

UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Sonja P. Pecić

**“Uticaj plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum* na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija”**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF AGRICULTURE

Sonja P. Pecić

**“The effect of fruit body of *Ganoderma lucidum*  
on chemical composition and sensory  
properties of special brandy”**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

**Mentor**

**Prof. dr Ninoslav Nikićević, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu  
Poljoprivredni fakultet

**Članovi komisije**

**Prof. dr Miomir Nikšić, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu  
Poljoprivredni fakultet

**Prof. dr Vele Tešević, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu  
Hemijski fakultet

**Prof. dr Ida Leskošek Čukalović, redovni profesor**  
Univerzitet u Beogradu  
Poljoprivredni fakultet

**Prof.dr Predrag Vukosavljević, vanredni profesor**  
Univerzitet u Beogradu  
Poljoprivredni fakultet

**Datum odbrane :**

## **POSVETA**

***Mom najdražem ocu Petru, zahvaljujem za  
sve što je učinio za svoju decu***

## ZAHVALNICA

*Najiskrenije se zahvaljujem na pomoći i podršci koju mi je pružio tokom izrade i pisanja doktorske disertacije svom metoru prof. dr. Ninoslavu Nikićeviću.*

*Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr. Miomiru Nikšiću, koji je predložio temu i svojim savetima i sugestijama aktivno učestvovao u izradi ovog rada.*

*Prof. dr. Idi Ileskošek-Čukalović zahvaljujem se na iskrenoj i neizmernoj podršci koju mi je pružila od prvog dana mog rada na fakultetu.*

*Zahvaljujem se prof. dr. Veletu Teševiću, vanredovnom profesoru Hemijskog fakulteta u Beogradu, i njegovim saradnicima na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog rada i značajnim sugestijama tokom obrade rezultata.*

*Prof. dr. Predragu Vukosavljeviću zahvaljujem se na entuzijazmu uloženom u izradu moje doktorske disertacije.*

*Posebno se zahvaljujem direktoru Ekonomskog instituta Draganu Šagovnoviću, kao i kolegama na nesebičnoj podršci i razumevanju. Zahvaljujem se i kolegama sa katedre za konzervisanje i vrenje na nesebičnoj pomoći koju su mi pružili prilikom izrade moje doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se Lani Filipović sa Instituta za onkologiju i radiologiju na pomoći u eksperimentalnom radu i korisnim savetima u izradi disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici na nesebičnoj podršci i razumevanju tokom decenijskog školovanja. Zahvaljujem se mom suprugu i kolegi, na razumevanju, korisnim savetima i nesebičnom podršci tokom izrade disertacije. Svojoj ćerki Jani se zahvaljujem na razumevanju za mamine obaveze.*

# Uticaj plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum* na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija

## REZIME

*Ganoderma lucidum* - hrastova sjajnica je jedna od najznačajnijih gljiva koja se upotrebljava u Kini i Japanu u poslednjih 4000 godina kao lek, pomoćno lekovito sredstvo ili eliksir. Spada u medicinske nejestive gljive, koja se najčešće koristi u obliku ekstrakata u vrućoj vodi, koncentrata, rastvora i praha. Plodonosno telo ove gljive obiluje bioaktivnim komponentama, od kojih su najznačajnije biološko dejstvo imaju polisaharidi, triterpeni i polifenoli. Analizom hemijskog sastava gljive *Ganoderma lucidum* do sada je izolovano više od 140 različitih triterpena lanostanskog tipa i većina je izuzetno gorkog ukusa, a najveći deo čine ganoderinske kiseline.

Destilati jakih alkoholnih pića imaju zanemarljivu količinu biološki aktivnih jedinjenja, a njihov sastav se oplemenjuje sazrevanjem u drvenim buradima ili dodatkom bilja čime se povećava biološko dejstvo. Maceracijom gljive *Ganoderma lucidum* u alkoholnim pićima se postiže efikasnija kompozicija i povećava rastvaranje biološki aktivnih materija u poređenju sa ekstrakcijom u vodenom rastvoru.

U radu su proizvedeni alkoholni ekstrakti i macerirana gljiva *Ganoderma lucidum* u alkoholnim medijumima šljivovici, lozovači, vinskim destilatima i travaricama da bi analizirali efekat jedinjenja gljive na hemijski sastav i senzorne karakteristike jakih pića. Takođe, definisani su optimalni uslovi ekstrakcije za proizvodnju jakih pića. U radu su korišćene koncentracije gljive od 1, 2.5 i 4 %, koje su estrahovane u različitim vremenskim periodima od 7, 21 i 60 dana. Dodatkom gljive kod svih uzoraka sadržaj polifenola i antioksidativni kapacitet su se povećavali. Sa povećanjem koncentracije dodate gljive povećava se sadržaj polifenola, ali vreme ekstrakcije se mora prolongirati da bi ekstrakcija polifenolnih materija bila kompletna. Izuzetak je vinski destilat kod koga je ekstrakcija polifenolnih materija sa 4% gljive završena nakon 7 dana. Najveći sadržaj ukupnih

polifenola imao je uzorak vinskog destilata sa 4% *G.lucidum* ekstrahovane tokom 7 dana (148 mg/L GAE), a antioksidativni kapacitet za dati uzorak određivan DPPH, FRAP i TEAC metodama iznosio je 0,641 mM TE, 1.852 FRAP jedinica i 3.963 mM TE, respektivno.

Da bi standardizovali i pojednostavili proizvodnju specijalnih jakih pića ispitivan je mogućnost korišćenja etanolnog ekstrakta gljive *Ganoderma lucidum*. Ustanovnjeno je da faktori ekstrakcije, veličina čestica i vreme ekstrakcije, imaju značajan efekat na sadržaj ukupnih polifenola, ali i senzorne karakteristike. Parametri ekstrakcije nisu uticali na kvalitativni sastav etanolnih ekstrakta gljive u kojima je pomoću HPLC-DAD/ESI-ToF-MS analize identifikovano 15 triterpenskih kiselina: ganoderinske kiseline (A, B, C2, C6, D, F, G, J), ganoderenske kiseline (D), lucidenske kiseline (A, E, D2, LM1), 12-hidroksi-ganoderinska kiselina D i elfingeniska kiselina A. Sadržaj gorkih triterpenskih kiselina se sa povećanjem vremena ekstrakcije značajno smanjuje kod uzoraka ekstrakata proizvedenih od seckane gljive, pa se gorčina analiziranih uzoraka smanjuje. Uzorak sa najboljim aromatskim kompleksom i najvećim sadržajem fenolnih materija je uzorak napravljen od seckane gljive ekstrahovane tokom 30 dana.

Maceracijom gljive *Ganoderma lucidum* u vinskom destilatu, šljivovici, lozovači i travaricama dolazi do promene hemijskog sastava i senzornih karakteristika usled prelaska jedinjenja gljive rastvorljivih u alkoholno vodenoj smeši. Na osnovu analize sadržaja ukupnih fenola, antioksidativnih karakteristika i senzornih karakteristika možemo zaključiti da ekstraktibilna jedinjenja gljive su se najbolje uklapala u hemijskih kompleks vinskog destilata i povećala funkcionalne karakteristike pića, a ujedno oplemenjivala i njihove senzorne karakteristike. Vinski destilat se pokazao i kao najbolja alkoholna sirovina za proizvodnju specijalnih travarica sa gljivom *G.lucidum*.

Ekstrahovana jedinjenja gljive menjaju i intezitet i koloritet boje uzoraka, pa etanolni ekstrakti mogu biti interesantna zamena karmelu, koji se danas koristi za standardizaciju boje jakih alkoholnih pića. U zavisnosti od načina proizvodnje ekstrakta imamo različit uticaj na intenzitet boje žitne rakije. Dodatkom većih količina ekstrakta intenzitet boje se povećava kod ispitivanih uzoraka.

Sa odabranim uzorcima etanolnog ekstrakta gljive *Ganoderma lucidum*, specijalnim rakijama i specijalnim travaricama proizvedenim dodatkom gljive *G.lucidum* ispitivano je antimikrobno dejstvo na standardne mikroorganizme *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enteritidis* ATCC 31806 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032. Najefikasnije antimikrobno dejstvo na ispitivane mikroorganizme imao je uzorak specijalne travarice napravljen sa dodatkom 40 g/L gljive *G. lucidum* i ekstrakta bilja.

U radu je ispitivan antiproliferativni efekat liofilizovanih ekstrakta gljive *G. lucidum* na ćelijske humanog karcinoma grlića materice (HeLa). Na osnovu rezultata, može se zaključiti da oni imaju vremenski i dozno zavisno dejstvo. Antiproliferativni efekat liofilizovanog uzorka šljivove rakije obogaćenog jedinjenjima gljive *G. lucidum* i mešavine bilja ispitivan je na ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa), ćelije humanog melanoma (FemX), ćelije adenokarcinoma pluća (A549) i transformisane endotelijalne humane linije (EA.hy 926). Na osnovu IC<sub>50</sub> vrednosti možemo rangirati antiproliferativno dejstvo uzorka obogaćenog jedinjenjima gljive i bilja na ćelijske linije: HeLa >FemX>EA.hy 926>A549.

**Ključne reči** *Ganoderma lucidum*, etanolni ekstrakt, senzorne karakteristike, antimikrobno dejstvo, antiproliferacija, LC-MS analiza, GC-MS-analiza, triterpeni, antioksidativnost, određivanje boje

**Naučna oblast** Biotehnologija

**Uža naučna oblast** Tehnologija konzervisanja i vrenja

**UDK broj** 663.551.5:582.28(043.3)



## **The effect of fruit body of *Ganoderma lucidum* on chemical composition and sensory properties of special brandy**

### **ABSTRACT**

*Ganoderma lucidum* - Reishi is one of the most important fungus used in China and Japan over the last 4000 years as a drug, additional remedy, or elixir. It belongs to the medical inedible mushrooms, which are commonly used in the form of extracts in hot water, concentrates, solutions and powders. Fruit body of this fungus is a rich source of bioactive components, where the most significant biological activity have polysaccharides, triterpenes and polyphenols. Analysis of chemical composition shows that fungus *Ganoderma lucidum* contain more than 140 different lanostane-type triterpenoids and the most of them have extremely bitter taste. Ganoderic acid is the most represented triterpenoid compound in *Ganoderma lucidum*.

Distilled beverages have a negligible amount of biologically active compounds. Their composition and biological activity could be improved by maturation in wooden barrels or the addition of herbs. Maceration of *Ganoderma lucidum* in alcoholic beverages providing more efficient composition and increase the dissolution of biologically active substances compared with extraction in aqueous solution.

In this paper, alcoholic extracts of the mushroom *Ganoderma lucidum* and its macerates in alcoholic media such as plum brandy, grape brand, wine distillates and herb brandy were produced. The effects of the compounds from fungi on chemical composition and sensory characteristics of strong drinks were analyzed. At the same time, the optimum production conditions for these specific strong beverages with this fungus were defined. Concentration of fungus was 1, 2.5 and 4%, and extraction was carried out at three different time periods: 7, 21 and 60 days. As a result of the mushroom addition in spirit drinks, in all samples polyphenol content and antioxidant capacity was increased. Polyphenol content was increased with increasing concentrations of added mushroom, but extraction time has

to be prolonged in order to enhance extraction efficiency. The exception was the wine distillate where the extraction of polyphenolic substances from mushroom (mushroom ratio in spirit was 4 %) was completed after 7 days. The highest content of total polyphenols had a sample of wine distillate with 4 % of *G. lucidum* extracted for 7 days (148 mg / L GAE). Antioxidant capacity for a given sample determined by DPPH, FRAP and TEAC methods were 0.641 mM TE, 1,852 FRAP units and 3,963 mM TE, respectively.

In order to standardize and simplify the production of special strong drinks, the possibility of using ethanol extracts of the mushroom *Ganoderma lucidum* were investigated. It was found that parameters of extraction such as particle size and extraction time have a significant effect on the content of total polyphenols and sensory characteristics. The extraction parameters did not effect on the qualitative composition of the ethanol extracts of mushroom, which were detected by HPLC-DAD / ESI-ToF-MS analysis. 15 triterpene acids were identified: ganoderic acid (A, B, C2, C6, D, F, G, J), ganoderenic acid (D), lucidenic acid (A, E, D2, LM1), 12-hydroxy-D ganoderic acid and elfingenic acid A. The content of bitter triterpene acids was significantly decreased with increasing extraction time in the samples produced with chopped fungi, and as consequence the bitterness of these samples was decreased. The sample with the best aromatic complex and the highest content of phenolic compounds was produced with chopped mushrooms extracted for 30 days.

Chemical composition and sensory characteristics of wine distillate, plum, grape and herb brandy were changed by maceration of *Ganoderma lucidum* due to the transition of soluble mushroom compounds in alcohol-water mixture. Based on the analysis of the content of total phenolics, antioxidant properties and sensory characteristics, it can be concluded that extracted mushroom compounds refined the chemical complex of wine distillate and increased functional features of drinks, and also improved their sensory characteristics. Wine distillate was the best alcoholic base for the production of special herb with *G. lucidum* fungus.

The extracted mushroom compounds influence on the color intensity of samples, and ethanol extracts could be of interest to substitute caramel, which is now used for the standardization of spirits color. The method of extract production has a different impact on

the intensity of the color of grain brandy. The addition of large quantities of *G.lucidum* extract increased the color intensity of the samples.

Antimicrobial effects of selected ethanol extracts of *Ganoderma lucidum*, special brandy and bitters produced by addition of *G. lucidum* fungus on the standard microorganisms *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ATCC 31806, *Salmonella enteritidis* and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032 were studied. The most effective antimicrobial effect on the tested microorganisms had a herb bitters made with the addition of 40 g / L of *G. lucidum*.

In this paper, inhibiting effect of lyophilized extracts of *G. lucidum* on cell proliferation in human cell cervical carcinoma (HeLa) was examined. According to the results, it can be concluded that samples inhibit the proliferation in a dose- and time dependent manner. Antiproliferative activity of lyophilized plum brandy sample enriched with *G. lucidum* compounds and mixtures of plants was examined in human cervical carcinoma (HeLa), human melanoma cells (FemX), lung adenocarcinoma cells (A549) and transformed human endothelial lines (EA.hy 926). Based on the IC50 values the antiproliferative effect of samples fortified with mushrooms and herbs compounds on cell lines it could be ranked as: HeLa> FemX> EA.hy 926> A549.

**Key words:** *Ganoderma lucidum*, ethanol extract, sensory characteristics, antimicrobial effect, antiproliferation, LC-MS analyses, GC-MS analyses, triterpens, antioxidative activity, color determination.

**Academic Expertise:** Biotechnology

**Field of Academic Expertises:** Conservation and fermentation technology

**UDC** 663.551.5:582.28(043.3)

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. OPŠTI DEO</b>	3
<b>2.1. <i>Ganoderma lucidum</i></b>	3
<b>2.1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE <i>G. lucidum</i></b>	3
<b>2.1.2. HEMIJSKI SASTAV GLJIVE <i>G. lucidum</i></b>	11
<b>2.1.2.1. Triterpeni</b>	12
<b>2.1.2.2. Polisaharid</b>	17
<b>2.1.2.3. Ostali konstituenti</b>	18
<b>2.1.3. TERAPEUTSKA PRIMENA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i></b>	20
<b>2.1.3.1. Antikancerogeno dejstvo</b>	22
<b>2.1.3.2. Imunomodulatorsko dejstvo</b>	25
<b>2.1.3.3. Antioksidativno dejstvo</b>	25
<b>2.1.3.4. Antimikrobno dejstvo</b>	26
<b>2.2. JAKA ALKOHOLNA PIĆA</b>	29
<b>2.2.1. VOĆNE RAKIJE</b>	31
<b>2.2.1.1. Šljivovica</b>	31
<b>2.2.1.2. Tehnološki postupak proizvodnje šljivovica</b>	32
<b>2.2.2. RAKIJE OD GROŽĐA</b>	33
<b>2.2.2.1. Lozovača</b>	33
<b>2.2.2.1.1. Tehnološki postupak proizvodnje lozovače</b>	34
<b>2.2.2.2. Vinski destilat</b>	35
<b>2.2.2.2.1. Tehnološki postupak proizvodnje vinskog destilata</b>	36
<b>2.2.3. ŽITNI AKOHOL</b>	39

2.2.3.1.	Tehnološki postupak proizvodnje rafinisanog žitnog alkohola	40
2.3.	<b>AROMATIČNA JEDINJENJA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA</b>	42
2.4.	<b>TRAVARICE</b>	47
2.5.	<b>JAKA ALKOHONA PIĆA SA DODATKOM GLJIVE</b> <i>Ganoderma lucidum</i>	48
3.	<b>NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	50
4.	<b>EKSPERIMENTALNI DEO</b>	51
4.1.	<b>ANALIZA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i></b>	51
4.1.1.	ODREĐIVANJE VLAGE	52
4.1.2.	ODREĐIVANJE PEPELA	52
4.1.3.	SADRŽAJ PROTEINA	52
4.1.4.	ODREĐIVANJE MASTI	53
4.1.5.	SADRŽAJ UGLJENIH HIDRATA	53
4.1.6.	PRIPREMA MATERIJALA	54
4.2.	<b>ALKOHOLNI MEDIJUMI</b>	54
4.2.1.	<b>ANALIZA ALKOHOLNIH MEDIJUMA</b>	55
4.2.1.1.	Određivanje sadržaja etanola	55
4.2.1.2.	Određivanje sadržaja metanola spektrofotometrijskim putem pomoću hromotropne kiseline u alkoholnim pićima	55
4.2.1.3.	Određivanje ukupnih kiselina	57
4.2.1.4.	Određivanje ukupnih estara	58
4.2.1.5.	Određivanje viših alkohola kolorimetrijskom metodom pomoću <i>p</i> - dimetilaminobenzaldehida (po Pejno-u i Gimbertou)	59
4.2.1.6.	Određivanje sadržaja aldehida	60
4.2.1.7.	Određivanje ukupnog ekstrakta	61
4.2.1.8.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja benzaldehida	61

4.2.1.9.	Određivanja sadržaja ukupne cijanovodonične kisiline (HCN)	62
4.2.2.	<b>ANALIZA KVALITETA RAFINISANOG ŽITNOG ALKOHOLA</b>	63
4.2.2.1.	Ispitivanje kvaliteta rafinade po metodi Barbe-a	63
4.2.2.2.	Dokazivanje prisustva furfurala u rafinisano etanolu	64
4.3.	<b>AROMATIČNO I LEKOVITO BILJE</b>	64
4.4.	<b>EKSTRAKCIJA ALKOHOLNIH MEDIJUMIMA</b>	66
4.4.1.	<b>PROIZVODNJA EKSTRAKATA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i></b>	67
4.4.2.	<b>PROIZVODNJA PIĆA SA DODATKOM GLJIVE</b>	68
4.5.	<b>ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA</b>	68
4.6.	<b>ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI</b>	69
4.6.1.	DPPH METODA	69
4.6.2.	FRAP METODA	70
4.6.3.	TEAC METODA	70
4.7.	<b>ODREĐIVANJE BOJE EKSTRAKATA I PIĆA DA DODATKOM <i>Ganoderma lucidum</i></b>	71
4.7.1.	AOAC METODA ZA ODREĐIVANJE BOJE DESTILISANIH PIĆA	71
4.7.2.	CIELAB METODA	71
4.8.	<b>ODREĐIVANJE <math>\beta</math>-GLUKANA EKSTRAKTA</b>	72
4.8.1.	ODREĐIVANJE UKUPNIH GLUKANA	73
4.8.2.	ODREĐIVANJE $\alpha$ -GLUKANA	73
4.9.	<b>HPLC ANALIZA ŠEĆERA EKSTRAKATA</b>	74
4.10.	<b>LC- MS I HPLC/DAD ANALIZA EKSTRAKATA PEČURAKA I JAKIH PIĆA SA DODATKOM PEČURKE</b>	75
4.10.1.	HPLC-DAD/ESI-TOF-MS ANALIZA NEISPARLJIVIH KOMPONENTI EKSTRKATA I SPECIJALNIH RAKIJA	75

4.10.2.	HPLC/DAD ANALIZA FENOLNIH KOMPONETI	76
4.11.	GC-MS ANALIZA AROMATSKOG KOMPLEKSA PIĆA	77
4.12.	ANTIMIKROBNA ANALIZA	78
4.13.	SENZORNA ANALIZA JAKIH PIĆA OBOGAĆENIH <i>Ganoderma lucidum</i> I EKSTRAKTOM BILJA	79
4.14.	ANALIZA ANTIKANCEROGENOG DEJSTVA KOMPLEKSA OBOGAĆENIH <i>Ganoderma lucidum</i>	81
4.14.1.	KULTURE ĆELIJA	81
4.14.2.	SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA RPMI 164	82
4.14.3.	PRIPREMA RPMI 1640 HRANLJIVE PODLOGE	83
4.14.4.	SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA DMEM	83
4.14.5.	PRIPREMA DMEM HRANLJIVE PODLOGE	85
4.14.6.	POSTUPAK ODRŽAVANJA KULTURE ĆELIJA	85
4.14.7.	POSTUPAK PASAŽIRANJA KULTURA ĆELIJA	86
4.15.	POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENIH <i>Ganoderma lucidum</i>	86
4.15.1.	POSTUPAK ODREĐIVANJA VIABILNOSTI ĆELIJA	86
4.15.2.	POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENOG GLJIVOM <i>Ganoderma lucidum</i> I EKSTRATOM BILJA	87
4.15.2.1.	Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT testom	88
4.15.2.2.	Konstrukcija kalibracione krive za mtt	88
4.15.2.3.	Postupak određivanja preživljavanja ćelija MTT	89
4.15.2.4.	Obrada podataka	89
4.16.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	90
5.	REZULTATI I DISKUSIJA	91
5.1.	ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA GLJIVE <i>Ganoderma</i>	91

	<i>lucidum</i>	
<b>5.2.</b>	<b>ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ALKOHOLNIH MEDIJA</b>	94
5.2.1.	ANALIZA AROMATSKOG SASTAVA ALKOHOLNIH MEDIJUMA	94
<b>5.3.</b>	<b>ANALIZA ETANOLNIH EKSTRAKTA <i>Ganoderma lucidum</i></b>	98
5.3.1.	ANALIZA ŠEĆERA EKSTRAKATA <i>Ganoderma lucidum</i>	98
5.3.2.	ANALIZA SADRŽAJA $\beta$ -GLUKANA U EKSTRAKTIMA <i>Ganoderma lucidum</i>	99
5.3.3.	ANALIZA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNOSTI UZORKA EKSTRAKATA GLJIVE	101
5.3.4.	ANALIZA FENOLNIH JEDINJENJA EKSTRAKATA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i>	103
5.3.5.	ANALIZA FENOLNIH JEDINJENJA EKSTRAKATA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i>	105
5.3.6.	ANALIZA BOJE EKSTRAKATA GLJIVE <i>Ganoderma lucidum</i>	111
<b>5.4.</b>	<b>PICA OBOGAĆENA GLJIVOM <i>Ganoderma lucidum</i></b>	113
5.4.1.	SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET SPECIJALNIH RAKIJA	113
5.4.2.	ANALIZA BOJE UZORAKA SPECIJANIH RAKIJA	121
5.4.3.	SADRŽAJ TRITERPENSKIH KISELINA U UZORCIMA ŽITNOG ALKOHOLA SA DODATKOM GLJIVE <i>G. lucidum</i>	138
5.4.4.	ANALIZA ISPARLJIVIH JEDINJENJE SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM GLJIVE <i>G. lucidum</i>	144
5.4.5.	SENZORNA ANALIZA SPECIJALNIH RAKIJA SA <i>Ganoderma lucidum</i>	148
<b>5.5.</b>	<b>SPECIJALNE TRAVARICE SA <i>G. lucidum</i></b>	151



5.5.1.	ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET SPECIJALNIH TRAVARICA SA <i>Ganoderma lucidum</i>	152
5.5.2.	ANALIZA AROMATSKIH JEDINJENJA SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM GLJIVE <i>G. lucidum</i>	155
5.5.3.	SENZORNA ANALIZA SPECIJALNIH TRAVARICA	157
5.6.	<b>ANTIMIKROBNO DEJSTVO EKSTRAKTA I SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM <i>G.lucidum</i></b>	160
5.7.	<b>POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENOG <i>G. lucidum</i></b>	162
6.	<b>ZAKLJUČAK</b>	166
7.	<b>LITERATURA</b>	172

## 1. UVOD

U razvijenim zemljama sveta glavni uzroci smrti ili oboljenja kao što su kardiovaskularna oboljenja, dijabetes, moždani udar, arteroskleroza, gojaznost, različiti tipovi kancera, su u najvećoj meri povezani sa načinom ishrane (Barasi, 1997). Polazeći od svesti o povezanosti ishrane sa nastankom oboljenja razvijen je koncept „funkcionalne hrane“ i uvedena je nova naučna disciplina - „nauka o funkcionalnoj hrani“ (Sadler i Saltmarch, 1998). Hrana se može smatrati funkcionalnom ukoliko sadrži sastojke (nutrijente ili nenutrijente) koji na identifikovan pozitivan način deluju na jednu ili više telesnih funkcija. Prema definiciji Akademije nauka SAD-a funkcionalna hrana obuhvata potencijalno lekovite proizvode uključujući svaku modifikovanu hranu ili sastojak hrane koji može obezbediti veći zdravstveni efekat od tradicionalnih nutrijenata koje sadrži. Nauka o funkcionalnoj hrani se danas smatra delom nauke o hrani čiji je glavni cilj održavanje dobrog zdravlja, produžavanje životnog veka i stvaranje uslova za redukciju rizika od oboljenja.

Vekovima se u mnogim društvima širom sveta gljive smatraju za veoma ukusnu i nutritivno bogatu hranu. Rane civilizacije su najverovatnije metodom probe i greške izgradile znanje o gljivama, pri čemu su veoma dobro razlikovali one pogodne za ishranu i one koje su otrovne, koristeći i jedne i druge, u zavisnosti od potrebe. Pored nutritivne vrednosti, mnoge jestive i nejestive gljive se već nekoliko hiljada godina koriste u medicinske svrhe, naročito na Dalekom istoku (Hobbs, 1995). Stara Kineska poslovice kaže: „Hrana i lek imaju isto poreklo“ (Klaus i saradnici, 2008). Danas je poznato više od 15 hiljada vrsta pečuraka, od kojih 2 hiljade njih se mogu koristiti u ishrani, a za oko 650 vrsta je utvrđeno da poseduju različita terapijska svojstva (Rai i saradnici, 2005).

Najčešće korišćene jestive gljive sa medicinskim i funkcionalnim svojstvima su vrste iz rodova *Lentinus*, *Auricularia*, *Hericum*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus* i *Tremella*, dok se samo zbog svojih medicinskih svojstava upotrebljavaju i nejestive gljive,

*Ganoderma* i *Trametes* (nejestive su zbog svoje grube i tvrde teksture i gorkog ukusa) (Smith i saradnici, 2002).

