εικόνα 14: Σύνθεση παλμιτικού οξέως.

Με τη διαδικασία αυτή δημιουργούνται τα λιπαρά οξέα μέχρι και 18 ανθράκων. Η δε σύνθεση λιπαρών οξέων με μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες πραγματοποιούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Όσο αυξάνει μεγαλώνει η ανθρακική αλυσίδα τόσο αυξάνεται και το σημείο τήξης αυτών όπως φαίνετε και στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Κορεσμένα λιπαρά οξέα.

ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ	ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΔΟΜΙΚΗ ΜΟΡΦΗ	C:D (Ανθρακες – Διπλός Δεσμός)	Σημείο Τήξης (°C)
Myristic Acid	Tetradecanoic Acid	$C_{14}H_{28}O_2$		Straight 14:0	52
Pentadecanoic Acid	Pentadecanoic Acid	$C_{15}H_{30}O_2$		Straight 15:0	54
Palmitic Acid	Hexadecanoic Acid	$C_{16}H_{32}O_2$		Straight 16:0	61
Margaric Acid	Heptadecanoic Acid	$C_{17}H_{34}O_2$		Straight 17:0	62
Stearic Acid	Octadecanoic Acid	$C_{18}H_{36}O_2$		Straight 18:0	70
Arachidic Acid	Eicosanoic Acid	$C_{20}H_{40}O_2$		Straight 20:0	75

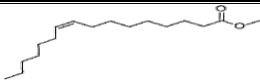
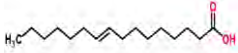

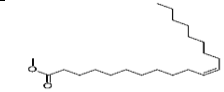
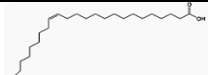
1.2.4.4. Ακόρεστα Λιπαρά Οξέα

Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι ευρύτατα διαδεδομένα στα τριγλυκερίδια των λιπαρών υλών των φυτών, των χερσαίων ζώων και των ψαριών. Τα δι- και τριενοϊκά οξέα απαντώνται κυρίως στις φυτικές λιπαρές ύλες (Μπόσκος, 1997). Η παραγωγή τους γίνεται από τα κορεσμένα λιπαρά οξέα παλμιτικό και στεατικό με την δημιουργία διπλού δεσμού C=C υπό την καταλυτική επίδραση των αποσατουρασών τα οποία είναι ένζυμα που αφαιρούν δύο άτομα υδρογόνου. Έτσι με τη δράση της Δ9-αποσατουράσης παράγεται το στεάρυλο-ACP το οποίο και μετατρέπεται σε ελαύλο-ACP που υδρολύεται σε ελαϊκό οξύ. Το δε ελαϊκό οξύ με τη δράση της Δ15-αποσατουράσης, μπορεί στη συνέχεια να μετατραπεί σε λινολενικό οξύ, που είναι το πιο άφθονο ακόρεστο λιπαρό οξύ ενώ με τη δράση της Δ12-αποσατουράσης καταλύεται η παραγωγή του λινελαϊκού οξέως. Τα ένζυμα αυτά δρουν υπό αερόβιες συνθήκες στα φυτά ενώ αντίθετα σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως η *E.coli* δρουν αναερόβιος.

Σε αντίθεση με τα φυτά ο άνθρωπος καθώς και όλα τα θηλαστικά μη διαθέτοντας τα ένζυμα δεν είναι σε θέση να βιοσυνθέσει τα λιπαρά οξέα α-λινολενικό(ωμέγα 3) καθώς και λινολεϊκό (ωμέγα 6), και έτσι τα αποκτά μόνο μέσω της τροφής και για το λόγο χαρακτηρίζονται “απαραίτητα” λιπαρά οξέα (Essential Fatty Acids, EFA). Έχει όμως την ικανότητα να τα μεταβολίζει με διαδικασίες αποκορεσμού (προσθέτοντας διπλούς δεσμούς) και επιμήκυνσης (μεγαλώνοντας την ανθρακική αλυσίδα). Η όλη αντίδραση της επιμήκυνσης καταλύεται από τα ένζυμα επιμηκυνάσες, τα οποία προσθέτουν δύο άτομα άνθρακα από το μηλονυλο-CoA στην αρχικό μόριο. Οι επιμηκυνάσες των λιπαρών οξέων βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ενώ η επιμήκυνση των λιπαρών οξέων γίνεται στο ενδοπλασματικό δίκτυο.






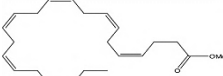
Έτσι για παράδειγμα μπορεί να μετατρέπει το λινολεϊκό οξύ (ω-3) σε αραχιδονικό οξύ το οποίο είναι και το πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση εικοσανοειδών, ενώσεων δηλαδή με είκοσι άτομα άνθρακα (Εικόνα 15). Τα εικοσανοειδή περιλαμβάνουν τρεις ομάδες δομικά συγγενών ενώσεων: τις προσταγλανδίνες, τα λευκοτριένια και τις θρομβοξάνες.

Πίνακας 7: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα.

ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ	ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΔΟΜΙΚΗ ΜΟΡΦΗ	C:D (Ανθρακες – Διπλός Δεσμός)	Σημείο Τήξης (°C)
Palmitoleic Acid	cis-9- Hexadecenoic Acid	$C_{16}H_{30}O_2$		C16:1	-0.5 έως +0.5
Palmitelaidic Acid	trans - 9- Hexadecenoic Acid	$C_{16}H_{30}O_2$		C16:1	0.5
Oleic Acid	cis - 9 - Octadecenoic Acid	$C_{18}H_{34}O_2$		C18:1	13.4
Gondoic Acid	cis-11-Eicosenoic Acid	$C_{20}H_{38}O_2$		C20:1	24
Nervonic Acid	cis- 15- Tetracosenoic Acid	$C_{24}H_{46}O_2$		C24:1	43

Ανάλογη με τον αριθμό των ακόρεστων διπλών δεσμών και τη θέση στο μόριο τους είναι και η δραστηκότητά τους. Έτσι χαρακτηρίζονται ως μονοακόρεστα με την ύπαρξη ενός διπλού δεσμού (Mono-Unsaturated Fatty Acids, MUFA, Πίνακας 7) και ως πολυακόρεστα με την ύπαρξη περισσοτέρων από ένα διπλών δεσμών (Poly Unsaturated Fatty Acids, PUFA, Πίνακας 8). Όταν στα πολυακόρεστα υπάρχει μεταξύ των δύο διπλών δεσμών μια μεθυλενική ομάδα τότε αυξάνετε η δραστηκότητα του λιπαρού οξέως.

Πίνακας 8: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

ΚΟΙΝΟ ΟΝΟΜΑ	ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ	ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ	ΔΟΜΙΚΗ ΜΟΡΦΗ	C:D (Ανθρακες – Διπλός Δεσμός)	Σημείο Τήξης (°C)
Linoelaidic Acid (ω -6)	trans-9-12 Octadecadienoic Acid	$C_{18}H_{32}O_2$		C18:2t	-5
Linoleic Acid (ω -6)	cis-9-12 Octadecadienoic Acid	$C_{18}H_{32}O_2$		C18:2	-11
Arachidonic Acid (ω -6)	cis-5-8-11-14 Eicosatetraenoic Acid	$C_{20}H_{32}O_2$		C20:4	-49
α -Linolenic Acid (ω -3)	cis-9-12-15 Octadecatrienoic Acid	$C_{18}H_{30}O_2$		C18:3	-11
Timnodonic Acid (ω -3)	cis 5-8-11-14-17 Eicosapentaenoic Acid	$C_{20}H_{30}O_2$		C20:5	-54
Cervonic Acid (ω -3)	cis 4-7-10-13-16-19 Docosahexaenoic Acid	$C_{22}H_{32}O_2$		C22:6	-44

Τα πολυακόρεστα λόγω των διπλών δεσμών μπορεί να βρίσκονται σε μη συζυγή (που είναι και η πιο συνηθισμένη) και σε συζυγή μορφή στην οποία οι διπλοί δεσμοί εναλλάσσονται από έναν απλό δεσμό.

1.2.4.5. Τα λιπαρά οξέα των goji berry

Από τη βιβλιογραφική έρευνα καταγράφηκε ένας μικρός (κάτω από 10) αριθμός ερευνών που ασχολήθηκαν με το προφίλ των λιπαρών οξέων σε σχέση με τον αριθμό των ερευνών που συνολικά έχουν καταγραφεί για τα goji berry. Στον πίνακα 9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα πέντε εξ' αυτών των ερευνών.

Από τα αποτελέσματα και των πέντε ερευνών επιβεβαιώνετε το γεγονός ότι το λινολεϊκό οξύ είναι το πιο διαδεδομένο στη φύση όπως ήδη προαναφέρθηκε αφού και στις πέντε ήταν το αυτό με το μεγαλύτερο ποσοστό ακολουθούμενο από τα ελαϊκό οξύ.

Το δεύτερο σε ποσοστό συγκέντρωσης λιπαρό που καταγράφουν και οι πέντε έρευνες είναι το ολεϊκό οξύ ακολουθούμενο από το παλμιτικό, το α-λινολενικό, το στεαρικό και το αραχιδικό.

Στην έρευνα των λιπαρών οξέων σε έλαιο που προήλθε από τους σπόρους του καρπού *L. barbarum* καταγράφηκαν επίσης σε πολύ μικρό ποσοστό συγκέντρωσης και λιπαρά οξέα μεσαίας αλύσου καθώς και το μπεχενικό οξύ (*Li et al., 2011*).

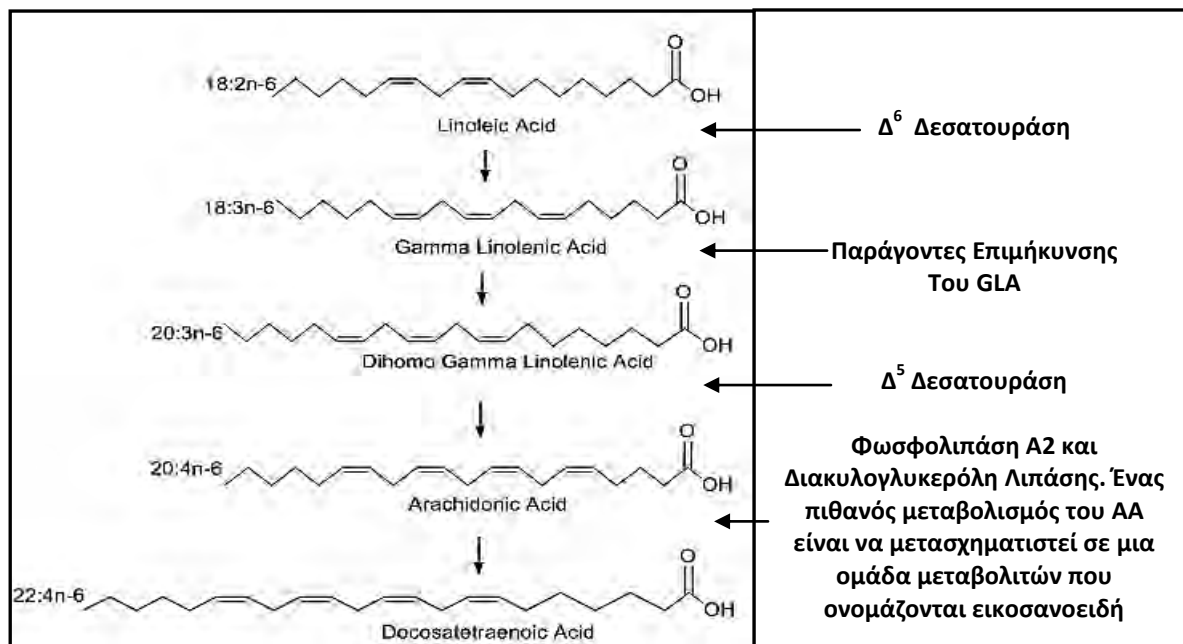
Πίνακας 9: Προφίλ λιπαρών οξέων στα goji berry (*Lycium barbarum*) με βάση τη βιβλιογραφική έρευνα.

	Fatty acids (%)	Cossignani et al.2017	Blasi et al. 2016	Endez et al. 2015	Yan et al. 2014	Li et al. 2011
		Italian sample	G4 sample	fruit	Fruit	Fruit seed oil with ethanol
Caproic acid	C6	-	-	-	-	0.02
Enanthic acid	C7	-	-	-	-	0.03
Pelargonic acid	C9	-	-	-	-	0.10
Capric acid	C10	-	-	-	-	0.03
Undecylic acid	C11	-	-	-	-	0.20
Lauric acid	C12	-	-	-	-	0.02
Myristic acid	C14:0	-	0.3	0.11	-	0.12
	C14:1 n-7	-	0.1	-	-	-
Palmitic acid	C16:0	14.6	15.7	8.23	7.22	10.37
Palmitoleic acid	C16:1 n-9	0.6	0.2	-	-	-
Palmitoleic acid	C16:1 n-7	-	0.7	-	-	-
Margaric acid	C17:0	-	0.2	-	-	0.15
Margaroleic acid	C17:1 n=8	-	0.2	-	-	-
Stearic acid	C18:0	2.9	3.0	2.91	3.21	6.5
Oleic acid	C18:1 n-9	-	20.5	21.69	17.13	16.53
Vaccenic acid	C18:1 n-7	31.7	1.3	-	-	-
Linoleic acid	C18:2 n-6	40.5	46.6	60.67	66.81	61.78
	C18:3 n-6	0.6	1.6	-	-	-
α -Linolenic acid	C18:3 n-3	7.3	6.6	1.11	3.35	1.31
Arachidic acid	C20:0	0.5	0.6	1.83	1.33	0.81
Gondoic acid	C20:1 n-11	-	0.1	-	-	0.12
Arachidonic acid	C20:4 n-6	-	-	-	-	-
Timnodonic acid	C20:5 n-3	-	-	-	-	-
Behenic acid	C22	0.4	1.4	-	-	0.54
Lignoceric acid	C24	0.5	0.8	-	-	-

Παρακάτω παρουσιάζονται λιπαρά οξέα των goji berry καθώς και οι βιολογικές τους ιδιότητες.

Λινολεϊκό οξύ (cis-9-cis-12 δεκαοκτανοδιενοϊκό οξύ - LA)

Είναι πολυακόρεστο ωμέγα-6 λιπαρό οξύ, με μοριακό τύπο $C_{18}H_{32}O_2$ το οποίο είναι άχρωμο υγρό σε φυσιολογικές συνθήκες. Πρόκειται για ένα απαραίτητο λιπαρό οξύ που σημαίνει ότι το ανθρώπινο σώμα δεν μπορεί να το βιοσυνθέσει (Robert et al., 1980) οποίο φέρει αλυσίδα με 18 άνθρακες και δύο -cis διπλούς δεσμούς, με τον πρώτο διπλό δεσμό να βρίσκεται στο έκτο άνθρακα από το μεθυλικό άκρο. Αποτελεί το πρόδρομο λιπαρό οξύ για τη βιοσύνθεση του αραχιδονικού οξέος και κατ' επέκταση στην βιοσύνθεση των προσταγλανδινών, λευκοτριενίων και θρομβοξανών (Εικόνες 15,16). Αποτελεί σε ποσοστό άνω του 50% το κυρίαρχο λιπαρό οξύ στα περισσότερα φυτικά έλαια (ηλιέλαιου, αραβοσιτελαίου, καρδάμου, σπόρων παπαρούνας, και των ελαίων της σόγιας (USDA National Nutrient Database, 2007). Η ανεπαρκής κατανάλωση του στη διατροφή του ανθρώπου προκαλεί σύμφωνα με έρευνες τριχόπτωση και δερματικά προβλήματα, (Cunnane and Anderson, 1997) και χαμηλή ικανότητα επούλωσης τραύματος σε αρουραίους (Ruthig and Meckling-Gill, 1999).

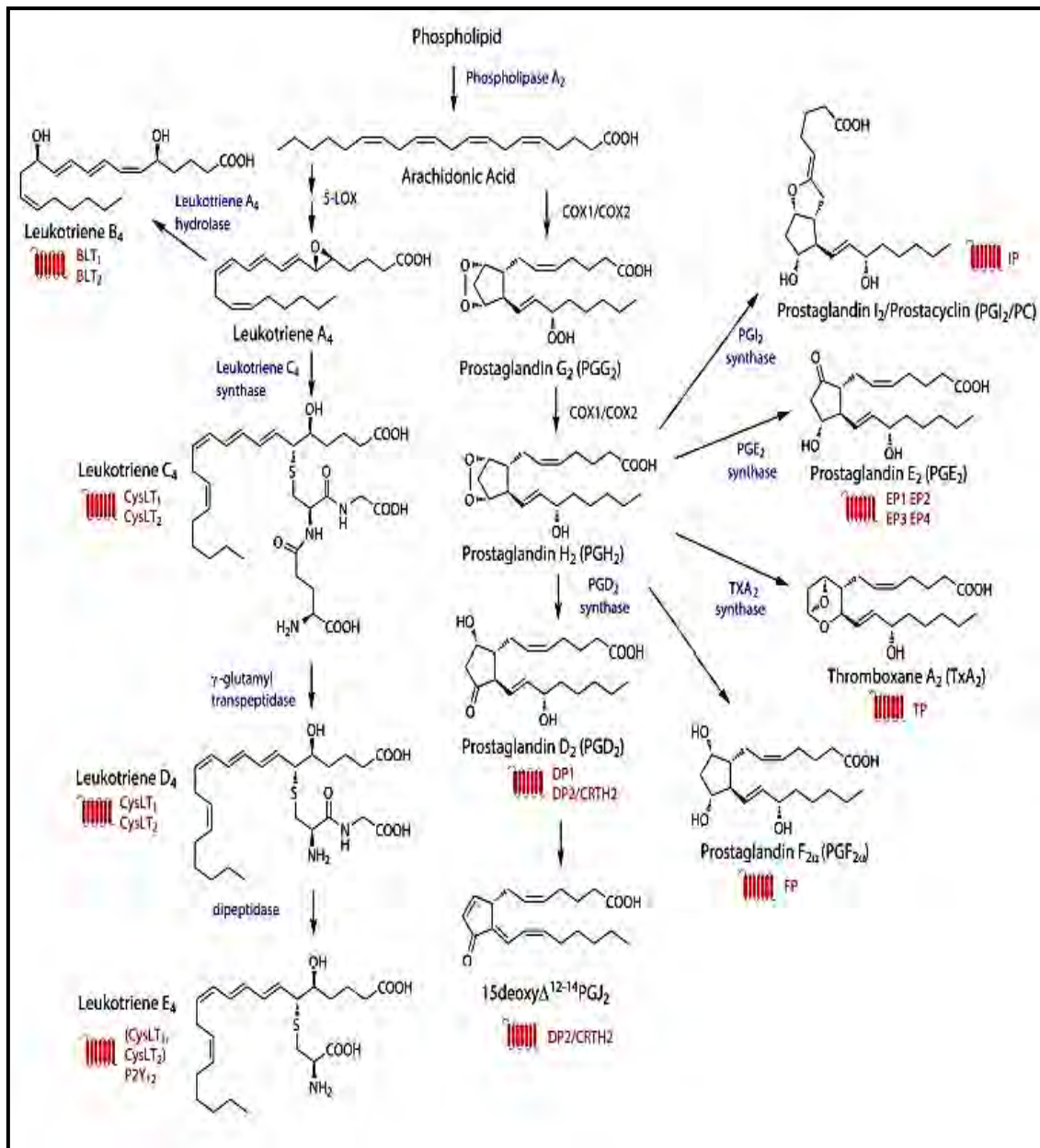


Εικόνα 15: Μεταβολισμός του λινολεϊκού οξέως.

Αραχιδονικό Οξύ (cis 5,8,11,14 - Εικοσατετραενοϊκό οξύ - AA),

Πρόκειται για ένα πολυακόρεστο ω-6 λιπαρό οξύ με μοριακό τύπο C₂₀H₃₂O₂ και το οποίο φέρει 4 cis διπλούς δεσμούς, με τον πρώτο διπλό δεσμό να βρίσκεται στο έκτο άνθρακα από το μεθυλικό άκρο και βιοσυντίθεται από το λινολεϊκό οξύ. Το αραχιδονικό βρίσκεται στα φωσφολιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών και περισσότερο στα εγκεφαλικά, μυϊκά και ηπατικά κύτταρα. Ειδικότερα στους σκελετικούς μυϊκούς ιστούς το ποσοστό του φθάνει περίπου το 10-20% κατά μέσο όρο. (Smith et al., 2011). Σύμφωνα με έρευνες το αραχιδονικό αποτελεί ενδιάμεσο της φλεγμονώδους αντίδρασης και έχει την ικανότητα να δρα ως αγγειοδιασταλτικό (Baynes and Marek, 2005). Αν και δεν είναι ένα από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα ωστόσο, αν υπάρχει έλλειψη σε λινολεϊκό οξύ ή πρόβλημα μετατροπής από το λινολεϊκό οξύ τότε αυτό αυτό μπορεί να καταστεί απαραίτητο. (Rivers et al., 1975).

Κατά τη διαδικασία παραγωγής εικοσανοειδών από το αραχιδονικό μια διαδικασία που παρουσιάζεται στην εικόνα 16, τα ένζυμα κυκλοοξυγενάση και υπεροξειδάση καταλύουν του αραχιδονικού σε προσταγλανδίνη H₂ από τις οποίες και παράγονται οι προσταγλανδίνες, προστακυκλίνες και οι θρομβοξάνες ενώσεις που επιτελούν σημαντικές ορμονικές λειτουργίες στον ανθρώπινο οργανισμό. Ενώ το ένζυμο 5-λιποξυγενάση καταλύει τις αντιδράσεις παραγωγής των λευκοτριενίων (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Μονοπάτια βιοσύνθεσης εικοσανοειδών από το αραχιδονικό οξύ (Lone A. M. & Taskén K., 2013).

Παλμιτικό οξύ (δεκαεξανοϊκό) με χημικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Αποτελεί το πιο διαδεδομένο κορεσμένο λιπαρό οξύ στη φύση, με τη μορφή του τριγλυκεριδίου του (παλμιτίνη) και αποτελεί σημαντικό συστατικό του σώματος των ανθρώπων, κατέχοντας το 21-30%, του λιπώδους ιστού (Mokdad et al., 2003).

Πηγές του αποτελούν το λίπος της φάλαινας, το φοινικέλαιο, το κερι των μελισσών, κλπ., ενώ βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις και στο ακατέργαστο όξινο κλάσμα των πετρελαίων. Συνήθως βρίσκεται σε στερεή μορφή και ρευστοποιείται στους $62,9^\circ\text{C}$, διαλύεται με αλκοόλη και αιθέρα αλλά παραμένει αδιάλυτη στο νερό.

Αποτελεί κύριο συστατικό των σαπουνιών με τη μορφή των αλκαλικών του αλάτων και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία των επιφανειοδραστικών υλικών. Η υπερβολική κατανάλωσή του σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων βέβαια με τελευταία έρευνα αναθεωρούνται τα δεδομένα αυτά (*Dehghan et al., 2017*)

Ελαιικό οξύ (οκταδεκανοϊκό οξύ), με χημικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)7\text{COOH}$

Το ελαιικό οξύ είναι ένα μονοακόρεστο ωμέγα-9 λιπαρό οξύ, με αριθμό λιπιδίων 18: 1 cis-9. Απαντάται φυσικά σε διάφορα ζωικά και φυτικά λίπη και έλαια. Είναι άοσμο, άχρωμο έλαιο, αν και τα εμπορικά δείγματα μπορεί να είναι κιτρινωπά. Ο όρος "ελαιικό" σχετίζεται με την προέλευσή του από το ελαιόλαδο, το οποίο είναι πλούσιο σε ελαιικό οξύ.

Η βιοσύνθεση του ελαιικού οξέος περιλαμβάνει τη δράση του ενζύμου στεαροϋλ-CoA 9-δεσατουράση που δρα επί του στεαροϋλ-CoA. Στην πραγματικότητα, το στεατικό οξύ αφυδρογονώνεται για να δώσει το μονοακόρεστο παράγωγο ελαιικό οξύ.

Εκτός από συστατικό των τροφίμων αποτελεί συστατικό των σαπουνιών καθώς και γαλακτοματοποιητικός παράγοντας.

Στεατικό οξύ (δεκαοκτανοϊκό), με χημικό τύπο $\text{CH}_3(\text{CH}_2)16\text{COOH}$

Το στεατικό οξύ εμφανίζεται κυρίως στη φύση ως ένα μικτό τριγλυκερίδιο ή ενωμένο με άλλα οξέα μακράς αλυσού ή ως ένας εστέρας μιας λιπαρής αλκοόλης. Αποτελεί μετά το παλμιτικό το αμέσως επόμενο πιο διαδεδομένο λιπαρό οξύ μακράς αλυσίδας, που υπάρχει στη φύση. Βρίσκεται κυρίως στα ζωικά λίπη με ποσοστό έως και 30% (*Gunstone, F.D. et al., 2007*).

Χρησιμοποιείτε στην παραγωγή σαπουνιών τα οποία παράγονται με αλκαλική υδρόλυση, ή σαπωνοποίηση, στην παραγωγή άλλων επιφανειοδραστικών αλλά και μαλακτικών προϊόντων. Επίσης έχει χρήση σαν ενισχυτής γαλακτωμάτων λόγω της ύπαρξης στο μόριο τους μιας υδρόφιλης και μιας υδρόφοβης κεφαλής.

α-Λινολενικό Οξύ (cis 9,12,15 - δεκαοκτατριενοϊκό οξύ - ALA) με χημικό τύπο $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_2$

Πηγές πλούσιες σε ALA αποτελούν τα σπορέλαια από chia , perilla , ελαιοκράμβη, και σόγια. Πρόκειται για ένα απαραίτητο πολυακόρεστο ω-3 λιπαρό

οξύ, με 3 cis διπλούς δεσμούς το οποίο λαμβάνει ο άνθρωπος μόνο μέσω της διατροφής, λόγω της απουσίας των ενζύμων 12 - & 15 - Δεσατουράσης που απαιτούνται, για τη σύνθεση του από το στεατικό. Λόγω της ευαισθησίας του στην οξείδωση ταγγίζει εύκολα με κατάληξη τα έλαια που το περιέχουν να οδηγούνται σε δυσάρεστη οσμή και γεύση. Για το λόγο αυτό για τον οποίο οι παραγωγοί επιλέγουν να υδρογονώνουν μερικώς τα έλαια που περιέχουν ALA, όπως το σογιέλαιο. Η σόγια αποτελεί τη μεγαλύτερη πηγή βρώσιμων ελαίων στις ΗΠΑ και το 40% της παραγωγής ελαίου σόγιας είναι μερικώς υδρογονωμένο. Μέσω όμως αυτής της διαδικασίας το ALA μετατρέπεται σε ανθυγιεινό trans λιπαρό.

1.2.4.6. Η σημασία των ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων.

Οι ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων από την κατανάλωση που επιφέρει η κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων έχουν γίνει συχνό αντικείμενο ερευνών τα τελευταία χρόνια. Από την άλλη οι αναφορές για τα ω-6 λιπαρά οξέα εμφανίζονται με μικρότερη συχνότητα στα μέσα ενημέρωσης. Η σημαντικότητα της ύπαρξης μιας καλής ισορροπίας στην πρόσληψη των ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα βασίζεται στο γεγονός ότι αποτελούν σημαντικά συστατικά στις μεμβράνες των κυττάρων και πρόδρομες ενώσεις πολλών ουσιών στον οργανισμό, όπως αυτές που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης και τη φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού.

Βιβλιογραφικές έρευνες αναδεικνύουν τη θετική επίδραση των ω-3 λιπαρά οξέων σε καρδιαγγειακές παθήσεις λόγω της αντιφλεγμονώδη δράση τους καθώς και στην πρόληψη του σακχαρώδους διαβήτη και συγκεκριμένων τύπων καρκίνου (*Lunn and Theobald, 2006*). Ο άνθρωπος έχει την ικανότητα να παράγει όλα τα λιπαρά οξέα που χρειάζεται, εκτός από δύο: το λινελαϊκό οξύ (LA, ω-6) και το α-λινολεϊκό οξύ (ALA, ω-3), τα οποία **ονομάζονται «απαραίτητα λιπαρά οξέα»**. Και τα δύο είναι αναγκαία για τη σωστή λειτουργία του οργανισμού, ενώ απαιτούνται επιπρόσθετα και για τη σύνθεση άλλων λιπαρών οξέων για παράδειγμα η βιοσύνθεση του αραχιδονικού οξέου (AA) πραγματοποιείται από το λινελαϊκό οξύ (LA). Αν και η βιοσύνθεση των ω-3 λιπαρών οξέων εικοσαπεντανοϊκού οξέως (EPA) και του δοκοσαεξανοϊκού οξέως (DHA) μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό εντούτοις αυτή γίνεται σε μικρές ποσότητες γι' αυτό η καθημερινή διατροφή απαιτείται να περιλαμβάνει και τα παραπάνω λιπαρών οξέων. Τα ALA και LA υπάρχουν σε φυτά και σε έλαια σπόρων ενώ στο ανθρώπινο σώμα το ALA και το LA ανταγωνίζονται για τον μεταβολισμό τους μέσω του ενζύμου δέλτα-6-δεσατουράση ($\Delta 6$ -desaturase). Η

σημαντικότητα αυτού του ανταγωνισμού στην υγεία του ανθρώπου έχει να κάνει με το γεγονός ότι η υψηλή πρόσληψη LA μπορεί να μειώσει την ποσότητα του ενζύμου που θα διαθέσιμη για τον μεταβολισμό του ALA, αυξάνοντας την πιθανότητα καρδιαγγειακών παθήσεων. Για το λόγο αυτό ανέκυψε η θεωρία τη "ιδανικού" λόγου ω-6 προς ω-3 λιπαρών οξέων στη διατροφή η οποία επίσης βασίστηκε και στην παρατήρηση δεδομένων του τελευταίου αιώνα σχετικά με την αύξηση της πρόσληψης ω-6 με ταυτόχρονη μείωση της πρόσληψης ω-3 λιπαρών οξέων η οποία συνδέεται με την αύξηση των καρδιακών παθήσεων (Simopoulos, 2008).

Αν και πολλές έρευνες έχουν καταγραφεί παρόλα αυτά, η ακριβής αναλογία ω-6/ω3 λιπαρών οξέων που σχετίζεται με το μειωμένο κίνδυνο καρδιακών παθήσεων δεν έχει προσδιοριστεί ακόμη αν και κάποιοι ειδικοί σήμερα πιστεύουν ότι τελικά αυτή καθ' αυτή η αναλογία δεν είναι και τόσο σημαντική αλλά αυτό που θα πρέπει να μας απασχολεί είναι τα απόλυτα επίπεδα πρόσληψης.

Για τα ω-3 λιπαρά οξέα η συνιστώμενη δοσολογία πρόσληψης διαφέρει μεταξύ των διαφόρων χωρών από 0.5 έως 2% στο ποσοστό της συνολικής ημερήσιας πρόσληψης ενώ πιο συγκεκριμένα για το ALA το προτεινόμενο ποσοστό κυμαίνεται μεταξύ 0.6 και 1.2 % ή 1 - 2 γρ. ανά ημέρα. Από τη άλλη μία σχετική έρευνα παρουσιάζει ότι η πραγματική πρόσληψη του ALA μέσω της διατροφής κυμαίνεται περίπου στο 0.6 γρ. ανά ημέρα στη Γαλλία και την Ελλάδα, 2.5 γρ. ανά ημέρα στην Ιρλανδία. Ενώ στο Γαλλικό αντρικό πληθυσμό 0.5 γρ. ανά ημέρα έως 2.1 γρ. ανά ημέρα στις γυναίκες από τη Δανία (Hulshof et al., 1999). Οι προαναφερόμενες καταναλώσεις είναι χαμηλότερες σε σχέση με την προτεινόμενη δοσολογία και μια αύξηση στην κατανάλωση τροφίμων που είναι πλούσια σε ω-3(λιπαρά ψάρια, κραμβέλαιο) θα ήταν ευεργετική.

Μια διεθνής έρευνα (Chowdhury et al., 2014) προβληματίζει περισσότερο σχετικά με τον ισχυρισμό της υγιεινής διατροφής ότι «η κατανάλωση κορεσμένων λιπαρών αυξάνει τον κίνδυνο των εμφραγμάτων» Στην έρευνα αυτή διερευνήθηκαν 32 μελέτες με πάνω από μισό εκατομμύριο συμμετέχοντες και με βάση τα αποτελέσματα αυτής τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν επιβαρύνουν την καρδιά και από την άλλη δεν αποδεικνύεται ότι τα πολυακόρεστα ασκούν προστατευτική δράση.

Από την άλλη, η δημοσίευση της Σχολής Δημόσιας Υγείας του Πανεπιστημίου Χάρβαρντ συμπεραίνει ότι τα ευρήματα της προηγούμενης έρευνας δεν θα πρέπει να εκληφθούν ως "πράσινο φως" στην αύξηση της κατανάλωσης του κόκκινου κρέατος, του βούτυρο και άλλων τροφών πλούσιων σε κορεσμένα λίπη» (Pan et al., 2012). Η

έρευνα στα συμπεράσματά της συνιστά το μοντέλο της μεσογειακής διατροφής, σύμφωνα με την οποία μπορεί πράγματι να μειώσει τον καρδιαγγειακό κίνδυνο ο οποίος αποτελεί την κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας παγκοσμίως. Ενώ συστήνει ότι διακοπή του καπνίσματος, η σωματική άσκηση και η υγιεινή διατροφή (μειωμένη κατανάλωση γλυκόζης και τροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε αλάτι και λιπαρά) αποτελούν βασικούς κανόνες προστασίας.

Τέλος τον Αύγουστο του 2017 δημοσιεύθηκαν τα αποτελέσματα της μεγαλύτερης επιδημιολογικής μελέτης PURE (*Prospective Urban Rural Epidemiology*) σε σχέση με την σύνδεση της θνησιμότητας και της διαιτητικών συνηθειών των ερευνοούμενων. Οι ερευνητές συνέλεξαν τα αυτο-αναφερόμενα στοιχεία διατροφής από 135.335 άτομα σε 18 χώρες και τα ομαδοποίησαν ανάλογα με την ποσότητα υδατανθράκων, λιπών και πρωτεϊνών που κατανάλωσαν. Μετά από την παρακολούθηση της υγείας των συμμετεχόντων κατά τη διάρκεια μιας επταετούς περιόδου, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι όσοι είχαν την υψηλότερη πρόσληψη διαιτητικού λίπους (35% των ημερήσιων θερμίδων) ήταν 23% λιγότερο πιθανό να έχουν πεθάνει από εκείνους με τη χαμηλότερη πρόσληψη λίπους (10% θερμίδες). Αντίθετα, για τους υδατάνθρακες, εκείνοι με τη μεγαλύτερη πρόσληψη (77% των ημερήσιων θερμίδων) ήταν 28% πιθανότερο να έχουν πεθάνει από όσους έχουν τη χαμηλότερη πρόσληψη (46% των ημερήσιων θερμίδων). Από τα ευρήματα αυτά, το κύριο συμπέρασμα των συγγραφέων είναι ότι "η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων συνδέεται με υψηλότερο κίνδυνο συνολικής θνησιμότητας, ενώ η κατανάλωση των συνολικών λιπαρών καθώς και οι μεμονωμένοι τύποι λιπαρών (κορεσμένα/ακόρεστα/πολυακόρεστα) σχετίζονται με χαμηλότερο ποσοστό με τη συνολική θνησιμότητα" (*Dehghan et al., 2017*).

1.2.5. Καροτενοειδή

Στα καροτενοειδή συμπεριλαμβάνονται τα καροτένια και οι ξανθοφύλλες. Πρόκειται για ισοπρενοειδή με 40-άνθρακα τα οποία και εμφανίζονται ευρέως σε φυτά, φρούτα και λαχανικά με τη μορφή κίτρινων, πορτοκαλί και κόκκινων λιποδιαλυτών χρωστικών ουσιών.

Χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ποτών και κοσμητολογίας σαν μη τοξικές φυσικές χρωστικές ουσίες αλλά διαθέτουν και διαθέτουν βιολογικές ιδιότητες π.χ. λειτουργούν σαν προβιταμίνη Α και διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση. Τα goji berry αποτελούν μία εξαιρετική πηγή καροτενοειδών τόσο λόγω του υψηλού τους περιεχομένου όσο και λόγω του προφίλ των καροτενοειδών που διαθέτουν. Σε μελέτη

των *Peng et al.*(2005) καταγράφεται ότι η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή των διαφορετικών goji berry κυμαίνεται μεταξύ 0,03 και 0,5%. Η περιεκτικότητα σε καροτενοειδή ποικίλλει ανάλογα με την εποχή και τον τόπο καλλιέργειας για παράδειγμα, η συνολική περιεκτικότητα σε καροτενοειδή είναι υψηλότερη στα φρούτα το καλοκαίρι από ότι στα πεσμένα φρούτα (*Ma et al.*, 2008).

Τα καροτενοειδή στα goji berry μπορεί να βρίσκονται στις ελεύθερες, μερικώς εστεροποιημένες ή πλήρως εστεροποιημένες μορφές τους. Η ζεαξανθίνη και οι εστέρες της αποτελούν τα σημαντικότερα καροτενοειδή του *L. barbarum* (*Li et al.*,1998.; *Weller and Breithaupt*, 2003). Η περιεκτικότητα των ζεαξανθινικών εστέρων στην ωρίμανση των φρούτων goji μπορεί να φθάσει το 77,5% των συνολικών καροτενοειδών (*Peng et al.*, 1998). Η παλμιτική ζεαξανθίνη συγκεκριμένα, περιλαμβάνει 31-56% των συνολικών καροτενοειδών που ανιχνεύονται με υγρή χρωματογραφία-υψηλής απόδοσης με ανιχνευτής συστοιχίας διόδων (HPLC-DAD) (*Peng et al.*, 2005). Ενώ η διπαλμιτική ζεαξανθίνη είναι το χαρακτηριστικό καροτενοειδές στα goji berry και μαζί με τη ζεαξανθίνη έχει αποτελέσει το επίκεντρο πολλών ερευνών για τον προστατευτικό ρόλο των goji berry έναντι της ατροφικής εκφύλισης της ωχράς κηλίδας (AMD) (*Peng et al.*, 2005). Η ζεαξανθίνη ως μία από τις κύριες χρωστικές του αμφιβληστροειδούς βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματική στην πρόληψη και θεραπεία της AMD (*Snodderly*, 1995;*Cooper et al.* 1999).

Εκτός από τη συμβολή της στην υγεία των ματιών, η ζεαξανθίνη και η διπαλμιτική ζεαξανθίνη έχουν αναφερθεί ότι εμφανίζουν αντι-ηπατοτοξική δράση, συγκρίσιμη με εκείνη της σιλυβίνης (*Kim et al.* 1997). Η ζεαξανθίνη και άλλα καροτενοειδή όπως το β-καροτένιο είναι επίσης ισχυρά αντιοξειδωτικά, τα οποία συμβάλλουν στις επιπτώσεις στην υγεία των μούρων goji έναντι ασθενειών που προκαλούνται από οξειδωτικό στρες.

Η εκχύλιση καροτενοειδών από goji berry πραγματοποιείται συνήθως αφαιρώντας πρώτα τα υδατοδιαλυτά συστατικά με νερό ή 50% αιθανόλη, ακολουθούμενη από εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες, όπως ακετόνη, πετρελαϊκό αιθέρα, εξάνιο, τολουόλιο ή το μείγμα τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρησιμοποιείται διαδικασία σαπωνοποίησης για να ληφθούν ελεύθερα καροτενοειδή. Έχει αναφερθεί η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των καροτενοειδών των goji berry με χρωματογραφικές τεχνικές και τεχνικές φασματομετρίας μάζας.

Τα κύρια καροτενοειδή που βρίσκονται στα goji berry παρουσιάζονται στον πίνακα 10. Οι *Li et al.* (1998) ταυτοποίησαν 10 καροτενοειδή, συμπεριλαμβανομένης

της ζεαξανθίνης, της β-κρυπτοξανθίνης, της βιλαξανίνης και των εστέρων τους, χρησιμοποιώντας ανάλυση HPLC-DAD. Οι *Inbaraj et al. (2008)* ανέφεραν την παρουσία 11 ελεύθερων καροτενοειδών και 7 εστέρες καροτενοειδών με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας HPLC-MS / GC (HPLC-MS / GC-FID). Η διπαλμιτική ζεαξανθίνη (1143,7 µg / g) ήταν η κυρίαρχη μεταξύ όλων των ταυτοποιημένων καροτενοειδών, ακολουθούμενη από ισομερή μονοπαλμιτικής β-κρυπτοξανθίνης (32,9-68,5 µg / g), ισομερή μονοπαλμιτικής ζεαξανθίνης (11,3-62,8 µg / g), trans-β-καροτένιο (23,7 µg / g) και all-trans-ζεαξανθίνη (1,4 µg / g). Σε άλλη μελέτη τα β-καροτένιο, η νεοξανθίνη, η κρυπτοξανθίνη, και η ζεαξανθίνη ταυτοποιήθηκαν στο σαπωνοποιημένο εκχύλισμα καροτενοειδών goji berry (*Wang et al., 2010*).

Πίνακας 10: Προφίλ κύριων καροτενοειδών στους καρπούς των goji berry (*L. Barbarum*)

Καροτενοειδή	Βιβλιογραφική Πηγή
β-Καροτένιο	<i>Inbaraj et al., 2008.</i>
Ζεαξανθίνη	<i>Inbaraj et al., 2008; Li et al., 1998.</i>
Νεοξανθίνη	<i>Wang et al., 2010.</i>
Διπαλμιτική Ζεαξανθίνη	<i>Inbaraj et al., 2008; Wang et al., 2010; Peng et al., 1998; Li et al., 1998.</i>
Μονοπαλμιτική Ζεαξανθίνη	<i>Inbaraj et al., 2008.</i>
Μονοπαλμιτική β-κρυπτοξανθίνη	<i>Inbaraj et al., 2008.</i>

Το περιεχόμενο και η σύνθεση των καροτενοειδών στα goji berry μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το στάδιο ωρίμανσης των καρπών. Για παράδειγμα, το επίπεδο των εστεροποιημένων καροτενοειδών αυξήθηκε με την ωρίμανση των καρπών, ενώ τα ελεύθερα καροτενοειδή όπως η ζεαξανθίνη ήταν λιγότερο άφθονα σε ώριμα φρούτα (*Weller et al., 2003*). Τα goji berry καταναλώνονται κυρίως ως αποξηραμένα φρούτα και η διαδικασία ξήρανσης πιστεύεται ότι επηρεάζει το προφίλ των καροτενοειδών που διαθέτουν. Η συμβατική διαδικασία ξήρανσης (με έκθεση στον ήλιο των καρπών) και αποθήκευσης (χύδην) συνήθως οδηγεί σε υποβάθμιση ή μετασχηματισμό των καροτενοειδών των καρπών. (*Ma et al., 2008*).

1.2.6. Άλλα βιοδραστικά συστατικά.

Εκτός από τα κύρια συστατικά που αναφέρθηκαν παραπάνω, τα goji berry περιέχουν επίσης τερπένια, αλκαλοειδή, cerebrosides (σύνθετες ενώσεις γλυκολιπιδίων με

υδατάνθρακες), κυκλικά πεπτίδια, φυτοστερόλες, βεταΐνη και έναν αριθμό ουδέτερων πτητικών ενώσεων (Qian et al., 2017) που επίσης συμβάλλουν σημαντικά στη βιολογική δράση τους. Τα cerebrosides έχουν εντοπιστεί στο *L. chinense* και σύμφωνα με μελέτη των Kim et al. (2000) επέδειξαν ηπατοπροστατευτική δράση έναντι ηπατοκυττάρων αρουραίου έναντι επαγόμενης από γαλακτοζαμίνη ηπατοτοξικότητα.

Άλλες ενώσεις goji berry με ηπατοπροστατευτική δράση είναι επίσης τα παράγωγα πυρρόλης και η βεταΐνη. Η βεταΐνη είναι επίσης ένα φυτοχημικό που παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου μειώνοντας την τοξικότητα της ομοκυστεΐνης και μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο στεφανιαίας καρδιοπάθειας και του εγκεφαλικού επεισοδίου (Dalmeijer et al., 2008). Η περιεκτικότητά σε βεταΐνη αναφέρθηκε ότι είναι 1,5% στα φύλλα *L. chinense* και 0,9-1,4% σε ολόκληρο το φυτό *L. barbarum* σε ξηρή βάση (Nishiyama, 1963; Chung et al., 2015).

Το lyciumin, ένα μοναδικό κυκλικό οκταπεπτίδιο (φαινυλοπροπανοειδή) το οποίο και έχει βρεθεί στις ρίζες του *L. chinense*, έχει δείξει ανασταλτική δράση του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης, υποδηλώνοντας έτσι πιθανή αντιυπερτασική ιδιότητα (Yahara et al., 1989).

Επιπλέον, μία ένωση η 2-O-(β-D-glucopyranosyl) ascorbic acid αποτελεί πρόδρομη ουσία της βιταμίνης C έχει απομονωθεί στα goji berry. Αυτή η ένωση προβιταμίνης C αντιπροσωπεύει περίπου το 0,5% του ξηρού βάρους του *L. barbarum* και έρευνες έχουν δείξει ότι αυξάνει το επίπεδο του ασκορβικού οξέος στο αίμα σε αρουραίους και συμβάλλει στις αντιοξειδωτικές και αντιγηραντικές ιδιότητες των goji berry (Toyota-Ono et al. 2004).

1.3. Ελεύθερες ρίζες - Οξειδωτικό στρες.

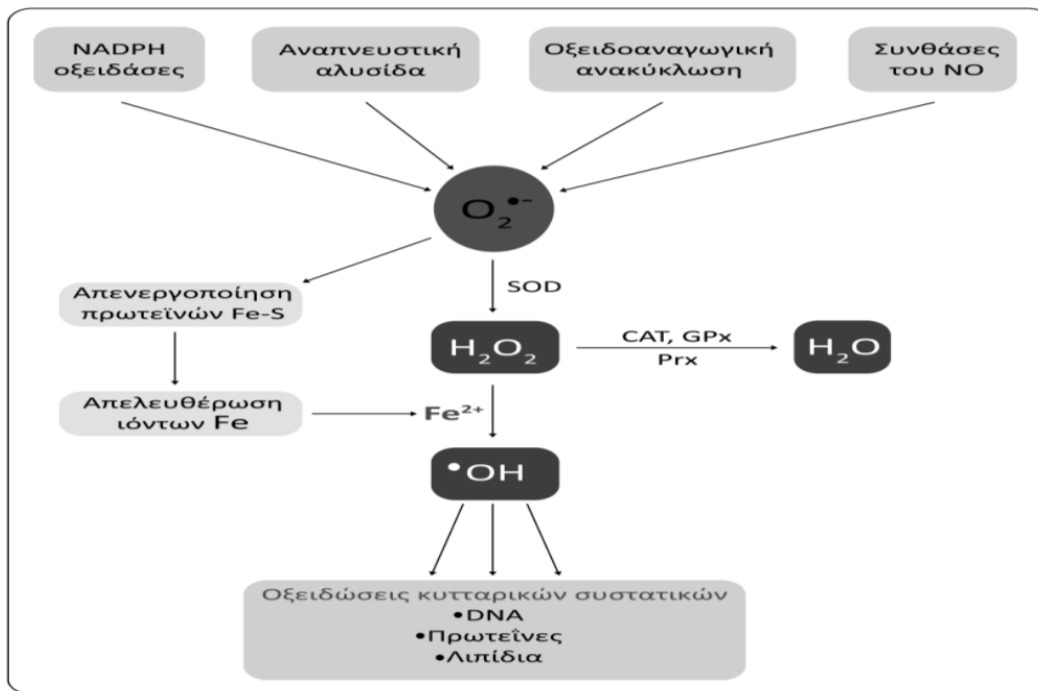
Όλα τα βασικά συστατικά των κυττάρων (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες), αποτελούν στόχο των δραστικών ελευθέρων ριζών, οι οποίες σχηματίζονται με αφητηρία το οξυγόνο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η δημιουργία δραστικών ελευθέρων ριζών ξεκινά με την αναγωγή του οξυγόνου με ένα μονό ηλεκτρόνιο σε ανιόν του σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$), το οποίο μεταβολίζεται γρήγορα σε O_2 και H_2O_2 , από τα ένζυμα δισμουτάσες του σουπεροξειδίου (SODs).

Επιβάλλεται να τονιστεί ότι ούτε το $O_2^{\cdot-}$ ούτε το H_2O_2 αποτελούν ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες, αλλά χρειάζονται ιδιαίτερους μηχανισμούς για να δημιουργήσουν δραστικές ελεύθερες ρίζες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την οξείδωση

των συστατικών των κυττάρων. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών αλλά και η επιτυχής αναστολή τους, όταν χρειάζεται, αποτελούν κεντρικά σημεία για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, μέσω εξωγενών παρεμβάσεων (εικόνα 17).

Ο καλύτερα μελετημένος μοριακός μηχανισμός οξείδωσης κυτταρικών συστατικών είναι αυτός της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Πρόκειται για μια κυκλικά ανατροφοδοτούμενη αλυσιδωτή διαδικασία, η οποία, εάν αρχίσει και δεν ανασταλεί εγκαίρως, μπορεί να οξειδώσει όλο το βιολογικό υλικό. Το DNA μπορεί να υποστεί έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών οξειδωτικών βλαβών, ανάλογα με τους παράγοντες που τις προκαλούν. Σε αντίθεση με τις οξειδωμένες πρωτεΐνες, οι οποίες συνήθως κατακερματίζονται και τα αμινοξέα τους επαναχρησιμοποιούνται, το οξειδωμένο DNA μπορεί να επιδιορθωθεί επί τόπου (*in situ*). Μη επαρκής επιδιόρθωση του DNA έχει ως αποτέλεσμα, ανάλογα με την ένταση του φαινομένου, την ενσωμάτωση μεταλλάξεων στο γενετικό τους υλικό, με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό τους και, τελικά, τον κυτταρικό θάνατο είτε με νέκρωση είτε με απόπτωση.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν στόχους οξείδωσης ανάλογα με τα κατάλοιπα αμινοξέων που περιέχει η καθεμιά. Τα αμινοξέα κυστεΐνη, μεθειονίνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη, τρυπτοφάνη και ιστιδίνη είναι πιο ευαίσθητα σε οξειδωτικές τροποποιήσεις σε σύγκριση με τα υπόλοιπα. Μια σχετικά πρόσφατη και απρόσμενη εξέλιξη στο πεδίο αυτό υπήρξε η κατανόηση του γεγονότος ότι οι οξειδωτικές τροποποιήσεις καταλοίπων αμινοξέων στις πρωτεΐνες, εκτός από τις βλαπτικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν, επιτελούν και φυσιολογικούς ρόλους, συμμετέχοντας στη διαδικασία μεταγωγής σημάτων εντός των κυττάρων (*redox signaling*).



Εικόνα 17: Διαγραμματική απεικόνιση των αντιδράσεων, μέσω των οποίων, το $O_2^{\bullet-}$ μπορεί να προκαλέσει την οξείδωση των βασικών κυτταρικών συστατικών.

1.3.1. Ελεύθερες Ρίζες και Δραστικά Είδη O_2 .

Τα μόρια αποτελούνται από έναν ή περισσότερους ατομικούς πυρήνες, οι οποίοι περιβάλλονται από ηλεκτρόνια, τα οποία περιφέρονται γύρω από τον πυρήνα. Τα ηλεκτρόνια είναι διευθετημένα σε έναν αριθμό τροχιακών, τα οποία βρίσκονται σε διαφορετικές αποστάσεις από τον πυρήνα. Στα περισσότερα μόρια, τα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σε κάθε τροχιακό, ζευγαρώνουν με ένα άλλο ηλεκτρόνιο. Τα δύο ηλεκτρόνια κάθε ζεύγους περιστρέφονται γύρω από τον εαυτό τους (spin) σε αντίθετες κατευθύνσεις. Τα ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια διατηρούν το μόριο σχετικά σταθερό σε -μικρότερη ενεργειακή κατάσταση- και ως εκ τούτου λιγότερο δραστικό.

Όταν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια, ιδιαίτερα αυτά που βρίσκονται στα εξωτερικά τροχιακά του ατόμου, είναι ασύζευκτα, δεν έχουν δηλαδή ζευγάρι, τότε το μόριο γίνεται ασταθές -σε μεγαλύτερη ενεργειακή κατάσταση- και συνεπώς πιο δραστικό από άλλα μόρια.

Άτομα ή μόρια με ασύζευκτα ηλεκτρόνια ονομάζονται παραμαγνητικά, ενώ όταν δεν διαθέτουν τέτοια ηλεκτρόνια, διαμαγνητικά. Ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ασκεί έλξη στα ηλεκτρόνια γειτονικών ατόμων με αποτέλεσμα την πρόκληση χημικών αντιδράσεων μεταξύ ατόμων ή μορίων, κατά τις οποίες έχουμε μεταφορά ηλεκτρονίων. Οι αντιδράσεις αυτές λέγονται οξειδοαναγωγικές (redox). Κατά την

οξειδωση έχουμε απώλεια ηλεκτρονίων, ενώ κατά την αναγωγή έχουμε απόκτηση ηλεκτρονίων από ένα άτομο.

Ένα άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια και ανεξάρτητη παρουσία, λέγεται **ελεύθερη ρίζα** και συμμετέχει πολύ εύκολα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής με γειτονικά μόρια. Κατά τις αντιδράσεις αυτές όχι μόνο μεταβάλλονται σημαντικά τα γειτονικά μόρια στόχοι, αλλά μερικές φορές μεταβιβάζονται τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια από στόχο σε στόχο, δημιουργώντας έτσι μία δεύτερη, τρίτη κ.ο.κ. ελεύθερη ρίζα υπό μορφή αλυσιδωτής αντίδρασης. (Halliwell & Gutteridge, 1990). Η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών οφείλεται ακριβώς στον πολλαπλασιασμό των μεταβολών που προκαλούνται από παρόμοιες αλυσιδωτές αντιδράσεις.

Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο ή τον άνθρακα. Το ίδιο το οξυγόνο που αναπνέουμε αποτελεί δυνητικό πρόδρομο ελεύθερης ρίζας, αφού περιέχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια, που βρίσκονται σε δύο διαφορετικά τροχιακά. Η μορφή όμως αυτή του O₂, που λέγεται οξυγόνο τριπλής κατάστασης (*triplet state*) και συμβολίζεται με 3O₂, δεν είναι ιδιαίτερα δραστική.

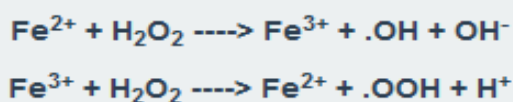
Το μοριακό όμως αυτό οξυγόνο μπορεί να ενεργοποιηθεί, έτσι ώστε τα δύο ηλεκτρόνια να βρεθούν στο ίδιο τροχιακό. Η πολύ δραστική αυτή μορφή οξυγόνου ονομάζεται οξυγόνο μονής κατάστασης (*singlet state*) και συμβολίζεται με '*O₂'.

Αν και το οξυγόνο μονής κατάστασης δεν αποτελεί ελεύθερη ρίζα, τα ηλεκτρόνια του βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση, δηλαδή είναι πολύ δραστικά και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσουν βλαπτικές αντιδράσεις παρόμοιες με αυτές των ελευθέρων ριζών οξυγόνου.

Παρόμοιο μόριο το οποίο δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά περιέχει δραστικό οξυγόνο αποτελεί και το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Συνολικά, όλα τα μοριακά είδη που περιλαμβάνουν οξυγόνο, είτε είναι ελεύθερες ρίζες είτε όχι, ονομάζονται δραστικά είδη οξυγόνου (ΔΕΟ).

Τα κυριότερα ΔΕΟ είναι:

- Υπό συνθήκες stress το O₂^{•-} δρα ως οξειδωτική ουσία για τα μεταλλοένζυμα και διευκολύνει την παραγωγή OH• από το H₂O₂, παρέχοντας ιόντα σιδήρου για την αντίδραση Fenton (Valko M, et al., 2005).



- η ρίζα υπεροξειδίου (ROO^{\cdot}),
 - Αφαιρεί H^+ από τα λιπαρά οξέα, δημιουργώντας έτσι μία αυτοκαταλυόμενη αντίδραση ελευθέρων ριζών, η οποία αν δεν σταματήσει με κάποιο τρόπο, μπορεί να οδηγήσει στην καταστροφή του κυττάρου.
- το O_2 απλής κατάστασης,
- το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- και το υποχλωριώδες οξύ (HOCl).

Στα δραστικά αυτά μοριακά είδη συμπεριλαμβάνεται επίσης και η δραστική μορφή αζώτου, το μονοξείδιο του αζώτου ($-\text{NO}^{\cdot}$), το οποίο είναι ελεύθερη ρίζα (με τελεία συμβολίζεται η ελεύθερη ρίζα, ενώ με (-) συμβολίζεται το αρνητικό φορτίο της ρίζας και με R, ένα άτομο ή μία ομάδα ατόμων, κυρίως αλυσίδα ατόμων άνθρακα).

1.3.2. Πρόκληση βλαβών στο DNA.

Το DNA, αν και είναι από τα βασικότερα συστατικά των κυττάρων και θα περίμενε κανείς να είναι καλύτερα προστατευμένο, είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε βλάβες οι οποίες προκαλούνται σε συνθήκες οξειδωτικού στρες *in vivo*. Οξειδωτικές τροποποιήσεις σ' αυτά τα νουκλεϊνικά πολυμερή, έχουν ως αποτέλεσμα την αναστολή τόσο της αντιγραφής και της μεταγραφής, όσο και της μετάφρασης στη διαδικασία έκφρασης των πρωτεϊνών. Επίσης, προκαλούν μεταλλάξεις, οι οποίες τελικά ενδέχεται να οδηγήσουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων ή ακόμα και στον θάνατο του οργανισμού.

Το ποσοστό των οξειδωτικών βλαβών στο DNA, ακόμα και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες, είναι αρκετά υψηλό. Οι βλάβες στο μιτοχονδριακό DNA φαίνεται να είναι αρκετές και υπολογίζονται σε μία τροποποιημένη βάση ανά 8.000. Τα μόρια του RNA είναι, επίσης, πολύ πιο ευαίσθητα στην οξείδωση από τα μόρια του DNA (*Tanaka, Chock et al., 2007*). Οι παρατηρήσεις αυτές θα πρέπει να συνδέονται με το γεγονός ότι τα μόρια του μιτοχονδριακού DNA και του RNA δεν είναι οργανωμένα σε συμπαγή διάταξη και δεν συνδέονται με ιστόνες, όπως στο αντίστοιχο πυρηνικό DNA. Επιπλέον, το μιτοχονδριακό DNA βρίσκεται πλησίον της αναπνευστικής αλυσίδας, η οποία θεωρείται η κύρια πηγή δημιουργίας δραστικών μορφών οξυγόνου (*Cadenas and Davies, 2000*).

Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι ρίζες του υδροξυλίου αποτελούν την κύρια αιτία για την πρόκληση οξειδωτικών βλαβών στο DNA. Το σημείο δημιουργίας

τους έχει ξεχωριστή σημασία για τυχόν αντιδράσεις τους με το DNA, μιας και ο χρόνος ημιζωής τους είναι μερικά μικροδευτερόλεπτα. Κατά συνέπεια, το πιο πιθανό σενάριο είναι ότι δεν προλαβαίνουν να διαχυθούν και να φθάσουν στο DNA, εάν το σημείο δημιουργίας τους είναι σχετικά μακριά.

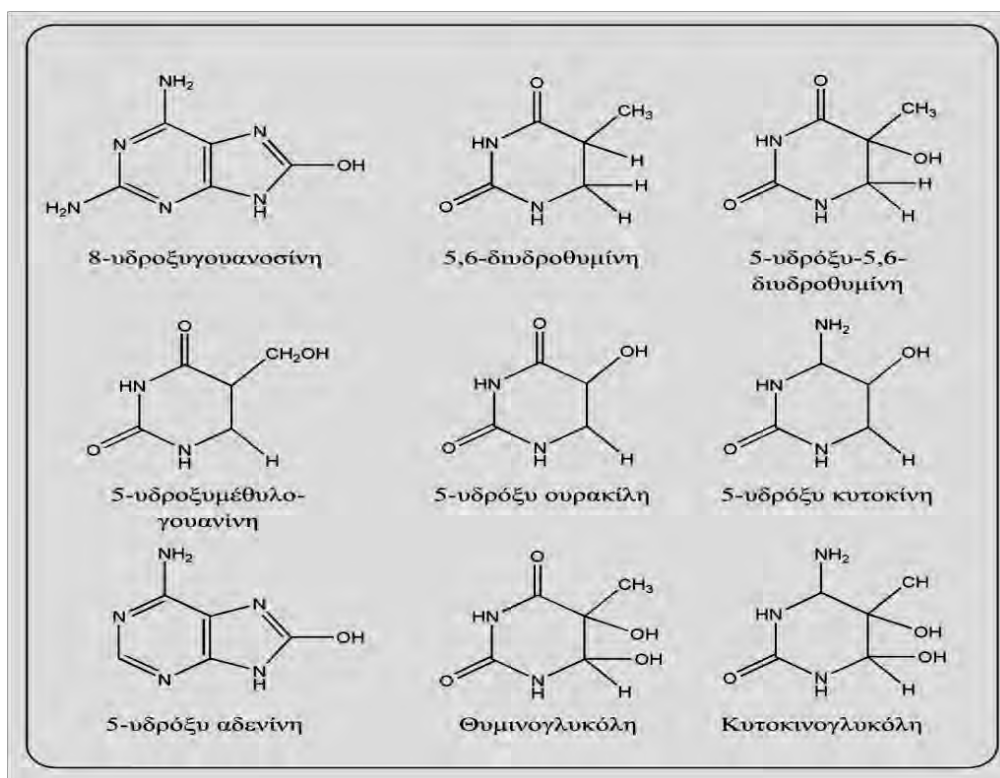
Έτσι, για παράδειγμα, οι ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου που δημιουργούνται στο ενδοπλασματικό δίκτυο είναι αδύνατον να δράσουν άμεσα στο σχετικά μακρινό μόριο του DNA. Λιγότερο δραστικές ελεύθερες ρίζες, όμως, μπορούν να διαχέονται σε σχετικά μεγαλύτερες αποστάσεις και να επιδρούν εξειδικευμένα με τα διάφορα μόρια.

Η πιο πιθανή ακολουθία γεγονότων στην περίπτωση δημιουργίας δραστικών ριζών (π.χ., ριζών OH), σε σημεία μακριά από τον πυρήνα είναι κατ' αρχάς μια αντίδραση με μόρια του άμεσου περιβάλλοντος από την οποία παράγονται δευτερεύοντα προϊόντα (π.χ., ρίζες υπεροξειδίων), ικανά να διαχυθούν και να αντιδράσουν με το πυρηνικό DNA.

Μια άλλη περίπτωση είναι η δέσμευση ιόντων μετάλλων μετάπτωσης (κυρίως σιδήρου) απευθείας στο DNA και, κατά συνέπεια, η δημιουργία ριζών OH πλησίον του DNA. Είναι εμφανές ότι σ' αυτήν την περίπτωση η χρήση εκκαθαριστών των ριζών του υδροξυλίου δεν πρόκειται να έχει κανένα αποτέλεσμα, μιας και οι εξαιρετικά δραστικές ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται πλησίον του DNA.

Η οξειδωτική τροποποίηση του DNA μπορεί να προκαλέσει μια σειρά από διαφορετικά αποτελέσματα, όπως σχάση των αλυσίδων (μονών και διπλών), ανταλλαγή αδελφών χρωματιδίων (sister chromatid exchange), διασυνδέσεις του τύπου DNA-DNA ή DNA-πρωτεΐνης και τροποποιήσεις των βάσεων του DNA. Η μελέτη των Cadet και Wagner (2013), παρουσιάζει την βλάβη βάσεων DNA από ενεργά είδη οξυγόνου, παράγοντες οξείδωσης και την υπεριώδη ακτινοβολία.

Μερικές από τις τροποποιημένες βάσεις, οι οποίες έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί, παρουσιάζονται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 18: Προϊόντα οξειδωσης των βάσεων του DNA, τα οποία σχηματίζονται μετά τη δράση των ελευθέρων ριζών.

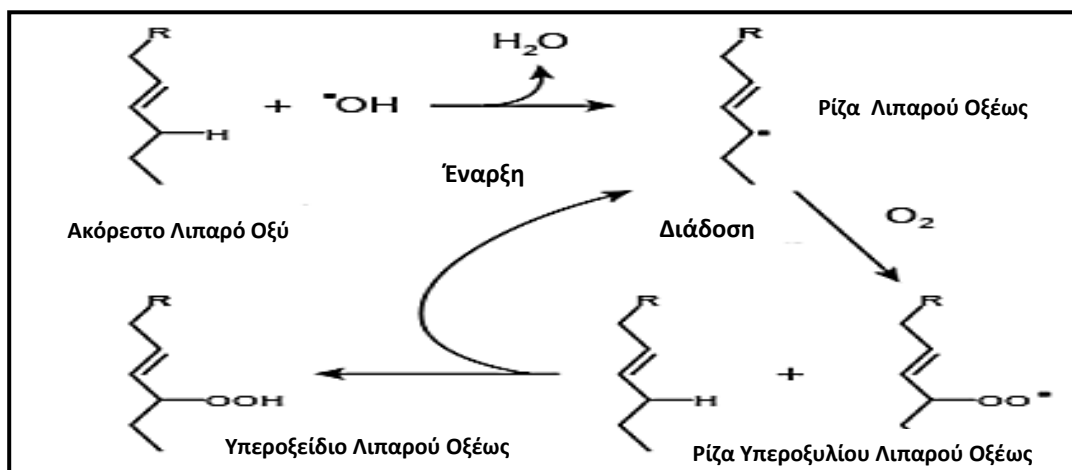
1.3.3. Υπεροξειδωση Λιπιδίων.

Η υπεροξειδωση των λιπιδίων αναφέρεται στην οξειδωτική αποικοδόμηση των λιπιδίων. Είναι η διαδικασία κατά την οποία οι ελεύθερες ρίζες αποσπούν ηλεκτρόνια από τα λιπίδια των κυτταρικών μεμβρανών, με αποτέλεσμα βλάβη των κυττάρων.

Πιο συχνά επηρεάζονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, επειδή περιέχουν πολλαπλούς διπλούς δεσμούς μεταξύ των οποίων βρίσκονται γέφυρες μεθυλενίου (-CH₂-) που διαθέτουν δραστικά υδρογόνα. Η διαδικασία της υπεροξειδωσης των λιπιδίων αποτελείται από τρία βασικά βήματα: έναρξη, διάδοση, και τερματισμό.

α. Κατά την έναρξη, παράγονται ρίζες λιπαρών οξέων όπως -OH[•] και -HOO[•], που αντιδρούν με το υδρογόνο με αποτέλεσμα την παραγωγή νερού και ρίζας λιπαρού οξέος.

β. Κατά τον πολλαπλασιασμό της διαδικασίας της λιπιδικής υπεροξειδωσης, η ρίζα πλέον του λιπαρού οξέως δεν είναι ένα σταθερό μόριο και έτσι αντιδρά άμεσα με το μοριακό οξυγόνο, δημιουργώντας μία ρίζα λιπαρού οξέος - υπεροξυλίου. Αυτή η ασταθής ρίζα αντιδρά με άλλο ελεύθερο λιπαρό οξύ (Εικόνα 19), δημιουργώντας έτσι μία άλλη ελεύθερη ρίζα λιπαρού οξέως και ένα υπεροξειδίο λιπιδίου. Αυτός ο κύκλος συνεχίζεται καθώς μία ρίζα λιπαρού οξέως αντιδρά με αυτόν τον τρόπο.



Εικόνα 19: Μηχανισμός της Λιπιδικής Υπεροξειδωσης.

γ. Οι οργανισμοί διαθέτουν μόρια που επιταχύνουν τον τερματισμό των παραπάνω αντιδράσεων με αποτέλεσμα την προστασία της κυτταρικής μεμβράνης. Ένα σημαντικό τέτοιο αντιοξειδωτικό είναι η βιταμίνη E και άλλα αντι-οξειδωτικά ένζυμα.

1.3.4. Πρόκληση βλαβών στις πρωτεΐνες.

Οι πρωτεΐνες στον ενδοκυττάριο αλλά και στον ενδοκυττάριο χώρο αποτελούν, επίσης, στόχο για τη δράση των δραστικών ελευθέρων ριζών (*Dunlop, Brunk et al., 2011*). Το μεγάλο ενδιαφέρον, όμως, για τη μελέτη της οξειδωτικής τροποποίησης των πρωτεϊνών αναπτύχθηκε σχετικά πρόσφατα, όταν έγινε γνωστό ότι οξειδωτικές τροποποιήσεις σε ορισμένες απ' αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή του σήματος εντός αλλά και μεταξύ των κυττάρων (redox signaling) (*Brewer, Garcia et al., 2015*). Οι περισσότερες πρωτεΐνες είναι δυνατόν να υποστούν σημαντικές οξειδωτικές τροποποιήσεις χωρίς σοβαρές επιπτώσεις στη λειτουργικότητά τους. Μόνον όταν θιγούν απαραίτητα αμινοξέα ή προσθετικές ομάδες στο ενεργό τους κέντρο (ή σε αλλοστερικά κέντρα), επηρεάζεται η γενικότερη λειτουργία τους (*Stadtman, 2006*).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στις πλάγιες αλυσίδες ορισμένων αμινοξέων, είναι δυνατόν να μεταπηδούν από θέση σε θέση μέσα στο μόριο μιας πρωτεΐνης. Η ύπαρξη πολλών σημείων με ελεύθερες ρίζες έχει συνήθως ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενδομοριακών αλλά και διαμοριακών ομοιοπολικών δεσμών, προκαλώντας αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία των συγκεκριμένων πρωτεϊνών. Εκτός των επιπτώσεων από την άμεση τροποποίηση, οι

κυτταρικές πρωτεΐνες μπορούν, επίσης, να τροποποιηθούν έμμεσα, αντιδρώντας για παράδειγμα με προϊόντα της λιπιδιακής υπεροξειδωσης (π.χ. μηλονική διαλδεύδη, 4-υδροξυ-νονενάλη κ.τ.λ.) (Higdon, Diers et al., 2012).

Είναι γνωστό ότι η οξειδωτική τροποποίηση μερικών αμινοξέων στις πρωτεΐνες, προκαλεί την αναγνώρισή τους από ορισμένες πρωτεάσες με αποτέλεσμα τον ολικό κατακερματισμό τους σε αμινοξέα, τα οποία στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών είτε για τη σύνθεση ATP μέσω του καταβολισμού τους.

1.3.5. Πως Εξουδετερώνονται τα Δραστικά Είδη Οξυγόνου (ΔΕΟ), στον Οργανισμό μας.

Σε κάθε βιολογικό σύστημα, πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της απομάκρυνσης των ΔΕΟ. Η αύξηση των οξειδώσεων από τα ΔΕΟ οδηγεί τα κύτταρα σε μία κατάσταση που ονομάζεται οξειδωτικό στρες και είναι παράγοντας πρόκλησης ασθενειών. Ο όρος οξειδωτικό στρες, περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου *Reactive Oxygen Species* - (ROS) και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών ενός οργανισμού (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan et al., 2004).

Το οξειδωτικό στρες προκαλείται συνήθως από:

(1) Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.

(2) Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Αυτό συμβαίνει είτε λόγω της έκθεσης των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS, είτε λόγω της ύπαρξης παραγόντων που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.

Καθώς είναι αδύνατον να προληφθεί ολοκληρωτικά η παραγωγή ελευθέρων ριζών *in vivo*, έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός αντιοξειδωτικών μηχανισμών στον οργανισμό (Birben E, et al., 2012; Elias, Kellerby, & Decker, 2008). Η γλουταθειόνη (GSH), εκπληρώνει αρκετούς ρόλους στο κυτταρικό αντιοξειδωτικό σύστημα άμυνας. Πρώτα, εξουδετερώνει απευθείας ένα εύρος ελευθέρων ριζών, προσφέροντας τους ένα άτομο υδρογόνου. Επίσης, μπορεί να εξουδετερώσει υδροϋπεροξειδία και λιπούπεροξειδία μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (*glutathione peroxidase* - GPx). Σε αυτή την αντίδραση δύο μόρια

γλουταθειόνης προσφέρουν ένα ζεύγος ατόμων υδρογόνου και οξειδώνονται για να σχηματίσουν την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης, τη δισουλφιδική γλουταθειόνη (GSSG). Ακόμη, η γλουταθειόνη έχει βρεθεί να εμπλέκεται στην αναγωγή ή «ανακύκλωση» αντιοξειδωτικών στο κύτταρο (Boukhenouna et al., 2014).

Άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD), η οποία λειτουργεί ως άμεση αντιοξειδωτική άμυνα στις ελεύθερες ρίζες και πιο συγκεκριμένα στα υπεροξειδία (Buettner, 2011) καταλύοντας την αντίδραση μετατροπής τους σε H₂O₂ και O₂, και η καταλάση, που διασπά το H₂O₂ σε H₂O και O₂ (Carocho & Ferreira, 2013).

Στους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας περιλαμβάνονται και διατροφικά αντιοξειδωτικά, όπως η βιταμίνη C, η βιταμίνη E, τα καροτενοειδή, το α-λιποϊκό οξύ, το συνένζυμο Q10 και τα φλαβονοειδή (Landete, 2013). Επίσης, το ουρικό οξύ φαίνεται να έχει αντιοξειδωτική δράση (Kumar, 2015). Ακόμη, τα ιχνοστοιχεία χαλκός, ψευδάργυρος, σίδηρος, σελήνιο και μαγγάνιο εμπλέκονται σε αντιοξειδωτικές λειτουργίες ως συνεργιστικοί παράγοντες των αντιοξειδωτικών ενζύμων (Carocho & Ferreira, 2013).

1.4. Προβιοτικά βακτήρια

Η χρήση των προβιοτικών εκτείνεται πίσω σε μια εποχή πριν την ανακάλυψη των μικροβίων. Γαλακτοκομικά προϊόντα ζύμωσης απεικονίζονταν σε Αιγυπτιακά ιερογλυφικά, ενώ ζυμωμένο γάλα από βουβάλια χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά από Θηβητιανούς νομάδες με σκοπό να διατηρήσουν το γάλα τους κατά την διάρκεια της μακράς οδοιπορίας τους (Guo et al., 2016).

Κατά την διάρκεια της δεκαετίας του 1800, παρατηρήθηκε από τους επιστήμονες η θετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία της κατανάλωσης ποσοτήτων γαλακτοκομικών προϊόντων που είχαν υποστεί ζύμωση, μόνο που η αιτία για αυτές τις επιπτώσεις στην υγεία παρέμενε άγνωστη. Ο Louis Pasteur κατάφερε να αναγνωρίσει βακτήρια και ζύμες που ήταν υπεύθυνα για την διαδικασία της ζύμωσης, μόνο που δεν μπόρεσε να συνδέσει αυτά τα μικρόβια με τυχόν εμφανείς επιπτώσεις στην υγεία (Barnett JA, 2000).

Το 1892 ένας ωφέλιμος συσχετισμός των μικροοργανισμών με το ανθρώπινο σώμα εξακριβώθηκε από τον Doberlein και σύμφωνα με αυτόν τα κολπικά βακτήρια

παράγουν γαλακτικό οξύ από τα σάκχαρα αναστέλλοντας ή και παρεμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων δημιουργώντας.

Ο Stanley Thomas το 1928 απομόνωσε και προσδιόρισε ότι το βακτήριο του Doberlein, ήταν ο *Lactobacillus acidophilus*. Όπως είναι γνωστό ο γαλακτοβάκιλλος *Lactobacillus acidophilus* βρίσκεται επίσης και στο γαστρεντερικό σωλήνα των ανθρώπων, των ζώων καθώς επίσης και των βρεφών τα οποία λαμβάνουν αρκετές ποσότητες γάλακτος, λακτόζης ή διατροφή η οποία περιέχει δεξτράνες.