*Ganoderma lucidum* - hrastova sjajnica je jedna od najznačajnijih gljiva koja se upotrebljava u Kini i Japanu u poslednjih 4000 godina kao lek, pomoćno lekovito sredstvo ili eliksir. Plodonosno telo ove gljive obiluje bioaktivnim komponentama: polisaharidima, terpenoidima, amino kiselinama, dok u manjim količinama sadrži proteine, steroide, lipide, alkaloidne, adenzin, riboflavin, askorbinsku kiselinu, neorganske jone (Mg, Ca, Zn, Mn, Fe, C) i organski vezan germanijum (Wasser, 2005). Intenzivna istraživanja farmakološkog efekta ove gljive u zapadnoj medicini započeta su pre oko tridesetak godina, kada je *Ganoderma lucidum* počela da se industrijski gaji.

U Kini i zemljama Orijenta, mnoge lekovite biljke i gljive se koriste kao tradicionalni lekovi. Medicinske gljive se veoma retko koriste u sirovom stanju, a najčešće se pripremaju u obliku ekstrakata u vrućoj vodi, koncentrata, rastvora i praha koji se dalje upotrebljavaju za proizvodnju tonika, tinktura, čajeva, supa i biljnih formula. Biljni preparati najčešće se prave kao multikomponente smeše bilja i lekovitih gljiva, a ređe sadrže jednu komponentu. Do sada je u Kineskoj literaturi opisano preko sto hiljada različitih formula, koje se najčešće sastoje od 4 do 12 individualnih biljaka sa različitim farmakološkim dejstvom (Lee i saradnici, 2003). Na tržištu postoji veliki broj tečnih farmakoloških preparata na bazi bilja i gljiva u kojima se etanol koristi kao rastvarač (i do 80%), koji se koriste kako za prevenciju tako i za lečenje pojedinih bolesti. Zbog svojih karakteristika *G. lucidum* je našla široku primenu za razvoj novih proizvoda sa povećanim funkcionalnim karakteristikama.

U zemljama dalekog Istoka gljiva *Ganoderma lucidum* je važan dodatak raznim alkoholnim pićima zbog svog gorkog ukusa i lekovitog dejstva. Maceracijom u alkoholnim pićima se postiže efikasnija kompozicija i povećava rastvaranje biološki aktivnih materija u poređenju sa ekstrakcijom u vodenom rastvoru. Takođe, alkoholna pića poboljšavaju cirkulaciju krvi i pospešuju kurativni efekat (Nikšić i saradnici, 2001). Zbog specifičnih senzornih karakteristika i povećanja funkcionalnosti, poslednjih godina se *Ganoderma lucidum* koristi kao interesantan dodatak alkoholnim pićima (Nikšić i saradnici, 2002; Leskošek-Čukalović i saradnici, 2010a; Leskošek-Čukalović i saradnici, 2010b).

## 2. OPŠTI DEO

### 2. 1. *Ganoderma lucidum*

#### 2.1.1. OPŠTE KARAKTERISTIKE *G. lucidum*

Gljiva sa mnogo imena, *Ganoderma lucidum* (Reishi, Mannentake, Ling Zhi, Ling Chi), je veoma važna vrsta, naročito u zemljama Dalekog istoka (Kina, Japan, Koreja), gde se u medicinske svrhe koristi već više od četiri hiljade godina (Zhao i Zhang, 1994). Imena pod kojima je poznata ukazuju na poštovanje koje je uživala u Kini i Japanu. Stari Kinezi su ovu gljivu nazivali Ling Zhi (ling qi ili ling chi), što znači „duhovna biljka“. Kineska reč za Ling Zhi se sastoji od tri logografska karaktera: jedan znači „šaman“, drugi „moliti se za“ dok treći znači „kiša“. U Japanu ovu gljivu nazivaju *reishi* ili *mannentake*, što znači „gljiva 10000 godina“. Zbog verovanja da omogućava dug život nazivaju je i „gljiva besmrtnosti“. Takođe, zbog njenog sjajnog izgleda u Evropi i Severnoj Americi je nazivaju „lakirani nos“ ili „umetnikov nos“, dok je na Tajlandu nazivaju „majmunsko sedište“. Pošto je u prirodi retka, često su je nazivali i „fantom gljiva“. Latinsko ime ove gljive, *Ganoderma lucidum*, vodi poreklo od grčkih reči: *ganos* - sjajan, *derma* - koža i *lucidum* – isijavati (Halpern, 2007; Stamets, 1993; Wasser, 2005). U našoj zemlji poznata je pod nazivom hrastova sjajnica.

*Ganoderma* je imala živopisnu prošlost, a prvi put se u pisanim dokumentima pominje za vreme vladavine prvog kineskog cara, Shing-Huang-a iz dinastije Ch'in (221-207 p.n.e.) (Stamets, 1993). Prema legendi, do cara su stigle glasine o *Ganodermi* kao „gljivi besmrtnosti“ koja raste na jednom ostrvu na istoku. Car je opremio flotu brodova sa posadom od trista hrabrih muškaraca i trista prelepih žena sa ciljem da pronađu zemlju u kojoj se verovalo da gljiva raste i da je donesu u Kinu. Međutim, brodovi su se izgubili u moru, a nakon brodoloma preživeli mornari su na obalama ostrva pronašli novi narod i novu zemlju - Japan (Halpern, 2007). Od tada pa do današnjih dana, ova gljiva je čest

predmet kineske literature i umetnosti. Slike na kojima je Ling Zhi krase tapiserije i vrata carskih palata u Zabranjenom gradu i Letnjoj palati, jer u Kineskoj umetnosti ona predstavlja izvor dobrog zdravlja i sreće (Stamets, 1993). Plodonosna tela *Ganoderma lucidum* mogu se koristiti i kao material za izradu umetničkih dela. Na fotografijama 1 i 2 predstavljene su umetničke figure ždrala i zmaja sačinjene od plodonosnih tela ove gljive.



**Fotografija 1 i 2.** Umetničke figure napravljene od *Ganoderma lucidum*

*Ganoderma* je zauzela počasno mesto i u najstarijoj kineskoj *Materia medica*-i, pisanoj oko 200 godine nove ere, gde je na karakterističan kineski način 365 medicinskih sastojaka podeljeno u tri stepena: superiorni, srednji i slab (Lee i saradnici, 2003). Na superiornom stupnju, *Ganoderma* zauzima prvo mesto, odmah ispred ginsenga. Da bi neki sastojak mogao da bude na superiornom stupnju, morao je da ima izuzetno velike medicinske kvalitete, kao i da ne uzrokuje sporedna neželjena dejstva prilikom korišćenja u dužem vremenskom periodu (Halpen, 2007). Medicinska upotreba gljive *Ganoderma* u drevnim zemljama Dalekog istoka uključivala je lečenje neurastenije, iznemoglosti nakon dugih bolesti, insomnie, anoreksije, vrtoglavice, hroničnog hepatitisa, hiperholesterolemie, koronarnih bolesti srca, hipertenzije, bronhijalnog kašlja, čira, ali se koristila i kao protivotrov (antidot) kod trovanja otrovnim gljivama. Tokom poslednje decenije,

istraživanja kineskih naučnika su bila fokusirana uglavnom na ispitivanje već poznatih dejstava gljive: produžavanje životnog veka, ishemija mozga (reperfuzija povreda), hronični viralni hepatitis, disfunkcija muškog polnog organa, hiperholesterolemia, poboljšanje imunog sistema kod starijih osoba, antikancerogena aktivnost, imunostimulacija itd. (Wasser, 2005).

U prirodi je bila veoma retka i nalažena je u malim količinama, zbog čega je njena cena bila visoka i smatrana je kao blago. U drevnoj Kini pronalazač ove vredne gljive bio bi vredno nagrađen ukoliko bi gljivu predao visokom zvaničniku. Čak do pedesetih godina XX veka praktikovana je tradicija predavljanja slučajno nađene gljive kineskim liderima (Wasser, 2005). Početkom sedamdesetih godina XX veka počela su intenzivna istraživanja o mogućnostima veštačke kultivacije, a osamdesetih godina saznanja su počela da se primenju i u industriju i gajenje ove gljive doživelo je ekspanziju, posebno u Kini. Sistematska istraživanja farmakoloških efekata su počela poslednjih decenija, kada su gajenjem dobijane neophodne količine. Danas se u industriji gaje velike količine ove vredne gljive, koja se koristi za proizvodnju različitih farmakoloških preparata, kao i dijetetskih suplemenata i proizvoda za prehrambenu industriju. Iako se gaji u velikim količinama njena vrednost i dalje je visoka, jer se potražnja za njom stalno povećava.

Porodica *Ganodermataceae* pripada bazidiomicetama sa bazidiosporama sa karakterističnim duplim zidovima (Donk, 1964). U prirodi ova porodica ima važnu ulogu razlagača, jer spada u izazivače bele truleži drveća naročito hrasta, javora, jasena i kestena. Proizvodi enzime efikasne u dekompoziciji kako lignina tako i celuloze i sličnih polisaharida (Hepting, 1971; Blanchette, 1984; Adaskaveg and Ogawa, 1990; Adaskaveg i saradnici, 1991, 1993). Veliku pažnju privlači i njihova uloga biljnog parazita, koji napada useve čaja i kaučuka, kao i korenje drveća i izaziva velike ekonomske gubitke.

Rod *Ganoderma* ustanovljen je nešto više od 100 godina, ustanovio ga je Finski mikolog Peter Adolf Karsten 1881. godine i uključivao je samo jednu vrstu *Polyporus lucidus* (Mohatny i saradnici, 2011). Od utemenjenja, veliki broj vrsta je dodavan ovom rodu na osnovu različitih osobina domaćina, geografske rasprostranjenosti i morfoloških karakteristika. Danas ovaj rod sadrži nekoliko stotina imena među kojima je nažalost i veliki broj sinonima, jer morfološke karakteristike nastaju usled različitih uslova

kultivacije, geografskih lokacija, klimatskih uslova i prirodnog genetičkog razvoja individualnih vrsta. Razvojem nauke ustanovljeno je da ove odlike nisu dovoljne za razdvajanje i utemeenje novih vrsta. U novijim naučnim radovima vrste se diferenciraju prema uslovama gajenja i razmnožavanja, a razvojem analitičkih metoda pripadnost se određuje ispitivanjem alozima i sekvencioniranja ribozomalne RNK (Seo and Kirk, 2000).

Prema važećoj taksonomiji gljiva i na osnovu najnovih naučnih saznanja, ova vrsta ima naučno ime *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. i svrstava se u sledeće taksonomske kategorije:

Carstvo:	<b><i>Fungi</i></b>
Razdeo:	<b><i>Eumycota</i></b>
Podrazdeo:	<b><i>Basidiomycotina</i></b>
Klasa:	<b><i>Hymenomycetes</i></b>
Red:	<b><i>Aphyllophorales</i></b>
Porodica:	<b><i>Ganodermataceae</i></b>
Rod:	<b><i>Ganoderma</i></b>
Vrsta:	<b><i>Ganoderma lucidum</i></b>

U skladu sa tradicionalnom kineskom medicinom, različiti tipovi *G. lucidum* imaju različite ukuse i stoga deluju na različite organe. Prema boji i obliku plodonosnog tela, *G. lucidum* je podeljena na šest različitih tipova, pri čemu se svaki koristi za različite namene (Tabela 1). Od svih tipova, smatra se da crveni varijeteti imaju najbolja medicinska svojstva (Wasser, 2005).

**Tabela 1.** - Tipovi *G. lucidum* prema boji plodonosnog tela (Wasser, 2005)

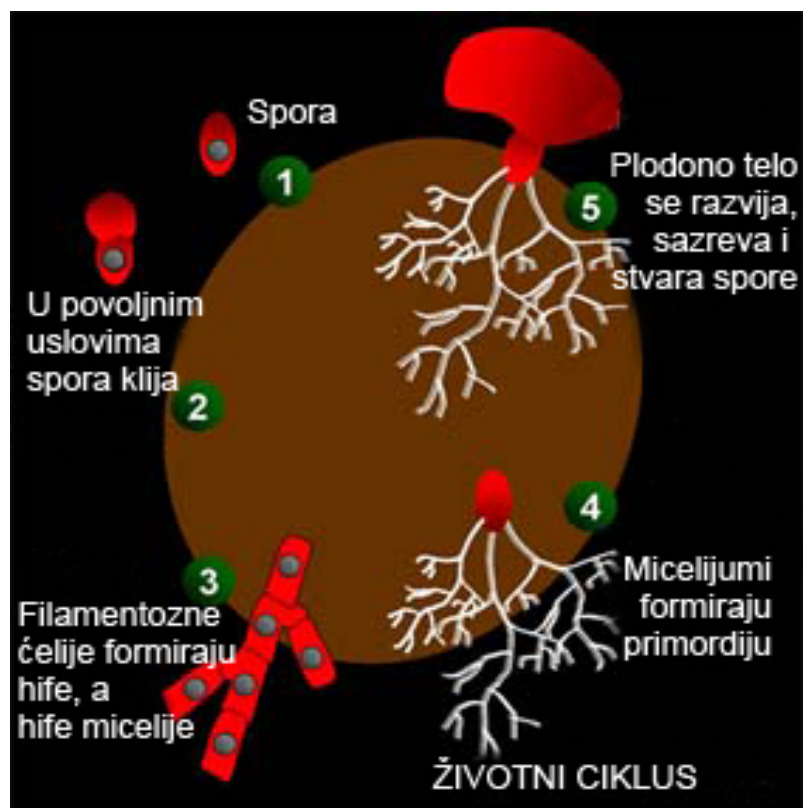
Boja	Ukus	Japansko ime	Upotreba
Plava	Kiselo	Aoshiha	Poboljšava vid i funkciju jetre, smanjuje nervozu
Crvena	Gorko	Akashiba	Poboljšava memoriju, vitalnost i unutrašnje organe
Žuta	Slatko	Kishiba	Jača funkciju slezine, smiruje „duh“
Bela	Oporo	Shirishiba	Poboljšava rad pluća; daje hrabrost i jača volju
Crna	Slano	Kuroshiba	Štiti bubrege
Purpurna	Slatko	Murasakishiba	poboljšava sluh, zglobove, mišiće, ten

Ljuska spore je veoma tvrda, dvoslojna i teško puca, tako da iako zrela pečurka proizvede veliki broj spora, samo mali broj spora u uslovima sa dovoljno nutrienata, vlage i kiseonika počinje da klija. Nakon klijanja formiraju se filamentozne ćelije zvane hife, koje nastavljaju da se mitotički razmnožavaju i formiraju mrežu hifa – micelij. Tokom rasta hife formiraju klamp veze, putem kojih dolazi do razmene genetičkog materijala i koje su neophodne da bi nastalo plodonosno telo pečurke. Micelije se u optimalnim uslovima obrazuju agregate, koji rastu iznad zemlje formirajući primordiju (malu pečurku). Nakon formiranja primordije, formira se drška i grane, tako da ukoliko dođe do oštećenja u fazi primordije, oštećenja neće biti uočljiva kod odrasle pečurke. Plodonosno telo nastavlja da se razvija, i obrazuje himenofor, površinu plodonosnog tela obraslu himenijom na kojoj se obrazuju bazidiospore, čime se završava životni ciklus pečurke (Straments, 1993).

Morfološke karakteristike gljive se razlikuju u zavisnosti od uticaja ekoloških uslova tokom razvoja bazidiokarpa. Plodonosno telo *Ganoderma lucidum* je drvenaste građe, sastoji se od belo-žute drške dužine do 10 cm i sjanog šešira čiji prečnik može biti od 5 cm do 20 cm. Najčešći oblik šešira je potkovičasti, čija površina može biti izdeljena koncentričnim zonama. Šešir je najčešće bočno pričvršćen za dršku, ali u prirodi se ređe mogu naći i centralno, ekcentrično, preklapajući vezani oblici, ali ne retko i konzularni oblik (bez drške). U uslovima kada nema dovoljno svetlosti i kada je koncentracija ugljendioksida povećana gljiva može stvarati oblik jelenskih rogova, koji je izuzetno cenjen



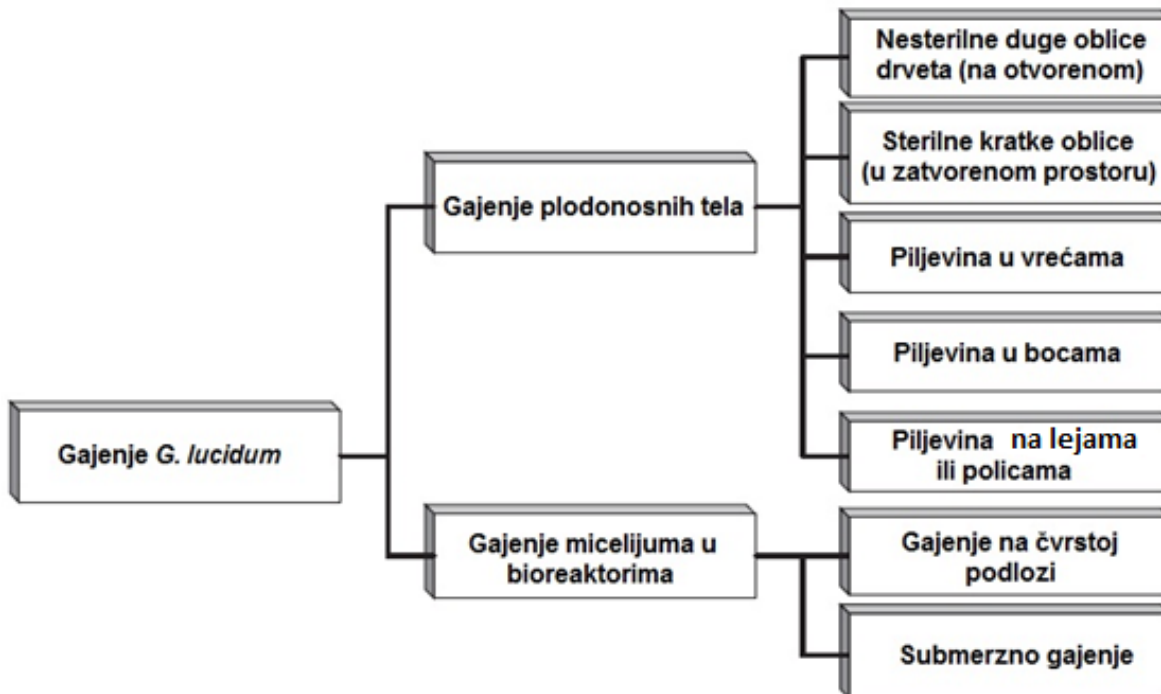
u Istočnim zemljama. Braon spore imaju elipsoidni oblik sa tupim krajem i dosta su sličnih veličina (7-12 x 6-8 $\mu$ m), pa ova osobina može služiti za karakterizaciju (Stamets, 2005). Životni ciklus *Ganoderma* predstavljen je na slici 1.



**Slika 1.** Životni ciklus *Ganoderma* (<http://www.hbp.usm.my/1b/GT/ganoderma.htm>)

U prirodi ova pečurka se može naći na različitim osušenim i umirujućim stablima najčešće listopadnog drveća naročito hrasta, javora, brešta, kestena, žalosnih vrba i rogača. Ređe se nalazi na četinarskom drveću u Evropi, Aziji i Severnoj i Južnoj Americi. Raspostranjena je širom sveta, ali više joj pogoduju predeli sa subtropskom klimom, nego sa umerenom klimom. U zemljama dalekog istoka prvenstveno raste na drvetu šljive. Može se naći i na panjevima isečenih drveća, posebno u blizini zemljišta (Stamets, 1993; Wasser, 2005).

Pošto je *G. lucidum* retka u prirodi, veštačka kultivacija je postala neophodna kako bi se zadovoljile potrebe tržišta. Prema pisanim podacima, gajenje ove gljive je počelo još u vreme Seng Nong-a, pre oko dve hiljade godina, jer su i tada, zbog njenog značaja i široke upotrebe, prirodni izvori bili nedovoljni. Ozbiljnije gajenje ove gljive pod kontrolisanim uslovima započeo je 1937. godine T. Henmi sa svojim saradnicima, dok je prvu masovnu proizvodnju na strugotini pokrenuo Y. Naomi 1971 godine. Od tada je gajenje *G. lucidum* na cepanicama i strugotini postala ustaljena praksa (Mizuno, 1997). Do danas su razvijene različite metode gajenja ove gljive (Slika 2), ali bilo koji od načina da se primenjuje neophodno je prvo odgajiti zdrav micelijum koji će pod određenim uslovima moći da obraste supstrat i da formira plodnosna tela. Prilikom gajenja moraju se obezbediti optimalni uslovi da bi dobio što veći prinos plodnosnih tela, ceo proizvodni turnus traje oko 3 meseca i propusti u procesu proizvodnje bi dovele do velikih gubitaka. Poslednjih godina se sve više radi na razvijanju submerznog gajenja micelijuma, što je bolja i mnogo kraća procedura, ali skuplja alternativa za efikasnu proizvodnju vrlo vrednih metabolita, najčešće polisaharida i ganoderinskih kiselina (Boh i saradnici, 2007; Xu i saradnici, 2010a).



**Slika 2.** Metode gajenja plodonosnog tela i micelijuma *G. lucidum*

Čest oblik gajenja ove gljive je na inokulisanim oblicama, koje mogu biti smeštene u saksijama (fotografija 3 i 4) ili zakopane u zemlji (fotografija 4).



**Fotografija 3 i 4.** Uzgajanje gljive *G. lucidum*

Na svetskom tržištu se već pre dve decenije moglo naći više od 90 brendova različitih proizvoda na bazi *Ganoderma lucidum* (Lin, 2000). Potražnja za ovom gljivom raste iz godine u godinu i procenjuje se na nekoliko hiljada tona godišnje. Dostupni podaci o ukupnom godišnjem prometu proizvoda sa Ganodermom tokom 1995. godine iznose 1.63 milijarde dolara (Chang and Buswell, 1999), 2002. godine dolazi do znatnog povećanja i iznosi 2.16 milijarde dolara (Lai, 2004). U marketima posebno u istočnim zemljama postoji veliki broj preparata i proizvoda koji se proizvode od plodonosnog tela, micelijima i spora gljive.

### 2.1.2. HEMIJSKI SASTAV GLJIVE *G. lucidum*

Do danas je objavljeno preko 300 naučnih radova o hemijskom sastavu *G. lucidum* i srodnih vrsta i ustanovljeno je da sastav *G. lucidum* uglavnom čine proteini, lipidi, ugljeni hidrati i vlakna. U istraživanju hemijskog sastava neisparljivog dela *G. lucidum*, Mau i saradnici (2001) su ustanovili da njega čini (% u odnosu na suhu materiju): 59% vlakana, 26-28 % ugljenih hidrata, 7-8% proteina, 3-5% masti i 1.8% pepela. Plodonosno telo, micelijum i spore ove gljive sadrže oko 400 različitih bioaktivnih jedinjenja, od kojih su najviše zastupljeni triterpenoidi, polisaharidi, nukleotidi, steroli, steroidi, masne kiseline, proteini/peptidi i elementi u tragovima (Yuen i Gohel, 2005; Wasser, 2005).

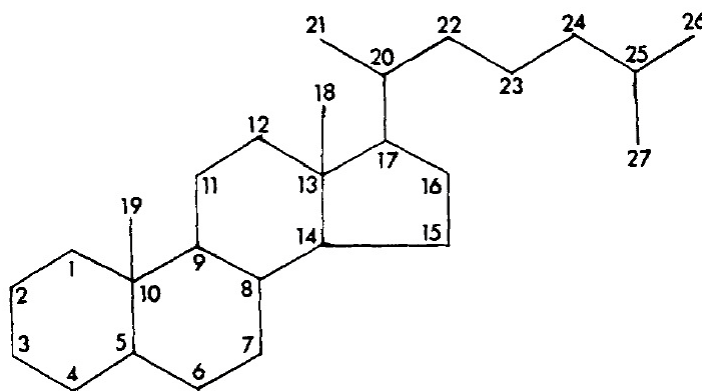
Veštački gajeni sojevi imaju sličan sadržaj nutritivnih komponenata kao i divlji tipovi, ali ustanovljeno je da kvalitativne i kvantitativne razlike hemijskog sastava proizvoda od *G. lucidum* potiču usled razlike u sojevima, poreklu, vrsti ekstrakcije i uslova kultivacije. Plodonosno telo i micelijum gljive sadrže različite bioaktivne komponente malih molekularnih težina koje se mogu ekstrahovati različitim rastvaračima kao što su voda, alkohol, alkohol-voda, aceton-voda itd. Ovim rastvaračima ekstrahuju se monosaharidi, alkoholi, oligosaharidi, aminokiseline, organske kiseline, steroidi, lipidi, terpenoidi, kumarini i taninske materije (Mizuno, 1997).

Najznačajnije komponente Ling Zhi sa bioaktivnim dejstvom su triterpeni, polisaharidi i peptidoglukani (Boh i saradnici, 2007; Zhou i saradnici, 2007).

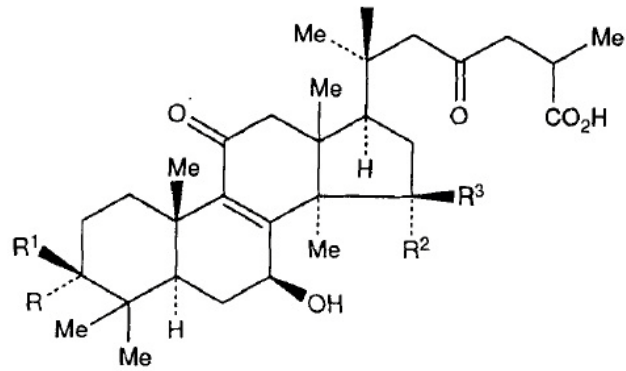
### 2.1.2.1. TRITERPENI

Terpeni su u prirodi široko rasprostranjena grupa biljnih produkata, čiji ugljeno hidratni skelet sastavljen od jedne ili više jedinica izoprena C<sub>5</sub>. Triterpeni su njihova podklasa i sastavljeni su od 6 izoprenskih jedinica, oni su uobičajeni produkt sinteze mnogih biljka tokom njihovog rasta i razvoja (Galor i saradnici, 2011). Uopšteno, triterpenoidi imaju veoma kompleksnu visoko oksidovanu strukturu sa molekulskom masom od 400 do 600 kDa (Mahato and Sen, 1997; Zhou i saradnici, 2007).

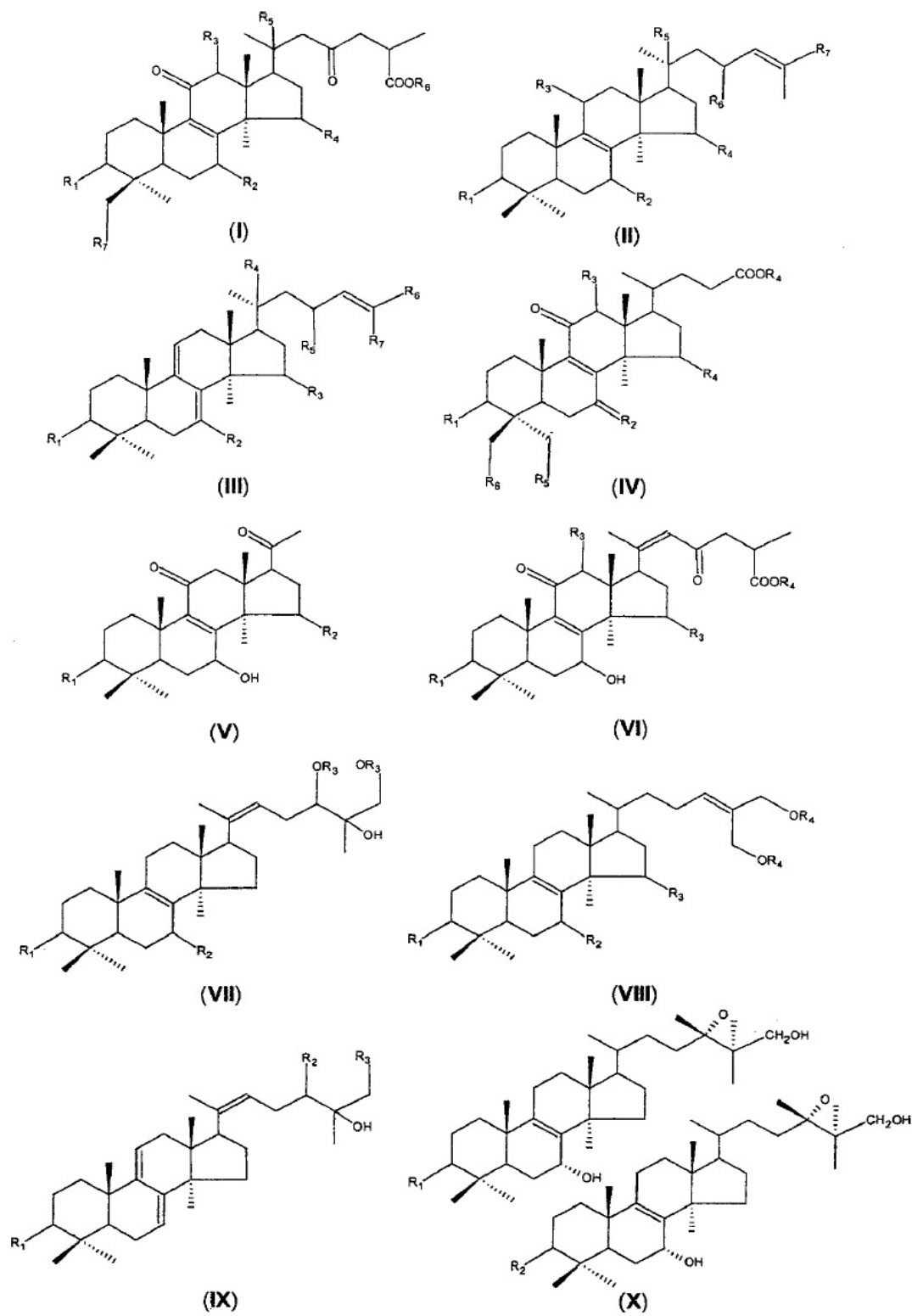
*Ganoderma lucidum* obiluje triterpenima lanostanskog tipa i do sada je izolovano više od 140 različitih jedinjenja ovog tipa iz *G. lucidum* i utvrđene su njihove hemijske konfiguracije (slika 3). Kubota i saradnici (1982) su prvi izlovali ganoderinske kiseline A i B iz epidermisa *Ganoderme lucidum* i predstavili su ganoderinsku kiselinu A kao novi visokooksidovani terpen sa konformacijom A prstena lanostana u obliku lađe (slika 4). Triterpeni *G. lucidum* se mogu podeliti u 10 grupa na osnovu njihove strukturne sličnosti i poznatih bioloških i medicinskih svojstava (slika 5) (Wasser, 2005).



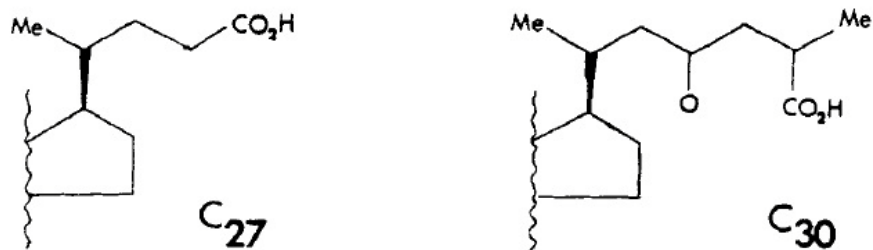
**Slika 3.** Struktura lanostanskih triterpenoida (Lin i saradnici, 1988)



**Slika 4.** Ganoderinske kiseline A i B. A:  $RR^1 = O$ ,  $R^2 = OH$ ,  $R^3 = H$ ; B:  $R = OH$ ,  $R^1 = H$ ,  $R^2R^3 = O$

Slika 5. Lanostanski triterpenoidi *G. lucidum*

Sadržaj triterpena varira od soja do soja gljive, kao i u zavisnosti od faze rasta, jer dolazi do cepanja lanaca i oksidacije skeleta triterpena (Nishitoba i saradnici, 1987). Najveći broj triterpena izolovanih iz *G. lucidum* predstavlja derivate ganoderinske ( $C_{30}$ ) i lucidinske ( $C_{27}$ ) kiseline (slika 6).



**Slika 6.**  $C_{27}$  i  $C_{30}$  terpenoidi (Jong i Birmingham, 1992)

Triterpeni se mogu izolovati iz plodonosnog tela, spora, micelijuma i kulturnog medijuma Lingzhi (Huie i saradnici, 2004). Triterpensi sastav plodonosnog tela varira u zavisnosti od mesta i uslova rasta, a preliminarne studije ukazuju da spore sadrže značajno veće količine ganoderinskih kiselina u odnosu na druge delove gljive (Min i saradnici, 2000). Ekstrakcija triterpena se obično izvodi pomoću rastvarača metanola, etanola, acetona, hloroforma, etra ili pomoću neke od mešavina ovih rastvarača. Ekstrakti se dalje prečišćavaju različitim separacionim metodama, uključujući tečnu hromatografiju sa normalnim i reveznim fazama (Su, 2001; Chen i saradnici, 1999).

Većina triterpena je izuzetno gorkog ukusa, a najveći deo čine ganoderinske kiseline (Kim i Kim, 1999). Nishitoba i saradnici (1988) su izvršili podelu triterpena na osnovu njihovo gorkog ukusa na:

- intenzivno gorke triterpene: lucidinska kiselina A i  $D_1$ , ganoderinske kiseline A, J i  $C_1$ , lucidoni C i A;
- blago gorke triterpene: lucidinska kiselina I, ganoderinske kiseline B,  $C_2$  i K;
- terpeni koji nemaju gorki ukus (ili su veoma malo gorki): ganoderinska kiselina D, lucidinske kiseline B, C, E1, G i H, ganolucidinske kiseline D i C, lucidon B.



Po intenzitetu gorčine redosled terpenoida je sledeći: lucidinska kiselina D > ganoderinska kiselina C > lucidon A > lucidinska kiselina A >> ganoderinska kiselina B > lucidinske kiseline B, C, E. Gorčina triterpena je naglašena u naknadnom ukusu i relativno dugo traje. Takođe, jedinjenja iz ove grupe imaju prilično nizak prag osetljivosti, što je prikazano u tabeli 2 u poređenju sa kinin-sulfatom i naringeninom (Nishitoba i saradnici, 1985). Gorak ukus ove gljive privukao je pažnju i doprineo je njenoj tradicionalnoj upotrebi u vidu tonika.

**Tabela 2.** Prag osetljivosti pojedinih gorkih supstanci

Jedinjenje	Koncentracija
Lucidinska kiselina A	$2 \times 10^{-6}$
Lucidinska kiselina D <sub>1</sub>	$5 \times 10^{-10}$
Ganoderinska kiselina A	$1 \times 10^{-8}$
Ganoderinska kiselina C <sub>1</sub>	$5 \times 10^{-6}$
Ganoderinska kiselina J	$1 \times 10^{-6}$
Lucidon A	$1 \times 10^{-6}$
Lucidon C	$1 \times 10^{-5}$
Naringin	$2,5 \times 10^{-5}$
Kinin-sulfat	$8 \times 10^{-6}$

Ganoderinske kiseline se dele u tri tipa, prema tome gde su locirane u gljivi. Ganoderinske kiseline A, B i H (tip I) su detektovane jedino u plodonosnom telu, dok su ganoderinske kiseline R, S i T (tip III) glavni triterpenoidi micelijuma (Hirotani i Furuya, 1990). Sadržaj triterpena se povećava nakon pojave plodonosnog tela i njihova najveća koncentracija je u spoljašnjim ili starijim delovima gljive (Miyahara i saradnici, 1987).

U zavisnosti od različitih funkcionalnih grupa i prema tipu bočnih lanaca, strukturni skelet ganoderinskih kiselina se može klasifikovati u tri grupe (Chen and Yu, 1990). Ovom podelom obuhvaćen je veliki broj oksidativnih modifikacija u strukturama ovih jedinjenja, posebno je ova pojava uočena na sledećim ugljenikovim atomima C-3, C-7, C-15 i C-22 (Xu i saradnici, 2010b).

### 2.1.2.2. POLISAHARIDI

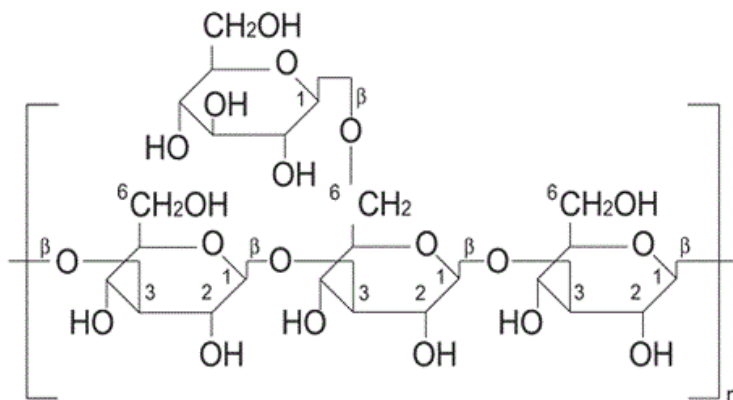
Poslednjih godina, velika naučna pažnja usmerena je na istraživanje polisaharida medicinskih gljiva, uključujući i polisaharide gljive *G. lucidum*, zbog njihovog antikancerogenog i imunomodulatorskog dejstva (Chen i saradnici, 2005). Više od 100 tipova polisaharida izolovano je iz plodonosnog tela, spora i micelijuma ili iz medijuma u kojoj se submerzno gaji micelijum *G. lucidum*. Telo *Ganoderma* obiluje ugljenim hidratima, prema istraživanjima u sastavu 100 g *Ganoderma lucidum* 71 g predstavljaju ugljeni hidrati, od čega su čak 69.3 g složeni ugljenohidrati (Stamets, 2005).

Molekulska masa primarne strukture većine ovih polisaharida teži od  $4 \times 10^5$  do  $1 \times 10^6$ . Većina izolovanih polisaharida sa bioaktivnim dejstvom predstavljaju glukane sa  $\beta$ -1,3 i  $\beta$ -1,6 vezama. Pored beta glukama iz ove gljive su izolovani i bioaktivni heteropolisaharidi u čiji sastav ulaze u različitom procentu pored glukoze i fruktoza, galaktoza, manoza, ksiloza, arabinoza i rafinoza (Zhou i saradnici, 2007), povezani  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 i  $\beta$ -1,6 vezama i  $\alpha$ -D (ili L) vezama (Lee i saradnici, 1999; Bao i saradnici, 2002).

Najčešći načini izdvajanja polisaharida iz gljive su dva oblika tečne ekstrakcije pomoću vrele vode i precipitacije pomoću metanola ili etanola, ali se koristi i drugi oblik ekstrakcije pomoću vode i alkalija. U eksperimentalnim istraživanjima za izolovanje polisaharida iz *Ganoderma lucidum*, koristi se ultrazvučna tehnika sa visokim frekvencijama (Zhao i saradnici, 2010).

Istraživanja pokazuju da su najaktivniji imunomodulatorski polisaharidi u vodi rastvorni  $\beta$ -glukani koji se talože sa etanolom.  $\beta$ -D-glukani se sastoje od linearnog lanca  $\beta$ -1,3 povezanih ostataka glukopiranoze, sa različitim stepenim grananja na C<sub>6</sub> atomu. Takođe,  $\beta$ -D-glukani postoje i kao heteropolisaharidi jer mogu sadržati i molekule ksiloze, manoze, galaktoze, uronske kiseline, a mogu graditi i komplekse sa proteinima, pri čemu  $\beta$ -D-glukan-protein kompleksi čine 10-50 % suve materije *G. lucidum* (Wasser, 2005). Stepennost aktivnosti ovih bioaktivnih materija zavisi od njihovog stepena grananja i rastvorljivosti u vodi (Bao i saradnici, 2001; Zhang i saradnici, 2001), ali postoje i polisaharidi sa antikancerogenim dejstvom, a u vodi nisu rastvorni (Wang i saradnici, 1993). Kod intracelularnih polisaharida koje proizvodi *G. lucidum* tokom submerznog gajenja

interesantno je vreme dejstva, jer je utvrđeno da tokom prvih 48 h deluju na hepatokancerogene ćelije, a stimuliraju njihov rast posle 72 h dejstva (Lin i saradnici, 2012).



**Slika 7.** Primarna molekularna struktura  $\beta$ -D-glukana

### 2.1.2.3. OSTALI KONSTITUENTI

Medicinske gljive u svom sastavu imaju manji procenat proteina nego jestive gljive kojima one obiluju. U sastavu *Ganoderma* se nalazi oko 7-8 % proteina (Mau i saradnici, 2001), ali pojedini proteini imaju važno bioaktivno dejstvo. Najpoznatiji aktivni protein je Ling zhi 8 (LZ8) i detektovan je iz micelijarnog ekstrakta, a u kasnijim istraživanjima je utvrđeno da ima imunosupresivnu ulogu (Van Der Hem i saradnici 1995). Iz plodonosnog tela *G.lucidum* izolovan je antifungalni protein, veličine 15 kDa i nazvan ganodermin (Wang i Ng, 2006). Proteini se nalaze i u kompleksima vezani za polisaharide, čineći kompleks peptidoglukana. U sastavu vodenog ekstrakta gljive nalaze se i bioktivni peptidi molekulske mase manje od 6 kDa, za koje je utvrđeno da poseduju antioksidativnu aktivnost (Sun i saradnika, 2004). Slobodne aminokiseline nisu zastupnjene u velikom procentu u sastavu medicinskih gljiva. Prema istraživanje Mau i saradnika (2001), sastav slobodnih amino

kiselina *G.lucidum* (13.78 mg/g suve materije) u najvećem procentu čini L-lizin (3.96 mg/L), a zatim u sličnim količinama L-tirozin, L-fenilalanin, L-leucin i L-alanin (od 1 mg/g).

*G. lucidum* sadrži i sterole, masne kiseline, ergosterol peroksid (5,8-epidioksi-ergosta-6,22*E*-dien-3-ol) i cerebrozide (4*E'*,8*E*)-*N*-*D*-2'-hidroksisteroil-1-*O*-β-*D*-glukopiranozil-9-metil-4-8-sfingadienin i (4*E*,8*E*)-*N*-*D*-2'-hidroksipamitoil-1-*O*-β-*D*-glukopiranozil-9-metil-4-8-sfingadienin (Wasser, 2005).

U analiziranim uzorcima gljive kao glavne mineralne komponente su određeni fosfor, silicijum, sumpor, kalcijum, kalijum i magnezijum, a u manjim količinama detektovani su gvožđe, natrijum, zink, bakar, mangan i stroncijum. Od teških metala u najvećoj količini određeni su kadmijum i živa (Chen i saradnika, 1998). *G. lucidum* sadrži i organski germanijum, koji ova gljiva ima sposobnost da ga koncentriše. Sadržaj ovog elementa je interesantan sa stanovišta da u malim količinama germanijum povoljno utiče na imunitet, antitumorne, antimutacione i antioksidativne aktivnosti (Kolesnikova i saradnici, 1997). Analizom 30 uzoraka gljiva odgajanih na drvetu u Japanu, Koreji, Tajvanu i Kini utvrđeno je da je sadržaj germanijuma u plodonosnim telima između 14 i 57 ppb. Germanijum ima sposobnost da neutrališe bol kod poslednjih stadijuma kancera (Mizuno i saradnici, 1995).

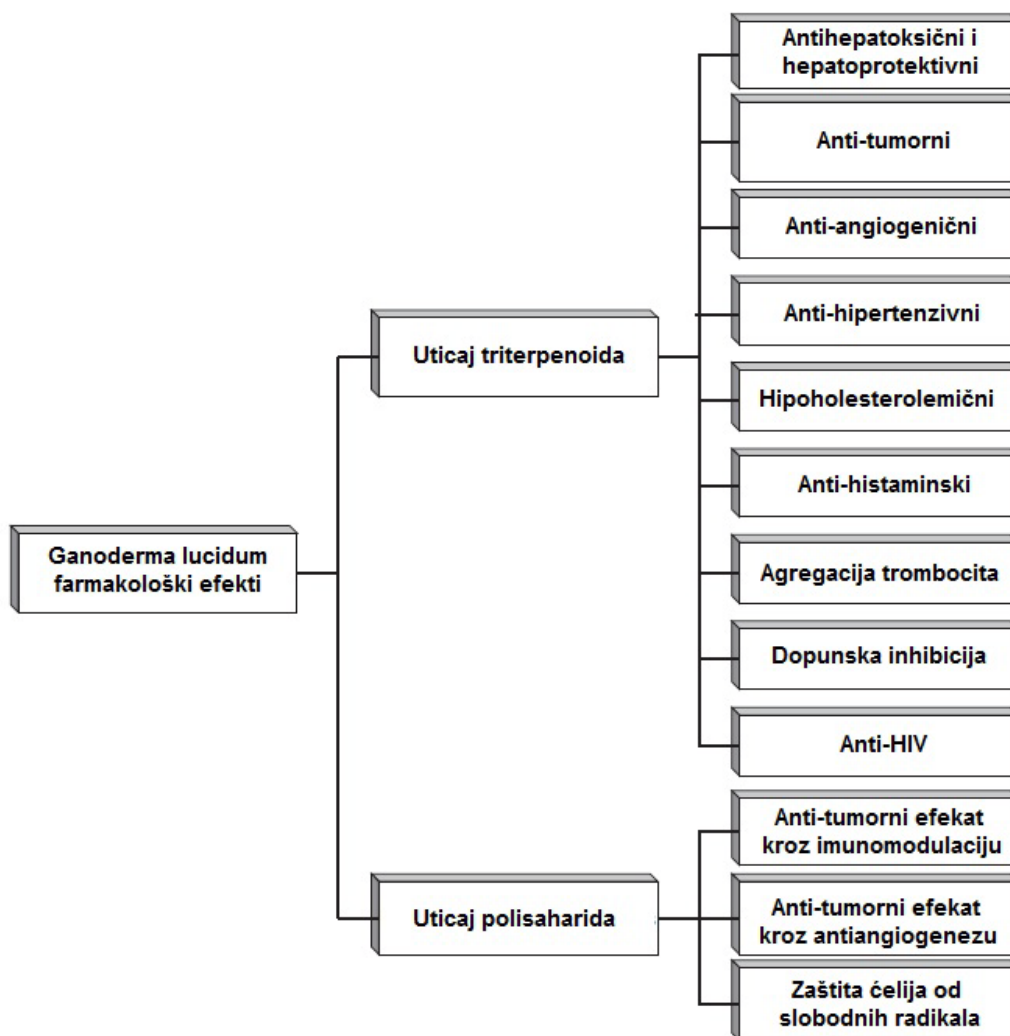
### 2.1.3. TERAPEUTSKA PRIMENA GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Mnoge svetske kulture smatraju gljive kao važne komponente tradicionalnih lekova, do sada je dokazano da najmanje 270 vrsta gljiva poseduje različita terapijska dejstva (Ying i saradnici, 1987). Pored jestih gljiva, u medicinske gljive se ubrajaju nejestive drvenaste gljive *Ganoderma lucidum* i *Trametes versicolor*.

Plodonosno telo *Ganoderma lucidum* u Kini i istočnim zemljama preporučivalo se kao panacea za lečenje svih tipova bolesti na osnovu saznanja zasnovanih na više vekovnom korišćenju, usmenim predanjima i kulturnim običajima. U tradicionalnoj medicini uspešno se koristila u lečenju hroničnog hepatitisa, artritisa, hipertenzije, insomnije, bronhitisa, hiperlipidemije, neoplazije, astme, želudačnog čira, ateroskleroze, diabetesa, umora usled duge bolesti i drugih bolesti (Lai i saradnici 2004). Poznavajući reputaciju ove lekovite pečurke, naučnici su proteklih decenija intenzivno istraživali njena lekovita svojstva. Velikim brojem studija dokazana su brojna farmakološka dejstva *G. lucidum*: poseduje imunomodulatornu i antiinflamatornu aktivnost, deluje kao antiarterosklerotik, analgetik, ima hemopreventivna, antitumorna, radioprotektivna, antibakterijska, antiviralna (uključujući Anti-HIV), hipolipidemijska, hepatoprotektivna, antioksidativna i hipoglikemijska svojstva, a pozitivno deluje i kod dijabetesa, čira, usporava starenje itd. (Halpern, 2007). Glavna farmakološka dejstva ove gljive prikazana su na slici 8.

*Ganoderma* se može koristiti u različitim formama. Tradicionalno se koristi kao dodatak alkoholnim napicima, toplim napicima ili supama. Nekoliko produkata proizvedenih od *Ganoderma lucidum* podvrgnuto je kliničkim ispitivanjima i komercijalno je dostupno u obliku sirupa, injekcija, tinktura, u obliku bolus injekcija (u obliku praha) i kapsula. Doza tinkture (20 %), koja se preporučuje za korišćenje je 10 ml tri puta dnevno, u obliku tableta je 1 g tablete tri puta dnevno i sirupa 4-6 ml dnevno. Preporučeno je da se suva *G. lucidum* (200-300 g) potopi u vruću vodu i da se konzumira kao piće 3-5 puta dnevno (Ying i saradnici, 1987; Zhuang i saradnici, 1993; Wasser, 2005).

Dugotrajna upotreba gljive *Ganoderma lucidum* ne deluje toksično na organizam, ali kod nekih ljudi oralna upotreba ekstrakta u prahu od 1.5-9 g na dan može se ispoljiti povećanom osetljivošću organizma, koja rezultira privremenim simptomima pospanosti, žeđi, čestim mokrenjem, abnormalnim znojenjem, osipom i nadimanjem (Soo, 1996).



**Slika 8.** Glavni farmakološki efekti *G. lucidum* (Boh i saradnici, 2007)

### 2.1.3.1. ANTIKANCEROGENO DEJSTVO

Kancer predstavlja vodeći svetski uzročnik bolesti sa smrtnim ishodom, rano otkrivanje i hemoterapija su najvažniji za pozitivni ishod lečenja (WHO, 2008). Kancerogeneza je kompleksan proces koji se od sastoji od mnogostepena ili mnogo mehanizama, uključuje ireverzibilnu alteraciju malignih ćelija (inicijalna faza), praćena kolonijalnom poliferacijom inicijalnih malignih ćelija (promocijalna faza) iz koje prelazi u invazivni i metastatični oblik (progresivna faza) (Trosko i Chang, 2001). Da bi prevencija ili lečenje tumora bilo moguće, moramo znati različite faze u kojima je delovanje lekova ili produkata moguće. U prevenciji i lečenju kancera uz savremene metode koriste se preparati izolovani iz mnogih gljiva, uključujući i gljivu *Ganoderma lucidum*. Mnogi produkti napravljeni od ove gljive mogu se kupiti širom sveta, koriste se kao suplementi u ishrani i označeni su kao imunomodulatori (Yuen i Gohel, 2005).

Do sada je izvršen veliki broj eksperimenta in vitro i na životinjama i ljudima (in i vivo) da bi se dokazalo da hemijske komponente izolovane iz gljiva, u najvećem broju polisaharidi i triterpenoidi, imaju antikancerogeno dejstvo (Yuen i saradnici, 2005; Zaidman i saradnici, 2005). U istraživanju Tomasija i saradnika (2004) od 58 ispitivanih *Basidiomycetes* vrsta, Lingzhi je imala najjaču citotoksičnu aktivnost na ćelije kancera. Triterpeni se smatraju potencijalnim antikancerogenim komponentama koje sprečavaju rast tumora (Lin i saradnici, 2003), oni imaju direktno citotoksično dejstvo protiv tumorskih ćelija (Gonzalez i saradnici, 2002).

Na osnovu mnogobrojnih istraživanja zaključuje se da glavni mehanizam antitumorne i antimetastatične aktivnosti gljive *Ganoderma* predstavlja osnaženje imunog sistema posredstvom delovanja polisaharida i polisaharopeptida (Ooi i Lui, 2000; Wasser, 2002; Sullivan i saradnici, 2006; Zhang i saradnici, 2007). U istraživanju Chena i Milesa (1996) ustanovljeno je da  $\beta$ -glukani gljive *Ganoderma* imaju jače antitumorno dejstvo i bolje su usvojivi od sintetičkih  $\beta$ -glukana. Ovaj polisaharid deluje na taj način što se vezuje za površinu leukocita ili serum-specifičnih proteina, što dovodi do aktivacije makrofaga, pomoćnih T-ćelija, prirodnih ubica (Nk ćelije) i drugih efektorskih ćelija (Battle i saradnici,

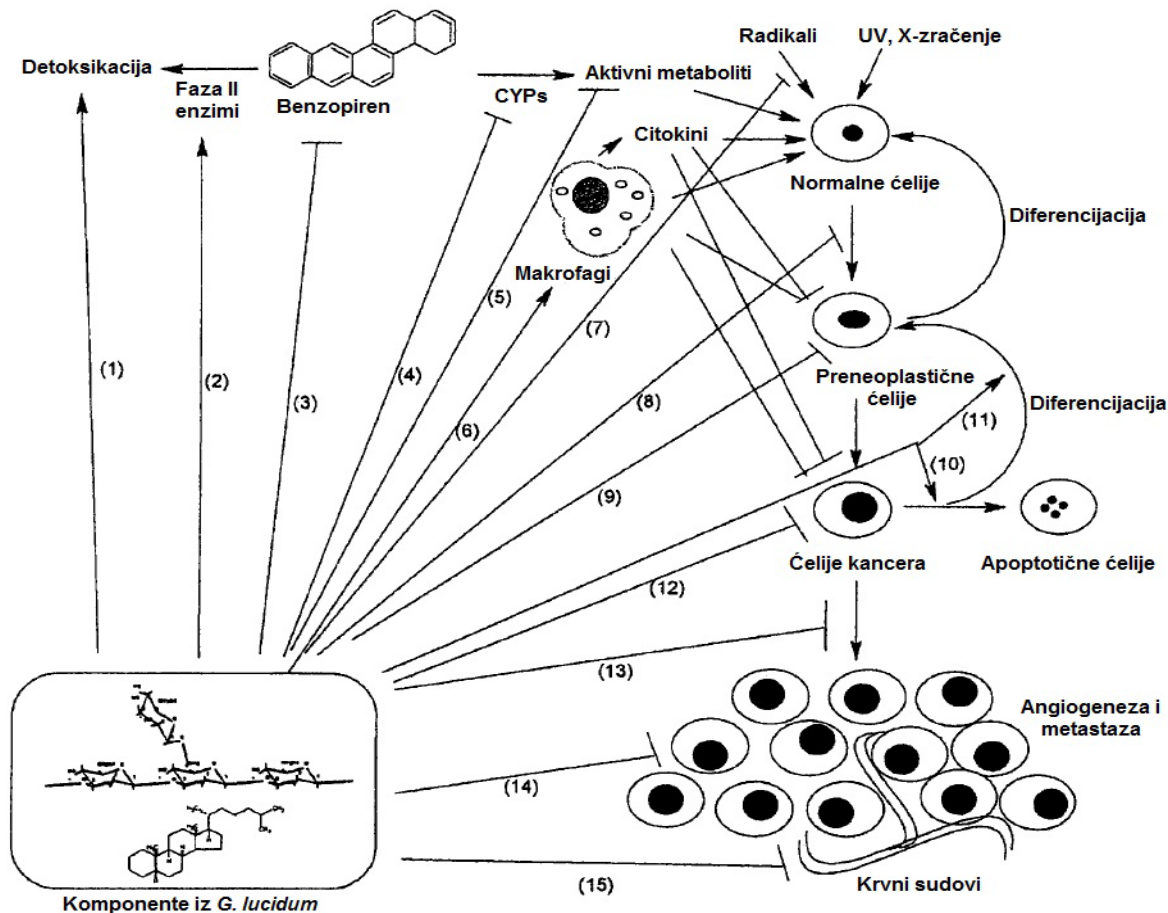
1998; Konopski i saradnici, 1994; Mueller i saradnici, 2000). Sve ovo dovodi do povećane produkcije citokina, kao što su tumor nekrozni faktor (TNF- $\alpha$ ), interleukini, interferoni, azot-monoksid i antitela, od strane aktiviranih efektorskih ćelija. Regresija tumora u različitim animalnim modelima opisuje se vaskularnim oštećenjem protoka krvi u tumoru i nekrozom uzrokovanom T-ćelijama i lokalnom produkcijom TNF- $\alpha$  (Wasser, 2005).