Το 1905 ο Elie Metchnikoff, ο οποίος είχε συνεργαστεί με τον Pasteur στη δεκαετία του 1860, πιστώθηκε να κάνει τη σύνδεση της μακροζωίας βοσκών της Βουλγαρίας, όχι από το γιαούρτι που καταλάωναν αλλά με τους γαλακτοβάκιλλους που χρησιμοποιούνταν για τη ζύμωση του γιαουρτιού και την παρουσία αυτών των γαλακτοβάκιλλων στο παχύ έντερο βοσκών (Mackowiak, 2013). Συγκεκριμένα ο Elie Metchnikoff στην μελέτη του με τίτλο «Ο πρόλογος της ζωής» το 1908, υπέθεσε ότι το Lactic Acid Bacterio που ανιχνεύτηκε σε βουλγάρικα γιαούρτια, και έτσι ονόμασε το βάκιλλο βουλγάρικο και κατόπιν έγινε γνωστός ως *Lactobacillus bulgaricus*, (σήμερα ονομάζεται *L. debrueckii subsp bulgaricus*) και ο *Streptococcus thermophilus*, είναι υπεύθυνα για την ενδυνάμωση του εντερικού συστήματος παρεμποδίζοντας μικροβιακές ζυμώσεις με αποτέλεσμα τη μείωση των παραγόμενων ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, όπως αμίνες και αμμωνία. Έτσι για πρώτη φορά ο Metchnikoff επισήμανε τη σημαντικότητα των συγκεκριμένων μικροοργανισμών και τη συμβολή τους στην ανθρώπινη υγεία και στην μακροζωία. Αντίθετα, υπέθεσε ότι τα εντεροβακτήρια είναι περισσότερο επιβλαβή παρά αβλαβή στο σύνολο τους για την ανθρώπινη υγεία.

Το 1906, ο Γάλλος παιδίατρος Henry Tissier απομόνωσε τα *Bifidobacterium* καθώς παρατήρησε ότι ο αριθμός τους στα κόπρανα παιδιών με διάρροια ήταν μικρός σε σχέση με τον αριθμό τους στα κόπρανα υγιών παιδιών. Έτσι ισχυρίστηκε ότι θα μπορούσε η χορήγηση των *Bifidobacterium* να εκτοπίσει τα παθογόνα βακτήρια στο έντερο. Αυτές οι ανακαλύψεις βοήθησαν καταλυτικά στην έρευνα των μικρόβιων που προάγουν την ανθρώπινη υγεία καθώς και το ρόλο τους στην πρόληψη των ασθενειών. Έτσι το 1922, σε μια από τις πρώτες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκε ο *Lactobacillus acidophilus* σε 30 ασθενείς με χρόνια δυσκοιλιότητα, διάρροια, ή έκζεμα διαπιστώθηκαν βελτιώσεις και για τις τρεις περιπτώσεις (Rettger LF, Cheplin HA, 1922).

Το 1932, μία μελέτη επιβεβαίωσε την επίδραση του *L. acidophilus* σε ασθενείς με δυσκοιλιότητα προσθέτοντας επίσης και μια ακόμη θετική επίδραση του σε ασθενής με ψυχική νόσο (*Kopeloff N, Blackman N, McGinn B, 1932*).

Το 1930 καλλιεργήθηκε για πρώτη φορά από τον ιάπωνα ιατρό Minoru Shirota ένα στέλεχος ωφέλιμων εντεροβακτηρίων, το οποίο είχε την ικανότητα να φτάνει στο έντερο ζωντανό χωρίς να έχει υποστεί καταστροφή από το πεπτικό σύστημα. Στην αρχή ονομάστηκε *Lactobacillus casei* Shirota. Μέσα σε πέντε χρόνια, ανακάλυψε ένα προβιοτικό ρόφημα που περιείχε αυτόν τον πληθυσμό με το όνομα Yakult και αποτέλεσε τον «πατέρα» του πρώτου προβιοτικού προτείνοντας συγχρόνως ότι το σωστό μίγμα βακτηριδίων στο έντερο θα μπορούσε να αποτρέψει τις ασθένειες.

Ο όρος προβιοτικό προέρχεται από την ελληνική λέξη προ+βίος και τις τελευταίες δεκαετίες χρησιμοποιήθηκε με πολλές και διαφορετικές έννοιες. Αρχικά ο όρος «προβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει ενώσεις που παράχθηκαν από ένα πρωτόζωο το οποίο διέγειρε την ανάπτυξη ενός άλλου (*Lilly & Stillwell 1965*).

Η έρευνα σχετικά με τα προβιοτικά αρχικά επικεντρώθηκε κυρίως στην εξέταση πιθανών προβιοτικών στελεχών που απομονώνονται από τη φύση ή από τους ανθρώπινους ξενιστές, και τον καθορισμό των μηχανισμών των δράσεων των προβιοτικών στελεχών. Στη συνέχεια η έρευνα προήγαγε την κατανόηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων της φυσιολογικής χλωρίδας και την ικανότητά τους να μπορούν να αντισταθούν σε τυχόν εισβολή παθογόνων βακτηρίων, που ονομάζεται αντίσταση αποικισμού (*McFarland LV, 2000*).

Στη πορεία των ετών προτάθηκαν διάφοροι ορισμοί όπως των *Guamer and Schasfma (1998)*, όπου σύμφωνα με αυτόν τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι διαμέσου της πρόσληψης σε συγκεκριμένους αριθμούς προσφέρουν ευεργετικές επιδράσεις πέρα από τη βασική διατροφή, ενώ αντίθετα ο ορισμός των *Salminen et al., (1998)* υποστηρίζει ότι τα προβιοτικά βακτήρια είναι ζωντανά κύτταρα που υπάρχουν στον άνθρωπο και τα οποία χρησιμοποιούνται σαν συμπληρώματα διατροφής ή ως φαρμακευτικά σκευάσματα και έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν στον πέρασμά τους από το ανώτερο γαστρεντερικό σωλήνα και να αποικίζουν σταδιακά το έντερο καθώς προσκολλούνται στην βλέννα του εντερικού συστήματος ενώ ταυτόχρονα είναι ευεργετικά για την υγεία.

Τελικά οι **ειδικοί του οργανισμού FAO/WHO** (Food and Agricultural Organisation , Οργανισμός τροφίμων και Γεωργίας) **όρισαν τα προβιοτικά** «σαν τους ζωντανούς μικροοργανισμούς , οι οποίοι όταν καταναλωθούν σε επαρκείς ποσότητες σαν ένα μέρος της τροφής , συνεισφέρουν στην ευεργετική επίδραση του ξενιστή» (FAO/WHO , 2001). FAO/WHO (2001).

Το 2013 ο Παγκόσμιος Οργανισμός Γαστρεντερολογίας όρισε τις παγκόσμιες κατευθυντήριες γραμμές σχετικά με τα προβιοτικά και πρεβιοτικά αλλά και την EFSA για τους επιτρεπόμενους ισχυρισμούς υγείας, όπου με αυτόν τον τρόπο επιβεβαίωσε ότι η αποτελεσματικότητα των προβιοτικών αποτελείται από ειδικά στελέχη και από συγκεκριμένες δόσεις (πρέπει να περιέχονται τουλάχιστον 10⁸ cfu/g προϊόντος ανά δόση), καταρρίπτοντας έτσι τον μύθο ότι οποιοδήποτε γιαούρτι μπορεί να θεωρηθεί ως προβιοτικό (Guarner et al., 2011).

Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός προβιοτικό θα πρέπει σύμφωνα με τους *De Vrese & Schrezenmei (2008)* να πληροί τα παρακάτω κριτήρια.

- Πρώτον, θα πρέπει να είναι ασφαλείς για τον άνθρωπο δηλαδή να μην επιφέρει κάποια παθογένεια ή τοξικότητα.
- Δεύτερον, θα ήταν προτιμότερο να προέρχεται από τον εντερικό σωλήνα ενός υγιή ατόμου, έτσι ώστε να είναι ασφαλές για τους ανθρώπους και να ανταποκρίνεται στην οικολογία του εντέρου.
- Τρίτον, θα πρέπει να είναι ανθεκτικό στα γαστρικά και στα χολικά οξέα, να είναι επαρκώς ανθεκτικό στα πεπτικά ένζυμα για να καταστεί δυνατή η επιβίωσή του όταν περάσει τον εντερικό σωλήνα.
- Και τέλος, να επιβεβαιώνει τη θετική του επίδραση στην εντερική χλωρίδα, όπως βιωσιμότητα, προσκόλληση στα εντερικά επιθηλιακά κύτταρα και την ικανότητα της αναπαραγωγής στο ανθρώπινο έντερο

Πολλοί μικροοργανισμοί όπως οι μύκητες, ή ζύμες, βακτήρια ή ο μεικτός συνδυασμός τους, έχουν θεωρηθεί ή έχουν χρησιμοποιηθεί σαν προβιοτικά. Δύο γένη βακτηρίων που αναφέρονται κυρίως ως προβιοτικά είναι εκείνα του γένους *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (*Ohimain & Ofongo, 2012*).

1.4.1 Πρεβιοτικά και συμβιοτικά

Τα πρεβιοτικά είναι συστατικά των τροφών τα οποία δεν πέπτονται και επηρεάζουν αποτελεσματικά τον ξενιστή με το να ευνοούν την ανάπτυξη ή και την δραστηριότητα αριθμού βακτηρίων στο παχύ έντερο (Gibson and Robertfroid, 1995). Επίσης η προσέγγιση των προβιοτικών υποστηρίζει τον έλεγχο των μη βιώσιμων οντοτήτων και γι' αυτό ξεπερνά οποιαδήποτε άλλα προβλήματα βιωσιμότητας των προβιοτικών, στο ανώτερο εντερικό σύστημα. Επιπλέον ένα πρεβιοτικό μπορεί να θεωρηθεί σαν κατάλληλο υπόστρωμα, το οποίο δυναμώνει αποτελεσματικά τη μικροβιακή χλωρίδα του εντερικού συστήματος παρόλα αυτά, διαφέρει από τις κλασικές διαιτητικές ίνες οι οποίες επιλεκτικά ευνοούν την ανάπτυξη ή δραστηριότητα των ειδών *Bifidobacterium*. Ο γενικός ορισμός των διαιτητικών ινών αναφέρεται στα εναπομείναντα φυτικά κύτταρα τα οποία είναι ανθεκτικά στην υδρόλυση από τα ανθρώπινα ένζυμα και τα οποία ρυθμίζουν τους υδατάνθρακες και των μεταβολισμών των λιπιδίων στον ξενιστή (Trowell, 1972; Trowell et al, 1976; Schweizer and Wursch, 1991)

Ως **συν-βιοτικό** μπορεί να οριστεί «ένα μείγμα προβιοτικών και πρεβιοτικών που επηρεάζει ωφέλιμα τον ξενιστή βελτιώνοντας την επιβίωση της ωφέλιμης μικροχλωρίδας και τον εμπλουτισμό της με ζωντανά ευεργετικά βακτήρια που βρίσκονται σε διατροφικά συμπληρώματα αυτά στο γαστρεντερικό σωλήνα έχουν επιλεκτική ανάπτυξης ή/και ενεργοποίηση του μεταβολισμού ενός ή περιορισμένου προάγοντας την υγεία και βελτιώνοντας έτσι την καλή διαβίωση στο γαστρεντερικό σωλήνα» (Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995). Τα συμβιοτικά έχουν ως στόχο να ενισχύσουν την επιβίωση και τη δραστηριότητα των προβιοτικών όπως έχει αποδειχθεί in vivo, καθώς και την τόνωση των *Bifidobacterium*.

Το 2014, με μια ομόφωνη δήλωση ο **οργανισμός FAO/WHO** επανεξέτασε τα δεδομένα σχετικά με τα προβιοτικά και καθόρισε 3 μεγάλες κατηγορίες των προβιοτικών:

- (1) Προβιοτικά χωρίς ισχυρισμούς υγείας (γενικά θεωρούνται ασφαλή).
- (2) Προβιοτικά ως συμπλήρωμα διατροφής με συγκεκριμένο ισχυρισμό υγείας (ορίζεται το στέλεχος που χρησιμοποιείται, και η αποτελεσματικότητα του βασίζεται σε στοιχεία από κλινικές δοκιμές ή μετα-αναλύσεις, που χρησιμοποιούνται για την

ενίσχυση της φυσικής άμυνας ή μείωση των συμπτωμάτων και έχουν εγκριθεί από τη EFSA)

(3) Προβιοτικά ως φάρμακο (μετά από κλινικές δοκιμές για την συγκεκριμένη ένδειξη ή ασθένεια, ορίζεται το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε, αιτιολόγηση κινδύνου-οφέλους, αντιμετώπιση των ρυθμιστικών προτύπων για τα φάρμακα) (Hill C, Guarner F, Reid G, et al., 2014).

1.4.2. Μικροβιακή χλωρίδα εντέρου

Η εντερική χλωρίδα του ανθρώπου αποτελείται περίπου από 10^{14} βακτηριακά κύτταρα που ανήκουν σε εκατοντάδες διαφορετικά είδη, ενώ τα περισσότερα από αυτά είναι πιθανώς ακόμα άγνωστα. Η μεταβολική δραστηριότητα της μικροβιακής χλωρίδας είναι τόσο ποικιλόμορφη όσο και η ίδια η χλωρίδα. Τα βακτήρια αυτά είναι ικανά να ζυμώνουν ποικίλες ουσίες τις οποίες ο ξενιστής δεν έχει την ικανότητα να χωνέψει μόνος του όπως για παράδειγμα τα πρεβιοτικά. Η ανατομία, φυσιολογία καθώς και η ανοσολογία του ξενιστή επηρεάζονται από τα βακτήρια αυτά και από τα προϊόντα ζύμωσής τους (Gmeimer et al., 2000). Μερικές από τις ευεργετικές μεταβολικές δραστηριότητες των βακτηρίων του εντερικού συστήματος είναι η σύνθεση των βιταμινών Β και Κ, η παραγωγή των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA, Short Chain Fatty Acids, τα οποία αποτελούν πηγή ενέργειας των ιστών του ξενιστή), η μετατροπή των καρκινογόνων τροφίμων σε μη ενεργές ενώσεις καθώς και η μετατροπή των τροφοφαρμάκων σε ενεργά φάρμακα (Shanahan et al., 2002).

Το γαστρικό οξύ και η χολή παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στην άμυνα του σώματος ενάντια στην κατάποση των μικροοργανισμών, έχοντας την ικανότητα να ελέγχουν την έκθεση του γαστρεντερικού συστήματος από διάφορα παθογόνα. Ως εκ τούτου, ο ίδιος μηχανισμός άμυνας μπορεί επίσης να απενεργοποιήσει δυνητικά ωφέλιμα μικρόβια. Για τις επιδράσεις των προβιοτικών οι οποίες εξαρτώνται από την βιωσιμότητα και την φυσιολογική δράση στο έντερο, είναι κρίσιμη η επιβίωση του προβιοτικού στην παρουσία γαστρικού οξέος και των χολικών αλάτων της χολής στην ανώτερη γαστρεντερική οδό. Πολλές μελέτες έχουν διερευνήσει την αντοχή του *Bifidobacterium bifidum* BB-12 στο γαστρικό οξύ καθώς και στα χολικά άλατα. Μια μελέτη in vitro αξιολόγησε την αντοχή σε γαστρικό οξύ και σε χολικά οξέα σε πέντε στελέχη *Bifidobacterium*, καθώς επίσης και την ανάπτυξη σε ποικίλους υδατάνθρακες. Η ανοχή ελέγχθηκε σε pH 2, pH 3, pH 4 καθώς και 1% χολικά άλατα. Ο BB-12 παρουσίασε μια αρκετά καλή επιβίωση σε όλες τις τιμές pH, έχοντας την καλύτερη

επιβίωση συγκριτικά με τα υπόλοιπα στελέχη. Ωστόσο ο *BB-12* δεν αναπτύχθηκε καλά στο 1% της χολής, αλλά εμφάνισε υψηλά ποσοστά επιβίωσης σε χαμηλό pH (Vernazza, C.L., Gibson, G.R., Rastall, R.A. 2006).

Σε μια *in vitro* μελέτη συγκρίθηκαν 17 στελέχη με βάση την ανοχή τους σε οξύ όπου το pH κυμαίνονταν από 2 έως 5. Ο *BB-12* παρουσίασε υψηλά ποσοστά επιβίωσης. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα φάνηκε να οφείλεται εν μέρει λόγω του χαμηλού pH επαγωγής της H⁺-ATP-άσης, ένα σύμπλοκο ενζύμου το οποίο είναι υπεύθυνο για την διατήρηση της ενδοκυτταρικής ομοιόστασης του pH στα βακτήρια (Matsumoto, Ohishi and Benno, 2004). Σε μια άλλη μελέτη που διεξήχθη δοκιμάστηκαν 24 στελέχη καλλιέργειας γαλακτικών βακτηρίων καθώς και στελέχη προβιοτικών βακτηρίων για ανοχή σε γαστρικό υγρό και χολικά άλατα. Ο *BB12* έδειξε αρκετά υψηλή αντοχή όσον αφορά το pH μετά από τριώρη έκθεση του σε pH 3 και pH 2. Όσον αφορά την ανάπτυξη στην παρουσία χολικών αλάτων, ο *BB-12* έδειξε την ίδια ανάπτυξη και την ίδια αποσύζευξη (ικανότητα διάσπασης) στο ταύρο-δεοξυχολικό νάτριο και στο γλυκό-δεοξυχολικό νάτριο, ενώ αυξήθηκε υπό την παρουσία ταυρο-χολικού νατρίου και γλυκό-χολικού νατρίου, χωρίς να δείχνει καμία αποσύζευξη (Vinderola, 2003).

Σε μια έρευνα του Chr. Hansen η οποία αφορούσε την επιβίωση σε γαστρικά υγρά και χολικά άλατα, έγινε μια συγκριτική αξιολόγηση σε 60 bifidobacteria τα οποία απομονώθηκαν από ανθρώπους, όπου ο *BB-12* έδειξε να επιβιώνει καλύτερα εν συγκρίσει με τα υπόλοιπα ελεγχθέντα στελέχη και στις δύο περιπτώσεις. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας ένα τεχνητό σύστημα μοντέλου εντέρου (TIM-1) προσομοιώνοντας με αυτό τη διέλευση του γαστρικού οξέος και του ανώτερου τμήματος της εντερικής χολής, το 60% -80% του *BB-12* σε μια φυσιολογική δόση κάψουλας παραμένει βιώσιμο (Hansen, 2013).

Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι ο *BB-12* παρουσιάζει υψηλή αντοχή στα γαστρικά οξέα καθώς και στα χολικά άλατα σε σύγκριση με άλλα bifidobacteria και μπορεί να επιβιώσει σε περιβάλλον όπου υπάρχουν γαστρικά υγρά και χολικά άλατα, μετά την κατανάλωση τους από τον άνθρωπο.

1.4.3. Η μικροβιακή χλωρίδα του στομάχου

Αρκετοί μικροβιακοί πληθυσμοί έχουν βρεθεί στο γαστρεντερικό σύστημα, οι οποίοι προέρχονται από διαφορετικούς αριθμούς βακτηρίων που συσχετίζονται με τρόφιμα στην περιοχή του οισοφάγου από 10¹ σε 10³ CFU/ml στο στομάχι, 10⁹ CFU /

ml στον ειλεό , και περίπου $5 \cdot 10^{11}$ CFU /ml στο ακραίο τμήμα του παχέος εντέρου. Ο συνολικά εκτιμώμενος πληθυσμός των 10^{14} ζωτικών βακτηρίων στο γαστρεντερικό σύστημα των ενήλικων ανθρώπων, αντιπροσωπεύει περίπου 10 φορές περισσότερο πληθυσμό βακτηρίων σε σχέση με τους υπόλοιπους ιστούς του σώματος. Αυτός είναι ο λόγος που ο μικροβιακός πληθυσμός αντιπροσωπεύει ένα τεράστιο μεταβολικό δυναμικό το οποίο όχι μόνο συμβάλει στην διαδικασία πέψης αλλά αλληλεπιδρά ακόμη στην διαδικασία (απο)τοξίνωσης. Τα Bacterioides καθώς και τα Gram θετικά βακτήρια, τα γενικά αναερόβια Eubacterium και Bifidobacterium επικρατούν στο παχύ έντερο. Από την άλλη, ομάδες όπως τα Clostridia, Peptostreptococci, Streptococci και Lactobacilli παίζουν και αυτά σημαντικό ρόλο στην διατήρηση μιας σταθερής βλέννας στο έντερο και στην διατήρηση μιας ικανοποιητικής αναλογίας των λιπαρών οξέων μικρής αλυσίδας (SCFA) που πιθανώς παίζουν σημαντικό βιολογικό ρόλο στην πρόληψη και θεραπεία του μεταβολικού συνδρόμου, των διαταραχών του εντέρου και ορισμένων τύπων καρκίνου (Asarat et al., 2015).

Ορισμένοι μηχανισμοί προβιοτικών προϋποθέτουν βιωσιμότητα και φυσιολογική δραστηριότητα του προβιοτικού στη θέση στόχο. Δεδομένου ότι η θέση στόχος μπορεί να μην είναι καθορισμένη, προκειμένου να γίνει μέτρηση της βιωσιμότητας των προβιοτικών στον γαστρεντερικό σωλήνα γίνεται συνήθως ανάκτηση τους από τα κόπρανα.

Μια εικονική και παράλληλα ελεγχόμενη έρευνα αξιολόγησε την επίδραση ενός συμβιοτικού γιαουρτιού (δηλαδή γιαουρτιού με συνδυασμό προβιοτικού μικροοργανισμού και πρεβιοτικής ουσίας) που περιείχε το προβιοτικό στέλεχος BB-12 μαζί με ινουλίνη με σκοπό την ανάκτηση του BB-12. Από 46 εθελοντές συλλέχθηκαν δείγματα κοπράνων , καθώς παρακολούθηθηκαν αλλαγές στην μικροχλωρίδα χρησιμοποιώντας αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR). Τελικά ο BB-12 ανακτήθηκε στα δείγματα των κοπράνων και ήταν εφικτό να ανιχνευτεί στα κόπρανα σε ποσοστό $>90\%$ μέχρι και δύο εβδομάδες μετά τη λήψη (Palaria, Johnson-Kanda, O'Sullivan, 2012).

1.5. Βιολογικές ιδιότητες των goji berry.

Οι βιολογικές ιδιότητες των goji berry έχουν καταγραφεί μέσα από ένα μεγάλο αριθμό ερευνών και καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος ευεργετικών για τον άνθρωπο

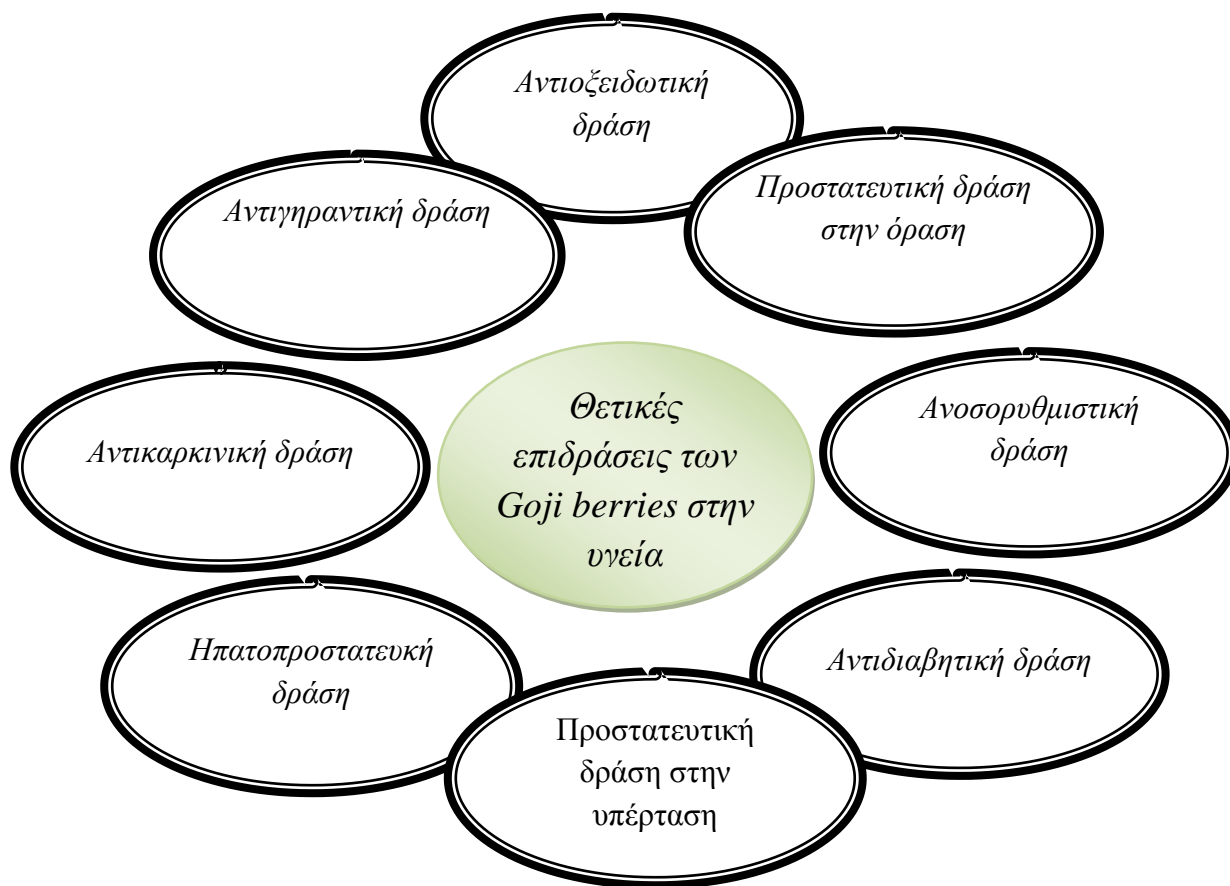
ιδιοτήτων (Εικόνα 20). Σύγχρονες έρευνες αποδεικνύουν ότι διαθέτει ένα μεγάλο εύρος ευεργετικών για τον άνθρωπο ιδιοτήτων όπως αυτές παρουσιάζονται στους πίνακες 8 & 9.

Ο χυμός από φρούτα goji έχει αναφερθεί ότι βελτιώνει το υποκειμενικό συναίσθημα της γενικής ευημερίας και της βελτίωσης των νευρολογικών και ψυχολογικών επιδόσεων της βελτίωσης της ποιότητας του ύπνου, μείωσης του στρες και της αίσθησης αδυναμίας. (Amagase and Nance, 2008; Hsu et al., 2012).

Επιπρόσθετα εκτός των καρπών, οι ρίζες και τα φύλλα των goji berry περιέχουν συστατικά που διαθέτουν μία ποικιλία βιοδραστικών ιδιοτήτων. Ο φλοιός ρίζας των μούρων goji έχει αποδειχθεί ότι έχει υποτασικές, υπογλυκαιμικές, αντιπυρετικές σε πειραματόζωα και χρησιμοποιείται στην ανατολική ιατρική ως τονωτικό για την ανακούφιση του βήχα, της υπέρτασης και του σακχαρώδη διαβήτη (Yao et al., 2018).

Τα goji berry έχει καταγραφεί ότι διαθέτουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες μέσω της εξουδετέρωσης της οξειδωτικής δράσης των ελεύθερων ριζών αλλά και ενεργοποίησης αντιοξειδωτικών μηχανισμών (Πίνακας 8) όπως π.χ. της αύξησης της γλουταθειώνης (GSH), των αντιοξειδωτικών ενζύμων υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), της καταλάσης (CAT), της περοξειδάσης της γλουταθειώνης (GPx) αλλά και του πυρηνικού παράγοντα (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) που ρυθμίζει την έκφραση αρκετών αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών ενζύμων (Cao et al., 2017). Έτσι για παράδειγμα εκχύλισμα *L. barbarum* εμφάνισε δέσμευση των ριζών ανιόντων υπεροξειδίου μειώνοντας τη δραστηριότητα τους (Wu et al., 2004). Από την άλλη εκχύλισμα αιθανόλης (70%) του *L. chinense* προστατεύει τα ηπατικά κύτταρα έναντι οξειδωτικών προκαλούμενη από το στρες κυτταρική βλάβη με την απομάκρυνση των ενδοκυτταρικών ROS, ανάκτηση SOD, CAT, και τη δράση της γλουταθειώνης, τη μείωση της οξείδωσης των λιπιδίων, την καταστροφή του DNA και τις τιμές καρβονυλίου πρωτεϊνών (Zhang et al., 2010). Ενώ οι Changbo and Zhaojun, (2012) παρουσίασαν ότι η χορήγηση LBP σε ποντικούς μπορεί να περιορίσει το οξειδωτικό στρες που προκαλείτε μετά από άσκηση κολύμβησης αυξάνοντας τα αντιοξειδωτικά ένζυμα SOD, CAT και GPx.

Τέλος οι He et al., (2014), Cao et al., (2017) και Li et al., (2017) διευκρίνισαν τους προστατευτικούς μηχανισμούς δράσης σε βιοχημικό επίπεδο των goji berry σε σχέση με την επαγωγή του πυρηνικού παράγοντα Nrf2.



Εικόνα 20. Κύριες ευεργετικές δράσεις των goji berry (Jin et al., 2012) .

Εκτός από την αντιοξειδωτική τους δράση, τα goji berry παρουσιάζουν επίσης ηπατοπροστατευτική δράση μέσω άλλων μηχανισμών, όπως η έκφραση της ρύθμισης του κυτοχρώματος P450 και τη βελτίωση της βιωσιμότητας των ηπατικών κυττάρων μέσω της αναστολής της απόπτωσης (Alharbi et al., 2017 ; Zhang et al., 2010).

Πίνακας 11. Βιολογικές ιδιότητες των goji berry.

Φυτικό υλικό, Εκχύλισμα Βιοδραστικό συστατικό,	Βιολογική Ιδιότητα	Ερευνητική Πηγή
Φλαβονοειδή, πολυσακχαρίτες, Λιπαρά οξέα, εκχυλίσματα, καροτένια	Αντιοξειδωτική	<i>Wu et al., (2004); Lin et al., (2009); Zhang et al., (2010); He et al., (2014); Wang et al., (2010); Changbo and Zhaojun, (2012); Donno et al., (2015); Du et al., (2016); Zhou et al., (2016) ; Benchennouf et al., (2017); Cao et al., (2017); Li et al., (2017)</i>
Καρποί, πολυσακχαρίτες, βιταμίνες, χρωστικές	Αντιγηραντική	<i>Li et al., (2007); Chang and So (2008); Bucheli et al., (2011); Yi et al., (2013)</i>
Πολυσακχαρίτες, Καροτένια (Λουτεΐνη & Ζεοξανθίνη)	Προστασία του αμφιβληστροειδούς (όραση)	<i>Tang et al., (2011); Mi et al., (2012); Ni et al., 2013; Pavan et al., (2014); Yang et al., (2017)</i>
Φρούτα, Πολυσακχαρίτες, διπαλμιτική ζεοξανθίνη φλαβονοειδή, βεταΐνη,	Ηπατοπροστατευτική	<i>Zhang et al., (2010); Cui et al., (2011); Xiao et al., (2012); Xia et al., (2014); Ahn et al., (2014); Alharbi et al., (2017); Liu et al., (2017)</i>
Πολυσακχαρίτες, σύμπλεγμα πρωτεϊνών/ πολυσακχαριτών χρωστικές	Ανοσοδιεγερτική	<i>Gan et al., (2004); Chao et al., (2006); Chen et al., (2009) ; Amagase et al., (2009); Tang et al., (2012); Zhang et al., (2014); Xie et al., (2016); Jian et al., (2016) Ren et al., (2017).</i>
Πολυσακχαρίτες (καρπός <i>L. barbarum</i>)	Σπερματογένεση	<i>Luo et al., (2014a); Quian and Yu, (2016); Shi et al., (2017)</i>
Σύμπλεγμα πρωτεϊνών / πολυσακχαριτών, εκχυλίσματα καρπού	Αντικαρκινική	<i>Ceccarini et al., (2016), Gan et al., (2004); Zhu and Zhang, (2013); Mao et al., (2011); Amagase and Farnsworth, (2011a); Zhao et al.,</i>

		(2016); Zhou et al., (2017);Zhang et al., (2007).
Χυμός, πολυσακχαρίτες, γλυκοσυμπλέγματα	Προστασία του δέρματος	Zhao et al., (2005);; Reeve et al., (2010)liang Changbo and Zhaojun (2012).
Υδατικά εκχυλίσματα, πολυσακχαρίτες, οργανικά οξέα και αλκαλοειδή	Αντιδιαβητική	Luo et al., (2004), Wu et al., (2006); Li XM., (2007), Ye et al., (2008); Song et al., (2012); Zhu et.al., (2013); Zhao et al., (2014);Cai et al., (2015)
Luciumoside I, διαλυτό κλάσμα σε αιθανικό αιθυλεστέρα, Εκχύλισμα φύλλων, άνθεων, καρπών.	Αντιμικροβιακή	Terauchi et al., (1998) ; Kim at al., (2000); Fit et al., (2013); Mocan, et al., (2014); Nikolaeva-Glomb L. et al., (2014); Mocan et al., (2015);
Υδατικά εκχυλίσματα, πολυσακχαρίτες, αλκαλικά εκχυλίσματα	Νευροπροστατευτική	Ho et al., (2009) Ho et al., (2010) ; Im et al., (2013); Wang et al., (2014)
Έλαιο από τους σπόρους του καρπού, πολυσακχαρίτες,	Προστασία από την αθηροσκλήρωση	Jiang et al., (2007), Ma et al., (2009)
Υδατικά εκχυλίσματα, πολυσακχαρίτες,	Προστασία από την υπέρταση	Kim at al., (1997); Mi et al., (2012a) ; Mi et al., (2012b); Zhang et al. (2015)
Υδατικά εκχυλίσματα Πολυσακχαρίτες, βεταΐνη,	Προστασία από την κούραση	Amagase and Nance, 2008; Kim and Baek, (2014)
Πολυσακχαρίτες (καρπός <i>L. barbarum</i>)	Πρεβιοτική & συμβιωτική	Amagase and Farnsworth, (2011); Rotar et al., (2015)

Τα goji berry, δυνητικά μπορεί να έχουν θετική δράση στον έλεγχο του σακχάρου στο αίμα όπως καταγράφεται στις σχετικές μελέτες του πίνακα 8. Σε μία εξ αυτών των μελετών, δόθηκε εκχύλισμα goji berry, σε αρουραίους με διαβήτη τύπου 2 για τέσσερις εβδομάδες. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των αρουραίων, μειώθηκαν στο 35% (Wu et al., 2006).

Επίσης παρουσιάζει θετικές επιδράσεις όπως αυτές καταγράφονται στους πίνακες 11 & 12 στη μείωση του κίνδυνου της αρτηριοσκλήρωσης της αρτηριακής υπέρτασης, του διαβήτη της όρασης, ανοσοδιεγερτική, νευροπροστατευτική, αντιγηραντική και ευεργετικές ιδιότητες στην προστασία του δέρματος και της θεραπείας της υπογονιμότητας επάγοντας τη σπερματογένεση. (Ni et al., 2013; Amagase, Sun and Nance, 2009; Cao et al., 2017; Reeve et al., 2010; Shi et al., 2017)

Επίσης μελέτες που έχουν διενεργηθεί με φαινολικές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από τα φύλλα των ποικιλιών *Lycium barbarum* και *chinense* έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα είχαν ισχυρή βακτηριοκτόνο δράση έναντι των gram θετικών αλλά και των gram αρνητικών βακτηρίων. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα των φύλλων της ποικιλίας *Lycium chinense* ήταν πιο ισχυρά, ενώ το βακτήριο στο οποίο ήταν πιο ισχυρή η επίδραση των εκχυλισμάτων ήταν ο *Bacillus subtilis*. (Mocan et al., 2014).

Πίνακας 12: Πρόσφατες μελέτες για το goji berry.

Βιβλιογραφική πηγή	Αντικείμενο μελέτης	Χρόνος διεξαγωγής της μελέτης	Συμπέρασμα μελέτης
Cao et al., 2017	Κύτταρα PC12 και επίδραση με CoCl ₂ σε 64 ποντίκια	10 ημέρες	Νευροπροστατευτική δράση των LBP στα κύτταρα PC12 μετά από επίδραση με H ₂ O ₂ καθώς και ενεργοποίηση της επαγωγής του πυρηνικού παράγοντα Nrf2
Du et al., 2016	64 ποντίκια	4 εβδομάδες	Μείωση των επιπέδων λευκοματίνης, της αζωτούχο ουρίας στο αίμα και των επιπέδων IL-2, IL-6, TNF-α, IFN-α και ICAM-1, αύξηση της δραστηριότητας SOD και GSH-Px και αναστολή έκφρασης της NP-κΒ σε νεφρικούς ιστούς
Zhou et al., 2016	30 ποντίκια	14 ημέρες	Οι LBP επέδειξαν προστατευτική δράση έναντι μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού των οστών από την απόπτωση που προκαλείται από ιονίζουσα ακτινοβολία και την οξειδωτική βλάβη
Cai et al., 2015	67 ασθενείς 2 τύποι διαβήτη (30 control+37 LBP grup)	3 μήνες	Προστατευτική δράση έναντι δύο τύπων διαβήτη μειώνοντας τη γλυκόζη στον ορό του αίματος και αυξάνοντας τον ινσουλινο-γενετικό δείκτη
Zhao et al., 2015	40 διαβητικά ποντίκια	6 εβδομάδες	Προστατευτική δράση έναντι του διαβήτη λόγω διαίτας με υψηλά λιπαρά και στρεπτοζοτοκίνη
Zhu and Zhang, 2013	κύτταρα καρκίνου της μήτρας	6 ημέρες	Το LBP θα μπορούσε να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων της μήτρας (HeLa) με την αλλαγή της κατανομής του κυτταρικού κύκλου και την επαγωγή της απόπτωσης.
Ni et al., 2013	40 ποντίκια	50 ημέρες	Προστατευτική δράση αμφιβληστροειδούς χρήση εκχυλίσματος <i>L. barbarum</i>
Hsu et al., 2012	81 ενήλικες	30 ημέρες	Το ενεργό δείγμα μετά από κατανάλωση χυμού GoChi® (FreeLife International, Phoenix, AZ, USA) έδειξε σημαντικές βελτιώσεις στην αδυναμία, το άγχος, την ψυχική οξύτητα, την ευκολία στην αφύπνιση, τη δύσπνοια, την εστίαση στη δραστηριότητα, την ποιότητα του ύπνου, την ονειροπόληση και τα γενικά συναισθήματα υγείας και ευεξίας κάτω από ένα μοντέλο τυχαίων αποτελεσμάτων.
Rivera et al., 2012	1 ενήλικα	1 εβδομάδα	Αναφορά αιμορραγίας από τον ορθό, μώλωπες και ρινική αιμορραγία σε άτομο που είχε καταναλώσει χυμό με βαρφαρίνη
Vidal et al., 2012	150 ενήλικες	3 μήνες	Βελτίωση της ανοσολογικής αντίδρασης κατά του εμβολίου γρίπης με χρήση προϊόντος με βάση το γάλα και goji berry.
Amagase and Nance, 2011	29 ενήλικες	14 ημέρες	Ευεργετικές δράσεις έναντι της παχυσαρκίας με κατανάλωση χυμού <i>L. barbarum</i> , άσκησης και διαίτας. Αύξηση του μεταβολικού ρυθμού και της ενεργειακής δαπάνης σε κατάσταση ανάπαυσης.
Ballarin et al., 2011	2 ενήλικες	24 ώρες	Αναφορά δερματικών αλλεργιών μετά από κατανάλωση χυμού
Cui et al., 2011	50 ποντίκια	30 ημέρες	Αναστέλλουν τη δράση των καρκινικών κυττάρων του κόλον ανάλογα με την αύξηση της δόσης.
Wu et al., 2010	50 ποντίκια	2 μήνες	Οι LBP μείωσαν την χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, τη γλυκόζη στο αίμα, τα TBARS (αντιδρώντες ουσίες μεθειοβαρβιτουρικό οξύ) και αύξησαν τα επίπεδα SOD, GSH-Px, και καταλάσης.
Amagase, Sun and Borek, 2009	50 ενήλικες	30 ημέρες	Αύξηση των επιπέδων GSH-Px, SOD και MDA με 120 mL χυμού <i>L. barbarum</i>
Amagase, Sun and Nance, 2009	60 ενήλικες	30 ημέρες	Αύξηση των επιπέδων των λεμφοκυττάρων, της ιντερλευκίνης-2 και της ανοσοσφαιρίνης G με κατανάλωση χυμού <i>L. barbarum</i>
Amagase and Nance, 2008	35 ενήλικες	14 ημέρες	Βελτίωση του υποκειμενικού συναισθήματος της γενικής ευημερίας και της βελτίωσης των νευρολογικών και ψυχολογικών επιδόσεων, της βελτίωσης της ποιότητας του ύπνου, της μείωσης του στρες και της αίσθησης αδυναμίας

Σε άλλη μελέτη εκχυλισμάτων των ανθέων των δύο ποικιλιών, βρέθηκε ότι τα εκχυλίσματα των ανθέων της ποικιλίας *L. barbarum*, να είναι πιο δραστικά στα Gram θετικά βακτήρια και ειδικότερα έδειξαν την πιο ισχυρή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*. (Mocan et al., 2015). Άλλη μελέτη (Nikolaeva-Glomb et al., 2014), που πραγματοποιήθηκε σε goji berry στην Βουλγαρία, είχε σαν αποτέλεσμα πως τα εκχυλίσματα όλων των δοκιμασμένων goji berry, να αναστέλλουν την αντιγραφή του CV-B1 (*coxsackievirus B1*, που προκαλεί ασθένειες οι οποίες κυμαίνονται από ήπιες γαστρεντερικές διαταραχές έως πλήρη περικαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα) και του ιού της γρίπης τύπου Α. Το CV-B1 αναστέλλεται στον υψηλότερο βαθμό τόσο από το μυρτίλο όσο και από τη φράουλα, καθώς και από τα συνολικά εκχυλίσματα του goji berry. Τα κλάσματα της ανθοκυανίνης όλων των goji berry, αναστέλλουν έντονα τον αναδιπλασιασμό του ιού της γρίπης Α/Η3Ν2.

Άλλες μελέτες που έχουν διενεργηθεί σχετικά με την πρεβιοτική δράση των καρπών goji berry υποδεικνύουν ότι οι πολυσακχαρίτες (LBP) τους λειτουργούν ως βιοενεργές ίνες ή πρεβιοτικά, συμβάλλοντας στη σύνθεση και αποδέσμευση των αντιοξειδωτικών από προβιοτικά βακτήρια και αναστέλλουν τη φλεγμονή. (Amagase et al., 2011). Έτσι, οι γαστρεντερικές επιδράσεις των LBP μπορεί να οδηγήσουν σε αντιοξειδωτική δράση εντός της γαστρεντερικής οδού πριν από την απορρόφηση του LPB ή των ενώσεων αποδόμησης του.

Τέλος σε μελέτη ελέγχου της προβιοτικής δράσης των καρπών goji berry σε καλλιέργειες γιαουρτιών βρέθηκε ότι η προσθήκη καρπών goji berry συνέβαλε με την προβιοτική τους δράση στη διατήρηση των γαλακτικών βακτηρίων (LAB) διατηρώντας το αριθμό αυτών στο τρόφιμο σε προβιοτικά επίπεδα (10^6 - 10^7 log CFU/ml) για 21 ημέρες σε σχέση με το 10^3 log CFU/ml δείγμα στο οποίο δεν είχαν προστεθεί goji berry (Rotar et al., 2015).

1.6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ

Έχοντας ήδη νέες εγκαταστημένες καλλιέργειες στον Ελλαδικό χώρο και ξεκινώντας τη δημιουργία μονάδων επεξεργασίας των καρπών προέκυψε η ανάγκη της βιοδραστικής αξιολόγησής τους και σύγκρισης των παραγόμενων καρπών με τους εισαγόμενους.

Ο σκοπός λοιπόν της παρούσας έρευνας ήταν η κάλυψη του προαναφερόμενου κενού με την εκτίμηση της περιεκτικότητας σε βιοδραστικά συστατικά των καρπών goji berry Θεσσαλικής προέλευσης σε σύγκριση με ανάλογους εισαγόμενους καρπούς και η αξιολόγηση των ευεργετικών για την υγεία του ανθρώπου δράσεων τους.

Επίσης ανέκυψε και το ενδιαφέρον για την παραγωγή συμπυκνωμένων σε βιοδραστικά συστατικά προϊόντων (εκχυλισμάτων) με στόχο την χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων αλλά και φαρμάκων και για το λόγο αυτό η ανάπτυξη μιας βελτιστοποιημένης διαδικασίας παραλαβής τους αποτέλεσε έναν από τους στόχους.

Ενώ ακόμη ένας βασικός σκοπός αποτέλεσε η αξιολόγηση των ευεργετικών για την υγεία βιολογικών δράσεων τους μέσω της διερεύνησης των αντιοξειδωτικών, αντιμεταλλαξιγόνων και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων οι οποίες αντικατοπτρίζουν έναν σημαντικό μηχανισμό της χημειοπροστατευτικής δράσης τους. Ενώ στους στόχους συμπεριλήφθηκε και η αξιολόγηση των πρεβιοτικών δράσεων των εκχυλισμάτων με σκοπό να δώσουμε ακόμη μια πιθανή αξιοποίησή τους στη βιομηχανία τροφίμων για την παραγωγή συμβιωτικών παρασκευασμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Βελτιστοποίηση της εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων από τους καρπούς goji berry (*Lycium barbarum*), και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. Βελτιστοποίηση της εκχύλισης των goji berry (*Lycium barbarum*), υποβοηθούμενης από υπερήχους και αξιολόγηση της βιοδραστικότητας των εκχυλισμάτων.

Μελετήθηκαν goji berry, τα οποία ξηράθηκαν στον ήλιο, πιστοποιημένα ως ποικιλία *Lycium Barbarum*, που παράγονται στην περιοχή Ningxia στην Κίνα. Επιπλέον, τα Ελληνικά goji berry της ίδιας ποικιλίας, συλλέχθηκαν στο ίδιο στάδιο της ωριμότητας με βάση το χρώμα, το μέγεθος και το χρόνο συλλογής (5 εβδομάδες μετά από άνθηση), από μια πειραματική φυτεία 2 ετών, που βρίσκεται στην περιοχή της Θεσσαλίας κοντά στην πόλη της Λάρισας και στη συνέχεια αποξηράθηκαν από τον ήλιο. Η υδατική υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους (UAE), είναι μια προηγμένη τεχνική πράσινης εκχύλισης, που χρησιμοποιεί υπέρηχους για να αυξήσει τη συχνότητα και την ταχύτητα της μοριακής κίνησης, να αυξήσει την ισχύ διείσδυσης του διαλύτη, να αυξήσει το ρυθμό διάλυσης, να μειώσει τον χρόνο εκχύλισης και να αυξήσει την απόδοση των υψηλών σε ποιότητα βιοενεργών εκχυλισμάτων από φυσικά υλικά (Pico, 2013, Liu et al., 2014). Η χρήση των υπερήχων, είναι μια γρήγορη και αποτελεσματική διαδικασία εκχύλισης, που επιτρέπει την εξαγωγή πολυσακχαριτών και λειτουργικών ενώσεων όπως οι πολυφαινόλες σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και διατηρεί τις δομικές και μοριακές ιδιότητες των περιεχόμενων βιοενεργών, που καθορίζουν τη βιολογική δραστηριότητα (Chua et al., 2009, Romdhane and Gourdon, 2002).

Η περιεκτικότητα σε υγρασία όλων των δειγμάτων, μετρήθηκε με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105°C χρησιμοποιώντας την εγκεκριμένη επίσημη μέθοδο (AOAC 935.29- Association of Official Analytical Chemists). Και τα δύο είδη δειγμάτων στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία ψύξης (0-4°C) για περαιτέρω ανάλυση. Η υγρασία όλων των δειγμάτων ήταν 12,7% ± 0,4% w/w. Η απόκλιση 0,4% από τη μέση τιμή 12,7%, ελήφθη υπόψη στις μετρήσεις των συνολικών υδατανθράκων, των ολικών στερεών και στη συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες.

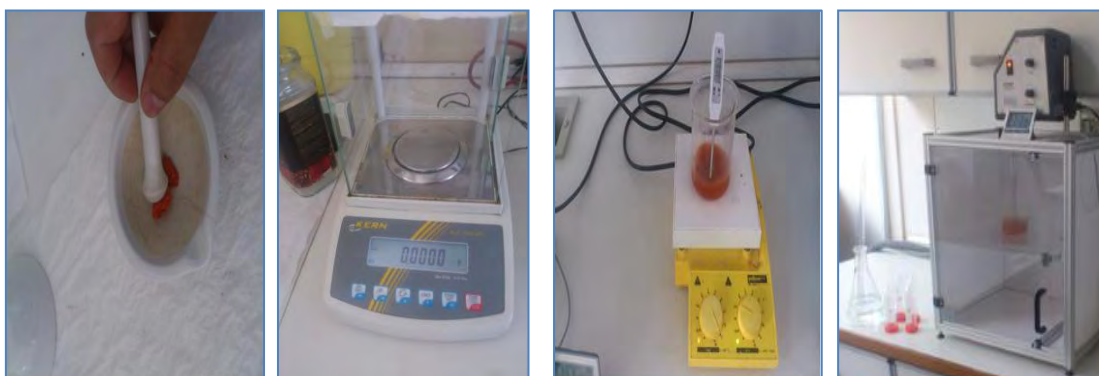
2.2. Υλικά και Μέθοδοι.

2.2.1. Διαδικασία εκχύλισης.

Εφαρμόστηκε μια διαδικασία εκχύλισης που περιγράφεται παρακάτω με την παραλλαγή των βασικών παραμέτρων για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης των βιοδραστικών ενώσεων με τη διαδικασία πειραματικού σχεδιασμού **Box-Behnken** (βλέπε Κεφ. 2.2.7.)

Συγκεκριμένα τα δείγματα καταψύχθηκαν με υγρό άζωτο και μετά κονιοποιήθηκαν σε σκόνη χρησιμοποιώντας γουδί. 2,5 g σκόνης από κάθε δείγμα εκχυλίστηκαν με αποσταγμένο νερό, χρησιμοποιώντας 50, 75 ή 100 ml νερού, ανάλογα με την αναλογία αραίωσης που χρησιμοποιείται σε κάθε μια από τις επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες, σε ποτήρι ζέσεως των 250 ml.

Η διαδικασία της εκχύλισης περιλάμβανε τα στάδια προθέρμανσης του μίγματος στην επιλεγμένη πειραματική θερμοκρασία (45, 55 και 65°C) και όταν αυτή η θερμοκρασία επιτεύχθηκε, τα δείγματα εισήχθησαν στη συσκευή υπερήχων (*Hielscher UP400 S –Teltow Germany*) (Εικόνες 21, 22, 23 και 24). Η ισχύς των υπερήχων ρυθμίστηκε στα 138, 253 και 368 W/cm². Ο χρόνος εκχύλισης ρυθμίστηκε στα 20, 30 και 40 λεπτά αντίστοιχα σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό. Οι παράμετροι του πειραματικού σχεδιασμού που τέθηκαν για την αριστοποίηση της εκχύλισης ήταν: η αναλογία του νερού προς goji berry, η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης και η ισχύς των υπερήχων. Το εύρος αυτών των παραμέτρων προσδιορίστηκε με την διεξαγωγή αρχικών πειραμάτων εκχύλισης με τη χρήση τοπικής προέλευσης καρπών goji berry, όπου ο στόχος ήταν η εξάρτηση της απόδοσης εκχύλισης σε σχέση με κάθε μία από τις παραμέτρους, ακολουθώντας την μέθοδο που περιγράφεται από τους Wang et al. (2014). Τα λαμβανόμενα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στα 20.000 g για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διατηρήθηκε σε καταψύκτη στους -20°C, μέχρις ότου γίνει περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνες 21, 22, 23 και 24: Στάδια διαδικασίας εκχύλισης:

(21) Κονιορτοποίηση με χρήση υγρού αζώτου.(22) Ζύγιση κονιορτοποιημένης καρπού.(23) Θέρμανση αραιωμένου υδατικού διαλύματος καρπού ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας και αναλογίας νερού του πειράματος.(24) Εκχύλιση υδατικού διαλύματος με χρήση υπερήχων ανάλογα με τις συνθήκες έντασης υπερήχων και χρόνου εκχύλισης του πειράματος.

2.2.2. Προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας των υδατανθράκων στα εκχυλίσματα.

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας των υδατανθράκων εκτελέστηκε σύμφωνα με την χρωματομετρική μέθοδο (μέθοδος φαινόλης / θείου) DuBois et al., (1956). Με τη χρήση της αντίδρασης φαινόλης-θειικού οξέος, η μέθοδος προσδιορίζει την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε υδατάνθρακες. Εν συντομία, 1 ml εκάστου εκχυλίσματος αναμίχθηκαν με 0,5 ml. φαινόλης 4% και 2,5 ml. θειικού οξέος 95% και μετά από επώαση 10 λεπτών, η οπτική πυκνότητα μετρήθηκε στα 490 nm. Η συνολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες υπολογίστηκε με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης της D-γλυκόζης και εκφράστηκε σε g υδατανθράκων / lt εκχύλισμα. Η περιοχική γραμμικότητα της πρότυπης D-γλυκόζης προσδιορίστηκε ως 0,01 έως 0,1 mg / lt ($R^2=0,9918$).

Η εξίσωση ελήφθη με γραμμική παλινδρόμηση: $y = 8,0357x + 0,0111$, όπου y είναι απορρόφηση στα 490 nm και x είναι συγκέντρωση D-γλυκόζης (mg/lt). Η ανάλυση επαναλήφθηκε 3 φορές.

2.2.3. Προσδιορισμός % περιεκτικότητας ολικών στερεών των εκχυλισμάτων.

Τα επί τοις % στερεά στο εκχύλισμα προσδιορίστηκαν χρησιμοποιώντας την επίσημη μέθοδο AOAC 935.29, ζυγίζοντας 3 ml από κάθε εκχύλισμα πριν και μετά την ξήρανση στους 105°C για 24 ώρες. Ο ζυγός ακριβείας (KERN ALS 220-4N, Γερμανία) χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις μετρήσεις.

2.2.4. Προσδιορισμός % της απόδοσης εκχύλισης.

Η απόδοση % εκχύλισης (Y) κάθε πειράματος υπολογίστηκε με τον τύπο:

$$Y \left(\%, \frac{w}{w} \right) = \left[\text{Ξηρά ουσία σε εκχύλισμα 3ml (g)} * \left(\frac{\text{ml απεσταγμένου νερού σε κάθε εκχύλιση}}{3\text{ml}} \right) \right] * \frac{100}{2,5 \text{ g}}$$

Ο τύπος βασίστηκε στο γεγονός ότι για τον υπολογισμό της απόδοσης εκχύλισης % χρησιμοποιήθηκαν 3 ml από κάθε εκχύλισμα, το οποίο ελήφθη από 2,5 g εκάστου ξηρού δείγματος, με μεταβλητούς όγκους αποσταγμένου νερού (50, 75 ή 100 ml).

2.2.5. Προσδιορισμός ολικών πολυφαινόλων των εκχυλισμάτων.

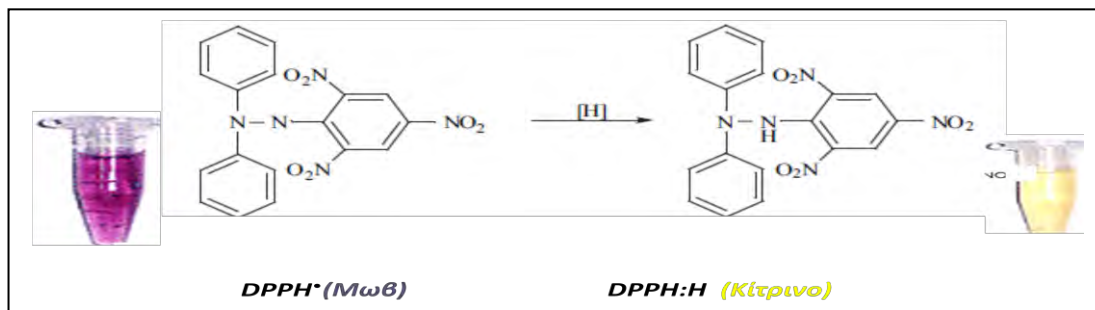
Μια ελαφρώς τροποποιημένη εκδοχή της μεθόδου των Singleton, Orthofer και Lamuela-Raventos (1999) και Waterhouse (2001) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συνολικής περιεκτικότητας πολυφαινόλης εκφρασμένης ως γαλλικό οξύ. Τα εκχυλίσματα (0,1 ml σε κατάλληλη αραιώση) προστέθηκαν σε 5 ml απιονισμένου νερού και 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu. Στα τυφλά δείγματα, προστέθηκαν 5,1 ml αποσταγμένου νερού και 0,5 ml αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu.

Μετά την ανάμιξη, τα δείγματα αφέθηκαν για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και προστέθηκαν 1,4 ml ενός διαλύματος ανθρακικού νατρίου 25% w/v (Na_2CO_3) και 3 ml αποσταγμένου νερού. Το μείγμα αφέθηκε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι και η απορρόφηση στα 765 nm μετρήθηκε χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Thermo scientific evolution 201. Η οπτική πυκνότητα μόνο των εκχυλισμάτων (0.1 ml σε κατάλληλη αραιώση) σε 1.4 ml ενός διαλύματος 25% w/v Na_2CO_3 και 8.5 ml αποσταγμένου νερού μετρήθηκε επίσης στα 765 nm. Η συνολική φαινολική περιεκτικότητα προσδιορίστηκε με μια πρότυπη καμπύλη τιμών απορρόφησης που προέκυψαν από τα πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης του γαλλικού οξέος (GA). Η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες (TPC) εκφράστηκε σε mg ισοδυνάμου γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο ξηρού βάρους.

2.2.6. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων (μέθοδος DPPH).

Η μέθοδος (Brand-Williams *et al.*, 1995, Kosar *et al.*, 2003), ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο ($DPPH^{\bullet}$). Η ρίζα $DPPH^{\bullet}$ μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (*single electron transfer, SET*) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (*hydrogen atom transfer, HAT*) (Prior *et al.*, 2005). Η $DPPH^{\bullet}$, είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση

τότε η ρίζα ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (*DPPH:H*), όπως φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 25: Η ρίζα $DPPH^{\bullet}$, που έχει σκούρο μωβ χρώμα, ανάγεται και αποχρωματίζεται προς το κίτρινο.

Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά. Εν συντομία, 1ml μεθανολικού διαλύματος ρίζας $DPPH^{\bullet}$ (100 μM) αναμείχθηκε με τα εξετασθέντα εκχυλίσματα διαλυμένα σε αποσταγμένο νερό σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Επώαστηκαν σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 λεπτά και η μετράται η απορρόφηση στα 517 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν και τουλάχιστον σε δύο ξεχωριστές περιπτώσεις. Το ποσοστό της ικανότητας αναστολής της ρίζας (*RSC*) των εξετασθέντων εκχυλισμάτων υπολογίστηκε σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$\% DPPH^{\bullet} \text{ radical scavenging activity} = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$$

Σύμφωνα τα παραπάνω, προσδιορίστηκε η αποτελεσματική συγκέντρωση IC_{50} των εκχυλισμάτων και συσχετίστηκε με τη συνολική αντιοξειδωτική τους ισχύ, ώστε να καταστεί δυνατή η άμεση σύγκριση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των διαφόρων εκχυλισμάτων.

2.2.7. Πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken.

Ο πειραματικός σχεδιασμός Box-Behnken (*BBD*) επιλέχθηκε για την δυνατότητα να παρέχει ένα δίκτυο πειραματικών σημείων, που θα χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης με βάση την περιεκτικότητα των εκχυλισμάτων σε ολικούς υδατάνθρακες, πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική

τους ικανότητα. Αυτή η στατιστική διαδικασία έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη βελτιστοποίηση διαδικασιών, λόγω της αποδεδειγμένης αποτελεσματικότητάς της, στην οικοδόμηση εξισώσεων πρόβλεψης (Box & Behnken, 1960; Box & Wilson, 1951; Han, Jiang & Zhang, 2011; Li et al., 2013; Wang et al., 2014; Xia et al., 2011; Yin and Dang, 2008). Για το πείραμα BBD, επιλέχθηκαν τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές οι οποίες ήταν: η αναλογία διαλύτη νερού προς ξηρά goji (C1=20-30-40 ml/g), η θερμοκρασία εκχύλισης (C2=45-55-65°C), η ισχύς των υπερήχων (C3=138-253-368 W/cm²) και ο χρόνος εξαγωγής (C=20-30-40 min).

Το εύρος αυτών των παραμέτρων εξαγωγής προσδιορίστηκε όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, όπου ο στόχος ήταν η εξάρτηση της απόδοσης εκχύλισης σε σχέση με κάθε μία από τις παραμέτρους, ακολουθώντας την μέθοδο που περιγράφεται από τους Wang et al., (2014). Για το λόγο αυτό, στη δημιουργία του τελικού δικτύου σημείων για τα είκοσι επτά (27) πειράματα εκχύλισης των Ελληνικών goji berry, χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό λογισμικό MiniTab 17. Τα πειράματα τυχαιοποιήθηκαν για να μεγιστοποιηθούν οι επιπτώσεις ανεξήγητης μεταβλητότητας στις παρατηρούμενες αποκρίσεις που οφείλονται στις μεταβλητές. Κάθε μεταβλητή ήταν κωδικοποιημένη σε τρία επίπεδα -1 (χαμηλό), 0 (ενδιάμεσο), +1 (υψηλό) και τα πειράματα που ελήφθησαν από το λογισμικό, παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.

2.2.8. Στατιστική ανάλυση.

2.2.8.α. Ανάλυση διακύμανσης και εκτίμηση των εξισώσεων των προβλεπόμενων μοντέλων.

Η στατιστική ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) και η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης των πειραματικών δεδομένων, πραγματοποιήθηκαν από το λογισμικό Design-Expert version 7 και ακολουθώντας μια μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης. Οκτώ αντίστοιχες εξισώσεις επιφανειακής απόκρισης προέκυψαν από την ανάλυση ANOVA, συσχετίζοντας τις μετρούμενες επιδόσεις και τις βιοδραστικές παραμέτρους με τις τέσσερις ανεξάρτητες μεταβλητές εξαγωγής, τόσο για τα Ελληνικά (Θεσσαλία) όσο και για τα εισαγόμενα goji berry. Το ίδιο λογισμικό χρησιμοποιήθηκε επίσης για την πρόβλεψη των βελτιστοποιημένων τιμών συνολικής περιεκτικότητας.

2.2.8.β. Στατιστική σύγκριση των μέσων τιμών των δεικτών βιοδραστικότητας και της απόδοσης εκχύλισης μεταξύ Κινέζικων και Ελληνικών φρούτων.

Η δοκιμή T και επίσης η δοκιμή U (*Mann-Whitney*) χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών των εισαγόμενων και των ελληνικών φρούτων. Το λογισμικό MiniTab 17 χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την εκτέλεση των συγκρίσεων.

2.3. Αποτελέσματα.

2.3.1. Αποτελέσματα σχεδιασμού Box-Behnken.

Τα πειράματα εκχύλισης που ελήφθησαν από το λογισμικό Mini Tab 17 με βάση τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken παρουσιάζονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Σχεδίαση επιφανειών απόκρισης από το λογισμικό Minitab 17 για τις τέσσερις μεταβαλλόμενες παραμέτρους εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτό το πείραμα που ήταν αντίστοιχα: ο λόγος του διαλύτη νερού για να αποξηράνει τα goji berry, η θερμοκρασία εκχύλισης, η ισχύς των υπερήχων και χρόνος εκχύλισης (C1, C2, C3, C4, αντίστοιχα). Κάθε πειραματική παράμετρος είναι κωδικοποιημένη σε τρία επίπεδα -1 (χαμηλό), 0 (ενδιάμεσο), +1 (υψηλό).

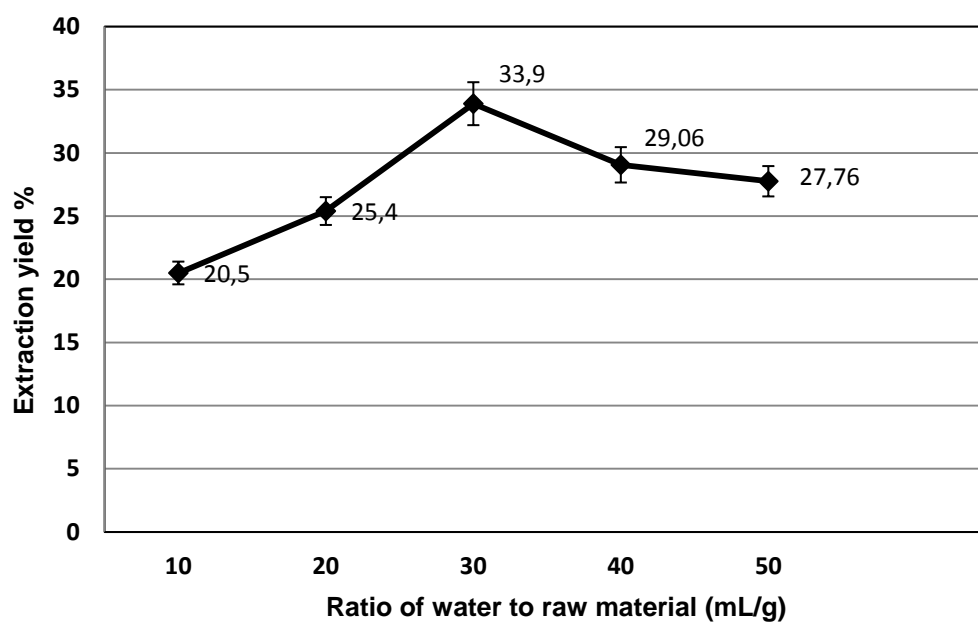
Minitab Box-Behnken Design				Run	C1	C2	C3	C4
Factors: 4 Replicates: 1				1	0	0	0	0
Base runs: 27				2	0	0	-1	1
Total runs: 27				3	1	1	0	0
Base blocks: 1				4	0	-1	-1	0
Total blocks: 1								
Center points: 3								
Design Table (randomized)				5	-1	0	1	0
				6	-1	0	0	1
				7	0	0	1	-1
				8	0	0	0	0
				9	1	0	-1	0
				10	0	1	-1	0
				11	0	1	0	-1
				12	0	-1	0	1
				13	1	-1	0	0
				14	1	0	0	-1
				15	0	0	0	0
				16	-1	0	-1	0
				17	-1	0	0	-1
				18	0	-1	0	-1
				19	0	1	0	1
				20	0	-1	1	0
				21	0	1	1	0
				22	-1	-1	0	0
				23	1	0	0	1
				24	0	0	-1	-1
				25	-1	1	0	0
				26	1	0	1	0
				27	0	0	1	1
Range of independent variables								
C1= Ratio of water solvent to dry goji berries								
C2=Extraction temperature								
C3 = Ultrasound power								
C4= Extraction time								
	-1	0	1					
C1	20 mL/g	30 mL/g	40 mL/g					
C2	45 °C	55 °C	65 °C					
C3	138 W/cm ²	253 W/cm ²	368 W/cm ²					
C4	20 min	30min	40min					

2.3.2. Προκαταρκτικά πειράματα για την αξιολόγηση της κλίμακας μεταβλητών εκχύλισης.

Ο προσδιορισμός του κατάλληλου εύρους των ανεξάρτητων μεταβλητών εκχύλισης, πραγματοποιήθηκε με τη διεξαγωγή προκαταρκτικών πειραμάτων απλού παράγοντα όπου ο στόχος καθορίστηκε ως η εξάρτηση της απόδοσης εκχύλισης σε κάθε μια από τις παραμέτρους εκχύλισης, ακολουθώντας τη μεθοδολογία που περιγράφεται από τους Wang et al., (2014). Έτσι, με τη χρήση Ελληνικών δειγμάτων της περιοχής της Θεσσαλίας στο ίδιο στάδιο ωριμότητας (με βάση το χρώμα, το μέγεθος και τον χρόνο συλλογής), εκτελέστηκε μια σειρά πειραμάτων μεμονωμένου παράγοντα, όπου άλλαξε μόνο μία παράμετρος εξαγωγής ενώ οι άλλες τρεις έλαβαν τις κεντρικές τους τιμές για να διαπιστωθεί ένα κατάλληλο εύρος εξάρτησης για κάθε παράμετρο, χρησιμοποιώντας ως εργαλείο το αποτέλεσμα στην απόδοση εξαγωγής. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τα προκαταρκτικά πειράματα προσδιορίστηκε το εύρος κάθε παραμέτρου και τα αποτελέσματα αυτών των πειραμάτων απλού παράγοντα, παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4 έως και 7.

2.3.2.a. Επίδραση της αναλογίας νερού προς την πρώτη ύλη, επί της απόδοσης εκχύλισης των τοπικών goji berry.

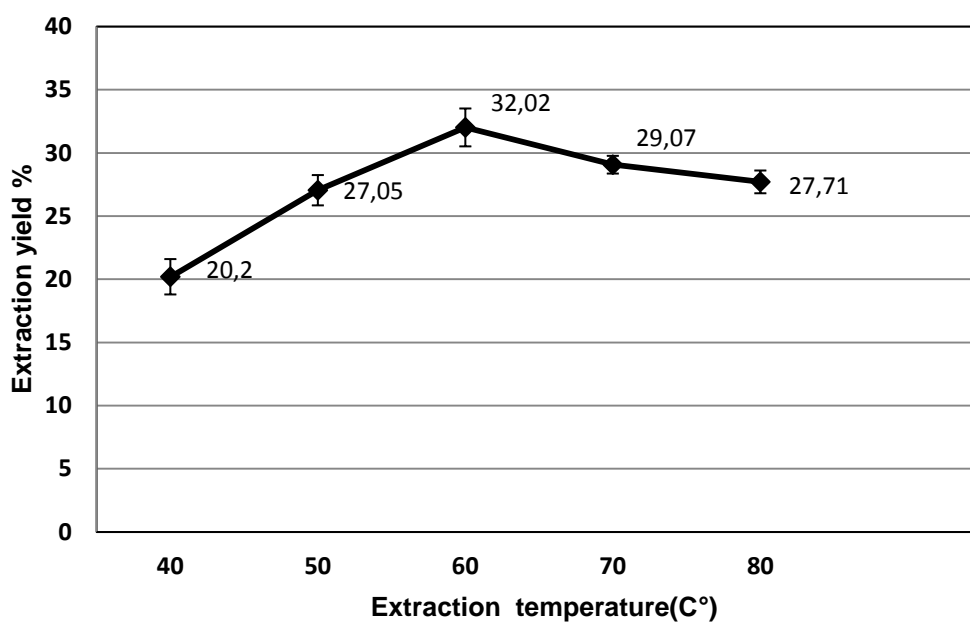
Η αναλογία νερού προς την πρώτη ύλη είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την εξαχθείσα απόδοση σύμφωνα με τους Wang et al., (2014). Στη παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκαν εκχυλίσεις σε διαφορετικές αναλογίες νερού με το προς ξήρανση δείγμα (10, 20, 30, 40, 50 ml/g). Οι άλλες παράμετροι είχαν οριστεί σε κεντρικές τιμές, οι οποίες ήταν: θερμοκρασία 55°C, ισχύς υπερήχων 253 w/cm² και ο χρόνος εκχύλισης τα 30 λεπτά.



Γράφημα 4: Επίδραση της αναλογίας νερού προς την πρώτη ύλη επί της απόδοσης εκχύλισης των τοπικών goji berry.

2.3.2.β. Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης.

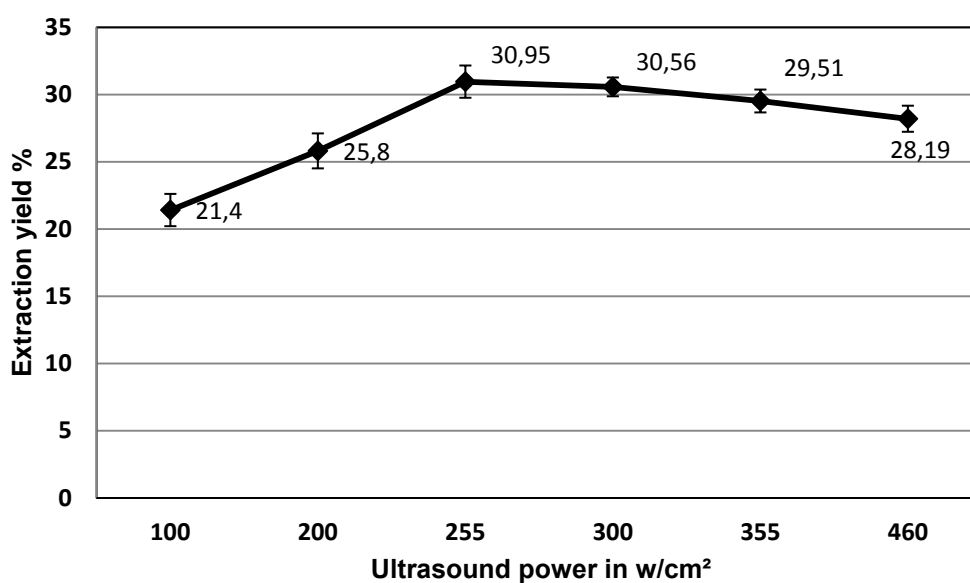
Η θερμοκρασία εκχύλισης είναι μια σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την απόδοση της εκχύλισης. Χρησιμοποιήθηκε μια σειρά διαφορετικών θερμοκρασιών (40, 50, 60, 70 και 80°C) σε προκαταρκτικά πειράματα για τον προσδιορισμό της τελικής πειραματικής κλίμακας. Σε αυτά τα προκαταρκτικά πειράματα, οι άλλες μεταβλητές ρυθμίστηκαν στις κεντρικές τους τιμές ως εξής: αναλογία νερού προς πρώτη ύλη 30:1 ml g, ισχύς υπερήχων 253 w/cm² και ο χρόνος εκχύλισης τα 30 λεπτά.



Γράφημα 5: Επίδραση της θερμοκρασίας εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης των goji berry.

2.3.2.γ. Επίδραση της ισχύος των υπερήχων στην απόδοση εκχύλισης.

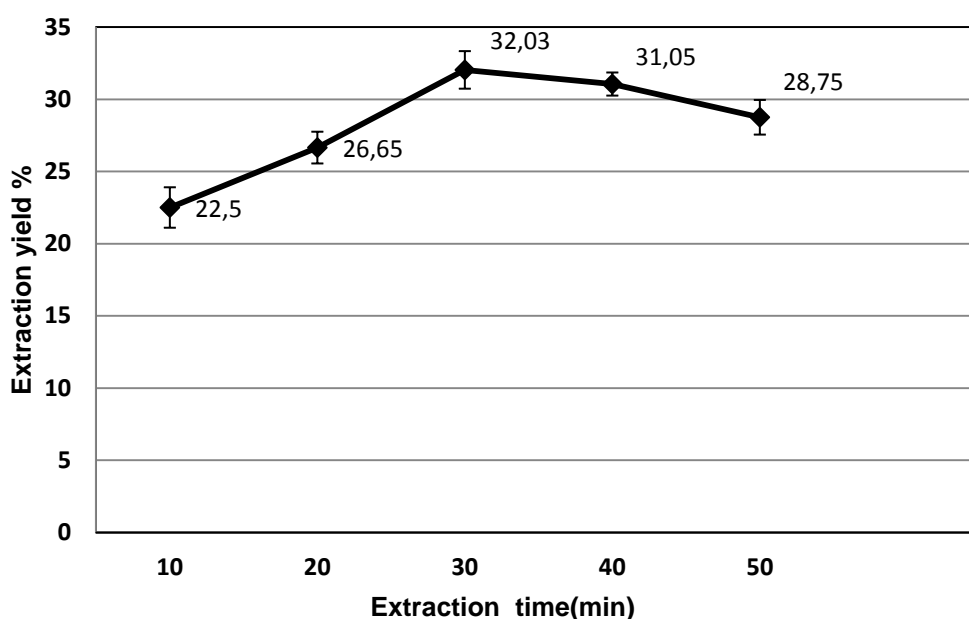
Σε αυτό το πείραμα ο λόγος νερού / ξηρό goji berry, η θερμοκρασία εκχύλισης και ο χρόνος εκχύλισης καθορίστηκαν στις κεντρικές τους τιμές: αναλογία ύδατος προς πρώτη ύλη 30:1 ml/g, θερμοκρασία 55°C και χρόνος εκχύλισης 30 λεπτά.



Γράφημα 6: Επίδραση της ισχύος των υπερήχων στην απόδοση εκχύλισης.

2.3.2.δ. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης.