Pored delovanja osnaženjem odbrambenog sistema domaćina, i drugi mehanizmi su uključeni u antitumornu aktivnost *Ganoderma*. Sumiranjem do sadašnjih istraživanja efekata *G. lucidum* na invaziju kancera i metastazu, možemo zaključiti da jedinjenja ove gljive deluju kroz modulaciju fosforizacije ekstracelularne signal regulisane kinaze (ERK1/2), fosfotidilinozitol 3-kinaze (PI 3-kinaze), ili Akt kinaze (protrin kinaze B). Aktivacija ovih kinaza naknadno inhibira aktivaciju ili ekspresiju aktivator proteina-1 (AP-1) i nuklearnog faktora-kappa-B (NF- $\kappa$ B). Rezultira smanjenjem aktivnosti urokinaze plaminogen aktivatora (uPA), uPA receptora (uPAR), matriks metaloproteinaze (MMP)-9, vaskularni endotelijalni factor rasta (VEGF), transformator faktora rasta (VEGF)- $\beta$ 1, interleukin (IL)-8, inducibilni azotni oksid (NO) i  $\beta$ 1-integrin kako pokazuju različite ćelijske linije ili životinjski modeli (Weng i Yen, 2010).

Jedinjenja iz *G. lucidum* inhibiraju rast K562 leukemijskih ćelija na dozno- i vremenski-zavisan način i indukuju njihovo diferenciranje u starije ćelije eritrocita (Zhong i saradnici, 1999). Citotoksični efekat jedinjenja iz *G. lucidum* u istraživanjima Jiang i saradnika (2004a, 2004b) i Zhu i saradnika (2000) delovao je na vremenski-zavisan način. Kondicionirani medijum od PS-stimulisanih mononuklearnih ćelija humane krvi (PSG-MNC-CM) značajno inhibiraju rast U937 ćelija i indukuju njihovo diferenciranje u starije monocite/makrofage, koji vrše funkciju fagocitoze i produkcije citoplazmatskog superoksida (Wang i saradnici, 1997). Inhibicija DNK polimeraze i posttranslaciona modifikacija onkoproteina može doprineti antitumornoj aktivnosti gljive *Ganoderma* (Mizushina i saradnici, 1998).



Mehanizmi prevencije tumora i antitumorne aktivnosti *Ganoderma lucidum* prikazani su na slici 9.



**Slika 9.** Mehanizmi prevencije tumora i antitumorne aktivnosti *G. lucidum*. Aktivna jedinjenja iz *G. lucidum* mogu delovati preko nekoliko mehanizama, uključujući pospešivanje detoksikacije karcinogena (linija 1), povećavanje ekspresije i aktivnosti Faza II enzima (linija 2), sprečavanje izlaganja organa karcinogenima redukcijom apsorpcije ili poboljšanjem ekskrecije (linija 3), smanjenje ekspresije i aktivnosti faza I (npr. CYPs) enzima (linija 4), smanjenje formiranja toksičnih metabolita i formiranja kompleksa sa makromolekulima (linija 5), poboljšanje imunog odgovora domaćina (aktivacija makrofaga, T limfocita, NK ćelija itd.) (linija 6), antioksidativni efekat (linija 7), antipromotivni efekat (linija 8), antiproliferaciju (linija 9), apoptoznu indukciju tumorskih ćelija (linija 10), indukciju diferencijacije (linija 11), direktnu citotoksičnost, indukciju sprečavanja ćelijskog ciklusa, antiproliferaciju i modulaciju signalnih transdukcionih molekula (linija 12), antiprogresiju u inhibiciju rasta tumora (linija 13), antimetastazu (linija 14) i antioangiogenezu (linija 15) (Gao i saradnici, 2002; Wasser, 2005)

### 2.1.3.2. IMUNOMODULATORSKO DEJSTVO

*Ganoderma lucidum* sadrži jedinjenja koja modifikuju imuni sistem organizama, koji je odgovoran za odbranu organizma od bolesti i infekcija. Glavni imunomodulatorni efekti aktivnih jedinjenja gljive uključuju mitogenezu i aktivaciju imuno efektorskih ćelija kao što su T limfociti, makrofagi i NK ćelije koje utiču na produkciju citokina (IL, TNF- $\alpha$  i IFN). Takođe, pored ovih postoje i drugi efekti, kao što su inhibicija masnih ćelija i aktivacija B limfocita (Wasser, 2005). Ekstrakti izolovani iz različitih delova gljive (micelijuma, plodonosnog tela i spora) mogu različito dejstvo na organizam i mogu ga ojačavati, inhibirati ili oporavljati (Zhou i saradnici, 2007).

### 2.1.3.3. ANTIOKSIDATIVNO DEJSTVO

Smatra se da su mnoga farmakološka dejstva gljive *Ganoderma lucidum* povezana sa njenom antioksidativnošću (Ahmed, 1995). U istraživanju Sheena i saradnika (2005) ispitivan je antioksidativni kapacitet ekstrakta *Ganoderma lucidum* sakupljene iz Južne Indije u zavisnosti od korišćenog rastvarača (metanol, etanol i voda) za ekstrakciju i rastvorljivosti supstanci ove gljive u njima. Utvrđeno je da sva tri ekstrakta imaju značajnu antioksidativnu aktivnost, ali komponente koje se rastvaraju u polarnijim rastvaračima metanolu i etanolu imaju veći antioksidativni potencijal.

Kozarski i saradnici (2011) su ispitivali antioksidativne karakteristike vodenih polisaharidnih ekstrakata plodonosnih tela *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Pleurotus linteus* i spora *G.lucidum*. Na osnovu antioksidativne aktivnosti ekstrakti se mogu rangirati *G.lucidum*  $\approx$  *P.linteus* > *A. brasiliensis* > *A. Bisporus*. Hemijskom analizom polisaharidnih ekstrakata je utvrđeno da oni sadrže mešavinu polisaharida, proteina i polifenola (Kozarski i saradnici, 2012). Ispitivani polisaharidni ekstrakti predstavljaju prirodne antioksidanse i mogu se koristiti kao dodaci ishrani.

Do sada je dokazano da triterpenoidi, polisaharidi, kompleks polisaharida i proteina, fenoli i bioktivni peptidi su komponente *Ganoderma lucidum*, koje imaju antioksidativnu aktivnost (Hu i saradnici, 1992; Lee i saradnici, 2001; Mau i saradnici, 2002; Sun i saradnici, 2004; Zhu i saradnici, 1999; Yen i Wu, 1999; You i Lin, 2002). Ganoderminske kiseline A, B, C i D, lucidenska kiselina B i ganodermanintriol predstavljaju terpenaska jedinjenja izlovena iz *G.lucidum* koja neutrališu negativno dejstvo slobodnih radikala na tkivo organizma. Antioksidanti *Ganoderma* se brzo absorbuju posle digestije, što dovodi do povećanja ukupne antioksidativne aktivnosti u plazmi ispitivanih ljudi (Wachtel-Gabor i saradnici, 2004).

Antioksidativno dejstvo ekstrakata i komponenti *Ganoderma lucidum* dokazano je, ne samo *in vitro* i *in vivo* istraživanjima, već u istraživanjima u kome je potvrđeno dejstvo i na ljudski organizam. Anesteziolozi Mackay Memorial Bolnice u Taipei na Tajvanu pokazali su da ekstrakti *Ganoderma* imaju efikasni antioksidansi efekat na toksičnost srca, jer deluju kao superoksid - sakupljač slobodnih radikala (Halpen, 2007).

#### 2.1.3.4. ANTIMIKROBNO DEJSTVO

*Basidiomycete* i više gljive, uključujući Lingzhi, se sve više istražuju kao interesantan izvor potencijalnih antiobiotika. Za dokazivanje antimikrobnog dejstva ekstrakata *G. lucidum* korišćena su *in vitro* i *in vivo* istraživanja. Kod *in vitro* istraživanja korišćena je disk metoda u kojoj je utvrđeno da hloroformni ekstrakt ima antimikrobno dejstvo na G(+) bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) i na G(-) bakterije (*Esherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) (Keypour i saradnici, 2008). Efikasnije antimikrobno dejstvo imao je vodeni ekstrakt ove gljive u odnosu na antibiotike pri delovanju na bakterije *E. coli*, *Micrococcus lutes*, *S.aures*, *B.cereus*, *Proteus vulgaris* i *Salmonela typhi*. Utvrđeno je da vodeni ekstrakt ima sinergističko dejstvo sa cefazolinom pri dejstvu kod čistih kultura bakterija *Klebsiella oxytoca*, *St. Aures*, *E.coli* i *Salmonella typhy* (Yoon i saradnici, 1994). *In vivo* istraživanje vršeno je na pacovima, i procenat

preživelih pacova je iznosio više od 80% kod kojih je dan pre nego što su zaraženi *E.coli* injektovano 2 mg/g ekstrakta na težinu pacova, a kod kontrolnih pacova procenat preživelih nakon infekcije iznosio je 33% (Ohno i saradnici, 1998).

Iako se koristi mnogo vekova, istraživanja o novim načinima gajenja, hemijskom sastavu, farmakološkom dejstvu i novim proizvodima za čiju se proizvodnju koristi *Ganoderma lucidum* su uvek aktuelna tema u naučnim istraživanjima. Stalno se potvrđuju ranije poznata dejstva, ali sa razvojem analitičkih metoda otkrivaju novi medicinski efekti *G.lucidum*. U tabeli 3 dat je pregled trenutnih biomedicinskih aplikacija *G. lucidum*.

**Tabela 3.** Pregled trenutnih biomedicinskih aplikacija *G. lucidum* (Wasser and Weis, 1997; Stamets, 1993; Hobbs, 1995; McKenna i saradnici, 2002; Zhou i saradnici, 2002; Gao i saradnici, 2002, 2003, 2004a; Chen and Miles, 1996).

Aplikacija	Uticaj
A. Trening kosmonauta u Rusiji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poboljšava radne sposobnosti</li> <li>2. Brzi povratak normalne fiziologije</li> </ol>
B. Upotreba u konvencionalnom lečenju kancera	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Održava broj leukocita</li> <li>2. Poboljšava imuni sistem</li> <li>3. Smanjuje toksičnost hemoterapije i eliminiše indukovanu leukopeniju</li> <li>4. Ubrzava postoperativni oporavak</li> <li>5. Sedativno sredstvo, otklanja bol i redukuje zavisnost od morfijuma kod pacijenata obolelih od kancera</li> <li>6. Upotreba tokom remisije u cilju prevencije recidiva</li> </ol>
C. Kardiovaskularni poremećaji	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Koronarna dilatacija i povećanje koronarne cirkulacije</li> <li>2. Povećanje frekvencije i amplitude srčane kontrakcije</li> <li>3. Regulacija krvnog pritiska</li> <li>4. Antiperlipidemik, antihipoglikemik i sprečavanje agregacije trombocita</li> </ol>
D. Imunomodulatorni efekti	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Antikancer</li> <li>2. Antiviralni</li> <li>3. Antibakterijski</li> <li>4. Antiinflamatorni</li> <li>5. Terapija autoimunih poremećaja</li> <li>6. Inhibicija oslobađanja histamina kod alergija i prevencija anafilaktičkog šoka</li> </ol>
E. Upotreba kod remisije kancera i tretiranje hepatitisa B	
F. Poboljšanje iskorišćenja kiseonika	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Smanjenje nelagodnosti kod straha od visine, glavobolje, vrtoglavice, mučnine i nesanicice</li> <li>2. Smanjenje nedostatka kiseonika usled blokade koronarnih arterija aterosklerozom, grčevima ili ugrušcima</li> <li>3. Tolerancija na hipobarične uslove</li> </ol>
G. Ostale primene	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Upotreba u kombinaciji sa drugim lekovima</li> <li>2. Sredstvo protiv starenja, antioksidant</li> <li>3. Antidijabetik</li> </ol>

## 2.2. JAKA ALKOLNA PIĆA

Jaka alkoholna pića zauzimaju značajno mesto na tržištu industrije poljoprivrednih proizvoda širom sveta. Veliku popularnost na globalnom tržištu ova pića su stekla svojim visokim senzornim kvalitetom, gradeći reputaciju tokom više stotina godina. Postoje različiti nacionalni i internacionalni zakoni, standardi i specifikacije koji definišu, opisuju i predstavljaju različite tipove jakih alkoholnih pića, i koji utvrđuju parametre kvaliteta koje ovi proizvodi moraju da ispunjavaju.

Prema važećem "Zakonu o rakiji i drugim alkoholim pićima" (2009) jaka alkoholna pića se definišu kao pića proizvedena destilacijom fermentisanog kljuka, slada i drugih sirovina poljoprivrednog porekla sa minimalnim sadržajem etanola 15% v/v i sa sačuvanim specifičnim senzornim karakteristikama. Alkoholna pića razvrstavaju se na: (1) rakije i (2) druga alkoholna pića, koja se razvrstavaju na žestoka alkoholna pića i ostala alkoholna pića.

Rakija je alkoholno piće proizvedeno destilacijom fermentisanog kljuka, matičnog soka, komine i pikea voća, grožđa, jestivih šumskih plodova i drugih sirovina poljoprivrednog porekla sa minimalnim sadržajem etanola 15% v/v i sa sačuvanim specifičnim senzornim osobinama koje potiču od sirovine od koje je proizvedena.

Žestoka alkoholna pića su pića proizvedena od rafinisanog etanola poljoprivrednog porekla u celosti, odnosno mešanjem etanola poljoprivrednog porekla, rakije i destilata poljoprivrednog porekla, odnosno mešanjem drugih žestokih pića, rakija i destilata poljoprivrednog porekla uz dodatak aditiva, zaslađivača i aroma sa minimalnim sadržajem etanola 15 % v/v (Zakon o rakiji i drugim alkoholnim pićima, 2009).

Proizvodnja jakih pića se razvijala i usavršavala uporedo sa razvojem aparatura za destilaciju. Tehnika destilacije bila je poznata još u starom Egiptu o čemu nam svedoče spisi cara Ziozmea, u kojima opisuje pojedinosti aparata za destilaciju koje je video kao crteže na zidu antičkog hrama u Memfisu (prestonici starog Egipta u periodu 3400- 2445. godine pre nove ere). Prastari podaci ukazuju da su pomenuti aparati korišćeni za

destilaciju aromatičnog bilja u cilju dobijanja parfema, mirisa i ulja za balsamovanje faraona (Nikićević i Tešević, 2008).

Iako su grčki lekari i filozofi pisali o destilaciji pre nove ere, podaci ukazuju da su alkoholna pića počela da se proizvode mnogo ranije u Aziji, nego u Evropi. Alkohol od pirinča prvo se počeo proizvoditi u Kini još u sedmom veku, dok su Indijci već u devetom veku destilisali aromatično bilje i proizvodili arak i rum (Ilić, 1987). Smatra se da je u Evropi alkohol bio nepoznat do IX veka, kad je Marko Greko pisao o dobijanju 'vatrene vode' od vina, a u zapadnoj Evropi saznanja o destilaciji su donešena kasnije početkom XII veka o čemu svedoče spisi Master Salernus. Narednih tri veka u Francuskoj i Italiji rakiju od grožđa su proizvodili alhemičari i apotekari, i pod nazivom „voda života”, kojom su prepisivali razne moći i preporučivali ga kao preventivu i lek za sve bolesti. Kasnije, rakiju proizvode i prodaju monasi i trgovci. Od XVI veka pa nadalje, iako se prestalo verovati u njenu lekovitost, rakija postepeno postaje narodno piće, koje je označeno kao „pitko zlato” (Hudson i Burglass, 2011). Ratovi i epidemije su u velikoj meri doprineli širenju rakije. Englezi su je prvi put počeli davati svojim vojnicima 1581. godine za vreme rata sa Holandijom. Krajem XVI veka rakija se proizvodila gotovo u svim zemljama Evrope. Nema tačnih podataka kada se počela proizvoditi u Srbiji, ali se zna da je Dušanov Zakonik napisan 1354. godine svojim paragrafom 166 zabranjivao zloupotrebu alkohola, ali se ne navodi o kojoj se vrsti alkoholnog pića radi, vinu ili rakiji. Za vreme Turaka proizvodnja rakije nije bila zabranjena, jer je za svaki kazan za pečenje rakije propisivano plaćanje takse u visini od 12 aspri u periodu od 1389. do 1878. godine. Prvobitno, kazani za destilaciju rakije su bili vrlo primitivni i male zapremine. Vremenom im se zapremina povećavala, a usavršen je i način zagrevanja i hladjenja (Nikićević i Tešević, 2008).

Do povećanog razvoja proizvodnje destilata dolazi posle prvog, a naročito posle drugog svetskog rata. Usavršavaju se i uređaji za preradu grožđa i voća, a osobito aparati za destilaciju. Danas, alkoholna pića se proizvode u složenim industrijskim postrojenjima gde se prerađuju ogromne količine sirovine i dobijaju alkoholna pića vrhunskog kvaliteta.

### 2.2.1. VOĆNE RAKIJE

Voćne rakije su alkoholna pića dobijena destilacijom fermentisanog matičnog soka ili pikea voća, sa sadržajem alkohola najmanje 25 % v/v. Moraju imati naziv prema vrsti voća od kojeg su proizvedena, a naziv prema voćnoj sorti mogu imati samo u slučaju da je data sorta zastupljena preko 70 % (132). Za proizvodnju voćnih rakija koriste se voćne sirovine koje sadrže fermentabilni šećer, iz kojih kvasac tokom alkoholne fermentacije stvara etilalkohol. Kod nas se kao sirovine za proizvodnju voćnih rakija najčešće koriste sledeće voćne vrste: iz grupe koštičavog voća (šljive, kajsije, breskve, višnje i trešnje), iz grupe jabučastog voća (jabuke, kruške i dunje), iz grupe jagodastog voća (maline i kupine) i iz grupe sitnozrnastog voća - borovnica, ribizla, drenjina, maginja (Nikićević i Paunović, 2013).

#### 2.2.1.1. ŠLJIVOVICA

Šljivovica je poreklom sa Balkana, gde je jedno od najzastupljenijih jakih alkoholnih pića, koje veliki broj domaćinstava samostalno proizvodi (za ličnu upotrebu ili pijačnu prodaju). Pored Balkana, u značajnoj količini se proizvodi i u zemljama Centralne Evrope (Mađarska, Češka, Poljska, Slovačka i Rumunija), dok je u manjoj meri prisutna u Francuskoj, Nemačkoj (Zwetschgengwasser) i Švajcarskoj (Pflumliwasser) (18).

Šljivovica je rakija proizvedena isključivo alkoholnom fermentacijom i destilacijom i/ili rektifikacijom kljuka šljive roda *Prunus domestica*. U proizvodnji rakije od šljive destilacija se vrši do sadržaja etanola u destilatu maksimalno 86% v/v tako da destilat sačuva aromu i ukus koji potiču od upotrebene šljive. Pod nazivom prepečenica u promet se stavlja rakija dobijena redestilacijom šljivovice, odnosno dvostrukom destilacijom fermentisanih plodova šljive, sa sadržajem etanola najmanje 37.5 % v/v. Ukoliko rakija sadrži maksimalno 30% etanola onda se ona u promet stavlja pod nazivom meka rakija (132).



Analizom podataka za 1997. godinu, o preradi voća i grožđa u SR Jugoslaviji, uočava se da je od ukupne količine proizvedenih voćnih rakija, čak 66 % bila šljivovica. Od toga je sirove meke šljivovice proizvedeno u količini 25.225.000 litara, a prepečenice u količini 21.687.000 litara. Srbija je sa pokrajinama u proizvodnji šljivovice u SR Jugoslaviji učestvovala sa 98 %, a bez pokrajina čak sa 95 % (Nikićević, 2000).

Za proizvodnju šljivovice u Srbiji se najčešće koriste sledeće rakijske sorte: autohtone (Crvena ranka, Metlaš), Požegača poreklom iz Male Azije i nove nastale ukrštanjem - Čačanska rodna, Čačanska lepotica, Čačanska najbolja (Pecić i saradnici, 2012; Nikićević, 2013).

#### **2.2.1.2. TEHNOLOŠKI POSTUPAK POIZVODNJE ŠLJIVOVICA**

Berbe šljiva namenjenih za proizvodnju šljivovica se vrši kada je plod dostigao tehnološku zrelost (maksimalni sadržaj šećera, mirisa, arome i skladan odnos šećera, arome i kiselina) ili je u blagom stadijumu prezrelosti (maksimalna količina šećera i arome). Plod šljive sadrži 10-25% sm, a sadržaj šećera je 10-16%. Sadrži dosta vitamina A, B i nešto C. Bogata je mineralnim materijama, naročito obiluje kalijumom (Nikićević, 2008).

Da bi postupak alkoholne fermentacije bio efikasniji usled olakšanog dejstva fermentnog sistema kvašćevih ćelija, vrši se priprema ploda šljive postupkom dezintegriranja i odstranjivanjem koštica. Bitno svojsvo koštičavog voća je da jezgro koštice sadrži gorkasti glikozid amigdalin čijom hidrolizom nastaju HCN, benzalaldehid i dva molekula glukoze (Nikićević, 2011). Prilikom prerade važno je da se lomljene koštica svede na minimum i toleriše se do 5% (Jović, 2003).

Voćni kljuk se podvrgava alkoholnoj fermentaciji, pri kojoj kvasac prevodi fermentabilne šećere u etanol i veliki broj sekundarnih jedinjenja, koji iako u malim količinama imaju važan uticaj na specifičnost arome šljivovih rakija. Alkoholna fermentacija može nastati usled dejstva specifične mikroflore prisutne na voću ili dodatkom selekcionisanih kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Prevreli kljuk se destiliše u cilju odvajanja isparljivih sastojaka iz sirovine i njihovog prevođenja u tečnost. Da bi se povećala koncentracija etanola i smanjio sadržaj nepoželjnih jedinjenja, često se vrši

frakciona destilacija, pri kojoj se odvajaju prvenac i patoka od srednje frakcije (srca destilacije). Srednja frakcija jačine 60-75 % v/v odlazi na odležavanje u drvenu burad 2-5 godina, a nekada i duže.

Pored poželjnih komponenti arome, šljivovica sadrži i neka nepoželjna jedinjenja, kao što su HCN, metanol, etilkarbamat i benzaldehid. Koncentracija ovih jedinjenja ograničena je zakonom, tako da po propisima EU sadržaj metanola i HCN ograničen na 12 g/l a.a. i 100 mg/l a.a. (EEC, 1989). Za etilkarbamat nije utvrđena gornja granica, ali se često koristi preporuka SAD-a i Kanade od 400 mg/l a.a. (Buglass i saradnici, 2011). Pravilnikom o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića (2010) propisan je maksimalan dozvoljeni sadržaj u šljivovim rakijama cijanovodonične kiseline i benzalaldehida, koji iznosi 50 mg/L a.a. i benzalaldehida 1000 mg/L a.a., respektivno.

### **2.2.2. RAKIJE OD GROŽĐA**

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića (2010) rakije od grožđa se proizvode isključivo destilacijom prevrelog grožđa. Za proizvodnju rakija, uglavnom se koristi grožđe od vrsta plemenite vinove loze *Vitis vinifera*. U groždane rakije sladaju sledeća jaka alkoholna pića: vinjak, vinovica, lozovača, komovica i steljovača.

#### **2.2.2.1. LOZOVAČA**

Lozovača (lozova rakija) je rakija od grožđa, koja se proizvodi isključivo destilacijom i/ili redestilacijom fermentisanog kljuka grožđa do sadržaja etanola u destilatu maksimalno 86% (132). Stavlja se u promet kao bezbojna, posle odležavanja u inertim sudovima ili obojena posle sazrevanja (starenja) u hrastovim sudovima.

SFRJ je do 1986. godina bila jedina zemlja na svetu koja je proizvodila lozovu rakiju. Nearomatične (neutralne) sorte grožđa, kao što su: vranac, krstač, kratošija, smederevka, prokupac itd., su se uglavnom koristile kao sirovina za proizvodnju lozovače. Nakon odluke Italijanske vlade da proizvodi lozovu rakiju, za proizvodnju ove rakije Italijani kao sirovu uvrstili najkvalitetnije muskatne sorte vinove loze. Ako se proizvede od jedne aromatične sorte, može se prepoznati po karakterističnoj sortnoj aromi. Ako se pak, proizvede od više aromatičnih sorti, aroma je raskošnija (Nikićević i Paunović, 2013).

Za proizvodnju najkvalitetnijih tzv. muskatnih lozovača, koriste se sledeće sorte grožđa: Muskat Hamburg, Neoplanta, Župljanka, Kladovka, Muskat Otonel, Traminac, Godominka, Tamjanika, Afus Ali, Muskat Krokan itd. (Nikićević, 2008).

#### **2.2.2.1.1. TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE LOZOVAČE**

Berba grožđa namenjenog za proizvodnju lozovače vrši se kada grožđe dostigne tehnološku zrelost, koja se najčešće poklapa sa potpunom zrelošću ploda. Vreme berbe ploda je od velike važnosti za dobijanje kvalitetnog proizvoda, jer sa povećanjem šećera povećava se i sadržaj aromatskog kompleksa koji ima presudan uticaj na autentičnost i originalnost lozove rakije.

Aromatski kompleks grožđa se sastoji iz slobodnog dela arome (slobodne isparljive komponente) i vezanog (prekursori arome koji se oslobađaju razgradnjom). Slobodni deo arome pretežno čine hemijska jedinjenja terpeni, zatim jedinjenja nastali degradacijom karotina, pretežno C<sub>13</sub>, norizoprenoidi i komponente fenolnog porekla. Prekursori arome grožđa su vezani u obliku glikozida i predstavljaju važan izvor aromatičnih jedinjenja. Glukozidi se sastoje od aglukona, koji je po hemijskom sastavu terpenol i glicida, koji je po hemijskom sastavu šećer - ramnoza, arabinoza i glukoza. Deo arome u obliku glukozidnih prekursora obično je 3-10 puta veći od slobodnog dela arome (Nikićević, 2008).

Da bi alkoholna fermentacija bila efikasnija vrši se dezintegracija grožđa, koja ima za cilj usitnjavanje bobica grožđa. Peteljke se odvoje i ceo kljuk stavlja na vrenje bez dodavanja konzervansa SO<sub>2</sub>. Aromatične komponente se najvećim delom nalaze u pokožici, da bi se povećao udeo u lozovoj rakiji primenjuje se postupak pokožične

prefermentativne maceracije, kojim se kontroliše kontakt šire i pokožice nakon dezintegracije grožđa. Pri proizvodnji lozovače, pokožica je u kontaktu sa širom za sve vreme alkoholne fermentacije, ali u nekim proizvodnim procesima i tokom destilacije. Ukoliko su enzimi kvasaca i grožđa nedovoljno efikasni mogu za dodavati egzogeni enzimi da bi povećali procenat oslobađanja vezanih aromatičnih sastojaka.

Posle maceracije vrši se ocedivanje i ceđenje kljuka, pa se dobijena šira stavlja na alkoholnu fermentaciju. Alkoholna fermentacija može biti spontanom (epifitnom) mikroflorom ili selekcionisanim sojevima kvasaca. Uporedo sa alkoholnim, odigrava se i jabučno-mlečno vrenje. Sirovina za destilaciju sastoji se iz 80% tečnog i 20% čvrstog dela (komine), koja se destiliše odmah nakon završene alkohone fermentacije da bi se što efikasnije sačuvala primarna aroma. Za destilaciju se koriste aparati sa prekidnim radom, oni mogu biti jednostavni za dvokratnu ili složeni za jednokratnu destilaciju uz obavezno odvajanje sporednih frakcija. Pri redestilaciji sirove lozovače, potrebno je odvajati frakcije – prvenac (0,5-1,5%) i patoku, kada prosečna koncentracija etanola u dobijenom destilatu 60-65%v/v (Nikićević i Paunović, 2013).

Dobijeni destilat lozovače može ići na odležavanje u inertan sud nekoliko meseci, radi stabilizacije i harmonizacije, i kao svež puštati na tržište. Lozovača dobija u kvalitetu kada određen vremenski period (ne manje od 12 meseci) sazreva (stari) u hrastovim buradima. Naročito su cenjene lozovače dobijene od mirišljavih (muskatnih) sorti grožđa (bezbojne ili obojene).

#### **2.2.2.2. VINSKI DESTILAT**

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholnih pića (2010) vinski destilat je poluproizvod dobijen destilacijom i/ili rektifikacijom vina, sa vinskim talogom ili bez njega sa maksimalnim sadržajem etanola 86% v/v, minimalnim sadržajem isparljivih sastojaka 1.250 mg/L a.a. i sadržajem metanola od 200 do 2.000 mg/L a.a. koji u potpunosti potiču od destilisanog vina. Vinski destilat se koristi kao alkoholna

osnova za proizvodnju sledećih jakih alkoholnih pića: vinjak, konjak, armanjak i rakija od vina.

Vinski destilat su inicijalno pravili mornari sa ciljem smanjenja količine vina koje su prevozili u drvenim buradima. Vinima je dodavan destilat da bi povećao sadržaj alkohola koji je služio kao konzervans za čuvanje vina tokom dugih plovidbi. Usled skladištenja vinskog destilata došlo je do ekstrakcije fenola i aromatičnih jedinjenja iz drvenih buradi, tako da je nastalo piće kompleksnije arome (Burglass i sardanici, 2011). Iako je destilacija alkoholnih pića započeta u XII veku, veći obim proizvodnje destilisanih pića je započeo u XVI veku, a prvi konjak je proizveden u sedamnaestom veku (Jackson, 2000).

#### **2.2.2.2.1 TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE VINSKOG DESTILATA**

Vinski destilat vrhunskog kvaliteta najčešće se proizvodi od vina sa neutralnim ili slabo izraženim mirisom i aromom, niskim sadržajem etil alkohola (8-10.5%) i višim sadržajem kiselina (>8%) (Nikićević i Paunović, 2013). Izbor sorti grožđa, zemljište, klima, način uzgajanja, vreme branja i tehnološki postupak proizvodnje vina su specifično definisani za proizvodnju vina, koje se koristi kao sirovina za destilaciju (Burglass i saradnici, 2011). Aroma jakih alkoholnih pića čija je osnova vinski destilat je veoma kompleksna, nastaje kada se primarna aroma grožđa obogati aromatičnim jedinjenjima nastalim u procesu alkoholne fermentacije i tokom destilacije, ali se zaokružuje jedinjenjima nastalim starenjem ili sazrevanjem.

Sorte grožđa koje su se pokazale kao najbolja sirovina za proizvodnju vinskog destilata u našoj zemlji su: Silavanac, Rizling italijanski, Župljnka, Smederevka, Prokupac i Kreaca.

Gožđe se bere u tehnološkoj zrelosti (maksimalna količina šećera i arome i optimalan odnos šećera, arome i kiselina). Neopravdano je brati grožđe pre postizanja tehnološke zrelosti, jer se biraju sorte grožđa čija je karakteristika manji sadržaj šećera. Viši sadržaj kiselina je od velike važnosti, jer se pri vinifikaciji grožđa za vinjak izbegava

korišćenja SO<sub>2</sub> koji prelazi u destilat dajući oštar miris i ukus, ili učestvuje u stvaranju sumporaste kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), tioestara i merkaptana koji negativan uticaj na miris i ukus. Niska pH ima selektivno dejstvo na mikrofloru i deluje kao konzerviran pri čuvanju vina (Nikićević i Paunović, 2013).

Grožđe se dezintegriše i odvajaju se peteljke, prerada se vrši po postupku za proizvodnju belih vina. Kontakt šire i pokožice je nepoželjan, jer povećan sadržaj polifenola negativno utiču na kvalitet. Visok sadržaj polifenola može katalizovati oksidaciju i pospešivanje nastanak proizvoda sa aldehidnim karakterom. Kljuk se cedi i najbolji kvalitet se dobija korišćenjem samotoka. Širu treba centrifugirati da se uklone ostaci pokožice i uklone nepoželjni mikroorganizmi. Nakon centrifugiranja, od velike važnosti za kvalitet proizvoda je da se vino ohladi u što kraćem vremenskom periodu (Bulglass i saradnici, 2011).

Nakon taloženja, u širu se dodaje selekcionisani kvasac da se spreči nastanak nespecifičnog mirisa koji nastaje dejstvom divljih kvasaca. Izbor kvasca je veoma bitan za finalni kvalitet proizvoda, jer prema istraživanjima Stegers i Lamprechts (2000) utiče na količinu proizvedenih viših alkohola, estara masnih kiselina i acetata. Temperatura tokom fermentacije treba da je u intervalu 16-20<sup>0</sup>C (najbolje 18<sup>0</sup>C).

Sa alkoholnom odigrava se i jabučno-mlečna fermentacija. Prema istraživanjima du Plessis i saradnika (2002) spontana jabučno-mlečna fermentacija se javlja kod polovine ispitivanih vina, koja su korišćenja za proizvodnju vinskog destilata. Dejstvom bakterija mlečno-kiselinskog vrenja gubi se intenzitet voćne arome vina.

Vino je najbolje destilisati odmah po završetku vrenja i to zajedno sa kvascem i talogom. Talog kvasca doprinosi da se vino održava u reduktivnoj sredini, pa se neće oksidisati. Destilacijom vina sa kvascem povećava se sadržaj estara masnih kiselina, koji etstrahuju iz ćelije kvasaca u destilat. Destilati su uvek bolji od mladog svežeg vina, nego od starog vina. Poželjno je da vino koje se destiliše, nema šećera ili da sadrži najviše 1 g/L (Nikićević, 2008).

Destilacijom vina iz fermentisane šire izdvaja se alkohol i poželjne aromatske komponente, a umanjuje koncentracija jedinjenja koja imaju negativan efekat na kvalitetet

alkoholne baze. Za dobijanje vinskog destilata koriste se prekidna ili kontinualna destilacija vina.

Prekidna destilacija je dvokratna, pri čemu se od vina sa sadržajem alkohola 8-12% v/v dobija vinski destilat sa 27-28% v/v. Pri redestilaciji izdvaja se frakcija prvenca (oko 1%), patočna frakcija, kada jačina destilata nije veća od 75% v/v. Prvenac i patoka se ponovo vraćaju na destilaciju (Nikićević i Paunović, 2013). Prekidna destilacija traje dugo (oko 7 h), pa usled zagrevanja fermentisane mešavine dolazi do raznih reakcija između komponenti, pri čemu se isparljivim jedinjenjima poveća ili smanjuje koncentracija ili teško isparljiva jedinjenja prelaze u destilat. Reakcije hidroliza, esterifikacije i povremeno pirolize, se mogu odvijati pod uticajem bakra kao katalizatora. Monoterpeni (linalool i  $\alpha$ -terpenol), ketoni ( $\alpha$ -jonon i  $\beta$ -jonon) i vitispiran i trimetil dihidronaftalen mogu nastati, kao rezultat razlaganja i ponovne reakcije različitih terpenoidnih komponenti (de Bod i saradnici, 2008).

Pri kontinualnoj destilaciji za proizvodnju vinskog destilata njačešće se posebna pažnja mora obratiti na izdvajanje lako isparljive aldehidno-estarske frakcije. Uređaji za destilaciju sačinjavaju dve kolone, od kojih je jedna za čišćenje, a druga za rektifikaciju. Kolona za čišćenje služi za odvajanje neisparljivih komponenti, organske i neorganske suspendovane materije, delimično selekcionisane pare mogu biti koncentrisane i dalje odvajane na rektifikacionoj koloni (Burglass i saradnici, 2011). Dobijeni destilati su većeg stepena čistoće, ali sadrže manje količine aromatičnih jedinjenja usled većeg stepena separacije. Kontinualnom destilacijom dobija se vinski destilat jačine 66-70%v/v. Destilati dobijeni kontinualnom destilacijom su pogodniji za vina od neutralnih soti grožđa.

Vinski destilat je poluproizvod, koji se koristi za proizvodnju vinjaka, konjaka i armnjaka sazrevanjem destilata u drvenim hrastovim buradima i bezbojnih vinovica koji se skladište u inertnim sudovima.

### 2.2.3. ŽITNI AKOHOL

Prema Zakonu o etanolu (2009), etanolom smatra se visokoprocenatna alkoholno-vodna mešavina proizvedena destilacijom i rektifikacijom prevrelih ugljenohidratnih sirovina poljoprivrednog porekla sa min 88% v/v etanola. Ukoliko se u nazivu ovog proizvoda navodi upotrebljena sirovina, etanol mora da bude proizveden isključivo od te sirovine (130).

Na osnovu svojstva kvaliteta, koncentracije etanola i čistoće, etanol se može svrstati u četiri kategorije:

- 1) sirovi etanol sa sadržajem alkohola do 88% v/v. Obično je denaturisan sa 0.5-1% piridina i obojen metil-violetom, radi lakšeg raspoznavanja.
- 2) tehnički etanol sa sadržajem alkohola od 88 do 96% v/v.
- 3) rafinisanog etanol sa sadržajem alkohola od 96 do 99% v/v. Najčisti tip rafinisanog alkohola, koristi se u farmaceutskoj industriji za proizvodnju ekstrakata i za proizvodnju nekih tipova žestokih alkoholnih pića (likera),
- 4) apsolutni etanol sa sadržajem alkohola od 99 do 99,99% v/v.

Kvalitet sirovog i rafinisanog etanola proverava se organoleptičkom ocenom, fizičkim i hemijskim ispitivanjima prema Pravilniku o svojstvima fermentisanog etil alkohola (1985). Parametre kvaliteta koje fermentisani etanol mora da zadovoljava prema pravilniku o svojstvima etil alkohola prikazane su u tabeli 4.

Ukus i miris rafinisanog etanola se određuju organoleptički, a izgled proverava na osnovu poređenja sa destilovanom vodom. Da bi zadovoljio parametre kvaliteta etanol mora da bude bezbojan i bistar, bez primesa stranog mirisa i ukusa.

Važna karakteristika rafinisanog etanola je sadržaj nečistoća, odnosno lako oksidabilnih materija, čije se prisustvo određuje probom po Barbeu. Ukoliko je rafinada čista i ima malo nečistoća, ne postoji mogućnost oksidoredukcione reakcije sa kalijum-permanganatom, tako da rastvor ne menja boju u ljubičasto. Obrnuto, kada rafinada ima



puno nečistoća, tj. lako oksidabilnih primesa, tada reakcija oksidacije odmah započinje, a ta reakcija je brza (Nikićević i Tešević, 2008).

**Tabela 4.** Svojstva kvaliteta rafinisanog etanola

Svojstva	Kvalitet		
	I	II	III
Izgled	Bezbojan i bistar		
Miris i ukus	Bez primesa stranog mirisa i ukusa		
Sadržaj etanola (% v/v), (minimum)	96	96	96
Sadržaj metanola (% v/v), (maksimum)	0.10	0.15	0.15
Proba po Barbeu (min.), (minimum)	25	15	10
Sadržaj kiselina (mg/L a.a.), preko sirćetne kiseline	20	40	60
Sadržaj estara (mg/L a.a.), preko etil acetate	40	60	Ne utvrđuje se
Sadržaj aldehida (% v/v a.a.), preko acetaldehid	0.001	0.002	0.004
Sadržaj viših alkohola (% v/v a.a.), preko izoamil-alkohol	0.0005	0.003	0.005
Furfural	Ne sme da sadrži		

### 2.2.3.1 TEHNOLOŠKI POSTUPAK PROIZVODNJE RAFINISANOG ŽITNOG ALKOHOLA

Rafinisani alkohol se koristi u prehrambenoj industriji za proizvodnju jakih alkoholnih pića (likera, votki i drugih pića) i za proizvodnju ekstrakata. U našoj zemlji najčešće korišćena žitna sirovina za proizvodnju kvalitetnog rafinisanog alkohola je

kukuruz. U proizvodnji se može koristiti celo zrno kukuruza, ali je efikasnije korišćenje brašna ili krupice, posle izdvajanja klice. Kukuruz se u odnosu na druga žita razlikuje po visokom sadržaju masti 5.1% sm, pa ukoliko nije odstranjena klica koja sadrži najveći procenat masnoća, destilat može imati neprijatan patočni priukus (Nikićević i Paunović, 2013).

Kukuruz spada u sirovine u kojima je dominantni ugljeni hidrat skob, koji kvasci mogu usvajati samo ukoliko ga razgradimo do fermentabilnih šećera. Proces proizvodnje etanola započinje postupkom suvog ili morkog drobljenja kukuruza. Izdrobljenu masu mešamo sa vodom (u odnosu 3-4:1), skrob bubri i dolazi do razaranja granulacione strukture, gubi se kristalna struktura i dolazi do želatinacije skroba. Nakon želiranja, skrob postaje dostupan termostabilnom enzimu  $\alpha$ -amilazi, koji ga ragrađuje do manjih jedinica dekstrina (Kelsall i Lyons, 2003). Postupak razgradnje intenziviramo, provođenjem suspenzije kroz protočni crevni grejač u kome se ona zagreva pregrejanom parom do 105°C. Nakon 15-20 sekundi, smeša se iz grejača prevodi u ekspanzicioni sud na normalnom pritisku. Usled ekspanzije dolazi do razaranja želiranih skrobnih zrnaca, a smeša se adijabatski hladi do 80°C i na datoj temperaturi zadržava 15-20 minuta. Nakon datog vremena masa se hladi do temperature ošećerenja (60-65°C) i u nju se doda potrebna količina enzima gluko-amilaze, koji dovodi do konačnog ošećerenja skroba.

U dekanteru se ošećerena komina oslobađa od nerazgrađenih delova zrna. Nakon dekantacije tečna frakcija se prevodi u fermentor, gde se razređuje vodom do 20% suve materije i hladi do 30-32 °C. Ohlađenoj ošećerenoj komini se dodaje suspenzija kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, čime počinje alkoholna fermentacija koja traje 72 h. Nakon završenog vrenja, iz prevrele masa se izdvaja kvasac, a tečna fermentisana frakcija se destiliše na kolonama. Dobijeni destilat nije dovoljne jačine, pa se koncentriše procesom rektifikacije u kojoj se izdvaja frakcija čistog etanola od 96.4% v/v. Pored njega izdvajaju se još dve frakcije, lakše i teže isparljivih jedinjenja dobijenih fermentacijom (Nikićević i Paunović, 2013).

### 2.3. AROMATIČNA JEDINJENJA JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

Aromatične komponente, njihov sadržaj, senzorna svojstva i prag osetljivosti su najvažnije za kvalitet i autentičnost destilisanih pića. Najčešće upotrebljavana metoda za istraživanje isparljivog aromatskog kompleksa jakih alkoholnih pića je gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrofotometrijom. Direktnim injektovanjem destilata, moguće je odrediti više od 50 jedinjenja sa sadržajem od 0.1-1000 mg/l, dok se primenom specijalnih metoda ekstrakcije ovaj broj može povećati do preko 1000 (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Analizom ovih jedinjenja može se odrediti tip pića i zemlja porekla, što ima ogromnu važnost u proizvodnoj kontroli i prevenciji zloupotreba (Tešević i saradnici, 2005).

Jedinjenja koja doprinose senzornim karakteristikama destilisanih pića mogu se podeliti u četiri grupe:

- primarne aromatične komponente,
- sekundarne aromatične komponente,
- tercijarne aromatične komponente,
- kvaternerne aromatične komponente, (Nikićević, 2008; Tešević i saradnici, 2005).

Primarne aromatične komponente su isparljiva jedinjenja sa karakterističnim senzornim svojstvima koja potiču iz sirovina upotrebljenih za fermentaciju i koja značajno doprinose formiranju tipične arome pića. Aromatične materije voća i grožđa nisu ravnomerno raspoređene u masi ploda, već se u najvećoj koncentraciji nalaze u sastavu pokožice. Proces proizvodnje jakih alkoholnih pića treba definisati tako da se očuvaju primarna jedinjenja koja određuju specifičnu aromu proizvoda.

Aromatične komponente poreklom iz voća variraju u zavisnosti od sorte, geoloških formacija, klimatskih uslova, uslova gajenja i tehnološke zrelosti ploda (Nikićević i Tešević, 2010). Analizom aromatskog kompleksa šljive vrste *Prunus domestica* Etievant i saradnici (1986) su utvrdili da se sastoji od 130 komponenti, uključujući 62 estra, 14 hidrokarbona, 11 aldehida, 10 alkohola, 8 laktone i 8 ketone. Aromatični sastojci tipični za

šljivu bili su benzaldehid, etil-nonanat, linalol,  $\gamma$ -oktalakton,  $\gamma$ -dekalakton, 2-fenetanol i metil-cinamat (Ismail i saradnici, 1981).

Aromatske komponente grožđa spadaju u sledeće grupe isparljivih hemijskih jedinjenja: alkohole, estre, kiseline, terpene i karbonilna jedinjenja. Za proizvodnju lozovače i vinskog destilata koriste se vinske sorte, koje najčešće spadaju u nearomatične vrste (Rosillo i sardanici, 1999). Nearomatične vrste najčešće proizvode alkohole i aldehide sa 6 ugljenikovih atoma kao što su heksanal, (*E*)-2-heksenal, 1-heksanol, (*Z*)-3-heksen-1-ol i (*E*)-2-heksen-1-ol nakon drobljenja pokožice. Oktanska kiselina i alkoholi, preventivno 2-feniletanol su detektovani nakon drobljenja bobica grožđa. Prema modernim istraživanjima većina aromatskih komponenti potiče iz pokožice, ali važne aromatične komponente, linalol i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen, potiču iz mesa bobice (Jackson, 2003).

Proces proizvodnje rafinisanog alkohola definisan je tako da primarne komponente budu svedene na minimum. Ukoliko je korišćena sirovina lošijeg kvaliteta u velikom meri se povećava broj jedinjenja i njihove koncentracije, što negativno utiče na kvalitet rafinisanog etanola.

Sekundarne aromatske komponente nastaju u procesu fermentacije ugljenohidratnih sirovina. Pored etanola i ugljenik-(IV)-oksida, koji su glavni proizvodi alkoholne fermentacije, nastaje i veliki broj drugih isparljivih jedinjenja (aldehidi, ketoni, viši alkoholi, organske kiseline, estri), sporednih proizvoda fermentacije, koji se u jakim alkoholnim pićima nalaze u relativno niskoj koncentraciji (0.5-1 %). U tabeli 5 prikazani su glavni sporedni proizvodi fermentacije, nastali kao rezultat delovanja kvasaca i drugih prisutnih mikroorganizama, koji su identifikovani u pićima proizvedenim od različitih sirovina (voća, vina, žita, šećerne trske i drugih ugljenohidratnih sirovina). Koncentracioni opseg jedinjenja dat je u mg/l pića jačine 40 % v/v. Neke od ovih supstanci, kao što su akrolein, diacetil, 2-butanol, alil-alkohol i sirćetna kiselina, nastaju kao rezultat povećane aktivnosti kontaminirajuće mikroflore, i u određenim koncentracijama uzrokuju neprijatnu aromu proizvoda (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

**Tabela 5.** Isparljiva jedinjenja u JAP-u nastala tokom alkoholne fermentacije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Jedinjenje	Opis arome	Prag osetljivosti [mg/l]		Koncentracija [mg/l (40 % v/v)]
		u vodi	u alkoholnom rastvoru	
<b>Karbonilna jedinjenja</b>				
Acetaldehid	Opor, sladak	0.025	10	< 2-160
Dietoksietan	Voćna, šeri	0.005	1	< 3-72
Trietoksietan	Opora	-	-	< 0.5-6
Akrolein	Ren, ljuta	0.04	-	< 0.1-1.2
Diacetil	Buter	0.1-2.5	-	< 0.1-12
<b>Alkoholi</b>				
Etanol	Alkoholna	24.9	-	-
Metanol	Alkoholna	-	668	20-1000
1-propanol	Ošamućujuća	500	830	40-800
1-butanol	Alkoholna	0.5-1.3	820	1-80
2-metil-1-propanol	Alkoholna	-	40-75	40-400
2-butanol	Alkoholna	-	1000	0.4-320
2-metil-1-butanol	Sladna	0.32	7-30	8-720
3-metil-1-butanol	Sladna	1	7-30	4-1200
Alil-alkohol	Neprijatna	19	-	4-52
Feniletal-alkohol	Ruža	1	7.5-10	4-32
<b>Estri</b>				
Etil-acetat	Rastvarač, aceton	17.6	7.5	4-800
Etil-butanoat	Voćna, cvetna	0.001	0.02	< 0.1-3.2
Metilbutil-acetat	Voćna, banana, kruška	0.3	0.03	1.2-12
2-feniletal-acetat	Ruža, med, voće	0.02	0.25	4-12
Etil-heksanoat	Jabuka, banana, ljubičica	0.005	0.005	0.4-3.2
Etil-oktanoat	Ananas, kruška	0.07	0.002-0.26	4-20
Etil-dekanoat	Cvetna, masna	0.5	-	4-36
Etil-dodekanoat	Cvetna	-	-	1.6-32
Dietil-sukcinat	-	-	100	2-12
Etil-laktat	-	-	100	< 10-400
<b>Kiseline</b>				
Sirćetna	Sirće, opora	100-1000	-	1-50
Buterna	Buter	1	4-10	< 0.1
Heksanska	Užegla, masna	-	3-8	1-19
Oktanska	Uljasta, masna, sapunasta	-	8.8-15	1-4
Dekanska	Masna, citrus	-	10-15	0.3-5

Metanol, 1-butanol i 2-butanol su supstance koje ne nastaju alkoholnom fermentacijom a čiji je sadržaj karakteristika upotrebljene sirovine. Njihovi pragovi osetljivosti su relativno veliki, tako da ne utiču značajno na senzorne karakteristike proizvoda (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Metanol nastaje enzimskom razgradnjom pektina i u višim koncentracijama se nalazi u voćnim rakijama. Visoko je toksičan i u količini od 6-10 g predstavlja rizik za zdravlje (Apostolopoulou i saradnici, 2005; Tuszyński, 1989). Viši alkoholi ili "patočna ulja" su kvantitativno najveća grupa isparljivih aromatičnih jedinjenja u jakim alkoholnim pićima i nastaju degradacijom aminokiselina preko odgovarajućih ketokiselina. Najvažniji su 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol i aromatični 2-feniletanol. Prevelika koncentracija viših alkohola uzrokuje jako oporan, patočni miris i ukus, dok u optimalnom sadržaju doprinose voćnoj aromi pića. 2-metilbutanol i 3-metilbutanol predstavljaju mešavinu koja se naziva izoamil-alkohol, i koji, zavisno od sirovine čini 40-70 % patočne alkoholne frakcije (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

U odnosu na pivo i vino, prisustvo kiselina kod JAP-a je značajno manje, usled esterifikacije i odvajanja tokom destilacije, tako da je kod pića tipa konjaka njihov sadržaj oko 500 mg/l a.a. (apsolutnog etanola). Sirćetna kiselina nastaje za vreme i tokom fermentacije, oksidacijom etanola pod aerobnim uslovima aktivnošću bakterija sirćetne kiseline, a njena koncentracija ne bi trebalo da je veća od 1000 mg/l a.a.. Estri predstavljaju najveću grupu aromatičnih sastojaka JAP-a sa uglavnom prijatnim aromatskim karakteristikama. Od najvećeg su značaja za senzorni profil pića i uglavnom se nalaze u koncentracijama koje prevazilaze njihove pragove osetljivosti (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Starenje (sazrevanje) JAP-a je veoma važan tehnološki postupak kojim se poboljšava često sirovi i opori miris i ukus svežih destilata. Obično se na sazrevanje stavljaju destilati sa povećanim sadržajem etanola do 70 % v/v, a nakon sazrevanja se destilovanom vodom razblažuju do željene jačine. Različita jedinjenja međusobno reaguju, tako da tokom starenja koncentracija etil-estara masnih kiselina raste, dok se sadržaj estara drugih alkohola smanjuje usled transesterifikacije. Takođe, dolazi do isparavanja aldehida i

do građenja acetala. Ukoliko se sazrevanje obavlja u drvenim sudovima, doći će do ekstrakcije određenih isparljivih jedinjenja, kao što su *cis*- i *trans*- $\beta$ -metil- $\gamma$ -oktolakton (viski laktoni), vanilin, gvajakol, eugenol, krezol itd. (tabela 6). Drvena burad dozvoljavaju prolazak vazduha i omogućavaju isparavanje etanola, čime njegov sadržaj postaje manji a aroma sve intenzivnija, kompleksnija i koncentrovanija (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Nakon sazrevanja u drvenim buradima, bezbojnim destilatima se menja boja u različitim tonovima od žute do braon. Deo ekstrahovanih polifenola iz drveta se razlaže pod uticajem atmosferskog kiseonika, koji rezultuje promenom boje i redukcijom trpkosti (Alañón i saradnici, 2011).