Όπως φαίνεται, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας νερού προς την πρώτη ύλη από την αναλογία 10 έως 30 ml/g, επιτυγχάνοντας την μέγιστη ποσότητα $33,90 \pm 1,7\%$ ($n = 3$) στην αναλογία 30 ml/g (νερό / πρώτη ύλη). Πάνω από την αναλογία των 30 ml/g η απόδοση της εκχύλισης μειώθηκε. Ο χρόνος εξαγωγής είναι επίσης μια παράμετρος που επηρεάζει την αποδοτικότητα εκχύλισης. Για να εκτιμηθεί ο κατάλληλος χρόνος εκχύλισης, τα προκαταρκτικά πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 10-50 λεπτών όταν οι άλλες μεταβλητές εκχύλισης ρυθμίστηκαν στις κεντρικές τους τιμές ως ακολούθως: αναλογία νερού προς πρώτη ύλη 30:1 ml/g, η θερμοκρασία εκχύλισης 55°C και ισχύ υπερήχων στα 253 W/cm^2 .



Γράφημα 7: Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση εκχύλισης των goji berry.

2.3.3. Προγνωστικά μοντέλα δεικτών βιοδραστικότητας και απόδοσης εκχύλισης επί τοις %, με την μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης.

Η απόδοση των 27 διαδικασιών εκχύλισης σε σχέση με το συνολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες, την απόδοση εκχύλισης (%), το συνολικό περιεχόμενο πολυφαινόλης και τη δραστηριότητα δέσμευσης ριζών DPPH (προσδιορίζεται με IC_{50})

των Ελληνικών (Θεσσαλίας) και των εισαγόμενων goji berry, παρουσιάζονται στον πίνακα 14. Όλες οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

Με την εφαρμογή της πολλαπλής ανάλυσης παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα και με τη χρήση του πακέτου λογισμικού Design Expert (Έκδοση 7), η μεταβλητή απόκρισης και οι μεταβλητές των ελέγχων, σχετίζονται με τις δευτεροβάθμιες εξισώσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα 15.

Πίνακας 14: Ο κεντρικός σχεδιασμός των επιφανειών απόκρισης και τα αποτελέσματα για κάθε απόκριση όπου:

C1= Ο λόγος του νερού για την ξήρανση των goji berries (-1: 20 ml/g, 0:30 ml/g, +1:40 ml/g).

C2= Θερμοκρασία εκχύλισης (-1: 45°C, 0: 55°C, +1: 65°C).

C3= Ισχύς υπερήχων (-1: 138 W/cm², 0: 253 W/cm², +1: 368 W/cm²).

C4= Χρόνος εκχύλισης (-1:20 λεπτά, 0:30 λεπτά, +1:40 λεπτά).

Run	Independent variables				Total carbohydrates content (g/L extracts)		Extraction yield (%)		Total phenols content in Gallic acid equivalent (mgGAE/L extract)		IC 50 of DPPH radical scavenging (mg/mL)	
	C1	C2	C3	C4	C9 THESSALY	C10 CHINESE	C11 THESSALY	C12 CHINESE	C13 THESSALY	C14 CHINESE	C15 THESSALY	C16 CHINESE
1	30	55	253	30	0,990	1,306	28,043	28,087	268,025	294,813	2,300	1,800
2	30	55	138	40	0,870	0,749	24,800	25,600	203,286	234,740	2,200	1,800
3	40	65	253	30	1,070	1,170	25,067	21,333	248,524	265,050	2,200	2,270
4	30	45	138	30	1,110	0,691	25,230	24,210	157,571	218,002	2,400	2,350
5	20	55	368	30	0,990	0,731	26,533	21,600	262,810	317,526	1,200	2,700
6	20	55	253	40	0,850	0,820	25,050	27,200	254,238	297,621	3,000	3,900
7	30	55	368	20	1,050	0,698	25,400	25,200	250,905	294,813	1,500	1,270
8	30	55	253	30	1,010	1,302	28,600	27,600	268,048	306,669	2,300	1,800
9	40	55	138	30	0,860	0,592	23,133	26,667	254,714	273,645	2,400	2,200
10	30	65	138	30	0,810	0,724	20,800	25,200	235,190	287,669	1,600	1,300
11	30	65	253	20	1,190	0,952	30,200	30,000	277,095	306,217	1,500	1,480
12	30	45	253	40	1,040	0,949	22,600	23,600	281,857	312,098	2,800	2,150
13	40	45	253	30	1,260	0,914	23,933	19,733	159,000	175,479	2,400	1,630
14	40	55	253	20	1,240	0,824	25,067	22,933	153,762	218,002	1,000	1,050
15	30	55	253	30	0,990	1,302	28,600	28,200	268,524	294,907	2,300	1,770
16	20	55	138	30	0,930	1,000	22,933	29,333	406,619	470,883	2,700	1,890
17	20	55	253	20	1,060	0,666	27,130	25,733	395,190	443,288	2,600	2,150
18	30	45	253	20	1,150	0,881	22,600	22,400	206,619	248,764	2,600	2,100
19	30	65	253	40	1,060	0,992	31,200	32,000	248,048	297,621	1,600	1,650
20	30	45	368	30	1,150	1,006	27,900	27,200	325,190	375,883	2,600	2,750
21	30	65	368	30	1,100	1,143	24,600	24,800	273,286	300,788	2,900	2,550
22	20	45	253	30	1,180	0,913	25,333	29,067	320,429	355,526	2,500	1,450
23	40	55	253	40	0,900	0,804	27,867	27,733	226,619	213,479	1,100	1,350
24	30	55	138	20	0,960	0,900	27,600	27,200	302,333	329,740	1,900	1,800
25	20	65	253	30	0,940	0,635	29,067	29,067	365,667	433,788	2,600	2,300
26	40	55	368	30	1,210	1,048	27,733	26,667	246,619	249,217	1,600	1,150
27	30	55	368	40	1,150	1,072	28,600	28,000	255,667	273,645	1,800	1,840

Πίνακας 15: Οι τετραγωνικές εξισώσεις για την πρόβλεψη κάθε απόκρισης που προκύπτει από την εφαρμογή ανάλυσης πολλαπλής παλινδρόμησης στα πειραματικά δεδομένα με τη χρήση του πακέτου λογισμικού Design Expert (Έκδοση 7).

No1:Total carbohydrates of Thessally fruits	$=+1.01 + (0.049*C1) + (0.015*C2) + (0.0025*C4) - (0.032*C1*C4) + (0.063*C2*C3) - (0.062*C2*C4) + (0.0093*C1^2) - (0.028*C3^2) - (0.12*C1^2*C2) - (0.14*C1^2*C3) - (0.10*C2^2*C3) - (0.10*C3^2*C2)$
No2:Total carbohydrates of imported fruits	$=+1.30 + (0.039*C3) + (0.039*C4) + (0.13*C1*C2) + (0.18*C1*C3) + (0.13*C3*C4) - (0.26*C1^2) - (0.15*C2^2) - (0.23*C3^2) - (0.23*C4^2) + (0.13*C1*C2^2) + (0.14*C2^2*C3)$
No3:% yield of Thessally fruits	$=+28.15 + (4.05*C2) - (0.65*C1*C2) + (1.22*C1*C4) + (1.50*C3*C4) - (1.35*C1^2) - (1.39*C2^2) - (1.80*C3^2) - (2.83*C1^2*C2) + (1.65*C1^2*C3) - (1.62*C1*C2^2) + (1.22*C2^2*C3) - (5.98*C2*C3^2)$
No4:% yield of imported fruits	$= +27.77 + (4.00*C2) + (1.93*C1*C3) + (1.10*C3*C4) - (1.46*C1^2) - (1.27*C2^2) - (0.89*C3^2) - (3.60*C1^2*C2) - (2.31*C1^2*C3) - (4.28*C1*C2^2) - (4.35*C2*C3^2)$
No5:Total polyphenol of Thessally fruits	$=+268.20 - (68.45*C1) - (20.30*C4) + (33.93*C1*C3) + (53.45*C1*C4) - (32.38*C2*C3) - (26.07*C2*C4) + (25.95*C3*C4) + (14.71*C1^2) - (15.12*C4^2) + (25.89*C1^2*C2) - (38.21*C1^2*C3) + (26.43*C1*C3^2) + (51.19*C2^2*C3) + (31.85*C2^2*C4)$
No6:Total polyphenol of imported fruits	$= +298.80 - (82.28*C1) - (33.29*C4) + (32.23*C1*C3) + (35.29*C1*C4) - (36.19*C2*C3) - (17.98*C2*C4) + (18.46*C3*C4) + (15.06*C1^2) - (15.37*C4^2) + (37.26*C1^2*C2) - (45.44*C1^2*C3) + (41.76*C2^2*C3) + (46.98*C2^2*C4)$
No7:IC50 of DPPH radical of Thessally fruits	$=+1.01+(0.049* C1) + (0.015* C2) + (0.092* C3) + (0.0025* C4) + (0.012* C1* C2) - (0.032* C1* C4) + (0.063* C2* C3) - (0.005* C2* C4) + (0.047* C3* C4)+ (0.0093* C1^2) + (0.081* C2^2) - (0.12* C1^2 * C2) - (0.14* C1^2 * C4) - (0.062* C2^2 * C4) - (0.10* C2* C3^2)$
No8:IC50 of DPPH radical of imported fruits	$=+1.76- (0.91* C1- (0.30* C2) - (0.47* C1* C3) - (0.36* C1* C4))+(0.21* C2* C4)+(0.047* C3* C4) +(0.67* C1^2 * C2)+(0.41* C1^2 * C4) +(0.95* C1* C2^2)+(0.60* C1* C3^2)+(0.50* C2^2* C3)$

Πίνακας 16: Η σημαντικότητα του μοντέλου και κάθε μεταβλητή, με βάση την ανάλυση ANOVA, για το συνολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες, την απόδοση εκχύλισης, την περιεκτικότητα σε ολικές πολυφαινόλες και το IC₅₀ στην εξουδετέρωση της ρίζας DPPH, των Ελληνικών και των εισαγόμενων goji berries.

C1= Ο λόγος του νερού για την ξήρανση των goji berries (-1:20 ml/g, 0:30 ml/g, +1:40 ml/g). C2= Θερμοκρασία εκχύλισης (-1: 45°C, 0: 55°C, +1: 65°C).

C3= Ισχύς υπερήχων (-1: 138 W/cm², 0: 253 W/cm², +1: 368 W/cm²).

C4= Χρόνος εκχύλισης (-1:20 λεπτά, 0:30 λεπτά, +1:40 λεπτά).

^a Significant (p<0,05), ^b Not Significant (p>0,1)

No1 Carbohydrate content (Greek)		No2 Carbohydrate content (imported)		No3 % extraction yield (Greek)		No4 % extraction yield (imported)		No5 Total polyphenol content (Greek)		No6 Total polyphenol content (imported)		No7 IC50 of DPPH (Greek)		No8 IC50 of DPPH (imported)	
	P value of the model		P value of the model		P value of the model		P value of the model		P value of the model		P value of the model		P value of the model		P value of the model
Model	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a	Model Variables	<0,0001 ^a
Variables	P value		P value		P value		P value		P value		P value		P value		P value
C1	< 0.0001	C1	0.7436	C1	0.2456	C1	0.9627	C1	< 0.0001	C1	< 0.0001	C1	< 0.0001	C1	<0.0001
C2	0.0004	C2	0.1963	C2	< 0.0001	C2	< 0.0001	C2	0.2092 ^b	C2	0.4438	C2	< 0.0001	C2	0.0109
C3	0.3608 b	C3	0.0729	C3	0.2242	C3	0.3106	C3	0.9770	C3	0.9067	C3	< 0.0001	C3	0.3596
C4	< 0.0001	C4	0.0330	C4	0.3442	C4	0.1483	C4	0.0087	C4	0.0007	C4	0.0025	C4	0.3232
C1C2	0.8761	C1C2	0.0004	C1C2	0.0630	C1C2	0.4372	C1C2	0.2076	C1C2	0.7397	C1C2	0.0024	C1C2	0.7043
C1C3	0.4430	C1C3	< 0.0001	C1C3	0.4357	C1C3	0.0035	C1C3	0.0038	C1C3	0.0056	C1C3	0.1553	C1C3	0.0061
C1C4	0.0012	C2C3	0.3724	C1C4	0.0032	C1C4	0.1246	C1C4	0.0003	C1C4	0.0035	C2C3	0.0056	C1C4	0.0224
C2C3	0.0666	C3C4	0.0005	C2C3	0.3807	C2C3	0.1191	C2C3	0.0048	C2C3	0.0031	C1 ²	0.0003	C2C3	0.1449
C2C4	0.0031	C1 ²	< 0.0001	C3C4	0.0009	C3C4	0.0522	C2C4	0.0137	C2C4	0.0639	C2 ²	0.0407	C1 ²	0.1721
C3C4	0.7556	C2 ²	< 0.0001	C1 ²	0.0004	C1 ²	0.0054	C3C4	0.0140	C3C4	0.0586	C3 ²	0.0010	C2 ²	0.1911
C1 ²	0.0138	C3 ²	< 0.0001	C2 ²	0.0003	C2 ²	0.0116	C1 ²	0.0707	C1 ²	0.0711	C4 ²	0.0037	C3 ²	0.3552
C2 ²	0.4830	C4 ²	< 0.0001	C3 ²	< 0.0001	C3 ²	0.0549	C2 ²	0.2005	C2 ²	0.7842	C1 ² C2	< 0.0001	C1 ² C2	0.0023
C3 ²	<0.0001	C1C2 ²	0.0027	C1 ² C2	<0.0001	C1 ² C2	0.0006	C3 ²	0.9672	C3 ²	0.5725	C1 ² C3	< 0.0001	C1 ² C4	0.0307
C1 ² C2	0.0539	C2 ² C3	0.0011	C1 ² C3	0.0042	C1 ² C3	0.0040	C4 ²	0.0648	C4 ²	0.0666	C1C2 ²	0.0004	C1C2 ²	0.0005
C1 ² C4	0.0004			C1 ² C4	0.0020	C1 ² C4	0.1258	C1 ² C2	0.0329	C1 ² C2	0.0075	C1C3 ²	< 0.0001	C1C3 ²	0.0100
C2 ² C4	<0.0001			C2 ² C3	0.0204	C1C2 ²	< 0.0001	C1 ² C3	0.0116	C1 ² C3	0.0057	C2 ² C3	< 0.0001	C2 ² C3	0.0120
C2C3 ²	0.0195			C2 ² C3	0.0204	C1C2 ²	< 0.0001	C1C3 ²	0.0304	C1C3 ²	0.1567	C2C3 ²	< 0.0001	C2 ² C3	
				C2C3 ²	< 0.0001	C2C3 ²	<0.0001	C2 ² C3	0.0027	C2 ² C3	0.0086				
								C2 ² C4	0.0138	C2 ² C4	0.0022				
Lack of fitting	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant
R ²	0.9788	0,9667	0.9803	0.9604	0.9825	0,9852	0.9901	0.9232							
Adj. R ²	0.9388	0,9278	0.9431	0.8855	0.9351	0,9451	0.9713	0.8003							

Τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι όλα τα μοντέλα είναι σημαντικά ($p < 0.01$) και με πρόβλεψη υψηλής ακρίβειας, γεγονός που είναι εμφανές από τις υψηλές τιμές R^2 που είναι η αναλογία της διακύμανσης στην εξαρτημένη μεταβλητή και είναι προβλέψιμη από τις ανεξάρτητες μεταβλητές, που παρουσιάζονται στον πίνακα 16. Οι υψηλές τιμές του προσαρμοσμένου συντελεστή προσδιορισμού (R^2_{adj}) επιβεβαιώνονται επίσης ότι τα μοντέλα ήταν στατιστικά σημαντικά.

2.3.4. Βελτιστοποίηση παραμέτρων εκχύλισης goji berry υποβοηθούμενης από υπερήχους.

Με τη χρήση του στατιστικού λογισμικού και του λογισμικού βελτιστοποίησης του Design Expert (*Version 7*), ελήφθησαν οι βέλτιστες συνθήκες για τις μεταβλητές εκχύλισης και της βιοενεργότητας [ολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, ολική περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και αναστολή της ρίζας DPPH κατά 50% (IC_{50})], των εισαγόμενων και τοπικών goji berries, που παρουσιάζονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17: Προβλεπόμενες τιμές για τις βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης Ελληνικών και εισαγόμενων goji berries.

Ανεξάρτητες μεταβλητές

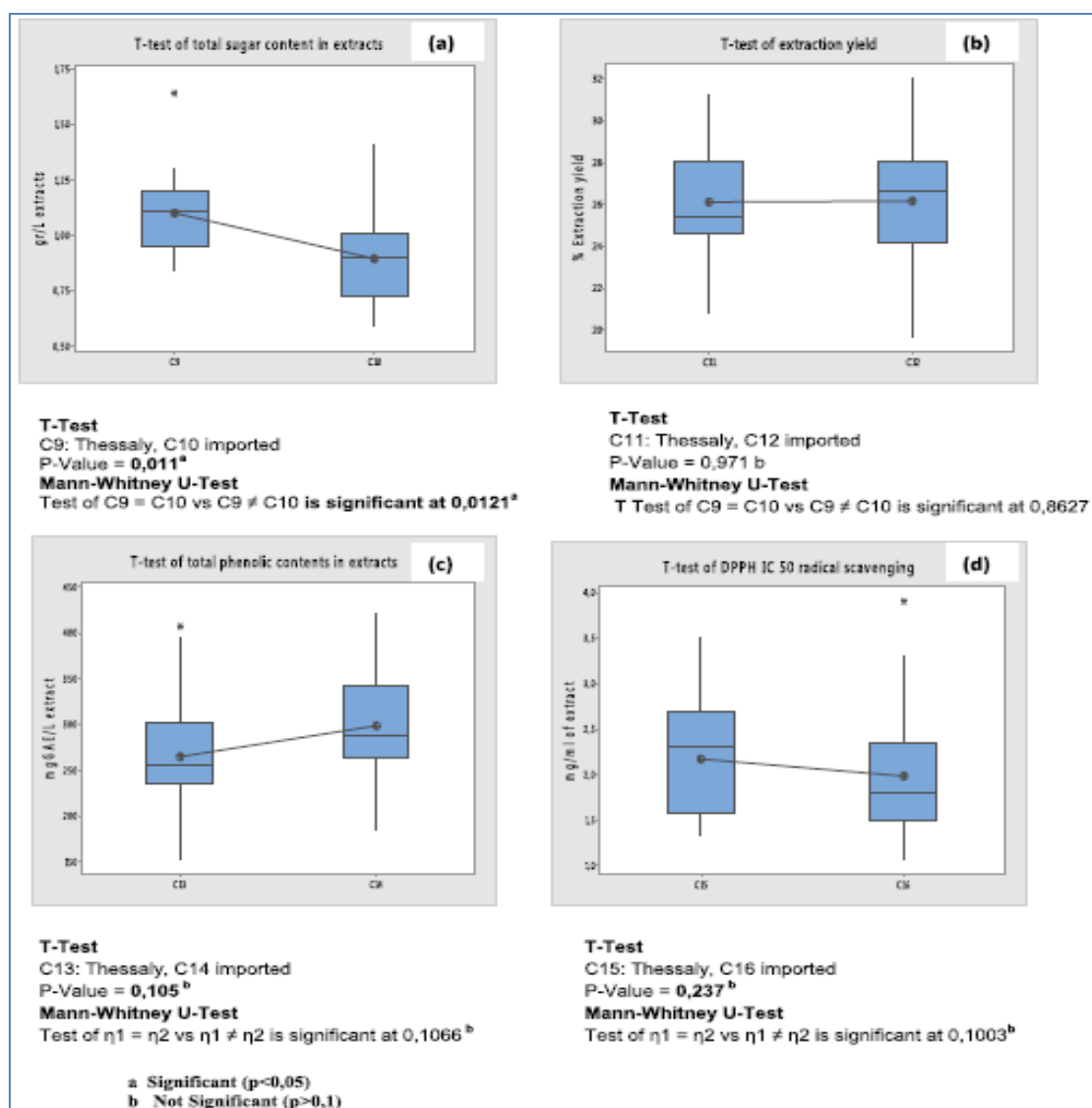
	C1	C2	C3	C4	Total carbohydrates content (g/L extracts)	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mgGAE/L extract)	IC 50 of DPPH radical scavenging mg/mL
Thessaly Imported	39.03 31.43	50,16 56.59	331,70 284.22	31.50 31.10	1.36 1.31			
Thessaly Imported	28.5 26.31	64.29 65	282,91 249	39.73 39.54		31.21 31.62		
Thessaly Imported	20.41 20.11	57.06 54.99	221,72 211,16	22.89 20.37			419.88 448.53	
Thessaly Imported	20 21.12	45 45.5	359,98 160,07	35.53 25.08				0.71 0.69

C1 = Ratio of water to dry goji berries (mL/g),

C2 = Extraction temperature ($^{\circ}C$),

C3 = Ultrasonic power (W/cm^2),

C4 = Extraction time (min)



Γράφημα 8: T-test και U-test στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των Ελληνικών (Θεσσαλίας) και των εισαγόμενων goji berries.

8a. Προβάλλονται τα αποτελέσματα του t-test και του U-test για το συνολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες. Τα αποτελέσματα των δοκιμών δείχνουν ότι η διαφορά στην απόκριση αυτή είναι στατιστικά σημαντική.

8b. Προβάλλονται τα αποτελέσματα του t-test και του U-test για την απόδοση εκχύλισης. Τα αποτελέσματα των δοκιμών δείχνουν ότι η διαφορά στην απόκριση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

8c. Παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δοκιμής t και της δοκιμής U για το συνολικό περιεχόμενο σε φαινόλη, καθώς τα αποτελέσματα των δοκιμών δείχνουν ότι η διαφορά δεν είναι στατιστικά σημαντική.

8d. Εμφάνιση των αποτελεσμάτων της δοκιμής t και της δοκιμής U για το IC₅₀ της δέσμευσης των ριζών DPPH. Τα αποτελέσματα των δοκιμών δείχνουν ότι η διαφορά στην απόκριση αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική.

2.4. Συζήτηση.

Όπως φαίνεται στο Γράφημα 3, η απόδοση της εκχύλισης αυξάνεται με την αύξηση της αναλογίας νερού προς την πρώτη ύλη από την αναλογία 10 έως 30 ml/g, επιτυγχάνοντας την μέγιστη ποσότητα $33,90 \pm 1,7\%$ ($n = 3$) στην αναλογία 30 ml/g (νερό / σκόνη καρπού). Πάνω από την αναλογία των 30 ml/g η απόδοση της εκχύλισης μειώθηκε.

Σύμφωνα με τους Xu et al., (2014), αυτό το φαινόμενο μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι όσο υψηλότερη είναι η αναλογία νερού προς την πρώτη ύλη, τόσο χαμηλότερη είναι η συγκέντρωση του στερεού και το ολικό ιξώδες του μέσου εκχύλισης. Ως εκ τούτου, περισσότερα μόρια πολυσακχαριτών θα μπορούσαν να διαλυθούν στο νερό και η απόδοση της εκχύλισης θα μπορούσε να αυξηθεί. Αλλά η ένταση της σπηλαίωσης πέφτει με αύξηση του ιξώδους του μέσου εκχύλισης, καθώς ο σχηματισμός σπηλαίωσης απαιτεί την αρνητική πίεση στην περιοχή εφαρμογής του κύματος για να ξεπεραστούν οι φυσικές συνεκτικές δυνάμεις. Έτσι η μείωση του ιξώδους λόγω της αραιώσης οδηγεί στη μείωση της έντασης του φαινομένου σπηλαίωσης, το οποίο είναι απαραίτητο για την αποδοτική εκχύλιση (Gogate & Pandit, 2004, Xu et al., 2014). Η σπηλαίωση είναι το φαινόμενο της εμφάνισης μικροσκοπικών φυσαλίδων αερίου που υπάρχουν γενικά σε ένα υγρό που έχει αναγκαστεί να ταλαντευτεί λόγω ενός εφαρμοσμένου ακουστικού πεδίου. Έτσι, η έντονη σπηλαίωση έχει ως αποτέλεσμα μια δυναμική μεταφορά της μάζας, ενισχύοντας την εκχύλιση και επιταχύνοντας τη μεταφορά μάζας των στοχευόμενων ενώσεων από ένα στερεό δείγμα στον διαλύτη (Vilkhu et al., 2008). Συνεπώς, μετά από τις προκαταρκτικές δοκιμές, στην περιοχή αυτή επιλέχθηκε το εύρος 20-40 ml/g όσον αφορά την αναλογία.

Η βέλτιστη θερμοκρασία ήταν 60°C , όπως φαίνεται στο Γράφημα 5, με την μέγιστη απόδοση $32.02 \pm 1,5\%$ ($n=3$). Με την αύξηση της θερμοκρασίας, οι πολυσακχαρίτες και η διάχυση των άλλων μορίων αυξάνονται στον διαλύτη νερού. Η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από 60°C , οδηγεί σε μείωση της απόδοσης της εκχύλισης. Επιπλέον, ο στόχος για να υπάρχει υψηλό περιεχόμενο φαινολών στα εκχυλίσματα με υψηλή αντιοξειδωτική δράση, αυτό διευκολύνεται από τη χρήση χαμηλότερων θερμοκρασιών. Είναι γνωστό η αρνητική επίδραση των θερμοκρασιών υψηλότερες των 55°C , στις φαινολικές ενώσεις (Madrau et al., 2009). Δεδομένου ότι ο στόχος είναι όχι μόνο η υψηλή περιεκτικότητα σε πολυσακχαρίτες, αλλά και η περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες, καθώς και η υψηλή αντιοξειδωτική δράση, υιοθετήθηκε η θερμοκρασία

των 55°C ως το κέντρο της θερμοκρασιακής περιοχής (45, 55 και 65°C που χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικά πειράματα).

Τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν επίσης ότι όταν η ένταση των υπερήχων αυξήθηκε, αυξήθηκε και το ποσοστό των στερεών εκχύλισης, έως ότου η ισχύς των υπερήχων έφθασε τα 255 W/cm², όπου η απόδοση εκχύλισης (%) έφθασε στην μέγιστη τιμή των 30,95% ± 1,2% (n=3), όπως φαίνεται στο Γράφημα 6. Από εκεί και πέρα, παρουσιάστηκε μία πτώση στην απόδοση της εκχύλισης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι η υψηλή τάση των υπερήχων, προκαλεί το σχηματισμό ενός μεγαλύτερου αριθμού φυσαλίδων, λόγω αύξησης της έντασης της σπηλαιώσης. Αυτό οδηγεί σε μεγαλύτερη πίεση που διαταράσσει τα κυτταρικά τοιχώματα, επιτρέποντας την εξαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας στερεών (Yang, Li, & Jin, 2014). Μετά υπερβαίνοντας αυτό το συγκεκριμένο σημείο, το ποσοστό των εκχυλισμένων στερεών άρχισε να μειώνεται, παρά το γεγονός ότι η ένταση των υπερήχων αυξάνονταν. Η παρατήρηση ότι η απόδοση της εκχύλισης μειώνεται πάνω από ένα ορισμένο όριο εφαρμοσμένης ισχύος είναι σύμφωνη με προηγούμενες μελέτες (Wang et al., 2014). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι η υψηλή ένταση υπερήχων οδηγεί σε υδρόλυση αποικοδόμησης πολυσακχαριτών που μειώνει το ιξώδες των πολυσακχαριτών και μειώνει την ποσότητα της εκχυλίσιμης ύλης. (Zhong & Wang, 2010, Zhou & Ma, 2006). Ως εκ τούτου, η επιλεγμένη ισχύς υπερήχων που εφαρμόστηκε για την εξαγωγή κυμάνθηκε μεταξύ 138 και 368 W/cm².

Από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο Γράφημα 7, είναι προφανές ότι αυξάνοντας τον χρόνο εκχύλισης από 10 σε 30 λεπτά, η απόδοση της εκχύλισης αυξήθηκε φθάνοντας σε μια μέγιστη τιμή 32,03 ± 1,3% (n=3) στα 30 λεπτά. Μετά από 30 λεπτά εκχύλισης η απόδοση της εκχύλισης άρχισε να μειώνεται, και πιθανότατα έχει να κάνει με το γεγονός ότι το μεγαλύτερο στερεών εκχυλίζεται μέχρι τα 30min και συνεχίζοντας την εκχύλιση βαίνει μειούμενο το ποσοστό αυτό αφού τα στερεά προς εκχύλιση έχουν και αυτά μειωθεί (Ying, Han, & Li, 2011). Για το λόγο αυτό, το χρονικό εύρος της εξαγωγής που υιοθετήθηκε, ήταν μεταξύ 20 και 40 λεπτών και η κεντρική τιμή των 30 λεπτών είναι η αντίστοιχη της μέγιστης απόδοσης εκχύλισης (%). Επίσης, είναι αξιοσημείωτο ότι τα δεδομένα του Πίνακα 17 δείχνουν ότι οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων εκχύλισης μεταξύ Ελληνικών και εισαγόμενων καρπών είναι αρκετά παρόμοιες σε όλες τις περιπτώσεις με μία εξαίρεση. Η εξαίρεση αυτή είναι στην περίπτωση των τιμών IC₅₀, όπου υπάρχουν μερικές διαφορές στις βέλτιστες τιμές της εφαρμοζόμενης ισχύος των υπερήχων και του χρόνου εκχύλισης μεταξύ τοπικών και

εισαγόμενων goji berries και αυτό μπορεί να αποδοθεί στη σχετικά χαμηλή τιμή R^2 του μοντέλου που αναπτύχθηκε για την πρόβλεψη της IC_{50} των εισαγόμενων. Έτσι, η χρήση του μοντέλου που αναπτύχθηκε για τους Ελληνικούς καρπούς είναι πιο ακριβής, με βάση την υψηλή τιμή R^2 (0,99) που επιτεύχθηκε στην περίπτωση αυτή.

Όσον αφορά στην επαλήθευση του μοντέλου πρόβλεψης, η καταλληλότητα της εξίσωσης του μοντέλου στις βέλτιστες τιμές απόκρισης, ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τις επιλεγμένες βέλτιστες συνθήκες των τεσσάρων παραμέτρων (όπως: η βέλτιστη τιμή αναλογίας νερού προς ξηρό goji berry, η ισχύς των υπερήχων, η θερμοκρασία εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης,) με τη χρήση καρπών goji berry Θεσσαλικής παραγωγής. Έτσι, για την επίτευξη ενός εκχυλίσματος με την υψηλότερη συγκέντρωση σε υδατάνθρακες, χρησιμοποιήθηκε ο συνδυασμός των προβλεπόμενων βέλτιστων παραμέτρων του πίνακα 17 (με την αναλογία νερού /αποξηραμένα goji berries στα 28 ml/g, την θερμοκρασία εκχύλισης στους 64,29°C, την ισχύ εξόδου των υπερήχων στα 283 W και τον χρόνο εκχύλισης στα 39,7 λεπτά. Ενώ επίσης για τις ολικές φαινόλες στα 20,4 ml/g, 57°C, 222 W και 22,9 λεπτά, αντίστοιχα, ενώ για το IC_{50} της ρίζας DPPH οι συνθήκες ήταν 20 ml/g, 45° C, 360 W και 35,5 λεπτά. Υπό αυτές τις συνθήκες, η ολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ήταν 1,34 g/L ($\pm 0,03$), για συνολική φαινολική περιεκτικότητα ήταν 4,21 mg GAE/L ($\pm 0,04$) και για το IC_{50} της DPPH 0,69 $\mu\text{g/mL}$ ($\pm 0,02$), οι οποίες δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p > 0,05$) από τις προβλέψιμες τιμές των 1.359 g/L, 419.88 mg GAE/L και 0.71 $\mu\text{g/mL}$. Αυτό αποδεικνύει ότι τα μοντέλα που σχεδιάστηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν ορθά και έγκυρα.

Τέλος, όσον αφορά στην σύγκριση των επιδόσεων εκχύλισης και των δεικτών βιοδραστικότητας μεταξύ των goji berry με διαφορετική προέλευση η δοκιμή t και η δοκιμή U (*Mann-Whitney*), που πραγματοποιήθηκαν για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών των τεσσάρων μετρούμενων παραμέτρων της απόδοσης εκχύλισης και της βιοδραστικότητας, έδειξαν ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καρπών διαφορετικής προέλευσης, όσον αφορά στην απόδοση εκχύλισης, στην συνολική φαινολική περιεκτικότητα και στην τιμή IC_{50} όπως φαίνεται στο Γράφημα 8. Αντίθετα, υπήρξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά στη συγκέντρωση των συνολικών υδατανθράκων, καθώς τα goji berry που προέρχονται από τη Θεσσαλία, φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση των ολικών υδατανθράκων σε σύγκριση με τα εισαγόμενα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

**Φυσικοχημικές ιδιότητες των καρπών goji berry
Ελληνικής και εισαγόμενης προέλευσης.**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. Φυτικοχημικές ιδιότητες των καρπών goji berry (*Lycium barbarum* και *Lycium chinense*)

Με τον όρο φυτικοχημικές ιδιότητες στην συγκεκριμένη έρευνά εννοούμε την περιεκτικότητα των καρπών σε χημικές ενώσεις και πιο συγκεκριμένα σε πολυσακχαρίτες, τις πολυφαινόλες, τα λιπαρά οξέα καθώς και την ολική αντιοξειδωτική δράση αυτών. Αυτές οι φυτικοχημικές ιδιότητες είναι άμεσα συνδεδεμένες με τη διατροφική αξία και τη βιολογική δραστικότητα των καρπών. Έτσι στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να προσδιοριστούν αυτές οι φυτικοχημικές ιδιότητες των φρούτων goji berries (*L. barbarum* και *L. chinensis mill*), που συλλέγονται από την περιοχή της Θεσσαλίας στην κεντρική Ελλάδα και να συγκριθούν με αυτές των εισαγωγής. Η χημική σύνθεση εξετάστηκε με μέτρηση της συνολικής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες και φαινόλες και αξιολογήθηκε με φασματοσκοπία FTIR, ενώ η αντιοξειδωτική δράση των καρπών εξετάστηκε με δύο *in vitro* μεθόδους που βασίστηκαν στη δραστικότητα δέσμευσης δύο ελεύθερων ριζών (DPPH• και ABTS•+, αντίστοιχα). Τέλος, το προφίλ λιπαρών οξέων των δύο ειδών προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας ανάλυση GC-MS.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι.

3.2.1. Δείγματα goji berry.

Τα goji berry συλλέχθηκαν σε 3 διαφορετικές περιόδους, από τον Ιούνιο του 2015, από πειραματική φυτεία τεσσάρων (4) ετών της ποικιλίας *L. barbarum* και *L. chinense*, που βρίσκεται στην περιοχή της Θεσσαλίας κοντά στην πόλη της Λάρισας και ξηράνθηκαν σε ξηραντήρα στους 30°C για 7 ημέρες, σε τελική τιμή υγρασίας 14%, όμοια με αυτή των εισαγομένων. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν υπό αναερόβιες συνθήκες σε θερμοκρασία (0-4°C) για περαιτέρω ανάλυση.

3.2.2. Περιεκτικότητα των καρπών σε ολικούς υδατάνθρακες (*Total Carbohydrate Content - TCC*) των εκχυλισμάτων.

Η μέθοδος του προσδιορισμού της συνολικής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.2.

3.2.3. Περιεκτικότητα των καρπών σε ολικές φαινόλες.

Η μέθοδος του προσδιορισμού των ολικών φαινολών, περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

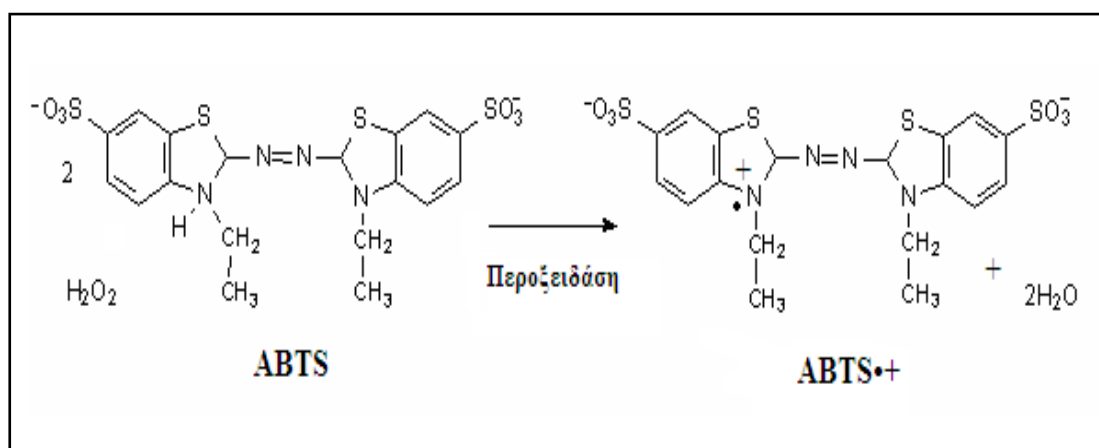
3.2.4. Προσδιορισμός της ολικής αντιοξειδωτικής δράσης των καρπών.

3.2.4.α. Μέθοδος DPPH.

Η μέθοδος DPPH, για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των καρπών, περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.

3.2.4.β. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}.

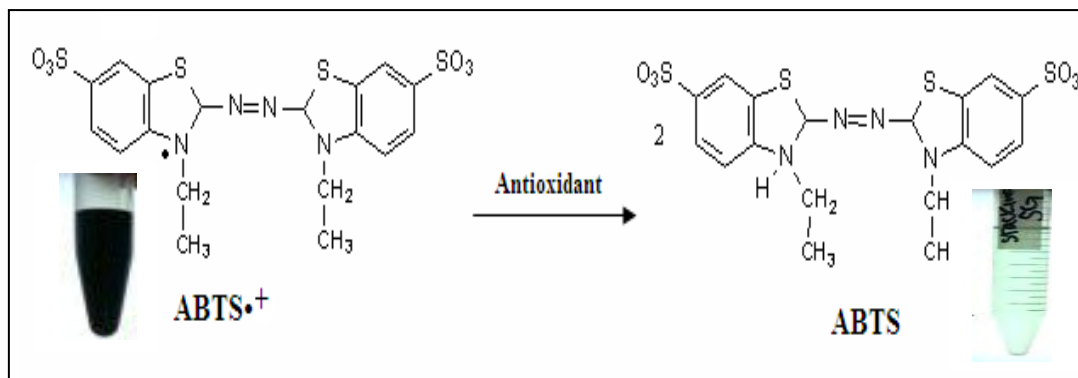
Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας εν δυνάμει αντιοξειδωτικών μορίων, αναπτύχθηκε από τους Rice-Evans et al., (1996) και βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS, [2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid)], παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) και μέσω της δράσης του ενζύμου της περοξειδάσης (Enzyme Horseradish Peroxidase- HRP), οξειδώνεται και δημιουργείται η δραστική ρίζα ABTS^{•+} (Εικόνα 26).



Εικόνα 26. Η Οξείδωση του ABTS σε Δραστική ρίζα.

Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (*Single Electron Transfer, SET*) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (*Hydrogen Atom Transfer, HAT*), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της

συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Εικόνα 27) (Prior et al., 2005 - Re et al., 1999).



Εικόνα 27: Προσθήκη αντιοξειδωτικού. Η ρίζα ABTS^{•+}, που έχει κυανοπράσινο χρώμα, ανάγεται και αποχρωματίζεται (ABTS).

3.2.5. Φασματοσκοπία υπέρυθρου (*Fourier-transf. infrared spectroscopy – FT-IR*).

Η σημασία της φασματοσκοπίας **FT-IR** για την ποιοτική ανάλυση προκύπτει από τις ιδιότητές της και ιδιαίτερα την χρήση της ως τεχνική “δακτυλικών αποτυπωμάτων” που προκύπτει από το γεγονός ότι δεν υπάρχουν δύο βιοδραστικές ενώσεις που έχουν τα ίδια φάσματα FTIR. Για το λόγο αυτό έγινε μία έρευνα και μία σύγκριση μεταξύ των φασμάτων των δυο παραγόμενων ποικιλιών (*L. barbarum* & *L. chinense*) καθώς και εισαγόμενων καρπών της ποικιλίας (*L. barbarum*) με σκοπό την ποιοτική ανάλυση αυτών.

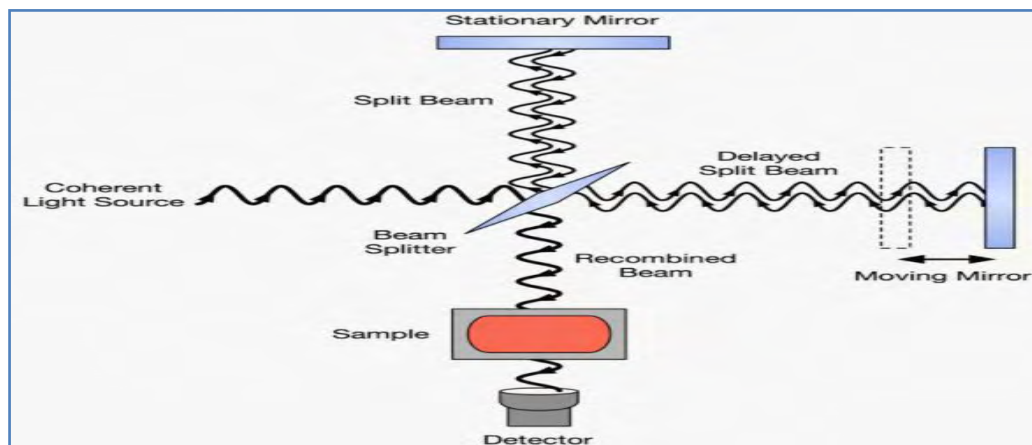
Αρχή λειτουργίας της Φασματοσκοπία υπέρυθρου

Η υπέρυθρη φασματοσκοπία μετασχηματισμών Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy – FTIR*) (Griffiths and Hasseth, 2007), είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την απόκτηση ενός υπέρυθρου φάσματος απορρόφησης της εκπομπής ενός στερεού, υγρού ή αερίου. Ένα φασματόμετρο FT-IR συλλέγει συγχρόνως δεδομένα υψηλής ανάλυσης φασματικής ευκρίνειας σε ένα ευρύ φασματικό εύρος. Αυτό, προσδίδει ένα πλεονέκτημα έναντι ενός φασματόμετρου διασποράς, το οποίο μετρά την ένταση σε ένα στενό εύρος μήκους κύματος κάθε φορά.

Ο όρος φασματοσκοπία υπέρυθρων μετασχηματισμού Fourier, προέρχεται από το γεγονός ότι απαιτείται μετασχηματισμός Fourier (μαθηματική διαδικασία) για τη μετατροπή των πρώτων δεδομένων στο πραγματικό φάσμα.

Ο στόχος οποιασδήποτε φασματοσκοπίας απορρόφησης (FTIR, φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατής κ.λπ.), είναι να μετρηθεί πόσο καλά ένα δείγμα απορροφά το φως σε κάθε μήκος κύματος. Ο πιο απλός τρόπος για να γίνει αυτό, η τεχνική "φασματοσκοπίας διασκορπισμού", είναι να "φωτίσει" μια μονοχρωματική ακτίνα φωτός ένα δείγμα, να μετρήσει πόσο φως απορροφάται και να επαναλαμβάνεται για κάθε διαφορετικό μήκος κύματος. Στη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier, αντί να φωτίζει μια μονοχρωματική ακτίνα φωτός το δείγμα, φωτίζει μια δέσμη που περιέχει πολλές συχνότητες φωτός ταυτόχρονα και μετρά πόσο από αυτή τη δέσμη απορροφάται από το δείγμα. Στη συνέχεια, η δέσμη τροποποιείται ώστε να περιέχει διαφορετικό συνδυασμό συχνοτήτων, δίνοντας ένα δεύτερο σημείο δεδομένων. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται πολλές φορές. Στη συνέχεια, ένας υπολογιστής λαμβάνει όλα αυτά τα δεδομένα, για να συμπεράνει ποια είναι η απορρόφηση σε κάθε μήκος κύματος.

Η δέσμη που περιγράφηκε παραπάνω παράγεται ξεκινώντας με μία ευρυζωνική πηγή φωτός-μία που περιέχει το πλήρες φάσμα των μηκών κύματος που πρόκειται να μετρηθούν. Το φως προσπίπτει σε ένα ιντερφερόμετρο (Εικόνα 28), μια συγκεκριμένη διάταξη που αποτελείται από έναν διαχωριστή δέσμης, έναν σταθερό καθρέφτη και έναν καθρέφτη που μετακινείται εμπρός και πίσω, με μεγάλη ακρίβεια.

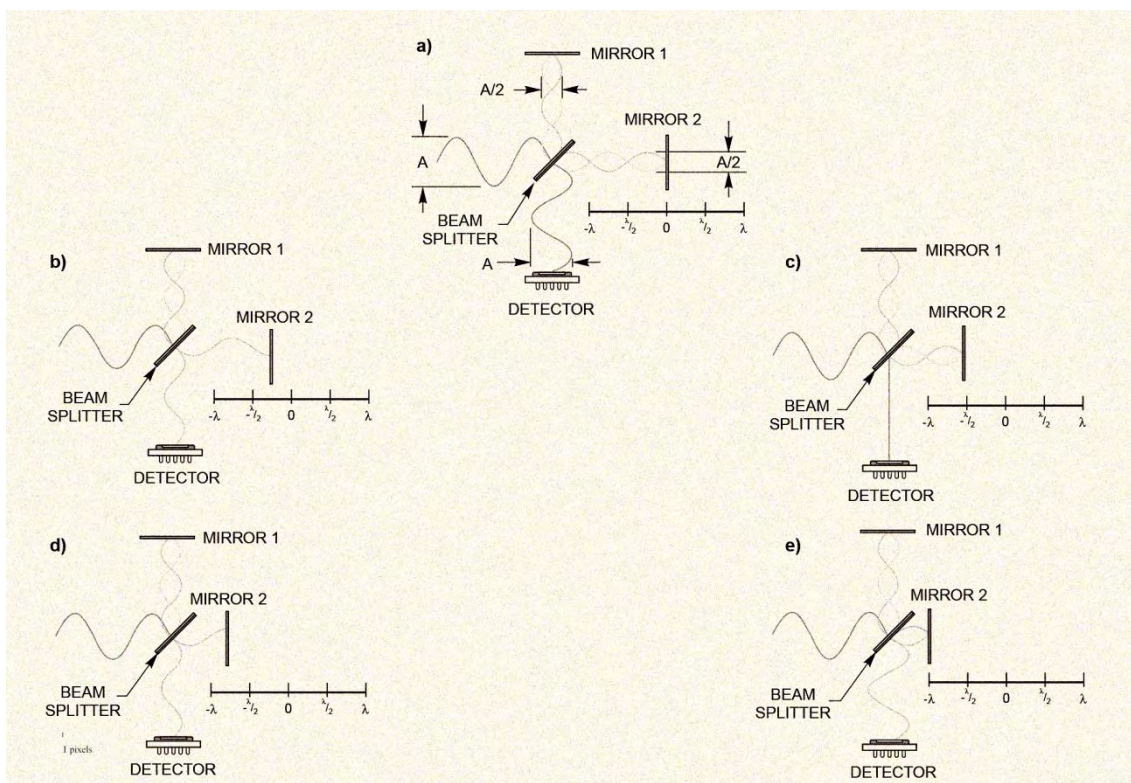


Εικόνα 28: Σχηματική παράσταση ιντερφερομέτρου Michelson, διαμορφωμένο για FTIR.

Ο διαχωριστής δέσμης είναι κατασκευασμένος από ειδικό υλικό που μεταδίδει το ήμισυ της ακτινοβολίας που το χτυπά και αντανακλά το άλλο μισό. Η ακτινοβολία από την πηγή χτυπά τον διαχωριστή δέσμης και χωρίζεται σε δύο μέρη. Μία δέσμη μεταδίδεται μέσω του διαχωριστή δέσμης στο σταθερό κάτοπτρο και η δεύτερη ανακλάται από τον διαχωριστή δέσμης στο κινούμενο κάτοπτρο. Τα σταθερά και μετακινούμενα κάτοπτρα αντανακλούν την ακτινοβολία πίσω στον διαχωριστή δέσμης.

Και πάλι, το ήμισυ αυτής της ανακλώμενης ακτινοβολίας μεταδίδεται και το μισό ανακλάται στον διαχωριστή δέσμης, με αποτέλεσμα μία δέσμη να διέρχεται στον ανιχνευτή και η δεύτερη να επιστρέφει στην πηγή.

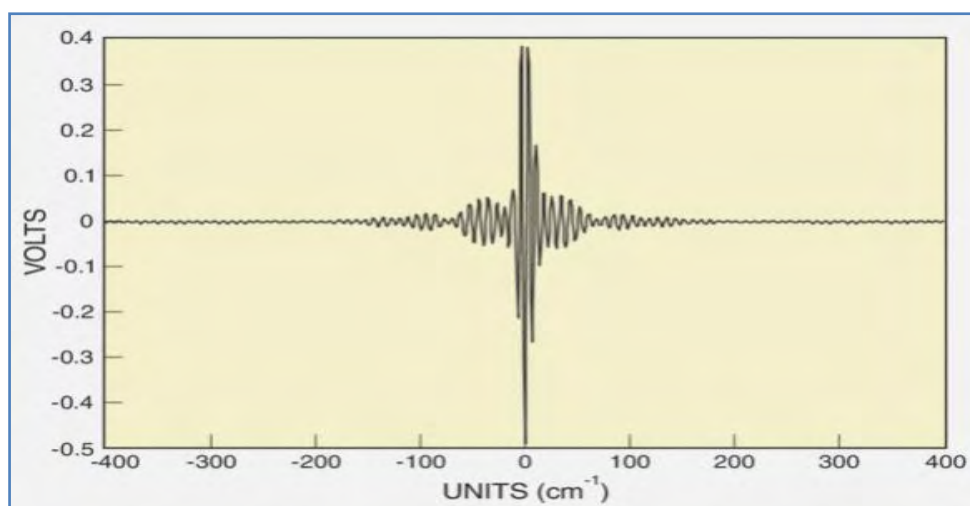
Το FT-IR έχει ένα φυσικό σημείο αναφοράς όταν οι κινούμενοι και σταθεροί καθρέφτες είναι της ίδιας απόστασης από τον διαχωριστή δέσμης. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μηδενική διαφορά διαδρομής (*Zero Path Difference – ZPD*). Η μετατόπιση του κατόπτρου κίνησης, Δ , μετράται από το ZPD. Η διαφορά οπτικής διαδρομής (*Optical Path Difference – OPD*) είναι η διαφορά μεταξύ των δεσμών που διέρχονται από τους δύο βραχίονες ενός ιντερφερομέτρου. Το OPD ισούται με το προϊόν της φυσικής απόστασης που διανύεται από το κινούμενο κάτοπτρο, πολλαπλασιασμένο με 2, 4 ή με άλλο πολλαπλασιαστή, που είναι συνάρτηση του αριθμού των χρησιμοποιούμενων ανακλαστικών στοιχείων. Με n συμβολίζεται ο δείκτης διάθλασης του μέσου γεμίσματος των βραχιόνων (αέρας, άζωτο κ.λπ.). Τα ακατέργαστα δεδομένα FT-IR αποτελούνται από ένα αριθμό ζευγών τιμών (σήμα, *OPD*). Στην εικόνα 20, η δέσμη που ανακλάται από το κινούμενο κάτοπτρο ταξιδεύει 2Δ πέρα από τη δέσμη που ανακλάται από το σταθερό κάτοπτρο. Η σχέση μεταξύ της διαφοράς οπτικής διαδρομής και της μετατόπισης του καθρέφτη Δ είναι: $OPD = 2\Delta n$ (Εικόνα 29).



Εικόνα 29: Σχηματική αναπαράσταση των κυμάτων και των φάσεων τους, είσοδος,

έξοδος και οι δύο βραχίονες του ιντερφερομέτρου, καθώς η σάρωση πηγαίνει από μηδενική συνθήκη διαδρομής σε $OPD = \lambda$. (a) $OPD = 0$. (b) $OPD = \lambda/4$. (c) $OPD = \lambda/2$. d) $OPD = 3\lambda/4$. e) $OPD = \lambda$.

Το ιντερφερόγραμμα είναι το όνομα της μορφής σήματος που αποκτάται από ένα φασματόμετρο FT-IR. Συνήθως, είναι πολύ πιο περίπλοκο από ένα απλό ημιτονοειδές, το οποίο θα αναμενόταν αν υπήρχε μόνο ένα μήκος κύματος φωτός. Η εικόνα 30 είναι γράφημα μιας ευρείας ζώνης φωτεινής πηγής. Στο κέντρο της εικόνας 30, η μεγάλη ακίδα είναι μια μοναδική υπογραφή – αποτύπωμα, μιας ευρυζωνικής πηγής. Η προέλευσή της έγκειται στο γεγονός ότι όλα τα μήκη κύματος είναι σε φάση στο ZPD. Επομένως, οι συνεισφορές τους είναι όλες στο μέγιστο και ένα πολύ ισχυρό σήμα παράγεται από τον ανιχνευτή του συστήματος.



Εικόνα 30: Ένα ιντερφερόγραμμα FTIR. Η κεντρική κορυφή βρίσκεται στη θέση ZPD ("μηδενική διαφορά διαδρομής" ή μηδενική καθυστέρηση), όπου η μέγιστη ποσότητα φωτός περνά μέσα από το συμβολόμετρο στον ανιχνευτή.

Το ιντερφερόγραμμα μετατρέπεται σε φάσμα, με μετασχηματισμό Fourier. Αυτό απαιτεί να αποθηκεύεται σε ψηφιακή μορφή, μια σειρά τιμών σε ίσα διαστήματα της διαφοράς διαδρομής μεταξύ των δύο δεσμών. Για να μετρηθεί η διαφορά διαδρομής, στέλνεται μια δέσμη λέιζερ μέσω του ιντερφερομέτρου, δημιουργώντας ένα ημιτονοειδές σήμα όπου ο διαχωρισμός μεταξύ διαδοχικών μεγίστων είναι ίσος με το μήκος κύματος. Αυτό μπορεί να ενεργοποιήσει έναν μετατροπέα αναλογικού προς ψηφιακό για να μετρήσει το σήμα IR κάθε φορά που το σήμα λέιζερ περνάει από το μηδέν. Εναλλακτικά, τα σήματα λέιζερ και IR μπορούν να μετρηθούν συγχρόνως σε μικρότερα χρονικά διαστήματα με το σήμα IR στα σημεία που αντιστοιχούν στο σήμα λέιζερ που καθορίζει μηδενική διέλευση με παρεμβολή (Brault and James, 1996).

Αυτή η προσέγγιση επιτρέπει τη χρήση μετατροπέων αναλογικού προς ψηφιακό, τα οποία είναι ακριβέστερα, με αποτέλεσμα χαμηλότερο θόρυβο.

Μόλις συλλεχθεί λοιπόν το διάγραμμα, πρέπει να μεταφραστεί σε ένα φάσμα (εκπομπή, απορρόφηση, μετάδοση κ.λπ.). Η διαδικασία μετατροπής γίνεται μέσω του αλγορίθμου γρήγορου μετασχηματισμού Fourier. Η ανακάλυψη αυτής της μεθόδου από τον *J.W. Cooley* και τον *J.W. Tukey* το 1965, ακολουθήθηκε από μια εκρηκτική αύξηση της υπολογιστικής ισχύος σε προσιτές τιμές και έτσι τα όργανα FT-IR διείσδυσαν στην αγορά. Ένας αριθμός βημάτων εμπλέκεται στον υπολογισμό του φάσματος. Κάποιες ηλεκτρονικές και οπτικές ατέλειες, μπορούσαν στην αρχή να προκαλέσουν λανθασμένες ενδείξεις λόγω διαφορετικών χρονικών καθυστερήσεων. Η αποδιαμόρφωση χρησιμοποιήθηκε για τη διόρθωση της φασματικής διαρροής και την τεχνητή δημιουργία φασματικών χαρακτηριστικών, με σκοπό την απομάκρυνση των ατελειών.

Τα FT-IR είναι ικανά για υψηλή ανάλυση, επειδή το όριο ανάλυσης είναι απλά ένα αντίστροφο της επιτεύξιμης διαφοράς οπτικής διαδρομής, OPD. Επομένως, ένα όργανο με δυνατότητα OPD 2 cm, μπορεί να φτάσει σε ανάλυση $0,5\text{ cm}^{-1}$.

Ερευνητική εφαρμογή

Για την εκτίμηση του χημικού προφίλ των δειγμάτων από τα εκχυλίσματα των goji berries, διεξήχθησαν μετρήσεις FT-IR, στην μεσαία υπέρυθη περιοχή $4000\text{--}650\text{ cm}^{-1}$ (αριθμός κυμάτων ανά cm), με την χρήση Nicolet 6700 Thermo Scientific Co. (Εικόνα 31).



Εικόνα 31: Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR φασματοφωτόμετρο.

Η τεχνική δειγματοληψίας FTIR διαμορφώθηκε ως εξής:

α. Με περιορισμένη ολική ανάκλαση (*Attenuated Total Reflection - ATR*), η οποία επιτρέπει την εξέταση των δειγμάτων απευθείας σε στερεή ή υγρή κατάσταση χωρίς περαιτέρω προετοιμασία (*Perkin Elmer, Life and Analytical Sciences, 2005*).

β. Με ανιχνευτή θεικής τριγλυκίνης (*Deuterated Tri Glycine Sulfate - DTGS*). Είναι ένας πολύ ευαίσθητος ανιχνευτής θερμοκρασίας χώρου για μετρήσεις μέσης υπέρυθρης ακτινοβολίας που χρησιμοποιεί θερμοηλεκτρικούς κρυστάλλους ευαίσθητους στη θερμοκρασία της δευτεριωμένης θεικής τριγλυκίνης. Καθώς η θερμοκρασία και κατά συνέπεια η πολικότητα των κρυστάλλων αλλάζει (λόγω της απορρόφησης της υπέρυθρης ακτινοβολίας) δημιουργείται ένα φορτίο το οποίο ανιχνεύεται από δύο παράλληλα ηλεκτρόδια. Η δευτεριωμένη μορφή των κρυστάλλων χρησιμοποιείται επειδή έχουν υψηλότερο σημείο Curie (*το σημείο Curie είναι η θερμοκρασία όπου τα υλικά χάνουν τις μόνιμες μαγνητικές τους ιδιότητες*) και με διαχωριστή δέσμης KBr (*Η περιοχή μετάδοσης μονοκρυσταλικού καλίου βρωμίδιου KBr, έχει οριστεί στις προδιαγραφές, για όργανα μεσαίας υπέρυθρης ακτινοβολίας*). Ο παραπάνω ανιχνευτής ελέγχονταν από το λογισμικό OMNIC 9.

Τα προς ανάλυση δείγματα τοποθετήθηκαν σε μια πλάκα δειγματοληψίας κρυστάλλων διαμαντιού (εξάρτημα Smart iTX) και συσφίγγονταν με ένα αιχμηρό άκρο. Μια σάρωση ελήφθη πριν από κάθε σάρωση δείγματος με μια κενή από δείγμα πλάκα. Επιπλέον, οι κρύσταλλοι ATR και η αιχμηρή άκρη καθαρίζονταν, για να απομακρυνθούν τυχόν παρεμβολές από το προηγούμενο δείγμα. Συνολικά 32 διαδοχικές σαρώσεις από κάθε δείγμα συλλέχθηκαν σε διάστημα 4 cm και ο μέσος όρος του φάσματος για κάθε δείγμα αναλύθηκε. Επιπλέον, έγινε κανονικοποίηση του κατακόρυφου άξονα της απορρόφησης, έτσι ώστε να λαμβάνει τιμές στην κλίμακα 0 έως 1.

3.2.6. Προσδιορισμός σύστασης σε λιπαρά οξέα με τη μέθοδο Αέριας Χρωματογραφίας – Φασματομετρίας Μαζών.

Σύνθεση μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (Fatty Acid Methyl Esters - FAME).

Η μέθοδος της σύνθεσης των FAME (*J. V. O'Fallon et al., 2007*), που εφαρμόστηκε περιγράφεται ως ακολούθως: ποσότητα δείγματος 0,5 ml τοποθετούνταν σε θερμοάντοχα γυάλινα σωληνάκια μήκους 16 cm και διαμέτρου 1,6 cm που διέθεταν βιδωτό

καπάκι τεφλόν για την ερμητική σφράγιση τους. Κατόπιν, προστέθηκε 1ml μεθανολικό διάλυμα τριδεκανοϊκού οξέως (C13:0) με συγκέντρωση 600 µg/ml, ως εσωτερικό πρότυπο. Ακολούθως, προστέθηκαν 10 N 0,4 ml KOH και 2,7 ml καθαρής μεθανόλης.

Τα σωληνάρια μετά από προσεκτικό ασφαλές βίδωμα τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 55⁰C για χρονικό διάστημα 1,5 ώρας και ανά 20 λεπτά με το χέρι ακολουθούσε δυνατή ανάδευση, με σκοπό την ορθή υδρόλυση των δειγμάτων. Στην συνέχεια και για 15 λεπτά της ώρας ακολούθησε ψύξη με νερό της βρύσης. Κατόπιν, προστέθηκαν 0,3 ml 24N H₂SO₄ ερμητικό βίδωμα και τα σωληνάρια τοποθετούνταν στο υδατόλουτρο στους 55⁰C για χρονικό διάστημα 1,5 ώρας και ανά 20 λεπτά με το χέρι ακολουθούσε δυνατή ανάδευση, με σκοπό την ορθή σύνθεση των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων. Κατόπιν και για 15 λεπτά ακολούθησε ψύξη με νερό της βρύσης.

Τέλος, προστέθηκαν 3 ml εξάνιο ως διαλύτης και τα δείγματα αναδεύτηκαν στο Vortex για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν στην φυγόκεντρο 3.000 rpm, 15 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο (το επίπεδο του εξανίου που περιέχει τα FAME), τοποθετήθηκε σε φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας των 2 ml τα οποία αποθηκεύτηκαν στους -20⁰C μέχρι την GS ανάλυση.

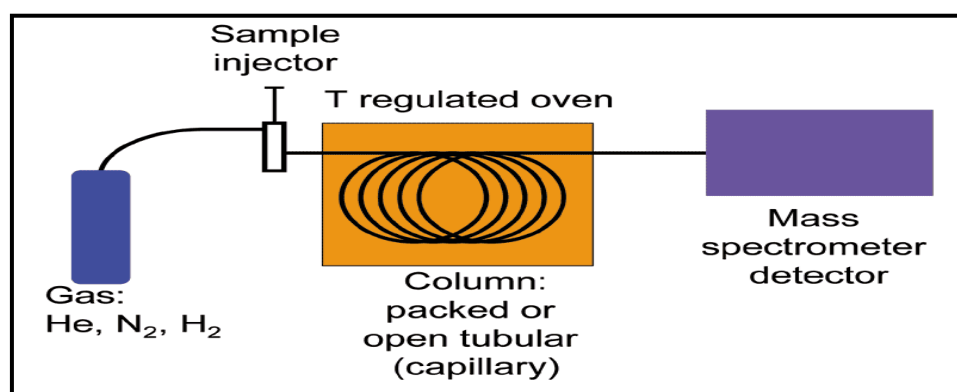
3.2.7. Αρχή λειτουργίας της αέρια χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας (GC-MS – Gas Chromatography – Mass Spectrometry)

Είναι μια συνδυασμένη αναλυτική τεχνική που συνδυάζει την αέρια χρωματογραφία και την φασματομετρία μάζας. Η αέρια χρωματογραφία εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό των συστατικών του δείγματος και η ανίχνευση και η ταυτοποίησή τους γίνεται με τη μέθοδο φασματομετρίας μαζών. Ο αέριος χρωματογράφος χρησιμοποιεί μία τριχοειδή στήλη, η οποία εξαρτάται από τις διαστάσεις της στήλης (μήκος, διάμετρος, πάχος φιλμ). Η διαφορά στις χημικές ιδιότητες μεταξύ των διαφόρων μορίων σε ένα μίγμα και η σχετική συγγένεια τους για την στατική φάση της στήλης εξασφαλίζει τον διαχωρισμό του αρχικού μίγματος σε επιμέρους συστατικά.

Όλο το δείγμα που εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου απευθείας ή με αυτόματο δειγματολήπτη, παρασύρεται από το φέρον αέριο, κατά μήκος της στήλης όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των προς ανάλυση ουσιών.

Τα συστατικά του δείγματος συγκρατούνται από τη στατική φάση με διαφορετική ισχύ και ως αποτέλεσμα εκλούνται από τη χρωματογραφική στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές (ονομάζεται χρόνος κατακράτησης). Στη συνέχεια οι ουσίες ιονίζονται

και θραυσματοποιούνται με έναν ή άλλο τρόπο στο θάλαμο ιονισμού που συνδέει τον αέριο χρωματογράφο με τον φασματογράφο μαζών.



Εικόνα 32: Σχηματική παράσταση της βασικής διάταξης του GS-MS: το δείγμα εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο και μεταφέρεται στην χρωματογραφική στήλη με τη ροή του φέροντος αερίου. Τα συστατικά του δείγματος βγαίνουν από την στήλη εν σειρά και αντιστρόφως ανάλογα προς τη συγγένειά τους σε στατική φάση της στήλης και οδηγούνται στον ανιχνευτή φασματογράφο μαζών.

Το φέρον αέριο, το οποίο μεταφέρει τις ουσίες που θα διαχωριστούν, θα πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με τη στατική φάση ή με τις προς ανάλυση ουσίες. Το φέρον αέριο οδηγείται στην στήλη από τη φιάλη της υψηλής πίεσης, μέσω ρυθμιστών παροχής. Τα κλάσματα των συστατικών ανιχνεύονται στην συνέχεια από τον ανιχνευτή και τα σήματα καταγράφονται από καταγραφικό ή οδηγούνται σε υπολογιστή (work station).

Ερευνητική εφαρμογή της αέρια χρωματογραφίας – φασματομετρία μάζας

Για την μέτρηση του προφίλ των λιπαρών οξέων των δειγμάτων goji berry, εφαρμόστηκε η μέθοδος FAME final optimal. Πραγματοποιήθηκε με διπλό υπολογισμό και χρήση μέσου όρου. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων έγινε με χρήση των επιφανειών των κορυφών μετά από διόρθωση με το εσωτερικό πρότυπο και με χρήση προτύπου 37 λιπαρών οξέων που προμηθεύτηκε από την εταιρεία SUPELCO και είναι γνωστό ως FAME 37 Standard. Για την αναγνώριση των διαφόρων εστέρων των λιπαρών οξέων χρησιμοποιήθηκε και η δυνατότητα του MS να πραγματοποιεί αναγνώριση - ταυτοποίηση των κορυφών σε συνδυασμό με την βάση φασματικών δεδομένων NIST (*National Institute of Standards and Technology*), που διέθετε ο

χρωματογράφος. Χρησιμοποιήθηκε η συσκευή χρωματογραφίας (GC-MS Agilent 7890A GC, Frankfurt, Germany) (Εικόνα 33).



Εικόνα 33: Χρωματογράφος GC-MS, Agilent 7890A GC.

Οι στήλες GC βρίσκονται σε εσωτερικό φούρνο ελεγχόμενης θερμοκρασίας. Γενικά, το ένα άκρο της στήλης συνδέεται στην είσοδο, ενώ το άλλο άκρο είναι συνδεδεμένο με τον ανιχνευτή. Οι στήλες ποικίλουν σε μήκος, διάμετρο και εσωτερική επικάλυψη. Κάθε στήλη έχει σχεδιαστεί για χρήση με διαφορετικές ενώσεις. Ο σκοπός της στήλης και του φούρνου είναι να διαχωρίσει το εγχεόμενο δείγμα σε μεμονωμένες ενώσεις καθώς ταξιδεύει μέσω της στήλης. Για να βοηθηθεί αυτή η διαδικασία, ο φούρνος GC μπορεί να προγραμματιστεί για να επιταχύνει τη ροή του δείγματος μέσω της στήλης. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη silica Agilent J & W 112-88A7: 804.11246 HP-88 250° C: 100 m x 250 μm x 0.25 μm (Εικόνα 34).

HP-88

- (88%-cyanopropyl)aryl-polysiloxane
- 250/320°C upper temperature limits
- High Polarity
- Designed for separation of cis/trans fatty acid methyl esters (FAMES)
- Even better separation than DB-23 of cis-trans isomers

Similar Phases: CP-Sil 88, SP-2560, SP-2340, SP-2330, BPX-70, BPX-90

Because HP-88 is not bonded or cross-linked, we do not recommend solvent rinsing.

HP-88

ID (mm)	Length (m)	Film (μm)	Temp Limits (°C)	Part No.
0.25	100	0.20	0 to 250/260	112-88A7
0.25	60	0.20	0 to 250/260	112-8867
0.25	30	0.20	0 to 250/260	112-8837

Structure of cyanopropyl-aryl-polysiloxane

Εικόνα 34: Στήλη τύπου πυριτίου μήκους 100 m.

Το αέριο που μεταφέρει τις ουσίες που πρόκειται να διαχωριστούν πρέπει να είναι αδρανές και να μην αντιδρά με την στατική φάση ή με τις αναλυόμενες ουσίες. Το αέριο οδηγείται στη στήλη από τον κύλινδρο υψηλής πίεσης μέσω του ρυθμιστή ροής. Το σύνολο του δείγματος εισάγεται στον εισαγωγέα του αέριου χρωματογράφου απευθείας ή με έναν αυτόματο δειγματολήπτη, παρασυρόμενο από το φέρον αέριο, κατά μήκος της στήλης στην οποία λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των αναλυτών. Τα κλάσματα των στοιχείων οδηγούνται σε έναν υπολογιστή. Χρησιμοποιήθηκε αέριο ηλίου με ροή 45,2 ml/min.

3.2.8. Χημικά αντιδραστήρια.

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια: Η μεθανόλη (*MeOH*), το άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4), το χλωριούχο νάτριο (*NaCl*), το υδροξείδιο του καλίου (*KOH*), ο μεθυλο-τρίτ-βουτυλαιθέρας (*MTBE*) και απιονισμένο νερό. Χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα πρότυπο μίγμα από την εταιρεία Supelco (Bellafonte, PA, USA), το οποίο ονομάζεται μίγμα FAME του συστατικού Supelco™ 37, που περιέχει τους μεθυλεστέρες των 37 λιπαρών οξέων (αριθμός καταλόγου 47885-U). Το μίγμα FAME περιείχε μεταξύ 2 και 4% του κάθε μεθυλεστέρα λιπαρού οξέος (FAME), ενώ ο μεθυλεστέρας του παλμιτικού οξέος ήταν 6% και του τριδεκανοεικού οξέως ($\geq 99\%$) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich. Επίσης, το αντιδραστήριο Folin Ciocalteu, το ανθρακικό νάτριο σε άνυδρη κρυσταλλική μορφή, το γαλλικό οξύ, η αιθανόλη, το 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλιο (DPPH), η μεθανόλη, το 2,2-αζινοδις-(3 - αιθυλ - βενζοθειαζολιν - σουλφονικό οξύ) (ABTS), χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των ενώσεων.

3.2.9. Στατιστική ανάλυση.

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων εκφράστηκαν ως μέσες τιμές \pm τυπική απόκλιση (*SD*). Οι στατιστικές διαφορές των δεδομένων εξετάστηκαν χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία t Student's και το επίπεδο σημαντικότητας καθορίστηκε στο επίπεδο $p \leq 0,01$. Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας λογισμικό Excel (*Microsoft, Redmond, WA, HΠΑ*).

3.3. Αποτελέσματα.

3.3.1. Ολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες και πολυφαινόλες.

Η ολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (TCC) και φαινόλες (TPC) των δειγμάτων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 15. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το δείγμα *L. chinense* είχε χαμηλότερους ολικούς υδατάνθρακες από το *L. barbarum* που ήταν $395 \pm 4,1$, $440 \pm 5,2$, $329 \pm 2,7$ και $452 \pm 3,8$, $490 \pm 6,8$ $370 \pm 4,3$ (mg Glu / g ξηρού καρπού) αντίστοιχα για κάθε είδος ανά μήνα συλλογής. Τα αποτελέσματα για τα εισαγόμενα φρούτα από την Κίνα και τη Μογγολία ήταν $459 \pm 3,8$ και $434 \pm 4,3$ αντίστοιχα. Αυτό συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία που επιβεβαιώνει την άποψη ότι τα φρούτα *L. barbarum* έχουν υψηλότερη ποιότητα (Potterat, 2010). Σε σύγκριση μεταξύ των δειγμάτων *L. barbarum*, τα φρούτα που καλλιεργούνται τον μήνα Αύγουστο δείχνουν υψηλότερη TCC σε σύγκριση με τα εισαγόμενα.

Σχετικά με την περιεκτικότητα σε φαινόλες του *L. barbarum*, τα αποτελέσματα ήταν $9,7 \pm 0,2$, $10,1 \pm 0,4$ and $6,9 \pm 0,3$, ενώ του *L. Chinense* ήταν $8,5 \pm 0,4$, $8,9 \pm 0,7$ και $7,4 \pm 0,6$ mg/ g Dry Fruit ισοδύναμου Γαλλικού οξέος. Επιπλέον, οι τιμές από τα εισαγόμενα Κινέζικα φρούτα ήταν $9,9 \pm 0,6$ ενώ τα εισαγόμενα από την Μογγολία ήταν $10,9 \pm 0,4$ mg/ g Dry Fruit ισοδύναμου Γαλλικού οξέος .

Οι τιμές της ολικής περιεκτικότητας σε πολυφαινόλες, που προέκυψαν στην παρούσα μελέτη, είναι υψηλότερες από τις τιμές που παρουσιάστηκαν από τους Ionică et al., (2012), χαμηλότερες από τις τιμές που αναφέρθηκε από τους Kosar et al., (2003), αλλά συσχετίζονται καλά με τις τιμές που αναφέρονται στην μελέτη Medina, (2011).

3.3.2. Αντιοξειδωτική δράση με βάση τις ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}.

Η DPPH είναι μια γνωστή τεχνητή ρίζα και χρησιμοποιείται ως δείκτης της παρουσίας των ριζών σε μία αντίδραση. Χρησιμοποιείται ευρέως για ερμηνεύσει την αντιοξειδωτική δράση πολλών δειγμάτων (Gerasopoulos et al., 2015a). Εκφράζεται με το IC₅₀ (την συγκέντρωση του εκχυλίσματος που απαιτείται για την ανατολή του 50% της ρίζας). Η μέθοδος ABTS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ευρείας ποικιλίας ουσιών (Re et al., 1999).

Η ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών DPPH[•] κυμάνθηκε από 784 έως 1254 μg / ml. ενώ οι τιμές ABTS^{•+} κυμαίνονται από 192 έως 407 μg / ml. Όπως παρατηρήθηκε από τα αποτελέσματα, και τα δύο είδη *Lycium* εμφάνισαν καλή αντιοξειδωτική δράση. Η καλύτερη (χαμηλότερη) τιμή IC₅₀ των *L. chinense* και *L. barbarum* επιτεύχθηκε τον Αύγουστο και ήταν $950 \pm 4,7$ και $810 \pm 5,4$ μg / ml για το DPPH[•] ενώ για το ABTS^{•+} ήταν $220 \pm 6,1$ και $195 \pm 3,5$ αντίστοιχα.

Οι αναφερθείσες τιμές IC₅₀ των ριζών DPPH είναι χαμηλότερες συγκριτικά με εκείνες που αναφέρθηκαν από τους Benchennouf et al., (2017) στο υδατικό εκχύλισμα.

Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 18, έδειξαν ότι η αντιοξειδωτική ικανότητα των αφυδατωμένων εισαγόμενων φρούτων goji ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τα φρούτα *L. barbarum* που καλλιεργήθηκαν στην Ελλάδα και συσχετίστηκαν καλά με τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο. Οι αναφερόμενες τιμές και αυτή η συσχέτιση συμβαδίζουν με τις προηγούμενες μελέτες. (Ionică et al., 2012, Donno et al., 2015).

Πίνακας 18: Βιοδραστικές ιδιότητες των καρπών *L. barbarum* και *L. chinense* που καλλιεργούνται στην κεντρική Ελλάδα και των εισαγόμενων. TCC: συνολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες σε mg / g ξηρής ουσίας, TPC: συνολική φαινολική περιεκτικότητα σε mg / g ξηρής ουσίας, *: Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέση ± τυπική απόκλιση τουλάχιστον τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, DPPH[•]: 2,2- πικρυλυδραζύλιο, ABTS^{•+}: 2,2-Αζινο-δις- (3-αιθυλο-βενζοθειαζολινοσουλφονικό οξύ, τιμή IC₅₀ που δείχνει τη συγκέντρωση που προκάλεσε 50% σάρωση της DPPH ρίζας. Αποτελέσματα που δεν μοιράζονται ένα γράμμα (^{a,c,c,d,e}) διαφέρουν σημαντικά σε P <0,05.