**Tabela 6.** Aromatična jedinjenja poreklom iz drveta (Christoph i Bauer-Christoph, 2007).

Jedinjenje	Opis arome	Prag osetljivosti [mg/l]
Furfural	Dim, badem	8
Gvajakol	Dim	0.005
<i>cis</i> -metil- $\gamma$ -oktolakton/ <i>trans</i> -metil- $\gamma$ -oktolakton	Hrast, drvo	0.02
Vinilgvajakol	Fenol, karanfilić	0.03
4-metilgvajakol	Dim, nagorelo drvo	0.01
4-etilgvajakol	Dim, fenol	0.02
4-etilfenol	Konjušnica, konj	0.13
Eugenol	Ljuto, karanfilić	0.007
Vanilin	Vanila, začinska	0.1
o-krezol	Lekovi, katran	0.04
m-krezol	Lekovi, dim	0.2

## 2.4. TRAVARICE

Počeci korišćenja aromatičnog i začinskog bilja za pripremanje pića datiraju još iz perioda drevnih mediteranskih zemalja, kada je bilo uobičajeno dodavati aromatično bilje vinu. Hipokrat je bio jedan od prvih proizvođača i najverovatnije izumitelj aromatizovanog vina, koje se po njenu naziva i hipokratovo vino ili *vinum absintium*, koje je preteča alkoholnog pića vermuta. Egipćani i Grci su već bili upoznati sa tajnama destilacije aromatičnog bilja i ova znanja koristili su za proizvodnju destilata, koje su dodavali vinima (Tonutti i Liddle, 2010; Liddle i Boero, 2003). Razvojem destilacione tehnologije etil-alkohol je izolovan iz fermentisanog pića, koji se pokazao kao pogodan rastvarač za isparljive i lekovite komponente bilja.

Prema Pravilniku o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića (2010), travarica se proizvodi od destilata poljoprivrednog porekla ili od mešavine destilata, dodavanjem macerata i/ili destilovanih macerata aromatičnih biljaka ili delova biljaka.

Travarice se tradicionalo proizvode u mediteranskim zemljama i u velikom broju balkanskih zemalja, od kojih su najznačajni proizvođači Srbija, Makedonija, Bugarska i Hrvatska. Kao alkoholna osnova najčešće se koriste destilati različitog fermentisanog voća. Voćna sirovina destilata zavisi od proizvodne tradicije i zemlje porekla travarice, a u Srbiji se najčešće koriste šljivove prepečenice (Pecić i saradnici, 2012b).

U proizvodnji jakih alkoholnih pića, najčešće korišćeni metod ekstrakcije aromatičnih i bioaktivnih komponenti bilja je maceracija u etanolno-vodenom rastvoru. Proces maceracije se odigrava na sobnoj temperaturi, tako da ne dolazi do denaturacije termolabilnih komponenti bilja (Tonutti i Liddle, 2010). Bilje je pored isparljivih aromatičnih komponenti bogat izvor i bioaktivnih komponenti među kojima su najbrojniji polifenoli, fitoaleksini, alkaloidi, kumarini, lignini, organske kiseline itd (Saroya, 2011). Prema navodima Alvesa i Rosa (2007), 20 hiljada biljaka se koristi za medicinsku upotrebu. Upotreba medicinskog bilja u ljudskoj ishrani ima pozitivan efekata na zdravlje konzumenata. Najznačajniji efekti bilja na ljudski organizam su antioksidativni, stimulacija



digestivnog sistema, anti-imflamatorno, antimikrobno, hipolipidemijsko, antimutageno i antikancerogeno (Wojdylo i saradnici, 2007).

Funkcionalne i senzorne karakteristike pića zavise od koncentracije, kombinacije i hemijske kompozicije upotrebljenog bilja. Hemijski sastav bilja varirira u zavisnosti od korišćenog dela biljke, lokacije, vremena berbe, uslova skladištenja i mnogih drugih.

## 2.5. JAKA ALKOHONA PIĆA SA DODATKOM GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Vekovima se u zemljama dalekog Istoka gljiva *Ganoderma lucidum* koristila kao dodatak raznim alkoholnim pićima zbog svog gorkog ukusa i lekovitog dejstva. Maceracijom u alkoholnim pićima postiže se efikasnija kompozicija i povećava rastvaranje biološki aktivnih materija u poređenju sa ekstrakcijom u vodenom rastvoru. Takođe, alkoholna pića poboljšavaju cirkulaciju krvi i pospešuju kurativni efekat. Zbog specifičnih senzornih karakteristika i povećanja funkcionalnosti, poslednjih godina se *Ganoderma lucidum* koristi kao interesantan dodatak alkoholnim pićima.

Danas se može naći veliki broj patenata za proizvodnju jakih pića za čiju proizvodnju je korišćenja gljiva, najveći broj njih odnosi se na proizvodnju piva. Pivu se može dodavati jedinjenje hloran steroid izolovan iz *G.lucidum*, koji se koristi kao zamena za gorke materije hmelja (Honda i Sakamura, 1981) ili se gljiva može dodavati u obliku ekstrakta, koji se koristi za aromatizaciju standardnog piva (Lan Tsai-Wang, 2001; Leskošek-Čukalović i saradnici, 2010a, 2010b). U proizvodnji japanskog sake pića koristi se za aromatizaciju u obliku arome ili ekstrakta (Nishiyama, 1981). Dodatkom gljive ne samo da se menjaju njene senzorne karakteristike (ukus, miris i boja), nego se povećavaju i funkcionalna svojstva, jer se estrahuju biološki aktivne komponente gljive u alkoholno vodenoj smeši.

Poslednjih decenija sve je veći broj patenata za proizvodnju rakija kojima se dodaje *G.lucidum* bilo sama ili kao komponenta biljnih mešavina, kojima se pripisuju lekovita

dejstva. Iako postoji veliki broj патената, mali broj radova u kojima se ispituje efekat gljive na karakteristike jakih pića je napisan. U jednom od malobrojnih naučnih radova, Kim i saradnici (2004) ispitivali su efekat gljive *Ganoderma lucidum* na kvalitet i funkcionalne karakteristike tradicionalne pirinčane rakije, Yakje. Sa povećanjem količine dodate gljive jakji povećavao se intenzitet gorčine i travnate arome, a smanjivao se intenzitet arome na alkohol. Vukosavljević i saradnici (2009) su ispitivali antioksidativnu aktivnost biljnog likera Biter 54, kojima je dodavan ekstrakt *G. lucidum* kao 55 sastojak. Upoređivanjem antioksidativnog kapaciteta Bitera 55 i komercijalnog farmaceutskog ekstrakta ( $EC_{50} = 1,055 \mu\text{l}/\mu\text{g DPPH}$ ) i komercijalnog likera  $EC_{50} = 2,236 \mu\text{l}/\mu\text{g DPPH}$ ), možemo zaključiti da je antioksidativnost Bitter 55 ( $EC_{50} = 0,387 \mu\text{l}/\mu\text{g DPPH}$ ) značajno veća.

### 3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA

*Ganoderma lucidum* je gljiva izuzetno bogata bioaktivnim komponentama, koje pospešuju zdravstvenu otpornost organizma čoveka. Sadržaj bioaktivnih komponenti se povećava maceracijom ili alkoholnom ekstrakcijom. Cilj naučnog istraživanja bio je:

- Dobijanje proizvoda sa povećanim sadržajem polifenola i većim antioksidativnim kapacitetom,
- Definisane postupka alkoholne ekstrakcije, kao i optimizacija procesa u cilju dobijanja ekstrakta sa najvećim sadržajem polifenolnih jedinjenja i sa najboljim aromatskim kompleksom,
- utvrđivanje antimikrobnih svojstava dobijenih alkoholnih ekstrakata i pića metodom difuzije sa filter diskova,
- ispitivanje funkcionalnih svojstava kompleksa obogaćenog polifenolnim materijama gljiva na ogovarajuće ćelijske linije-HeLa ćelijski model,
- ispitivanje funkcionalnih svojstava kompleksa obogaćenog polifenolnim materijama gljiva na ćelijske linije,
- poređenje macerata gljive *Ganoderma lucidum* u vinskom destilatu, šljivovici, lozovači i monotravaricama,
- definisanje ugljenohidratnog sastava dobijenih pića i ekstrakata,
- utvrđivanje kvalitativnih i kvantitativnih promena u aromatskom i hemijskom kompleksu tokom postupka sazrevanja specijalnih travarica i novih vrsta jakih alkoholnih pića sa dodatkom ekstrakta gljive *Ganoderma lucidum*,
- mogućnost korišćenja ekstrakta ove gljive za ubrzano sazrevanje jakih alkoholnih pića.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

U istraživanju je korišćeno suvo plodonosno telo gljive *Ganoderma lucidum* GL-I iz kolekcije za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, ova gljiva je izolovana u okolini Beograda. Plodonosna tela su proizvedena na supstratu od hrastove strugotine i pšeničnih mekinja u poluindustrijskim uslovima, zatim su sušena do sadržaja vlage manje od 12%.

### 4.1. ANALIZA GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Nakon sušenja, gljiva je usitnjena i analizirani su sledeći parametri: sadržaj vlage, sirovih proteina, sirove masti, ukupnih šećera i ukupnog pepela.

#### 4.1.1. ODREĐIVANJE VLAGE

Za određivanje sadržaja vlage homogeni uzorak 1 g mlevene gljive je sušen u aluminijumskim posudama sa poklopcem u vakum sušnici 4 h na 95-100°C. Nakon sušenja uzorak je izvađen iz vakum sušnice, poklopljen i ostavljen pola sata u eksikatoru da se ohladi do sobne temperature. Ohlađenom uzorku je izmerena težina na analitičkoj vagi i ponovo je sušen još 1 h na 95-100°C i postupak je ponavljan do izmerene konstantne mase sušenog uzorka. Vлага uzorka je preračunata kao gubitak mase tokom sušenja i izračunava se u %.

#### 4.1.2. ODREĐIVANJE PEPELA

Većina pečuraka sadrži u svom sastavu 5-10% pepela računato na suhu masu pečurke. Sadržaj pepela se izračunava kao razlika mase pečurke i mase nakon paljenja do konstantne težine u peći na 550°C i izražava se u %.

**PRINCIP.** Oko 2 g osušene pečurke je izmereno u porculanskom sudu, koji je prethodno izaren i čija je masa izmerena, nakon hlađenja do sobne temperature u eksikatoru. Uzorak je spaljivan u peći na oko 550°C do obrazovanja belo-sivog pepela i ostavljen da se ohladi. Dodato je nekoliko kapi destilovane vode da se rastvore rastvorljive soli i sušeno polako na ringli, i zatim u pećnici do postizanja konstantne mase na 550°C. Izmerena je težina uzorka nakon spaljivanja na analitičkoj vagi.

#### 4.1.3. SADRŽAJ PROTEINA

Sadržaj proteina gljive je određivan korišćenjem Kjeldalove metode, pomoću koje se indirektno određuje sadržaj proteina preko organskog azota koji se množi sa korekcionim faktorom ( $N \times 6.25$ ) i izračunava procenat proteina.

**PRINCIP.** Uzorak gljive se zagrevanjem sa koncentrovanom sumpornom kiselinom, dehidruje i postepeno oksiduje u Kjeltec digestionom aparatu. Ugljenik sadržan u uzorku se postepeno oksiduje do ugljendioksida, vodonik do vode, a sumporna kiselina se redukuje do sumpordioksid. Postupak razaranja se ubrzava dodatkom katalizatora ( $\text{CuSO}_4$ , Cu i Se) i supstanci koje povećavaju temperaturu ključanja sumporne kiseline ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ). Krajnji rezultat digestije proteina homogenog uzorka je rastvor amonijum sulfata kome se dodaje baza NaOH kako bi se iz amonijeve soli oslobodio amonijak. Oslobodjen amonijak se sakuplja u poznatu količinu 4% rastvora borne kiseline u Kjeltec automatic destilacionoj jedinici. Uzorak borne kiseline u kome je

sakupljen amonijak se titriše sa 0.1 HCl u automatskom titratoru. Određeni sadržaj organskog azota je množen sa korekcionim faktorom 6.25, jer prosečni sadržaj proteina je 16% (100/16).

#### 4.1.4. ODREĐIVANJE MASTI

Sadržaj sirove masti u uzorcima određivan je pomoću Soxhlet-ovog aparata za kontinualnu ekstrakciju korišćenjem petroletra kao organskog rastvarača.

**PRINCIP.** Odmeri se oko 2 g uzorka gljive koji se postavi u specijalnu cilindričnu posudu od presovanog celuloznog papira (hilzna). Nakon merenja, uzorak se postavi u čašu od 100 ml i suši tokom 1h na 105°C. Cilindrične posude u kojima se vrši ekstrakcija, se operu i suše se 1h na 105°C i nakon hlađenja do sobne temperature u eksikatoru (45 minuta) izmeri se njihova masa na analitičkoj vagi. Celulozne hilzne sa osušenim uzorcima se postave u cilindrične posude ispod kojih se nalazi grejno telo. Pare rastvarača odlaze u hladnjak, gde se kondenzuju i kondezat se u kapima vraća u hilzne i ekstrahuju mast. Ekstrakcija traje oko 5-6 h, tokom koje petroletar iz ekstraktora u balon prelazi 6-10 puta. Nakon ekstrakcije cilindrična posuda se suši do konstantne mase na 105°C. Sušenje prvo traje 2h, zatim se na svakih pola sata proverava masa.

$$\% \text{ masti} = \frac{\text{masa masti u cilindričnoj posudi posle sušenja}}{\text{masa uzorka}} \times 100 \%$$

#### 4.1.5. SADRŽAJ UGLJENIH HIDRATA

Sadržaj ugljenih hidrata u sastavu gljive je određivan preračunavanjem uz pomoć formule:

Ugljeni hidrati (% pečurke) = 100 - vlaga (%) - sadržaj proteina (% pečurke) - masti (% pečurke) - pepeo (% pečurke) = ukupni ugljeni hidrati (g/100g suve gljive).

#### 4.1.6. PRIPREMA MATERIJALA

Za pripremanje pića i ekstrakata korišćena je suva usitnjena gljiva *Ganoderma lucidum*. Gljiva je usitnjena na komadiće od oko 1 cm ili mlevenjem u aparatu za kafu. Određivan je srednji prečnik čestica samlevene gljive pomoću seta sita različitih promera i pomoću formule:

$$\frac{100}{d} = \sum\left(\frac{mi}{di}\right)$$

Gde su:  $d$  - srednji prečnik čestica,  $mi$  - maseni procenat  $i$ -te frakcije (%), a  $di$  - srednji prečnik  $i$ -te frakcije (mm).

#### 4.2. ALKOHOLNI MEDIJUMI

Kao polazni alkoholni medijum za proizvodnju ekstrakata je korišćen žitni alkohol (96%) kupljen u lokalnom supermarketu. Za proizvodnju pića sa dodatkom gljive korišćena je lozova prepečenica proizvedena na oglednom dobru Radmilovac Poljoprivrednog fakulteta, šljivova prepečenica lokalnog proizvođača iz aleksandrovačkog okruga, selo Starci i vinski destilat industrijske proizvodnje fabrike „Vršački vinograd“, Vršac.

#### 4.2.1. ANALIZA ALKOHOLNIH MEDIJUMA

Za uzorke alkoholnih medijuma (lozova i šljivova prepečenica, vinski destilat) prema Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza alkoholnih pića (Službeni list SFRJ, 1988) potrebno je kvantitativno odrediti sadržaj etanola, metanola, ukupnih kiselina, aldehida, estara, viših alkohola i ekstrakata, a za šljivovu prepečenicu određivaće se benzalaldehid i cijanovodonična kiselina.

##### 4.2.1.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA ETANOLA

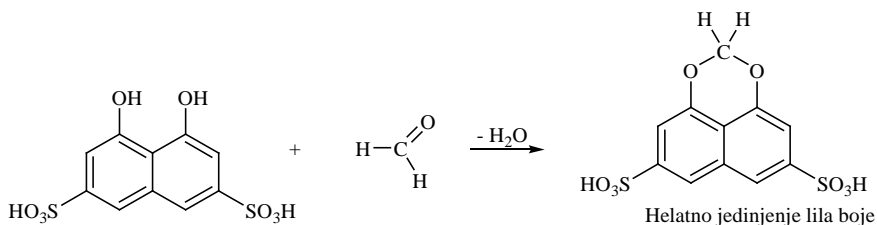
Etanol je osnovi sastojak alkoholnih pića, koji je u čistom stanju bistra, bezbojna, neutralna, higroskopna i lakopokretljiva tečnost, prijatnog karakterističnog mirisa i palećeg ukusa. Sa vodom se se meša u svim oblicima i rastvara veliki broj polarnih, ali i nepolarnih jedinjenja. Alkoholni medijumi predstavljaju smešu alkohola i vode, i ne sadrže bojene i ekstraktibilne materije, pa redestilizaciju nije potrebno izvršiti. Uzorak se homogenizuju i temperira u vodenom kupatilu na 20°C, zatim se pomoću šprica injektuje u aparat Alcoyser Beer Me Analyser Systema (Anton Paar Gmbh, Austria), i sadržaj etanola direktno očitava. Svaka analiza je urađena u triplikatu.

##### 4.2.1.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA METANOLA U ALKOHOLNIM PIĆIMA SPEKTROFOTOMETRIJSKIM PUTEM POMOĆU HROMOTROPNE KISELINE

Metanol se indirektno određuje prevođenjem u formalaldehid oksidacijom pomoću  $\text{KMnO}_4$  u kiseloj sredini. Formalaldehid ima sposobnost građenja obojenog kompleksa sa



odgovarajućim reaktivima, u metodi se koristi hromotropna kiselina. Koncentracija metanola se određuje kolorimetrijskom metodom određivanjem intenziteta obojenja helatnog jedinjenja koji obrazuje formalaldehid.



Jaka alkoholna pića kod kojih se određuje metanol treba predestilisati, vodeći računa da se izbegne gubitak etanola. Uzorci pića kod kojih je određen procenat etanola, svode se na 2.5% v/v etanola. Hromotropna kiselina nije strogo selektivna samo za formaldehid, pa se prilikom određivanja uvek analizira i sadržaj metanola u kontrolnom uzorku. Kontrolni uzorak se priprema sipanjem 2.5 ml 2.5% etanola u epruvetu sa šlifovanim zatvaračem.

Sadržaj metanola se očitava sa standardne krive za čiju pripremu se prvo napravi osnovni rastvor metanola, tako što se u normalni sud od 100 ml, doda 1 ml 100% metanola (p.a.) i dopuni do oznake sa 2.5% rastvorom etanola, dobro homogenizuje i termostatira na 20°C.

Za ovu metodu postavlja se serija standardnih rastvora tačno poznatih koncentracija metanola. U pet normalnih sudova od 100 ml sipa se redom 0.4; 0.8; 1.2; 1.6 i 2.0 ml osnovnog rastvora i dopune sa 2.5% etanolom do markice uz obavezno temperiranje na 20°C. Sadržaj metanola u normalnim sudovima iznosi 0.16; 0.32; 0.48; 0.64; i 0.80 % vol/a.a.. Iz svakog normalnog suda, otpipetira se 2.5 ml rastvora standarda u specijalne epruvete od Pyrex stakla i dodaju sledeći reagensi 1 ml rastvora H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:3) se pomeša sa 1 ml 1% vodenog rastvora KMnO<sub>4</sub>.

Epruveta se ostavi da odstoji 10 min radi potpune oksidacije (pojavljuje se braon boja, tj boja jedinjenja Mn<sup>2+</sup>), a zatim doda 1-2 kapi zasićenog vodenog rastvora natrijum sulfita (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), dok se rastvor ne obezboji. Sadržaj epruvete se homogenizuje, a zatim se

doda 0.5 ml 2% hladnog rastvora hromotropne kiseline. Sadržaji epruveta se ponovo dobro homogenizuju i na kraju doda 5ml koncentrovane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Zatim se epruvete stavljaju u pripremljeno ključalo vodeno kupatilo (100°C), gde ostaju 20 minuta. Posle 20 minuta, epruvete se vade iz vodenog kupatila, skidaju šlifovani zatvarači i stavljaju u posudu sa ledenom vodom. Nakon hlađenja do sobne temperature, vrši se očitavanje apsorcije ljubičastog obojenog helatnog jedinjenja na  $\lambda=570$  nm u staklenoj kiveti debljine 10 mm.

Nakon određivanja apsorcije uzorka sa standardne krive se očitava sadržaj metanola u uzorku (% vol/aa). Kriva predstavlja zavisnost apsorcije od količine metanola.

### 5.2.1.3. ODREĐIVANJE UKUPNIH KISELINA

Ukupna titraciona kiselost određuje se titracijom alkoholnog pića sa 0.1 M rastvorom NaOH uz fenolftalein kao indikator. Na ovaj način se može određivati sadržaj kiselina svih alkoholnih pića.

U erlenmajer od 100 ml se odpipetira 25 ml predestilisanog uzorka jakog alkoholnog pića, doda 15-20 ml destilovane vode i kuva 10 minuta u aparatu sa povratnim hladnjakom radi uklanjanja rastvorenog CO<sub>2</sub> (ugljene kiseline-H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Zatim se erlenmajer sa uzorkom zatvori odgovarajućim šlifovanim zatvaračem i ohladi pod mlazom hladne vode. Ovom rastvoru se doda 1-2 kapi rastvora indikatora fenolftaleina i titruje sa 0.1 M NaOH, do prve pojave blede ružičaste boje koja mora biti stabilna 20 sekundi. Ukupna količina kiselina izražava se u mg sirćetne kiseline na litar pića, prema sledećem obrascu:

$$T_k \text{ (g/L)} = a \times F \times 0.24$$

gde su: T<sub>k</sub> – titriva kiseline, a – ml 0,1 M NaOH utrošenog za titraciju, F – faktor molariteta NaOH i 0.24 – korekcionni faktor za sirćetnu kiselinu.

#### 4.2.1.4. ODREĐIVANJE UKUPNIH ESTARA

Princip određivanja zasniva se na neutralizaciji kiselina i saponifikaciji estara u baznoj sredini. Višak NaOH se odredi retitracijom sa sumpornom kiselinom, uz fenolftalein kao indikator. Nakon što se jakom alkoholnom piću odredi sadržaj kiselina uzorak se u prisustvu fenolftaleina neutrališe sa 0.1 M rastvorom NaOH i predestiluje. Estri se zatim određuju iz dobijenog destilata.

Odpipetira se 25 ml predestilisanog uzorka pića, doda 1-2 kapi sveže pripremljenog fenolftaleina i titruje sa 0.1M NaOH do prve pojave svetlo-ružičaste boje. Uzorku se zatim doda 10 ml 0.1M NaOH (pojava intenzivne roze boje) i uz povratni hladnjak na vodenom kupatilu refluktuje u toku 45 minuta. Nakon završene reakcije saponifikacije, višak NaOH se određuje retitracijom sa 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> do obezbojenja uzorka. Količina estara se indirektno određuje na osnovu potrošene količine 0.1M NaOH u reakciji saponifikacije. Izračunavanje se izvodi na osnovu sledeće jednačine:

$$\frac{[\text{mg}]}{[\text{la.a.}]} = \frac{[(10 \times F_1) - (a \times F_2) \times 0.352 \times 100]}{\%v/v}$$

gde su: 10 - višak NaOH u ml, a - ml 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, F<sub>1</sub> - faktor molariteta za 0.1M NaOH, F<sub>2</sub> - faktor molariteta za 0.1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.352 – korekcionni faktor i %v/v – prava jačina alkoholnog pića.

#### 4.2.1.5. ODREĐIVANJE VIŠIH ALKOHOLA KOLORIMETRIJSKOM METODOM POMOĆU *P*-DIMETILAMINOBEZALDEHIDA (PO PEJNO-U I GIMBERTO-U)

Princip određivanja viših alkohola se zasniva na obrazovanju obojenog jedinjenja ćilibarne boje, koje nastaje u reakciji viših alkohola i aromatičnog amina, *p*-dimetilaminobenzaldehida ( $C_9H_{11}NO_6$ ) u kiseloj sredini. Intenzitet boje se određuje spektrofotometrijski merenjem transparencije ( $T$ ) na 530 nm. Uzorak se prethodno mora destilacijom osloboditi viška aldehida i kiselina.

Osnovni rastvor se prirema mešanjem 4 ml izoamil-alkohola i 1 ml izobutil-alkohola, koji se odmere na analitičkoj vagi tačno 1 g mešavine i kvantitativno prenese u normalni sud od 100 ml. Sud se dopuni do oznake sa sveže pripremljenim 5% rastvorom etanola u vodi. Temperatura rastvora se dovede na 20°C i tako održava.

Standardi se pripremaju isto kao prilikom određivanja metanola, a razlika je u tome što se ovde osnovni rastvor dopuni sa 5% etanolom do oznake. Od osnovnog rastvora pripremaju se pet standardnih rastvora koncentracije 50, 100, 150, 200 i 250  $\mu\text{g}/1\text{ ml}$ .

Uzorak i standard se pripremaju tako što u svaku epruvetu sa šlifovanim zatvaračem ulije se redom po 0.5 ml standardnog rastvora i uzorka svedenog na 5% etanola. Zatim se doda po 1 ml 0.5% natrijum-hidroksi-aminhidrohlorida (3.5 g/100 ml vode). Epruvete se dobro zatvore, promešaju i ostave da stoje 15 minuta.

Nakon destilacije pipetom se zatim uzme 0.5 ml destilata, prenese u epruvetu, doda 10 ml koncentrovane  $H_2SO_4$ , u kojoj je za svaki uzorak prethodno rastvoreno po 5 mg reagensa, *para*-dimetil-aminobenzaldehida. Prilikom rastvaranja u koncentrovanoj  $H_2SO_4$  daje svetlu limun-žutu boju, inače je sam beo. Epruvete se mućkaju zaronjene u ledenu vodu sve vreme dodavanja reagensa. Zatim se epruvete 20 minuta zagrevaju na ključalom vodenom kupatilu. Nakon nekoliko minuta zagrevanja, epruvete se promućkaju da se obojeni proizvodi ne koncentrišu samo na površini. Posle 20 minuta, epruvete sa uzorcima se rashlade u ledenoj vodi dok se ne postigne sobna temperatura, a zatim meri intenzitet obojenja pomoću spektrofotometra na talasnoj dužini  $\lambda=530\text{ nm}$ .

Sadržaj viših alkohola izražava se u mg/l a.a., i dobija na sledeći način:

$$\frac{[mg]}{[la.a]} = \frac{A \times 20 \times 1000}{1000}$$

gde su: A – količina viših alkohola očitana sa standardne krive; 20 – razblaženje (100:5).