Parameters	<i>L. chinense Mill</i>			<i>L. barbarum</i>			<i>L. barbarum</i>	<i>L. barbarum</i>
	<i>LcC1</i>	<i>LcC2</i>	<i>LcC3</i>	LbC1	LbC2	LbC3	Origin China	Origin Mongolia
	June 2015 Collection	August 2015 Collection	October 2015 Collection	June 2015 Collection	August 2015 Collection	October 2015 Collection		
TCC*	395±4.1	440 ^{a,b,c,d} ±5.2	329 ±2.7	452 ± 3.8	490 ^a ± 6.8	370± 4.3	459 ^{a,b,c,d} ± 3.8	434 ^{b,c,d} ± 4.3
TPC*	8.5±0.4	8.9 ^b ±0.7	7.4 ±0.6	9.7±0.2	10.1 ^{a,b} ±0.4	6.9±0.3	9.9 ^{a,b} ±0.6	10.9 ^{a,b} ±0.4
DPPH [•] IC ₅₀ *	1,085±2.9 µg/ml	950 ^a ±4.7 µg/ml	1,254 ±5.1 µg/ml	894 ±6.4 µg/ml	810 ^{b,c,d} ± 5.4 µg/ml	1,150± 7.1 µg/ml	795 ^{b,c,d,e} ± 2.4 µg/ml	784 ^{c,d,e} ± 3.6 µg/ml
ABTS ^{•+} IC ₅₀ *	385±2.9 µg/ml	220 ^{a,b} ±6.1 µg/ml	407 ±4.9 µg/ml	241 ±7.7 µg/ml	195 ^{a,b} ± 3.5 µg/ml	397±4.2 µg/ml	198 ^{a,b} ± 2.8 µg/ml	192 ^{a,b} ± 3.6 µg/ml

3.3.3. Προφίλ λιπαρών οξέων των goji berry.

Η σύνθεση λιπαρών οξέων των δειγμάτων goji berry, παρουσιάζεται στον Πίνακα 19 και εκφράζεται ως ποσοστό (%) των ολικών λιπαρών οξέων (TFA). Τα δείγματα goji του *L. barbarum* που συλλέχθηκαν στη Θεσσαλία τον Ιούνιο (LbC1) βρέθηκαν να έχουν το μεγαλύτερο ποσοστό SFA (43,76%), ενώ στην ίδια περίοδο τα συλλεχθέντα φρούτα από το είδος *L. chinense* (LcC1) είχαν το χαμηλότερο ποσοστό 32,47%.

Από τα είδη *Lycium* που συλλέχθηκαν στη Θεσσαλία, το κυρίαρχο κορεσμένο λιπαρό οξύ ήταν το παλμιτικό (*hexadecanoic acid*, C16:0), με τιμές από 26,02% του δείγματος LcC3 (*L. chinense* που συλλέχθηκε στη Θεσσαλία τον Οκτώβριο), στο 34,79% του LbC1 (*L. barbarum* που συλλέχθηκε στη Θεσσαλία τον Ιούνιο), ενώ το δείγμα προέλευσης Μογγολίας είχε το χαμηλότερο ποσοστό παλμιτικού οξέος μεταξύ όλων των αποτελεσμάτων των δειγμάτων. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν στη μελέτη των Blasi et al., (2016).

Το περιεχόμενο της συνολικής περιεκτικότητας MUFA κυμαίνεται από 10,71% LbC1 έως 12,61% LbC1 έως 22,51% LcC3. Το ελαϊκό οξύ που βρέθηκε ότι είναι το κυριότερο MUFA με ποσοστό που κυμαίνεται από 10,71% του LbC1 έως 19,39% του δείγματος LcC3 (Endes et al., 2015). Το δείγμα *L. chinense*, με λινολεϊκό οξύ (ω -6) (C18: 2n6L) ιδιαίτερα υψηλό στα 30,3% και το δείγμα *L. barbarum* με χαμηλότερη τιμή στα 27,04%). Τα PUFA ήταν τα πιο αντιπροσωπευτικά λιπαρά οξέα, από τιμές 47,77% στο *L. chinense* σε 50,36% σε δείγμα *L. barbarum*.

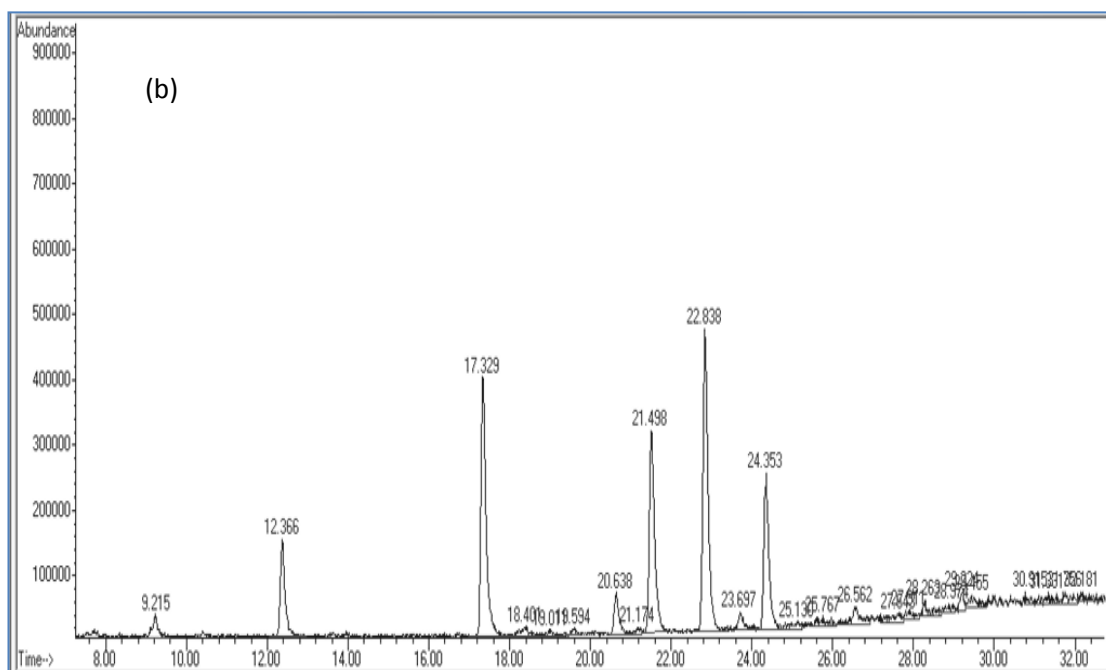
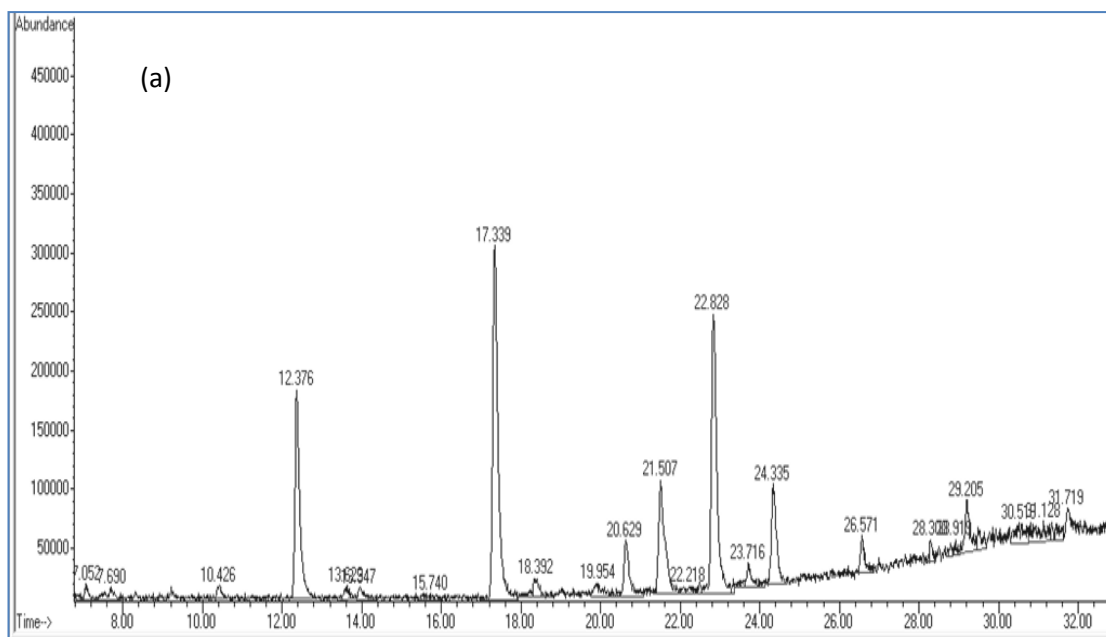
Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αναλογία PUFA / SFA του *L. barbarum* και του *L. chinense* ήταν 1,28 και 1,76 αντίστοιχα. Έχει προταθεί ότι η ισορροπία μεταξύ της πρόσληψης των ω -6 και των ω -3 PUFA είναι πιο σημαντική από τα επίπεδα πρόσληψης των επιμέρους λιπαρών οξέων, όσον αφορά στις μεταβολικές λειτουργίες στο ανθρώπινο σώμα (Ulbricht et al., 2015). Στη παρούσα μελέτη ο λόγος ω 6 / ω 3 του *L. barbarum* είναι 1,89 και του *L. chinense* 1,98.

Πίνακας 19: Σύνθεση λιπαρών οξέων.

Οι αναφερόμενες τιμές είναι % μέσες τιμές \pm SD (n = 3), υπολογιζόμενες σε τιμές περιοχής κορυφής διορθωμένες με θεωρητικούς συντελεστές απόκρισης.

LbC1: *L. barbarum* που συλλέχθηκε στη Θεσσαλία τον Ιούνιο του 2015, LbC2: *L. barbarum* που συλλέχθηκε στη Θεσσαλία τον Αύγουστο του 2015, LbC3: *L. barbarum* που συλλέχθηκε στη Θεσσαλία τον Οκτώβριο του 2015, LcC1: *L. chinense* που συλλέχθηκαν στη Θεσσαλία τον Ιούνιο του 2015, LcC2: *L. chinense* που συλλέχθηκαν στη Θεσσαλία τον Αύγουστο του 2015, LcC3: *L. chinense* που συλλέχθηκαν στη Θεσσαλία τον Οκτώβριο του 2015, SFA: Κορεσμένο λιπαρό οξύ, MUFA: μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, PUFA: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, ND: δεν ανιχνεύθηκε.

Fatty acids (%)	<i>L. barbarum L.</i>			<i>L. chinense Mill</i>			<i>L. barbarum L.</i>	<i>L. barbarum L.</i>	
	LbC ₁	LbC ₂	LbC ₃	LcC ₁	LcC ₂	LcC ₃	<i>Ningxia origin</i>	<i>Mongolia origin</i>	
Palmitic acid	C16:0	34,79 \pm 0.0	34,55 \pm 0.1	29,38 \pm 0.6	26,59 \pm 0.0	26,02 \pm 0.2	29,67 \pm 0.0	23,96 \pm 0.0	20,08 \pm 0.0
Palmitoleic acid	C16:1 n-9	1,90 \pm 0.0	3,07 \pm 0.0	1,66 \pm 0.0	1,78 \pm 0.0	1,51 \pm 0.0	1,80 \pm 0.1	1,01 \pm 0.0	1,00 \pm 0.0
Palmitoleic acid	C16:1 n-7	ND	1,80 \pm 0.0	0,54 \pm 0.1	0,55 \pm 0.1	0,66 \pm 0.1	0,58 \pm 0.0	1,16 \pm 0.1	1,17 \pm 0.1
Stearic acid	C18:0	4,78 \pm 0.2	4,05 \pm 0.0	3,69 \pm 0.1	3,43 \pm 0.0	3,75 \pm 0.0	4,20 \pm 0.0	2,61 \pm 0.0	2,69 \pm 0.1
Oleic acid	C18:1 n-9	10,71 \pm 0.1	11,32 \pm 0.1	16,29 \pm 0.0	18,08 \pm 0.1	17,66 \pm 0.1	19,39 \pm 0.1	14,07 \pm 0.1	15,61 \pm 0.4
Linoleic acid	C18:2 n-6	28,84 \pm 0.4	25,09 \pm 0.3	32,60 \pm 0.1	30,46 \pm 0.0	28,14 \pm 0.4	27,89 \pm 0.1	22,75 \pm 0.1	24,83 \pm 0.1
Arachidic acid	C20:0	1,59 \pm 0.0	1,03 \pm 0.5	3,03 \pm 0.0	1,14 \pm 0.1	0,99 \pm 0.0	1,15 \pm 0.0	1,86 \pm 0.0	2,03 \pm 0.0
α -Linolenic acid	C18:3 n-3	7,99 \pm 0.0	8,85 \pm 0.3	7,15 \pm 0.5	13,52 \pm 0.0	12,47 \pm 0.1	11,27 \pm 0.0	16,46 \pm 0.0	15,39 \pm 0.2
Gondoic acid	C20:1 n-11	ND	1,41 \pm 0.0	1,30 \pm 0.1	0,89 \pm 0.0	0,91 \pm 0.2	0,74 \pm 0.2	3,95 \pm 0.2	4,05 \pm 0.0
Arachidonic acid	C20:4 n-6	0,44 \pm 0.0	2,07 \pm 0.1	0,70 \pm 0.0	0,76 \pm 0.0	1,18 \pm 0.0	0,72 \pm 0.0	1,33 \pm 0.1	1,37 \pm 0.0
Timnodonic acid	C20:5 n-3	6,34 \pm 0.2	5,51 \pm 0.0	3,65 \pm 0.3	1,47 \pm 0.0	2,31 \pm 0.0	1,35 \pm 0.0	4,80 \pm 0.0	4,98 \pm 0.0
Behenic acid	C22	2,60 \pm 0.0	ND	ND	0,56 \pm 0.0	2,88 \pm 0.2	0,48 \pm 0.1	6,03 \pm 0.0	6,78 \pm 0.1
Lignoceric acid	C24	ND	1,23 \pm 0.0	ND	0,75 \pm 0.1	1,50 \pm 0.1	0,76 \pm 0.0	ND	ND
	Σ SFA	43,76	40,86	36,1	32,47	35,14	36,26	34,46	31,58
	Σ MUFA	12,61	17,6	19,79	21,3	20,74	22,51	20,19	21,83
	Σ PUFA	56,22	59,12	63,89	67,51	64,84	63,74	65,53	68,4
	PUFA/MUFA	4,46	3,36	3,23	3,17	3,13	2,83	3,25	3,13
	PUFA/SFA	1,28	1,45	1,77	2,08	1,85	1,76	1,90	2,17
	n6/n3	2,04	1,89	3,08	2,08	1,98	2,27	1,13	1,29



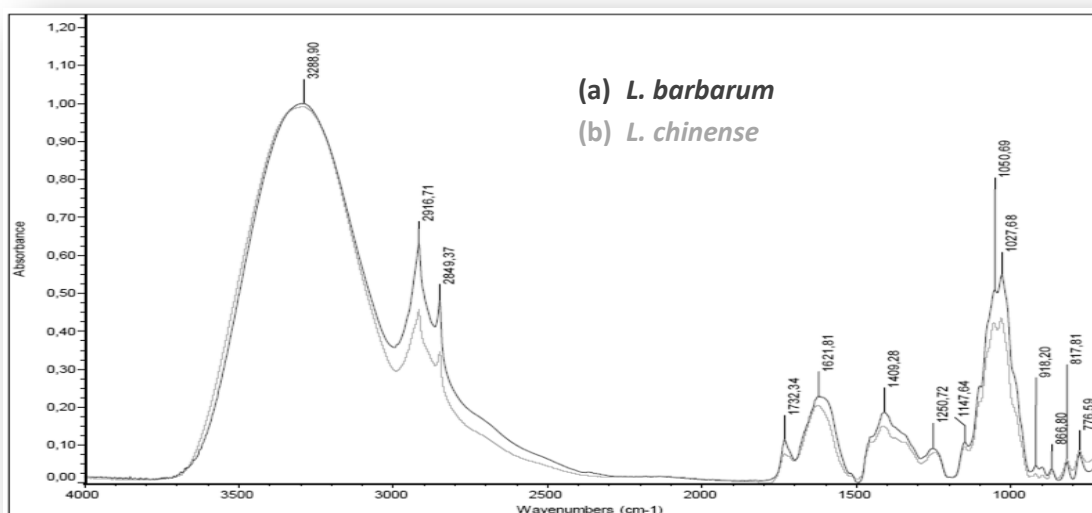
Εικόνα 35: GC-MS προφίλ των *L. barbarum* (a) and *L. chinense* (b) που καλλιεργήθηκαν στην κεντρική Ελλάδα τον Αύγουστο του 2015.

3.3.4. Φασματοσκοπία FT-IR (Fourier-transform infrared spectroscopy).

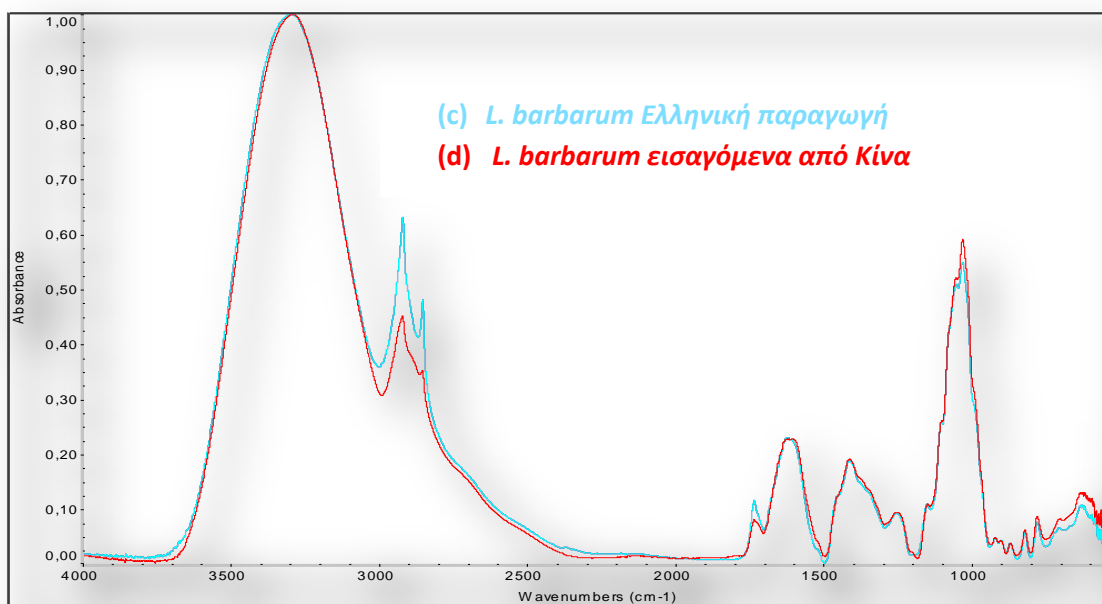
Η σημασία της φασματοσκοπίας IR όπως προαναφέρθηκε για την ποιοτική ανάλυση προκύπτει από τις ιδιότητές της, ιδιαίτερα ως τεχνική δακτυλικών αποτυπωμάτων. Οι λειτουργικές ομάδες και ο χαρακτηρισμός της δομής όλων των κορυφών που παρουσιάζονται στον πίνακα 20.

Πίνακας 20: Ανάλυση κορυφών φάσματος FTIR των λειτουργικών ομάδων των goji berry (*L. barbarum* L. και *L. chinense*) που καλλιεργούνται στην κεντρική Ελλάδα.

<i>L. barbarum</i> Absorption (cm ⁻¹)	Peak intensity	<i>L. chinense</i> Absorption (cm ⁻¹)	Peak intensity	Functional group	Structural characteristic
3288.9	1	3296.7	1	hydroxyl group (-OH) amino group (-NH ₂)	stretching vibration of O-H stretching vibration of N-H
2916.71	0.631	2916.61	0.461	alkyl group (-CH ₂ -)	stretching vibration of C-H
2849.37	0.480	2849.13	0.350	alkyl group (-CH ₂ or -CH ₃)	stretching vibration) of CH ₂ and CH ₃
1732.34	0.115	1732.26	0.077	carboxyl group (-COOH), aldehyde group (-CHO) or esterfunction (-COOR)	stretching vibration of C=O
1621.81	0.229	1624.74	0.207	carbonyl group (-C=O or - CHO) amide group (-NH ₂ or -COR) amino group (-NH ₂)	stretching vibration of C=O bending vibration of N-H or stretching vibration of C=O bending vibration of N-H bound water
				alkyl group (-CH ₂ - or -CH ₃)	bending vibration of C-H
1409.28	0.186	1416.25	0.151	carboxyl group (-COOH)	stretching vibration of C-O
1250.72	0.09	1245.96	0.08	carboxyl group (-COOH)	bending vibration of O-H
1147.64	0.107	1148.14	0.095	b-anomeric configuration	
1050.69	0.51	1053.72	0.426	hydroxyl group (-OH)	bending vibration of O-H
1027.68	0.55	1030.17	0.438	D-glucopyranose ring	symmetrical ring vibration
918.20	0.04	918.98	0.024	α-type glycosidic linkage	symmetrical ring vibration
866.80	0.03	865.69	0.031	α-type glycosidic linkage	symmetrical ring vibration
817,81	0,05	817.64	0.063	α-D-galactopyranose	symmetrical ring vibration
776.59	0.07	776.99	0.08	D-glucopyranose ring	symmetrical ring vibration



Εικόνα 36: FTIR του *L. barbarum* L (a) και του *L. chinense* (b), που καλλιεργήθηκαν στην κεντρική Ελλάδα



Εικόνα 37: FTIR του *L. barbarum* L (c) που καλλιεργήθηκαν στην κεντρική Ελλάδα και εισαγόμενων από την Κίνα καρπών (d).

Οι κυματαριθμοί μεταξύ 950 και 1200/cm καλείται συχνά δακτυλικό αποτύπωμα μορίων επειδή επιτρέπει την ταυτοποίηση των κύριων χημικών ομάδων στις εξεταζόμενες ενώσεις: η θέση και η ένταση των ζωνών που είναι ειδικές για κάθε ένωση (Kawabata *et al.*, 1998, Fellah *et al.*, 2009). Επιπλέον, στο φάσμα IR η χαρακτηριστική ζώνη στα 898 / cm ανήκε στην β-ανομερή διαμόρφωση, η ζώνη στα 1029 / cm, 864 / cm, 817 / cm, 778 / cm μπορεί να αποδοθεί στον δακτύλιο πυρανόζης (Fellah *et al.*, 2009, Teli & Waghmare, 2009). Οι υψηλότερες εντάσεις κορυφής στα φάσματα *L. barbarum* σε σχέση με τα *L. chinense* στην Εικόνα 36 πιθανώς να συσχετίζονται με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε TCC και TPC. Από την άλλη οι συγκρίσεις των φασμάτων των καρπών θεσσαλικής παραγωγής *L. barbarum* με καρπούς εισαγωγής της ίδιας ποικιλίας όπως φαίνετε και στην Εικόνα 37 δεν έδειξαν διαφορές στις λειτουργικές ομάδες που περιέχουν μιας και οι κορυφές ήταν ίδιες με κάποιες διαφορές στην ένταση των κυματαριθμών 1732.34, 2916.71 και 2849.37 που έχει να κάνει με υψηλότερη συγκέντρωση των Ελληνικών καρπών σε λειτουργικές ομάδες που αντιστοιχούν στις κορυφές αυτές σύμφωνα με τον Πίνακα 17.

3.4. Συζήτηση.

Σύγχρονες φαρμακολογικές μελέτες έδειξαν ότι οι ενώσεις που προέρχονται από τους καρπούς του *L. barbarum*, κατέχουν μια σειρά βιολογικών δράσεων συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων (Liang *et al.*, 2011).

Δεδομένου ότι τα φρούτα *L. barbarum* που προέρχονται από καλλιέργειες διαφορετικών περιοχών έχει καταγραφεί ότι διαθέτουν διαφορετικές συγκεντρώσεις κύριων ενεργών συστατικών τους (Jing Z. Dong, 2012), η κύρια φαρμακευτική και λειτουργική χρήση τους θα είναι και αυτή διαφορετική λόγω του ότι σχετίζετε με αυτά.

Η παρούσα μελέτη, διεξήχθη για να διερευνηθεί το χημικό προφίλ δύο ποικιλιών του γένους *Lycium*, που καλλιεργούνται στην κεντρική Ελλάδα, με μέτρηση του περιεχομένου των ολικών υδατανθράκων των ολικών φαινολών, του προφίλ των λιπαρών οξέων και της αντιοξειδωτικής δράσης, που βασίζεται στην ικανότητα εξουδετέρωσης των ελεύθερων ριζών (DPPH[•] και ABTS^{•+}).

Η μελέτη έδειξε ότι οι καρποί που συλλέχθηκαν τον μήνα Αύγουστο είχαν καλύτερο προφίλ βιοδραστικών χημικών ουσιών και στις δύο ποικιλίες. Από την

άλλη πλευρά οι καρποί της ποικιλίας *L. Barbarum* είχαν σε μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυσακχαρίτες και πολυφαινόλες και επέδειξαν καλύτερη αντιοξειδωτική δράση σε σχέση με τους καρπούς της ποικιλίας *L. chinense*. Ενώ μεταξύ των καρπών της ποικιλίας *L. barbarum* που παρήχθησαν στη Θεσσαλία και των εισαγωγής τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν σημαντικά μεγαλύτερη διαφορά της συγκέντρωσης σε ολικούς υδατάνθρακες στους Ελληνικούς καρπούς ενώ οι καρποί από τη Μογγολία έδειξαν σε οριακό ποσοστό καλύτερη συγκέντρωση σε πολυφαινόλες. Τέλος σε σύγκριση με του Θεσσαλικούς καρπούς οριακά καλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση τη δέσμευση των δύο ελεύθερων ριζών επέδειξαν τα Κινεζικής εισαγωγής ενώ οι καρποί με προέλευση από τη Μογγολία παρουσίασαν ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα και από τις προηγούμενες δύο (Πίνακας 15).

Τα γεγονόσ αυτό ίσως οφείλτε στα υδατοδιαλυτά μακρομόρια των *L. Barbarum*, τα οποία εμφανίζουν μια σειρά βιολογικών δραστικοτήτων. Αυτές οι ιδιότητες, αποδίδουνται σε διαλυτά γλυκοσυζεύγματα τα οποία αναγνωρίστηκαν ως πρωτεΐνες αραβινογαλακτάνης (AGPs), αλλά αναφέρονται κυρίως στην κινεζική βιβλιογραφία ως *L. barbarum* πολυσακχαρίτες (LBP). Οι Matsumura et al. (2003), επεσήμαναν ότι η πηκτίνη που περιέχει γαλακτουρονικό οξύ, επέδειξε δράση στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών, πιθανώς λόγω θραύσης του δεσμού μεταξύ του γαλακτουρονικού οξέος και της γλυκοσίδης με αποτέλεσμα την αποικοδόμηση της πηκτίνης. Με άλλα λόγια, το γαλακτουρονικό οξύ στην πηκτίνη μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών.

Αυτό το φαινόμενο επιβεβαιώθηκε από τους (Rashad et al., 2012) που απομόνωσαν τον όξινο πολυσακχαρίτη από τον *Bacillus polymyxa* NRC-A και διαπιστώθηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση των πολυσακχαριτών, εξαρτιόταν κυρίως από την ποσότητα γαλακτουρονικού οξέος. Επιπρόσθετα, το μοριακό βάρος των όξινων κλασμάτων των πολυσακχαριτών, μπορεί επίσης να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο (Wang et al., 2008).

Επιπλέον, τα goji berry περιέχουν πολυφαινόλες που συμβάλουν στην αντιοξειδωτική τους δράση. Η αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών οφείλεται κυρίως στις ιδιότητες οξειδοαναγωγής τους, οι οποίες τις καθιστούν δραστικές ως αναγωγικοί παράγοντες, ως δότες υδρογόνου και επίσης μπορούν να έχουν μεταλλικό δυναμικό χηλίωσης (Re et al., 1999). Ακόμα, η συνεργιστική δράση μεταξύ των αντιοξειδωτικών, καθιστά την αντιοξειδωτική δράση όχι μόνο εξαρτώμενη από τη συγκέντρωση, αλλά και από τη δομή και την αλληλεπίδραση μεταξύ των

αντιοξειδωτικών (*Djeridane et al., 2006*). Αυτό πιθανότατα μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη αντιοξειδωτική ικανότητα των *L. barbarum* έναντι των *L. chinense*, δεδομένου ότι δεν έχουν μόνο υψηλότερη συγκέντρωση ολικών φαινολών, αλλά και υψηλότερη συνολική περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. (*Πίνακας 15*).

Με βάση τη συνολική περιεκτικότητα σε φαινόλες και τις τιμές IC_{50} της ρίζας DPPH, η τρέχουσα μελέτη συντονίζεται με μια προηγούμενη μελέτη των φρούτων goji berry της Ελλάδας, που αναφέρεται χαμηλό TPC και χαμηλότερη δράση της ρίζας DPPH, σε σύγκριση με το υδατικό εκχύλισμά τους (*Benchennouf et al., 2017*). Πράγματι, λόγω των διαφορετικών αντιοξειδωτικών δυνατοτήτων των διαφορετικών ενώσεων, η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος εξαρτάται έντονα από τη διαδικασία εκχύλισης και από τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη (*Jang et al., 2007*).

Η παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη προσπάθεια αξιολόγησης της σύνθεσης λιπαρών οξέων που περιέχονται στα Ελληνικά goji berry. Παρόμοιες μελέτες έχουν ολοκληρωθεί από τους (*Yan et al., 2014; Endez et al., 2015*) σε καρπούς *L. barbarum* Ασιατικής προέλευσης, καθώς και από τους *Blasi et al. (2016)*, που μελέτησαν δεκαέξι εμπορικά δείγματα φρούτων στην Ιταλία και επίσης από τους *Cossignani et al. (2017)* που μελέτησαν και συνέκριναν το προφίλ των λιπαρών οξέων Ιταλικών καρπών καθώς και καρπών από Κίνα και Μογγολία. Οι μελέτες, ανέφεραν ότι τα φρούτα περιείχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις παλμιτικού οξέος, και υψηλότερες ελαϊκού και λινολεϊκού οξέος, σε διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης, ενώ στην τρέχουσα μελέτη, ταυτοποιήθηκαν υψηλότερα ποσοστά των συνολικών κορεσμένων λιπαρών οξέων (ΣSFA) και χαμηλότερα ποσοστά των ΣPUFA. Οι διαφορές αυτές πιθανώς να οφείλονται στη διαφορετική μεθοδολογία εκχύλισης η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαφορές στη σύνθεση των λιπαρών οξέων. (*Blasi et al., 2016*)

Από τη σύγκριση μεταξύ των καρπών της ποικιλίας *L. barbarum* προέκυψε ότι οι θεσσαλικοί καρποί περιείχαν μεγαλύτερα ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων (36,1-43,76%) σε σχέση με τα εισαγωγής (31,58-34,46%) και μικρότερα ποσοστά μονοακόρεστων (12,6-19,8%) και πολυακόρεστων (56,2 - 63,9%) σε σχέση με των εισαγωγής που ήταν (20,2-21,9%) και (65,5-68,4%).

Στη συνέχεια, αναλύθηκαν τα φάσματα FTIR των δύο ποικιλιών για να εκτιμηθούν οι διαφορές μεταξύ των καρπών των δύο ειδών του *Lycium*.

Με βάση τα αποτελέσματα της τρέχουσας μελέτης δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των φασμάτων των δύο ειδών *Lycium θεσσαλικής παραγωγής*, εκτός από το ύψος των κορυφών που αντιπροσωπεύει το περιεχόμενο των λειτουργικών ομάδων στους καρπούς, και που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα των ολικών φαινολών και των ολικών υδατανθράκων. Το ίδιο ισχύει και μεταξύ των καρπών της ποικιλίας *L. barbarum* που προήλθαν από Θεσσαλική παραγωγή με τα εισαγωγής από Ασιατικές χώρες όπως χαρακτηριστικά παρουσιάζεται στην Εικόνα 34.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Αξιολόγηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης και της αντιοξειδωτικής επίδρασης τους σε μυικά κύτταρα C2C12 εκχυλισμάτων goji berries Ελληνικής καλλιέργειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. Αξιολόγηση της αντιμεταλαξιγόνου δράσης και της αντιοξειδωτικής επίδρασης σε μυϊκά κύτταρα C2C12 των εκχυλισμάτων goji berries Ελληνικής καλλιέργειας.

Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν με βάση τις συνθήκες εκχύλισης που προσδιορίστηκαν στο ΚΕΦ. 2 να παραχθούν εκχυλίσματα από καρπούς *L. chinense* και *barbarum* με υψηλές συγκεντρώσεις σε ολικούς υδατάνθρακες και πολυφαινόλες. Τα εκχυλίσματα αυτά αξιολογήθηκαν με βάση την αντιοξειδωτική και την αντιμεταλλαξιγόνο δράση τους και από αυτά επιλέγει το πιο αντιοξειδωτικό με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασής του σε αντιοξειδωτικούς δείκτες σωματικών κυττάρων C2C12.

Η επανάληψη του ελέγχου της δραστηριότητας δέσμευσης ελεύθερων ριζών των εκχυλισμάτων με τις μεθόδους DPPH[•] και ABTS^{•+} πραγματοποιήθηκε διότι τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με διαφορετικούς καρπών goji berry νέας παραγωγής (ένα έτος μετά) σε σχέση με τα προηγούμενα πειράματα. Τα αποτελέσματα και των δύο ελέγχων έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή δράση στη δέσμευση των ριζών με τιμές IC₅₀ κυμαινόμενες από 1,29 έως 3,00 mg / mL με την μέθοδο DPPH[•] και από 0,39 έως 1,10 mg / mL με την μέθοδο ABTS^{•+}. Τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την επαγόμενη από τις ελεύθερες ρίζες βλάβη του DNA, που οφείλεται στις ρίζες υπεροξυλίου (RO₂[•]) με IC₅₀ που κυμαίνεται από 0,69 έως 6,90 mg / mL. Το εκχύλισμα των goji berries, που επέδειξε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση στις παραπάνω αναλύσεις, εξετάστηκε επίσης σε μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα, μυοβλάστες ποντικού C2C12 υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το επιλεγμένο εκχύλισμα, σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, για 24 ώρες και μετρήθηκαν τέσσερις δείκτες οξειδωτικού στρες: τα ολικά δραστικά είδη οξυγόνου (ROS), η γλουταθειόνη (GSH), τα επίπεδα υπεροξειδωσης των λιπιδίων και τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα σε 25 και 100 μg/mL αύξησε τα επίπεδα της GSH έως και 189,5% και μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τα καρβονύλια των πρωτεϊνών κατά 21,8 και 29,1% αντίστοιχα. Η παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη σχετικά με τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις των υποβοηθούμενων από υπερήχους υδατικών εκχυλισμάτων, από goji berries στα μυϊκά κύτταρα.

Τα φρούτα goji berry συλλέχθηκαν από μια πειραματική φυτεία 3 ετών, που βρίσκεται στην περιοχή της Θεσσαλίας κοντά στην πόλη της Λάρισας και στη συνέχεια αποξηράθηκαν στον ήλιο. Η περιεκτικότητα σε υγρασία όλων των δειγμάτων μετρήθηκε με ξήρανση μέχρι σταθερού βάρους στους 105°C χρησιμοποιώντας την επίσημη μέθοδο AOAC 935.29 (Παράγραφος 2.2.3). Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στη συνέχεια υπό ψύξη (0-4°C) για περαιτέρω ανάλυση.

4.2. Υλικά και Μέθοδοι.

Σημείωση

Ο προσδιορισμός της συνολικής περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, των ολικών φαινολών των εκχυλισμάτων, καθώς και οι δύο μέθοδοι (*DPPH-ABTS*) του προσδιορισμού της αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων, περιγράφονται στις παραγράφους (2.2.2 – 2.2.5 – 2.2.6 και 3.2.4.β.) αντίστοιχα.

4.2.1. Χημικά Αντιδραστήρια.

Σε αυτή τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά αντιδραστήρια: Folin Ciocalteu, το ανθρακικό νάτριο σε άνυδρη κρυσταλλική μορφή, το γαλλικό οξύ, η αιθανόλη, το 2,2-διφαινυλ-1-πικρυλ-υδραζύλιο (*DPPH*), η μεθανόλη, το 2,2-αζινο-δις-3-αιθυλ-βενζοθιαζολινοσουλφονικό οξύ (*ABTS*), το ένζυμο υπεροξειδάσης (*HRP*), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το 2,7-διγλωφθορεσκεΐνης (*DCF-DA*) και ο πορτοκαλί υδράργυρος, αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich (*St. Louis, MO, USA*). Το θρεπτικό των κυττάρων (*Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMED*), ο ορός εμβρυϊκού βοδιού (*FBS*) και ο αλατούχος ρυθμιστικός διαλύτης φωσφορικών (*PBS*) αναλυτικής ποιότητας, αγοράστηκαν από την Gibco (*UK*). Το κιτ πολλαπλασιασμού κυττάρων II (*XTT*) αγοράστηκε από την Roche Diagnostics (*Mannheim Germany*).

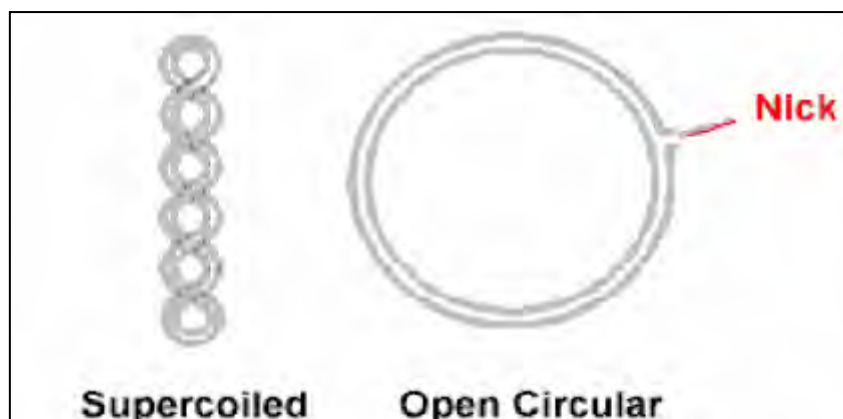
4.2.2. Διαδικασία εκχύλισης.

Για να βελτιστοποιηθεί η διεργασία εκχύλισης οι συνθήκες εκχύλισης ποικίλουν όπως περιγράφηκε προηγουμένως στο κεφάλαιο 2.2.1. Συγκεκριμένα, τα αποξηραμένα φρούτα goji berry με τη χρήση υγρού αζώτου κονιοποιήθηκαν. Από κάθε δείγμα εκχυλίστηκαν 2.5 g, με χρήση αποσταγμένου νερού (50, 75, 93, 99 ή 100 mL), σε γυάλινο ποτήρι των 250 mL. Τα δείγματα προθερμάνθηκαν στην επιλεγμένη πειραματική θερμοκρασία (45, 55, 57 ή 65°C) και στη συνέχεια εισήχθησαν στη

συσκευή εκχύλισης υπερήχων (*Hielscher UP400 S*). Η ισχύς υπερήχων ρυθμίστηκε στα 138, 220, 253, 360, 366,7 ή 368 W / cm², ενώ ο χρόνος εκχύλισης ρυθμίστηκε στα 23, 30, 33,4, 35 ή 40 λεπτά, σύμφωνα με τις επιλεγμένες πειραματικές συνθήκες. Τα ληφθέντα εκχυλίσματα φυγοκεντρήθηκαν στις 12.000 rpm για 15 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέχθηκε και διατηρήθηκε σε καταψύκτη (-20°C) μέχρι περαιτέρω χρήση.

4.2.3. Διάσπαση πλασμιδιακού DNA, που επάγεται από οξειδωτικούς και μεταλλαξιόνους παράγοντες.

Ορισμένοι οξειδωτικοί και μεταλλαξιγόνοι παράγοντες επάγουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν κοψίματα (*nicks*) σε έναν από τους κλώνους ενός δίκλωνου DNA (*Halliwell and Gutteridge 2015*). Οι βλάβες αυτές στο DNA μπορούν να οδηγήσουν στη συνέχεια σε μεταλλαξιγένεση και καρκινογένεση (*Finkel and Holbrook 2000*). Μία από τις μεθόδους που χρησιμοποιείται για να διαπιστώσουμε αν μια ουσία αναστέλλει τη δημιουργία των παραπάνω βλαβών στο DNA είναι η επώαση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα με πλασμιδιακό DNA (*Yamagishi et al., 2001; Kitts et al., 2001*). Το κυκλικό δίκλωνο πλασμιδιακό DNA όταν βρίσκεται στην υπερελικωμένη του μορφή (*supercoiled*) λόγω της συμπαγούς διαμόρφωσής του παρουσιάζει υψηλή ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε μία πηκτή αγαρόζης. Αν προκληθούν κοψίματα σε έναν από τους κλώνους του από έναν μεταλλαξιγόνο παράγοντα τότε το υπερελικωμένο DNA ξετυλίγεται και μετατρέπεται σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (*open circular or relaxed*) το οποίο έχει μειωμένη ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτή αγαρόζης (*Εικόνα 34*). Έτσι σε μία ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης το υπερελικωμένο και το χαλαρωμένο DNA θα δώσουν διαφορετικές ηλεκτροφορητικές ζώνες. Δίκλιωνα κοψίματα οδηγούν στο σχηματισμό γραμμικού DNA (*linear*) το οποίο σε μία πηκτή αγαρόζης μετακινείται ανάμεσα στο υπερελικωμένο και στο χαλαρωμένο DNA. Αν στην αντίδραση προστεθεί μία ουσία που παρεμποδίζει τη δράση της μεταλλαξιγόνου ουσίας τότε θα ανασταλεί και η μετατροπή του υπερελικωμένου DNA σε χαλαρωμένο.



Εικόνα 38: Μετατροπή ενός υπερελικωμένου δίκλωνου κυκλικού πλασμιδιακού DNA (*supercoiled*) σε κυκλικό χαλαρωμένο DNA (*open circular*) μετά τη δημιουργία ενός κοψίματος (*nick*).

4.2.3.α. Διάσπαση πλασμιδιακού DNA, που επάγεται από την ρίζα υδροϋπεροξειδίου (Hydroperoxyl radical HO_2^\cdot).

Σε αντίθεση με το O_2^- , το οποίο ενεργεί κατά κύριο λόγο ως αναγωγικό, το HO_2^\cdot μπορεί να δράσει ως οξειδωτικό, σε μια σειρά από βιολογικές σημαντικές αντιδράσεις, όπως η αφαίρεση ατόμων υδρογόνου από τοκοφερόλη και τα λιπαρά οξέα στη λιπιδική διπλοστοιβάδα. Ως εκ τούτου, μπορεί να είναι ένας σημαντικός εκκινητής της υπεροξειδωσης των λιπιδίων.

Η δοκιμασία διεξήχθη χρησιμοποιώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως στη μελέτη των Chang et al., (2001). Οι ρίζες υδροπεροξυλίου (HOO^\cdot) δημιουργήθηκαν από τη θερμική αποσύνθεση του διϋδροχλωρικού 2,2'-αζωδισ (2-αμιδινο-προπανίου) (AAPH), παρουσία οξυγόνου. Τα αντιδρώντα (10 μl) ήταν: 1 μg DNA πλασμιδίου pBluescriptSK⁽⁺⁾, 2,5 mM AAPH σε PBS (PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4), επώαστηκαν στο σκοτάδι για 45 λεπτά στους 37°C. Μετά την επώαση, η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 3 μl ρυθμιστικό διάλυμα (0,25% μπλε βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλη) και αναλύθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Η αναστολή του μετασχηματισμού της υπερελικωμένης μορφής στο ανοικτό κυκλικό πλασμίδιο, υποδηλώνει ένα μηχανισμό αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξικής δράσης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Τα αποτελέσματα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων έναντι της θραύσης της έλικας του DNA, που προκλήθηκε από την ρίζα του υδροπεροξυλίου, αξιολογήθηκαν όπως περιγράφεται παρακάτω για την θραύση κλώνου DNA που προκαλείται από ρίζες υδροξυλίου.

4.2.3.β. Διάσπαση πλασμιδιακού DNA, που επάγεται από την ρίζα υδροξυλίου (Hydroxyl radical OH[•]).

Η ρίζα του υδροξυλίου είναι εξαιρετικά δραστική στα βιολογικά συστήματα και έχει χαρακτηριστεί ως εξαιρετικά βλαβερό είδος στην παθολογία των ελεύθερων ριζών, ικανό να προκαλέσει βλάβη σε βιομόρια των ζωντανών κυττάρων. Η ρίζα αυτή αλληλεπιδρά με νουκλεοτίδια στο DNA και προκαλεί σπάσιμο των αλυσίδων, γεγονός που οδηγεί στην καρκινογένεση, τη μεταλλαξιγένεση και την κυτταροτοξικότητα. Η ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας OH[•] μιας ουσίας, συνδέεται άμεσα με την αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος.

Η θραύση της αλυσίδας του DNA, μετρήθηκε με τη μετατροπή του δίκλωνου DNA πλασμιδίου pBluescript SK⁽⁺⁾, σε ανοικτή κυκλική μορφή. Η χαλάρωση του DNA, που προκαλείται από τη ρίζα του υδροξυλίου, έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τους Keum et al., (2000), με κάποιες τροποποιήσεις. Τα αντιδρώντα (10 μ l) ήταν: 1 μ g πλασμιδίου DNA pBluescript SK⁽⁺⁾, 10 mM Tris-HCl-1mM EDTA, το εξεταζόμενο εκχύλισμα σε διάφορες συνθήκες και 40 mM H₂O₂. Οι ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) δημιουργήθηκαν από υπεριώδη φωτόλυση του H₂O₂, μετά από ακτινοβόληση του μίγματος της αντίδρασης με λαμπτήρα UV 300 W (OSRAM GmbH, Μόναχο, Γερμανία), για 3 λεπτά σε απόσταση 50 cm. Η αντίδραση τερματίστηκε με την προσθήκη 3 μ l ρυθμιστικού διαλύματος (0,25% μπλε βρωμοφαινόλης και 30% γλυκερόλης) και αναλύθηκε σε 0,8% ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης στα 70 V για 1 ώρα. Οι πηκτές χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο (0,5 μ g /ml), αποχρωματίστηκαν με νερό, φωτογραφήθηκαν και αναλύθηκαν με υπεριώδη ακτινοβολία, χρησιμοποιώντας το σύστημα Alpha Imager EC (Alpha Innotech, Νότια Αφρική) (Εικόνα 39).

Επιπλέον, το πλασμιδιακό DNA pBluescript SK⁽⁺⁾ υποβλήθηκε σε επεξεργασία με κάθε εκχύλισμα, μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση, προκειμένου να εξεταστούν οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων στη διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές. Η δραστικότητα των εξετασθέντων εκχυλισμάτων κατά της θραύσης του κλώνου DNA, που επάγεται από ρίζα υδροξυλίου εκτιμήθηκε με μέτρηση της αναστολής της μετατροπής της διαμόρφωσης υπερελίκωσης, στην ανοικτή κυκλική μορφή.



Εικόνα 39: Σύστημα Alpha Imager EC (Alpha Innotech, Νότια Αφρική).

Η εκατοστιαία αναστολή την οποία προκαλούν τα εξεταζόμενα δείγματα, κατά των ριζών του υδροξυλίου που επάγουν την διάσπαση του κλώνου DNA, υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$\% \text{ inhibition} = [(S - S_0)/(S_{\text{control}} - S_0)] \times 100$ όπου *Scontrol* είναι το ποσοστό του υπερελικωμένου DNA του δείγματος αρνητικού μάρτυρα (μόνο πλασμιδιακό DNA).

Το S_0 είναι το εκατοστιαίο ποσοστό του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA του δείγματος θετικού μάρτυρα (χωρίς εξετασθέντα εκχυλίσματα αλλά παρουσία του οξειδωτικού παράγοντα) και το S είναι το ποσοστό του υπερελικωμένου πλασμιδιακού DNA του δείγματος με τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα και τον παράγοντα έναρξης ριζών.

4.2.4. Κυτταρική καλλιέργεια.

Τα μυϊκά κύτταρα από μνοβλάστες ποντικού C2C12, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό μέσο (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, UK), που περιέχει 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 μονάδες/ml πενικιλίνης και 100 μονάδες/ml στρεπτομυκίνης, σε πλαστικές φιάλες κυτταροκαλλιέργειας, μίας χρήσης, στους 37°C σε 5% CO₂.

4.2.5. Έλεγχος βιωσιμότητας κυττάρων.

Η βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας το kit ανάλυσης XTT [(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfo-phenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide Roche, Germany)]. Εν συντομία, τα κύτταρα C2C12 καλλιεργήθηκαν σε πλάκα που

έφερε 96 πηγαδάκια με 1×10^4 κύτταρα ανά πηγαδάκι, σε θρεπτικό μέσο DMEM. Μετά από επώαση 24 ωρών, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε αγωγή με αυξανόμενες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος goji berry, σε μέσο DMEM χωρίς ορρό, για 24 ώρες. 50 μl διαλύματος XTT, το οποίο παρασκευάστηκε με ανάμιξη 50 μl αντιδραστηρίου επισήμανσης XTT με 1 μl αντιδραστηρίου σύζευξης ηλεκτρονίων, προστέθηκαν στη συνέχεια σε κάθε πηγαδάκι.

Μετά από 4 ώρες επώασης, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm και επίσης στα 690 nm ως μήκος κύματος αναφοράς, σε συσκευή ανάγνωσης μικρο-πλάκας Bio-Tek ELx800 (Winooski, VT, USA) (Εικόνα 40).



Εικόνα 40: Συσκευή ανάγνωσης απορρόφησης μικροπλακιδίων Bio-Tek ELx800.

Οι καλλιέργειες κυττάρων σε DMEM χωρίς ορό χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός έλεγχος. Επίσης, η απορρόφηση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος DMEM χωρίς ορό και σε διάλυμα XTT, δοκιμάστηκε στα 450 nm. Τα δεδομένα υπολογίστηκαν ως ποσοστό αναστολής από τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(O.D. \text{ control} - O.D. \text{ sample}) / O.D. \text{ control}] \times 100$$
 όπου: O.D. control και O.D. sample, δείχνουν την απορρόφηση του αρνητικού μάρτυρα και των ελεγχόμενων συγκεντρώσεων αντίστοιχα. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν.

4.2.6. Αξιολόγηση των επιπέδων GSH και ROS με κυτταρομετρία ροής.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα GSH και ROS αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας πορτοκαλί υδράργυρο (*mercury orange*) και διοξική 2,7-διχλωροφθορεσκεΐνη (*Dichlorofluorescein Diacetate – DCF-DA*), αντίστοιχα. Το πορτοκαλί φθορίζον

δεσμεύεται απευθείας στην GSH, ενώ το DCF-DA εντός των κυττάρων αποακετυλιώνεται από εστεράσες και μετατρέπεται περαιτέρω σε φθορίζον DCF με την οξειδωτική δράση των ROS. Διάλυμα 400 mM πορτοκαλί υδραργύρου παρασκευάστηκε σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4°C, καθώς επίσης και διάλυμα 400mM DCF-DA σε μεθανόλη, το οποίο παρασκευάστηκε πριν το πείραμα. Για τη μέτρηση των επιπέδων GSH και ROS, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν (τοποθετήθηκαν τα κύτταρα σε PBS δηλαδή, 1×10^6 κύτταρα / ml και επώαστηκαν παρουσία πορτοκαλί υδραργύρου (40 μ M) ή DCF-DA (10 μ M) στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Τα κύτταρα μετά πλύθηκαν, επαναιωρήθηκαν σε PBS και υποβλήθηκαν σε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας κυτταρόμετρο ροής FACS Calibur (*Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA*) (Εικόνα 41), με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για ROS και στα 488 και 580 nm για την GSH, αντίστοιχα.



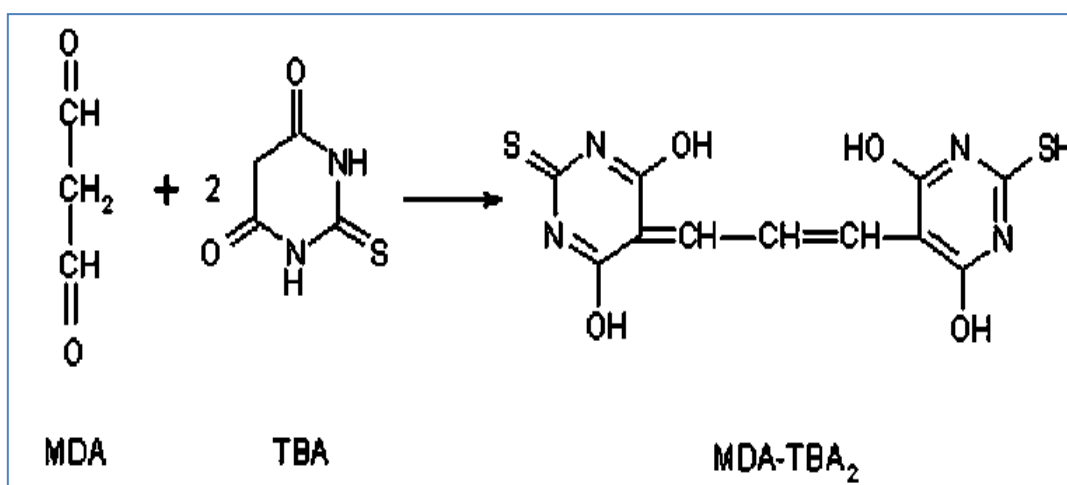
Εικόνα 41: Κυτταρόμετρο ροής FACS (Fluorescence-activated cell sorting) Calibur.

Επιπλέον, μετρήθηκε η σκέδαση φωτός της πρόσθιας και της δεξιάς γωνίας που δείχνουν το μέγεθος των κυττάρων και την εσωτερική σύνθεσή τους αντίστοιχα. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με ρυθμό ροής 1.000 κυττάρων / δευτερόλεπτο. Διεξήχθησαν αναλύσεις σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και οι εντάσεις φθορισμού μετρήθηκαν σε λογαριθμική κλίμακα φθορισμού. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας λογισμικό BD Cell Quest (*Becton-Dickinson*). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

4.2.7. Αξιολόγηση των επιπέδων TBARS με φασματοφωτομετρία.

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), που σχηματίζονται ως παραπροϊόν της υπεροξειδωσης των λιπιδίων,

χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Keles et al., (2001), ελαφρά τροποποιημένη. Το οξειδωτικό στρες στο κυτταρικό περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό άκρως ενεργών και ασταθών υπεροξειδίων των λιπιδίων από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Προϊόν της διάσπασης αυτών των μορίων είναι η μαλονδιαλδεύδη (MDA). Το κυτταρικό αιώρημα (400 ml) ή 400 ml PBS για το τυφλό μίγμα αναμίχθηκαν με 500 ml 35% TCA και 500 ml Trishydrochloride (*Tris-HCl*, 200 mM, ρH 7,4) και επώαστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκε 1 ml 2M Na₂SO₄ και 55 mM θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) διάλυμα και τα δείγματα επώαστηκαν στους 95°C για 45 λεπτά. Η αντίδραση της MDA με το TBA, σχηματίζει το μόριο MDA-TBA.

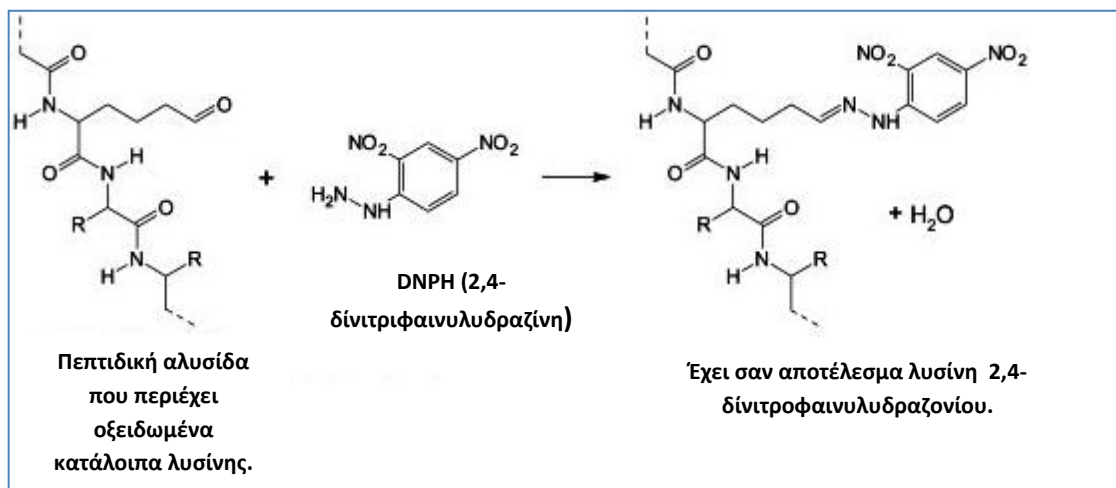


Εικόνα 42: Η αντίδραση της μαλονδιαλδεύδης (MDA), με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA).

Τα δείγματα ψύχθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά και μετά την προσθήκη 1 ml 70% TCA έγινε ανακίνηση των δειγμάτων με vortex. Στη συνέχεια, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκείμενου κλάσματος αναγνώστηκε στα 530 nm. Η δοκιμή απαιτεί περισσότερο από 30 mg απόλυτης ποσότητας πρωτεΐνης στο δείγμα. Η ολική πρωτεΐνη αξιολογήθηκε με Bradford. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης TBARS βασίστηκε στον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA (0,156 $\mu\text{mol/l}$). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

4.2.8. Αξιολόγηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με φασματοφωτομετρία.

Οι πρωτεΐνες και τα αμινοξέα είναι ευαίσθητα σε βλάβες προκαλούμενες από τις ελεύθερες ρίζες. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια είναι ένας δείκτης της οξειδωσης των πρωτεϊνών και χρησιμοποιείται ευρέως. Οι καρβονυλικές ομάδες (αλδεύδες και κετόνες) που αποτελούνται από ένα άτομο άνθρακα σε διπλό δεσμό με ένα άτομο οξυγόνου $C = O$ συνήθως αποτελούν μέρος άλλων μεγαλύτερων λειτουργικών ομάδων. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια παράγονται κυρίως στις προσθετικές ομάδες της προλίνης (*pro*), της αργινίνης (*arg*), της λυσίνης (*lys*) και της θρεονίνης (*thr*). Είναι ένας αξιόπιστος δείκτης οξειδωσης των πρωτεϊνών καθώς τα καρβονύλια είναι σταθερά μόρια. Η αξιολόγηση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στην μέθοδο των Patsoukis et al., (2004). Οι πρωτεΐνες που καρβονυλιώνονται υφίστανται μη αναστρέψιμες βλάβες, καθώς εκτρέπονται από τη φυσιολογική τους λειτουργία. Για παράδειγμα, αν υποστούν καρβονυλίωση ένζυμα όπως εκείνα που επισκευάζουν το DNA ή οι DNA πολυμεράσες, το DNA δε θα επιδιορθώνεται ούτε θα αντιγράφεται με την απαραίτητη πιστότητα. Ο σχηματισμός των καρβονυλίων συνήθως ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4-δινιτρυφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό του 2,4-δινιτροφαινυλδραζονίου (Εικόνα 43).



Εικόνα 43: Ο σχηματισμός καρβονυλίων ανιχνεύεται με την αντίδρασή τους με το DNPH (2,4 δινιτρυφαινυλδραζίνη) προς σχηματισμό 2,4 δινιτρυφαινυλδραζονίου.

Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε κατεργασία με θρυψίνη, πλύθηκαν με PBS και στη συνέχεια λύθηκαν με υπερήχους. Στη συνέχεια, 200 ml 20% TCA προστέθηκαν σε 200 ml κυτταρολύματος και αυτό το μίγμα επώαστηκε σε λουτρό πάγου για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε. Κατόπιν, προστέθηκε στο ίζημα 0,5 mL του 10 mM DNPH

(διαλυμένο σε 2,5 N HCL) για τα δείγματα ή 0,5 mL 2,5 N HCL για τα τυφλά (κάθε δείγμα έχει το δικό του τυφλό), διαλύθηκε με την πιπέτα το ίζημα, αναδεύτηκε και επώαστηκε στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση στο vortex κάθε 15 λεπτά.

Μετά την πάροδο της μίας ώρας, έγινε φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1 ml 10% TCA, ακολουθεί ανάδευση και φυγοκεντρούμε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1ml αιθανόλης και οξικού μεθυλεστέρα (1:1 v/v). Εκτελέστηκε ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4°C. Το τελευταίο βήμα εκτελέστηκε άλλες δύο φορές, για να απομακρυνθεί πλήρως το DNPH που δεν αντέδρασε. Το υπερκείμενο απομακρύνθηκε και προστέθηκε 1ml 5M Urea (pH 2,3) η οποία προκαλεί μετουσίωση των πρωτεϊνών (διασπώντας τους ομοιοπολικούς δεσμούς), αυξάνοντας έτσι τη διαλυτότητά τους. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C. Τέλος, μεταφέρθηκαν με την πιπέτα 900 ml σε κυψελίδα και μετρήθηκε η απορρόφηση στα 375 nm. Η δοκιμή απαιτεί περισσότερο από 30 mg απόλυτης ποσότητας πρωτεΐνης στο δείγμα. Η ολική πρωτεΐνη αξιολογήθηκε με Bradford. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τρεις φορές.

4.2.9. Στατιστική ανάλυση.

Οι βέλτιστες παράμετροι εκχύλισης προσδιορίστηκαν με μαθηματικό μοντέλο βασισμένο στο πειραματικό σχέδιο Box Behnken όπως περιγράφηκε προηγουμένως στο κεφάλαιο 2. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής, θεωρήθηκε ότι μια τιμή $P < 0.05$ υποδηλώνει μια στατιστικά σημαντική διαφορά. Επιπλέον, εφαρμόστηκε μονόδρομη ANOVA, ακολουθούμενη από τη δοκιμή Tukey για πολλαπλές συγκρίσεις με ζεύγη χρησιμοποιώντας λογισμικό SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ΗΠΑ). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm SEM.

4.3. Αποτελέσματα.

4.3.1. Ολικό φαινολικό και υδατανθρακικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων goji berries.

Στον πίνακα 21 παρουσιάζεται, το ολικό φαινολικό και υδατανθρακικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων goji berries.

Πίνακας 21: Παράμετροι εκχύλισης όπως: η συνολική περιεκτικότητα φαινολών και υδατανθράκων σε κάθε εκχύλιση, καθώς και η αντιοξειδωτική τους δράση, όπως εκτιμήθηκε από την DPPH[•], ABTS^{•+} και τη θραύση του πλασμιδιακού DNA που προκαλείται ρίζες υδροπεροξυλίου.

Samples	Variety	Ratio of water to dry goji berry (mL/g)	Extraction temperature (°C)	Ultrasonic power (W/cm ²)	Extraction time (min)	Total carbohydrate (g/L of extract)	TPC ^a (mg GAE/L)	DPPH [•] ^b	ABTS ^{•+} ^b	ROO [•] ^b
1	<i>L. barbar.</i>	30.0	55.0	138.0	40.0	0.958	272.3	2.33±0.03	0.67±0.01	1.80±0.05
2	<i>L. barbar.</i>	40.0	45.0	253.0	30.0	1.155	296.3	2.10±0.02	0.85±0.02	1.90±0.01
3	<i>L. barbar.</i>	39.4	50.0	335.7	33.4	1.201	323.3	1.90±0.01	0.75±0.03	4.60±0.05
4	<i>L. barbar.</i>	40.0	65.0	138.0	30.0	1.079	234.3	2.15±0.02	0.77±0.01	4.30±0.041
5	<i>L. barbar.</i>	20.0	57.0	220.0	23.0	1.191	394.3	1.45±0.02	1.10±0.04	0.69±0.018
6	<i>L. barbar.</i>	20.0	45.0	360.0	35.0	1.181	351.3	1.29±0.01	0.42±0.03	1.75±0.026
7	<i>L. barbar.</i>	30.0	65.0	368.0	30.0	1.010	303.3	2.80±0.04	1.05±0.04	1.40±0.031
8	<i>L. barbar.</i>	36.3	56.4	224.4	22.9	1.054	283.3	3.00±0.03	0.65±0.02	6.90±0.045
9	<i>L. chinense</i>	20.0	57.0	220.0	23.0	0.941	371.3	2.20 ±0.04	0.64±0.02	2.40±0.034
10	<i>L. chinense</i>	20.0	45.0	360.0	35.0	0.916	297.3	1.70±0.03	0.39±0.01	1.95±0.024

^aTPC: total polyphenolic content. ^bIC₅₀ values (mg/ml) shown as mean ± SD of at least three independent experiments.

Το TPC κυμαινόταν από 234,3 έως 394,3 mg GAE / L εκχυλίσματος Το υψηλότερο επίπεδο πολυφαινολών βρέθηκε στο εκχύλιση Νο5 από ποικιλία *L.*

barbarum. Η υψηλότερη τιμή της TPC στην ποικιλία *L. chinense* ήταν 371,3 mg GAE / L του εκχυλίσματος Νο9.

Το συνολικό περιεχόμενο σε υδατάνθρακες των εκχυλισμάτων κυμαίνεται από 0,916 έως 1,201 g / L. Η υψηλότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες παρουσιάστηκε στο εκχύλισμα Νο3 από ποικιλία *L. barbarum*, ενώ το εκχύλισμα Νο9 είχε την υψηλότερη τιμή 0,941 mg GAE /L.

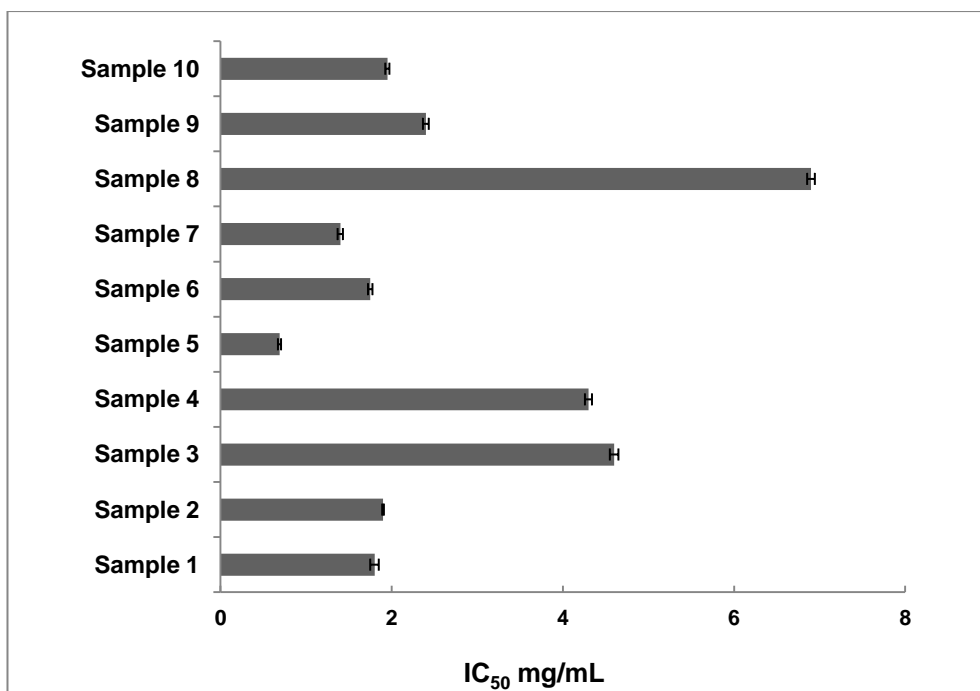
4.3.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας ελευθέρων ριζών χρησιμοποιώντας τις μεθόδους DPPH[•] και ABTS^{•+}.

Όλα τα εκχυλίσματα παρουσίασαν δραστηριότητα έναντι των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+}. Στην ανάλυση DPPH, οι τιμές IC₅₀ κυμαίνονταν από 1,29 έως 3,00 mg/mL. Την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασε το εκχύλισμα Νο6 της ποικιλίας *L. barbarum*, ενώ το εκχύλισμα Νο8 (*L. barbarum*) είχε τη χαμηλότερη δραστηριότητα. Το εκχύλισμα Νο10 ήταν το πιο ισχυρό εκχύλισμα της ποικιλίας *L. chinense* με IC₅₀ 1,70 mg / mL (Πίνακας 18).

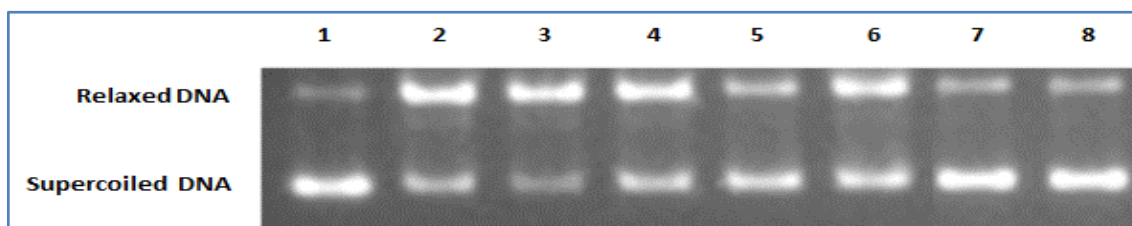
Στην μέθοδο ABTS^{•+}, η πιο ισχυρή δράση παρουσιάστηκε με το εκχύλισμα Νο10 από την ποικιλία *L. chinense* με IC₅₀ 0,39 mg/mL και τη χαμηλότερη δράση παρουσίασε το εκχύλισμα από την ποικιλία *L. barbarum* με IC₅₀ 1,10 mg /mL. Μεταξύ των εκχυλισμάτων *L. barbarum*, το Νο6 εμφάνισε την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση με IC₅₀ 0,42 mg/mL (Πίνακας 18).

4.3.3. Προστατευτική δράση κατά των βλαβών DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες.

Όλα τα εκχυλίσματα προστατεύονται από βλάβες που επάγονται από τις ρίζες υπεροξυλίου (ROO[•]), με τιμές IC₅₀ που κυμαίνονται από 0,69 έως 6,90 mg/mL (Πίνακας 18 και Εικόνα 44). Το πιο ισχυρό ήταν το εκχύλισμα Νο5, ενώ το εκχύλισμα Νο8 είχε τη χαμηλότερη δραστηριότητα. Το πιο ισχυρό από τα εκχυλίσματα *L. chinense* ήταν το Νο10 με IC₅₀ 1,95 mg/mL. Επιπλέον, το εκχύλισμα Νο5, ήταν το μοναδικό εκχύλισμα το οποίο επέδειξε προστατευτική δράση, έναντι βλαβών DNA που προκαλούνται από ρίζες υδροξυλίου (OH[•]) με IC₅₀ 1,87 mg / mL (Εικόνα 45) .



Εικόνα 44: IC₅₀ των εκχυλισμάτων goji berries έναντι ROO^{•-} (επαγωγή βλάβης DNA).



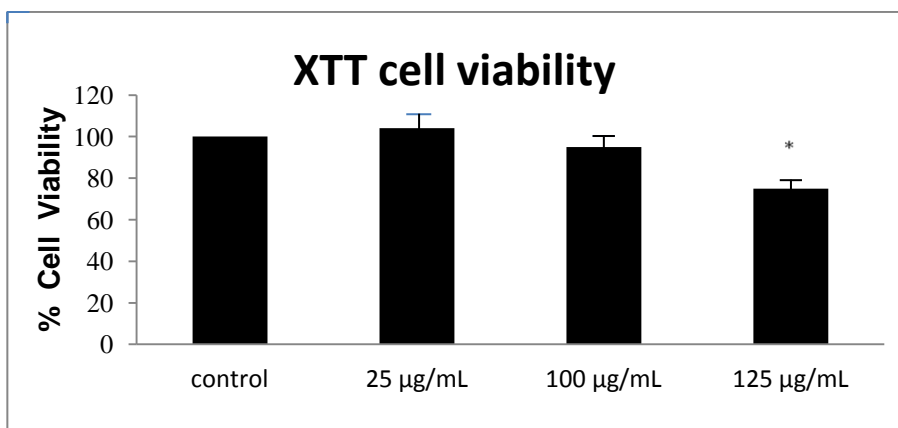
Εικόνα 45: Προστατευτική δράση του εκχυλίσματος No5 κατά της επαγόμενης από ROO^{•-} βλάβης του DNA.

Lane 1, πλασμιδιακό DNA χωρίς καμία επεξεργασία. Lane 2, Πλασμιδιακό DNA που εκτίθεται σε AAPH. Lanes 3-7, το πλασμιδίο DNA εκτίθεται σε AAPH παρουσία 0,06, 0,12, 0,24, 0,48 και 1,92 mg / mL εκχυλίσματος αντίστοιχα. Lane 8, το πλασμιδιακό DNA εκτίθεται σε 1,92 mg / mL εκχύλισμα μόνο.

4.3.4 Επιδράσεις εκχυλίσματος goji berry στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12.

Όπως αναφέρθηκε, το εκχύλισμα No5 από την ποικιλία *L. Barbarum*, επέδειξε μία από την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση, που συνοδεύεται με την υψηλότερη προστασία, έναντι βλαβών του DNA, που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Έτσι, επιλέχθηκε το εκχύλισμα No5 για εξέταση των αντιοξειδωτικών του δράσεων σε κύτταρα C2C12. Εν τούτοις, αρχικά, η επίδραση των εκχυλισμάτων στη βιωσιμότητα των κυττάρων αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία XTT, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Τα

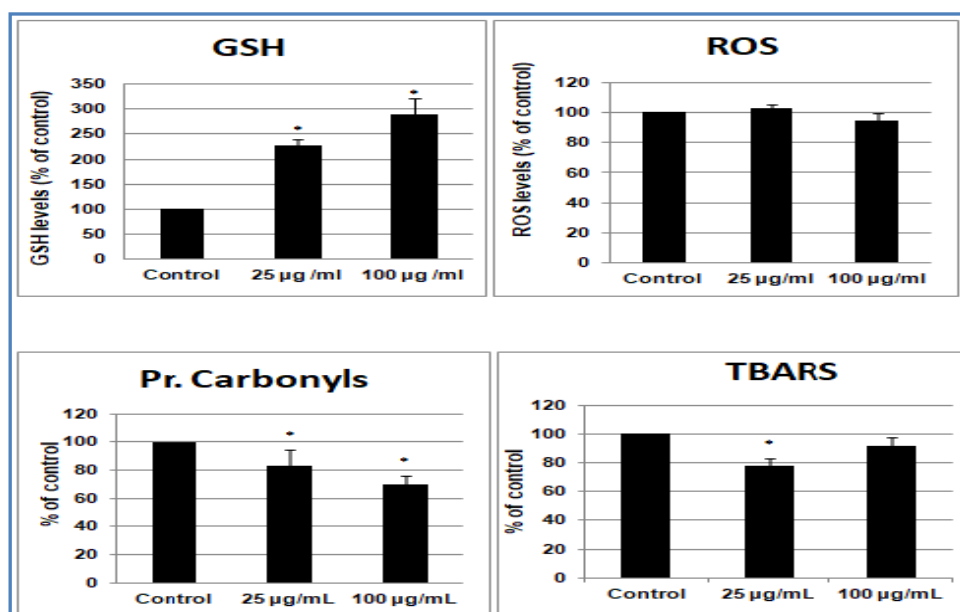
αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα είχε κυτταροτοξικότητα σε συγκέντρωση >125 µg/mL (Εικόνα 46). Έτσι, οι μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εξέταση της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των εκχυλισμάτων ήταν 25 και 100 µg/mL.



Εικόνα 46: Βιωσιμότητα κυττάρων C2C12, μετά από επεξεργασία με το εκχύλισμα goji berry Νο5. Τα αποτελέσματα αντιπροσωπεύουν το μέσο ± SEM, τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που διεξάγονται εις τριπλούν. * $p < 0,05$: για τιμές στατιστικά σημαντικές.

4.3.5. Αντιοξειδωτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος Νο5 των goji berries, σε μυϊκά κύτταρα C2C12.