#### 4.2.1.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA ALDEHIDA

Kvantitativno se određuje sadržaj aldehida u jakim pićima određivanjem količine SO<sub>2</sub>, koja se vezuje za aldehide. Neophodno je prvo izvršiti hidrolizu acetala na sastavne delove na alkohol i aldehyd u neutralnoj sredini (pH=7). Dodavanjem kalijum metabisulfita (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) jedan deo oslobođenog SO<sub>2</sub> se vezuje za aldehide, a drugi deo za alkohol. Da bi se odredila količina koja reaguje sa aldehydom, prvo se mora odrediti deo SO<sub>2</sub> vezanog za alkohol u kiseloj sredini pH=2. Količina se određuje titracijom sa M/10 I<sub>2</sub>, uz fenolftalein i škrob kao kao indikatori rastvor se titriše se do pojave plavoljubičaste boje. U baznoj sredini pH=9 se boja rastvora menja u slabo rozu i vrši se oslobađanje SO<sub>2</sub> vezanog za aldehyd, koji se određuje titracijom sa M/100 I<sub>2</sub> do pojave stabilne plavoljubičaste boje. Sadržaj ukupnih aldehida izračunava se prema sledećoj formuli:

$$\left[ \frac{mg}{laa} \right] = \frac{a \times F \times 0.22 \times 200 \times 100}{\%v/v}$$

gde su: a- ml titracionog 0.01 M rastvora I<sub>2</sub> prilikom druge završne titracije; 200 – faktor razblaženja (za analizu se uzima 5 ml uzorka, a obračun se vrši na 1000 ml); 0.22 – korekcionni faktor, koji predstavlja količinu aldehida, koji se oksiduje pomoću 1 ml radnog titracionog 0.01 M rastvor I<sub>2</sub>; 100/ %v/v – za preračun na l a.a.

#### 4.2.1.7. ODREĐIVANJE UKUPNOG EKSTRAKTA

Ekstrakt jakog alkoholnog pića podrazumeva sve neisparljive sastojke koji ostaju nakon uparavanja vode i etanola u određenoj količini alkoholnog pića.

Ukupni ekstrakt se određuje postupkom direktnog uparavanja alkoholnog pića na vodenom kupatilu i dodatnim sušenjem u sušnici na 105°C do konstantne mase. U izžarenu i izmerenu platinsku posudu sipa se 20 ml uzorka, koji se uparava na vodenom kupatilu, a zatim u sušnici do konstantne mase. Količina ekstrakta (g/L) se izračunava prema sledećem obrazcu:

$$[\text{g/L}] = (m_1 - m_2) \times 40$$

gde su:  $m_1$  – masa posude sa ekstraktom (g);  $m_2$  – masa prazne posude (g); 40 – razblaženje (za analizu se uzima 25 ml, a obračun se vrši na 1000 ml).

#### 4.2.1.8. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA BENZALDEHIDA

Količina benzaldehida u jakim alkoholnim pićima određuje se spektrofotometrijskom metodom, očitavanjem vrednosti apsorbance jakog alkoholnog pića svedenog na 10% v/v, na talasnoj dužini  $\lambda = 249$  nm. Uzorak alkoholnog pića razblaži se destilovanom vodom na 10% v/v alkohola. Ukoliko je uzorak jap-a bezbojan i bez ekstraktivnih materija, može se razblažiti direktno, a ako je obojen i sa ekstraktivnim materijama, neophodna je njegova destilacija, s tim što se od 100 ml uzorka prihvata 100 ml odgovarajućeg destilata. Razblaženom uzoraku na 10% v/v alkohola se očitava vrednost apsorpcije na  $\lambda = 249$  nm.

Za konstituisanje standardne krive prvo se pripremi matični rastvor benzaldehida merenjem 1g benzaldehida, koji se rastvori u normalnom sudu od 100 ml sa 10% vodenim rastvorom etanola i dopuni do oznake ( $c=10$  mg/ml). Zatim se uzme 1 ml osnovnog

rastvora i sa 10% vodenim rastvorom etanola razblaži do 100 ml ( $c=100 \mu\text{g/ml}$ ). Od osnovnog rastvora pripremi se serija razblaženja, različitih koncentracija benzaldehida u standardnim rastvorima iznosi: 1; 2; 4; 6; 8 i 10  $\mu\text{g/L}$  ml rastvora, što odgovara 1 -10 mg/L 10% rastvora etanola. Nakon očitavanja apsorbancije za standardne rastvore na  $\lambda= 249 \text{ nm}$  konstruiše se kalibraciona kriva zavisnosti apsorbancije od koncentracije benzaldehida.

$$\left[\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right]_{\text{laa}} = S \times 10$$

gde su: S - očitani sadržaj benzaldehida sa kalibracione krive i 10 - faktor za preračunavanje na 100% etanol.

#### 4.2.1.9. ODREĐIVANJA SADRŽAJA UKUPNE CIJANOVODONIČNE KISELINE (HCN)

Sadržaj cijanovodonične kiseline se u jakim alkoholnim pićima određuje spektrofotometrijski  $\lambda=578 \text{ nm}$ , nakon izazivanja bojene reakcije HCN sa serijom reagenasa: hloraminom T, piridinom i barbiturnom kiselinom.

Osnovni rastvor se priprema merenjem 0,188 g NaCN ili 0,250 g KCN i prebaci u normalni sud od 100 ml. Posle obaveznog termostatiranja, dopuni se destilovanom vodom do markice. Zapremina 1 ml ovog rastvora odgovara 1 mg CN<sup>-</sup> jona. Od osnovnog rastvora pravi se serija razblaženja, od koji se konstruiše standardna kriva. Uzorak rakije koji se ispituje razblaži se na 25% v/v alkohola i odmeri 5 ml, ukoliko imamo manju količinu uzorak se dopuni do 5 ml sa 25% se etanolom.

U svaku epruvetu standardnih rastvora i uzorka doda se 0.2 g 1% rastvora hloramina T, sačeka 1 minut, doda 1 ml rastvora pufera pH 7.6 i 0.6 ml mešanog reagenasa. Boja u epruvetama je ljubičasta. Posle deset minuta vrši se očitavanje apsorbancije za svaki standardni rastvor na talasnoj dužini 584 nm. Nakon očitavanja apsorbancije za pojedinačne razblažene standardne rastvore na  $\lambda= 584 \text{ nm}$  konstruiše se kalibraciona kriva zavisnosti apsorbancije od koncentracije.

Ako se za analizu uzme 5 ml uzorka rakije, razblažene na 25% v/v, onda se direktno sa dijagrama očitava količina cijanovodonične kiseline u  $\mu\text{g/l}$  a.a..

#### 4.2.2. ANALIZA KVALITETA RAFINISANOG ŽITNOG ALKOHOLA

Kvalitet rafinisanog alkohola određen je organoleptičkim svojstvima (miris, ukus i izgled), sadržajem etanola, metanola, kiselina, estara, aldehida i viših alkohola, probom po Barbeu i metodom dokazivanja furfurala. Određivanje sadržaja ukupnih kiselina, isparljivih estara, ukupnih aldehida i viših alkohola u rafinisanom etanolu određuje se isto kao i kod jakih alkoholnih pića.

##### 4.2.2.1. ISPITIVANJE KVALITETA RAFINADE PO METODI BARBE-A

Za ispitivanje kvaliteta rafinade korišćeni su sledeći reagensi: rastvor kalijum-permanganata, rastvor kobalt-hlorida i rastvor uranil-nitrata. Standardni rastvor se proizvodi odmeravanjem 5 ml rastvora kobalthlorida i 7 ml rastvora uranil-nitrata, koji se preruče u balon od 100 ml, pa dopuni destilovanom vodom do oznake i dobro homogenizuje.

**POSTUPAK.** U staklenu čistu i bezbojnu bocu prizmatičnog oblika, zapremine 100 ml, sipa se 50 ml uzorka rafinisanog alkohola za ispitivanje, boca dobro zatvori, stavi u termostat ili vodeno kupatilo i temperira na  $18^{\circ}\text{C}$ . Zatim se dodaju 2 ml sveže pripremljenog rastvora kalijum permanganata, dobro promućka, ponovo stavi u termostat i ostavi u njemu, dok se boja kalijum permanganata ne izjednači sa bojom standardnog rastvora. Upoređivanje boje uzorka rafinisanog etanola sa bojom standardnog rastvora, koji se nalazi u drugoj boci istog oblika, iste veličine i u istoj količini (50 ml), obavlja se na dnevnoj svetlosti.



**IZRAČUNAVANJE.** Vreme koje je potrebno da prođe od trenutka dodavanja kalijumpermanganata u uzorak za ispitivanje do trenutka izjednačavanja boje sa standardnim rastvorom meri se hronometrom. Rezultat ispitivanja izražava se u minutima. Kvalitetniji tj. čistiji je onaj rafinisani etanol, kod koga je vreme izjednačavanja boje sa standardom duže.

#### 4.2.2.2. DOKAZIVANJE PRISUSTVA FURFURALA U RAFINISANOM ETANOLU

Odmeri se 10 ml etanola i prenese u stakleni cilindar sa brušenim zatvaračem. Zatim se doda 1 ml sveže destilovanog anilina, gustine  $\rho=1,027$  g/ml i 2-3 kapi koncentrovane (37% v/v) hlorovodonične kiseline. Ukoliko se ni posle 10 minuta ne pojavi roze ili crvenkasta boja, rafinisani etanol ne sadrži furfural ni u tragovima.

### 4.3. AROMATIČNO I LEKOVITO BILJE

Za proizvodnju ekstrakta bilja i travarica korišćeno je osušeno bilje Instituta za proučavanje lekovitog bilja Josip Pančić u Beogradu. Ekstrakt se sastoji od mešavine biljog materija, koja sadrži 39 vrste lekovitog i aromatičnog bilja, 4 vrste sušenog voće i kore hrasta.

**Tabela 7.** Korišćene biljke za proizvodnju gorkog ekstrakta

<b>Bilje</b>	<b>latinski naziv</b>	<b>deo biljke</b>
<b>Lazakinja</b>	<i>Asperula odorata</i>	herba
<b>Nana</b>	<i>Mentha piperita L.</i>	list
<b>Iva</b>	<i>Teucrium montanum L.</i>	herba
<b>Podubica</b>	<i>Teurium chamaedrys</i>	herba
<b>Hibiskus</b>	<i>Hawaiian hibiscus</i>	cvet
<b>Neven</b>	<i>Calendula officinalis L</i>	cvet
<b>Kopriva</b>	<i>Utrica dioica L</i>	list

<b>Nastavak tabele 7</b>		
<b>Žalfija</b>	<i>Salvia officinalis L.</i>	list
<b>Kamilica</b>	<i>Matricaria chamomilla L.</i>	cvet
<b>Matičnjak</b>	<i>Melissa officinalis L.</i>	list
<b>Iđirot</b>	<i>Acorus calamus</i>	koren
<b>Majčina dušica</b>	<i>Thymus serpyllum L.</i>	herba
<b>Očajnica</b>	<i>Marrubium vulgare</i>	herba
<b>Glog</b>	<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	cvet i list
<b>Zova</b>	<i>Sambucus nigra L.</i>	cvet
<b>Veronika</b>	<i>Veronica officinalis</i>	herba
<b>Hajdučka trava</b>	<i>Achillea millefolium L.</i>	cvet
<b>Majoran</b>	<i>Origanum majorana L.</i>	herba
<b>Podbel</b>	<i>Tussilago farfara L.</i>	herba
<b>Pelin</b>	<i>Artemisia absinthium L.</i>	list
<b>Mlečica</b>	<i>Euphorbia cyparissias L.</i>	herba
<b>Rastavić</b>	<i>Equisetum arvense L.</i>	herba
<b>Kleka</b>	<i>Juniperus communis L.</i>	plod
<b>Miloduh</b>	<i>Hyssopus officinalis</i>	list i cvetovi
<b>Ruzmarin</b>	<i>Rosmarinus officinalis L.</i>	list
<b>Lincura</b>	<i>Gentiane lutea</i>	koren
<b>Imela</b>	<i>Viscum album L.</i>	herba
<b>Hoću-neću</b>	<i>Capsella bursa pastoris L.</i>	herba
<b>Perovac</b>	<i>Paris quadrifolia L.</i>	herba
<b>Kičice</b>	<i>Erythraea centaurium Pers.</i>	herba
<b>Morača</b>	<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>	seme
<b>Omana</b>	<i>Inula helenium</i>	koren
<b>Vodopija</b>	<i>Cichorium intybus</i>	koren
<b>Anis</b>	<i>Pimpinella anisum L.</i>	seme
<b>Bokvica</b>	<i>Plantago lanceolata</i>	list
<b>Vanila</b>	<i>Vanilla planifolia</i>	
<b>Cimet</b>	<i>Cinnamomum div.</i>	cvet
<b>Karanfilić</b>	<i>Eugenia caryophyllata L.</i>	pupoljak
<b>Voće</b>	<b>Latinski naziv</b>	<b>deo biljke</b>
<b>Smokva</b>	<i>Ficus carica L.</i>	plod
<b>Grožđe</b>	<i>Vitis vinifera L.</i>	plod
<b>Borovnica</b>	<i>Vaccinium myrtillus</i>	plod
<b>Jabuka</b>	<i>Pirusmalus L.</i>	plod
<b>Šljiva</b>	<i>Prunus domestica L.</i>	plod
<b>Drvo</b>	<b>Latinski naziv</b>	<b>deo biljke</b>
<b>Hrast</b>	<i>Quercus sp.</i>	kora



**Slika 10.** Biljna mešavina korišćena za proizvodnju biljnog ekstrakta

Usitnjeno bilje je estrahovano tokom 10 dana u 52% šljivovoj prepečenici, a nakon ekstrakcije na hidrauličnoj presi je iscedeno. Uzorak ekstrakta je filtriran na celuloznim filter pločama promera 10  $\mu\text{m}$ .

#### **4.4. EKSTRAKCIJA ALKOHOLNIH MEDIJUMIMA**

Za proizvodnju jakih alkoholnih pića proizvedenih sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* korišćeni su usitnjeni delovi gljive, proizvedeni ekstrakti i delimično prečišćen ekstrakt pakovan u kapsule proizvođača Alphay, Fujian, Kina.

#### 4.4.1. PROIZVODNJA EKSTRAKATA GLJIVE *GANODERMA LUCIDUM*

Usitnjena suva plodonosna tela gljive korišćena su za dobijanje sirovih alkoholnih ekstrakata, a kao ekstrakciono sredstvo je korišćen 60% i 70% žitni alkohol. U istraživanju je napravljeno 6 ekstrakata, u kojima je ispitivan uticaj vremena ekstrakcije (24 h, 15 dana i 30 dana), veličine čestica (seckani i mleveni uzorci gljive) i temperature (sobna i 40°C) na kvalitativne i kvantitativne karakteristike ekstrakata.

Procedure za proizvodnju ekstrakata su sledeće:

**E1** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu;

**E2** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu;

**E3** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu;

**E4** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu;

**E5** – 40 g/L usitnjene gljive je ekstrahovano tokom 24 h na 40°C u tamnoj boci;

**E6** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 24 h na 40°C u tamnoj boci.

Ekstrakcija je vršena u bocama zapremine 1 L, koje su tokom ekstrakcije bile mešane konstantno na tresilici. Nakon završene ekstrakcije izvršena je filtracija uzoraka, koji su zatim uparavani na vakum uparivaču do 1/5 mase. Dobijeni ekstrakt skladišten je u boce koje su čuvane na 4°C do analize. Za svaki uzorka postupak je ponavljen 3 puta.

#### 4.4.2. PROIZVODNJA PIĆA SA DODATKOM GLJIVE

Ekstrakcija sastojaka gljive vršena je u alkoholnim medijumima sa sadržajem 45% etanola u staklenim posudama na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je vršena tokom: 7, 21 i 60 dana sa količinom seckanog tela gljive sa 1%, 2.5% i 4% konstantnim mešanjem na magnetnoj mešalici. Svi uzorci su filtrirani i skladišteni u zelene boce na tamnom na sobnoj temperaturi (16 – 20°C) do analize. Svi uzorci su urađeni u triplicatu.

#### 4.5. ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA

Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima ekstrakta i pića sa dodatkom gljive *G.lucidum* određivan je metodom po Folin-Ciocalteu (Singelton i Rosi, 1965). U 0.5 ml razblaženog uzorka dodato je 2.5 ml rastvora po Folin-Ciocalteu, nakon čega je epruveta sa reakcionom mešavinom promešana i ostavljena u mraku 5 minuta. Nakon toga, u epruvetu je dodato 2 ml rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L), a zatim je promešana i ostavljena u mraku 2 sata. Nakon inkubacije merena je apsorbancija smeše na 760 nm. Za slepu probu korišćena je destilovana voda (0.5 ml). Sadržaj ukupnih fenola određen je korišćenjem standardne krive za čiju su konstrukciju upotrebljeni rastvori galne kiseline koncentracija od 10-80 mg/l. Rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (mg/l GAE). Kod uzoraka koji su pre analize razblaženi, rezultat očitani sa standardne krive množen je sa odgovarajućim stepenom razblaženja.

## 4.6. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI

Za određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka korišćene su metode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Power), DPPH i TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

### 4.6.1. DPPH METODA

Određivanje antioksidativnog kapaciteta vršeno je pomoću metode DPPH, koju su ustanovili Kaneda i saradnici (1995). Analizirani uzorci su razblaženi u različitom odnosu sa 96% etanolom. Uzorku (0.2 ml) dodavano je 2.8 ml radnog rastvora DPPH, koji je napravljen mešanjem  $1,86 \times 10^{-4}$  mol/L rastvora DPPH u etanolu sa 0.1 M rastvorom acetatnog pufera u odnosu 2:1 (v/v). Apsorbanca je merena na 525 nm posle inkubacije od 90 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Za slepu probu korišćen je etanol i rastvor DPPH. Merenje antiradikalske aktivnosti je vršeno sa standardne krive koje izražava zavisnosti procenta inhibicije DPPH radikala u funkciji koncentracije rastvora Trolox-a. Rezultati su izraženi kao mM Trolox ekvivalenta na litar uzorka (mM TE). Procenat od inhibicije DPPH regensa se izračunava iz formule:

$$\% \text{ DPPH inhibicije} = \left[ \frac{A - A_s}{A} \right] \times 100\%$$

Gde su:  $A_s$  - apsorbanca slepe probe,  $A$  - apsorbanca analize.

#### 4.6.2. FRAP METODA

Analiza uzoraka je vršena prema metodi koju su ustanovili Benzie i Strain (1996). FRAP rastvor je napravljen mešanje acetatnog pufera (pH=3.6), TPTZ (10 ml rastvora TPTZ se rastava u 40 ml HCl) i  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u zapreminskom odnosu 10:1:1. Pre analize svi reagensi i uzorci su inkubirani na 37°C. U 0.1 ml razblaženog uzorka dodato 3 ml FRAP reagensa, nakon čega su kivete inkubirane na 37°C. Apsorbanca je očitana nakon inkubacije od 40 minuta na 593 nm. Za slepu probu korišćena je voda. Za određivanje vrednosti konstruisana je standardna kriva korišćenjem serije razblaženja matičnog Trolox rastvora (1 mM). FRAP vrednost je izražena korišćenjem formule:

$$\text{FRAP} = \text{mM Trolox ekvivalenta} \times 2$$

#### 4.6.3. TEAC METODA

Antioksidativni kapacitet je određivan i korišćenjem TEAC metode, koja je vršena prema modifikovanoj proceduri Re i saradnika (1999). Osnovni rastor  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  je proizveden mešanjem jednakih zapremina 14 mM ABTS i 4.9 mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , koji su rastvoreni u fosfatnom puferu pH=7.4. Dobijeni tamno plavo-zeleni rastvor je ostavljen na tamnom mestu na sobnoj temperaturi 12-14 h pre upotrebe. Radni  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  rastvor je pripreman razblaživanjem osnovnog rastvora (oko 80 puta) sa fosfatnim puferom, tako da asporbanca rastvora na 734 nm iznosi  $0.70 \pm 0.02$  AU. Konstruiše se standardna kriva pravljenjem serije razblaženja osnovnog rastvora koncentracija 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 i 0.15625 mM. U 30  $\mu\text{l}$  različitih razblaženja uzorka doda se 3 ml radnog  $\text{ABTS}^{*\cdot}$  rastvora, inkubira se kiveta na 30°C 6 minuta, a zatim meri absorbanca na 734 nm. Pored standardne krive, konstruiše se i kriva koja definiše procenat inhibicije u zavisnosti od koncentracije uzorka. Za slepu probu se koristi fosfatni pufer. Kriva se konstruiše prema formuli:

$$I (\%) = \frac{A_s - A}{A_s} \times 100$$

gde su:  $A_s$  - apsorbanca slepe probe,  $A$  – apsorbanca.

TEAC vrednost se izračunava:

$$\text{TEAC (mM)} = \frac{\text{koeficijent pravca krive uzorka}}{\text{koeficijent pravca krive standarda}}$$

## **4.7. ODREĐIVANJE BOJE EKSTRAKATA I PIĆA DA DODATKOM *GANODREME LUCIDUM***

### **4.7.1. AOAC METODA ZA ODREĐIVANJE BOJE DESTILISANIH PIĆA**

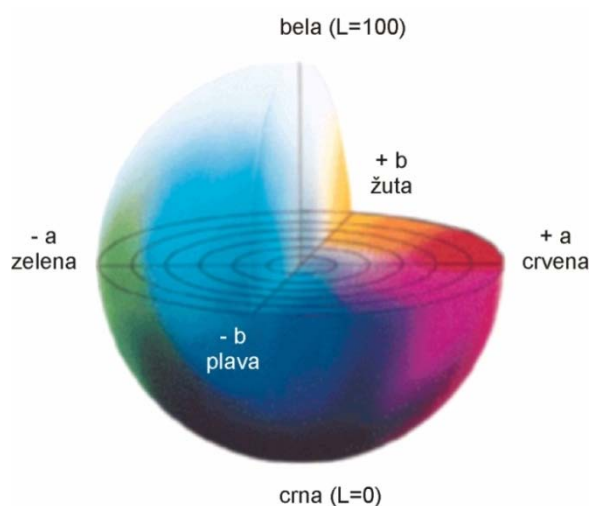
Analiza boje uzoraka vršena je AOAC metodom 992.09 (AOAC, 1998) za određivanje boje destilisanih pića. Konstruisana je standardna kriva sa serijom razblaženja  $K_2Cr_2O_7$  koncentracija od 0.05–0.5/L u 0.05 M  $H_2SO_4$ . Kriva predstavlja zavisnost apsorbanca od koncentracije jedinjenja  $K_2Cr_2O_7$ , apsorbanca rastvora je određivana na 430 nm i izražena u jedinicama boje (Color unit CU), rangiranih od 1-10. Boja uzoraka ili njihovih razblaženja sa 50% etanolom određivana je merenjem apsorbanca i njenim preračunavanjem na jedinice boje, a ukoliko je uzorak razblažen njegovim množenjem sa odgovarajućim razblaženjem.

### **4.7.2. CIElab METODA**

Boja je analizirana korišćenjem kolorimetra Chromometar model CR410 sa izvorom svetlosti  $D_{65}$ , koji meri tristulusne vrednosti analizirane boje. Rezultati su



izraženi u CIE (Internacionalna komisija za ocenjivanje) parametrima:  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$ , prema color space metodu. Ovi parametri definišu:  $L^*$  definiše svetlost i ima vrednosti od 0 do 100, gde 0 predstavlja crnu boju, a 100 belu;  $a^*$  i  $b^*$  parametri nemaju brojčana ograničenja,  $a^*$  ukoliko ima pozitivnu vrednost određuju crvenu boju, a negativna vrednost zelenu boju uzorka;  $b^*$  pozitivna vrednost definiše žutu boju, a negativna plavu boju uzorka,  $C^*$  zasićenje i  $h$  (ugao) definiše ton boje.



**Slika 11.** CIElab obojeni prostor (195)

#### 4.8. ODREĐIVANJE $\beta$ -GLUKANA EKSTRAKTA

Za određivanje  $\beta$ -glukana korišćen je Megazim enzimski kit (Megazyme, Irska). Analizirani su 1,3:1,6- $\beta$ -D-glukan, 1,3- $\beta$ -D-glukan i  $\alpha$ -glukan gljiva, koji se rastvaraju u koncentrovanoj HCl i zatim intezivno hidrolizuju sa 1.3 N HCl na 100°C tokom 2 h. Hidroliza se vrši do D-glukoze korišćenjen mešavine visoko prečišćenih enzima exo-1,3- $\beta$ -glukanaza i  $\beta$ -glukozidaze. Neki  $\beta$ -glukani su lako rastvorni u toploj vodi ili u toploj bazi

KOH. Analiza ovih glukana zahteva parcijalnu kiselinsku hidrolizu da bi se uklonile veze koje dovode do stvaranje gela i drugih kovalentnih veza sa drugim proteinima i polisaharidima.

#### 4.8.1. ODREĐIVANJE UKUPNIH GLUKANA

Na analitičkoj vagi se odmeri oko 100 mg uzorka, koji je pripremljen uparavanjem ekstrakta gljive na vakum uparivaču do 1/5 mase, a zatim liofiliziran. Liofilizirani uzorak se kvantitativno prenose u staklene epruvete u kojima se doda 1.5 ml conc. HCl. Smeša se meša na vorteksu, pa epruvete sa uzorcima prenesu u vodeno kupatilo (30°C) u kome se inkubiraju 45 minuta. Nakon hlađenje uzorku se doda 10 ml vode i uzorak se stavlja u ključalo vodeno kupatilo 2h. Kada se ohladi do sobne temperature uzorku se dodaje 10 ml 2N KOH i prebacuje u normalni sud od 100 ml, koji se dopuni do crte ca CH<sub>3</sub>COONa (pH=5). Sadržaj normalnog suda se centrifugira na 1500 obrtaja tokom 10 minuta, 0.1 ml uzorka se prebacuje u epruvete (16×100mm) i doda se 0.1 ml mešavine exo-1,3-β-glukanaza i β-glukozidaze i inkubira 60 minuta na vodenom kupatilu na 40°C. Nakon inkubacije se doda 3 ml GOPOD reagensa, koji se sastoji od mešavine rastvorenih enzima glukoza oksidaze, peroksidaze i 4 animoantipirina, i ponovo vrati u vodeno kupatilo još 20 minuta. Određuje se apsorbanca razloženog uzorka na 510 nm. Za slepu probu se koristi 0.2 ml CH<sub>3</sub>COONa (pH=5), kome se dodaje 3 ml GOPOD reagensa.