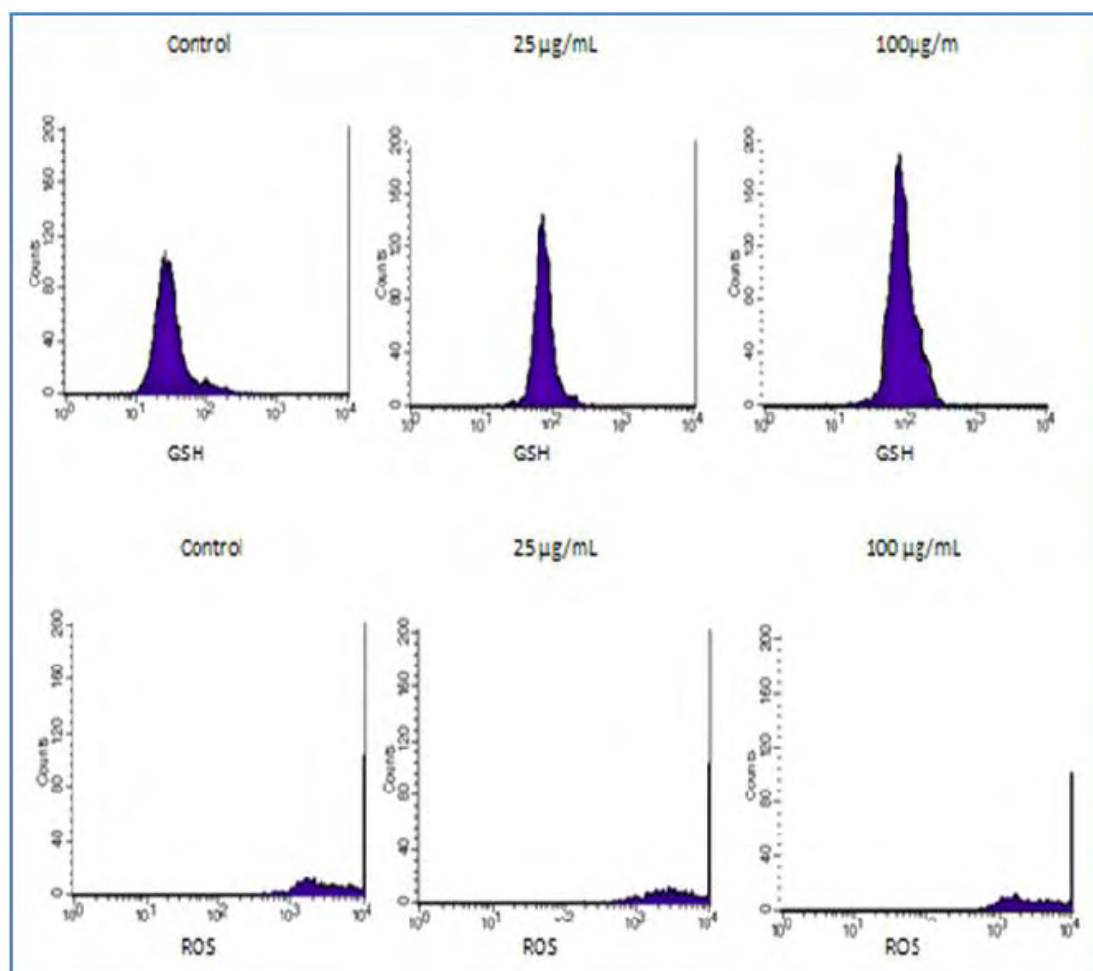
Για την εκτίμηση των αντιοξειδωτικών επιδράσεων του εκχυλίσματος Νο5, σε κύτταρα C2C12, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις δείκτες οξειδωτικού στρες, τα επίπεδα ROS, GSH, TBARS και CARB (Εικόνα 47).



Εικόνα 47: Επίπεδα ROS, GSH, TBARS και CARB, σε κύτταρα C2C12, με την προσθήκη του εκχυλίσματος Νο5 των goji berries. (Το επίπεδο σημαντικότητας $*p < 0,05$ σε σύγκριση με το Control).

Τα επίπεδα της GSH αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής (Εικόνα 47,48). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα Νο5 αύξησε τα επίπεδα της GSH κατά 127,5 και 189,5% στα 25 και 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ αντιστοίχως, σε σύγκριση με τον έλεγχο. Ωστόσο, η ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, έδειξε ότι η θεραπεία των κυττάρων με το εκχύλισμα Νο5 δεν επηρέασε τα ROS σε σύγκριση με τον έλεγχο.

Όσον αφορά στα επίπεδα TBARS, δείκτη υπεροξειδωσις λιπιδίων, διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με το εκχύλισμα Νο5 των κυττάρων τους, μείωσε κατά 21,8 και 9,4% στα 25 και 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα. Τέλος, το εκχύλισμα Νο5 μείωσε τα επίπεδα CARB που δείχνουν οξείδωση πρωτεΐνης, κατά 26,8 και 29,9% στα 25 και 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα.



Εικόνα 48: Επιδράσεις του εκχυλίσματος Νο5 των goji berries, μετά από αγωγή για 24 ώρες, σε κύτταρα C2C12 και με προσθήκη οξειδωτικού παράγοντα, χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής. Ιστογράμματα αριθμών κυττάρων έναντι του φθορισμού των 10.000 κυττάρων που αναλύθηκαν για την ανίχνευση της GSH. Τα

ιστογράμματα δείχνουν επίσης και τον αριθμό των κυττάρων έναντι του φθορισμού των 10.000 κυττάρων, που αναλύθηκαν για την ανίχνευση των ROS.

4.4. Συζήτηση.

Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού και των ενδογενών ελευθέρων ριζών, έχει ως αποτέλεσμα την υπεροξείδωση των λιπιδίων, τη βλάβη του DNA, την οξείδωση πρωτεϊνών και το γενικό οξειδωτικό στρες και συνεπώς την πρόκληση πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Σύμφωνα με τους Gerasopoulos et al. (2015a, b), οι οργανισμοί, διαθέτουν ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς προκειμένου να καλύψουν ζημιές μορίων και να παρέχουν περαιτέρω προστασία έναντι των οξειδωτικών βλαβών. Η αναστολή ή η αντιοξειδωτική δράση των ελευθέρων ριζών παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των οργανισμών από βλάβες στους ιστούς.

Ένας από τους ιστούς που είναι ιδιαίτερα επιρρεπείς σε οξειδωτικό στρες είναι ο σκελετικός μυς (Nicolaidis et al., 2008). Στους σκελετικούς μυς, η υπερπαραγωγή των ROS μπορεί να συμβεί ακόμη και κάτω από φυσιολογικές διεργασίες όπως η άσκηση. Κατά τη διάρκεια της άσκησης υπάρχει υψηλό ποσοστό κατανάλωσης O₂ σε σκελετικούς μύες, που μπορεί να προκαλέσει ατελή μείωση του O₂ και διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, οδηγώντας στην παραγωγή ROS και οξειδωτικού στρες (Hood et al., 2011). Με τη σειρά του, οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα τη βλάβη των κυττάρων και την κόπωση των μυών (Phaneuf & Leeuwenburgh, 2001). Έτσι, προτείνεται αντιοξειδωτική συμπλήρωση για την εξουδετέρωση των βλαβών που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες στους σκελετικούς μύες (Kerasioti et al., 2012).

Εντούτοις, η παρουσία φυσικών μηχανισμών με αντιοξειδωτικές επιδράσεις δεν μπορεί να είναι αποτελεσματική από μόνη της καθώς οι διατροφικές συνήθειες, ιδιαίτερα η συμπλήρωση με φυσικά αντιοξειδωτικά προϊόντα, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον Gerasopoulos et al., (2015b).

Ένα τέτοιο φυσικό προϊόν είναι το *L. barbarum*, που διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους στις φαρμακολογικές και βιολογικές λειτουργίες, στη γνωστή κινεζική παραδοσιακή ιατρική και είναι επίσης γνωστό ως ένα είδος superfood (Cheng et al., 2015). Δεδομένου ότι οι καρποί *L. barbarum* των διαφόρων περιοχών έδειξαν διαφορετικά περιεχόμενα των κύριων ενεργών συστατικών (Dong et al., 2013, Zheng

et al., 2010, Wang, 2002, Li, 2007), η κύρια φαρμακευτική τους χρήση θα πρέπει κατά συνέπεια να διαφέρει.

Για το λόγο αυτό, σε προηγούμενη μελέτη, όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 εντοπίσαμε τις βέλτιστες παραμέτρους εκχύλισης της υποβοηθούμενης εκχύλισης με υπέρηχους, με σχεδιασμό πειράματος Benken Box, προκειμένου να λάβουμε εκχυλίσματα με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και πολυσακχαρίτες χρησιμοποιώντας εμπορικά εισαγόμενα φρούτα και φρούτα που συλλέγονται από την κεντρική Ελλάδα.

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκαν οι αντιοξειδωτικές και αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις των εκχυλισμάτων από goji berries, από τις ποικιλίες *L. barbarum* και *L. Chinense*, που καλλιεργούνται από την περιοχή της Θεσσαλίας. Στην αρχή, εκτιμήθηκε η ικανότητα των εκχυλισμάτων να αντιμετωπίζουν τις ελεύθερες ρίζες DPPH[•] και ABTS^{•+}. Κατόπιν, μελετήθηκε η προστατευτική δράση κατά της επαγόμενης από ρίζες υπεροξυλίου και υδροξυλίου στη διάσπαση πλασμιδιακών κλώνων. Επιπροσθέτως, όλα τα εκχυλίσματα εμφανίζουν προστατευτική δράση εναντίον της διάσπασης του πλασμιδιακού DNA από ρίζα υπεροξυλίου, αλλά μόνο ένα δείγμα έδειξε ειδική δραστηριότητα και έναντι θραυσμάτων που προκαλούνται από τη ρίζα υδροξυλίου. Αυτό μπορεί να οφείλεται στον υψηλό ρυθμό αντίδρασης του OH με το DNA και έτσι είναι πιο δύσκολο για τα αντιοξειδωτικά μόρια να ασκούν τις προστατευτικές τους επιδράσεις (*Priiftis et al.*, 2015).

Από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναφέρει τις προστατευτικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων *Lycium barbarum* και *Lycium chinense* έναντι βλαβών του DNA που προκαλείται από ρίζες OH[•] και ROO[•]. Ωστόσο, οι Ceccarini et al., (2016) μελέτησαν *in vitro* τα προστατευτικά αποτελέσματα των *L. barbarum* που καλλιεργούνται στην Umbria (Ιταλία), σε ανθρώπινα κύτταρα ηπατοκυτταρικού καρκινώματος και επέδειξαν προστατευτική δράση στη βλάβη του DNA, εκφρασμένη ως αντιγενετοξική δράση *in vitro*. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, επελέγη το εκχύλισμα No5, το οποίο παρουσίασε δεύτερη πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση έναντι των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} και την ισχυρότερη αντιμεταλλαξιογόνο δράση, έναντι ριζών OH[•] και ROO[•] στη θραύση πλασμιδιακού DNA. Στο επιλεγμένο εκχύλισμα η υψηλή συνολική φαινολική περιεκτικότητα, ακολουθήθηκε από υψηλή αντιοξειδωτική δράση αλλά όχι υψηλότερη σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα No6 και No10 έναντι των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+},

υποδεικνύοντας ότι η σχέση μεταξύ φαινολικής και αντιοξειδωτικής δράσης μπορεί να μην είναι απλή και μπορεί επίσης να εξαρτάται στην σύνθεση πολυφαινόλης, εκτός από την ποσότητα (Priftis *et al.*, 2015). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Bai *et al.*, 2016), στις μετρήσεις της αντιοξειδωτικής δραστηριότητας κατά των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+}, τα υψηλά επίπεδα φαινολικών ενώσεων δεν οδηγούν πάντοτε σε χαμηλές τιμές IC₅₀. Επιπλέον, τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών μεθόδων μπορεί να μην συσχετίζονται καλά μεταξύ τους ή ακόμη και να είναι αντιφατικά λόγω της διαφορετικής σύστασης των δύο ελεύθερων ριζών. Οι δύο *in-vitro* μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν σε εκχυλίσματα και όχι σε καθαρές ενώσεις, λόγω της προφανής δυσκολίας της απομόνωσης και μέτρησης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων κάθε αντιοξειδωτικού συστατικού χωριστά. Ωστόσο, αυτά τα συστατικά μπορεί να αλληλεπιδράσουν ή να εξουδετερωθούν, μέσα σε ένα εκχύλισμα και μπορεί να έχουν διάφορους βαθμούς αντιοξειδωτικού δυναμικού, σύμφωνα με τη σύνθεση και τη χημική δομή. Αυτό μπορεί να εξηγεί τα διαφορετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μεθόδους DPPH και ABTS. Επίσης, οι δύο ρίζες έχουν διαφορετική χημική δομή και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικούς τύπους βιοδραστικών συστατικών των εκχυλισμάτων.

Κατόπιν, για να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις, εξετάστηκε η κυτταροτοξικότητα του δείγματος No5 στα κύτταρα μυοβλαστών ποντικού C2C12, με την δοκιμασία XTT. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα είχε κυτταροτοξικότητα σε συγκέντρωση > 125 μg/mL. Έτσι, οι μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις των 25 και 100 μg/mL χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να εξεταστούν η δράση του δείγματος No5, στην κυτταρική οξειδοαναγωγή σε κύτταρα C2C12, με εκτίμηση της των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής.

Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση ολικών σακχάρων στα υδατικά εκχυλίσματα από ποικιλία *L. Barbarum* ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με εκείνα του *L. Chinense* στις ίδιες συνθήκες εκχύλισης. Με βάση τα αποτελέσματα, η υψηλή περιεκτικότητα σε ολικά σάκχαρα σε συνδυασμό με την υψηλότερη πολυφαινολική περιεκτικότητα εμφανίζει την υψηλότερη αντιμεταλλαξιγόνο δραστηριότητα έναντι της επαγόμενης από ρίζες OH[•] και ROO[•] διάσπασης της πλασμιδιακής αλυσίδας DNA, επιβεβαιώνοντας τις μελέτες των Gan *et al.*, (2004) και Lin *et al.*, (2009), σχετικά με την προστατευτική δράση των LBPs (*Lycium barbarum polysaccharides*), στη βλάβη του DNA και επίσης στην έκθεση με την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση λόγω της

ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης των γλυκοσυζευγμάτων σύμφωνα με τους Zhao et al., (2005).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αγωγή των μυϊκών κυττάρων C2C12, με το επιλεγμένο εκχύλισμα, χωρίς την παρουσία οξειδωτικού παράγοντα, οδηγεί στην ενίσχυση της αντιοξειδωτικής τους κατάστασης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της GSH. Οι ζωντανοί οργανισμοί εκτίθενται συνεχώς σε ξενοβιοτικά. Η GSH είναι ένα από τα πιο κρίσιμα και καλά μελετημένα αντιοξειδωτικά μόρια και είναι το σύμπλεγμα γλυκίνης, κυστεΐνης και γλουταμινικού οξέος. Σύμφωνα με τον Yu, (1994), ο αριθμός των ξενοβιοτικών και των ελευθέρων ριζών, αποτοξινώνονται με την GSH με δύο τρόπους, είτε με την κύρια φάση της ενζυμικής αποτοξίνωσης που είναι η σύζευξη ενεργοποιημένων ξενοβιοτικών σε μειωμένη γλουταθειόνη (GSH) καταλυόμενη από την γλουταθειόνη-S-τρανσφεράση (GST), είτε με τη χρήση ως δότης ηλεκτρονίων από τη σουλφυδρυλική ομάδα του (-SH). Ως εκ τούτου, η αύξηση των επιπέδων της GSH, φαίνεται να είναι ένας από τους μοριακούς μηχανισμούς, που αντιπροσωπεύουν τη βελτίωση της αντιοξειδωτικής δράσης, από το εκχύλισμα goji berry στα μυϊκά κύτταρα. Η παρατηρούμενη αύξηση των επιπέδων GSH από τη θεραπεία εκχυλισμάτων goji berry μπορεί ίσως να αποδοθεί στην ενεργοποίηση του πυρηνικού παράγοντα (erythroid-derived 2) -like 2 (Nrf2). Το Nrf2 είναι ένας παράγοντας μεταγραφής που ρυθμίζει την έκφραση αρκετών αντιοξειδωτικών και κυτταροπροστατευτικών ενζύμων και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες αντιοξειδωτικές αποκρίσεις στο οξειδωτικό στρες (Vomund et al., 2017). Επιπλέον, το Nrf2 ρυθμίζει την έκφραση των ενζύμων συνθάσης γάμμα-γλουταμυλοκυστεΐνης (g-GCS) και αναγωγάσης γλουταθειόνης (GR) που παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH στα κύτταρα (Cao et al., 2017). Πρόσφατες μελέτες σε κυτταρικές σειρές και in vivo έδειξαν ότι οι πολυσακχαρίτες *L. barbarum* ενισχύουν την αντιοξειδωτική δράση μέσω της επαγωγής του μηχανισμού Nrf2 (Li et al., 2017; He et al., 2014; Cao et al., 2017) και αυτό ίσως αποτελεί και την εξήγηση στα αποτελέσματά μας.

Τα αποτελέσματα της ερευνάς μας συμβαδίζουν με αυτά της μελέτης των Yi et al., (2013), που χρησιμοποιούν επίσης σχεδιασμό για να μελετήσουν την τεχνολογία των υπερήχων, προκειμένου να βελτιστοποιήσουν την εκχύλιση των πολυσακχαριτών *L. barbarum* (LBP) και να μελετήσουν το αντιγηραντικό τους αποτέλεσμα δημιουργώντας ένα μοντέλο ποντικού D-gal (το ζώο μοντέλο που εγχύεται με d-γαλακτόζη, το οποίο τυπικά καθιερώθηκε με χορήγηση διαδοχικών υποδόριων ενέσεων

d-gal σε ζώα για περίπου έξι ή οκτώ εβδομάδες, χρησιμοποιείται συχνά για έρευνα γήρανσης). Το πειραματικό μοντέλο σχηματίστηκε με συνεχή έγχυση D-gal και η ικανότητα αντιγήρανσης των LBPs, δοκιμάστηκε χρησιμοποιώντας τις μεθόδους MDA, CAT και GPx και SOD σε επίπεδα αίματος και SOD, MDA και Hyr στο δέρμα. Η μελέτη των Changbo και Zhaojun (2012), έδειξε ότι οι LBPs θα μπορούσαν να περιορίσουν το οξειδωτικό στρες σε ποντικούς, που προκαλείται από την άσκηση κολύμβησης, προωθώντας αυξήσεις στις δραστηριότητες των κύριων αντιοξειδωτικών ενζύμων (SOD, CAT και GPx) και μικρή αύξηση του MDA.

Η αύξηση της GSH, υποστηρίχθηκε από τη μείωση των επιπέδων των TBARS, δείκτη υπεροξειδωσίας των λιπιδίων και από την μείωση των επιπέδων των καρβονυλίων, έναν δείκτη οξείδωσης πρωτεϊνών πιθανότατα λόγω της άμεσης δράσης των εκχυλισμάτων έναντι των ελεύθερων ριζών. Η υπεροξειδωσία των λιπιδίων σύμφωνα με τους Sachdev και Davies, (2008) είναι το τελικό αποτέλεσμα της βλάβης των ριζικών αλυσιδωτών αντιδράσεων. Αυτό συνήθως ξεκινά με μια μόνη αφαίρεση υδρογόνου από ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ ακολουθώντας την αφαίρεση υδρογόνου που μπορεί να οδηγήσει σε εξουδετέρωση της αρχικής ρίζας (R). Η λιπιδική ρίζα (L) παράγεται από οξυγόνο για να παράγει μία ρίζα λιποειδούς υπεροξυλίου (LOO). Σύμφωνα με τους Reid et al., (1994) η αντίδραση μίας εξαιρετικά ασταθούς ρίζας με γειτονικά λιπαρά οξέα, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στην ακεραιότητα των κυτταρικών μεμβρανών, των μεμβρανών ενδοπλασμίνης και των μεμβρανών του πυρήνα που οδηγούν σε μια ευρεία σειρά πρωτογενών δευτερογενών προϊόντων οξείδωσης όπως: συζευγμένα διένια ή υδροϋπεροξειδία λιπιδίων, αλδεϋδες λιπιδίων, (MDA και αλκάνια). Το MDA χρησιμοποιείται συχνά ως δείκτης οξειδωτικού στρες ως απόκριση στην άσκηση (Urso and Clarkson, 2003). Αν και το εκχύλισμα του *Lycium barbarum* ενίσχυσε την αντιοξειδωτική ικανότητα των C2C12 κυττάρων, με την αύξηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών και την προστασία των λιπιδίων και των πρωτεϊνών, αυτά τα αποτελέσματα δεν ήταν πάντοτε εξαρτώμενα από τη δόση, ενώ η μείωση της υπεροξειδωσίας λιπιδίων από το εκχύλισμα των 25μg/mL ήταν μειωμένη στατιστικά σημαντικά, σε σχέση με την υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Αυτά τα αποτελέσματα ήταν σύμφωνα με αυτά άλλων μελετών. Για παράδειγμα, οι Gan et al., (2004) έδειξαν ότι δόση 10 mg/kg κινεζικών LBPs, ήταν αποτελεσματικότερη από 5 και 20 mg/kg δόσεις στη μείωση του βάρους του σαρκόματος και στη βελτίωση του ανοσοποιητικού συστήματος στους ποντικούς. Η

σημαντική αύξηση των επιπέδων GSH δεν ακολουθήθηκε με σημαντική μείωση επίσης των συνολικών επιπέδων ROS εντός των μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 43). Σε προηγούμενες μελέτες των Priftis et al., (2015) και Goutzourelas et al., (2014) αναφέρεται επίσης ότι τα επίπεδα ROS δεν συνοδεύονται πάντοτε από μεταβολές στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες ή των αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης έδειξαν για πρώτη φορά ότι η βελτιστοποίηση της εκχύλισης Ελληνικών goji berry (*L.barbarum*), υποβοηθούμενης από υπερήχους, παρουσίασαν ισχυρή δράση στην αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών και προστατεύουν το DNA έναντι βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ένα από αυτά τα εκχυλίσματα αύξησε τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό της GSH και μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων και την οξείδωση των πρωτεϊνών στα μυϊκά κύτταρα. Έτσι, αυτά τα ευρήματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα *L. barbarum*, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπλήρωμα διατροφής, για να μειώσουν τις δυσμενείς επιδράσεις στους μύες που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες, για παράδειγμα, μετά από εντατική άσκηση αθλητών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Εκτίμηση *in vitro* της αντιμικροβιακής δράσης των ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων goji berries (*Lycium barbarum*) σε μορφή σκόνης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5.1. Εκτίμηση *in vitro* της αντιμικροβιακής δράσης των ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων goji berries (*Lycium barbarum*) σε μορφή σκόνης.

Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στην διερεύνηση της επίδρασης του διαλύτη εκχύλισης υποβοηθούμενης με υπερήχους (*Ultrasound Assisted Extracts - UAE*), ξηρών goji berries. Οι ενθυλακωμένες λυοφιλοποιημένες σκόνες που παραλήφθηκαν από τις εκχυλίσεις αυτές αξιολογήθηκαν σε περιεκτικότητα βιοδραστικών συστατικών, της αντιοξειδωτικής τους ικανότητας και της αντιμικροβιακής τους δράσης *in vitro* με σκοπό την πιθανή χρήση τους σε τρόφιμα ως φυσικά αντιοξειδωτικά και αντιμικροβιακά.

Χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω μέθοδοι: η μέτρηση της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*Minimal Inhibitory Concentration - MIC*) / της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (*Minimal Bactericidal Concentration - MBC*), της μέτρησης θολερότητας (κυτταρική πυκνότητα) και ο έλεγχος διάχυσης (*well diffusion assay*), έτσι ώστε να προσδιοριστεί η αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι αρκετών ειδών βακτηρίων που περιέχουν τα τρόφιμα όπως:

(*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*),

ζυμομύκητες (*Yarrowia Lipolytica*, *Metschnikowia fructicola* και *Rhodotorula mucilaginosa*) και

μύκητες (*Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani*).

Επίσης, μετρήθηκε η περιεκτικότητα σε ολικούς υδατάνθρακες και πολυφαινόλες ενώ χρησιμοποιήθηκαν οι δοκιμασίες δέσμευσης ριζών DPPH[•] (2,2-διφαινυλ-1-πικρυλυδραζύλ) και ABTS^{•+} (2,2-αζινο-δις-3-αιθυλ-βενζθειαζολινοσουλφονικό οξύ) για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής δράσης καθώς επίσης αξιολογήθηκαν και τα φάσματα FT-IR όλων των δειγμάτων, για να προσδιοριστεί το χημικό τους προφίλ.

Τα φρούτα goji berry συλλέχθηκαν από μια πειραματική φυτεία 3 ετών της ποικιλίας *Lycium barbarum* που βρίσκεται στην περιοχή της Θεσσαλίας και ξηράθηκαν σε ξηραντήρα στους 45° C για 5 ημέρες. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους (0-4°C) για περαιτέρω ανάλυση.

5.2. Υλικά και Μέθοδοι.

5.2.1. Διαδικασία εκχύλισης.

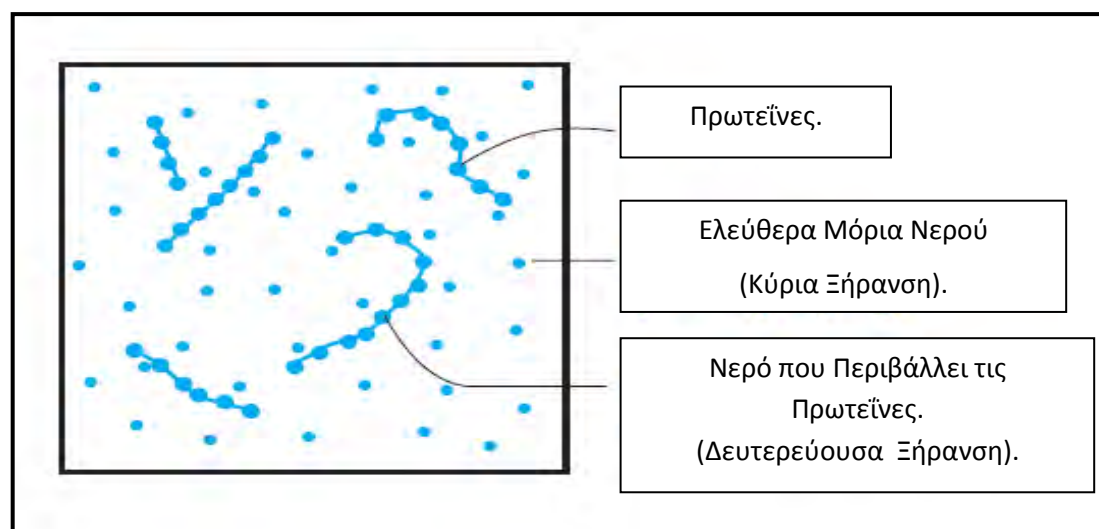
Η διαδικασία της εκχύλισης που ακολουθήθηκε περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2.2.1. Ο λόγος εκχύλισης του αποξηραμένων φρούτων goji berry προς το διαλύτη εκχύλισης ήταν 1/20, σε θερμοκρασία 55°C, και ισχύς εκχύλισης στα 220 W/cm² για 25 λεπτά. Κατόπιν, τα εκχυλίσματα διηθήθηκαν και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για λυοφιλοποίηση. Ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν εκτός από αποσταγμένο νερό, η αιθανόλη και το εξάνιο.

5.2.2. Ενθυλάκωση, λυοφιλοποίηση των εκχυλισμάτων goji berry.

Η τεχνολογία Freeze Drying, τεχνικά γνωστή ως λυοφιλοποίηση, είναι μια διαδικασία αφυδάτωσης που τυπικά χρησιμοποιείται για τη διατήρηση ενός υλικού ή για να κάνει το υλικό πιο βολικό για μεταφορά.

Η λυοφιλοποίηση λειτουργεί με κατάψυξη του υλικού και στη συνέχεια την μείωση της περιβάλλουσας πίεσης για να επιτρέψει το κατεψυγμένο νερό στο υλικό να υποβληθεί απευθείας από τη στερεά φάση στην αέρια φάση. Λόγω της πολύ χαμηλής θερμοκρασίας η μικροβιολογική δραστηριότητα μειώνεται και έτσι το τελικό προϊόν έχει καλύτερη ποιότητα λαμβάνεται (Sagar and Suresh Kumar, 2010).

Είναι γνωστό ότι κατά τη διαδικασία της ξήρανσης με τεχνολογία freeze – drying οι υδατάνθρακες και πρωτεΐνες (Εικόνα 49), μπορεί να υφίστανται μεταβολές στις φυσικές τους ιδιότητες, οι οποίες επηρεάζουν την σταθερότητα αποθήκευσης τους (Roos and Karel 1990).



Εικόνα 49: Αφαίρεση Νερού από το Freeze Dryer.

Ένα τέτοια παράδειγμα μεταβολής αποτελεί και η υαλώδη μετάπτωση όπου ένα πολυμερές σε θερμοκρασία κάτω από το σημείο τήξεως υφίσταται μια μεταβολή από πολύ παχύρρευστο και ελαστικό, σε υαλώδη μορφή η δε θερμοκρασία στην οποία συμβαίνει ονομάζεται θερμοκρασία μετάπτωσης ή μεταβατική θερμοκρασία (*glass transition temperature – T_g*) (Roos and Karel 1991).

Η υαλώδης μετάπτωση είναι μία αναστρέψιμη μετάβαση όπου τα άμορφα υλικά που έχουν μετατραπεί σε μία σκληρή και σχετικά εύθραυστη "υαλώδη" κατάσταση, μεταβαίνουν σε μία ιξώδη ή ελαστική κατάσταση καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται. Το νερό πλαστικοποιεί έντονα την άμορφη δομή και η θερμοκρασία μετάπτωσης (*T_g*) μειώνεται με την αύξηση της περιεκτικότητας σε υγρασία.

Η ενθυλάκωση με λυοφιλοποίηση είναι μια οικονομική μέθοδος και το πιο κοινό και κατάλληλο υλικό της ενθυλάκωσης είναι η μαλτοδεξτρίνη (Ravichandran *et al.*, 2014). Τα εκχυλίσματα goji berries σε υγρή μορφή μετά από διαδικασία υποβοηθούμενης από υπερήχους (UAE), αναμίχθηκαν (ενθυλακώθηκαν) πριν από την λυοφιλοποίηση με διαφορετικούς όγκους [14%, 7% & 2% (w/w) στερεών συστατικών υγρού εκχυλίσματος], με μαλτοδεξτρίνη DE 18 από την εταιρεία Amylon SA (*Batch no: 160120*), προκειμένου να αποφευχθεί το φαινόμενο της υαλώδους μετάπτωσης, των σκονών λυοφιλοποίησης. Στο δείγμα με την προσθήκη του χαμηλότερου ποσοστού μαλτοδεξτρίνης 2% (w/w) προστέθηκε επίσης 1% (w/w) διοξείδιο του πυριτίου (*SiO₂*) για να αυξηθεί η θερμοκρασία μετάπτωσης (*T_g*). Η εισαγωγή τέτοιων νανοσωματιδίων βελτιστοποιεί τις θερμικές ιδιότητες των πολυμερών. Έχει αποδειχθεί ότι τα πρόσθετα διοξειδίου του πυριτίου στη μήτρα εποξειδικής ρητίνης, αυξάνουν σημαντικά τη θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης (*T_g*) των σύνθετων υλικών (κατά 50-70°C) Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη μεταβολή της *T_g* κατά τη διάρκεια της τροποποίησης είναι η πολικότητα του πολυμερούς (Alekseeva *et al.*, 2015).

Δύο δείγματα (*No1* και *No3*) εκχυλίστηκαν με διαλύτη αποτελούμενο από μείγμα 70% (v/v) αιθανόλης και 30% (v/v) αποσταγμένου νερού, τρία δείγματα (*No2*, *No4*, *No6*) εκχυλίστηκαν με αποσταγμένο νερό και ένα δείγμα (*No5*) εκχυλίστηκε με ένα μείγμα 33% (v/v) εξανίου, 33% (v/v) αποσταγμένου ύδατος και 33% (v/v) αιθανόλης (Πίνακας 19). Αυτά τα εκχυλίσματα στη συνέχεια λυοφιλοποιήθηκαν για να παραχθεί η λυοφιλοποιημένη ενθυλακωμένη σκόνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας (Πίνακας 22).

Πίνακας 22: Διαλύτες εκχύλισης και ποσοστά μαλτοδεξτρίνης και διοξειδίου του πυριτίου που χρησιμοποιούνται για ενθυλάκωση.

Δείγματα	Συνθήκες εκχύλισης	Μαλτοδεξτρίνη ή/ και SiO₂ % (w/w στερεαίων υγρού εκχυλίσματος) που χρησιμοποιείται για ενθυλάκωση
No1	70% Αιθανόλης + 30% Αποσταγμένο νερό	7% Μαλτοδεξτρίνη
No2	Αποσταγμένο νερό	7% Μαλτοδεξτρίνη
No3	70% Αιθανόλης + 30% Αποσταγμένο νερό	14% Μαλτοδεξτρίνη
No4	Αποσταγμένο νερό	14% Μαλτοδεξτρίνη
No5	33% Εξάνιο + 33% Αποσταγμένο νερό + 33% Αιθανόλης	14% Μαλτοδεξτρίνη
No6	Αποσταγμένο νερό	2 % Μαλτοδεξτρίνη + 1% SiO ₂

Η διαδικασία λυοφιλοποίησης πραγματοποιήθηκε σε Freeze Dryer τύπου Zirbus GmbH Sublimator 4x5x6 (Εικόνα 50) και περιέχει 3 στάδια, όπως περιγράφεται παρακάτω σε μία διαδικασία κύκλου 24 ωρών.



Εικόνα 50: Freeze Dryer τύπου Zirbus GmbH Sublimator 4x5x6.

1^ο Στάδιο. Ψύξη του προϊόντος σε τελική θερμοκρασία -30°C . Διάρκεια περίπου 2 ώρες.

2^ο Στάδιο. Θέρμανση του προϊόντος σε θερμοκρασία 0°C και υπό κενό στα 0,15 mbar. Διάρκεια περίπου 12 ώρες.

3^ο Στάδιο. Θέρμανση του προϊόντος σε θερμοκρασία 40°C και κενό στα 0,15 mbar. Διάρκεια περίπου 10 ώρες.

5.2.3. Προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικές φαινόλες (TPC) των εκχυλισμάτων.

Η μέθοδος για τον προσδιορισμό των ολικών φαινολών περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.5.

5.2.4. Προσδιορισμός της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων.

5.2.4.α. Μέθοδος DPPH.

Η μέθοδος DPPH, για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, περιγράφεται στην παράγραφο 2.2.6.

5.2.4.β. Μέθοδος ABTS.

Η μέθοδος ABTS, για τον προσδιορισμό της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας των εκχυλισμάτων, περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.4.β.

5.2.5. Μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν, για τον προσδιορισμό της αντιμικροβιακής δράσης.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων, ελήφθησαν από την τράπεζα καλλιέργειας ATCC (*American Type Culture Collection*), συγκεκριμένα *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Clostridium perfringens* ATCC 13124 και *Campylobacter jejuni* ATCC 33291.

Οι ζυμομύκητες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν *Yarrowia Lipolytica* ATCC 9773, *Metschnikowia fructicola* CBS 8853 και *Rhodotorula mucilaginosa* DSM 70403.

Τέλος, οι μύκητες που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη όπως: *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* και *Rhizoctonia solani*, παρασχέθηκαν ευγενικά από την ελληνική συλλογή καλλιεργειών του Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου Μπενάκη.

Όλες οι καλλιέργειες βακτηρίων που χρησιμοποιούνται ως εμβόλια στις αναλύσεις της αντιμικροβιακής δράσης αναπτύχθηκαν για 48 ώρες σε ζωμό Tryptone Soy Broth (*Oxoid*, *U.K.*), με εξαίρεση το *Campylobacter jejuni* που αναπτύχθηκε σε ζωμό Bolton, ενώ όλες οι μυκητιακές καλλιέργειες αναπτύχθηκαν για 72 ώρες σε ζωμό δεξτρόζης πατάτας (*Oxoid*, *U.K.*).

5.2.6. Μέθοδος MIC / MBC.

Τα προαναφερθέντα παθογόνα βακτηρίδια ενοφθαλμίστηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με μέσο ανάπτυξης υγρού συμπληρωμένο με τα αντιμικροβιακά δείγματα προκειμένου να προσδιοριστεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (*Minimum Inhibitory Concentration - MIC*) κάθε δείγματος. Το MIC ορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της σκόνης του δείγματος που είχε ως αποτέλεσμα την απουσία ανάπτυξης του εμβολιασμένου μικροοργανισμού μετά από επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία (*Leontopoulos et al., 2015*). Ειδικότερα, παρασκευάστηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν 9 ml ζωμού Bolton για την επώαση του

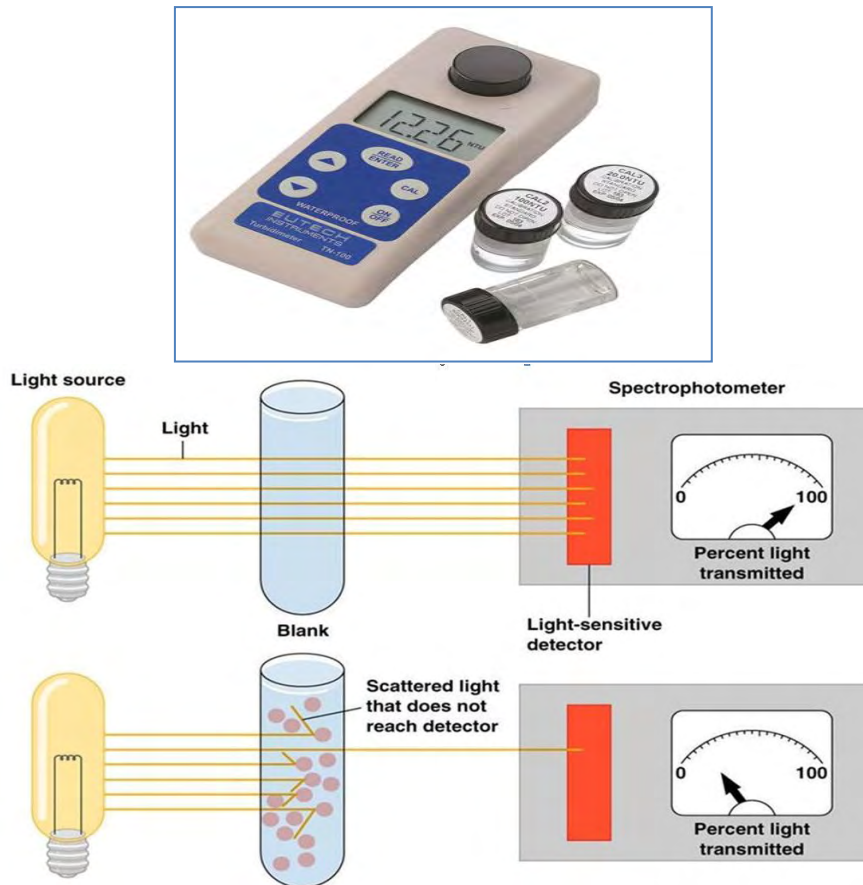
Campylobacter jejuni ή του ζωμού Trypone Soy Broth (TSB) για την επώαση όλων των άλλων βακτηριδίων. Ακολούθως προστέθηκαν 0% (έλεγχος), 1%, 5%, 10% και 20% των ανωτέρω δειγμάτων σκόνης (αριθ. 1-6) και αναμίχθηκαν σε κάθε μέσο ανάπτυξης. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες αποστειρώθηκαν και ακολούθως εμβολιάστηκαν με 0,1 ml καλλιέργεια 48 ωρών εκάστου των 6 παθογόνων βακτηριδίων και επώαστηκαν στους 37°C για άλλες 48 ώρες. Η μικροβιακή ανάπτυξη προσδιορίστηκε από την παρουσία κυτταρικού ιζήματος / βιοφίλμ στον πυθμένα / επιφάνεια του μέσου ανάπτυξης. Το MIC ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη.

Η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (*Minimum Bactericidal Concentration* - *MBC*) προσδιορίστηκε μετά τον ενοφθαλμισμό 1 ml από τους δοκιμαστικούς σωλήνες της δοκιμασίας MIC που δεν επέδειξε ανάπτυξη βακτηρίων, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιέχουν 9 ml από το ίδιο μέσο ανάπτυξης, αλλά χωρίς κανένα αντιμικροβιακό παράγοντα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν και πάλι στους 37°C για 48 ώρες και παρατηρήθηκε παρουσία μικροβιακής ανάπτυξης. Το *MBC* ήταν η χαμηλότερη συγκέντρωση όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη (Πίνακας 21).

5.2.7. Έλεγχος θολερότητας (*Turbidity assay*).

Οι ενοφθαλμισμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες που εμφάνισαν μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης MIC χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό θολότητας, ο οποίος διεξήχθη για να δείξει πυκνότητα κυττάρων, σύμφωνα με τους McCoy και Olson (1986). Θολερότητα είναι η ιδιότητα ενός υγρού, που προκαλείται από μεγάλο αριθμό μεμονωμένων σωματιδίων που είναι γενικά αόρατα με γυμνό μάτι, παρόμοια με τον καπνό στον αέρα.

Ένα χιλιοστόλιτρο εκάστου μέσου αναπτύξεως που επέδειξε μικροβιακή ανάπτυξη αραιώθηκε σε 9 ml αποσταγμένου ύδατος και στη συνέχεια εισήχθη στο θολόμετρο. Η θολότητα μετρήθηκε σε μονάδες νεφελομετρικής θολότητας (*Nephelometric Turbidity Units* - *NTU*), χρησιμοποιώντας ένα μετρητή Eutech TN 100 (*Eutech Instruments Pte. Ltd.*) με ανάλυση 0,01 NTU και δίοδος εκπομπής υπερύθρων σε μήκος κύματος 850 nm (Εικόνα 51).



Εικόνα 51: Μετρητής νεφελομετρικής θολερότητας Eutech TN 100.

5.2.8. Έλεγχος διάχυσης (*Well diffusion assay*).

Για τον προσδιορισμό των ζωνών αναστολής μετά από μικροβιακή ανάπτυξη σε τρυβλία Petri, χρησιμοποιήθηκε ο προσδιορισμός διάχυσης, σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από την NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards-Methods for determining bactericidal activity of antibacterial agents.1999*).

Τα τρία λυοφιλοποιημένα δείγματα εκχυλίσματος goji berry διαλύθηκαν σε αλατούχο διάλυμα ρυθμισμένο με φωσφορικά (PBS, pH 7.0-7.2) σε συγκεντρώσεις 1%, 5%, 10%, 20% και αποστειρωμένα. 100 μl υγρής καλλιέργειας που περιέχει ~10⁶ cfu/ml από τα παραπάνω παθογόνα βακτηρίδια που ενοφθαλμίστηκαν και διασκορπίστηκαν σε θρεπτικό άγαρ (CM0003, Oxoid U.K.), με την εξαίρεση του *C. jejuni*, που αναπτύχθηκε σε Campylobacter Selective Agar (CSA, Lab-M, UK). Παρομοίως, μια ίση ποσότητα μυκητιακών καλλιεργειών (*F. oxysporum*, *Y. Lipolytica*, και *Rhodotorula mucilaginosa*) απλώθηκε σε άγαρ πατάτας δεξτρόζης (PDA). Τέσσερα κυλινδρικά φρεάτια διαμέτρου 7 mm σχηματίστηκαν σε κάθε πλάκα

χρησιμοποιώντας μία αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur και σε κάθε φρεάτιο χύθηκαν 25 μl διαλύματος δείγματος. Οι πλάκες PDA επώαστηκαν στους 25°C για 3-5 ημέρες, ενώ οι πλάκες NA και CSA επώαστηκαν στους 37°C για 48 ώρες. Το *C. perfringens* επώαστηκε αναερόβια με τη χρήση φακέλων Anaerocult A (*Merck, USA*) και το *C. jejuni* επώαστηκε υπό μικροαερόφιλες συνθήκες χρησιμοποιώντας Anaerocult C φακελάκια (*Merck, USA*) σε Anaerobic Jars (*Merck USA*), ενώ όλοι οι άλλοι μικροοργανισμοί επώαστηκαν αερόβια. Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα αξιολογήθηκε με μέτρηση της διαμέτρου (mm) της ζώνης αναστολής (*Diameter of inhibition zone - DIZ*) των μικροοργανισμών που εξετάστηκαν μετά από επώαση (*Leontopoulos et al., 2015, Shan et al., 2007, Valgas et al., 2007*). Οι μετρήσεις των ζωνών αναστολής της δοκιμασίας διάχυσης διεξήχθησαν εις τριπλούν (για κάθε μικροοργανισμό και κάθε συγκέντρωση του δείγματος), από τις οποίες υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές (Πίνακας 21).

5.2.9. Φασματοσκοπία υπερέυθρου (*Fourier-transform infrared spectroscopy – FT-IR*).

Η τεχνική δειγματοληψίας FTIR, για να εκτιμηθεί το χημικό προφίλ των δειγμάτων περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.5.

5.2.10. Στατιστική ανάλυση.

Η τυπική απόκλιση υπολογίστηκε και οι μέσες τιμές μαζί με τις τυπικές αποκλίσεις (SD) τεκμηριώνονται στους αντίστοιχους πίνακες ή αριθμούς. Οι στατιστικές διαφορές μεταξύ των μέσων καθώς και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν στις χημικές αναλύσεις, διερευνήθηκαν με μονόδρομη ανάλυση ANOVA που ακολουθήθηκε από τη δοκιμή Tukey και η στατιστική σημαντικότητα καθορίστηκε στο επίπεδο $P < 0,05$. Το λογισμικό MiniTab®17.1.0 χρησιμοποιήθηκε ως εργαλείο για την εκτέλεση των παραπάνω αναφερόμενων δοκιμών.

5.3. Αποτελέσματα.

5.3.1. Ολικό φαινολικό, υδατανθρακικό περιεχόμενο και IC₅₀ των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} των ενθυλακωμένων goji berries.

Πίνακας 20: Ολικό φαινολικό, υδατανθρακικό περιεχόμενο και IC₅₀ των ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} *TPC: Total Polyphenols Content, **GAE: Ισοδύναμο σε γαλλικό οξύ ***DF: ξηρό φρούτο). Διαφορετικά γράμματα (^{b,c,d}) έδειξαν διαφορές στους μέσους όρους των αποτελεσμάτων μέσα σε κάθε στήλη. Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων που δεν μοιράζονται ένα γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε P < 0,05.

Samples	*TPC	IC ₅₀ of DPPH [•] radical	IC ₅₀ of ABTS ^{•+} radical
	(mg **GAE / g ***DF extract)	scavenging (μg/ml)	scavenging (μg/ml)
No 1	18.99 ^c ±1.21	970 ^d ± 19	176 ^{c,d} ± 2.51
No 2	20.94 ^{b,c} ±1.62	860 ^c ± 21	171 ^c ± 4.61
No 3	16.21 ^{c,d} ±1.14	1,260 ^e ± 43	196 ^e ± 3.12
No 4	18.66 ^c ±1.72	1,050 ^d ± 38	180 ^d ± 5.22
No 5	11.60 ^d ±1.84	1,550 ^f ± 52	349 ^f ± 3.57
No 6	25.31 ^b ±1.75	755 ^b ± 47	161 ^b ± 6.15

5.3.2. Αποτελέσματα MIC/MBC.

Τα αποτελέσματα της χαμηλότερης συγκέντρωσης των δειγμάτων των goji berries (αντιβακτηριδιακός παράγοντας), που είχε ως αποτέλεσμα την απουσία ανάπτυξης του εμβολιασμένου μικροοργανισμού, μετά από επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία (MIC) και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) που είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που απαιτείται για να εξαλειφθεί ένα συγκεκριμένο βακτήριο, παρουσιάζονται στον πίνακα 23.

Πίνακας 23: Αποτελέσματα της ανάλυσης MIC / MBC των δειγμάτων εκχυλίσματος goji berry, έναντι παθογόνων βακτηρίων. Οι τιμές υπολογίζονται ως μέσος όρος, τριπλών μετρήσεων.

Tested Microorganism	Sample concentration (w/v)	Sample No1		Sample No2		Sample No3		Sample No4		Sample No5		Sample No6	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. coli</i>	1%											1%	
	5%			5%				5%		5%			
	10%	10%	10%		10%								10%
	20%					20%	20%		20%		20%		
<i>S. aureus</i>	1%											1%	
	5%	5%		5%		5%		5%		5%			
	10%		10%		10%								10%
	20%						20%		20%		20%		
<i>S. typhimurium</i>	1%												
	5%	5%	5%	5%						5%		5%	
	10%				10%	10%		10%					10%
	20%						20%		20%		20%		
<i>L. monocytogenes</i>	1%											1%	
	5%	5%		5%	5%	5%		5%		5%			5%
	10%		10%										
	20%						20%		20%		20%		
<i>C. perfringens</i>	1%											1%	
	5%			5%		5%		5%		5%			5%
	10%	10%	10%		10%								
	20%						20%		20%		20%		
<i>C. jejuni</i>	1%	5%	5%	5%	5%			1%					
	5%								5%	5%		5%	
	10%					10%					10%		10%
	20%						20%						

5.3.3. Αποτελέσματα ελέγχου διάχυσης.

Τα τρία λυοφιλοποιημένα δείγματα εκχυλίσματος goji berry, αφού υποβλήθηκαν στον έλεγχο της διάχυσης (*well diffusion assay*), αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δραστηριότητα με μέτρηση της διαμέτρου (*mm*) της ζώνης αναστολής (*DIZ*) των εξετασθέντων μικροοργανισμών (Πίνακας 24). Το δείγμα Νο6 του *L. barbarum* ήταν το μοναδικό εκχύλισμα goji berry που παρουσίασε αντιμικροβιακή δράση έναντι του *F. oxysporum*. Έδειξε επίσης την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε συγκέντρωση 5% έναντι του *S. aureus* (*DIZ*: 7,71 *mm*) και του *L. monocytogenes* (*DIZ*: 6,15 *mm*) (Πίνακας 12). Περαιτέρω, το εκχύλισμα Νο6 του *L. barbarum* σε συγκέντρωση 10% ανέστειλε τα *E.coli* και *S. typhimurium* με ζώνη αναστολής 11,15*mm* και 1,5*mm* αντίστοιχα.

Πίνακας 24: Ζώνες αναστολής (mm) των μικροοργανισμών, με βάση τον έλεγχο διάχυσης, χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις (1%, 5%, 10% και 20%) εκχυλισμάτων goji berries (δείγματα Νο1-6). Η απουσία ζώνης αναστολής υποδεικνύεται με (-). Οι μέσες τιμές υπολογίστηκαν από τριπλές μετρήσεις.

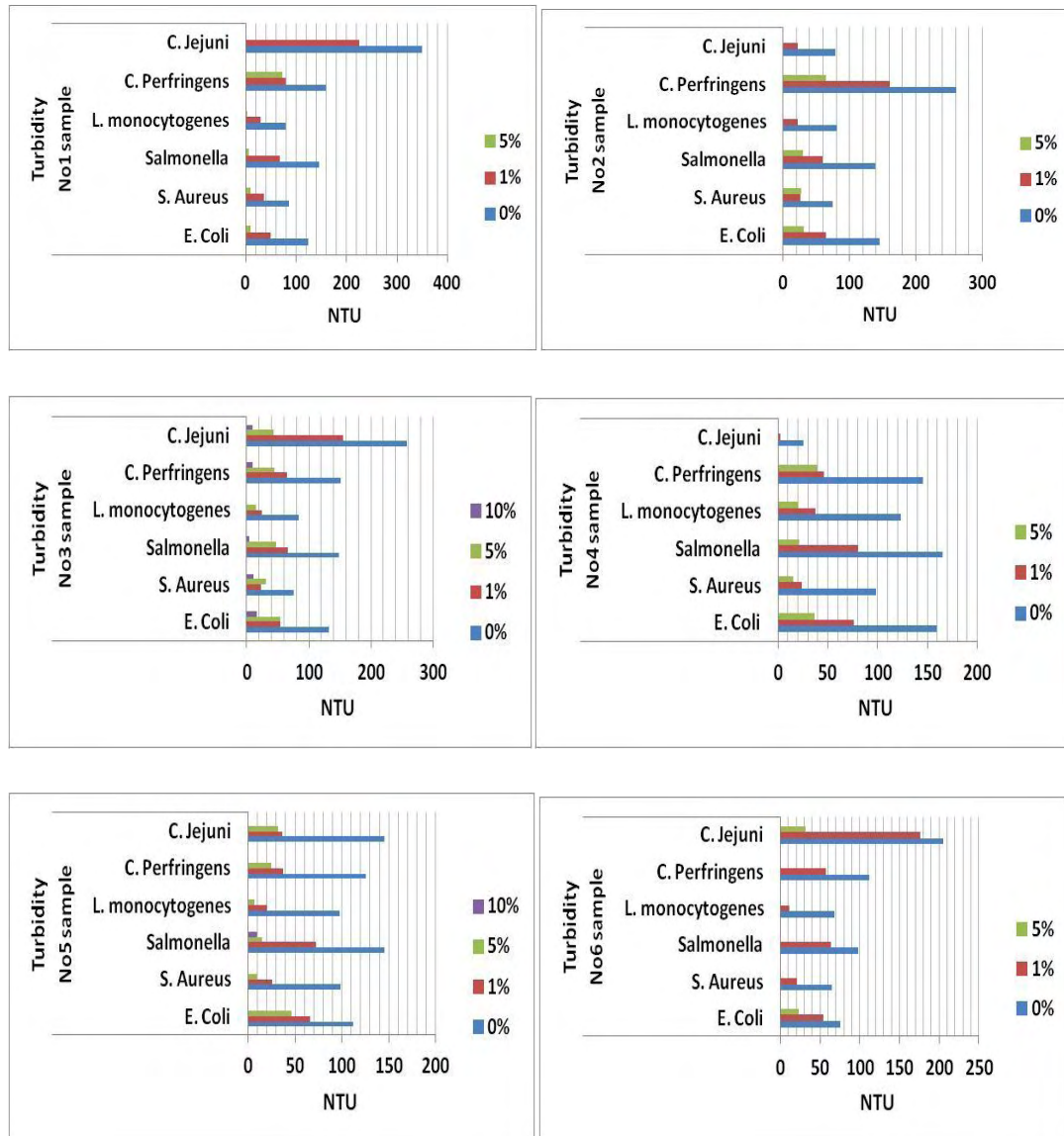
		Zone of Inhibition per Sample (in mm)					
Tested Microorganism	Sample's concentration	No1	No2	No3	No4	No5	No6
<i>E. coli</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	11.16	6.50	7.20	8.40	13.40	11.15
	20%	11.59	19.4	17.20	16.9	19.30	17.60
<i>S. aureus</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	7.71
	10%	1.63	7.82	3.61	-	-	11.50
	20%	5.86	14.06	9.84	12.83	15.51	11.54
<i>S. typhimurium</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	3.10	8.88	9.70	-	-
	20%	2.69	9.01	16.14	18.5	11.42	13.51
<i>L. monocytogenes</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	6.15
	10%	14.80	13.60	-	9.75	8.50	10.15
	20%	18.38	18.00	13.95	14.73	16.89	16.14
<i>C. perfringens</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	1.50
	20%	-	1.17	0.50	-	-	3.97
<i>C. jejuni</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-
	20%	2.37	-	-	-	-	1.01
<i>R. mucilaginosa</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-
	20%	-	-	-	-	-	-
<i>Y. lipolytica</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-
	20%	-	-	-	-	-	-
<i>F. oxysporum</i>	1%	-	-	-	-	-	-
	5%	-	-	-	-	-	-
	10%	-	-	-	-	-	-
	20%	-	-	-	-	-	4.00

Η λιγότερο αποτελεσματική αντιβακτηριδιακή δράση των εκχυλίσματος Νο6 του *L. barbarum* επιδείχθηκε έναντι του *C. Jejuni*, που δεν υπήρχε αναστολή ανάπτυξης του βακτηρίου, αλλά ήταν αποτελεσματικό έναντι του *F. oxysporium* (DIZ 4 mm) μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση 20% w/v. Στην Εικόνα 48, παρατηρούμε οπτικά τις ζώνες αναστολής των μικροοργανισμών, λόγω της σκόνης του εκχυλίσματος των goji berries, μετά από ενθυλάκωση και λυοφιλοποίηση (δείγμα Νο6).

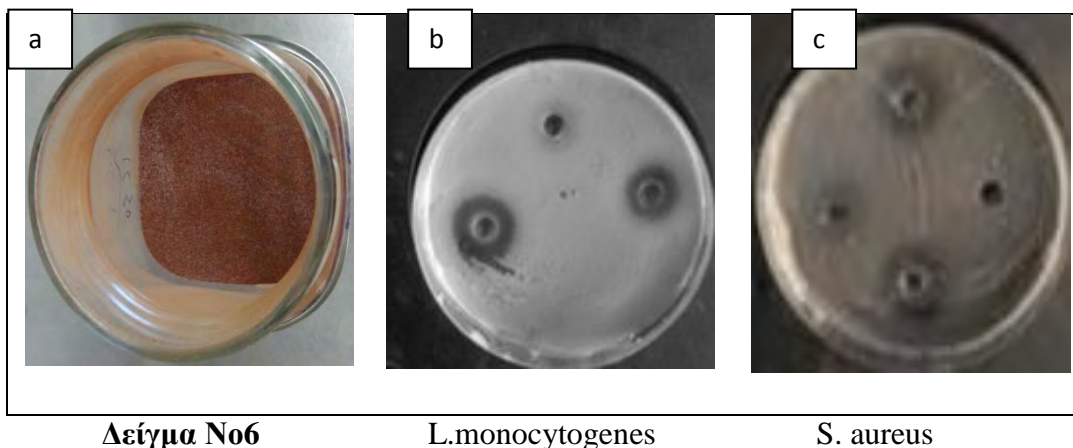
5.3.4. Αποτελέσματα ελέγχου θολερότητας.

Οι ενοφθαλμισμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες που εμφάνισαν μικροβιακή ανάπτυξη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης MIC χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό θολερότητας, ο οποίος διεξήχθη για να δείξει την πυκνότητα των κυττάρων και κατ'επέκταση τον πληθυσμό των μικροοργανισμών.

Από τα διαγράμματα της εικόνας 52 μπορούμε να δούμε ότι η ανάπτυξη των ελεγχόμενων μικροοργανισμών μειώνεται σε σχέση με τα control στα οποία δεν έχει προστεθεί λυοφιλοποιημένο εκχύλισμα goji berry. Ειδικότερα με τη χρήση του δείγματος Νο6 σε ποσοστό 5% μόνο στους μικροοργανισμούς *C. Jejuni* και *E. Coli* παρατηρήθηκε αύξηση της θολερότητας ενώ στους άλλους ελεγχόμενους μικροοργανισμούς δεν υπήρξε αύξηση που σημαίνει ότι ανέστειλε την ανάπτυξή τους αποτέλεσμα που επιβεβαιώνει και το αποτέλεσμα του ελέγχου διάχυσης.



Εικόνα 52: Νεφελομετρική θολερότητα (δηλ. κυτταρική πυκνότητα), του μέσου ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων που μετρήθηκε με μονάδες (NTU), ως αποτέλεσμα της προσθήκης έξι διαφορετικών δειγμάτων goji berry σε συγκεντρώσεις 0% (έλεγχος), 1%, 5% και 10%. Υψηλή μονάδα νεφελομετρικής θολερότητας (NTU) σημαίνει υψηλή μικροβιακή ανάπτυξη.



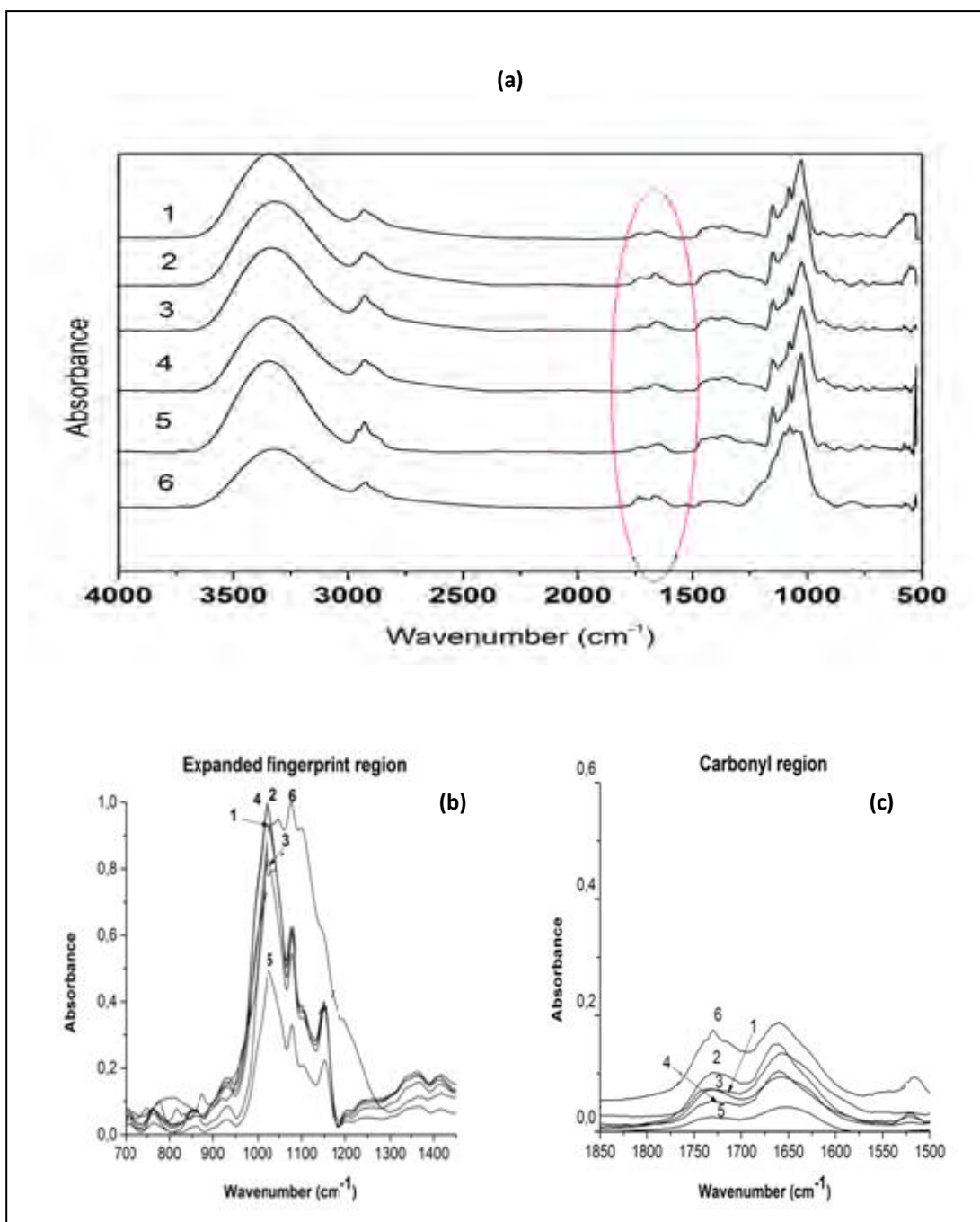
Εικόνα 53: (a) Δείγμα Νο6 της σκόνης εκχυλίσματος των goji berries, μετά από ενθυλάκωση και λυοφιλοποίηση. (b&c) Ζώνες αναστολής των μικροοργανισμών. *L.monocytogenes* και *S. aureus*

5.3.5. Αποτελέσματα φασματοσκοπίας υπερύθρου (FT-IR).

Η σημασία της φασματοσκοπίας IR για την ποιοτική ανάλυση προκύπτει από τις ιδιότητές της, ιδιαίτερα ως τεχνική δακτυλικών αποτυπωμάτων, που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν δύο βιοδραστικές ενώσεις που έχουν τα ίδια φάσματα FTIR. Η ανάλυση κορυφών φάσματος, των λειτουργικών ομάδων του δείγματος Νο6, παρουσιάζεται στον πίνακα 25.

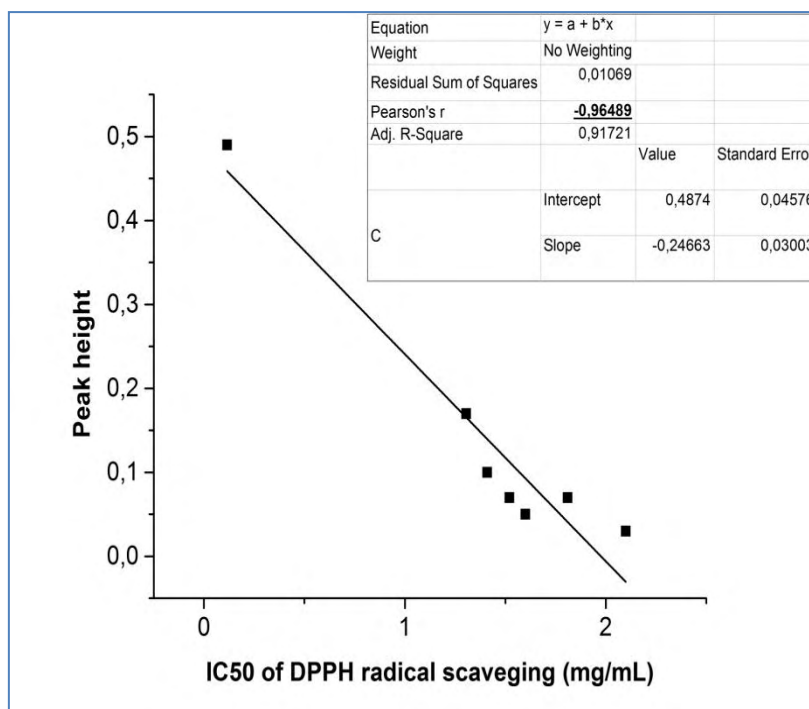
Πίνακας 25: FT-IR ανάλυση κορυφών φάσματος, των λειτουργικών ομάδων του δείγματος Νο6.

SampleNo6 Absorption (cm ⁻¹)	Peak intensity	Functional group	Structural characteristic
3335,69	0,73	hydroxyl group (-OH)	stretching vibration of O-H
		amino group (-NH ₂)	stretching vibration of N-H
2925,05	0,34	alkyl group (-CH ₂ -)	stretching vibration of C-H
2851,77	0,24	alkyl group (-CH ₂ or -CH ₃)	stretching vibration) of CH ₂ and CH ₃
1729,86	0,17	carboxyl group (-COOH), aldehyde group (-CHO) or esterfunction (-COOR)	stretching vibration of C=O
1660,44	0,19	carbonyl group (-C=O or -CHO) amide group (-NH ₂ or -COR) amino group (-NH ₂)	stretching vibration of C=O bending vibration of N-H or stretching vibration of C=O bending vibration of N-H bound water
1521,10	0,07	amino group (-NH ₂) or amide group(NH ₂) carbonyl group (-C=O)	bending vibration of N-H stretching vibration of C=O
1417,45	0,13	carboxyl group (-COOH)	stretching vibration of C-O
1368,27	0,11	carboxyl group (-COOH)	symmetrical stretching vibration of C=O
1097,80	0,92	Silicon bond (-Si-O-CH ₃)	stretching vibration of Si-O-
1077,07	1	hydroxyl group (-OH)	bending vibration of O-H
1047,66	0,95		
807,04	0,11	α-D-galactopyranose D-glucopyranose ring	symmetrical ring vibration



Εικόνα 54: (a). Φάσματα απορρόφησης FT-IR όλων των δειγμάτων. (b) Περιοχή δακτυλικών αποτυπωμάτων. (c) Περιοχή καρβονυλίων.

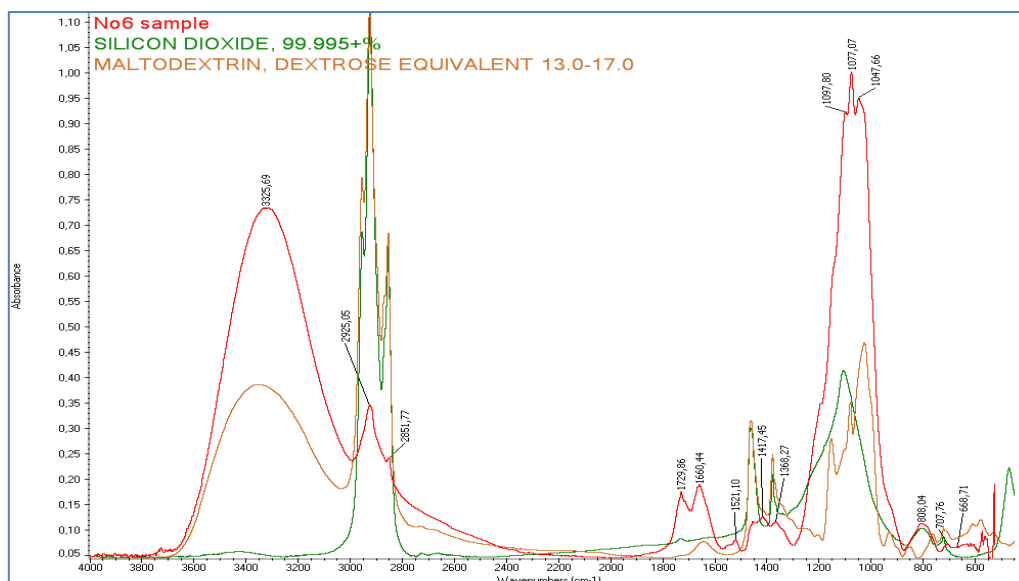
Η έρευνα επικεντρώθηκε στις διαφορές στην περιοχή δακτυλικών αποτυπωμάτων Εικόνα 54 (b) και ειδικότερα στην περιοχή καρβονυλίου Εικόνα 54 (c), που βρέθηκε ότι η ένταση αυτών των κορυφών της περιοχής συσχετίζεται ($Pearson R^2 = 96.4$) με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων (Εικόνα 50).



Εικόνα 55: Συσχέτιση ύψους κορυφής μήκους κύματος 1720-1732 cm^{-1} , με το IC_{50} της ρίζας DPPH.

Η ένταση της κορυφής στα 1732 cm , που χαρακτηρίζει την ομάδα των καρβοξυλίων εμφανίζει μία ισχυρή θετική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση και αυτό συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία όπου τα οργανικά οξέα (κιτρικό, Μαλικό, Οξαλικό και κουνικό) και τα πολυφαινολικά σιναμινικά οξέα (Caffeic acid, Chlorogenic acid, Coumaric acid and Ferulic acid) αποτελούν τα πιο σημαντικά βιοδραστικά συστατικά των καρπών σε σχέση με την αντιοξειδωτική δράση. (Donno et al., 2015; Liang et al.; 2011, Shan et al., 2011; Xiao et al. 2012; Zhou et al., 2016).

Το δείγμα No 6 σε αυτή την περιοχή έχει 3 κορυφές στα 1729,86 cm^{-1} , 1660,44 cm^{-1} και 1521,10 cm^{-1} με εντάσεις μικρότερες από 0,17, 0,19 και 0,07 αντίστοιχα όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 56, μαζί με τα φάσματα του διοξειδίου του πυριτίου 99% και της μαλτοδεξτρίνης DE 18.



Εικόνα 56: Φάσματα του δείγματος Νο6, του διοξειδίου του πυριτίου και της μαλτοδεξτρίνης DE 18.

5.4. Συζήτηση.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, όσον αφορά το ολικό φαινολικό περιεχόμενο το δείγμα Νο6 παρουσιάζει την μεγαλύτερη τιμή, με $25,31 \pm 1,7$ mg/g εκχύλισμα ξηρού φρούτου ισοδύναμου γαλλικού οξέος. Τα χαμηλότερα ποσοστά μαλτοδεξτρίνης στις διαδικασίες ενθυλάκωσης οδηγούν σε υψηλότερα ποσοστά ξηρού εκχυλίσματος goji berries και υψηλότερων ολικών φαινολών στα δείγματα. Οι τιμές TPC είναι παρόμοιες με αυτές που αναφέρονται στην μελέτη των Benchennouf et al., (2017) αν και επιτεύχθηκαν με διαφορετικό διαλύτη και είδος εκχύλισης..

Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής ικανότητας της σκόνης που προήλθε από την λιοφυλίωση - ενθυλάκωση των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι in-vitro (*DPPH* και *ABTS*). Με αυτές τις μεθόδους υπολογίστηκε η συνολική αντιοξειδωτική δράση, λόγω της προφανούς δυσκολίας της απομόνωσης και της μέτρησης των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων, κάθε συστατικού του εκχυλίσματος ξεχωριστά. Ωστόσο, αυτά τα συστατικά μπορεί να αλληλεπιδράσουν ή να εξουδετερωθούν μέσα σε ένα εκχύλισμα και μπορεί να έχουν διάφορους βαθμούς αντιοξειδωτικού δυναμικού, σύμφωνα με τη σύνθεση και τη χημική δομή. Αυτό μπορεί να εξηγή τα διαφορετικά αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μεθόδους. Επίσης, οι δύο ρίζες έχουν διαφορετική χημική δομή και μπορούν να αλληλεπιδράσουν με διαφορετικούς τύπους βιοδραστικών συστατικών των

εκχυλισμάτων. Η ασθενής συσχέτιση ($Spearman R^2 = 75.4$ & $P-value=0.084>0.05$) μεταξύ των δύο μεθόδων, έδειξε ότι όχι μόνο η ποσότητα αλλά η ποιότητα και η σύνθεση αντιοξειδωτικών ενώσεων που υπάρχουν στα εκχυλίσματα μπορεί να καθορίσουν τη συνολική αντιοξειδωτική ικανότητα. Έτσι, θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν δύο ή περισσότερες διαφορετικές μέθοδοι μέτρησης της αντιοξειδωτικής δράσης, προτού καταλήξουμε σε ασφαλή συμπεράσματα.

Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκαν 6 δείγματα goji berry με συγκεντρώσεις από 155 έως και 5000 $\mu\text{g/mL}$. Τα δείγματα *L. barbarum* με διαλύτη νερό φαίνεται να έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνα με μείγμα αιθανόλης και νερού. Αυτή η διαφορά μπορεί να έγκειται στις παραμέτρους εκχύλισης που λήφθηκαν μετά από αριστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης με υπερήχου που βασίστηκε σε υδατικό διαλύτη. Το δείγμα Νο5 εμφάνισε τη χαμηλότερη δράση στη δέσμευση των ριζών ($DPPH IC_{50} = 1,550 \pm 52 \mu\text{g/mL}$ – $ABTS IC_{50} = 349 \pm 3.57 \mu\text{g/mL}$), ενώ το δείγμα 6 ήταν το εκχύλισμα με την υψηλότερη δράση ($DPPH IC_{50} = 755 \pm 47 \mu\text{g/mL}$ $ABTS IC_{50} = 161 \pm 6.15 \mu\text{g/mL}$) (Πίνακας 20). Πρέπει να αναφερθεί ότι η TPC έδειξε ισχυρή αρνητική συσχέτιση με την IC_{50} της δέσμευσης της ρίζας DPPH ($R^2 = -0,9325$ $TPC / DPPH IC_{50}$), γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα της μελέτης των Donno et al., (2015) και σημαίνει πως η αύξηση του TPC στα δείγματα των εκχυλισμάτων θα έδινε αύξηση στην αντιοξειδωτική δράση με τη μέθοδο DPPH. Οι Mocan et al., (2014), μελέτησαν την αντιοξειδωτική δράση των ολικών φαινολών των ειδών *Lycium* και τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν μία καλή συσχέτιση μεταξύ των μεθόδων όπως επίσης με το ολικό φαινολικό περιεχόμενο σε σχέση με την αντιοξειδωτική δράση των *L. chinense* και *L. barbarum*.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα της χαμηλότερης συγκέντρωσης των λυοφιλοποιημένων δειγμάτων των goji berries (αντιβακτηριδιακός παράγοντας), που είχε ως αποτέλεσμα την απουσία ανάπτυξης του εμβολιασμένου μικροοργανισμού, μετά από επώαση σε κατάλληλη θερμοκρασία (MIC) και η ελάχιστη βακτηριοκτόνος συγκέντρωση (MBC) που είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που απαιτείται για να εξαιρεθεί ένα συγκεκριμένο βακτήριο, παρουσιάζονται στον Πίνακα 21.

Παρατηρείται ότι απαιτείται συγκέντρωση τουλάχιστον 5% για την πλήρη αναστολή κάποιων μικροοργανισμών σε σχέση με τα δείγματα Νο1 έως Νο6, ενώ για άλλους μικροοργανισμούς απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση. Για παράδειγμα, στο δείγμα Νο1 η MIC για τους μικροοργανισμούς (*S. Aureus*, *S. Typhimurium*, *L. Monocytogenes* και *C. Jejuni*), εμφανίζεται στο 5%, ενώ για τους *E.coli* και *C.*

Perfringens, απαιτείται συγκέντρωση 10%. Εξαιρέση εμφανίζει το δείγμα Νο6 (με διαλύτη εκχύλισης το νερό και 2% μαλτοδεξτρίνη + 1% SiO₂ ως υλικά ενθυλάκωσης), που παρουσιάζεται στον Πίνακα 19 και το οποίο εμφανίζει δραστικότητα αναστολής έναντι βακτηρίων σε συγκέντρωση 1% (*E.Coli*, *S. Aureus*, *L. Monocytogenes* και *C. Perfringens*), ενώ τα βακτήρια (*C. jejuni* και *S. Typhimurium*) ήταν τα πιο ανθεκτικά παθογόνα στο δείγμα Νο6 και απαιτήσαν συγκέντρωση MIC 5%.

Επιπρόσθετα, τα έξι λυοφιλοποιημένα δείγματα εκχυλίσματος goji berry, αφού υποβλήθηκαν στον έλεγχο της διάχυσης (*well diffusion assay*), αξιολογήθηκε η αντιμικροβιακή δραστικότητα με μέτρηση της διαμέτρου (mm) της ζώνης αναστολής (DIZ) των εξετασμένων μικροοργανισμών (Πίνακας 22). Το δείγμα Νο6 ήταν το μοναδικό εκχύλισμα goji berry που παρουσίασε αντιμυκητιασική δράση έναντι του *F. oxysporum*. Έδειξε επίσης την καλύτερη αντιμικροβιακή δράση σε συγκέντρωση 5% έναντι του *S. aureus* (DIZ: 7,71 mm) και του *L. monocytogenes* (DIZ: 6,15 mm) (Πίνακας 22). Περαιτέρω, το εκχύλισμα Νο6 του *L. barbarum* σε συγκέντρωση 10% ανέστειλε τα *E.coli* και *S. typhimurium* με ζώνη αναστολής 11,15mm και 1,5mm αντίστοιχα. Σε προηγούμενη μελέτη των Fit et al.,(2013) τα ληφθέντα υδατικά εκχυλίσματα goji berry παρουσίασαν ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι του στελέχους *E.coli*. Η λιγότερο αποτελεσματική αντιβακτηριακή δράση των εκχυλίσματος Νο6 *barbarum* επιδείχθηκε έναντι του *C. Jejuni*, που δεν υπήρχε αναστολή ανάπτυξης του ζυμομύκητα, αλλά ήταν αποτελεσματικό έναντι του *F. oxysporium* (DIZ 4 mm), μόνο στην υψηλότερη συγκέντρωση 20% w/v.

Από τα παραπάνω καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως το δείγμα Νο6 παρουσιάζει την μεγαλύτερη αντιμικροβιακή δράση, έναντι των υπολοίπων δειγμάτων. Επίσης αυτό επιβεβαιώνεται και από την μέτρηση της νεφελομετρικής θολερότητας, όπου σε συγκεντρώσεις 1%, 5% και 10%, με έξι διαφορετικούς μικροοργανισμούς, το δείγμα Νο6 εμφανίζει τις μικρότερες μονάδες νεφελομετρικής θολερότητας (που σημαίνει μεγαλύτερη αναστολή ανάπτυξης μικροοργανισμών), σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Τα αποτελέσματα επίσης είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Salvat et al., (2014) που παρουσιάζουν ότι τα εκχυλίσματα *L. chinense* και *L. barbarum* που παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση, παρουσιάζουν επίσης και καλή αντιμικροβιακή δράση, κατά των περισσότερων από τους μικροοργανισμούς που εξετάστηκαν. Επιπρόσθετα, σε ακόμη μια μελέτη (Dahech et al., 2013), που αφορούσε το γένος *Lycium shawii*, τα εκχυλίσματά του έδειξαν υψηλή αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση.

Έτσι σαν αποτέλεσμα της έρευνας αυτής σχετικά με τα ενθυλακωμένα υδατικά εκχυλίσματα από καρπούς goji berry που μελετήθηκαν, αποδεικνύεται ότι μπορεί πράγματι να είναι πιθανές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Εκτίμηση *in vitro* της επίδρασης έναντι
προβιοτικών βακτηρίων των εκχυλισμάτων goji
berries
(*Lycium barbarum*).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Εκτίμηση *in vitro* της επίδρασης έναντι προβιοτικών βακτηρίων των εκχυλισμάτων goji berries (*Lycium barbarum*).

Η παρούσα εργασία αποσκοπούσε στην *in vitro* εκτίμηση της πρεβιοτικής επίδρασης λυοφιλοποιημένης ενθυλακωμένης σκόνης που λήφθηκε από αποξηραμένους καρπούς goji berry με υποβοηθούμενη με υπερήχους εκχύλιση (*Ultrasound Assisted Extracts - UAE*). Από τα δείγματα που ερευνήθηκαν για αντιμικροβιακή δράση επιλέχθηκαν μόνο τα δείγματα που η εκχυλίστηκαν με υδατικό διαλύτη (No2, No4, και No6).

Στόχος του πειράματος ήταν η μελέτη της πρεβιοτικής δράσης εκχυλισμάτων με τη μορφή σκόνης goji berry έναντι των προβιοτικών βακτηρίων *Lactobacillus* και *Bifidobacterium*. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με ανάπτυξη τους σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα και αφετέρου με έλεγχο της επιβίωσή τους σε προσομοιωμένες συνθήκες εντέρου και στομάχου (σε συνθετικό διάλυμα προσομοίωσης εντερικών και γαστρικών υγρών). Σκοπός της έρευνας ήταν η διερεύνηση τυχόν πρεβιοτικών ιδιοτήτων των εκχυλισμάτων για χρήση σε συμβιοτικά τρόφιμα.

6.2. Υλικά και Μέθοδοι πρεβιοτικής επίδρασης εκχυλισμάτων έναντι προβιοτικών γαλακτοβάκκινων.

6.2.1. Επιλογή δειγμάτων

Επιλέχθηκαν για διερεύνηση από τα εκχυλίσματα που ελέγχθηκαν για την αντιμικροβιακή τους δράση μόνο τα δείγματα No2, No4, και No6, των οποίων οι συνθήκες παρασκευής περιγράφονται στα κεφάλαια 5.2.1 & 5.2.2.

Η επιλογή τους έγινε με βάση το χρησιμοποιούμενο διαλύτη που ήταν το νερό σε συνδυασμό με υψηλά ποσοστά βιοδραστικών συστατικών (ολικών σακχάρων και φαινολών) και τη χρήση μικρού ποσοστού ενθυλακωτικού μέσου (μαλτοδεξτρίνης).

6.2.2. Προβιοτικά στελέχη

Τα στελέχη που εξετάστηκαν ανήκαν στα γένη των *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* και προμηθεύτηκαν ως λυοφιλοποιημένα εμπορικά προϊόντα προβιοτικών καλλιεργειών. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν ο *Lb. acidophilus* (ATCC: SD5221

Danisko Dupont), ο *Lb. casei* (*nutrish®L.casei 431® Christian Hansen Laboratory, Horsholm, Denmark*), ο *Lb. rhamnosus* (*FreshQ® 2 Christian Hansen Laboratory*), ο *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (*nutrish® BB-12® Christian Hansen Laboratory, Horsholm, Denmark*) και ο *Bifidobacterium longum Bb46* (*DVS, Christian Hansen Laboratory, Horsholm, Denmark*).

6.2.2.1. Απομόνωση καθαρών καλλιέργειών των στελεχών

Lb. acidophilus, Lb. casei & Lb. rhamnosus : Για την απομόνωση των συγκεκριμένων γαλακτικών βακτηρίων έγινε καλλιέργεια των λυοφυλιοποιημένων καλλιέργειών σε *Lactobacilli* MRS Broth (7406A, Acumedia) σε γυάλινα δοχεία 100 ml με βιδωτό καπάκι και επώστηκαν στους 37°C για 18h.

Bifidobacteria B. lactis & B. longum: έγινε απομόνωση των συγκεκριμένων *Bifidobacterium* από λυοφυλιοποιημένες καλλιέργειες σε γυάλινα δοχεία 100 ml με βιδωτό καπάκι που περιείχαν TPY Broth (*Condi S.A. Spain*) και προσθέσαμε 10 ml αποστειρωμένη παραφίνης για να δημιουργήσουμε αναερόβιες συνθήκες και επώστηκαν στους 37°C για 18h.

6.2.3. Καλλιέργεια σε θρεπτικό συνθετικό υπόστρωμα

Για τη συνέχεια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν νέα μπουκάλια των 100ml με υπόστρωμα *Lactobacilli* MRS Broth (7406A Academia) όπου σε κάθε μπουκάλι προστέθηκε 0,1% από το εξεταζόμενο δείγμα (εκχύλισμα) και χρησιμοποιήθηκε ένα ως control στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μόνο το θρεπτικό υπόστρωμα με τον μικροοργανισμό (χωρίς εκχύλισμα). Στη συνέχεια ακολούθησε αποστείρωση των παραπάνω μπουκαλιών σε θερμοκρασία 121°C για 15 λεπτά και έπειτα έγινε εμβολιασμός σε θερμοκρασία περιβάλλοντος με 1% πρόσφατης καθαρής καλλιέργειας 48 ωρών από κάθε μικροοργανισμό. Ακολούθησε επώαση στους 37°C. Για τα *Bifidobacterium* προστέθηκε στα γυάλινα μπουκάλια αποστειρωμένη παραφίνη για την επίτευξη αναερόβιων συνθηκών ανάπτυξης. Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για μέτρηση του pH και της καταμέτρησης του πληθυσμού σε 8h, 25h, 34h ώρες.



Εικόνα 57: Καλλιέργεια γαλακτικών βακτηρίων μετά από μια μέρα επώαση παρουσία του δείγματος 6. Το ίζημα υποδεικνύει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Οι παράμετροι που μετρήθηκαν κατά την καλλιέργεια σε MRS Broth είναι οι παρακάτω:

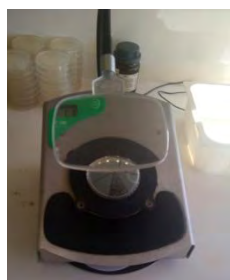
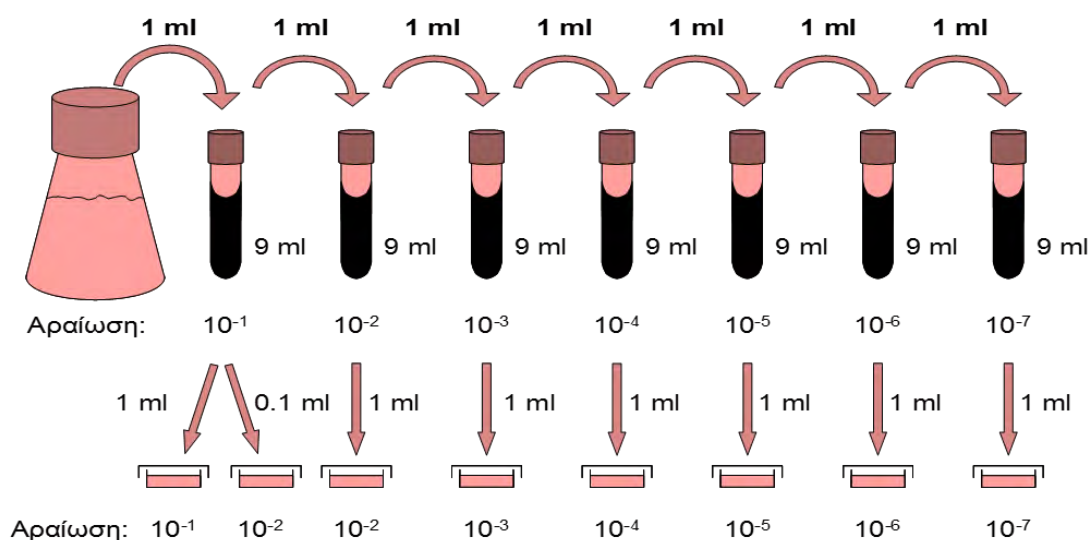
- Μέτρηση pH.
- Καταμέτρηση πληθυσμού σε log cfu/ml.

6.2.4. Μέτρηση pH

Για την συγκεκριμένη παράμετρο με την χρήση επιτραπέζιου πεχάμετρου HANNA pH 210 έγινε η ακριβής μέτρηση του pH σε όλα τα δείγματα.

6.2.5. Καταμέτρηση πληθυσμού σε log cfu/ml

Με ασηπτικές συνθήκες και μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής πήραμε δείγμα από το κάθε μπουκάλι και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Στην συνέχεια έγινε εμβολιασμός των κατάλληλων αραιώσεων των δειγμάτων σε τρυβλία και ακολούθησε ενσωμάτωση με MRS Agar (Oxoid, U.K.) και επώαση στους 37°C για 3-5 ημέρες. Η ίδια διαδικασία ακολούθηθηκε και για τα δυο *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*) μόνο που αυτά ενσωματώθηκαν σε TOS propionate Agar (cat:2011.00 Conda S.A. Spain) σε αναερόβιες συνθήκες με τοποθέτηση των τριβλίων σε τζάρες (κυτία) αναερόβιας επώασης και τη χρήση Anaerocult A και επώαση στους 37°C για 3 ημέρες.



Εικόνα 58: Διαδικασία διαδοχικών αραιώσεων και επίστρωσης τους σε τριβλία για την καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία. (Γιαβάσης Γ., 2012)

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης, μετρήθηκαν οι αποικίες με μετρητή αποικιών σε μετρητή αποικιών Scan[®] 100 (*Interscience, France*) και έγινε μετατροπή τους σε colony forming units/ml (μονάδες που σχηματίζουν αποικίες, cfu/ml) σύμφωνα με την εξίσωση $x = (a1 + a2 + b1 + b2) (n1 + 0.1 * n2)$, όπου a και b ο αριθμός των αποικιών (εις διπλούν) στα τριβλία δύο διαδοχικών αραιώσεων, και n ο αριθμός των τριβλίων που μετρήθηκαν από κάθε αραιώση.

6.2.6. Πρεβιοτικές ουσίες.

Σε δοκιμαστικούς σωλήνες προστέθηκαν 10 ml αποσταγμένου νερού καθώς και 0,01 g από κάθε δείγμα (0,1% εκχύλισμα) του οποίου την προβιοτική δράση θέλαμε να ελέγξουμε. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες αποστειρώθηκαν στους 121°C για 15 λεπτά.

6.2.7. Παρασκευή διαλυμάτων προσομοίωσης γαστρικού και εντερικού υγρού.

6.2.7.1. Γαστρικό υγρό

Η δοκιμή της πρεβιοτικής δράσης των δειγμάτων έναντι των στελεχών των *Bifidobacterium* πραγματοποιήθηκε σε υγρό διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών με όξινο pH που περιείχε το πρωτεολυτικό ένζυμο πεψίνη, όπως έχει ήδη έχει περιγράψει από τους Pak et al. (2013). Η ανασύσταση των καλλιιεργειών *Bifidobacterium*, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στο **6.2.2.1**. Το διάλυμα πεψίνης αποτελείται από πεψίνη (Sigma, St. Louis, USA) 0.22% (w/v, 1.2 U/mg) επαναιωρημένη σε διάλυμα NaCl (cas:7647-14-5 Penta Czech) 0.5% (w/v) ρυθμισμένο σε pH 2 με HCl 0.1 N. Συνολικά 90ml διαλύματος πεψίνης μέσω διαδικασίας αποστειρωτικής διήθησης (φίλτρο 0,45mm) προστέθηκαν σε 10ml αποστειρωμένου δείγματος (εκχυλίσματος) και στα οποία προστέθηκε ασηπτικά επιπλέον 1 ml βακτηριακού εμβολίου (ποσοστό εμβολίου 1%) μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής με τη χρήση αποστειρωτικής φλόγας.

Ακολούθησε επώαση του μείγματος στους 37°C και ο πληθυσμός των βιώσιμων *Bifidobacterium* καταμετρήθηκε με την μέθοδο των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε χρονικά διαστήματα 0, 1, και 3 h από την έναρξη της επώασης. Για την καταμέτρηση του πληθυσμού των *Bifidobacterium* χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα TOS Propionate agar + *Bifidobacterium* selective supplement και η επώαση των τρυβλίων έγινε αναεροβίως σε κυτίο αναεροβίωσης με φάκελο παραγωγής CO₂ (Anaerocult A, Merck, USA) για 3 μέρες στους 37°C.

6.2.7.2. Εντερικό υγρό:

Η δοκιμή της πρεβιοτικής δράσης των ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων έναντι των στελεχών των *Bifidobacterium* σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών παρουσία χολικών αλάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Pak et al. (2013), με την προσθήκη 90ml αποστειρωμένου διαλύματος χολικών αλάτων 0,33% σε 10ml αποστειρωμένου δείγματος και στα οποία προστέθηκε το 1 ml βακτηριακού εμβολίου (ποσοστό εμβολίου 1%). Το διάλυμα χολικών αλάτων (BBL, USA), προερχόμενων από αποξηραμένη χολή μοσχαριού, παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 0,33% w/v με την προσθήκη αποσταγμένου νερού. Η αποστείρωση και

πάλι πραγματοποιήθηκε με το σύστημα αποστειρωτικής διήθησης (με φίλτρο 0,45μm) σε αποστειρωμένα μπουκάλια όπως και παραπάνω.

6.3. Αποτελέσματα πρεβιοτικής δράσης.

Για την εκτίμηση της διεγερτικής δράσης στην ανάπτυξη των προβιοτικών βακτηρίων μετρήθηκε το pH του συνθετικού υποστρώματος ανάπτυξης, η μεταβολή του οποίου είναι μέτρο σύγκρισης της ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων αλλά και της αποτελεσματικής πρεβιοτικής τους δράσης τους. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών παρουσιάζονται στον πίνακα 26.

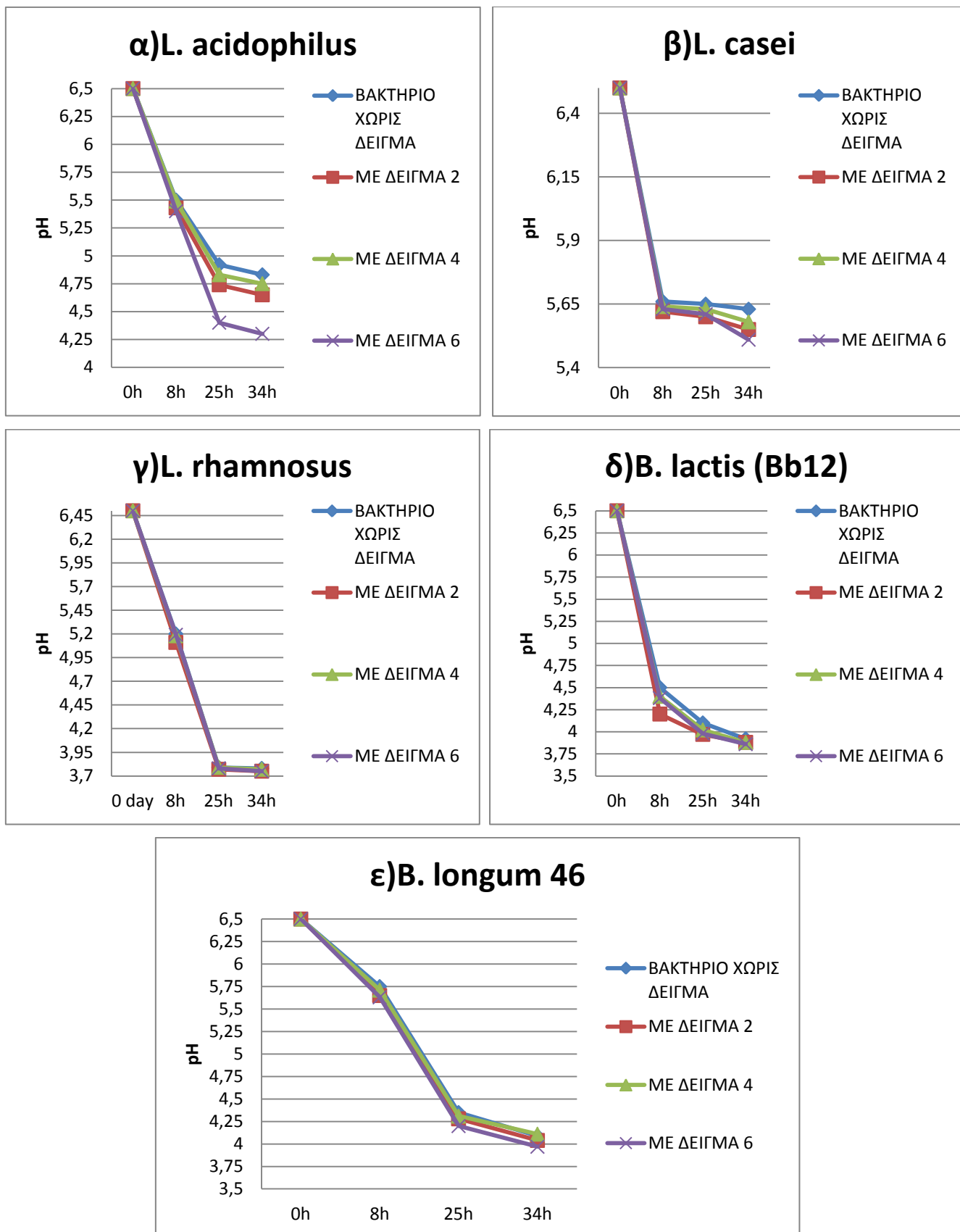
Κατά τον πειραματικό έλεγχο της διεγερτικής δράσης των δειγμάτων ελέγχοντας την μεταβολή του pH σε όλους τους μικροοργανισμούς παρατηρήθηκε ότι ο *L. rhamnosus* επέτυχε τη μεγαλύτερη μεταβολή μεταξύ των 5 προβιοτικών βακτηρίων που ελέγχθησαν με ή χωρίς προσθήκη δείγματος. Έτσι ξεκινώντας από pH 6.50(σε όλα τα ελεγχόμενα βακτήρια) και χωρίς της προσθήκη ενθυλακωμένου δείγματος goji berry το pH του υποστρώματος έπεσε στις 8h, στις 25h και στις 34h στο 5.20, 3.79 και 3.78 αντίστοιχα, ενώ με την προσθήκη του δείγματος 2 & 6 μειώθηκε ακόμη περισσότερο στις 34 h στα 3,75. Το δείγμα 4 την 8^η ώρα επέτυχε το χαμηλότερο pH 5.07 ενώ την 25h το δείγμα 6 είχε το χαμηλότερο pH 3.76.

Σε γενικές γραμμές όλα τα δείγματα και σε όλες τις ώρες ελέγχου επέτυχαν διέγερση με αποτέλεσμα τη μείωση του pH των ελεγχόμενων προβιοτικών βακτηρίων. Το δείγμα 6 επέτυχε τις μεγαλύτερες μειώσεις pH στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθούμενο από το δείγμα 2. Η μεγαλύτερη μείωση του pH επετεύχθη με την προσθήκη δείγματος 6 στον *L. Acidophilus* με επίτευξη pH 4.30 την 34^η ώρα όταν χωρίς την προσθήκη δειγμάτων το pH ήταν 4.83 όπως φαίνετε και στο γράφημα 8 α.

Στις καλλιέργειες των *Bifidobacterium* στις πρώτες 8h το δείγμα 2 επιτυγχάνει χαμηλότερες τιμές αλλά στη συνέχεια στις 25 & 34h το χαμηλότερο pH επιτυγχάνετε από το δείγμα 6.

Πίνακας 26: Αποτελέσματα μετρήσεων pH προβιοτικών καλλιεργειών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων goji berry.

	Μετρήσεις pH			
	0h	8h	25h	34h
<i>L. acidophilus</i>	6.50	5.50	4.92	4.83
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	6.50	5.43	4.74	4.65
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	6.50	5.40	4.40	4.30
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	6.50	5.49	4.83	4.75
<i>L. casei</i>	6.50	5.66	5.65	5.63
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	6.50	5.62	5.60	5.55
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	6.50	5.63	5.61	5.49
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	6.50	5.64	5.63	5.58
<i>L. rhamnosus</i>	6.50	5.20	3.79	3.78
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	6.50	5.11	3.77	3.75
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	6.50	5.19	3.76	3.75
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	6.50	5.07	3.95	3.93
<i>B. lactis</i> (Bb-12®)	6.50	5.80	4.27	4.18
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 2	6.50	5.56	4.27	4.17
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 6	6.50	5.65	4.23	4.02
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 4	6.50	5.67	4.29	4.04
<i>B. longum</i> 46	6.50	5.86	4.62	4.45
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 2	6.50	5.73	4.49	4.23
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 6	6.50	5.78	4.29	4.11
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 4	6.50	5.64	4.41	4.25



Γράφημα 9: Η διεγερτική επίδραση μείωσης του pH στα ελεγχόμενα προβιοτικά βακτήρια.

Η μείωση του pH της καλλιέργειας μπορεί να υποδηλώνει την αύξηση του αριθμού των μικροοργανισμών. Έτσι για παράδειγμα με προσθήκη του δείγματος 6 στον *L. casei* παρατηρείτε μείωση του pH και ταυτόχρονα σημαντική αύξηση στον αριθμό των γαλακτικών βακτηρίων *L. casei* κατά 1.34 (log cfu/mL) μετά από 34h.

Η επίδραση στον αριθμό των αποικιών σε log cfu/mL παρουσία και απουσία των δειγμάτων παρουσιάζετε στον πίνακα 27. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η προσθήκη των δειγμάτων 2 & 6 επιφέρει μικρές αυξήσεις στους αριθμούς των ελεγχόμενων γαλακτοβακίλων *L. acidophilus* & *L. rhamnosus*.

Η πιο σημαντική αύξηση κατά 2 & 1.8 log cfu/mL παρατηρήθηκε στον *B. Lactis* (Bb-12) μετά από 34h με προσθήκη των δειγμάτων 2 & 6 αντίστοιχα ενώ μικρές αυξήσεις κατά 0,23 & 0,26 log cfu/mL παρατηρήθηκαν στον *B. longum* 46 με τα ίδια δείγματα αντίστοιχα.

Πίνακας 27: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία πιθανών προβιοτικών δειγμάτων goji berry.

	Μετρήσεις αποικιών(log cfu/mL)			
	0h	8h	25h	34h
<i>L. acidophilus</i>	4.93	7.56	8.77	8.61
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	4.93	7.78	8.73	8.75
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	4.93	7.68	8.74	8.61
<i>L. acidophilus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	4.93	7.56	7.71	8.11
<i>L. casei</i>	6.85	8.39	9.04	7.89
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	6.85	8.49	9.04	8.04
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	6.85	8.43	9.17	9.23
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	6.85	8.34	8.88	9.17
<i>L. rhamnosus</i>	5.86	8.38	8.77	8.90
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	5.86	8.43	8.88	8.87
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	5.86	8.38	8.89	8.90
<i>L. rhamnosus</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	5.86	8.41	8.84	8.86
<i>B. lactis</i> (Bb-12®)	3.99	5.85	6.78	5.08
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 2	3.99	5.88	6.82	7.08
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 6	3.99	6.08	6.84	6.88
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 4	3.99	5.98	6.74	6.79
<i>B. longum</i> 46	5.54	6.46	7.87	7.85
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 2	5.54	6.49	7.98	8.08
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 6	5.54	6.38	7.99	8.11
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 4	5.54	6.47	7.89	7.91

Για να παρέχουν τα προβιοτικά βακτήρια τα οφέλη τους στην υγεία του καταναλωτή θα πρέπει να παραμείνουν βιώσιμα κατά τη διάρκεια της μετάβασής τους στο γαστρεντερικού σωλήνα σε επίπεδα πληθυσμού 10^6 - 10^7 cfu / g (Pavli et al. 2016). Βασικοί ανασταλτικοί παράγοντες έναντι της προβιοτικής επιβίωσης είναι το όξινο περιβάλλον και η επίδραση του πρωτεολυτικού ενζύμου πεψίνη στο στομάχι ενώ στο δωδεκαδάκτυλο τα χολικά άλατα που εκκρίνονται. Η αντοχή στα χολικά άλατα σύμφωνα με τους Ruiz et al., (2013) είναι μία από τις πιο βασικές ιδιότητες για τις οποίες ελέγχονται τα προβιοτικά βακτήρια για να διαπιστωθεί η ικανότητα επιβίωσής τους στο λεπτό έντερο, και κατ' επέκταση η ικανότητά τους να διαδραματίζουν λειτουργικό ρόλο ως προβιοτικά.

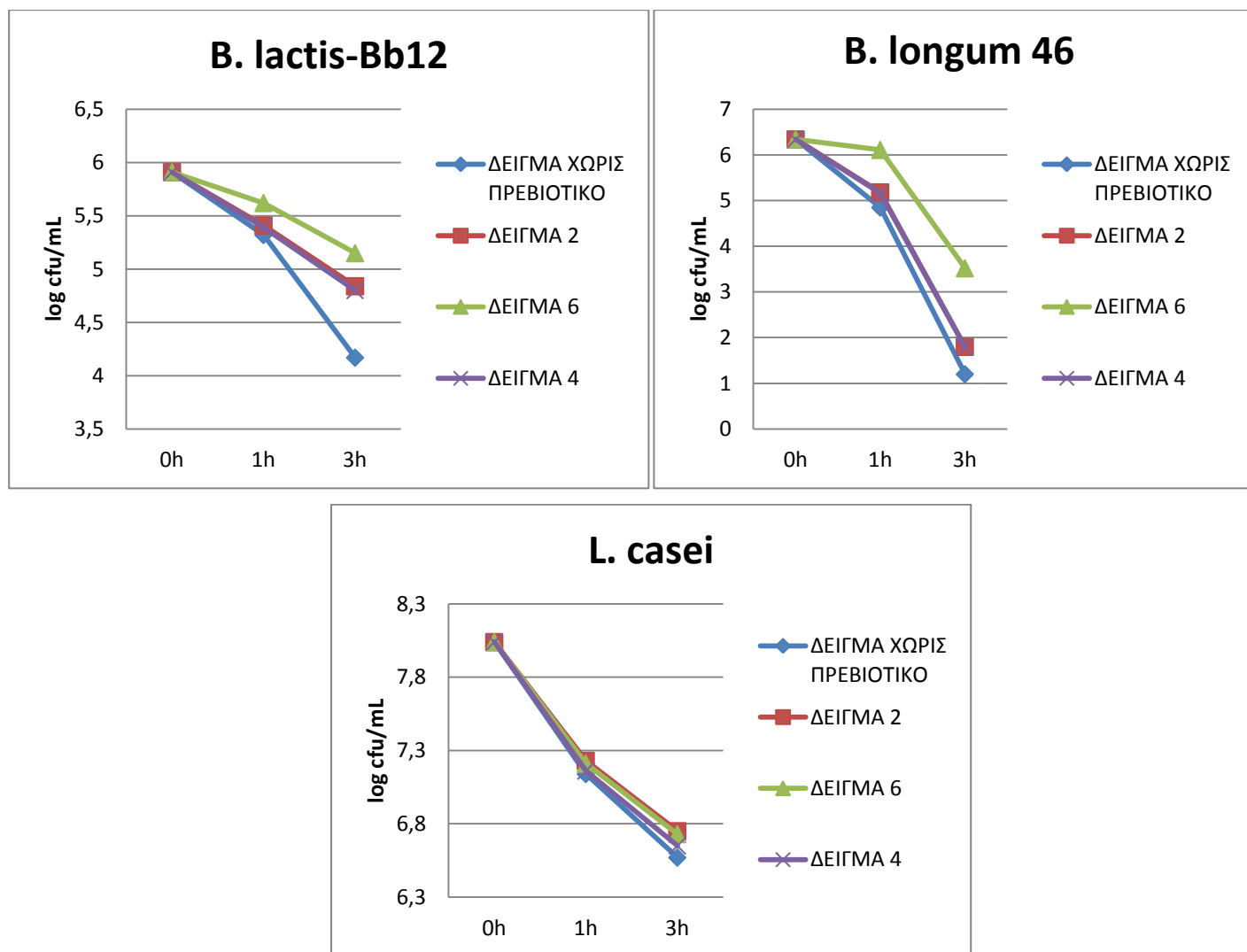
Ο έλεγχος που πραγματοποιήθηκε έναντι των δυο αυτών ανασταλτικών παραγόντων έδειξε επιβίωση των *Bifidobacterium* καθώς και του *L.casei* ο οποίος όμως έδειξε επιβίωση μόνο σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών όπως παρουσιάζονται στους πίνακες 28 & 29.

Πίνακας 28: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία πιθανών προβιοτικών δειγμάτων goji berry σε προσομοίωση γαστρικών συνθηκών.

	Μετρήσεις αποικιών(log cfu/mL) μετά από παραμονή σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών		
	0h	1h	3h
<i>Bifidobacterium lactis</i> (Bb-12®)	5.91	5.32	4.17
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 2	5.91	5.41	4.84
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 6	5.91	5.62	5.15
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 4	5.91	5.39	4.80
<i>B. longum</i> 46	6.34	4.85	1.20
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 2	6.34	5.18	1.80
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 6	6.34	6.11	3.52
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 4	6.34	5.16	1.79
<i>L.casei</i>	8.04	7.14	6.57
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	8.04	7.23	6.75
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	8.04	7.21	6.73
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	8.04	7.16	6.65

Με βάση τα αποτελέσματα επιβίωσης σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών το δείγμα 6 επέτυχε σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των *Bifidobacterium*. Πιο συγκεκριμένα επέτυχε διαφορά μεταξύ του control (καλλιέργεια βακτηρίου χωρίς

δείγμα) κατά 1 log cfu/mL στην επιβίωση *B. lactis* (Bb-12) και κατά 2.32 log cfu/mL στην επιβίωση του *B. longum* 46. Ενώ από την άλλη το δείγμα 2 έδειξε μία μικρή θετική επίδραση αυξάνοντας κατά 0,16 log cfu/mL την επιβίωση του *L.casei* όπως αυτή παρουσιάζεται στον γράφημα 10.



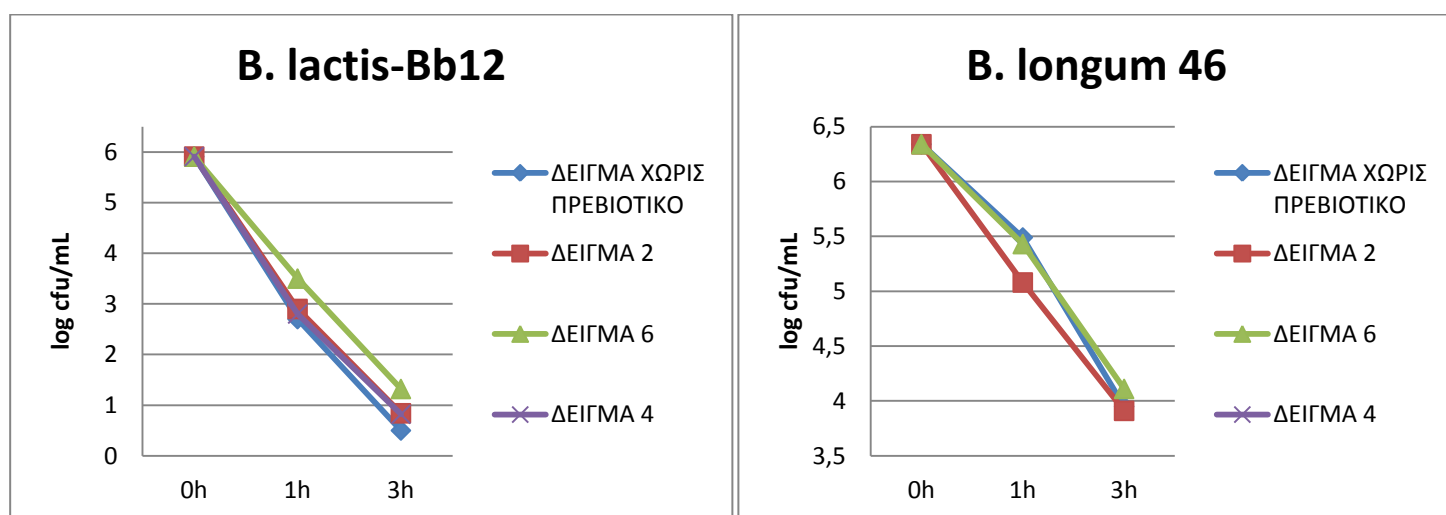
Γράφημα 10 : Η προστατευτική επίδραση σε διάλυμα προσομοίωσης γαστρικών υγρών στα ελεγχόμενα προβιοτικά βακτήρια.

Η προσθήκη του δείγματος 6 παρουσίασε επίσης σημαντική προστατευτική δράση κατά 0.82 log cfu/mL σε σχέση με αυτή του control στον *B. lactis* (Bb-12) μετά από 3 ώρες παραμονής σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών ενώ μικρή θετική επίδραση κατά 0.16 log cfu/mL (σε σχέση με αυτή του control) παρουσίασε έναντι του *B. longum* 46 όπως αυτές παρουσιάζονται στο γράφημα 11.

Πίνακας 29: Μετρήσεις αποικιών (σε log cfu/mL) προβιοτικών μικροοργανισμών χωρίς αλλά και με παρουσία δειγμάτων goji berry σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών συνθηκών.

	Μετρήσεις αποικιών(log cfu/mL) μετά από παραμονή σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών		
	0h	1h	3h
<i>B. lactis</i> (Bb-12®)	5,91	2,7	0,5
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 2	5,91	2,9	0,84
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 6	5,91	3,5	1,32
(Bb-12®)+ΔΕΙΓΜΑ 4	5,91	2,8	0,82
<i>B. longum</i> 46	6,34	5,49	3,95
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 2	6,34	5,08	3,91
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 6	6,34	5,43	4,11
<i>B. longum</i> 46+ΔΕΙΓΜΑ 4	6,34	5,10	3,89
<i>L. casei</i>	8,04	-	-
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 2	8,04	-	-
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 6	8,04	-	-
<i>L. casei</i> +ΔΕΙΓΜΑ 4	8,04	-	-

Όσον αφορά στην επίδραση των προσομοιωμένων εντερικών συνθηκών έναντι του λακτοβάκιλλου *casei* τα αποτελέσματα έδειξαν την αναστολή της ανάπτυξης στην πρώτη ώρα παραμονής στις συνθήκες αυτές.



Γράφημα 11 : Η προστατευτική επίδραση σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών συνθηκών στα ελεγχόμενα πρεβιοτικά βακτήρια.

6.4. Συζήτηση

Αν και η πρεβιοτική δράση των goji berry έχει καταγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία εντούτοις δεν έχει διερευνηθεί διεξοδικά παρά μόνο αποσπασματικά ελέγχοντας πιθανές δράσεις του σε γιαούρτη (Rotar *et al.*, 2005; Baba *et al.*, 2014), σε κινεζικής προέλευσης πίκλες (Liao *et al.*, 2017), σε χυμό goji berry (Kocot *et al.*, 2017) και ευεργετικές επιδράσεις του in-vivo έναντι της κολίτιδας (Zhao *et al.*, 2014). Συνεχίζοντας τη διερεύνηση των παραχθέντων βιοδραστικών ενθυλακωμένων υδατικών εκχυλισμάτων goji berry για πιθανές πρεβιοτικές δράσεις προσπαθήσαμε να καλύψουμε τα κενά στη μέχρι τώρα έρευνα με μεγαλύτερο την μη ύπαρξη ερευνητικών δεδομένων με προϊόντα Ελληνικής προέλευσης. Έτσι ελέγχθηκε η πιθανή διεγερτική τους δράση σε προβιοτικά βακτήρια ελέγχοντας σε πρώτο στάδιο τη μεταβολή του pH καλλιέργειας διότι βάση αυτής της ιδιότητας τους τα προβιοτικά βακτήρια μπορούν να επιφέρουν ευεργετικά αποτελέσματα έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών. Ένας από τους πιθανούς τρόπους επίτευξης αυτού είναι και η παραγωγή γαλακτικού οξέος αλλά και άλλων οργανικών οξέων με συνέπεια τη μείωση του pH στη γαστρεντερική οδό. Αυτό οδηγεί στη μείωση του pH στο εσωτερικό των κυττάρων των παθογόνων μικροοργανισμών, προκαλώντας σημαντικές βλάβες στα δομικά και λειτουργικά συστατικά των επιβλαβών βακτηρίων (Alakomi *et al.*, 2000 ; Mahore *et al.*, 2017).

Προηγούμενες έρευνες έχουν διερευνήσει την επίδραση διαφόρων ολισακχαριτών, πολυσακχαριτών (συμπεριλαμβανομένου και της μαλτοδεξτρίνης) και διαιτητικών ινών στην ανάπτυξη προβιοτικών μικροοργανισμών καθώς και για τη δημιουργία συμβιωτικών σκευασμάτων. Kimoto-Nira *et al.*, 2010; Vernazza *et al.*, 2006; Kondepudi *et al.*, 2012). Στο σύνολό τους οι έρευνες υποδεικνύουν ότι η ύπαρξη ορισμένων σακχάρων στο μέσο ανάπτυξης των προβιοτικών βακτηρίων λειτουργεί θετικά στην ανάπτυξή τους και κατ' επέκταση στην προβιοτική τους δράση.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνάς μας η προσθήκη του ενθυλακωμένου εκχυλίσματος No 6 στην καλλιέργεια του *L. acidophilus* μετά από 34h επέτυχε μείωση του pH κατά 0,53 σε σχέση με την καλλιέργεια στην οποία δεν είχε προστεθεί δείγμα (control). Η μεταβολή αυτή όμως δεν ακολουθήθηκε με ανάλογη σε ποσοστό μεταβολή του αριθμού των αποικιών (σε log cfu/ml). Όπως όμως προαναφέρθηκε αυτή η μείωση του pH είναι σημαντική διότι μπορεί να δράσει

ανασταλτικά έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών ακόμη και στις περιπτώσεις που δεν ακολουθείται από ανάλογη αύξηση του πληθυσμού των προβιοτικών βακτηρίων (Fayol-Messaoudi et al., 2005). Παρατηρείτε δηλαδή ότι ο ίδιος πληθυσμός βακτηριακών κυττάρων διεγείρεται και παράγει περισσότερα οργανικά οξέα με την προσθήκη ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων goji berry.

Επίσης οι Vernazza et al., (2006) σε έρευνα τους σχετικά με την επίδραση των υδατανθράκων στην ανάπτυξη των *Bifidobacterium* επισήμαναν ότι η μαλτοδεξτρίνη επηρεάζει ελάχιστα κατά 0.004 h^{-1} (h: ειδικός δείκτης ανάπτυξης μικροοργανισμών ανά ώρα) τον *B. Longum 46* ενώ οι (GOS) γαλακτοολιγοσακχαρίτες, οι (FOS) φρούτοολιγοσακχαρίτες, οι (XOS) ξύλοολιγοσακχαρίτες και η γλυκόζη επηρεάζουν κατά 0.116 , 0.072 , 0.040 και 0.095 h^{-1} αντίστοιχα. Ενώ η επίδραση της στον *B. Lactis Bb12* ήταν 0.041 h^{-1} ενώ των (GOS), (FOS), (XOS) και της γλυκόζης ήταν 0.091 , 0.045 , 0.048 , 0.075 h^{-1} αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα λοιπόν της έρευνάς μας επιβεβαιώνουν τα ευρήματα αυτά διότι το δείγμα 6 με ποσοστό μαλτοδεξτρίνης 2% εν συγκρίσει με τα δείγματα 4 & 2 με ποσοστά μαλτοδεξτρίνης 14% & 7% αντίστοιχα παρουσίασε συνολικά καλύτερα συγκριτικά αποτελέσματα πρεβιοτικής δράσης με αμέσως επόμενο το δείγμα 2 με 7% μαλτοδεξτρίνη. Αυτό πιθανότατα έχει να κάνει με την ύπαρξη μεγάλου αριθμού μορίων γαλακτόζης, (FOS), (XOS) αλλά και γλυκόζης που υπάρχουν στους πολυσακχαρίτες των goji berry (Qian et al., 2017)

Οι ισχυρές όξινες συνθήκες και η επίδραση του πρωτεολυτικού ενζύμου πεψίνη που επιβάλλονται από τη σύνθεση του γαστρικού υγρού είναι ένα από τα εμπόδια που αντιμετωπίζουν οι γαλακτοβάκλιοι και τα *Bifidobacterium* στο στομάχι. Μεταξύ των ελεγχόμενων προβιοτικών βακτηρίων ο γαλακτοβάκιλος *L. Casei* επηρεάστηκε λιγότερο, ακολουθούμενος από το *B. Lactis Bb12* που έδειξε την αμέσως μεγαλύτερη ανοχή στο όξινο περιβάλλον ενώ η επιβίωση του *B.longum 42* ήταν χαμηλή κάτι που επιβεβαίωσε και τα αποτελέσματα της έρευνας των González et al. (2012) στην οποία και καταγράφεται η μικρότερη ανθεκτικότητα του *B.longum 42* εν σύγκριση με τον *B. Lactis Bb12* σε χαμηλό pH.

Η ύπαρξη ενός εξωκυτταρικού πολυσακχαρικού φιλμ που παράγεται από ορισμένα γαλακτικά βακτήρια αλλά και από τα *Bifidobacterium* έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία. (Alp and Aslim 2010; Alp et al., 2010). Το πολυσακχαρικό αυτό φιλμ διαχωρίζει τα προβιοτικά βακτηριακά κύτταρα από το περιβάλλον και λειτουργεί ως μία ασπίδα έναντι των συνθηκών που επικρατούν στη γαστρεντερική οδό και βοηθά

στην επιβίωσή τους. Επίσης έχει καταγραφεί ότι τα στελέχη του γένους *longum* των *Bifidobacterium* παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες αυτού του φιλμ σε σχέση με τον Bb12 με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη αντοχή αυτών στα χολικά άλατα. Η αντοχή αυτή σχετίζεται με τη δέσμευση των χολικών αλάτων από το πολυσακχαρικό φιλμ με αποτέλεσμα τη μείωση της αντιμικροβιακής του δράσης (Alp and Aslim 2010).

Τα αποτελέσματα της έρευνάς μας, επιβεβαιώνουν τα προαναφερόμενα και ταυτόχρονα επισημαίνουν την αύξηση της βιωσιμότητας του στελέχους Bb12 με την προσθήκη εκχυλισμάτων goji berry. Η αύξηση αυτή πιθανότατα σχετίζεται με τους πολυσακχαρίτες των goji berry οι οποίοι στη σύνθεσή τους έχουν μόρια Γαλακτόζης, Γλυκόζης, Φρουκτόζης, Αραβινόζης, Μανόζης και Ξυλόζης τα οποία αποτελούν και βασικά δομικά μόρια αυτής εξωκυτταρικής πολυσακχαρικής αντιμικροβιακής ασπίδας σύμφωνα με τους Alp and Aslim (2010) και Redgwell et al.,(2011).

Ως συμπέρασμα, που προκύπτει από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης μπορεί να καταγραφεί η σαφή διεγερτική και πρεβιοτική *in vitro* δράση ενθυλακωμένων υδατικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από καρπούς Ελληνικών goji berry με υποβοηθούμενης με υπερήχους εκχύλιση.

Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ένα από αυτά τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα είχε σαφή πρεβιοτική υπεροχή που οφείλονταν όχι στον πολυσακχαρίτη μαλτοδεξτρίνη που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ενθυλάκωσης αλλά στους πολυσακχαρίτες που περιέχει ο καρπός *L. barbarum*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΝΟΨΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΣΥΝΟΨΗ

Οι βασικοί στόχοι της παρούσας ερευνητικής εργασίας περιλάμβαναν την εκτίμηση της περιεκτικότητας σε βιοδραστικά συστατικά των καρπών goji berry Θεσσαλικής προέλευσης σε σύγκριση με ανάλογους εισαγόμενους καρπούς και αξιολόγηση των ευεργετικών για την υγεία του ανθρώπου δράσεων τους. Τα ευρήματα αυτής της διατριβής είναι ιδιαίτερος σημαντικά για την δικαιολόγηση της ανάπτυξης των εγχώριων φυτειών goji berry με σκοπό τη μείωση της εισαγωγής στους καρπούς αυτούς ενώ ταυτόχρονα δίνει εναλλακτικές λύσεις στον αγροτικό αλλά και στον μεταποιητικό τομέα παρουσιάζοντας καινοτόμες επεξεργασίες και χρήσεις του σε μία περίοδο όπου απαιτούνται διεξοδοί ανάπτυξης στη χώρα μας.

Πιο συγκεκριμένα για την επίτευξη των στόχων της εργασίας:

- ✓ Αναπτύχθηκε μία καινοτόμος βελτιωμένη διαδικασία απομόνωσης των βιοδραστικών ενώσεων από τους καρπούς με υδατική εκχύλιση υποβοηθούμενη με υπερήχους. Οι βέλτιστες συνθήκες της εκχύλισης προσδιορίστηκαν με την διαδικασία του πειραματικού σχεδιασμού Box-Behnken με μεταβολή τεσσάρων βασικών παραμέτρων της εκχύλισης (αναλογία νερού/ σκόνης goji berry, θερμοκρασία εκχύλισης, έντασης υπερήχων και χρόνου εκχύλισης).
- ✓ Πραγματοποιήθηκε η εκτίμηση της σύστασης και της περιεκτικότητας των καρπών αλλά και των εκχυλισμάτων σε βιοδραστικές ενώσεις, με τις μεθόδους της φασματοφωτομετρίας, της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών και με τη μέθοδο της φασματοσκοπίας υπερέθρων.
- ✓ Ελέγχθηκε η αντιοξειδωτική ικανότητα έναντι δύο ελεύθερων ριζών (DPPH• και ABTS•+) και η αντιμεταλλαξιογόνος δράση (με έλεγχο της προστασίας της διάσπασης πλασμιδιακού DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης) μιας σειράς υγρών εκχυλισμάτων που παρελήφθησαν από τις δύο ποικιλίες που καλλιεργούνται στη Θεσσαλία με βάση βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό Box-Behnken. Με βάση τα αποτελέσματα των ελέγχων επιλέχθηκε το πιο βιοδραστικό εκχύλισμα το οποίο και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής επίδρασης σε μυϊκή κυτταρική σειρά επιμύων C2C12 ελέγχοντας τους δείκτες των ROS και της γλουταθειώνης (GSH) με κυτταρομετρία ροής αλλά και φωτομετρικά ελέγχοντας την προστασία έναντι των λιπιδίων (TBARS) και των πρωτεϊνών (πρωτεϊνικά καρβονύλια).

- ✓ Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν σκόνες με τη μέθοδο της λυοφιλοποίησης και της ενθυλάκωσης σε φορέα μαλτοδεξτρίνης D18 (18% ισοδύναμο δεξτρόζης). Οι σκόνες προήλθαν από εκχυλίσματα που προέκυψαν με συγκεκριμένες παραμέτρους εκχύλισης ελέγχοντας ταυτόχρονα και την αποτελεσματικότητα της χρήσης και άλλων διαλυτών. Πραγματοποιήθηκε μια αξιολόγηση των ενθυλακωμένων σκονών όσον αφορά τα βιοδραστικά συστατικά τους και την αντιοξειδωτική τους δράση έναντι των δύο ενεργών ριζών DPPH• και ABTS•+ και επετεύχθη συσχέτιση περιεχόμενης βιοδραστικής ομάδας με την αντιοξειδωτική δράση τους ενώ στην πορεία ελέγχθηκε η αντιμικροβιακή δράση αυτών.
- ✓ Τέλος στα ενθυλακωμένα σκευάσματα από τα προαναφερόμενα υδατικά εκχυλίσματα αξιολογήθηκε η πρεβιοτική τους δράση έναντι προβιοτικών βακτηρίων (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) ελέγχοντας την επίδρασή τους στο pH των καλλιεργειών καθώς επίσης και την προστατευτική τους επίδραση σε προβιοτικά βακτήρια σε in vitro προσομοιωμένες στομαχικές και εντερικές συνθήκες

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Από τη συγκριτική αξιολόγηση της περιεκτικότητας σε βιοδραστικά συστατικά των καρπών goji berry Θεσσαλικής προέλευσης και εισαγόμενων αποδείχθηκαν τα παρακάτω:

- Οι δοκιμές t-test και U(*Mann-Whitney*) test που πραγματοποιήθηκαν για τη σύγκριση μεταξύ των μέσων τιμών των τεσσάρων μετρούμενων παραμέτρων κατά τη διαδικασία αριστοποίησης της παραγωγής συμπυκνωμένων βιοδραστικών εκχυλισμάτων έδειξαν ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των καρπών διαφορετικής προέλευσης αναφορικά με την περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και την αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση την τιμή IC₅₀ της δέσμευσης της ενεργής ρίζας DPPH. Αντίθετα, υπήρξε μια στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά στη συγκέντρωση των συνολικών υδατανθράκων, καθώς τα εκχυλίσματα που προέρχονταν από Θεσσαλικά goji berries, φαίνεται να έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση σε υδατάνθρακες ($1,16 \pm 0,17 \text{ g/L}$), εν συγκρίσει με τα αντίστοιχα

εισαγόμενα φρούτα ($0,89 \pm 0,19 \text{ g/L}$) κάτι που στην πορεία των ερευνών επιβεβαιώθηκε και σε μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε καρπούς (Θεσσαλικά : $490^a \pm 6.8 \text{ mg/g}$ Εισαγωγής από Κίνα: $459^{a,b,c,d} \pm 3.8 \text{ mg/g}$).

- Επιπρόσθετα η σύγκριση μεταξύ των δύο καλλιεργούμενων στη Θεσσαλία ποικιλιών (*L. barbarum* και *L. chinensis mill*), με συλλογές καρπών στη διάρκεια ενός παραγωγικού έτους (κατά τους μήνες Ιούνιο, Αύγουστο και Οκτώβριο του έτους 2015) έδειξε ότι οι καρποί που συλλέχθηκαν τον μήνα Αύγουστο είχαν καλύτερο προφίλ βιοδραστικών συστατικών. Ειδικότερα τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μεταξύ των δύο καρπών που καλλιεργούνται στην Θεσσαλία οι καρποί των *L. barbarum* εμφανίζουν υψηλότερη συγκέντρωση σε υδατάνθρακες αλλά και σε φαινόλες, έναντι των καρπών *L. chinense*. Επιπλέον, έχουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση με βάση την αναστολή των ριζών DPPH• και ABTS•+. Επιπρόσθετα από την ανάλυση του προφίλ των λιπαρών οξέων που πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε Ελληνικούς καρπούς goji berry με GC-MS επιβεβαιώθηκε η περιεκτικότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ελαϊκού και λινελαϊκού οξέως στους καρπούς των δύο ειδών που αναφέρεται και στη βιβλιογραφία. Από τη σύγκριση της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα μεταξύ των καρπών της ποικιλίας *L. barbarum* προέκυψε ότι οι Θεσσαλικοί καρποί περιείχαν μεγαλύτερα ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων (36,1-43,76%) σε σχέση με τα εισαγωγής (31,58-34,46%) και μικρότερα ποσοστά μονοακόρεστων (12,6-19,8%) και πολυακόρεστων (56,2 - 63,9%) σε σχέση με των εισαγωγής που ήταν (20,2-21,9%) και (65,5-68,4%).
2. Οι άριστες τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών καθώς και οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις σε βιοδραστικά συστατικά και αντιοξειδωτική ικανότητα με βάση τα αποτελέσματα της έρευνας για την παραλαβή εμπλουτισμένων εκχυλισμάτων με τη μεθοδολογία επιφανειών απόκρισης παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

	Ανεξάρτητες μεταβλητές				Total carbohydrates content (g/L extracts)	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mgGAE/L extract)	IC 50 of DPPH radical scavenging mg/mL
	C1	C2	C3	C4				
Thessaly Imported	39.03	50,16	331,70	31.50	1.36			
Thessaly Imported	31.43	56.59	284.22	31.10	1.31			
Thessaly Imported	28.5	64.29	282,91	39.73		31.21		
Thessaly Imported	26.31	65	249	39.54		31.62		
Thessaly Imported	20.41	57.06	221,72	22.89		419.88		
Thessaly Imported	20.11	54.99	211,16	20.37		448.53		
Thessaly Imported	20	45	359,98	35.53			0.71	
Thessaly Imported	21.12	45.5	160,07	25.08			0.69	

C1 = Ratio of water to dry goji berries (mL/g),

C2 = Extraction temperature (°C),

C3 = Ultrasonic power (W/cm²)

C4 = Extraction time (min)

Οι βέλτιστες παράμετροι εκχύλισης που προσδιορίστηκαν για τους Θεσσαλικούς και τους εισαγόμενους καρπούς διαπιστώθηκε ότι είναι ως επί το πλείστον παρόμοιες όσον αφορά τις παραμέτρους απόδοσης εκχύλισης και τους δείκτες βιοδραστικότητας, δηλαδή την περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, την απόδοση εκχύλισης, την περιεκτικότητα σε φαινόλες και τη συνολική αντιοξειδωτική δράση (βάση της δέσμευσης της ρίζας DPPH•) εκφρασμένη ως τιμή IC₅₀.

3. Τα ευρήματα της μελέτης διερεύνησης των αντιοξειδωτικών και αντιμεταλλαξιγόνων δράσεων των εκχυλισμάτων goji berries, από τις ποικιλίες *L. barbarum* και *L. Chinense*, που καλλιεργούνται από την περιοχή της Θεσσαλίας έδειξαν για πρώτη φορά ότι :

- Παρουσίασαν ισχυρή δράση στην αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών και στην προστασία του DNA έναντι βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες. Ειδικότερα αποδείχθηκε η προστατευτική δράση εναντίον της διάσπασης του πλασμιδιακού DNA από ρίζα υπεροξυλίου, αλλά μόνο ένα δείγμα έδειξε ειδική δραστηριότητα και έναντι θραυσμάτων που προκαλούνται από τη ρίζα υδροξυλίου. (Αυτό όπως προαναφέρθηκε μπορεί να οφείλεται στον υψηλό ρυθμό αντίδρασης του OH με το DNA και έτσι είναι πιο δύσκολο για τα αντιοξειδωτικά μόρια να ασκούν τις προστατευτικές τους επιδράσεις).

- Επιπλέον, αποδείχθηκε ότι ένα από αυτά τα εκχυλίσματα σε μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις 25 και 100μg/mL βελτίωσε τον αντιοξειδωτικό μηχανισμό μυϊκών κυττάρων C2C12 αυξάνοντας τη GSH κατά 127,5 και 189,5% αντιστοίχως, σε σύγκριση με το μάρτυρα ενώ επίσης,
 - Μείωσε την υπεροξειδωση των λιπιδίων κατά 21,8 και 9,4% στα 25 και 100 μg / ml, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα και την οξειδωση των πρωτεϊνών στα κύτταρα αυτά κατά 26,8 και 29,9% στα 25 και 100 μg / ml, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μάρτυρα.
4. Στη συνέχεια η αξιολόγηση των ενθυλακωμένων εκχυλισμάτων έδειξε ότι τα δείγματα *L. barbarum*, με νερό παρουσίασαν υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση από εκείνα με μείγμα αιθανόλης και νερού αλλά και από αυτά με τη χρήση εξανίου ως διαλύτη. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλετε στις παραμέτρους εκχύλισης και στη χρήση της βελτιστοποιημένης μεθόδου υπερήχων (*Skenderidis et al., 2016*) με βάση το νερό ως διαλύτη. Το δείγμα (με διαλύτη εκχύλισης το νερό και 2% μαλτοδεξτρίνη + 1% SiO₂ ως υλικά νανοενθυλάκωσης) έδειξε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ολικών φαινολικών TPC. Από τη συσχέτιση της TPC με την IC₅₀ της δέσμευσης της ρίζας DPPH• όλων των εκχυλισμάτων παρουσιάστηκε μία ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($R^2 = -0,9325 \text{ TCP} / \text{DPPH} \cdot \text{IC}_{50}$), γεγονός που συμβαδίζει με τα αποτελέσματα.
- Μέσω ανάλυσης των υπερύθρων φασμάτων (FTIR) προσδιορίστηκε ότι η κορυφή στα 1732 cm⁻¹, που χαρακτηρίζει τα καρβοξύλια εμφανίζει μία ισχυρή θετική συσχέτιση με την αντιοξειδωτική δράση των δειγμάτων και επίσης.
 - Το δείγμα με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δύναμη εμφάνισε τη μεγαλύτερη επίδραση στην αναστολή των βακτηρίων *E.Coli*, *S. Aureus*, *L. Monocytogenes* και *C. Perfringens* σε συγκέντρωση 1% , ενώ για τα βακτήρια *C. jejuni* και *S. Typhimurium* απαιτήθηκε συγκέντρωση MIC 5%.
 - Επίσης το ίδιο δείγμα ήταν το μοναδικό που παρουσίασε αντιμυκητιασική δράση έναντι του *F. oxysporum*.

5. Με βάση τα αποτελέσματα των ερευνών σχετικά με τη διεγερτική και πρεβιοτική *in vitro* δράση των ενθυλακωμένων υδατικών εκχυλισμάτων που προέκυψαν από καρπούς Ελληνικών goji berry αποδείχθηκε ότι ένα από αυτά τα ενθυλακωμένα εκχυλίσματα είχε σαφή πρεβιοτική υπεροχή που οφείλονταν όχι στον πολυσακχαρίτη μαλτοδεξτρίνη που χρησιμοποιήθηκε ως μέσο ενθυλάκωσης αλλά στους πολυσακχαρίτες που περιέχει ο καρπός *L. barbarum*. Το συγκεκριμένο δείγμα επέτυχε τις μεγαλύτερες μειώσεις pH στις περισσότερες περιπτώσεις. Η μεγαλύτερη μείωση του pH επετεύχθη στον *L. Acidophilus*. Ενώ το ίδιο δείγμα επέτυχε σημαντικές διαφορές στην επιβίωση των *Bifidobacterium*.

- Ενώ με βάση τα αποτελέσματα επιβίωσης σε συνθήκες προσομοίωσης γαστρικών υγρών το ίδιο δείγμα επέτυχε διαφορά μεταξύ του control (καλλιέργεια βακτηρίου χωρίς δείγμα) 1 log cfu/mL στην επιβίωση *B. lactis* (Bb-12) και 2.32 log cfu/mL στην επιβίωση του *B. longum* 46.
- Ενώ τα αποτελέσματα επιβίωσης σε συνθήκες προσομοίωσης εντερικών υγρών έδειξαν ότι η προσθήκη του ίδιου δείγματος παρουσίασε επίσης σημαντική προστατευτική δράση κατά 0.82 log cfu/mL σε σχέση με αυτή του control στον *B. lactis* (Bb-12) μετά από 3 ώρες παραμονής σε διάλυμα προσομοίωσης εντερικών υγρών ενώ μικρή θετική επίδραση 0.16 log cfu/mL (σε σχέση με αυτή του control) παρουσίασε έναντι του *B. longum* 46.

Φθάνοντας στο τέλος της παρούσας Διδακτορικής διατριβής και συμπερασματικά, με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, τα Θεσσαλικά goji berry μπορεί πράγματι, να είναι πιθανές πηγές φυσικών αντιοξειδωτικών και αντιμικροβιακών παραγόντων ενώ ταυτόχρονα θα διαθέτουν και πρεβιοτικές ιδιότητες. Παράλληλα η αριστοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης με υπερήχους αποτελεί μία ιδανική λύση στη δημιουργία λειτουργικών τροφίμων υψηλής προστιθέμενης αξίας αλλά και επιλεκτικής απομόνωσης βιοδραστικών συστατικών με σκοπό τη χρήση τους στη φαρμακοποιία και τη βιομηχανία τροφίμων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahn M; Park JS;Chae S;Kim S; Moon C; Hyun JW; et al. **2014**. Hepatoprotective effects of Lycium chinense Miller fruit and its constituent betaine in CCl₄-induced hepatic damage in rats. *Acta Histochem*, 116: 1104-1112
- Alakomi, H.L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala and I. M. Helander **2000**. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol*. 66:2001-5.
- Alekseeva, O.V.; Noskov, A.V.; Guseinov, S.S.; Agafonov, A.V. **2015**. The Effect of Silicon Dioxide Concentration on Thermodynamic Properties of Polystyrene Based Composites. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces*, 51, 253-256.
- Alharbi, B. K. Mousa, M. H. Ibrahim H. Z. and El-Ashmawy, I. M. **2017**. Hepatoprotective Effect of Methanolic Extracts of *Prosopis farcta* and *Lycium shawii* Against Carbon Tetrachloride-induced Hepatotoxicity in Rats. *Journal of Biological Sciences*, 17: 35-41.
- Alp, G., Aslim, B., **2010a**. Relationship between the resistance to bile salts and lowpH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium* spp. isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* 16, 101–105.
- Alp, G., Aslim, B., Suludere, Z., Akca, G., **2010b**. The role of hemagglutination and effect of exopolysaccharide production on bifidobacteria adhesion to Caco-2 cells in vitro. *Microbiol. Immunol*. 54, 658–665.
- Amagase, H.; Farnsworth, N.R. **2011**. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Res. Int.* 44: 1702–1717.
- Amagase, H.; Nance, D. M. **2008**. Improvement of Sleep Quality by a Standardized *Lycium barbarum* Fruit Juice Shown in a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Human Clinical Study at 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF in Athens, Greece, August 3–8.

- Amagase, H.; Sun, B.; Nance, D. M. **2009**. Immunomodulatory effects of a standardized *Lycium barbarum* fruit juice in Chinese older healthy human subjects. *Journal of Medicinal Foods*, 12(5), 1159–1165.
- Amagase H; Sun B; Borek C, **2009**. *Lycium barbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. *Nutrition Research*; 29 (1): 19-25.
- Asarat, M., Apostolopoulos, V., Vasiljevic, T., Donkor, O., **2015**. Short-chain fattyacids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells, on in peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66, 755–765.).
- Ballarín SM, Lopez-Matas MA, Abad DS, Pérez-Cinto N, Carnés J. 2011. Anaphylaxis associated with the ingestion of Goji berries (*Lycium barbarum*). *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 21: 567-570.
- Baba A., Najarian A., Shori A., Lit K., Keng G., **2014**. Yogurt Viability of Lactic Acid Bacteria, Antioxidant Activity and In Vitro Inhibition of Angiotensin-I-Converting Enzyme of *Lycium barbarum*. *Arab J Sci Eng* (2014) 39:5355–5362
- Bai, K.; Xu, W.; Zhang, J.; Kou, T.; Niu, Y.; Wan, X.; Zhang, L.; Wang, C.; Tian, W. **2016**. Assessment of Free Radical Scavenging Activity of Dimethylglycine Sodium Salt and Its Role in Providing Protection against Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress in Mice. *PLoS One*. 11(5): e0155393.
- Barnett JA . **2000** . A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast*. 15;16(8):755-71.
- Baynes, J.W.; Marek, H.D. **2005**. *Medical Biochemistry* 2nd. Edition. Elsevier Mosby: pp. 1-555.
- Benchenouf, A.; Grigorakis, S.; Loupassaki, S. **2017**. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Lycium barbarum* (Goji) cultivated in Greece. *Pharmaceutical Biology* 55(1): 596-602.
- Birben, E.; Sahiner, U.M.; Sackesen, C.; Erzurum, S.; Kalayci, O. **2012**. Oxidative

- stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* (1):9-19.
- Blasi, F.; Montesano, D.; Simonetti, M.S.; Cossignani, L. **2016**. A Simple and Rapid Extraction Method to Evaluate the Fatty Acid Composition and Nutritional Value of Goji Berry Lipid. *Food Analytical Methods* 970–979.
- Boukhenouna, S.; Mazon, H.; Branlant, G.; Jacob, C.; Toledano, M.B.; Clermont, S.R. **2015**. Evidence that glutathione and the glutathione system efficiently recycles 1-cys. sulfiredoxin in vivo. *Antioxidants and Redox Signaling* 4; 22(9) 731-743.
- Box, G.E.P.; Behnken, D.W. **1960**. Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455-475.
- Box, G.E.P.; Wilson, K.B. **1951**. On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13, 1–45.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. **1995**. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28: pp. 25–30.
- Braut, James W. **1996**. New Approach to high-precision Fourier transform spectrom. design. *Applied Optics*. 35 (16): 2891–2896.
- Brett, C. T. ; Waldron, K. W. **1996**. *Physiology and Biochemistry of Plant Cell*, London: Chapman & Hall.
- Brewer, T.F.; Garcia, F.J.; Onak, C.S.; Carroll, K.S.; Chang, C.J. **2015**. Chemical Approaches to Discovery and Study of Sources and Targets of Hydrogen Peroxide Redox Signaling Through NADPH Oxidase Proteins. *Ann Rev Biochem.* 2015; 84:765–790.
- Bucheli P, Gao Q, Redgwell R, Vidal K, Wang J, Zhang W. 2011. Biomolecular and clinical aspects of Chinese wolfberry. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press;
- Buettner R. Garry, **2011**. *Superoxide Dismutase in Redox Biology: The roles of*

- superoxide and hydrogen peroxide *Anticancer Agents Med Chem.* 1; 11(4): 341–346.
- Cadenas, E.; Davies, K.J. **2000**. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4):222-30.
- Cadet, J.; Wagner J; R. **2013**. DNA Base Damage by Reactive Oxygen Species, Oxidizing Agents, and UV Radiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5:a012559.
- Calder, P. C. **2006**. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 75: pp. 197-202.
- Cai H; Liu F; Zuo P; Huang G; Song Z; Wang T; Lu H; Guo F; Han C; Sun G. **2015**. Practical Application of Antidiabetic Efficacy of Lycium barbarum Polysaccharide in Patients with Type 2 Diabetes. *Med Chem.*;11(4):383-90.
- Calder, P. C.; Burdge, G.C. **2004**. Fatty acids. In *bioactive lipids*. pp. 1-35.
- Cao, S. ; Du, J. ; Hei, Q.2017. Lycium barbarum polysaccharide protects against neurotoxicity via the Nrf2-HO-1 pathway, *Exp.Ther. Med.* 14 (2017) 4919–4927.
- Carocho, M.; Ferreira, I.C. **2013**. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51: pp. 15-25.
- Ceccarini, M.R.; Vannini, S.; Cataldi, S.; Moretti, M.; Villarini, M.; Fioretti, B.; Albi, E.; Beccari, T.; Codini, M. **2016**. In Vitro Protective Effects of Lycium barbarum Berries Cultivated in Umbria (Italy) on Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Biomed Res Int.* 7529521.
- Chang RC, So KF. **2008**. Use of anti-aging herbal medicine, Lycium barbarum, against aging-associated diseases. What do we know so far *Cell Mol Neurobiol*, 28 (5), pp. 643-652.
- Chang, H. W.; Douglas A. J. **2001**. Structure and Function of the *Escherichia coli* RecE Protein, a Member of the RecB Nuclease Domain Family. *The Journal*

of Biological Chemistry 276, 46004-46010.

Changbo, D.; Zhaojun, S. **2012**. Supplementation of Lycium barbarum polysaccharides protection of skeletal muscle from exercise-induced oxidant stress in mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 6(9), pp. 643-647.

Chao, J. C.; Chiang, S. W.; Wang, C. C.; Tsai, Y. H.; Wu, M. S. **2006**. Hot water-extracted Lycium barbarum and Rehmannia glutinosa inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *World Journal of Gastroenterology*, 12(28), 4478–4448.

Chen Z; Lu J; Srinivasan N; Tan BK; Chan SH **2009**. Polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum L. is a novel stimulus of dendritic cell immunogenicity. *J Immunol*, 182: 3503-3509

Cheng, J ; Zhou, Z.-W.; Sheng, H.-P et al., **2015**. An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 33–78.

Childs, N.M. & Poryzees, G.H. **1997**. 'Foods that help prevent disease: consumer attitudes and public policy implications' *British food journal*, Vol. 9, pp. 419-426

Chowdhury, R.; Warnakula, S.; Kunutsor, S.; Crowe, F.; Ward, H.A.; Johnson, L.; Franco, O.H.; Butterworth A.S.; Forouhi, N.G.; Thompson, S.G.; Khaw, K.T.; Mozaffarian, D.; John, D.; Angelantonio, E. **2014**. Association of Dietary, Circulating, and Supplement Fatty Acids with Coronary Risk: A Systematic Review and Meta-analysis. *Annals of Internal Medicine*. 160(6): pp. 398-406.

Christie, W. W. **2003**. Lipids: their structure and occurrence. In *Lipid Analysis Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*: pp. 3-36.

Chua, S.C.; Tan, C.P.; Mirhosseini, H.; Lai, O.M.; Long, K.; Baharin, B.S. **2009**. Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *J Food Eng.* 92, 403-409.

- Cui B;Liu S; Lin X; Wang J; Li S, et al. **2011**. Effects of *Lycium barbarum* aqueous and ethanol extracts on high-fat-diet induced oxidative stress in rat liver tissue. *Molecules* 16: 9116–9128.
- Chung I.M.; Ali M.; Nagella P;Ahmad A. 2015. New glycosidic constituents from fruits of *Lycium chinense* and their antioxidant activities. *Arabian Journal of Chemistry*: 8(6),pp 803-811
- Cossignani L; Blasi F;Simonetti MS; Montesano D **2017**. Fatty Acids and Phytosterols to Discriminate Geographic Origin of *Lycium barbarum* Berry
- Cooley, J.W.; Tukey, J. W. **1965**. An Algorithm for the Machine Calculation of Complex Fourier Series. *Math. Comp.* 19 297-301.
- Cooper, D.A., Eldridge, A.L.&Peters, J.C. **1999**. Dietary carotenoids and certain cancers, heart disease, and age-related macular degeneration: a review of recent research. *Nutrition Review*, 57, 201–214.
- Crozier, A.; Clifford, N. M.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* **2006** by Blackwell Publishing Ltd.
- Cunnane, S.; Anderson, M. **1997**. Pure linoleate deficiency in the rat: influence on growth, accumulation of n-6 polyunsaturated, and (1-14C) linoleate oxidation. *J. Lipid Res.* 38 (4): pp. 805–812.
- Dalmeijer, G.W., Olthof, M.R., Verhoef, P., Bots, M.L. & van der Schouw, Y.T. **2008**. Prospective study on dietary intakes of folate, betaine, and choline and cardiovascular disease risk in women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 62, 386–394.
- Dahech, I.; Farah, W.; Trigui, M.; Hssouna, A.B.; Belghith, H.; Belghith, K.S.; Abdallah, F.B. **2013**. Antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium shawii* fruits extract. *International Journal of Biological Macromolecules* 60: 328-333.
- Dehghan, M.;Mente, A.; Zhang, X.; Swaminathan, S.; Li, W.; Mohan, V.; Iqbal, R.;

- Kumar, R.; Wentzel-Viljoen, E.; Rosengren, A., Amma, L.; Avezum, A.; Chifamba, J.; Diaz, R.; Khatib, R.; Lear, S.; Lopez-Jaramillo, P.; Liu, X.; Gupta, R.; Mohammadifard, N.; Gao, N.; Oguz, A.; Safura Ramli A.; Seron, P.; Sun, Y.; Szuba, A.; Tsolekile, L.; Wielgosz, A., Yusuf, R.; Yusufali, A.H.; Teo, K. K. Rangarajan, S.; Dagenais, G.; Bangdiwala, S.I.; Islam, S.; Anand, S.S. Yusuf, S. on behalf of the Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study investigators***2017**. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. *The Lancet*, 390(10107), 2050–2062.
- Decker, E.L.; Reski. R. **2008**. Current achievements in the production of complex biopharmaceuticals with moss bioreactors. *Bioprocess Biosyst Eng* (1):3-9.
- De Vrese, M., ; Schrezenmeir, J. **2008**. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 111, 1–66,
- Dew, T., Day A., Morgan, M. **2005**. Xanthine Oxidase Activity in Vitro: Effects of Food Extracts and Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(16): pp. 6510-6515.
- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B. **2006**. Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry* 97:654–660.
- Dong, J.Z.; Wang, Y.; Wang, S.H.; Yin, L.P.; Xu, G.J.; Zheng, C.; Lei, C.; Zhang, M.Z. **2013**. Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and carotenoids of *Lycium chinense* leaves. *J Sci Food Agric*. 93(2):310–315.
- Donno, D.; Beccaro, G.L.; Mellano, M.G.; Cerutti, A.K.; Bounous. G. **2015**. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): Antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. *Journal of Functional Foods* 18:1070–1085.
- Dotan, Y.; Lichtenberg, D.; Pinchuk, I. **2004**. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 43:200–227.
- Duan, C.L.; Qiao, S.Y.; Wang, N.L.; Zhao, Y.M.; Qi, C.H.; Yao, X.S. Studies on active polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Yaoxue Xuebao* 2001, 36, 196–199.

- Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith F. **1956**. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- Dunlop, R.A.; Brunk, U.T.; Rodgers, K.J. **2011**. Proteins containing oxidized amino acids induce apoptosis in human monocytes. *Biochem J.* 1;435(1):207-216
- Du M, Hu X, Kou L, Zhang B, Zhang C. **2016**. Lycium barbarum Polysaccharide Mediated the Antidiabetic and Antinephritic Effects in DietStreptozotocinInduced Diabetic Sprague Dawley Rats via Regulation of NFκB. *BioMed Research International*: 19.
- Ebert, D.; Haller, R.G.; Walton, M.E. **2003**. Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *The Journal of neuroscience.* 23 (13): pp. 5928–5935.
- Elias, R.J.; Kellerby, S.S.; Decker, E.A. **2008**. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48(5):430-441.
- Endes Z, Uslu N, Özcan MM, Er F **2015**. Physico-chemical properties , fatty acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L .) fruit. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 21:36–40
- Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina 1-4 October Διαθέσιμο σε: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C. N., Coconnier-Polter, M.-H., Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. **2005**. pH-, Lactic Acid-, and Non-Lactic Acid-Dependent Activities of Probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008–6013.
- Fellah, A.; Anjukandi, P.; Waterland, M.R.; Williams, M.A.K. **2009**. Determining the degree of methylesterification of pectin by ATR/FT. Methodology optimisation and comparison with theoretical calculations. *Carbohydrate Polymers* 78:847–853.

- Finkel, T.; Holbrook, N.J. **2000**. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. Nov 9; 408(6809):239-247.
- Fit N.I.; Chirila, F.; Nadas G.; Pall E.; Muresan R. **2013**. Comparative testing of antimicrobial activity of aqueous extracts of Aloe vera and Lycium barbarium. *Veterinary Medicine*, 70(1)/2013
- Fukuda, T.; Yokohama, J.; Ohashi, H. **2001**. Phylogeny and biogeography of the genus Lycium (Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol.* 19(2):246-58.
- Gan, L.; Hua, Z. S.; Liang, Y. X.; Bi, X. H. **2004**. Immunomodulation and antitumor activity by a polysaccharide-protein complex from Lycium barbarum *Int Immunopharmacol.* (4):563-569.
- Gazzani, G.; Daglia, M.; Papetti, A. **2012**. Food components with anticaries activity *Current Opinion in Biotechnology*, 23:153–159.
- Gerasopoulos, K.; Stagos, D.; Kokkas, S.; Petrotos, K.; Kantas, D.; Goulas, P.; Kouretas, D. **2015a**. Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens. *Food and chemical toxicology* 82:42–49.
- Gerasopoulos, K.; Stagos, D.; Kokkas, S.; Petrotos, K.; Kantas, D.; Goulas, P.; Kouretas, D. **2015b**. Feed supplemented with polyphenolic byproduct from olive mill wastewater processing improves the redox status in blood and tissues of piglets. *Food and chemical toxicology* 86:319–327.
- Gibson GR, Roberfroid MB. **1995**. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125:1401–12.
- Gmeimer, M Kneifel, W Kulbe KD Wouters R Bover P Nollet. L. **2000**. Influence of a symbiotic mixture consisting of Lactobacillus acidophilus 74-2 and a fructooligosaccharide preparation of the microbial ecology sustained in a stimulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Appl. Microbiol. Biotechnol.*,
- González-Rodríguez I.; Sánchez B.; Ruiz L.; Turróni F.; Ventura M.; Ruas-

- Madiedo P.; et al. . **2012**. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. Appl. Environ. Microbiol. 78, 3992–3998. 10.1128/AEM.08024-11
- Gogate, P. R.; Pandit, A. B. **2004**. Sonochemical reactors: Scale up aspects. Ultr. Sonochem. 11, 105-117.
- Goutzourelas, N.; Stagos, D.; Demertzis, N.; Mavridou, P.; Karterolioti, H.; Georgadakis, S.; Kerasioti, E.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, L.; Statiri, A. **2014**. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. Hum Exp Toxicol 33: 1099-1112.
- Grajek, W.; Olejnik, A. and Sip, A. **2005**. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. Acta Biochimica Polonica 52: 665–671. Greger, J.L. 1999.
- Griffiths, P.; de Hasseth, J. A. **2007**. Fourier Transform Infrared Spectrometry (2nd ed.). Wiley-Blackwell. ISBN 0-471-19404-2.
- Guarner F, Khan AG, Garisch J, et al. **2012**. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. J. Clin Gastroenterol, 46: 468-81.
- Guarner F, Schaafsma GJ. **1998**. Probiotics. Int J Food Microbiol.,39(3):237-8
- Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra DJ. **2007** The lipid handbook. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press;
- Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L., & Huo, G. **2016**. Probiotic properties of Enterococcus strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. Microbial Biotechnology, 9(6), 737–745.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. **1990**. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. Methods in Enzymology 186: pp. 1-85.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J. M.C. **2015**. Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. Oxford University Press.
- Han, J.; Jiang, X.; Zhang, L. **2011**. Optimization of extraction conditions for

- polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- γ mRNA expression in chicken lymphocytes. *Carb. Polymers* 86, 1320–1326.
- Hansen Chr. A/S **2013**. Study summaries BB-12. Chr. Hansen A/S -10-12 Bøge Allé – DK-2970 Hørsholm, Denmark.
- Harborne, J. B.; Dey P. M. **1989**. Plethora of polyphenols Plant Phenolics . Volume 1 in *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press: London. Pp.552.
- Harborne, J.B.; Williams, C.A. **2000**. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.
- He, M. ; Pan, H. ; Chang, C.-C. R. ; So, F. - K. ; Brecha, C. N. ; Pu, M. **2014**. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage, *PLOS ONE*. 9: e84800.
- Higdon, A.; Diers, A.R.; Oh, J.Y.; Landar, A.; Darley-Usmar, V.M. **2012**. Cell signalling by reactive lipid species: new concepts and molecular mechanisms. *Biochem J*. 15; 442(3):453-464.
- Hill C, Guarner f, Reid G, et al. **2014**. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. ;11(8):506-14.
- Ho YS, Yu MS, Yik SY, So KF, Yuen WH, Chang RC. **2009**. Polysaccharides from wolfberry antagonizes glutamate excitotoxicity in rat cortical neurons. *Cell Mol Neurobiol.*,29(8):1233–1244.;
- Ho YS, Yu MS, Yang XF, So KF, Yuen WH, Chang RC. **2010**. Neuroprotective effects of polysaccharides from wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons. *J Alzheimers Dis.*,19(3):813–827.;
- Hsu CH Paul, Nance DM, Amagase H. **2012**. A meta-analysis of clinical

- improvements of general well-being by a standardized *Lycium barbarum*. *J Med Food*. Nov;15(11):1006-14. doi: 10.1089/jmf.2012.0013. Epub 2012 Aug 16.
- Huang, L. J.; Tian, G. Y.; Zheng, G. **1999**. Structure elucidation of glycan of glycoconjugate LbGp3 isolated from the fruit of *Lycium Barbarum*. *Journal of Asian Natural Products Research*,1, 259–267.
- Hulshof, K.F.; Van Erp-Baart, M.A.; Anttolainen, M.; Becker, W.; Church, S.M.; Couet, C.; Hermann-Kunz, E.; Kesteloot, H.; Leth, T.; Martins, I.; Moreiras, O.; Moschandreas, J.; Pizzoferrato, L.; Rimstad A.H.; Thorgeirsdottir, H.; Van Amelsvoort, J.M.; Aro, A.; Kafatos, A.G.; Lanzmann-Petithory, D.; Van Poppel, G. **1999**. Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: the TRANSFAIR Study. *Eur. J. Clin Nutr.* 53(2): pp. 143-57.
- Stephen Inbaraj, B., Lu, H., Hung, C.F., Wu, W.B., Lin, C.L. & Chen, B.H. **2008**. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 812-818.
- Im, A.-R., Kim, Y.-H., Uddin, M. R., Chae, S., Lee, H. W., Kim, Y. S., & Lee, M. Y. **2013**. Neuroprotective Effects of *Lycium chinense* Miller Against Rotenone-Induced Neurotoxicity in PC12 Cells. *The American Journal of Chinese Medicine*, 41(06), 1343–1359.
- Ionica, M. E.; Nour, V.; Trandafir, I.; **2012**. Polyphenols content and antioxidant capacity of goji berry fruits (*Lycium chinense*) as affected by the extraction solvents, *Horticulture, Biology and Environment* 3(2):121-129.
- Jang, H.D.; Chang, K.S.; Huang, Y.S. **2007**. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry* 103:749–756.
- Jian-Hua Xie; Wei Tang; Ming-Liang Jin; Jing-En Li; Ming-Yong Xie **2016**. Recent advances in bioactive polysaccharides from *Lycium barbarum* L., *Zizyphus jujuba* Mill, *Plantago* spp., and *Morus* spp.: Structures and functionalities, *Food Hydrocolloids*, Volume 60, Pages 148-160,

- Jiang Y.D; Cao J; Dong Q.Z; Wang S.R. **2007**. Experimental study of anti-atherosclerosis potency by lycium seed oil and its possible mechanism. *Zhong Yao Cai*. 2007;30:672–7.
- Jing, Z. D. **2012**. Analysis on the main active components of *Lycium barbarum* fruits and related environmental factors. *Journal of Medicinal Plants Research* 6:2276–2283.
- Jutta Cerning **1990**. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria *FEMS Microbiology Reviews*, 7(1-2) : 113–130
- Kafkaletou, M. ,Christopoulos, M.V., Tsantili, E. **2017** Short-term treatments with high CO₂ and low O₂ concentrations on quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L.) during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* Volume 97, Issue 15, December 2017, Pages 5194-5201
- Kafkaletou, M. ,Christopoulos, M.V. Tsaniklidis, G.,Papadakis, I., Ioannou, D., Tzoutzoukou, C., Tsantili, E. **2018** Nutritional value and consumer-perceived quality of fresh goji berries (*Lycium barbarum* L. and *L. chinense* L.) from plants cultivated in Southern Europe(Article). Volume 73, Issue 1, January-February 2018, Pages 5-12
- Kawabata, Y.; Semba, I.; Hirayama, Y. **1998**. Wax D of *Mycobacterium tuberculosis* induced osteomyelitis accompanied by reactive bone formation in Buffalo rats. *FEMS immunology and medical microbiology* 22:293–302.
- Ke, M.; Zhang, X.J.; Han, Z.H.; Yu, H.Y.; Lin, Y.; Zhang, W.G.; Sun, F.H.; Wang, T.J. **2011**. Extraction, purification of *Lycium barbarum* polysaccharides and bioactivity of purified fraction. *Carbohydr. Polym.* 86, 136–141.
- Keles, M.S.; Taysi, S.; Sen, N.; Aksoy, H.; Akcay, F. **2001**. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can. J. Neurol. Sci.* 28, 141–143.
- Keum, Y.S.; Park, K.K.; . Lee, J.M.; Chun, K.S.; Park J.H.; Lee, S.K.; Kwon, H.; Surh, Y.J. **2000**. Antioxidant and anti-tumor promoting activities of the methanol

- extract of heat-processed ginseng., *Cancer Letters*. 150 41–48.
- Kerasiotti, E. ; Kiskini, A. ;Veskoukis, A. ; Jamurtas, A. ; Tsitsimpikou, C. Tsatsakis, A.M. ; Koutedakis, Y. ; Stagos, D. ;Kouretas, D. ; Karathanos, V. **2012**. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans, *Food. Chem. Toxicol.* 50 : 2805–2810.
- Kim, S.Y., Lee, K.H., Chang, K.S., Bock, J.Y. & Jung, M.Y. **1997**. Taste and flavour compounds in boxthron (*Lycium chinense* Miller) leaves. *Food Chemistry*, 58, 297-303.
- Kim, S.Y., Lee, J.E., Kim, P.H., Lee, H.S.&Kim, Y.C. **2000**. LCC, a cerebroside from *Lycium chinense*, protects primary cultured rat hepatocytes exposed to galactoseamine. *Phytotherapy Research*, 14, 448-451.
- Kim N.H; Baek S.H., **2014**. Effects of *Lycium chinense* Miller Fruit and its Constituent Betaine on Immunomodulation in Balb/c Mice. *Korean Journal of Environmental Agriculture*; 33(3): 189-193
- Kimoto-Nira H, Suzuki C., Sasaki K., Kobayashi M., Mizumachi K. **2010** .Survival of a *Lactococcus lactis* strain varies with its carbohydrate preference under in vitro conditions simulated gastrointestinal tract. *Int. J of Food Microbiology* 143 : 226–229
- Kitts, D.D.; Lim, K.T. **2001**. Antitumorigenic and cytotoxic properties of an ethanol extract derived from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS). *J Toxicol Environ Health*. 64:357-371.
- Kocyigit, E.; Sanlier, N. **2017**. A review of composition and health effects of *Lycium barbarum*. *Int J Chin Med*.1 (1):1–9.
- Kocot, A. M., Mruk, M. S., & Olszewska, M. A. (2017). Fluorescent in situ hybridization applied to identify and evaluate physiological activity of *Lactobacillus* SPP. In goji berry juice. *Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology. Quality*, 24(2), 106–119. <http://doi.org/10.15193/zntj/2017/111/189>

- Kondepudi K., Ambalam P., Ingrid Nilsson I., Torkel Wadström T., Ljungh Å. 2012
Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria
and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*. *Anaerobe* 18: 489-497
- N. Kopeloff, N. Blackman, B. McGinn, **1932**. The Incidence of *Lactobacillus*
Acidophilus in Adults, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 50, Issue 5-6
- Kosar, M.; Altintas, A.; Kirimer, N.; Baser, K. H. C. **2003**. Determination of the
free radical scavenging activity of *Lycium* extracts. *Chem. of Nat. Compounds*
39, 6:531-535.
- Kulczyński, B.; Michałowska, A. G. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition
and Health Effects – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **2016**, Vol. 66, No. 2, pp.
67–75.
- Kumar, De. U.; Mukherjee, R.; Nandi, S.; Patel, B.H.; Dimri, U.; Ravishankar, C.;
Verma, A.K. **2015**. Alterations in oxidant/antioxidant balance, high-mobility
group box 1 protein and acute phase response in cross-bred suckling piglets
suffering from rotaviral enteritis. *Trop. Anim. Health Prod.* 46 (7): pp.1127-
1133.
- Landete, J.M. **2013**. Dietary intake of natural antioxidants: vitamins and
polyphenols. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(7):706-21.
- Leontopoulos, S.V.; Giavasis, I.; Petrotos, K.; Kokkora M.; Makridis, C. **2015**.
Effect of different formulations of polyphenolic compounds obtained from
OMWW on the growth of several fungal plant and food borne pathogens.
Studies in vitro and in vivo. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 4:
327-337.
- Li, H. ; Li, Z. ; Peng, L. ; Jiang, N. ; Liu, Q. ; Zhang, E. ; Liang, B. ; Li, R. Zhu, H.
2017. *Lycium barbarum* polysaccharide protects human keratinocytes against
UVB-induced photo-damage, *Free Rad.Res.* 51: 200–210.
- Li, J. W. H.; Vederas, J. C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or
an Endless Frontier? *Science* 325, 161 **2009**; DOI: 10.1126/science.1168243.

- Li, Q.; Yu, N.; Wang, Y.; Sun, Y.; Lu, K.; Guan, W. **2013**. Extraction optimization of *Bruguiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carb. Polymers* 96, 148–155.
- Li, X.; Zhou, A. **2007**. Evaluation of the antioxidant effects of polysaccharides extracted from *Lycium barbarum*. *Med. Chem. Res.*, 15, 471–482.
- Li, XM. **2007**. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol.* 10;40(5):461-465.
- Li, H. ; Li, Z. ; Peng, L. ; Jiang, N. ; Liu, Q. ; Zhang, E. ; Liang, B. ; Li, R. Zhu, H. **2017**. *Lycium barbarum* polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage, *Free Rad.Res.* 51: 200–210.
- Li, Z., Peng, G. & Zhang, S. **1998**. Separation and determination of carotenoids in *Fructus lycii* by isocratic non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 16, 341–343.
- Li, G.; You, J.; Suo, Y.; Song, C.; Sun, Z., et al., **2011**. A developed pre-column derivatization method for the determination of free fatty acids in edible oils by reversed-phase HPLC with fluorescence detection and its application to *Lycium barbarum* seed oil. *Food Chemistry*, 125(4), 1365–1372.
- Liao, M., Wu, Z.Y., Yu, H.G, Wen-Xue Zhang X.W. **2017**. Improving the quality of Sichuan pickle by adding a traditional Chinese medicinal herb *Lycium barbarum* in its fermentation. *International Journal of Food Science and Technology*, 52, 936–943
- Liang, B.; Jin, M.; Liu, H. **2011**. Water-soluble polysaccharide from dried *Lycium barbarum* fruits: Isolation, structural features and antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers* 83:1947–1951.
- Lin, C.; Wang, C.; Chang, S.; Inbaraj, B.S.; Chen, B. **2009**. Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. *International journal of biological macromolecules* 45: 146–151.
- Liu, C.; Liao, J.-Z.; Li, P.-Y. **2017**. Traditional Chinese herbal extracts inducing autophagy as a novel approach in therapy of nonalcoholic fatty liver disease

- (review) *World Journal of Gastroenterology* Open Access Volume 23, Issue 11, 21 March 2017, Pages 1964-1973
- Liu, H.; Fan, Y.; Wang, W.; Liu, N.; Zhang, H.; Zhu, Z.; Liu, A. **2012**. Polysaccharides from *Lycium barbarum* leaves: Isolation, characterization and splenocyte proliferation activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 51, 417–422.
- Liu, Y.; Gong, G.; Zhang, J. **2014**. Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Carbohydrate polymers* 110:278–284.
- Lone AM; Taskén K. **2013**. Proinflammatory and immunoregulatory roles of eicosanoids in T cells. *Front Immunol.*,4;4:130.
- Lorgeril, M.; Renaud, S.; Mamelle, N.; Salen, P.; Martin, J.L.; Monjaud, I.; Guidollet, J.; Touboul, P.; Delaye, J. **1994**. Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. *Lancet.* 1994 Jun 11; 343 (8911): pp. 1454-1459.
- Ludwig, A.I.; Clifford, N. M.; Lean, E. J. M.; Ashiharad, H.; Crozier A. **2014**. Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.* 5: 1695–1717.
- Lunn, J.; Theobald, H. **2006**. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. *Nutrition Bulletin* 31: pp. 178-224.
- Luo, Q.; Cai, Y.; Yan, J.; Sun, M.; Corke, H. **2004**. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sci.* 76(2):137-49.
- Luo, Y.; Cobb, E. R.; Zhao, H. **2014**. Recent Advances in Natural Product Discovery. *Curr. Opin. Biotechnol.* 230–237.
- Luo Q; Li J; Cui X; Yan J; Zhao Q; Xiang C., 2014a. The effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the male rats' reproductive system and spermatogenic cell apoptosis exposed to low-dose ionizing irradiation. *J Ethnopharmacol.*;154(1):249–58.
- Mackowiak, P. A. (2013). Recycling Metchnikoff: Probiotics, the Intestinal Microbiome and the Quest for Long Life. *Frontiers in Public Health*, 1, 52.

<http://doi.org/10.3389/fpubh.2013.00052>).

- Madrau, A. M.; Piscopo, A.; Sanguinetti M. A.; Caro, D. A.; Marco, P.; Romeo V. F. Piga A. **2009**. Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *Eur. Food Research and Tech.* 228:441–448.
- Mahore J, Rohit B., Deshkar S. **2017**. Investigation of Oligosaccharides for Prebiotic Action on Vaginal Lactobacilli .*J Young Pharm*, 9(4): 502-506
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. **2004**. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 79: pp. 727–747.
- Ma, W., Ni, Z., Li, H. & Chen, M. **2008**. Changes of the main carotenoid pigment contents during the drying processes of the different harvest stage fruits of *Lycium barbarum* L. *Agricultural Sciences in China*, 7, 363–369.
- Ma M; Lui G; Yu Z; Chen G; Zhang X. **2009**. Effect of the *Lycium barbarum* polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress of mice fed high-fat diet in vivo. *Food Chem.* ;113:872–7.
- Mao, F.; Xiao, B.; Jiang, Z.; Zhao, J.; Huang, X.; Guo, Z. **2011**. Anticancer effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on colon cancer cells involves G0/G1 phase arrest. *Med. Oncol.* 28: 121-126.
- Marin-Valencia, I.; Good, L.B.; Ma, Q.; Malloy, C.R.; Pascual, J.M. **2013**. Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 33 (2): pp. 175–182.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y. H. **2004**. + -ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* , 93, 109-113.
- Matsumura, Y.; Egami, M.; Satake. C.; Maeda, Y.; Takahashi, T.; Nakamura, A.; Mori T. **2003**. Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions. *Food Chemistry* 83:107–119.
- Mattos, R.; Staples, C. R.; Thatcher, W. W. **2000**. Effects of dietary fatty acids on

- reproduction in ruminants. *Rev. Reprod.* 5: pp. 38-45.
- McCoy, F. W.; Olson H.B. **1986**. Relationship among turbidity, particle counts and bacteriological quality within water distribution lines. *Water Research* 20(8): 1023-1029.
- McFarland, L.V. **2000**. Normal flora: diversity and functions. *Microbial Ecology in Health and Disease* 12, 193–207.
- Medina, M.B. **2011**. Simple and rapid method for the analysis of phenolic compounds in beverages and grains. *J Agric Food Chem.* 59(5):1565-1571.
- Mi XS, Feng Q, Lo AC, Chang RC, Lin B, et al. **2012a**. Protection of retinal ganglion cells and retinal vasculature by *Lycium barbarum* polysaccharides in a mouse model of acute ocular hypertension. *PLoS One* 7: e45469)
- Mi X.S.; Chiu K. , G. Van, J.W. Leung, A.C. Lo, S.K. Chung, R.C. Chang, K. F. So. **2012**. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on the expression of endothelin-1 and its receptors in an ocular hypertension model of rat glaucoma *Neural Regen. Res.*, 7 (9), pp. 645-651
- Mocan, A.; Vlase, L.; Raita, O.; Hanganu, D.; Păltinean, R.; Dezsi, Ș. **2015**. Comparative studies on antioxidant activity and polyphenolic content of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. leaves. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28 1511–1515.
- Mokdad AH; Ford ES; Bowman BA; Dietz WH; Vinicor F; Bales VS; Marks JS. **2003**. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors. *JAMA.* Jan 1;289(1):76-9.
- Mocan. A.; Vlase, L.; Vodnar, D.C. **2014**. Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill leaves. *Molecules* 19:10056–73.
- Ni T.; Wei G.; Yin X.; Liu X.; Liu D. **2013**. Neuroprotective effect of *Lycium barbarum* on retina of Royal College of Surgeons (RCS) rats: a preliminary study. *Folia Neuropathol.*, , 2, 158–163

- Nikolaeva-Glomb, L.; Mukova, L.; Nikolova, N.; Badjakov, I.; Dincheva, I.; Kondakova, V.; Doumanova, L.; Galabov, AS. **2014**. In vitro antiviral activity of a series of wild berry fruit extracts against representatives of Picorna-, Orthomyxo- and Paramyxoviridae. *Nat Prod Commun.* (1):51-54.
- Nishiyama, R. **1963**. Betaine of *Lycium chinense*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-Shi*, 10, 517–519.
- O’Fallon J. V.; Busboom, J.R.; Nelson, M.L.; Gaskins, C.T. **2007**. A direct method for fatty acid methyl ester synthesis: Application to wet meat tissues, oils, and feedstuffs. *Journal of Animal Science* 85:1511–1521.
- Palaria , A.; Johnson-Kanda, I.; O’Sullivan, D.J. **2012**. Effect of a symbiotic yogurt on levels of fecal bifidobacteria, clostridia and enterobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* , 78, 933-940.
- Pan, A.; Sun, Q.; Bernstein, A. M.; Schulze, M. B.; Manson, J.A. E.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C.; Hu, F.B. **2012**. Red Meat Consumption and Mortality: Results from Two Prospective Cohort Studies. *Arch Intern Med.* 172(7): 555–563.
- Patsoukis, N.; Zervoudakis, G.; Panagopoulos, N.T.; Georgiou, C.D.; Angelatou, F.; Matsokis, N.A. **2004**. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357,83–86.
- Pavan, B.; Capuzzo, A.; Forlani, G. **2014**. High glucose-induced barrier impairment of human retinal pigment epithelium is ameliorated by treatment with Goji berry extracts through modulation of cAMP levels *Experimental Eye Research*, 120, pp. 50-54
- Pavli FG, Argyri AA, Papadopoulou OS, Nychas GJE, Chorianopoulos NG, Tassou C.C. **2016**. Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria from Traditional Fermented Dairy and Meat Products: Assessment by In Vitro Tests and Molecular Characterization. *J Prob Health* 4: 157. doi: 10.4172/2329-8901.1000157

- Peng, G.H., Li, Z. & Zhang, S.H. **1998**. Separation and identification of carotenoids in *Fructus lycii* by thin-layer chromatography. *Acta Nutrimenta Sinica*, 20, 76–78.
- Peng, Y., Ma, C., Li, Y., Leung, K.S., Jiang, Z. & Zhao, Z. **2005**. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in *Lycium* fruits (*Fructus lycii*). *Plant Foods for Human Nutrition*, 60, 161–164.
- Peng, X.M.; Wang, Z.F.; Tian G.Y. **2001a**. Physico-chemical properties and activity of glycoconjugate LbGp2 from *Lycium barbarum* L. *Yaoxue Xuebao*.36: 601–602.
- Peng, X.M.; Huang, L.J.; Qi, C.H.; Zhang, Y.X.; Tian, G.Y. **2001b**. Studies on chemistry and immuno- modulating mechanism of a glycoconjugate from *Lycium barbarum* L. *Chin. J. Chem.* 19, 1190–1197.
- Phaneuf, S. ; Leeuwenburgh, C. **2001**. Apoptosis and exercise. *Med. Sci. Sp. Exerc.* 33 : 393–396
- Picó, Y. **2013**. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 43 (2013) 84–99.
- Potterat, O. **2010**. Goji (*Lycium barbarum* and *L . chinense*): Phytochemistry , Pharmacology and Safety in the Perspective of Traditional Uses and Recent Popularity. *Planta Med.* 7–19.
- Priftis, A.; Stagos, D.; Kostantinopoulos, K.; Tsitsimpikou, C.; Spandidos, D.; Tsatsakis, A.M.; Tzatzarakis, M.; Kouretas, D. **2015**. Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. *Molecular medicine reports* 12:7293-7302.
- Prior, R.; Xianli, W.; Schaich, K. **2005**. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 53 (6): pp. 1841-1856.
- Protti, M.; Gualandi, I.; Mandrioli, R.; Zappoli, S.; Tonelli, D.; & Mercolini, L. **2017**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Analytical profiling of selected antioxidants and total antioxidant capacity of goji (*Lycium* spp .)

- berries. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 143, 252–260.
<http://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.048>
- Qian L, Yu S. **2016**. Protective effect of polysaccharides from *Lycium barbarum* on spermatogenesis of mice with impaired reproduction system induced by cyclophosphamide. *Am J Reprod Immunol*. Nov;76(5):383-385
- Qian, D.; Zhao, Y.; Yang, G., & Huang, L. **2017**. Systematic Review of Chemical Constituents in the Genus *Lycium* (Solanaceae). *Molecules* , 8;22(6). pii: E911. doi: 10.3390/molecules22060911.
- Qin, X.; Yamauchi, R.; Aizawa, K.; Inakuma, T.; Kato, K. **2000**. Isolation and Characterization of Arabinogalactan-protein from the Fruit of *Lycium chinense* Mill. *J. Appl. Glycosci*. 47, 155–161.
- Qin, X.; Yamauchi, R.; Aizawa, K.; Inakuma, T.; Kato, K. **2001**. Structural features of arabinogalactan-proteins from the fruit of *Lycium chinense* Mill. *Carbohydr. Res*. 333, 79–85.
- Qin, X.E. **2003**. Isolation and Characteristics of Araban Isolated from the Fruit of *Lycium chinense* Mill. *Food Sci.*, 24, 52–56.
- Rangel-Huerta, O. D.; Aguilera C. M.; Martin, M. V.; Soto, M. J.; Rico, M. C.; Vallejo, F.; Barberan, F. T.; Perez-de-la-Cruz, A. J.; Gil, A.; Mesa, M. D. **2015**. Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults. *American Society for Nutrition*.; doi:10.3945/jn.115.213660. pp. 1808 –1816.
- Rashad, M.M.; Mahmoud, A.E.; Al-Kashef A.S.; Mohamed U.N. **2012**. Purification and Characterization of a Novel Fibrinolytic Enzyme by *Candida guilliermondii* Grown on Sunflower Oil Cake. *Journal of Applied Sciences Research* 8:635–645.
- Ravichandran, K.; Palaniraj, R.; Saw, N. M. M. T.; Gabr, A. M. M. ; Ahmed A. R., Knorr, D., & Smetanska, I. **2014**. Effects of different encapsulation agents and drying process on stability of betalains extract. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 2216–2221.
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C.

- 1999.** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* (9-10): pp.1231-1237.
- Redgwell, R. J.; Curti, D.; Wang, J. ; Dobruchowska, J. M. ; Gerwig, G. J., Kamerling, J. P.; Bucheli, P. **2011.** Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan-proteins. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 1075–1083. <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.12.071>
- Reeve, V.E.; Allanson, M.; Arun, S.J.; Domanski, D.; Painter, N. **2010.** Mice drinking goji berry juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways . *Photochemical and Photobiological Sciences*, 9 (4), pp. 601-607.
- Reid, M.B.; Stokić, D.S.; Koch, S.M.; Khawli, F.A.; Leis, A.A. **1994.** N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans. *J.Clin. Invest.*, 94(6): 2468-2474.
- Ren, L.; Li, J.; Xiao, Y. **2017.** Polysaccharide from *Lycium barbarum* L. leaves enhances absorption of endogenous calcium, and elevates cecal calcium transport protein levels and serum cytokine levels in rats. *Journal of Functional Foods* 33:227–234.
- Rettger LF, Cheplin HA.**1922** *Bacillus Acidophilus* and its therapeutic application. *Arch Intern Med (Chic)*. 1922;29(3):357–367.
- Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. **1996.** Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* ;20(7):933-956.
- Rivera CA; Ferro CL; Bursua AJ; Gerber BS, **2012.** Probable interaction between *Lycium barbarum* (goji) and warfarin. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 32: e50-e53.
- Rivers, J.P.; Sinclair, A.J.; Craford, M.A. **1975.** Inability of the cat to desaturate essential fatty acids. *Nature* 258 (5531): pp. 171–173.
- Robert, S.; Goodhart, M.; Shils, E. **1980.** *Modern Nutrition in Health and Disease* (6th ed.). Philadelphia: Lea and Febinger: pp. 134–138.

- Romdhane, M.; Gourdon, C. **2002**. Investigation in solid–liquid extraction: influence of ultrasound. *Chem Eng J.* 87, 11-19.
- Roos, Y.; Karel, M. **1990**. Differential scanning calorimetry study of phase transitions affecting the quality of dehydrated materials. *Biotechnology Progress*, 6, 159–163.
- Roos, Y.; Karel, M. **1991**. Phase transitions of mixtures of amorphous polysaccharides and sugars. *Biotechnology Progress*, 7, 49–53.
- Rotar, AM; Vodnar, D.C. ; Bunghez, F.; Cătunescu, G.M.;Pop, C.R. ; Jimborean, M., Semeniuc, C.A. **2015**. Effect of Goji Berries and Honey on Lactic Acid Bacteria Viability and Shelf Life Stability of Yoghurt. *Not Bot Horti Agrobo*, 43(1), 196-203.
- Ruiz, L; Margolles, A; Sánchez, B. **2013**. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front Microbiol* 4: 396
- Ruthig, D.J.; Meckling-Gill, K.A. **1999**. Both (n-3) and (n-6) fatty acids stimulate wound healing in the rat intestinal epithelial cell line, IEC-6. *Journal of Nutrition* 129 (10): pp. 1791–1798.
- Sachdev, S.; Davies, K.J. **2008**. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 44(2): 215-223.
- Sagar, V. R.; Kumar P. S. **2010**. Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. *J Food Sci Technol.* 47(1): 15–26.
- Salminen S; von Wright A; Morelli L; Marteau P; Brassart D; de Vos WM; Fondén R; Saxelin M; Collins K; Mogensen G; Birkeland SE; Mattila-Sandholm T. **1998**. Demonstration of safety of probiotics -- a review. *Int J Food Microbiol.*,44(1-2):93-106.
- Salvat, A.; Antonacci, L.; Fortunato, R.H.; Suarez, E.Y.; Godo, H.M. **2004**. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from Northern Argentina. *Phytomedicine* 11: 230-234.
- Schultz, P.; Celia, H.; Riva, M.; Darst, S.; Colin, P.; Kornberg, R.; Sentenac, A.; Oudet, P. **1990**. Structural Study of the Yeast RNA Polymerase A Electron

- Microscopy of Lipid-bound Molecules and Two-dimensional Crystals. *J. Mol. Biol.* 216, 353-362.
- Schweizer, T.F. ; Wursch, P. **1991**. The physiological and nutritional importance of dietary fiber, *Experientia*, 47, 181-186.
- Shan, B.; Cai, Y. Z.; Brooks, J. D.; Corke, H. **2007**. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of food microbiology*, 117(1): 112-119.
- Shan, X.; Zhou, J.; Ma, T.; Chai, Q. **2011**. Lycium barbarum polysaccharides reduce exercise-induced oxidative stress. *International journal of molecular sciences* 12:1081–1088.
- Shanahan. F. **2002**. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fantasy to facts and future. *Br. J. Nutr.*, 88:S5-S9.
- Shi GJ; Zheng J; Wu J; Qiao HQ; Chang Q; Niu Y; Sun T; Li YX; Yu JQ. **2017**. Beneficial effects of Lycium barbarum polysaccharide on spermatogenesis by improving antioxidant activity and inhibiting apoptosis in streptozotocin-induced diabetic male mice. *Food Funct.* Mar 22;8(3):1215-1226.
- Simopoulos, A.P. **2008**. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. Vol. 233 (6): pp. 674-688.
- Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, 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.
- Smith, G.I.; Atherton, P.; Reeds, D.N.; Mohammed, B.S.; Rankin, D.; Rennie, M.J.; Mittendorfer, B. **2011**. Omega-3 polyunsaturated fatty acids augment the muscle protein anabolic response to hyperinsulinaemia-hyperaminoacidaemia in healthy young and middle-aged men and women. *Clinical science London, England*: 1979. 121 (6): pp. 267–278.
- Snodderly, D.M. **1995**. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of*

- Clinical Nutrition, 62, 1448S–1461S.
- Song, M.K.; Roufogalis, B.D.; Huang, T.H.W. **2012**. Reversal of the caspase-dependent apoptotic cytotoxicity pathway by taurine from *Lycium barbarum* (Goji Berry) in human retinal pigment epithelial cells: Potential benefit in diabetic retinopathy Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, art. no. 323784
- Stadtman, E.R. **2006**. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 40(12):1250-8.
- Stanley Thomas **1928**. Döderlein's Bacillus: *Lactobacillus Acidophilus*. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 43, Issue 3, 1 September, Pages 218–227 , <https://doi.org/10.1093/infdis/43.3.218>
- Sun, Y.; Sun, W.; Guo, J.; Hu, X.; Gong, G.; Huang, L.; Cao, H.; Wang, Z. **2015**. Sulphation pattern analysis of chemically sulphated polysaccharide LbGp1 from *Lycium barbarum* by GC-MS. *Food Chem.* 170, 22.
- Tanaka, M.; Chock, P.B.; Stadtman, E.R. **2007**. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(1):66-71.
- Tang L.; Zhang Y.; Jiang Y.; Willard L.; Ortiz E.; Wark L.; Medeiros D.; Lin D. **2011**. Dietary wolfberry ameliorates retinal structure abnormalities in db/db mice at the early stage of diabetes. *Exp. Biol. Med.*, , 236, 1051–1063
- Tang W.M.; Chan E.; Kwok C.Y.; Lee Y.K.; Wu J.H.; Wan C.W.; Chan S.W. **2012**. A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium barbarum* fruit. *Int. Immopharmacol.*, , 20, 307–314.
- Taiz, L. and Zeiger, E. **1998**. *Plant Physiology*. 2nd Edition, Sinauer Associates Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Teli, M.D.; Waghmare, N.G. **2009**. Synthesis of superabsorbent from carbohydrate waste. *Carbohydrate Polymers* 78:492–496.
- Terauchi M, Kanamori H, Nobuso M, et al. **1998**. Antimicrobial components in leaves of *Lycium chinense* Mill. *J Food Hyg Soc Japan* 1998;39:399–405.
- Toyoda-Ono, Y.; Maeda, M.; Nakao, M.; Yoshimura, M.; Sugiura-Tomimori, N.;

- Fukami, H. **2004**. 2-O-(α -D-glucopyranosyl)ascorbic acid, a novel ascorbic acid analogue isolated from Lycium fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2092–2096.
- Trowell, H. **1972**. Ischemic heart disease and dietary fiber, *Am.J. Clin. Nutr.*, 25, 926-932
- Trowell, H.; Southgate, D.A.T.; Wolever, T.M.S. ; Leeds, A.R.; Gassull, M.A.; Jenkins, D.J.A. **1976**. Dietary Fiber Redefined. *Lancet* 1:967.
- Ulbricht, C.; Bryan, JK.; Costa, D.; Culwell, S.; Giese, N.; Isaac, R.; Nummy, K.; Pham, T.; Rapp, C.; Rusie, E.; Weissner, W.; Windsor, RC.; Woods, J.; Zhou, S. **2015**. An Evidence-Based Systematic Review of Goji (*Lycium* spp.) by the Natural Standard Research Collaboration. *J Diet Suppl.* 12(2):184-240.
- Urso, M.L.; Clarkson, P.M. **2003**. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2): 41-54.
- USDA (U.S. Department of Agriculture). National Nutrient Database for Standard Reference. Agricultural Research Service. (2007). Release 20. Nutrient Data Laboratory.
- Valgas, C.; Souza, S. M. D.; Smânia, E. F.; Smânia Jr, A. **2007**. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian journal of microbiology*, 38(2): 369-380.
- Vernazza C.; Gibson G.; Rastall R. **2006**. Carbohydrate preference, acid tolerance and bile tolerance in five strains of *Bifidobacterium* *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02832.x
- Vilkhu, K.; Mawson, R.; Simons, L.; Bates, D. **2008**. Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innov. Food Science & Emerging Techn.* 9, 161-169.
- Vomund, S. ; Schafer, A. ; Parnham, M.J. ; Brune, B. ; Knethen, von A. **2017**. Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses, *Int. J.Mol. Sci.* 18.
- Vidal K; Bucheli P; Gao Q; Moulin J; Shen LS; Wang J; Blum S; Benyacoub J

- 2012.** Immunomodulatory effects of dietary supplementation with a milkbased wolfberry formulation in healthy elderly: a randomized, doubleblind, placebocontrolled trial. *Rejuvenation research*,15 (1): 89-97
- Vinderola, C. **2003.** Lactic acid starter and probiotic bacteria : A comparative “in vitro” study of probiotic charecteristics and biological barrier resistance. *Food Res. Int.* 36, 895-904.
- Wang, C.C. ; Chang, S.C. ; Stephen Inbaraj, B. ; Chen, B.H. **2010.** Isolation of carotenoids, flavonoids and polysaccharides from *Lycium barbarum* L. and evaluation of antioxidant activity. *Food Chemistry*, 120, 184–192.
- Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Li, Z. **2008.** Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules* 42:127–132.
- Wang, Y.; Zhao, H.; Sheng, X.; Gambino, P.E.; Costello, B.; Bojanowski, K. **2002.** Protective effect of *Fructus lycii* polysaccharides against time and hyperthermia-induced damage in cultured seminiferous epithelium. *J Ethnopharmacol.* 82:169–175.
- Wang, Z.; Liu, Y.; Sun, Y.; Mou, Q.; Wang, B.; Zhang, Y.; Huang, L. **2014.** Structural characterization of LbGp1 from the fruits of *Lycium barbarum* L. Volume 159, 15 September 2014, Pages 137-142.
- Waterhouse, A.L. **2001.** Determination of Total Phenolics, in R. E. Wrolstad (ed.), *Current Protocols in Food Analytic Chemistry*, John Wiley & Sons Inc., New York, pp. II.1.1–II.1.8.
- Watt, S.; Hayes. E. **2013.** Monastic medicine: medieval herbalism meets modern science. *Science in School* I Issue 27.
- Wei, L.; Liu, Y.; Rui, Z.; Yu, J.; Lu, W.; Pan, C.; Yao, W.; Gao, X. **2016.**Structure characterization, chemical and enzymatic degradation, and chain conformation of an acidic polysaccharide from *Lycium barbarum* L. *Carbohydr. Polym.* 147, 114–124.
- Weller, P. ; Breithaupt, E. **2003.** Identification and quantification of zeaxanthin

- esters in plants using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7044–7049.
- Wu, D.T.; Lam, S.C.; Cheong, K.L.; Wei, F.; Lin, P.C.; Long, Z.R.; Lv, X.J.; Zhao, J.; Ma, S.C.; Li, S.P. **2016**. Simultaneous determination of molecular weights and contents of water-soluble polysaccharides and their fractions from *Lycium barbarum* collected in China. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 129:210–218.
- Wu, H.; Guo, H.; Zhao, R. **2006**. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on the improvement of antioxidant ability and DNA damage in NIDDM rats. *Yakugaku Zasshi* 126(5):365-371.
- Wu, S.J.; Ng, L.T.; Lin, C.C. **2004**. Antioxidant activities of some common ingredients of traditional Chinese medicine, *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Poria cocos*. *Phytotherapy Research*, 18, 1008–1012.
- Wu H.T.; He X.J.; Hong Y.K; Ma T.; Xu Y.P.; Li H.H. **2010**. Chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of highfat mice. *International journal of biological macromolecules*; 46 (5): 540-543
- Xia, Y.; Kuang, H.; Yang, B.; Wang, Q.; Liang, J.; Sun, Y.; Wang, Y. **2011**. Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity. *Carbohydrate Polymers* 84, 282–291.
- Xia G; Xin N; Liu W; Yao H; Hou Y; Qi J **2014**. Inhibitory effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on cell apoptosis and senescence is potentially mediated by the p53 signaling pathway. *Mol Med Rep*, 9: 1237-1241
- Xiao, J.; Liong, E.C.; Ching, Y.P. **2012**. *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachloride-induced oxidative stress and necroinflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 139:462–470.
- Ye Z; Huang Q; Ni HX; Wang D. **2008**. Cortex *Lycii Radicis* extracts improve insulin resistance and lipid metabolism in obese-diabetic rats. *Phytother Res*.

Dec;22(12):1665-70.

- Xu, Y.; Zhang, L.; Bailina, Y.; Ge, Z.; Ding, T.; Ye, X. **2014**. Effects of ultrasound and or heating on the extraction of peptin from grapefruit peel. *J. of food Eng.* 126, 72-81.
- Yahara, S.; Shigeyama, C.; Nohara, T.; Okuda, H.; Wakamatsu, K.; Yasuhara, T. **1989**. Structures of anti-ace and -renin peptides from lycii radices cortex. *Tetrahedron Letters*, 30, 6041–6042.
- Yamagishi, H.; Yuuki, T.; Kagami, N.; Yokogawa, Y.; Shibata, K.; Minemura, M.; Ohya, Y. **2001**. Appearance of poor-fermenting variants in brewing yeast culture. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(10):2361-2363.
- Yan, Y; Ran, L ;Cao, Y ;Qin, K; et al. **2014**. Nutritional, phytochemical characterization and antioxidant capacity of Ningxia wolfberry (*Lycium barbarum* L.). *J. Chem. Soc. Pak*, 36(6), 1079.
- Yang, P.; Li, D.; Jin, S. **2014**. Stimuli-responsive biodegradable poly (methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials*. 35(6), 2079–2088.
- Yang, D.; So, K.-F.; Lo, A.C.Y. **2017**. *Lycium barbarum* polysaccharide extracts preserve retinal function and attenuate inner retinal neuronal damage in a mouse model of transient retinal ischaemia *Clinical and Experimental Ophthalmology*.45(7),717-729
- Yao, R.a.; Heinrich, M.b ; Weckerle, C.S **2018**. The genus *Lycium* as food and medicine: A botanical, ethnobotanical and historical review *Journal of Ethnopharmacology* Volume 212, 15 February 2018, Pages 50-66
- Yi, R.; Liu, X.M.; Dong, Q.; **2013**. A study of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 10: 171–174.
- Yin, G.; Dang, Y. **2008**. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box-Behnken statistical design. *Carbohydrate*

Polymers 74:603–610.

Ying, Z.; Han, X.; Li, J. **2011**. Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry* 127, 1273-1279.

Yu, B. P. **1994**. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*, 74, 139–162.

Zamora-Ros, R.; Knaze, V.; Luja'n-Barroso L.; Romieu I.; Scalbert, A.; Slimani N.; Hjarðarsson, A.; Engeset, D.; Skeie G.; Overvad, K.; Bredsdorff, L.; Tjønneland A.; Halkjær, J.; Key, J. T.; Khaw, K.-T.; Mulligan, A.; Winkvist A.; Johansson, I.; Bueno-de-Mesquita, H. B.; Peeters, H. M. P.; Wallström, P.; Ericson, U.; Pala, V.; Santucci de Magistris, M.; Polidoro, S.; Tumino, R.; Trichopoulou, A.; Dilis, V.; Katsoulis, M.; Huerta, J. M.; Martínez, V.; Sánchez, M. J.; Ardanaz, E.; Amiano, P.; Teucher, B.; Grote, V.; Bendinelli, B.; Boeing, H.; Förster, J.; Touillaud, M.; Perquier, F.; Fagherazzi G.; Gallo, V.; Riboli, E.; González, C. A. Differences in dietary intakes, food sources and determinants of total flavonoids between Mediterranean and non-Mediterranean countries participating in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **2013**. *British Journal of Nutrition* 109, 1498–1507.

Zhao, R.; Qiu, B.; Li, Q.; Zhang, T.; Zhao, H.; Chen, Z.; Cai, Y.; Ruan, H.; Ge, W.; Zheng, X. **2014**. LBP-4a improves insulin resistance via translocation and activation of GLUT4 in OLETF rats. *Food and Function*, 5, 811-820.

Zhao R, Jin R, Chen Y, Han FM. **2015**. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effects of *Lycium barbarum* Polysaccharide in Diabetic Rats. *Chinese Herbal Medicines*, 7: 310-315.

Zhang, R.; Kang, K.A.; Piao, M.J.; Kim, K.C.; Kim, A.D.; Chae, S.; Park, J.S.; Youn, Y.J.; Hyun, J.W. **2010**. Cytoprotective effects of the fruits of *Lycium chinense* Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 299–306.

Zhang XR, Qi CH, Cheng JP, et al. **2014**. *Lycium barbarum* polysaccharide LBPF4-OL may be a new Toll-like receptor 4/MD2-MAPK signaling pathway activator

- and inducer. *Int Immunopharmacol.*;19(1):132–141.
- Zhang, X.; Yang, X.; Lin, Y.; Suo, M. ;Gong, L. ;Chen, J.;Hui, R. **2015**. Anti-hypertensive effect of *Lycium barbarum* L. with down-regulated expression of renal endothelial lncRNA sONE in a rat model of salt-sensitive hypertension. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6981–6987.
- Zhang, Q.; Chen, W.; Zhao, J.; Xi W. **2016**. Functional constituents and antioxidant activities of eight Chinese native goji genotypes *Food Chemistry* 200 (2016) 230–236
- Zhang, M.; Chen, H.; Huang, J.; Li, Z.; Zhu, C.; Zhang, S. **2005**. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci.* 76, 2115–2124.
- Zhao, H.; Alexeev, A.; Chang, E.; Greenburg, G.; Bojanowski, K. **2005**. *Lycium barbarum* glycoconjugates: effect on human skin and cultured dermal fibroblasts. *Phytomedicine*.12(1-2),131-137.
- Zhao, C.J.; He, Y.Q.; Li, R.Z. **1996**. Chemistry and Pharmacological Activity of peptidoglycan from *Lycium barbarum*l. *Chin. Chem. Lett.*, 7, 1009–1010.
- Zhao, C.; Li R.; He, Y. ; Guohui, C. **1997**. Studies on the chemistry of Gouqi polysaccharides. *J. Beijing Med. Univ.*, 29, 231–232
- Zhao, L. ; Wu, H. ; Zhao, A. ; Lu, H. ; Sun, W. ; Ma, C. ;Yang, Y. ; Xin, X. ; Zou, H. ; Qiu, M. ; Jia, W. **2014**. The in vivo and in vitro study of polysaccharides from a two-herb formula on ulcerative colitis and potential mechanism of action. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(1), 151–159.
- Zhao, R.; Gao, X.; Zhang, T.; Li, X. **2016**. Effects of *Lycium barbarum*. Polysaccharide on type 2 diabetes mellitus rats by regulating biological rhythms. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(9), 1025–1030.

- Zheng, G.Q.; Zheng, Z. Y.; Xu, X.; Hai, H.Z. **2010**. Variation in fruit sugar composition of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. of different regions and varieties. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38, 3: 275-284.
- Zhong, K.; Wang, Q. **2010**. Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers* 80, 19–25.
- Zhou, C.; Ma, H. **2006**. Ultrasonic degradation of polysaccharides from a red algae (*Porphyra yezoensis*). *J. of Agr. and Food Chem.* 54 , 2223-2225.
- Zhou, Z.Q.; Fan, H.X.; He, R.R. **2016**. Lycibarbarspermidines A-O, New Dicaffeoylspermidine Derivatives from Wolfberry, with Activities against Alzheimer's Disease and Oxidation. *Journal of agricultural and food chemistry* 64:2223–2237.
- Zhou, Z. Q.; Xiao, J.; Fan, H. X.; Yu, Y.; He, R. R.; Feng, X. L.;Kurihara H.; So K.F.; Yao X.S.; Gao H., **2017**. Polyphenols from wolfberry and their bioactivities. *Food Chemistry*, 214, 644–654.
- Zhu C.P.; Zhang S.H., **2013**. *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits the proliferation of HeLa cells by inducing apoptosis. *J. Sci. Food. Agric.*, 93, 149–156
- Zhu, J.; Liu, W.; Yu, J.; Zou, S.; Wang, J.; Yao, W.; Gao, X. **2013**. Characterization and hypoglycemic effect of a polysaccharide extracted from the fruit of *Lycium barbarum*. *Carbohydr Polym.* 98(1):8-16.
- Zou, S.; Zhang, X.; Yao, W.; Niu, Y.; Gao, X. **2010**. Structure characterization and hypoglycemic activity of a polysaccharide isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. *Carbohydr. Polym.* 80, 1161–1167.
- Γιαβάσης Ι. **2012**. Σημειώσεις εργαστηριακών ασκήσεων μικροβιολογίας τροφίμων, Καρδίτσα, σελ. 11.
- Μπόσκος, Δ. **1997**. Λίπη Έλαια και άλλα Λιπίδια: Χημεία Τροφίμων, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη σελ.125-129, 136-143, 144-146.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/311665160>

Optimization of ultrasound assisted extraction of of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity

Article in *Journal of Food Process Engineering* · December 2016

DOI: 10.1111/jfpe.12522

CITATIONS

0

READS

25

5 authors, including:



Prodromos Skenderidis

University of Thessaly

1 PUBLICATION 0 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Ioannis Giavasis

Technological Educational Institute of Thessaly

27 PUBLICATIONS 255 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Christos Hadjichristodoulou

University of Thessaly

202 PUBLICATIONS 1,940 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Andreas Tsakalof

University of Thessaly

93 PUBLICATIONS 1,094 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Vitamin D in health and disease [View project](#)

All content following this page was uploaded by [Ioannis Giavasis](#) on 17 December 2016.

The user has requested enhancement of the downloaded file. All in-text references [underlined in blue](#) are added to the original document and are linked to publications on ResearchGate, letting you access and read them immediately.

Optimization of ultrasound assisted extraction of of goji berry (*Lycium barbarum*) fruits and evaluation of extracts' bioactivity

Prodromos Skenderidis^{1,3} | Kostantinos Petrotos¹ | Ioannis Giavasis² |
Christos Hadjichristodoulou³ | Andreas Tsakalof³

¹Department of Biosystems Engineering, Technological Educational Institute of Thessaly, Ring Road of Larisa-Trikala, Larisa 41110, Greece

²Department of Food Technology, end of N. Temponera Street, Technological Educational Institute of Thessaly, Karditsa 43100, Greece

³Department of Medicine, Lab of Hygiene and Epidemiology, University of Thessaly, Papakyriazi 22, Larisa 41222, Greece

Correspondence

Prodromos Skenderidis, Department of Biosystems Engineering, Technological Educational Institute of Thessaly, Ring Road of Larisa-Trikala, Larisa 41110, Greece.
Email: pskenderidis@med.uth.gr or pskenderidis@teilar.gr

Abstract

Popularity of goji berry fruit extracts as functional ingredients is growing rapidly. "Green" aqueous extraction technologies are preferable to organic solvent-based processes as they improve the bioactivity and added value of these extracts. This work aimed at optimizing the ultrasound assisted aqueous extraction (UAE) of *Lycium barbarum* for both locally produced and imported fruits and comparing the bioactivity in relation to extraction conditions and origin of fruits, using a response surface model. The optimal solvent/extracted material ratio, extraction temperature, ultrasonic power, and extraction time were determined to achieve the following optimal quality/bioactivity indices: total solids, carbohydrates, phenolics, and antioxidant capacity based on IC-50 values of the DPPH method. Fruits of different origin had mostly similar optimal extraction conditions and antioxidant capacity but differed significantly in carbohydrate content, which was higher for locally produced fruits (1.1 ± 0.17 g/L extract) compared to imported ones (0.89 ± 0.19 g/L extract).

Practical applications

In this study, the UAE process for goji berry extracts was successfully optimized using response surface methodology, and the most preferable conditions for optimal extraction performance and optimal bioactivity were determined. With regard to extraction yield, the optimal water/raw material ratio (33.9%), extraction temperature (32.02°C), ultrasonic power (30.95 w/cm²), and extraction time (32.03 min) were determined. Under optimal extraction conditions, locally produced fruits had no significant difference in extraction yield, and antioxidant capacity (IC50 values) compared to imported ones. However, locally produced fruits had significantly higher carbohydrate content and somewhat lower polyphenol content under optimal UAE conditions, showing that fruit origin may affect the composition of fruit extracts. These findings are a useful tool for producers of goji berry extracts to achieve an effective and economically viable extraction process as well as optimal composition and bioactivity in terms of antioxidant capacity, which are indeed important traits of these fruit extracts.

KEYWORDS

Goji berry, ultrasound extraction, bioactivity, Box-Behnken design, functional foods

1 | INTRODUCTION

Goji berry is a relatively new name given to *Lycium barbarum* and *Lycium chinense*, two similar species with a long traditional use as medicinal (in Traditional Chinese Medicine-TMC) and food plant in China. Goji berries were used in traditional Chinese medicine as a tonic,

enhancing health of liver and kidney, moistening lung and increasing longevity of foodstuff (Bagchi, 2014; Liu & Tseng, 2005). Contemporary studies support the TCM, indicating that the extracts from *L. barbarum* possess also a range of biologic activities such as anti-aging effects (Ho, So, & Chang, 2010), antioxidant properties (Weihua et al., 2013) increased metabolism (Amagase & Nance, 2009), antidiabetic

properties (Qiong, Yizhong, Jun, Mei, & Harold, 2004), anti-carcinogenic properties (Miao et al., 2010; Xiao et al., 2012), antiproliferative effect on cells (Shen & Guang, 2012), and immunomodulatory activity (Su et al., 2014; Changbo & Zhaoju, 2012).

Investigations on the fruit content have been performed mostly with *L. barbarum*, while conversely, studies for *L. chinense* focus on the roots and the leaves of the plant. Polysaccharides of the red fruits are considered to be the most important group of bioactive substances in the fruit and are the most investigated (Amagase & Farnsworth, 2011). Flavonoids and phenolic acids are another important class of compounds contained in goji berries, while carotenoids are a major group of metabolites that give the bright red color to the fruit (Amagase & Farnsworth, 2011; Ma, Ni, Li, & Chen, 2008). The fruits also contain vitamins as riboflavin, thiamin, and ascorbic acid and 18 kinds of amino acids, essential oils and fatty acids as hexadecanoic acid, linoleic acid and 21 trace elements (Cui, Xing, Liu, & Wang, 1996).

Hot water extraction (HWE) is a common method for extraction of *L. barbarum* polysaccharides and other water-soluble constituents from Goji berries in industrial scale. However, HWE is rather time-consuming, energy-intensive and relatively inefficient in large-scale production (Li, Wang, & Li, 2014).

Aqueous ultrasound assisted extraction (UAE) is an advanced green extraction technique for the production of high quality bioactive extracts from natural materials. UAE process has been proposed as an ideal alternative extraction technique for obtaining extracts of high bioactivity from natural products. UAE is a fast extraction process and conversely preserves structural and molecular properties of the contained bio-actives in the natural extraction substrate. At the same time UAE can enable extraction of polysaccharides and functional compounds at lower temperatures (Chea et al., 2009; Romdhane & Gourdon, 2002). Among the currently used extraction methods which include HWE, and microwave assisted extraction (MAE) (Valdes, Vidal, Beltran, Canals, & Garrigos, 2015), the UAE was been selected because of the lower energy and solvent consumption and higher efficiency (Vilkhu, Mawson, Simons, & Bates, 2008). This method has been already applied for natural materials extraction, such as fruits of *Litchi chinensis* Sonn (Chen, Luo, Gao, & Zhu, 2011) and *Trametes robinio-philis* (Wang, Wang, & Quan, 2014). Moreover, an UAE with a combination of a column elution fractionation and supercritical anti-solvent has been applied for the re-crystallization for purifying and preparing micro-sized particles containing the carotenoid zeaxanthin dipalmitate from the *L. barbarum* fruits (Chang et al., 2012). Also UAE has been used for the extraction of flavonoids from *L. barbarum* (Dong et al., 2012).

Just recently, many researchers conducted experimental work to establish a novel application of UAE of goji berry polysaccharides using enzymes (Liu et al., 2014) or alternatively other scientific groups experimented with subcritical water extraction of *L. barbarum* Polysaccharides (Yang et al., 2015). Both of the above mentioned studies showed a significantly increased extraction yield of LBPs in the case of UAE. A combination of a MAE and the ultrasound reflux extraction with the

use of organic solvent was also performed for polyphenols extraction from the leaves of *L. barbarum* (Dong et al., 2011).

To study and optimize the above mentioned novel extraction methods Response Surface Methodology is used which is a powerful mathematical and statistical technique that explores the relationships and interactions among multiple variables involved in the extraction process by reducing the number of the required experimental points. Until now, RSM has been frequently successfully applied in the optimization of conditions in food and pharmaceutical research (Yin & Dang, 2008; Chen et al., 2011; Chang et al., 2012; Muralidhar, Chirumamila, Marchant, & Nigam, 2001; Wang et al., 2014; Wang, Liu, & Hu, 2014; Yong et al., 2014; Yang et al., 2015).

The aim of the present work is the optimization of the UAE of *L. barbarum* goji berries in both cases of imported and Greek originating fruits and, additionally, the comparison of their bioactivity indices to investigate the potential positive or negative effect of the Greek micro-climate on the quality of a traditional imported fruit.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Goji berry fruits

Imported sun-dried goji berry fruits produced at Ningxia region in China were purchased from a Greek importer and they were certified to be of *L. barbarum* variety. Furthermore, Greek goji berry fruits of the same variety were collected at the same stage of ripeness based on color, size and collection time (5 weeks after blossom) from a 2-year-old experimental plantation, located in the region of Thessaly near to the city of Larissa and subsequently they were sun-dried. The moisture content of all samples was measured by drying to constant weight at 105°C using the AOAC approved official method. Both kinds of samples were then stored in refrigeration temperature (0–4°C) for further analysis. The moisture of all samples was $12.7\% \pm 0.4\%$ and this deviation ($\pm 0.4\%$) from the mean value (12.7%) was taken into account in the measurements of total carbohydrate, total solids and total polyphenol content of the fruits.

2.2 | Chemicals

Phenol (PubChem CID:996); Sulfuric acid 98% (PubChem CID:1118); D-glucose (PubChem CID:5793); Folin Ciocalteu 2N, Sodium carbonate in anhydrous crystal form (PubChem CID:10340); Gallic acid (PubChem CID:370); Ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (PubChem CID:74358); methanol (PubChem CID:887); were purchased from Sigma Aldrich. All the above mentioned chemical reagents were of analytical grade.

2.3 | Extraction process

The dry fruits were pulverized into powder using liquid nitrogen and a mortar. From each sample 2.5 g were extracted with distilled water (using 50, 75, or 100 ml of water, depending on the dilution ratio used

in each of the selected experimental conditions) in a 250 ml glass beaker. The samples were preheated to the selected experimental temperature (45, 55, and 65°C) and when this temperature was achieved, the samples were introduced to the Ultrasound extraction device (Hielscher UP400 S) which included a water bathroom for temperature regulation. The ultrasound power set at 138, 253, and 368 W/cm² while the extraction time was set at 20, 30, and 40 min respectively according to experimental design. The range of the extraction parameters: ratio of water to dry goji berry, extraction temperature, extraction time, and ultrasound power identified by conducting preliminary single factor experiments with local origin goji berries in which the target of the extraction was set to be the dependence of extraction yield on each one of the extraction parameter following the methodology described by Wang et al. (2014).

The obtained extracts were centrifuged at 12,000 rpm for 15 min and the supernatant was collected and was kept in a freezer at -20°C until further analysis.

2.4 | Determination of total carbohydrate content of the extracts

Phenol/sulfuric method according to Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, and Smith (1956), was used for the determination of total carbohydrates. The analysis result was expressed as g of carbohydrates/L of extract.

2.5 | Determination of % total solid content of the extracts

The % solids in the extract was determined using the AOAC approved official method by weighting 3 ml from each extract before and after drying at 105°C for 24 hr. An analytical balance (KERN ALS 220-4N, Germany) was used for all weightings.

2.6 | Calculation of % extraction yield

The % extraction yield (Y) of each experiment was calculated using the following formula:

$$Y(\%, w/w) = \left[\frac{\text{dry solid content in 3 ml extract (g)}}{\left(\frac{\text{(ml) of distilled water used in each extraction}}{3(\text{ml})} \right)} \right] \times \frac{100}{2.5(\text{g})}$$

The formula was based on the fact that for the calculation of the % extraction yield we used 3 ml of each extract, which was received from 2.5 g of each dry sample with variable volumes of distilled water (50, 75, or 100 ml water).

2.7 | Determination of total polyphenol content of the extracts

A slightly modified version of the method given by Singleton, Orthofer, and Lamuela-Raventos (1999) and Waterhouse (2001) was used to determine the total polyphenol content expressed as

gallic acid. The results were expressed as g Gallic Acid Equivalent/L extract.

2.8 | Determination of total antioxidant capacity of the extracts (DPPH method)

The DPPH[•] (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay (Brand-Williams et al., 1995; Kosar et al., 2003) was utilized for the determination of Total Antioxidant Capacity of the extracts. According to the above mentioned assay, the effective concentration IC₅₀ of goji berry extracts was determined and correlated to their overall antioxidant power to allow direct comparison of antioxidant capacity of the various extracts.

2.9 | Box-Behnken design experiment

Box-Behnken statistical design (BBD) was chosen to select the experimental points network to be used for the extraction experiments. This statistical procedure is a spherical and revolving design, and has been widely used in optimization of extraction processes due to its proven effectiveness in assisting to build sound prediction equations (Box & Behnken, 1960; Box & Wilson, 1951; Han, Jiang, & Zhang, 2011; Li et al., 2013; Wang et al., 2014; Xia et al., 2011).

For the BBD experiment four independent variables were selected which were: the ratio of water solvent to dry goji berries (C₁ = 20–30–40 ml/g), the extraction temperature (C₂ = 45–55–65°C), the ultrasound power (C₃ = 138–253–368 W/cm²), and the extraction time (C₄ = 20–30–40 min). The range of these extraction parameters identified as referred previews by conducting preliminary single factor experiments following the methodology described by Wang et al. (2014).

The MiniTab 17 statistic software was consequently used for the formation of the final network of 27 set points which were used for the 27 extraction experiments to obtain 27 extracts from the imported and 27 extracts from the Greek goji berries. Experiments were randomized to maximize the effects of unexplained variability in the observed responses due to variables. Each variable was first coded in three levels -1(low), 0(intermediate), +1(high), and the total of 27 experiments obtained by MiniTab software are shown in the five columns of Table 1.

2.10 | Analysis of variance statistical analysis and estimation of predicted models equations

The analysis of variance (ANOVA) statistical analysis and multiple regression analysis of the experimental data were performed by Design-Expert version 7 software and by following a surface response methodology. Eight respective surface response equations were derived by the ANOVA analysis, correlating the measured performance and bioactive parameters with the four independent extraction variables, for both Greek (Thessaly) fruits and imported fruits. The same software was also used for predicting the optimized values of total

TABLE 1 Response surfaces central design by Minitab 17 software for the four extraction parameters (variables) used in this experiment which were the Ratio of water solvent to dry goji berries, Extraction temperature, Ultrasound power, and Extraction time (C1, C2, C3, C4, respectively)

Minitab Box-Behnken Design	Run	C1	C2	C3	C4
Factors: 4 Replicates: 1	1	0	0	0	0
Total runs: 27 Base runs: 27	2	0	0	-1	1
Base blocks: 1	3	1	1	0	0
Total blocks: 1	4	0	-1	-1	0
Center points: 3 Design Table (randomized)	5	-1	0	1	0
	6	-1	0	0	1
	7	0	0	1	-1
	8	0	0	0	0
	9	1	0	-1	0
	10	0	1	-1	0
	11	0	1	0	-1
	12	0	-1	0	1
	13	1	-1	0	0
	14	1	0	0	-1
	15	0	0	0	0
	16	-1	0	-1	0
	17	-1	0	0	-1
Range of independent variables	18	0	-1	0	-1
C1= Ratio of water solvent to dry goji berries	19	0	1	0	1
C2=Extraction temperature	20	0	-1	1	0
C3= Ultrasound power	21	0	1	1	0
C4= Extraction time	22	-1	-1	0	0
-1	23	1	0	0	1
0					
1					
C1 20 ml/g 30 ml/g 40 ml/g	24	0	0	-1	-1
C2 45°C 55°C 65°C	25	-1	1	0	0
C3 138 W/cm ² 253 W/cm ² 368 W/cm ²	26	1	0	1	0
C4 20 min 30min 40min	27	0	0	1	1

polyphenol content, total carbohydrate content, extract yield, and IC50 of DPPH for both imported and Greek fruits.

2.11 | Statistical comparison of the mean values of the bioactivity indices and extraction yield between chinese and greek fruits

The *T*-test and also the *U*-test (Mann-Whitney) were used for the comparison between the mean values of imported and Greek fruits. MiniTab 17 software was used as the tool to perform both the above mentioned tests.

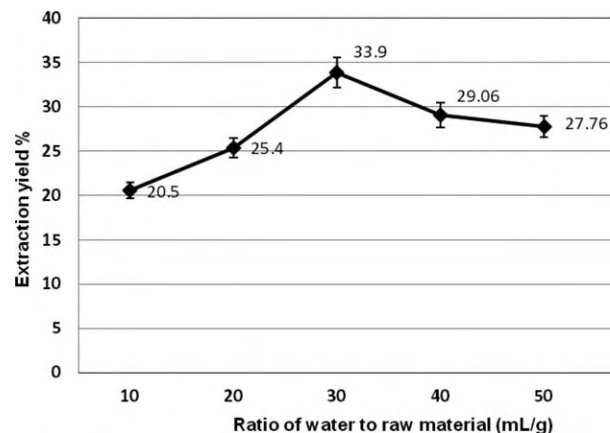


FIGURE 1 Effect of ratio of water to raw material on extraction yield of goji berry (single factor preliminary experiment performed with local fruits)

3 | RESULTS AND DISCUSSION

3.1 | Preliminary experiments for evaluating the range of extraction variables

The determination of the appropriate range of the independent extraction variables was done by conducting preliminary single factor experiments in which the target was set to be the dependence of extraction yield on each one of the extraction parameter following the methodology described by Wang et al. (2014). Thus, using Greek fruit samples of the Thessaly region at the same stage of ripeness (based on color, size, and collection time), a series of single factor experiments were performed where only one extraction parameter changed while the other three took their central values to find out an appropriate range of dependence for each parameter using as a tool the effect on the extraction yield. Taking into consideration the results which were obtained by the preliminary experiments the range of each parameter

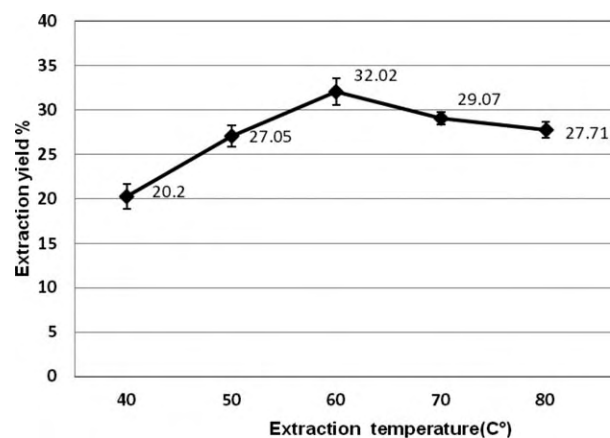


FIGURE 2 Effect of extraction temperature on extraction yield of goji berry (single factor preliminary experiment performed with local fruits)

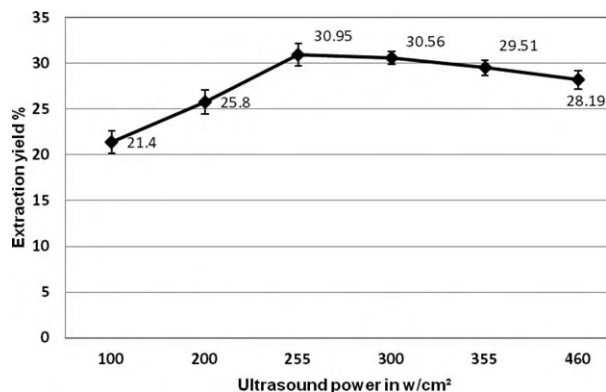


FIGURE 3 Effect of ultrasonic power on extraction yield of goji berry (single factor preliminary experiment performed with local fruits)

was determined and the results of this single factor experiments are presented in Figures 1–4.

3.1.1 | Effect of ratio of water to raw material on extraction yield

The ratio of water to raw material is a significant parameter that affects the extracted yield according to Wang et al. (2014). In the present study, extractions were performed in different ratios of water to dry sample (10, 20, 30, 40, 50 ml/g). The other parameters were set at their central values, which were: temperature 55°C, ultrasonic power 253 w/cm², and extraction time 30 min.

As shown in Figure 1 the extraction yield is increased with the increase of ratio of water to raw material from a ratio of 10 up to 30 ml/g, reaching a maximum amount of $33.90 \pm 1.7\%$ ($n = 3$) at a ratio of 30 ml/g (water/raw material). Above the ratio of 30 ml/g the extraction yield was decreased. According to Xu et al. (2014), this phenomenon can be explained by the fact that the higher the ratio of water to raw material, the lower the concentration and viscosity of the extraction solvent would be. Hence, more polysaccha-

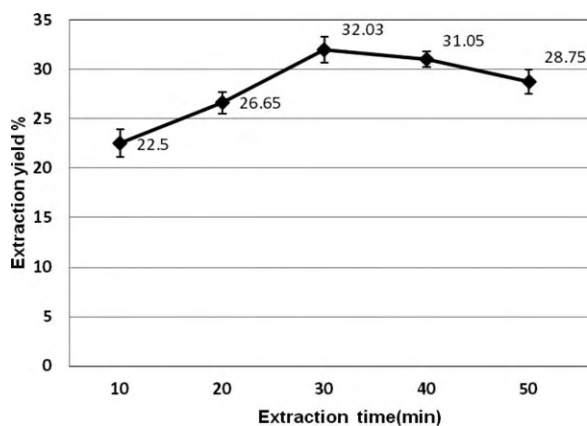


FIGURE 4 Effect of extraction time on extraction yield of goji berry (single factor preliminary experiment performed with local fruits)

rides molecules could dissolve in water and the extraction yield could increase. But the intensity of cavitation drops with an increase in the viscosity of the medium, as the formation of cavitation requires the negative pressure in the rarefaction region of wave function to overcome the natural cohesive forces. This leads to the decrease of the intensity of the cavitation phenomenon, which is essential for efficient extraction (Gogate & Pandit, 2004; Xu et al., 2014). Cavitation is the phenomenon of the appearance of microscopic gas bubbles that are generally present in a liquid that has been forced to be oscillated due to an applied acoustic field. Cavitation serves as means to concentrate in a very short time in a region that diffused fluid energy to create a zone of intense energy dissipation. Thus, the intensive cavitation effect to a dynamic mass transfer, enhances extraction and accelerate mass transfer of targeted compounds from a sample solid matrix to the solvent (Vilkhu et al., 2008). Therefore, after the preliminary tests, the range of 20–40 mL/g regarding the ratio of water to raw material was selected in this study.

3.1.2 | Effect of extraction temperature on extraction yield

Extraction temperature is an important parameter that affects the extraction yield. A range of different temperatures (40, 50, 60, 70, 80°C) was used in preliminary experiments to determine the final experimental range. In these preliminary experiments, the other extraction variables were set at their central values as follows: ratio of water to raw material 30:1 ml/g, ultrasonic power 253 w/cm² and extraction time 30 min (Figure 2).

As shown in Figure 2 the optimum temperature was 60°C reaching a maximum yield of $32.02 \pm 1.5\%$ ($n = 3$).

With the increase of UAE temperature the polysaccharides and the other molecules diffusion increase in the water solvent. Increasing the temperature over the 60°C leads to a decrease of the extraction yield. Furthermore, the aim to have high content of phenolic extracts with high antioxidant activity is facilitated by the use of lower temperatures due to the detrimental effect on phenolic compounds at temperatures higher than 55°C (Madrau et al., 2009). As the aim is to gain not only high polysaccharide content but also polyphenol content, as well as high antioxidant activity, the temperature of 55°C was adopted as the center of temperature range (45, 55, and 65°C were used in different experiments).

3.1.3 | Effect of ultrasonic power on extraction yield

In this experiment water/dry goji berry ratio, extraction temperature and extraction time were set at their central values: water to raw material ratio 30:1 ml/g, temperature 55°C, and extraction time 30 min. The experimental results showed that when the intensity of ultrasound increased, the amount of the extracted solids was increased until the power reached 255W/cm² where the extraction yield (%) approached the value of $30.95\% \pm 1.2\%$ ($n = 3$), as shown in Figure 3.

TABLE 2 Response surfaces central design and results for each response

Run	Independent variables				Total carbohydrates content (g/L extracts)		Extraction yield (%)		Total phenols content in Gallic acid equivalent (mg) per L extract (mgGAE/L extract)		IC 50 of DPPH radical scavenging (mg/ml)	
	C1	C2	C3	C4	C9 THESSALY	C10 CHINESE	C11 THESSALY	C12 CHINESE	C13 THESSALY	C14 CHINESE	C15 THESSALY	C16 CHINESE
1	30	55	253	30	0,990	1,306	28,043	28,087	268,025	294,813	2,300	1,800
2	30	55	138	40	0,870	0,749	24,800	25,600	203,286	234,740	2,200	1,800
3	40	65	253	30	1,070	1,170	25,067	21,333	248,524	265,050	2,200	2,270
4	30	45	138	30	1,110	0,691	25,230	24,210	157,571	218,002	2,400	2,350
5	20	55	368	30	0,990	0,731	26,533	21,600	262,810	317,526	1,200	2,700
6	20	55	253	40	0,850	0,820	25,050	27,200	254,238	297,621	3,000	3,900
7	30	55	368	20	1,050	0,698	25,400	25,200	250,905	294,813	1,500	1,270
8	30	55	253	30	1,010	1,302	28,600	27,600	268,048	306,669	2,300	1,800
9	40	55	138	30	0,860	0,592	23,133	26,667	254,714	273,645	2,400	2,200
10	30	65	138	30	0,810	0,724	20,800	25,200	235,190	287,669	1,600	1,300
11	30	65	253	20	1,190	0,952	30,200	30,000	277,095	306,217	1,500	1,480
12	30	45	253	40	1,040	0,949	22,600	23,600	281,857	312,098	2,800	2,150
13	40	45	253	30	1,260	0,914	23,933	19,733	159,000	175,479	2,400	1,630
14	40	55	253	20	1,240	0,824	25,067	22,933	153,762	218,002	1,000	1,050
15	30	55	253	30	0,990	1,302	28,600	28,200	268,524	294,907	2,300	1,770
16	20	55	138	30	0,930	1,000	22,933	29,333	406,619	470,883	2,700	1,890
17	20	55	253	20	1,060	0,666	27,130	25,733	395,190	443,288	2,600	2,150
18	30	45	253	20	1,150	0,881	22,600	22,400	206,619	248,764	2,600	2,100
19	30	65	253	40	1,060	0,992	31,200	32,000	248,048	297,621	1,600	1,650
20	30	45	368	30	1,150	1,006	27,900	27,200	325,190	375,883	2,600	2,750
21	30	65	368	30	1,100	1,143	24,600	24,800	273,286	300,788	2,900	2,550
22	20	45	253	30	1,180	0,913	25,333	29,067	320,429	355,526	2,500	1,450
23	40	55	253	40	0,900	0,804	27,867	27,733	226,619	213,479	1,100	1,350
24	30	55	138	20	0,960	0,900	27,600	27,200	302,333	329,740	1,900	1,800
25	20	65	253	30	0,940	0,635	29,067	29,067	365,667	433,788	2,600	2,300
26	40	55	368	30	1,210	1,048	27,733	26,667	246,619	249,217	1,600	1,150
27	30	55	368	40	1,150	1,072	28,600	28,000	255,667	273,645	1,800	1,840

C1 = Ratio of water to dry goji berries (−1: 20 ml/g, 0:30 ml/g, +1:40 ml/g).

C2 = Extraction temperature (−1: 45°C, 0:55°C, +1:65°C).

C3 = Ultrasonic power (−1: 138 W/cm², 0:253 W/cm², +1: 368 W/cm²).

C4 = Extraction time (−1:20 min, 0:30 min, +1:40 min).

This can be explained by the fact that the highest Ultrasonic tension causes the formation of a greater number of bubbles due to the increase of the intensity of cavitation. This leads to a greater pressure which disrupts the cell walls, allowing the extraction of larger quantity of solids (Yang, Li, & Jin, 2014). After exceeding this particular point, the percentage of extracted solids started to decrease despite the fact that ultrasonic tension was further increased. The observation that the extraction yield

declines above a certain limit of applied power is in agreement with previous studies (Wang et al., 2014). This can be attributed to the fact that high ultrasound intensity leads to degradation-hydrolysis of polysaccharides which reduces the viscosity of the polysaccharides and reduces the amount of extractable matter (Zhang et al., 2013; Zhong & Wang, 2010; Zhou & Ma, 2006). Therefore, the chosen ultrasound power applied for extraction ranged between 138 and 368 w/cm².

TABLE 3 Quadratic equations for the prediction of each response derived by applying multiple regression analysis on the experimental data with the use of Design Expert software package (Version 7)

No1: Total carbohydrates of Thessaly fruits	$= +1.01 + (0.049 \cdot C1) + (0.015 \cdot C2) + (0.0025 \cdot C4) - (0.032 \cdot C1 \cdot C4) + (0.063 \cdot C2 \cdot C3) - (0.062 \cdot C2 \cdot C4) + (0.0093 \cdot C1^2) - (0.028 \cdot C3^2) - (0.12 \cdot C1^2 \cdot C2) - (0.14 \cdot C1^2 \cdot C3) - (0.10 \cdot C2^2 \cdot C3) - (0.10 \cdot C3^2 \cdot C2)$
No2: Total carbohydrates of imported fruits	$= +1.30 + (0.039 \cdot C3) + (0.039 \cdot C4) + (0.13 \cdot C1 \cdot C2) + (0.18 \cdot C1 \cdot C3) + (0.13 \cdot C3 \cdot C4) - (0.26 \cdot C1^2) - (0.15 \cdot C2^2) - (0.23 \cdot C3^2) - (0.23 \cdot C4^2) + (0.13 \cdot C1 \cdot C2^2) + (0.14 \cdot C2^2 \cdot C3)$
No3: % yield of Thessaly fruits	$= +28.15 + (4.05 \cdot C2) - (0.65 \cdot C1 \cdot C2) + (1.22 \cdot C1 \cdot C4) + (1.50 \cdot C3 \cdot C4) - (1.35 \cdot C1^2) - (1.39 \cdot C2^2) - (1.80 \cdot C3^2) - (2.83 \cdot C1^2 \cdot C2) + (1.65 \cdot C1^2 \cdot C3) - (1.62 \cdot C1 \cdot C2^2) + (1.22 \cdot C2^2 \cdot C3) - (5.98 \cdot C2 \cdot C3^2)$
No4: % yield of imported fruits	$= +27.77 + (4.00 \cdot C2) + (1.93 \cdot C1 \cdot C3) + (1.10 \cdot C3 \cdot C4) - (1.46 \cdot C1^2) - (1.27 \cdot C2^2) - (0.89 \cdot C3^2) - (3.60 \cdot C1^2 \cdot C2) - (2.31 \cdot C1^2 \cdot C3) - (4.28 \cdot C1 \cdot C2^2) - (4.35 \cdot C2 \cdot C3^2)$
No5: Total polyphenol of Thessaly fruits	$= +268.20 - (68.45 \cdot C1) - (20.30 \cdot C4) + (33.93 \cdot C1 \cdot C3) + (53.45 \cdot C1 \cdot C4) - (32.38 \cdot C2 \cdot C3) - (26.07 \cdot C2 \cdot C4) + (25.95 \cdot C3 \cdot C4) + (14.71 \cdot C1^2) - (15.12 \cdot C4^2) + (25.89 \cdot C1^2 \cdot C2) - (38.21 \cdot C1^2 \cdot C3) + (26.43 \cdot C1 \cdot C3^2) + (51.19 \cdot C2^2 \cdot C3) + (31.85 \cdot C2^2 \cdot C4)$
No6: Total polyphenol of imported fruits	$= +298.80 - (82.28 \cdot C1) - (33.29 \cdot C4) + (32.23 \cdot C1 \cdot C3) + (35.29 \cdot C1 \cdot C4) - (36.19 \cdot C2 \cdot C3) - (17.98 \cdot C2 \cdot C4) + (18.46 \cdot C3 \cdot C4) + (15.06 \cdot C1^2) - (15.37 \cdot C4^2) + (37.26 \cdot C1^2 \cdot C2) - (45.44 \cdot C1^2 \cdot C3) + (41.76 \cdot C2^2 \cdot C3) + (46.98 \cdot C2^2 \cdot C4)$
No7: IC50 of DPPH radical of Thessaly fruits	$= +1.01 + (0.049 \cdot C1) + (0.015 \cdot C2) + (0.092 \cdot C3) + (0.0025 \cdot C4) + (0.012 \cdot C1 \cdot C2) - (0.032 \cdot C1 \cdot C4) + (0.063 \cdot C2 \cdot C3) - (0.005 \cdot C2 \cdot C4) + (0.047 \cdot C3 \cdot C4) + (0.0093 \cdot C1^2) + (0.081 \cdot C2^2) - (0.12 \cdot C1^2 \cdot C2) - (0.14 \cdot C1^2 \cdot C4) - (0.062 \cdot C2^2 \cdot C4) - (0.10 \cdot C2 \cdot C3^2)$
No8: IC50 of DPPH radical of imported fruits	$= +1.76 - (0.91 \cdot C1) - (0.30 \cdot C2) - (0.47 \cdot C1 \cdot C3) - (0.36 \cdot C1 \cdot C4) + (0.21 \cdot C2 \cdot C4) + (0.047 \cdot C3 \cdot C4) + (0.67 \cdot C1^2 \cdot C2) + (0.41 \cdot C1^2 \cdot C4) + (0.95 \cdot C1 \cdot C2^2) + (0.60 \cdot C1 \cdot C3^2) + (0.50 \cdot C2^2 \cdot C3)$

C1, C2, C3, and C4 are the coded parameters for ratio of water to raw material, extraction temperature, ultrasonic power, and extraction time.

3.1.4 | Effect of extraction time on extraction yield

The extraction time is also a parameter that affects the UAE extraction efficiency. To estimate the appropriate extraction time, preliminary experiments performed in a time range of 10–50 min when the other extraction variables were set at their central values as follow: ratio of water to raw material 30:1 ml/g, extraction temperature 55°C, and ultrasonic power 253 w/cm². From the extraction results that are depicted in Figure 4, it is obvious that by increasing the extraction time from 10 to 30 min the extraction yield was increased reaching a maximum value of 32.03 ± 1.3% (*n* = 3) at 30 min.

After 30 min of extraction the extraction yield started to decrease, which may be the result of a partial polysaccharide degradation-hydrolysis when exposed at high temperature for long time (Ying, Han, & Li, 2011). For this reason, the adopted extraction time range was between 20 and 40 min and the central value of 30 min is the corresponding to the maximum extraction yield (%).

3.2 | Predicted models of bioactivity indices and % extraction yield by surface response methodology

The performance of the 27 extraction processes with regard to the Total carbohydrate content, the extraction yield (%), the total polyphenol content, and the DPPH radical scavenging activity (determined by IC50) of the Greek (Thessaly) and the imported goji berry extracts are given in Table 2. All trials were performed in triplicate.

By applying multiple regression analysis on the experimental data with the use of Design Expert software package (Version 7), the response variable and the test variables are related by the quadratic equations, as shown in Table 3.

In the BBD analysis, the *p*-value is used as a tool to check the significance of each coefficient, and the smaller the *p*-value is, the more significant the corresponding coefficient is (Zhong & Wang, 2010). The ANOVA was performed to evaluate the predictive model and the variables as shown in Tables 4.

The data presented in the tables suggest that all the derived predicted models are significant (*p* < .01) and of high prediction accuracy, which is evident by the high *R*² values shown in the Table 4. The determination coefficient (*R*²) indicated the amount of the total variations was explained by the model. The high values of adjusted determination coefficient (*R*²adj) are also confirmed that the models were highly significant.

3.3 | Optimization of dry goji berries UAE

Using Design Expert (Version 7) statistical and optimization software, the optimal conditions for the extraction parameters to optimize each of the four selected performance (extraction yield) and bioactivity (total carbohydrate, total content IC 50 of DPPH radical) parameters were obtained for both imported and local fruits which are presented on Table 5.

It is remarkable that the data of Table 5 suggest that the optimal values of extraction parameters are quite similar in all cases with one

TABLE 4 Significance of the model and each variable based on ANOVA analysis for total carbohydrate content, extraction yield, total polyphenol content, and IC50 of DPPH radical scavenging of Greek (Thessaly) and imported fruits

No1 Carbohydrate content (Greek)	No2 Carbohydrate content (Imported)	No3 % extraction yield (Greek)	No4 % extraction yield (Imported)	No5 Total polyphenol content (Greek)	No6 Total polyphenol content (Imported)	No7 IC50 of DPPH (Greek)	No8 IC50 of DPPH (Imported)	
	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	<i>p</i> value of the model	
Model Variables	<.0001 ^a	<.0001 ^a	<.0001 ^a	<.0001 ^a	<.0001 ^a	<.0001 ^a	<.0001 ^a	
	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	
C1	<.0001	.7436	C1	.2456	C1	<.0001	C1	<.0001
C2	.0004	.1963	C2	<.0001	C2	.2092 ^b	C2	<.0001
C3	.3608 b	.0729	C3	.2242	C3	.3106	C3	<.0001
C4	<.0001	.0330	C4	.3442	C4	.1483	C4	.0025
C1C2	.8761	.0004	C1C2	.0630	C1C2	.4372	C1C2	.0024
C1C3	.4430	<.0001	C1C3	.4357	C1C3	.0035	C1C3	.1553
C1C4	.0012	.3724	C1C4	.0032	C1C4	.1246	C1C4	.0056
C2C3	.0666	.0005	C2C3	.3807	C2C3	.0048	C2C3	.0035
C2C4	.0031	<.0001	C3C4	.0009	C2C4	.0137	C1 ²	.0003
C3C4	.7556	<.0001	C1 ²	.0004	C3C4	.0140	C2 ²	.0407
C1 ²	.0138	<.0001	C2 ²	.0003	C1 ²	.0707	C3 ²	.0010
C2 ²	.4830	<.0001	C3 ²	<.0001	C2 ²	.0711	C4 ²	.0037
C3 ²	<.0001	.0027	C1 ² C2	<.0001	C3 ²	.2005	C1 ² C2	<.0001
C1 ² C2	.0539	.0011	C1 ² C3	.0042	C1 ² C3	.9672	C1 ² C3	<.0001
C1 ² C4	.0004	.0011	C1C2 ²	.0020	C1 ² C4	.0329	C1C2 ²	.0004
C2 ² C4	<.0001	.0204	C2 ² C3	.0204	C1 ² C3	.0116	C1C3 ²	<.0001
C2C3 ²	.0195	<.0001	C2C3 ²	<.0001	C1C3 ²	.0304	C2 ² C3	<.0001
					C2 ² C3	.1567	C2C3 ²	<.0001
					C2 ² C4	.0086		
					C2 ² C4	.0138		
Lack of fitting	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	Not significant	
R ²	0.9788	0.9667	0.9803	0.9604	0.9825	0.9901	0.9232	
Adj. R ²	0.9388	0.9278	0.9431	0.8855	0.9351	0.9713	0.8003	

C1 = Ratio of water to dry goji berries (-1: 20 ml/g, 0:30 ml/g, +1:40 ml/g).

C2 = Extraction temperature (-1: 45°C, 0:55°C, +1:65°C).

C3 = Ultrasonic power (-1: 138 W/cm², 0:253 W/cm², +1: 368 W/cm²).

C4 = Extraction time (-1:20min, 0:30min, +1:40min).

^aSignificant (*p* < .05), ^b Not Significant (*p* > .1).

TABLE 5 Predicted values of the responses at optimum conditions of extraction of Greek and imported fruits

	Independent variables				Total carbo-hydrates content (g/L extracts)	Extraction yield (%)	Total phenolic content (mgGAE/L extract)	IC 50 of DPPH radical scavenging mg/ml
	C1	C2	C3	C4				
Thessaly	39.03	50,16	331,70	31.50	1.36			
Imported	31.43	56.59	284.22	31.10	1.31			
Thessaly	28.5	64.29	282,91	39.73		31.21		
Imported	26.31	65	249	39.54		31.62		
Thessaly	20.41	57.06	221,72	22.89			419.88	
Imported	20.11	54.99	211,16	20.37			448.53	
Thessaly	20	45	359,98	35.53				0.71
Imported	21.12	45.5	160,07	25.08				0.69

C1 = Ratio of water to dry goji berries (ml/gr).

C2 = Extraction temperature (°C).

C3 = Ultrasonic power (W/cm²).

C4 = Extraction time (min).

exception. In the case of IC50 values, there are some differences in the optimal values of applied ultrasonic power and extraction time between local and imported fruits and this can be attributed to the relatively low R^2 value of the model developed for the prediction of IC50 of imported fruits. Thus, it is assumed that the use of the model developed for the Greek fruits is more accurate, based on the high R^2 value (0.99) which was achieved in that case.

3.3.1 | Verification of predictive model

The suitability of the model equation for predicting the optimum response values was tested using the selected optimal conditions. The optimal values of ratio of water to dry goji berry, ultrasound power, extraction temperature, extraction time, were tested or total carbohydrate, total phenolic content and IC50 of DPPH radical scavenging with Thessaly fruits following optimal from the related models conditions. Thus, for total carbohydrate content, they were carried out: ratio of water to dry goji berry 28 ml/g, extraction temperature 64.29°C ultra-sonic output power 283 W, extraction time 39.7 min, for total phenol content: 20.4 ml/g, 57°C, 222 W, and 22.9 min, respectively, while for IC50 of DPPH the conditions were 20 ml/g, 45°C, 360 W, and 35.5 min. Under these conditions, the content of received extracts of total carbohydrate was 1.34 gr/L (± 0.03), for total phenolic content was 4.21 mgGAE/L (± 0.04), and for the IC50 of DPPH 0.69 $\mu\text{g/ml}$ (± 0.02), which were not significantly different ($p > .05$) from the predicted values of 1.359 gr/L, 419.88 mgGAE/L, and 0.71 $\mu\text{g/ml}$. This proved that the models designed in this study were valid.

3.4 | Comparison of extraction performance and bioactivity indices between fruits of different origin

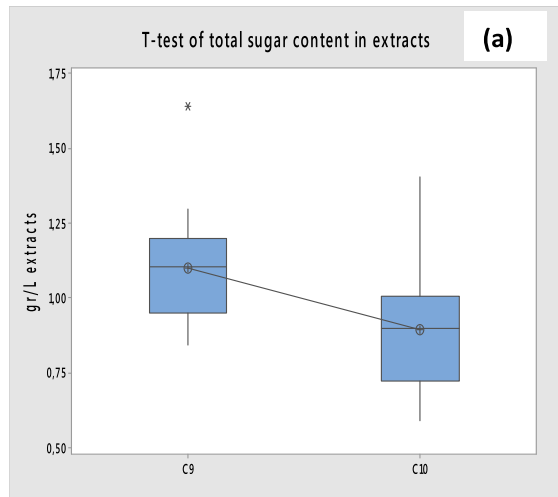
The t -test and also the U -test (Mann–Whitney) which were performed for the comparison between the mean values of the four measured

parameters of extraction performance and bioactivity for the imported and the Greek fruits indicated that there were no significant differences between the fruits of different origin, concerning the extraction yield, the total phenolic content, and the IC50 value as shown in Figure 5. On the contrary, there was a statistically significant difference with regard to the concentration of total carbohydrates, as Thessaly originating fruits appear to have higher concentration of total carbohydrates compared to the imported ones.

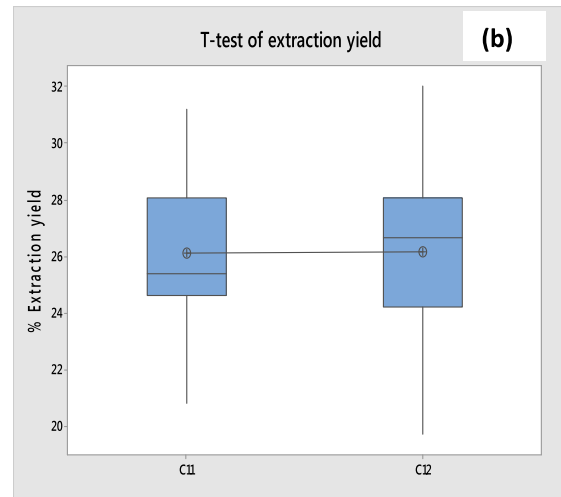
4 | CONCLUSIONS

In this study, UAE technology was used to achieve high biological extracts from dry goji berry fruits. The extraction variables were optimized by a single factor design and a BBD and appeared to be similar for both goji berry extracts (local and imported). Response surface methodology was confirmed to be a useful tool for the optimization of experiment variables. The optimum extraction parameters were determined for Thessaly and imported fruits and they were found to be mostly similar concerning the extraction performance parameters and the bioactivity indices, namely total carbohydrate content, extraction yield, total polyphenol content, and total antioxidant activity expressed as IC50 value (DPPH method). The main exception, with regard to achieving the optimal antioxidant capacity (IC50 values), was the optimal ultrasound power, which was significantly higher for local fruits (359.98 W/cm²) compared to the imported ones (160.07 W/cm²), and the optimal extraction time which was again higher for local fruits (35.53 min) compared to the imported ones (25.08 min). Based on the higher R^2 value obtained for the locally produced fruits, the use of the model developed for these fruit extracts is more accurate.

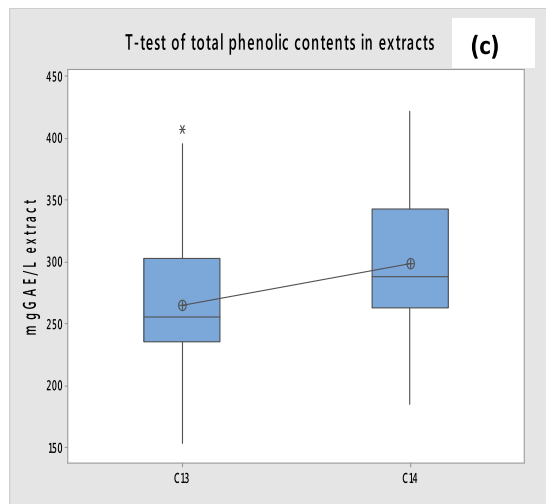
Additionally, the results of the statistical comparison between Greek (Thessaly) and imported goji berry fruits revealed that the only statistically significant difference in composition between fruits of the two different origins was that the total carbohydrate content was



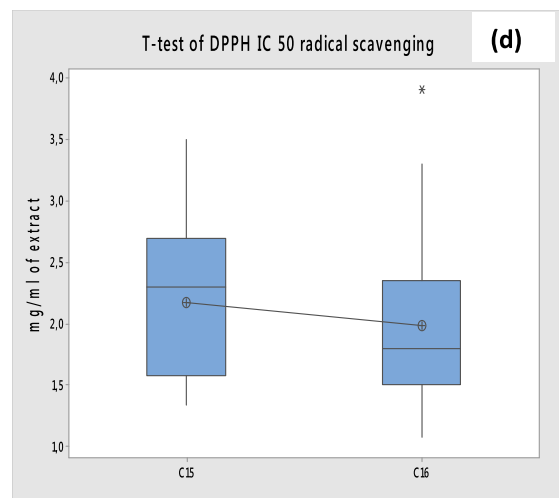
T-Test
 C9: Thessaly, C10 imported
 P-Value = **0,011^a**
Mann-Whitney U-Test
 Test of $C9 = C10$ vs $C9 \neq C10$ is significant at **0,0121^a**



T-Test
 C11: Thessaly, C12 imported
 P-Value = 0,971 ^b
Mann-Whitney U-Test
 T Test of $C9 = C10$ vs $C9 \neq C10$ is significant at 0,8627



T-Test
 C13: Thessaly, C14 imported
 P-Value = **0,105^b**
Mann-Whitney U-Test
 Test of $\eta_1 = \eta_2$ vs $\eta_1 \neq \eta_2$ is significant at 0,1066 ^b



T-Test
 C15: Thessaly, C16 imported
 P-Value = **0,237^b**
Mann-Whitney U-Test
 Test of $\eta_1 = \eta_2$ vs $\eta_1 \neq \eta_2$ is significant at 0,1003^b

a Significant ($p < 0,05$)
b Not Significant ($p > 0,1$)

FIGURE 5 T-test and U-test statistical analysis of the responses results of Greeks (Thessaly) and imported fruits. (a) Show the results of the t-test and the U-test for the total carbohydrate content, as the results of the tests indicates the difference in this response is significant. (b) Show the results of the t-test and the U-test for the extraction yield, as the results of the tests indicates the difference in this response is not significant. (c) Show the results of the t-test and the U-test for the total phenolic content, as the results of the tests indicates the difference in this response is not significant. (d) Show the results of the t-test and the U-test for the IC50 of DPPH radical scavenging, as the results of the tests indicates the difference in this response is not significant

higher for the Greek (Thessaly) goji berry fruits (1.1 ± 0.17 g/L extract) than the corresponding imported fruits (0.89 ± 0.19 g/L extract).

REFERENCES

- Amagase, H., & Farnsworth, N. (2011). A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, 44, 1702–1717.
- Amagase, H., & Nance, D. M. (2009). Effect of standardized *Lycium barbarum* (Goji) juice, GoChi® intake on resting metabolic rate and waist circumference: Randomized, placebo-controlled, double-blind clinical studies. *FASEB Journal*, 23, LB419.
- Bagchi, D. (2014). *Nutraceutical and Functional food regulation in the United States and around the world* (2nd ed., Elsevier, Chapter 21, pp. 381–386). Academic Press. Amsterdam, Holland.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. & Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28, 25–30.
- Box, G. E. P., & Behnken, D. W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–475.
- Box, G. E., & Wilson, K. B. (1951). On the experimental attainment of optimum conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 13, 1–45.
- Changbo, D., & Zhaoju, S. (2012). Supplementation of *Lycium barbarum* polysaccharides protection of skeletal muscle from exercise-induced oxidant stress in mice. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6, 643–647.
- Chang, L. P., Cheng, J. H., Hsu, S. L., Fu, Y. C., Lin, K. L., Shieh, C. J., Zhou, X. Q. & Chang, C. M. (2012). Supercritical carbon dioxide anti-solvent purification of anti-oxidative compounds from *Lycium barbarum* fruits by using response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 100, 66–73
- Chea, S. C., Tan, P. C., Mirhosseini, H., Lai, M. O., Long, K., & Baharin, S. B. (2009). Optimization of ultrasound extraction condition of phospholipids from palm-pressed fiber. *Journal of Food Engineering*, 92, 403–409.
- Chen, Y., Luo, H., Gao, A., & Zhu, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 12, 305–309.
- Cui, K. R., Xing, G. S., Liu, X. M., & Wang, Y. F. (1996). Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science*, 146, 9–16.
- Dong, J. Z., Gao, W. S., & Wang, Y. (2011). Simultaneous extraction and analysis of four polyphenols from leaves of *Lycium Barbarum* L. *Journal of Food Biochemistry*, 35, 914–931.
- Dong, J. Z., Wang, S. H, Zhu, L., & Wang, Y., (2012). Analysis on the main active components of *Lycium barbarum* fruits and related environmental factors. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(12), 2276–2283.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28, 350–356.
- Gogate, P. R., & Pandit, A. B. (2004). Sonochemical reactors: Scale up aspects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11, 105–117.
- Han, J., Jiang, X., & Zhang, L. (2011). Optimization of extraction conditions for polysaccharides from the roots of *Isatis tinctoria* L. by response surface methodology and their in vitro free radicals scavenging activities and effects on IL-4 and IFN- mRNA expression in chicken lymphocytes. *Carbohydrate Polymers*, 86, 1320–1326.
- Ho, Y. S., So, K. F., & Chang, R. C. C. (2010). Anti-aging herbal medicine -How and why can they be used in aging- associated neurodegenerative diseases. *Ageing Research Reviews*, 9, 354–362.
- Kosar, M., Altintas, A., Kirimer, N., & Baser, K. H. C. (2003). Determination of the free radical scavenging activity of *Lycium* extracts. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 531–535.
- Li, Y. C., Wang, Y. L., & Li, Z. W. (2014). Optimization of extraction process of water-soluble polysaccharides from *Porphyra* by response surface methodology. *Advances Materials Research*, 864, 526–530.
- Li, Q., Yu, N., Wang, Y., Sun, Y., Lu, K., & Guan, W. (2013). Extraction optimization of *Bruguiera gymnorhiza* polysaccharides with radical scavenging activities. *Carbohydrate Polymers*, 96, 148–155.
- Liu, C. Y., & Tseng, A. (2005). *Chinese Herbal Medicine: Modern Applications of Traditional Formulas*. Boca Raton FL: CRC Press.
- Liu, Y., Gong, G., Zhang, J., Jia, S., Lia, F., Wang, Y., & Wu, S. (2014). Response surface optimization of ultrasound-assisted enzymatic extraction polysaccharides from *Lycium barbarum*. *Carbohydrate Polymers*, 110, 278–284.
- Ma, W. P., Ni, Z. J., Li, H., & Chen, M. (2008). Changes of the main carotenoid pigment contents during the drying processes of the different harvest stage fruits of *Lycium barbarum* L. *Agricultural Science*, 7, 363–369.
- Madrau, A. M., Piscopo, A., Sanguinetti, M. A., Caro, D. A., Marco, P., Romeo, V. F., & Piga, A. (2009). Effect of drying temperature on polyphenolic content and antioxidant activity of apricots. *European Food Research and Technology*, 228, 441–448.
- Miao, Y., Xiao, B., Jiang, Z., Guo, Y., Mao, F., Zhao, J., Huang, X., & Guo, J. (2010). Growth inhibition and cell cycle arrest of human gastric cancer by *L. barbarum* polysaccharide. *Medical Oncology*, 27, 785–790.
- Muralidhar, V., Chirumamila, R., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 17–23.
- Qiong, L., Yizhong, C., Jun, Y., Mei, S., & Harold, C. (2004). Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. *Life Sciences*, 76, 137–149.
- Romdhane, M., & Gourdon, C. (2002). Investigation in solid liquid extraction: Influence of ultrasound. *Chemical Engineering Journal*, 87, 11–19.
- Shen, L., & Guang, D. U. (2012). *Lycium barbarum* polysaccharides stimulates proliferation of MCF-7 cells by ERK pathway. *Life Sciences*, 91, 353–357.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, 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.
- Su, C. X., Duan, X. G., Liang, L. J., Wang, F., Zheng, J., Fu, X. Y., Yan, Y. M., & Wang, N. P. (2014). *Lycium barbarum* polysaccharides as an adjuvant for the recombinant vaccine through enhancement of humoral immunity by activating Tfh cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 158, 98–104.
- Valdes, A., Vidal, L., Beltran, A., Canals, A., & Garrigos, M. C. (2015). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from almond skin byproducts (*Prunus amygdalus*): A multivariate analysis approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5395–5402.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Application and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 161–169.
- Wang, Z., Wang, C., & Quan, Y. (2014a). Extraction of polysaccharides from *Phellinus nigricans* mycelia and their antioxidant activities in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 99, 110–115.

- Wang, Y., Liu, Y., & Hu, Y. (2014). Optimization of polysaccharides extraction from *Trametes robiniophila* and its antioxidant activities. *Carbohydrate Polymers*, *111*, 324–332.
- Waterhouse, A. L. (2001). Determination of Total Phenolics. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current protocols in food analytic chemistry* (pp. I1.1.1–I1.1.8). New York: Wiley.
- Weihua, N., Tingting, G., Hailiang, W., Yuzhi, D., Jiayu, L., Cen, L., Lixin, W., & Hongtao, B. (2013). Anti-fatigue activity of polysaccharides from the fruits of four Tibetan plateau indigenous medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*, 529–535.
- Xia, Y., Kuang, H., Yang, B., Wang, Q., Liang, J., Sun, Y., & Wang, Y. (2011). Optimum extraction of acidic polysaccharides from the stems of *Ephedra sinica* Stapf by Box–Behnken statistical design and its anti-complement activity. *Carbohydrate Polymers*, *84*, 282–291.
- Xiao, J., Liong, C. E., Ching, P. Y., Chuen, R., Chang, C., So, F. K., Fung, M. L., & Tipoe, L. G. (2012). *Lycium barbarum* polysaccharides protect mice liver from carbon tetrachlorine - induced oxidative stress and necroinflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, *139*, 462–470.
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., & Ye, X. (2014). Effects of ultrasound and heating on the extraction of peptin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, *126*, 72–81.
- Yang, R. F., Zhao, C., Chen X., Chan, S. W. & Wu, J. Y. (2015). Chemical properties and bioactivities of Goji (*Lycium barbarum*) polysaccharides extracted by different methods. *Journal of Functional Foods*, *17*, 903–909.
- Yang, P., Li, D., & Jin, S. (2014). Stimuli-responsive biodegradable poly (methacrylic acid) based nanocapsules for ultrasound traced and triggered drug delivery system. *Biomaterials*, *35*, 2079–2088.
- Ying, Z., Han, X., & Li, J. (2011). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mulberry leaves. *Food Chemistry*, *127*, 1273–1279.
- Zhong, K., & Wang, Q. (2010). Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from dried longan pulp using response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *80*, 19–25.
- Zhou, C., & Ma, H. (2006). Ultrasonic degradation of polysaccharides from a red algae (*Porphyra yezoensis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *54*, 2223–2225.



Assessment of the antioxidant and antimutagenic activity of extracts from goji berry of Greek cultivation

Prodromos Skenderidis^{a,c}, Efthalia Kerasiotti^b, Eleftheria Karkanta^{b,*}, Dimitrios Stagos^{b,*}, Demetrios Kouretas^b, Konstantinos Petrotos^c, Christos Hadjichristodoulou^a, Andreas Tsakalof^a

^a Department of Medicine, Lab of Hygiene and Epidemiology, University of Thessaly, Larisa, Vioplis, 41500, Greece

^b Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Vioplis, 41500, Greece

^c Technological Educational Institute of Thessaly, Dept. of Biosystems Engineering, Larisa, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

Goji berry
Antioxidant
Polyphenols
Muscle cells
Glutathione
Lipid peroxidation
Protein oxidation

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the antioxidant and antimutagenic activities of ultrasound assisted aqueous extracts from dry goji berry fruits cultivated in Greece. The extracts' free radical scavenging activity was assessed by the DPPH· and ABTS·⁺ assays. The results from both assays demonstrated that the extracts exhibited strong radical scavenging activity with IC₅₀ values ranging from 1.29 to 3.00 mg/ml for DPPH· and from 0.39 to 1.10 mg/mL for ABTS·⁺ assay. The investigated extracts also inhibited free radical-induced DNA damage induced by peroxy (ROO·) radicals with IC₅₀ ranging from 0.69 to 6.90 mg/mL. The antioxidant activity of the goji berry extract exhibited the highest potency in the above assays was also examined in muscle cells. In particular, muscle C2C12 cells were treated with the selected extract at non cytotoxic concentrations for 24 h and four oxidative stress markers were measured: total reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), lipid peroxidation and protein carbonyl levels. The results showed that the extract at 25 and 100 µg/mL increased GSH levels up to 189.5% and decreased lipid peroxidation and protein carbonyls by 21.8 and 29.1% respectively. The present study was the first on the antioxidant effects of ultrasound assisted aqueous extracts from goji berry fruits in muscle cells.

1. Introduction

The production of reactive oxygen species (ROS) occurs physiologically in living organisms. ROS are useful molecules at low concentrations, since they regulate growth, differentiation, proliferation, and apoptosis. However, when there is an excess production of ROS, a pathological condition called oxidative stress, then several diseases (e.g. cardiovascular, cancer and neurodegenerative) may be caused [1–3].

One of the tissues that are especially susceptible to oxidative stress is skeletal muscle [4]. In skeletal, muscle, overproduction of ROS may occur even under physiological processes such as exercise [5]. During exercise there is a high rate of O₂ consumption in skeletal muscles, that may cause incomplete O₂ reduction and electron leakage from the electron transfer chain, leading to the generation of ROS and oxidative stress [5]. In turn, oxidative stress results in cell damage and muscle fatigue [6]. Thus, antioxidant supplementation has been suggested for counteracting oxidative stress-induced damage to skeletal muscles [7].

Moreover, it is well documented that several traditional herb and plant extracts have antioxidant properties and are potential candidates for the prevention and treatment of ROS-induced diseases [8–10]. One of those herbs is goji berry (*Lycium barbarum*), whose extracts have been shown to protect from damage caused by ROS [11]. For example, goji berry's extracts have been reported to prevent oxidative stress-induced disorders (e.g. neurological) and pathological conditions (e.g. aging) [12].

Both *in vitro* and *in vivo* studies have provided evidence for these antioxidant effects of goji berry's extracts. For instance, the antioxidant capacity of *L. barbarum* polysaccharides (LBPs) has been demonstrated by *in vitro* methods including superoxide, DPPH· and ABTS·⁺ radical scavenging activity and reducing power [13]. In addition, other studies with rats and mice have reported that LBPs protected from DNA damage and inhibited lipid peroxidation and damage in hepatic and renal tissues caused by chronic hyperglycemia-induced oxidative stress in a high-fat diet [14,15]. Moreover, LBPs protected against oxidative damage in skeletal muscle, caused by exhaustive exercise [16]. Apart from

Abbreviations: DPPH·, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS·⁺, 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid); ROS, reactive oxygen species; GSH, glutathione; TBARS, thio-barbituric acid-reactive substances

* Corresponding author.

E-mail address: stagkos@med.uth.gr (D. Stagos).

<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.001>

Received 17 December 2017; Received in revised form 1 February 2018; Accepted 2 February 2018

Available online 05 February 2018

2214-7500/ © 2018 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

polysaccharides, other antioxidant compounds found in goji berry are carotenoids (e.g. zeaxanthin) and polyphenols. It is believed that the antioxidant properties of the polysaccharides are likely attributed to low molecular weight phenolic substances that bind to them during the extraction process [17].

Most studies on goji berry's extracts have used plants from cultivations in China, which is the main supplier of this fruit. In the present study, we used extracts from *L. barbarum* and *L. chinensis* dry fruits from Greek cultivations and investigated their antioxidant and anti-mutagenic activity using molecular and cell culture methods. It is known that the climatic and soil conditions may affect the chemical composition of a plant, and so the bioactivity of its different parts [18,19]. The extracts were produced by an ultrasound assisted extraction process using water as solvent, optimized for giving extracts with maximum antioxidant activity as we have described previously [20].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Folin Ciocalteu, sodium carbonate, gallic acid, ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), methanol, 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS), horseradish peroxidase enzyme (HRP), hydrogen peroxide (H₂O₂), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and mercury orange, were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Dulbescco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) and phosphate buffered saline (PBS) of analytical grade were purchased from Gibco (UK). Cell proliferation kit II (XTT) was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

2.2. Goji berry fruits

Goji berry fruits from *L. barbarum* and *L. chinensis* were collected from a 3 year old experimental plantation, located in the region of Thessaly, and they were subsequently sun-dried. The moisture content of all samples was measured after fruits were drying to constant weight at 105 °C following the AOAC 935.29 official method. The samples were then stored under refrigeration (0–4 °C) for further analysis.

2.3. Extraction process

To optimize the extraction process the extraction conditions were varied as previously described [20]. In particular, dried whole fruits of goji berry were frozen by liquid nitrogen and were pulverized in mortar. From each sample, 2.5 g were extracted with distilled water (using 50, 75, 93, 99 or 100 mL of water,) in a 250 mL glass beaker. The samples were preheated to the selected experimental temperature (45, 55, 57 or 65 °C), and then they were introduced to the ultrasound extraction device (Hielscher UP400 S). The ultrasound power was set at 138.0, 220.0, 253.0, 360.0, 366.7 or 368.0 W/cm², while the extraction time was set at 23, 30, 33.4, 35 or 40 min, according to the chosen experimental conditions. The obtained extracts were centrifuged at 12,000 rpm for 15 min and the supernatant was collected and kept in a freezer (–20 °C) until further use.

2.4. Determination of the total carbohydrate content of the extracts

Phenol/sulfuric method was used for the determination of total carbohydrates and was carried out according to Dubois et al. [21]. Briefly, 1 mL of each extract was mixed with 0.5 mL of 4% phenol and 2.5 mL of 95% sulfuric acid, and after 10 min incubation the optical density was measured at 490 nm. The total carbohydrate content was calculated on the basis of a calibration curve of D-glucose (concentration range: 0.01–0.1 mg/L; R² = 0.991) and were expressed as g of carbohydrates/L of extract. The assay was repeated three times.

2.5. Determination of the total polyphenolic content (TPC) of the extracts

The method of Singleton et al. [22] modified by Waterhouse [23] was used to determine the TPC. Briefly, 20 µL of each extract was mixed with 1.58 mL water, and then with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (0.2 N). Subsequently, 300 µL of Na₂CO₃ solution (200 g/L) was added and after 120 min incubation in dark, the optical density was measured at 765 nm. TPC was calculated on the basis of a calibration curve of gallic acid (concentration range: 50–500 mg/L, R² = 0.991) and expressed as gallic acid equivalents (GAE)/mg of dried extract. The assay was repeated three times.

2.6. DPPH· radical scavenging activity assay

The DPPH· radical scavenging activity of extracts was assessed as described previously by Spanou et al., [24]. Briefly, 1 mL of freshly made methanolic solution of DPPH· radical (100 µM) was mixed with the tested goji berry extracts dissolved in distilled water at different concentrations and after 20 min incubation in dark, the optical density was measured at 517 nm. The percentage of radical scavenging capacity (RSC) of the tested extracts was calculated according to the following equation:

$$\% \text{ DPPH}\cdot \text{ radical scavenging activity} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}})/\text{Abs}_{\text{control}}] \times 100}{X}$$

where Abs_{control} and Abs_{sample} are the absorbance values of the control and the tested sample respectively. Moreover, in order to compare the radical scavenging efficiency of the extracts, the IC₅₀ value showing the concentration caused 50% scavenging of DPPH· radical was estimated. All measurements were carried out in triplicate and at least in two independent experiments.

2.7. ABTS·⁺ radical scavenging activity assay

ABTS·⁺ radical scavenging activity was measured as described by Kerasioti et al., [25]. The RSC percentage of the ABTS·⁺ radical scavenging activity and the IC₅₀ values were determined as described above for the DPPH· method. All measurements were carried out in triplicate and at least in two independent experiments.

2.8. Peroxyl radical-induced DNA plasmid strand cleavage

The assay was performed as described previously by Priftis et al., [26]. The preventive activity of the tested extracts against peroxyl radical-induced DNA strand breakage was based on the inhibition of the conversion of supercoiled form to the open-circular. The analysis was performed using an AlphaImager EC photodocumentation system and the amounts of supercoiled and open-circular forms were analyzed with the Alpha View software (AlphaInnotech, CA, USA).

The percentage inhibition was calculated using the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[(S - S_o)/(S_{\text{control}} - S_o)] \times 100}{100}$$

where S_{control} is the percentage of supercoiled DNA of the negative control sample (plasmid DNA alone), S_o is the percentage of supercoiled plasmid DNA of the positive control sample (without tested extracts but in the presence of the radical initiating factor), and S is the percentage of supercoiled plasmid DNA of the sample with the tested extracts and the radical initiating factor. Each experiment was carried out three times.

2.9. Total solid assay

Total solids of extract no. 5 were measured according to the method of Symons and Morey [27]. The extract was well-mixed and evaporated

Table 1

Extraction parameters, TPC and carbohydrate content of each extract as well as their antioxidant activity as assessed by DPPH, and ABTS·⁺ assays and ROO·⁻ – induced DNA plasmid breakage.

Samples	Variety	Ratio of water to dry goji berry (ml/gr)	Extraction temperature (°C)	Ultrasonic power (W/cm ²)	Extraction time (min)	Total carbohydrate (g/L of extract)	TPC ^a (mg GAE/L)	DPPH· ^b	ABTS· ⁺ b	ROO· ^b
1	<i>L. barbarum</i>	30.0	55.0	138.0	40.0	0.958	272.3	2.33 ± 0.03	0.67 ± 0.01	1.80 ± 0.05
2	<i>L. barbarum</i>	40.0	45.0	253.0	30.0	1.155	296.3	2.10 ± 0.02	0.85 ± 0.02	1.90 ± 0.01
3	<i>L. barbarum</i>	39.4	50.0	335.7	33.4	1.201	323.3	1.90 ± 0.01	0.75 ± 0.03	4.60 ± 0.05
4	<i>L. barbarum</i>	40.0	65.0	138.0	30.0	1.079	234.3	2.15 ± 0.02	0.77 ± 0.01	4.30 ± 0.04
5	<i>L. barbarum</i>	20.0	57.0	220.0	23.0	1.191	394.3	1.45 ± 0.02	1.10 ± 0.04	0.69 ± 0.02
6	<i>L. barbarum</i>	20.0	45.0	360.0	35.0	1.181	351.3	1.29 ± 0.01	0.42 ± 0.03	1.75 ± 0.03
7	<i>L. barbarum</i>	30.0	65.0	368.0	30.0	1.010	303.3	2.80 ± 0.04	1.05 ± 0.04	1.40 ± 0.03
8	<i>L. barbarum</i>	36.3	56.4	224.4	22.9	1.054	283.3	3.00 ± 0.03	0.65 ± 0.02	6.90 ± 0.04
9	<i>L. chinensis</i>	20.0	57.0	220.0	23.0	0.941	371.3	2.20 ± 0.04	0.64 ± 0.02	2.40 ± 0.03
10	<i>L. chinensis</i>	20.0	45.0	360.0	35.0	0.916	297.3	1.70 ± 0.03	0.39 ± 0.01	1.95 ± 0.02

^a TPC: total polyphenolic content.

^b IC50 values (mg/ml) shown as mean ± SD of at least three independent experiments.

in a weighed dish and dried to constant weight in an oven at 103–105 °C.

The calculation of the total solid was performed using the following formula:

$$\text{mg of total solids/L} = (A - B) \times 1000 / \text{sample volume in mL}$$

where: A is the weight of dried residue plus the weight of the dish in mg, and B is the weight of the dish in mg.

2.10. Cell culture

C2C12 muscle cells were cultured in normal Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, UK), containing 10% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine (Gibco, UK), 100 units/ml of penicillin, and 100 units/ml of streptomycin (Gibco, UK) in plastic disposable tissue culture flasks at 37 °C in 5% CO₂.

2.11. Cell viability assay

Cell viability was assessed using the XTT assay kit (Roche, Germany), as described by Goutzourelas et al. [1]. All experiments were carried out in triplicate and at least on two separate occasions.

2.12. Assessment of GSH and ROS levels by flow cytometry

The levels of GSH and ROS in C2C12 cells were assessed using mercury orange and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), respectively. The flow cytometry methodology was made as described by Goutzourelas et al., [1]. The fluorescent of mercury orange binds directly to GSH. For ROS assessment, the fluorescent of DCF (produced by esterases via the diacetylation of DCF-DA and ROS presentation) was estimated. The cells were analyzed at a flow rate of 1000 events/sec. Analyses were performed on 10,000 cells per sample, and the fluorescence intensities were measured on a logarithmic scale. Data were analyzed using BD Cell Quest software (Becton-Dickinson). Each experiment was repeated at least three times.

2.13. Assessment of TBARS levels by spectrophotometry

A spectrophotometric assay was performed as described previously by Kerasioti et al., for the determination of TBARS [25]. The assay requires a minimum of 30 µg of protein in the test sample (protein determination was performed using Bradford assay). TBARS were expressed as equivalents of malondialdehyde (MDA) and measured at 530 nm. Calculation of TBARS concentration was based on the molar extinction coefficient of malondialdehyde. Each experiment was repeated at least three times.

2.14. Assessment of protein carbonyl levels

Protein carbonyl determination was based on the spectrophotometric method of Patsoukis et al., [28]. According to this assay, the formation of carbonyls is detected by their reaction with DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) to form 2,4-dinitrophenylhydrazone measured at 375 nm. The assay requires 30 µg of protein in the test sample (protein determination was performed using Bradford assay). Each experiment was repeated at least three times.

2.15. Statistical analysis

The optimal extraction parameters were determined by mathematical model based on Box Behnken designed experiment as described previously [20]. Data from all methods were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test for post-hoc analysis. The level of statistical significance was set at $p < .05$. For all statistical analyses, SPSS software, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Data are presented as the means ± SEM.

3. Results

3.1. Polyphenolic and carbohydrate content of goji berry extracts

In Table 1, TPC and total carbohydrate content of the goji berry extracts are presented. TPC ranged from 234.3 to 394.3 mg GAE/L of extract (Table 1). The highest level of polyphenols was found in extract 5 from *L. barbarum* variety (Table 1). The highest value of TPC in *L. chinensis* variety was 371.3 mg GAE/L of extract 9 (Table 1).

The total carbohydrate content of the extracts ranged from 0.916 to 1.201 g/L. The highest carbohydrate content was exhibited by extract 3 from *L. barbarum* variety, while extract 9 had the highest value (0.941 mg GAE/L) from *L. chinensis* extracts (Table 1).

3.2. Assessment of the free radical scavenging activity using the DPPH· and ABTS·⁺ assays

All the extracts exhibited scavenging activity against DPPH· and ABTS·⁺ radicals. In DPPH assay, the IC₅₀ values ranged from 1.29 to 3.00 mg/ml. The highest antioxidant activity was shown by the extract 6 of *L. barbarum* variety, while the extract 8 (*L. barbarum*) had the lowest activity (Table 1). Extract 10 was the most potent extract from *L. chinensis* variety with IC₅₀ 1.70 mg/ml (Table 1).

In ABTS·⁺ assay, the most potent activity was exhibited by extract 10 from *L. chinensis* variety with IC₅₀ 0.39 mg/ml and the lowest activity by extract 5 from *L. barbarum* variety with IC₅₀ 1.10 mg/ml (Table 1). Among *L. barbarum* extracts, no. 6 exhibited the highest

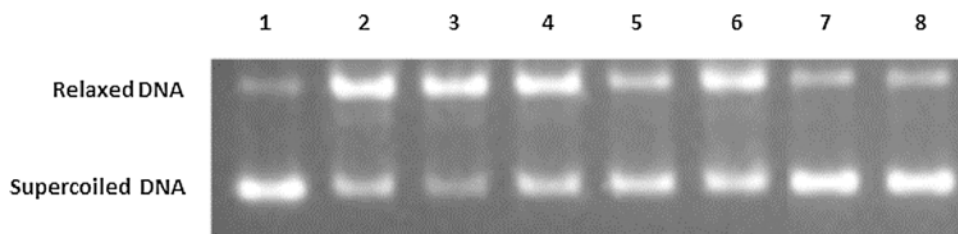


Fig. 1. Representative photo of the protective activity of extract 5 against $\text{ROO}\cdot$ -induced DNA damage. Lane 1, plasmid DNA without any treatment; lane 2, plasmid DNA exposed to AAPH; lanes 3–7, plasmid DNA exposed to AAPH in the presence of 0.06, 0.12, 0.24, 0.48 and 1.92 mg/ml of extract respectively; lane 8, plasmid DNA exposed to 1.92 mg/ml of extract alone.

antioxidant activity with IC_{50} 0.42 mg/ml (Table 1).

3.3. Protective activity against free radical-induced DNA damage

All the extracts protected from $\text{ROO}\cdot$ -induced DNA damage with IC_{50} values ranging from 0.69 to 6.90 mg/ml (Table 1). The most potent was the extract 5 (*L. barbarum* variety), while the extract 8 (*L. barbarum* variety) had the lowest activity (Fig. 1). The most potent from *L. chinensis* extracts was the 10 with IC_{50} 1.95 mg/ml (Table 1).

3.4. Effects of goji berry extract on viability of C2C12 cells

The extract 5 from *L. barbarum* variety exhibited on average the highest antioxidant activity in free radical scavenging assays and $\text{ROO}\cdot$ -induced DNA damage. Thus, it was selected for examining its antioxidant effects in C2C12 muscle cells. However, at first, extract's effect on cell viability was assessed using the XTT assay, in order to use non-cytotoxic concentrations.

The results showed that the extract had cytotoxicity at concentration > 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Fig. 2). Thus, the non-cytotoxic concentrations used for the examination of the extract's antioxidant activity were 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.5. Antioxidant effects of goji berry extract in C2C12 muscle cells

For assessing the antioxidant effects of extract 5 in C2C12 cells, four oxidative stress markers were used, ROS, GSH, TBARS and CARB levels (Fig. 3).

GSH levels were assessed by flow cytometry. The findings showed that extract 5 increased GSH levels by 127.5 and 189.5% at 25 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively, compared to control (Fig. 3C).

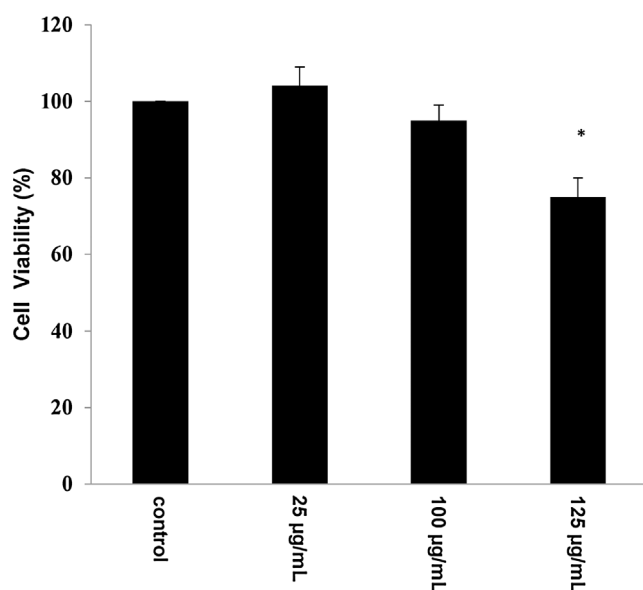


Fig. 2. Cell viability of C2C12 cells after treatment with the goji berry extract. The results represent the mean \pm SEM of three independent experiments carried out in triplicate. * $p < .05$: significantly different from the control value.

However, flow cytometry analysis demonstrated that treatment of cells with extract 5 did not affect ROS levels compared to control (Fig. 3C).

Regarding TBARS levels, a marker of lipid peroxidation, it was found that cell treatment with extract 5 decreased them by 21.8 and 9.4% at 25, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, compared to control (Fig. 3C).

Finally, extract 5 decreased CARB levels, a marker of protein oxidation, by 26.8 and 29.9% at 25, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, compared to control (Fig. 3C).

4. Discussion

L. barbarum fruits exhibit a number of beneficial health effects and are used widely in the Chinese traditional medicine [29]. Since *L. barbarum* fruits cultivated in many areas differ in their chemical composition, the potency of their bioactivities may also be different [30,31]. In a previous study, we have identified the optimal parameters for the UAE in order to receive extracts with high polyphenol and polysaccharide content from commercial imported goji berry fruits as well as from fruits cultivated in Greece [20]. UAE is an advanced green extraction method which uses ultrasound to increase the frequency and speed of molecular movement, solvent penetrating power and dissolution rate, and thus to reduce extraction time and efficiency of extraction. Thus, this method is very effective for increasing the production yield and the quality of bioactive extracts from natural materials [32]. In the present study, we investigated the antioxidant and antimutagenic activities of UAE extracts of goji berry from *L. barbarum* and *L. chinensis* varieties cultivated in the region of Thessaly in Greece.

The results demonstrated that the extracts from the variety of *L. barbarum* had higher concentrations in total carbohydrate and TPC compared with those of *L. chinensis* using the same extraction parameters, confirming the notion that *L. barbarum* fruits have higher nutritional quality [29]. Moreover, the results of the total carbohydrate and TPC of the extracts were in accordance with the results of our previous study [20] as well as of other studies [33,34]. Small differences in the total carbohydrate and TPC between different studies are probably due to the different conditions of the cultivated regions and cultivation seasons of the goji berry fruits [34].

Goji berry's carbohydrates are mainly "arabinogalactan-proteins" (AGPs), but they are mostly referred in the Chinese literature as "*L. barbarum* polysaccharide" (LBP). Matsumura et al., [35] pointed out that the galacturonic acid-containing pectin showed a strong free radical scavenging activity, probably due to the bond breakage between galacturonic acid and glucoside, resulting in pectin degradation. In general, goji berry's carbohydrates may play a major role in its antioxidant properties and exhibit several pharmacological and biological functions and are used widely in the Chinese traditional medicine [29].

The extract 5 exhibited the second higher total carbohydrate content and the highest TPC. These results were in accordance with its antioxidant activity, since it exhibited on average the highest antioxidant potency in DPPH \cdot and ABTS \cdot^+ assays and $\text{ROO}\cdot$ -induced DNA damage. The IC_{50} values of the tested extracts in the DPPH assay were similar with those presented for aqueous extracts by Kosar et al., [33]. However, Benchennouf et al., [36] found higher IC_{50} values than ours for the scavenging of DPPH \cdot from a water fraction from goji berry fruits cultivated in the Greek island of Crete and acquired by a Soxhlet

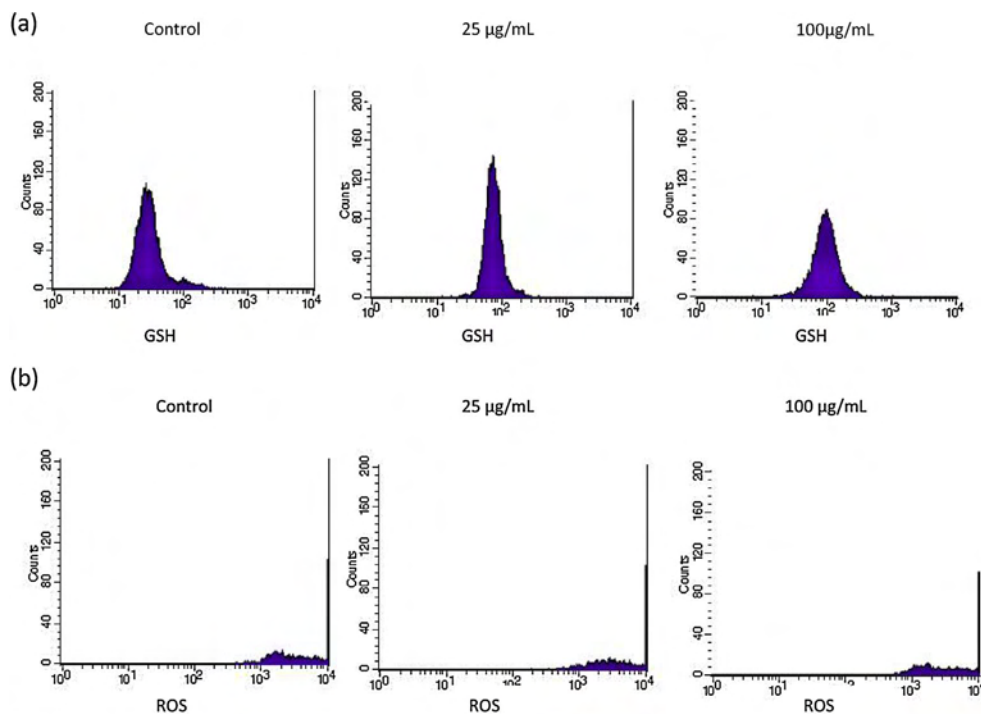
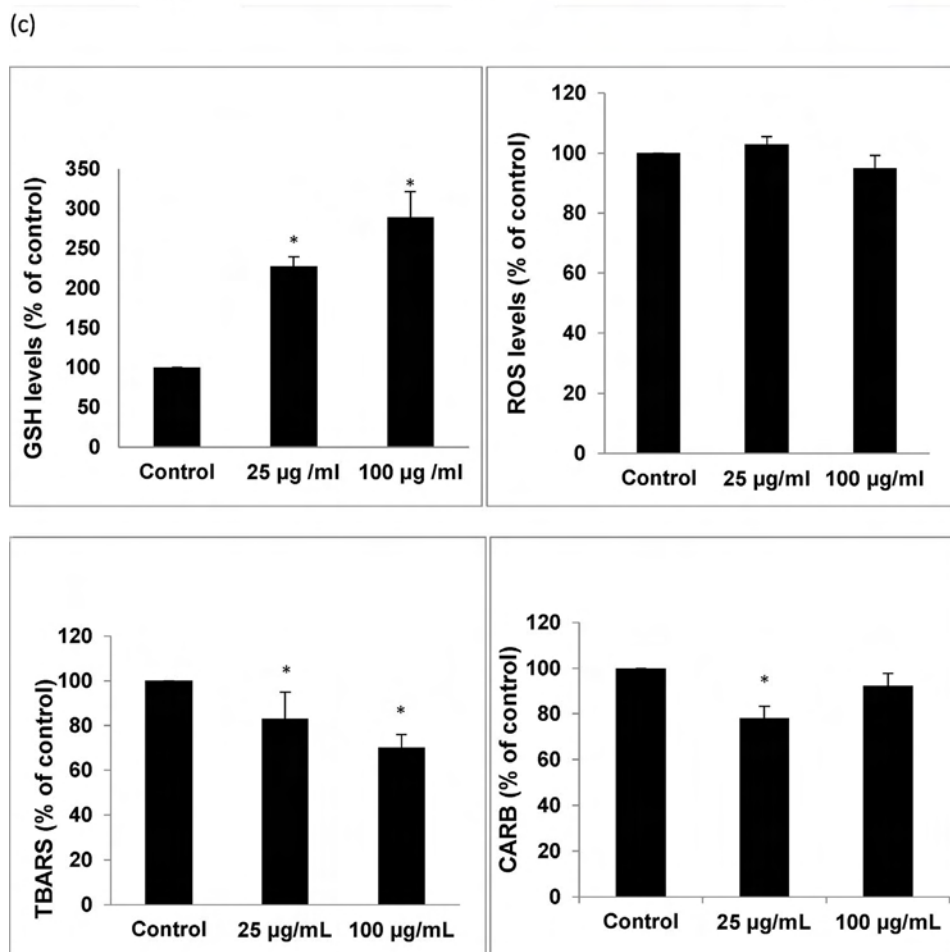


Fig. 3. Effects of the goji berry extract 5 after treatment for 24 h on oxidative stress markers in C2C12 cells. (a) The histograms of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using flow cytometer for the detection of GSH. The histograms represent the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. (b) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using flow cytometer for the detection of ROS. The histograms represent the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. For ROS and GSH measurement, C2C12 cells were incubated with 10 mM DCF-DA and 40 mM mercury orange respectively, for 30 min at 37 °C. The cells were then washed, suspended in PBS, and analyzed using flow cytometry, as described in Materials and methods section. (c) Effects of extract 5 on ROS, GSH, TBARS and CARB are shown. All values are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. *p < 0.05: significantly different from the control value.



extraction. Probably, the different soil and climatic conditions as well as the different extraction method and parameters (e.g. extraction temperature) led to these differences in the IC₅₀ results.

Moreover, the extracts showed to protect effectively at very low

concentrations from free radical-induced DNA damage. To the best of our knowledge, this is the first study to report the protective effects of *L. barbarum* and *L. chinensis* UAE extracts against DNA damage induced by ROO• radicals. Likewise, Ceccarini et al., [37] have demonstrated that

L. barbarum berries cultivated in Umbria (Italy) exerted antigenotoxic activity in human hepatocellular carcinoma cells. The extract 5 exhibited the highest protective activity against ROO· radical-induced DNA damage (2-fold higher than the second best protective activity). Importantly, as mentioned, extract 5 had also the second total carbohydrate content and the highest TPC which may account for this potent protective activity. For example, Zhao et al., [38] have shown that the highest antioxidant activity of *L. barbarum* extracts was attributed to their high carbohydrate content. Moreover, other studies have shown that carbohydrates from *L. barbarum* protected from DNA damage [39,40].

Furthermore, our results showed that treatment of muscle cells C2C12 with goji berry extract 5 resulted in the enhancement of their antioxidant status. Specifically, there was an increase in GSH levels, one of the most crucial antioxidant molecules, which exerts its antioxidant activity either through formation of S-conjugates or by serving as an electron donor from its sulfhydryl group (–SH) [41]. This finding suggested a crucial role of the increased GSH levels in the observed antioxidant activity of the goji berry extract in muscle cells. Our results were also in accordance with those from the study of Yi et al., [42] who used an orthogonal design to examine the UAE technology for the extraction of *L. barbarum* polysaccharides (LBP). Specifically, they demonstrated that LBP can increase superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) levels. In addition, administration of carbohydrates from *L. barbarum* has been shown to increase glutathione transferase (GST) and GSH levels activity in aging rats [43]. The observed increase in GSH levels by the goji berry extract treatment may be attributed to the activation of the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2). Nrf2 is a transcription factor regulating the expression of several antioxidant and cytoprotective enzymes and consists one of the major antioxidant responses to oxidative stress [44]. Moreover, Nrf2 regulates the expression of synthase gamma-glutamylcysteine (g-GCS) and glutathione reductase (GR) enzymes playing important role in the determination of GSH levels in cells [44,45]. Several studies in cell lines and *in vivo* have demonstrated that *L. barbarum* polysaccharides enhance antioxidant activity through induction of Nrf2 mechanism [45–47].

The increase of GSH in muscle cells was in accordance with the reduction in TBARS levels, a marker of lipid peroxidation. Lipid peroxidation is a self-propagating chain reaction which may cause damage to integrity of cell, endoplasmic reticulum and nucleus membranes, leading to a wide array of primary and secondary oxidation products such as conjugated dienes, lipid hydroperoxides, lipid aldehydes (e.g. MDA) and alkanes. *In vivo* studies have also shown that LBP administration reduces MDA levels after exercise-induced oxidative stress in rats [48]. Other *in vivo* studies have also demonstrated that the polysaccharides extracted from *L. barbarum* inhibited the formation of MDA in aged mice and increased antioxidant enzymes (SOD, GSH-Px, CAT), total antioxidant capacity (TAC) and immune functions [49,50].

Apart from reduction in lipid peroxidation, treatment of C2C12 muscle cells with *L. barbarum* extract 5 resulted in decrease in protein oxidation as shown by the reduction in CARB levels. This effect is important, since oxidative stress-induced carbonylation of proteins leads to the loss of their physiological function [51]. It is also believed that there is an association between lipid and protein oxidation [52]. Our results were consistent with those of Li et al., [8], who have demonstrated that carbohydrates from *L. barbarum* decreased protein oxidation damage in aged rats.

Although the treatment with the extract 5 from *L. barbarum* increased antioxidant mechanism and decreased lipid peroxidation and protein oxidation in muscle cells, it did not decrease ROS levels. In previous studies of our research group on other plant extracts, changes in ROS levels were also not accompanied by protection against oxidative stress-induced damage or increase in antioxidant mechanism levels. This may be explained by the fact that the increased antioxidant mechanisms (e.g. GSH) may be able to protect macromolecules from free

radical-induced damage but not to scavenge the ‘free forms’ of these radicals [25].

5. Conclusion

The findings of the present study indicated for the first time that UAE extracts of *L. barbarum* cultivated in Greece exhibited potent free radical scavenging activity and protected against DNA damage induced by free radicals. Moreover, it was shown for the first time that one of these extracts increased the antioxidant mechanism of GSH and decreased lipid peroxidation and protein oxidation in muscle cells. Thus, the findings suggested that *L. barbarum* extracts may be used as a food supplement to reduce the adverse effects of oxidative stress, especially after intensive exercise of athletes.

References

- [1] N. Goutzourelas, D. Stagos, N. Demertzis, P. Mavridou, H. Karterolioti, S. Georgadakis, E. Kerasioli, N. Aliagiannis, L. Skaltsounis, A. Statri, A. Tsioutsouliti, A. Tsatsakis, A. Hayes, D. Kouretas, Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells, *Hum. Exp. Toxicol.* 33 (2014) 1099–1112.
- [2] L.L. Ji, Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review, *Exp. Gerontol.* 42 (2007) 582–593.
- [3] K. Gerasopoulos, D. Stagos, S. Kokkas, K. Petrotos, D. Kantas, P. Goulas, D. Kouretas, Feed supplemented with byproducts from olive oil mill wastewater processing increases antioxidant capacity in broiler chickens, *Food Chem. Toxicol.* 82 (2015) 42–49.
- [4] M.G. Nikolaidis, A.Z. Jamurtas, V. Paschalis, I.G. Fatouros, Y. Koutedakis, D. Kouretas, The effect of muscle-damaging exercise on blood and skeletal muscle oxidative stress: magnitude and time-course considerations, *Sports Med. (Auckland, N.Z.)* 38 (2008) 579–606.
- [5] D.A. Hood, G. Uguccioni, A. Vainshtein, D. D'souza, Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle: implications for health and disease, *Comp. Physiol.* 1 (2011) 1119–1134.
- [6] S. Phaneuf, C. Leeuwenburgh, Apoptosis and exercise, *Med. Sci. Sports Exercise* 33 (2001) 393–396.
- [7] E. Kerasioli, A. Kiskini, A. Veskoukis, A. Jamurtas, C. Tsimpikou, A.M. Tsatsakis, Y. Koutedakis, D. Stagos, D. Kouretas, V. Karathanos, Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans, *Food. Chem. Toxicol.* 50 (2012) 2805–2810.
- [8] X.M. Li, Y.L. Ma, X.J. Liu, Effect of the Lycium barbarum polysaccharides on age-related oxidative stress in aged mice, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 504–511.
- [9] S.V. Leontopoulos, P. Skenderidis, V. Anatolioti, M.I. Kokkora, S. Tsilifoglou, K.B. Petrotos, I. Vagelas, Antifungal activity of azadirachta indica aqueous and non-aqueous extracts on colletotrichum gloeosporioides botryodiplodia theobromae and fusarium solani. A First Approach, *J. Food Biol. Eng.* 6 (1) (2017) 38–50.
- [10] S. Leontopoulos, P. Skenderidis, H. Kalorizou, K. Petrotos, Bioactivity Potential of polyphenolic compounds in human health and their effectiveness against various food borne and plant pathogens. A Review, *J. Food Bio. Eng.* 7 (2017) 1–19.
- [11] P.H.W. Chu, H.Y. Li, M.P. Chin, K.F. So, H.H.L. Chan, Effect of Lycium Barbarum (Wolfberry) Polysaccharides on preserving retinal function after partial optic nerve transection, *PLoS One* 8 (2013).
- [12] Q. Zhang, X. Du, Y. Xu, L. Dang, L. Xiang, J. Zhang, The effects of Gouqi extracts on Morris maze learning in the APP/PS1 double transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *Exp. Ther. Med.* 5 (2013) 1528–1530.
- [13] X.M. Li, Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats, *Int. J. Biol. Macromol.* 40 (2007) 461–465.
- [14] H.T. Wu, X.J. He, Y.K. Hong, T. Ma, Y.P. Xu, H.H. Li, Chemical characterization of lycium barbarum polysaccharides and its inhibition against liver oxidative injury of high-fat mice, *Int. J. Biol. Macromol.* 46 (2010) 540–543.
- [15] X.M. Li, Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats I, *Int. J. Bio Macromol.* 40 (2007) 461–465.
- [16] A. jun Niu, J. mei Wu, D. hai Yu, R. Wang, Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on oxidative damage in skeletal muscle of exhaustive exercise rats, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 447–449.
- [17] P. Bucheli, Q. Gao, R. Redgwell, V. Karine, J. Wang, W. Zhang, S. Nong, B. Cao, Chapter 14 Wolfberry Biomolecular and Clinical Aspects of Chinese, (2013), pp. 1–17.
- [18] J. Zhang, M. Li, G. Zheng, Effect of stand age on soil microbial community structure in wolfberry (Lycium barbarum L.) fields, *Act. Ecol. Sin.* 37 (2017) 10–17.
- [19] M.A. Wen-Ping, Ni Zhi-jing, Li Heb, Chen Min, Changes of the main carotenoid pigment contents during the drying processes of the different harvest stage fruits of lycium barbarum I, *Agric. Sci. China* 7 (2008) 363–369.
- [20] P. Skenderidis, K. Petrotos, I. Giavasis, C. Hadjichristodoulou, A. Tsakalof, Optimization of ultrasound assisted extraction of goji berry (Lycium barbarum) fruits and evaluation of extracts' bioactivity, *J. Food Proc. Eng.* (2016).
- [21] M. DuBois, K. a. Gilles, J.K. Hamilton, P. a. Rebers, F. Smith, Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.* 28 (1956) 350–356.

- [22] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventós, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.* 299 (1998) 152–178.
- [23] A.L. Waterhouse, Determination of Total Phenolics, In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [24] C. Spanou, D. Stagos, L. Tousias, A. Angelis, N. Aligiannis, A.L. Skaltsounis, D. Kouretas, Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays, *Anticancer Res.* 27 (2007) 3403–3410.
- [25] E. Kerasiotti, D. Stagos, A. Priftis, S. Aivazidis, A.M. Tsatsakis, A.W. Hayes, D. Kouretas, Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells, *Food Chem.* 155 (2014) 271–278.
- [26] A. Priftis, D. Stagos, K. Konstantinopoulos, C. Tsitsimpikou, D.A. Spandidos, A.M. Tsatsakis, M.N. Tzatzarakis, D. Kouretas, Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods, *Mol. Med. Rep.* 12 (2015) 7293–7302.
- [27] G.E. Symons, B. Morey, The effect of drying time on the determination of solids in sewage and sewage sludges, *Sewage Works J.* 13 (1941) 936.
- [28] N. Patsoukis, G. Zervoudakis, N.T. Panagopoulos, C.D. Georgiou, F. Angelatou, N.A. Matsokis, Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure, *Neurosci. Lett.* 357 (2004) 83–86.
- [29] J. Cheng, Z.-W. Zhou, H.-P. Sheng, L.-J. He, X.-W. Fan, Z.-X. He, T. Sun, X. Zhang, R.J. Zhao, L. Gu, C. Cao, S.-F. Zhou, An evidence-based update on the pharmacological activities and possible molecular targets of Lycium barbarum polysaccharides, *Drug Des. Dev. Ther.* 9 (2015) 33–78.
- [30] Z. Zhou, J. Xiao, H. Fan, Y. Yu, R. He, X. Feng, H. Kurihara, K. So, X. Yao, H. Gao, Polyphenols from wolfberry and their bioactivities, *Food Chem.* 214 (2017) 644–654.
- [31] Jing Z. Dong, Analysis on the main active components of Lycium barbarum fruits and related environmental factors, *J. Med. Plants Res.* 6 (2012) 2276–2283.
- [32] Y. Picó, Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 84–99.
- [33] M. Kosar, A. Altintas, N. Kirimer, K.H.C. Baser, Determination of the free radicals scavenging activity of Lycium extracts, *Chem. Nat. Comp.* 39 (2003) 439–442.
- [34] G.Q. Zheng, Z.Y. Zheng, X. Xu, Z.H. Hu, Variation in fruit sugar composition of Lycium barbarum L. and Lycium chinense Mill. of different regions and varieties, *Biochem. Syst. Ecol.* 38 (2010) 275–284.
- [35] Y. Matsumura, M. Egami, C. Satake, Y. Maeda, T. Takahashi, A. Nakamura, T. Mori, Inhibitory effects of peptide-bound polysaccharides on lipid oxidation in emulsions, *Food Chem.* 83 (2003) 107–119.
- [36] A. Benchenouf, S. Grigorakis, S. Loupassaki, Phytochemical analysis and antioxidant activity of Lycium barbarum (Goji) cultivated in Greece, *Pharm. Biol.* 55 (2017) 596–602.
- [37] M.R. Ceccarini, S. Vannini, S. Cataldi, M. Moretti, M. Villarini, B. Fioretti, E. Albi, T. Beccari, M. Codini, In vitro protective effects of Lycium barbarum berries cultivated in Umbria (Italy) on human hepatocellular carcinoma cells, *BioMed Res.* 1 (2016) 7529521.
- [38] H. Zhao, A. Alexeev, E. Chang, G. Greenburg, K. Bojanowski, Lycium barbarum glycoconjugates: effect on human skin and cultured dermal fibroblasts, *Phytomedicine* 12 (2005) 131–137.
- [39] L. Gan, J. Wang, S. Zhang, Inhibition the growth of human leukemia cells by Lycium barbarum polysaccharide, *J. Hyg. Res.* 30 (2001) 333–335.
- [40] N.-C. Lin, J.-C. Lin, S.-H. Chen, C.-T. Ho, A.-I. Yeh, Effect of goji (Lycium barbarum) on expression of genes related to cell survival, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 10088–10096.
- [41] B.P. Yu, Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* 74 (1994) 139–162.
- [42] R. Yi, X.-M. Liu, Q. Dong, A study of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect, *Afr. J. Tradit. Comp. Altern. Med.* 10 (2013) 171–174.
- [43] L. Jing, O. Qin, S. Jie, Study of Effect of Lycium Barbarum Polysaccharides on Protein Oxidation Damage in D-gal-induced Aging Rats, (2018), pp. 2384–2385. Available at <http://europepmc.org/abstract/CBA/648268>.
- [44] S. Vomund, A. Schafer, M.J. Parnham, B. Brune, A. von Knethen, Nrf2, the master regulator of anti-oxidative responses, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017).
- [45] S. Cao, J. Du, Q. Hei, Lycium barbarum polysaccharide protects against neurotoxicity via the Nrf2-HO-1 pathway, *Exp. Ther. Med.* 14 (2017) 4919–4927.
- [46] H. Li, Z. Li, L. Peng, N. Jiang, Q. Liu, E. Zhang, B. Liang, R. Li, H. Zhu, Lycium barbarum polysaccharide protects human keratinocytes against UVB-induced photo-damage, *Free Rad. Res.* 51 (2017) 200–210.
- [47] M. He, H. Pan, R.C.-C. Chang, K.-F. So, N.C. Brecha, M. Pu, Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage, *PLoS One* 9 (2014) e84800.
- [48] Duan Changbo, Supplementation of Lycium barbarum polysaccharides protection of skeletal muscle from exercise-induced oxidant stress in mice, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6 (2012) 643–647.
- [49] B. Liang, M. Jin, H. Liu, Water-soluble polysaccharide from dried Lycium barbarum fruits: isolation, structural features and antioxidant activity, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 1947–1951.
- [50] X.M. Li, X.L. Li, A.G. Zhou, Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from Lycium barbarum fruits in vitro, *Eur. Polym. J.* 43 (2007) 488–497.
- [51] M.F. Beal, Oxidatively modified proteins in aging and disease, *Free Radical Biol. Med.* 32 (2002) 797–803.
- [52] Y.V. Vasil'ev, S.-C. Tzeng, L. Huang, C.S. Maier, Protein modifications by electrophilic lipoxidation products: adduct formation, chemical strategies and tandem mass spectrometry for their detection and identification, *Mass Spectrom. Rev.* 33 (2014) 157–182.