#### 4.8.2. ODREĐIVANJE A-GLUKANA

Odmeri se na analitičkoj vagi oko 100 mg uzoraka i kvantitativno prenese u epruvete (16×100 mm) i doda 2 ml 2M KOH, a zatim inkubira 20 minuta u ledenom vodenom kupatilu. Nakon inkubacije doda se 8 ml 1.2 M CH<sub>3</sub>COONa (pH=3.8) i 0.2 ml

enzimske mešavine amiloglikozidaza i invertaze, i smeša inkubira na 40°C 30 minuta. Pošto uzorak sadrži manje od 10%  $\alpha$ -glukana, smeša se kvantitativno prebaci u normalni sud od 100 ml i dopuni do crte destilovanom vodom i centrifugira na 1500 obrtaja 10 minuta. U epruvetu se prebacuje 0.1 ml centrifugiranog uzorka, kome se dodaje  $\text{CH}_3\text{COONa}$  pH=5 i 3 ml GOPOD reagensa i inkubira 20 minuta na 40°C u vodenom kupatilu. Apsorbanca razloženog uzorka se određuje na 510 nm.

$\beta$ -glukan se određuje izračunavanjem razlike između sadržaja ukupnih glukana i  $\alpha$ -glukana. Preračunavanje je izvršeno korišćenjem Megazimovog programa Mega-Calc<sup>TM</sup>.

#### 4.9. HPLC ANALIZA ŠEĆERA EKSTRAKATA

Rastvorljivi šećeri su identifikovani i kvantifikovani metodom tečne hromatografije pod velikim pritiskom (HPLC–PAD). Koncentracije glukoze, fruktoze i saharoze u uzorcima FM su preračunate na osnovu veličine njihovih pikova, pri čemu su kao standardi korišćene čiste supstance (Sigma Co. St. Louis, MO).

Analize su urađene na Waters Breeze hromatografskom sistemu (Waters, Milford, MA), koji je snabdeven elektrohemijским detektorom (Waters 2465) sa zlatnom radnom elektrodom dijametra 3 mm i vodoničnom referentnom elektrodom. Razdvajanje šećera je izvršeno korišćenjem CarboPac PA1 (Dionex, Sunnyvale, CA) kolone (250 x 4 mm) koja je povezana sa odgovarajućom CarboPac PA1 pretkolonom. Kao mobilna faza korišćen je 0,2 M rastvor NaOH. Šećeri su izokratski eluirani tokom 20 min, pri protoku od 1 ml/min, na konstantnoj temperaturi od 30°C. Signali su detektovani u pulsnom modu sa sledećim oblikom signala: E1= +0,05V tokom 400 ms; E2= +0,75 V tokom 200 ms; E3= –0,15 V tokom 300 ms i u okviru 180 ms integrativnog vremena. Vremenska skala filtera je 0,2 s i opseg 200 do 500 nA za celu mV skalu.

Za pripremanje rastvora 0,2 M NaOH korišćen je rastvor NaOH (50% w/w, sa niskim sadržajem karbonata, Baker J.T., Deventer, Holandija) i dejonizovana voda, koja je prethodno vakuum–degasirana. Rezultati su predstavljeni kao g šećera /L uzorka.

## 4.10. LC- MS I HPLC/DAD ANALIZA EKSTRAKATA PEČURAKA I JAKIH PIĆA SA DODATKOM PEČURAKA

### 4.10.1. HPLC-DAD/ESI-ToF-MS ANALIZA NEISPARLJIVIH KOMPONENTI EKSTRKATA I SPECIJALNIH RAKIJA

**PRIPREMA UZORKA.** Uzorci su upareni na vakum uparivaču, a zatim su liofilizovani i liofilizati su rastvarani u metanolu tako da je koncentracija bila  $c=10.000$  mg/mL.

Za analizu hemijskog sadržaja ispitivanih uzoraka korišćena je HPLC aparatura (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies) sa degaserom, autosamplerom, kolonom Zorbax SB C18 (100 x 2,1 mm i. d.; 1.8  $\mu$ m) i DAD detektorom u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Kao mobilna faza korišćena je smesa rastvarača A (0,2% rastvor mravlje kiseline u vodi) i B (acetonitril) sa programiranim izokratnim i gradijentnim eluiranjem: 0-2 min 80 % A, 2-15 min 80-5% A, 15-20 min 5 % A, 20-21 min 5-20 % A, 21-25 min 20 % A, pri protoku od 0.40 mL/min. Za detekciju signala u opsegu talasnih dužina 190-450 nm korišćen je DAD detektor, reprezentativni hromatografi su zabeležni na 254 nm. Injekciona zapremina bila je 2  $\mu$ L, a temperatura kolone 40°C. Negativno naelektrisani molekulske joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na negativnu, sa sledećim vrednostima ES parametara: potencijal kapilare, 4000 V; temperatura gasa, 350°C; protok gasa za sušenje, 12 L/min; pritisak nebulajzera, 45 psig (310.26 Pa); napon fragmentora 140 V, a mase su merene u opsegu 100-1500 m/z. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation.

Za potvrdu identiteta komponenti čija je molekulska formula preračunata sa merenih visoko preciznih masa, HPLC-DAD/ESI-MS-MS eksperiment je izvođen na Waters TQ (Tandem Quadrupole) instrumentu spojenom sa Water Acquity UPLC H-Class

HPLC sistemom. HPLC system sastoji se od kvaternarne pumpe (Waters Quaternary Solvent Manager), injektora (Waters Sample Manager-FTN), i fotodiodnog detektora (Waters 2998 PDA). HPLC uslovi su isti kao za HPLC-DAD/ESI-ToF-MS. HPLC efluent je uvođen u ESI izvor jona masenog spektrofotometra bez razdvajanja. Detektor je radio na niskoj rezoluciji u punom režimu skeniranja pod sledećim MS uslovima: negativan jon mod; potencijal kapilare, 3000V; napon fragmentora, 25 V; temperature gasa, 120 °C; desolvaciona temperatura, 250 °C; protok gasa za sušenje, 500 L/h; a mase su merene u opsegu 100-1500 *m/z*. Argon visoke čistoće je korišćen kao sudarni gas za indukovanu disocijaciju, i sudarna energija bila je podešena na 20 eV. U MRM (Multiple Reaction Monitoring) modu, karakteristična tranzicija deprotonovanih ( $[M-H]^-$ ) i/ili  $[M-H-H_2O]^-$  molekulskih jona komponenti je merena. Akvizicija i analiza podataka je izvršena pomoću MassLynx V4.1 softvera.

Navedeni HPLC-DAD/ESI-MS-MS eksperiment u režimu skeniranja je korišćen za procenu količine komponenti. Količina jedinjenja se određuje poređenjem površine pikova dobijenih za odedene komponente (1-15) sa površine pika dobijenih za interni standard (holnu kiselinu).

#### 4.10.2. HPLC/DAD ANALIZA FENOLNIH KOMPONETI

**PRIPREMA UZORKA.** Upareni uzorci na vakum uparivaču do 1/5 mase su filtrirani na filterima 0.45µm, pre injektovanja u kolonu.

Fenolne komponente su određene pomoću HPLC uređaja Agilent 1100 (USA) opremljenog sa UV/DAD detektorom. Hromatografska separacija je izvršena na koloni Poroshell 120 EC-C18 (4.6x100mm 2.7 µm). Sistem rastarača ima konstantnu brzinu protoka 1.0 ml/min. Mobilna faza A sačinjavaju destilovana voda sa 0.1% glacijalne sirćetne kiseline, a mobilnu fazu B acetonitril sa 0.1% glacijalne sirćetne kiseline. Injektovana zapremina je 5 µl sa održavanom konst antnom temperaturom, uz gradijent program je: 0-3.25 min, 8-10 %B; 3.25-8 min, 10-12 %B; 8-15, 12-25 %B; 15-15.8 min,

25-30 %B; 15.8-25 min, 30-90 %B; 25-25.4 min, 90-100 %B; 25.4-30 min, 100 %B. Talasne dužine za detekciju su izabrane prema apsorcionom maksimumu analiziranih fenolnih komponenti i uključuju 225 nm (vanilinska kiselina, benzoeva kiselina), 280 nm (galna kiselina, 4-hidroksibenzoeva kiselina, katehin, siringinska kiselina, trans-cinaminska kiselina, hesperatin, naringenin), 305 nm (kumarinska kiselina, resveratol), 330 nm (klorogenska kiselina, kafa kiselina) and 360 nm (rutin, kvercetin, kemferol). Kvantitativna analiza urađena je na korišćenju eksterne standardne metode. Standardni osnovni rastvor (1, 2.5, 5, 10, 15, 25 mg/l) je napravljen sa dimetilsulfoksidom (DMSO). Sve standardne kalibracione krive su male visok stepen linearnosti ( $r^2 > 0.99$ ).

#### 4.11. GC-MS ANALIZA AROMATSKOG KOMPLEKSA PIĆA

**PRIPEMA UZORAKA.** Svi uzorci su pripremljeni tečno tečnom ekstrakcijom. Proba od 50ml uzorka razblažena je sa 100ml destilovane vode i zatim je dodato 20 ml rastvora standarda i 10 g natrijum-hlorida. Kao standard korišćen je metil-10-undecenoat, rastvor u metilen-hloridu, koncentracije 0.01 mg/ml, dodavano je u svaku probu. Probe su zatim mešane na magnetnim mešalicama u zatvorenim jodometrijskim tikvicama (šlifovanim erlenmajerima) po sat vremena. Nakon toga odvojen je organski od vodenog sloja. Osušen je pomoću natrijum-sulfata, zatim proceden i uparavan do zapremine od 2 ml nakon čega je prebacivan u vijalu od 2.5 ml. Uparavanje vršeno na vacuum-uparivaču, na kom je vodeno kupatilo bilo napunjeno hladnom vodom.

Uzorci su analizirani na aparatu Agilent 7890A sa MS-detektorom Agilent 5975C. Ubrizgavano je po 1  $\mu$ l svake probe (split 25:1). Korišćena je kolona Agilent 19091N- 30 m x 320  $\mu$ m x 0.25  $\mu$ m sa polarnom tečnom fazom HP -INNOWax (polietilen-glikol). Protok gasa 50.4 ml/min, kao noseći gas korišćen je helijum. Temperatura injektora je iznosila 220 °C. Početna temperatura kolone je iznosila 40°C, a zatim rasla 3°C/min do 230°C. Kao detektori su korišćeni istovremeno FID i MSD.

#### 4.12. ANTIMIKROBNA ANALIZA

Analizirana su antimikrobna svojstva ekstrakta *Ganoderma lucidum*, ekstrakta bilja i jakih pića obogaćenih ekstraktima gljive *G.lucidum* i bilja ispitivana su *in vivo* metodom difuzije sa filter diskova. Analiza je vršena prema preporukama Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2007).

Uzoraci su priremani, merenjem 50 µg liofilizovanih uzoraka, koji su rastvarani u 1 ml dimetilsufoksida (DMSO).

Izpitivanje je vršeno na sledećim vrstama patogenih mikroorganizmima:

*Salmonella enteritidis* ATCC 31806

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032

*Enterococcus faecalis* ATCC 29212

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Prema bojenju po Gramu, *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa* spadaju u G negativne bakterije, a *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* u G pozitivne bakterije.

Bakterije su zasejane na hranljivom agaru i ostavljene tokom 24 h na 35 °C. Sa hranljive podloge pomoću eze, izdvojene su čiste kulture (4-5) i prebačene u hranjivi bujon u kome su inkubirane dok broj bakterija nije bio jednak zamućenju 0.5 McFarland-ovog standarda, što odgovara  $1-2 \times 10^8$  CFU broju ćelija. Suspenzije 0.2 ml mikroorganizama je zasejano u svaku Petri kutiju i izliveno sa 20 ml Mueller Hilton agara. Nakon hlađenja podloge, u svakoj epriveti postavljena su tri sterilna diska prečnika 6 mm (Whatman, Sigma-Aldrich, St. Louis). Na svakom disku izliveno je po 20 µl odgovarajućeg uzorka i inkubirano 24 h na 37 °C. Kao slepa proba korišćen je DMSO, a za pozitivnu probu korišćen je antibiotik. Nakon inkubacije vršeno je merenje zona, sve analize urađene su u triplikatu.

#### 4.13. SENZORNA ANALIZA JAKIH PIĆA OBOGAĆENIH *Ganodermom lucidum* I EKSTRAKTOM BILJA

Senzorna analiza je korisna i neophodna metoda za kontrolu i ocenu kvaliteta jakih alkoholnih pića. Sensorika jakih pića predstavlja ocenjivanje na osnovu nadražaja ljudskih čula i ova ocena je subjektivna i da bi bila primenljiva, analizu moraju vršiti obučeni ocenjivači na osnovu sistematskih i egzaktnih naučnih metoda.

Ocenjivanje je vršio panel od 5 eksperata sa dugogodišnjim iskustvom u analizi jakih pića. Svi uzorci jakih pića sa dodatkom gljive su šifrovani i prezentovani u bezbojnim čašama sa tankim zidovima oblika lale (130 ml) pokrivenih staklom, između ocenjivanja. Ocenjivanje je vršeno u prostorijama sa kontrolisanom atmosferom (kondicionirani vazduh, odgovarajuća temperatura 18-22°C, odgovarajuća vlažnost 60-70%, dovoljna i dobra prirodna osvetljenost, obezbeđenost mira i tišine, nemogućnost ulaska u prostoriju stranih, napadnih i neprijatnih mirisa, zabrana pušenja).

Senzorna analiza je izvršena korišćenjem modifikovanog Buxbaum-ovog modela pozitivnog rangiranja sa maksimumom 20 bodova (Tešević i saradnici, 2005; Pecić i saradnici, 2012). Ocenjivana su sledeća senzorna svojstva: boja, bistrina, tipičnost, miris i ukus.

Bistrina je parametar koji predstavlja sveukupnu vizuelnu dopadljivost uzorka alkoholnog pića, zavisi od čistoće i nijanse boje pića (Nikićević i Tešević, 2008).

Boja se definiše kao vizuelni uticak nastao kao posledica nadražaja mrežnjače oka svetlosnim zracima različitih talasnih dužina (Radovanović i Popov-Raljić, 2000).

Tipičnost kao parametar kvaliteta jakih alkoholnih pića, koristi se da izdiferencira specifična i karakteristična svojstva koja su sinonim za određene kategorije jakih alkoholnih pića. Piće može biti: atipično (nesvojstveno) i tipično (karakteristično). (Nikićević i Tešević, 2008).

Miris se definiše kao olifaktorni uticak pri udisaju/ili izdisaju vazduha preko nosa (Radovanović i Popov-Raljić, 2000). Nastaje nadraživanjem receptora u nosnoj šupljini



udisanjem vazduha, koji sadrži specifične isparljive supstance pića (Pecić i saradnici, 2011).

Ukus je najvažnije senzorno svojstvo, koje nastaje stimulacijom o gustatornih receptora u usnoj šupljini rastvorljivim komponentama (Pecić i sardanici, 2011).

Sadržaj etanola analiziranih uzoraka utiče na nadražaj i krajnju senzornu ocenu, tako da su svi ispitivani uzorci jakih pića sadržali 45% etanola. Ocenjivački list za senzornu analizu predstavljen je u tabeli 8.

**Tabela 8.** Ocenjivački list za senzornu analizu Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET- ZEMUN**  
Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju

**OCENJIVAČKI LIST ZA JAKA PIĆA**

Redni broj ocenjivača	Redni broj uzorka	Šifra uzorka

Osobine uzorka	Maksimalan broj poena	Ocena	Napomena
<b>Boja</b>	<b>1</b>		
<b>Bistrina</b>	<b>1</b>		
<b>Tipičnost</b>	<b>2</b>		
<b>Miris</b>	<b>6</b>		
<b>Ukus</b>	<b>10</b>		
<b>Ukupno</b>	<b>20</b>		

..... godine  
(datum)

.....  
(Potpis ocenjivača)

#### 4.14. ANALIZA ANTIKANCEROGENOG DEJSTVA KOMPLEKSA OBOGAĆENIH *Ganoderma lucidum*

##### 4.14.1. KULTURE ĆELIJA

Kulture ćelija upotrebljene u ovom radu bile su:

- tumorske ćelije: ćelije humanog karcinoma grlića materice (**HeLa**), ćelije humanog melanoma (**FemX**), ćelije adenokarcinoma pluća (**A549**);
- transformisane endotelijalne linije humanog (**EA.hy 926**);

Navedene kulture ćelija su iz kolekcije ćelijskih linija Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. Karakteristike ćelijskih linija, korišćenih u ovom radu, prikazane su u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Karakteristike ćelijskih linija korišćenih u ovom radu.

ćelijska linija	Morfologija	Vrsta	tkivo/organ	tumor
<b>HeLa</b>	Epitelijalna	Humane	Cerviks	adenokarcinom
<b>A549</b>	Epitelijalna	Humane	Pluća	adenokarcinom
<b>EA.hy 926</b>	Endotelijalna	Humane	hibrid somatskih ćelija	/
<b>FemX</b>	Epitelijalna	Humane	Koža	melanom

Ćelije su gajene u hranljivim medijumima, koji su čuvani u frižideru, a pre upotrebe bili zagrejani do temperature od 37 °C. Ćelijske linije HeLa, A549 i FemX, su održavane kao monosloj u hranljivoj podlozi RPMI 1640, pH 7,2, koja je sadržala 10 % fetalnog goveđeg seruma (eng. Fetal Calf Serum, FCS), termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. RPMI 1640 je bila obogaćena penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES (25 mM). Linije EA.hy 926 su održavane kao monosloj u hranljivoj podlozi DMEM, pH 6.9, koja sadrži 10 % fetalnog goveđeg seruma, termički inaktivisanog, sa dodatkom penicilina 192 IU/ml, streptomicina 200 µl/ml i L-glutationa (3 mM).

#### 4.14.2. SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA RPMI 1640

RPMI 1640 podloga je proizvod istraživača Moore i saradnika sa instituta "Roswell Park Memorial Institute", odakle i potiče njen naziv RPMI. RPMI 1640 je primarno formulisan za gajenje humanih ćelijskih kultura koje rastu u monosloju ili suspenziji (Moore i saradnici, 1967). Osnovni sadržaj podloge je fosfatno puferisani fiziološki rastvor (eng. Phosphate Buffer Saline, PBS), u koji se dodaju amino kiseline i vitamini, a sastav je sledeći (g/l):

L-Glutamin	0.3
Glicin	0.01
L-Histidin	0.015
Hidroksi-L-prolin	0.02
L-Izoleucin	0.05
L-Leucin	0.05
L-Lizin-HCl	0.04
L-Metionin	0.015
L-Prolin	0.02
L-Fenilalanin	0.015
L-Serin	0.03
L-Treonin	0.02
L-Triptofan	0.005
L-Tirozin x 2Na x2H <sub>2</sub> O	0.029
L-Valin	0.02
D-Biotin	0.0002
Holin-hlorid	0.003
Folna kiselina	0.001
Mioinozitol	0.035
Niacinamid	0.001
p-Aminobenzoeva kiselina	0.001

D-Pantotenska kiselina	0.00025
Piridoksin x HCl	0.001
Riboflavin	0.002
Tiamin x HCl	0.001
Vitamin B12	0.000005
D-glukoza	2
Glutation	0.001
HEPES	5.958
Fenol crveno (Na-so)	0.0053

#### 4.14.3. PRIPREMA RPMI 1640 HRANLJIVE PODLOGE

Prašasta RPMI 1640 podloga je rastvarana u sterilnoj destilovanoj vodi (102 g/l), uz mešanje na temperaturi 15-20 °C. U rastvor je dodato 2 g NaHCO<sub>3</sub>. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0.1 – 0.2 jedinica ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6.7 – 7.0. Podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCl i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0.22 mikrometra. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je opskrbljena i penicilinom 192 IU/ml i streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), HEPES (25 mM) (Moore i saradnici, 1967).

#### 5.14.4. SASTAV HRANLJIVOG MEDIJUMA DMEM

DMEM (eng. Dulbecco's Modified Eagles Medium) je modifikacija BME (eng. Basal Medium Eagle). Originalna formula je sadržala 1 g/l glukoze i korišćena je za kulture mišjih embrionalnih ćelija, a od tada je modifikovana na više načina da bi bila pogodna za

primarne kulture mišijih i kokošijih ćelija, kao i za normalne i transformisane ćelije. Hemijski sastav DMEM podloge je sledeći (g/l) (Dulbecco i saradnici, 1959):

Kalcijum-hlorid, anhidrovani	0.20000
Holin-hlorid	0.00400
D-Kalcijum-pantotenat	0.00400
D-Glukoza, anhidrovana	4.50000
Gvožđe(III)-nitratnonahidrat	0.00010
Folna kiselina	0.00400
Glicin	0.03000
HEPES	5.95800
L-Arginin	0.08400
L-Cistin-dihidrochlorid	0.06300
L-Glutamin	0.58400
L-Histidin-hidrochloridmonohidrat	0.04200
L-Izoleucin	0.10500
L-Leucin	0.10500
L-Lizin-hidrochlorid	0.14600
L-Metionin	0.03000
L-Fenilalanin	0.06600
L-Serin	0.04200
L-Treonin	0.09500
L-Triptofan	0.01600
L-Dinatrijum-tirozinhidrat	0.10400
L-Valin	0.09400
Magnezijum-sulfat, anhidrovan	0.09767
Mio-Inozitol	0.00720
Niacinamid	0.00400
Fenol-crveno, natrijumova so	0.01500
Kalijum-hlorid	0.40000

Piridoksinhidrohlorid	0.00400
Riboflavin	0.00040
Natrijum-bikarbonat	3.70000
Natrijum-hlorid	4.75000
Dinatrijumhidrogen-fosfatmonohidrat	0.12500
Tiamin-hidrohlorid	0.00400

#### 4.14.5. PRIPREMA DMEM HRANLJIVE PODLOGE

Prašasta DMEM podloga je rastvarana u sterilnoj destilovanoj vodi uz mešanje na temperaturi 15-20 °C. Tokom pripreme podloge, pH vrednost podloge je podešavana na 0,1 – 0,3 jedinice ispod željene pH vrednosti, koja iznosi 6.9, a podešavanje pH je vršeno rastvorima 1 M HCl i 1 M NaOH. Podloga je sterilisana takozvanom „hladnom sterilizacijom“, upotrebom membranskog filtra poroznosti 0.22 mikrona. U podlogu je dodato 10 % fetalnog goveđeg seruma termički inaktivisanog na 56 °C, 30 minuta. Podloga je opskrbljena i penicilinom 192 IU/ml, streptomycinom 200 µl/ml, L-glutationom (3 mM), i HEPES (25 mM) (Dulbecco i saradnici, 1959).

#### 4.14.6. POSTUPAK ODRŽAVANJA KULTURE ĆELIJA

Kultura ćelija je održavana kao monosloj u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Kultura ćelija je gajena u inkubatoru na temperaturi 37 °C, u atmosferi vazduha sa 5 % CO<sub>2</sub>, zasićenog vodenom parom. Za gajenje ćelija korišćeni su polietilenski sudovi, zapremine od 50 – 450 ml, odnosno površine dna 25-225 cm<sup>2</sup>. Održavanje ćelija u monosloju postignuto je presejavanjem ćelija u svežu podlogu, tj. „pasažiranjem“, svakih 4-5 dana.

Pasažiranje ćelija je obavljano u sterilnoj komori, uz korišćenje sterilnih laboratorijskih sudova i nošenje zaštitne laboratorijske opreme. Pasažiranje je vršeno kada

ćelije potpuno prekriju dno suda, ili kada su istrošeni nutrijenti podloge, na šta ukazuje indikator promene pH podloge (Biochemical and reagents for life science research, 1997).

#### 4.14.7. POSTUPAK PASAŽIRANJA KULTURA ĆELIJA

Kada je dno suda potpuno prekriveno monoslojem ćelija ili kada su nutritivne materije iz podloge potpuno potrošene, na šta može da nam ukaže boja podloge, podloga je odlivana iz falkona. Dno falkona na kome su zalepljene ćelije ( $V = 50$  ml) je isprano sa 3 ml 0.25 % rastvora tripsina zagrejanog do  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  u vodenom kupatilu. Zatim je nalivena sa 5 ml 0.25 % rastvora tripsina i inkubira na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1-5 minuta. Promena morfologije ćelija je praćena pod svetlosnim mikroskopom, na uveličanju 20/0.40 (50 puta). Kada su ćelije počele da se zaokrugljuju, sadržaj iz boćice je špricom prenesen u epruvetu u kojoj se već nalazi 2 ml hranljive podloge. Antitripsin prisutan u podlozi neutrališe dalje dejstvo tripsina na prenete ćelije. Ćelije su stajale još 3-5 minuta u termostatu na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i resuspenduju se u toj podlozi pomoću šprica. Jedna zapremina suspenzije ćelija je vraćena u sud za gajenje ćelija, dopunjena svežom podlogom do zapremine  $V = 15$  ml i sud je vraćen u inkubator na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Preostala suspenzija ćelija je korišćena za eksperimente *in vitro* (Biochemical and reagents for life science research, 1997).

#### 4.15. POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENIH *Ganoderma lucidum*

##### 4.15.1. POSTUPAK ODREĐIVANJA VIABILNOSTI ĆELIJA

Analiza ponašanja ćelija *in vitro* zasniva se na razumevanju procesa rasta i proliferacije, što podrazumeva i pravilno određivanje broja ćelija (Biochemical and

reagents for life science research, 1997). Procena rasta kulture ćelija može se vršiti osmatranjem ćelija pod svetlosnim mikroskopom, ali kvantitativni eksperimenti na ćelijama zahtevaju određivanje tačnog broja ćelija na kojima se vrši eksperiment. Koncentracija ćelija u suspenziji može biti određena korišćenjem hemocitometra –optički ravna komora za posmatranje ćelija pod mikroskopom. Ćelije se broje unutar obeleženih zona na komori, a broj ćelija po mililitru suspenzije, hranljivog medijuma, određuje se na osnovu formule.

U 50  $\mu$ l suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi, dodato je 450  $\mu$ l rastvora boje tripan-plavo, tako da je finalna koncentracija boje 0.004 %. Obojena suspenzija ćelija je dobro promešana na vorteksu i 50  $\mu$ l ove suspenzije je preneseno automatskom pipetom na komoru za bojenje (Neubauer).

Prosečan broj živih ćelija po polju komore, određivan je brojanjem ćelija pod mikroskopom na uveličanju 20/0.4. Svako polje na komori za brojanje zauzima zapreminu od  $10^{-4}$   $\text{cm}^3$ . Kako 1  $\text{cm}^3$  odgovara zapremini od 1 ml, broj ćelija po mililitru početne suspenzije ćelija u hranljivoj podlozi je dobijen po formuli:

$$N=N_s \times R \times 10^4$$

$N_s$ =prosečan broj ćelija po polju komore

$R$ =faktor razblaženja ćelija u rastvoru za bojenje (u ovom slučaju iznosi 10).

#### **4.15.2. POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENOG GLJIVOM *Ganoderma lucidum***

Antiproliferativni potencijal ispitivanog kompleksa obogaćenog jedinjenjima gljive *Ganoderma lucidum* i lekovitog bilja, utvrđen je kolorimetrijskim MTT testom, na ukupno 4 ćelijske linije, koje su pomenute ranije (Poglavlje 4.14.) (Supino i saradnici, 1995).



#### **4.15.2.2. POSTUPAK ODREĐIVANJA PREŽIVLJAVANJA ĆELIJA MTT TESTOM**

MTT test je kolorimetrijski test kojim je određivana sposobnost živih ćelija da konvertuju tetrazolijum so (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid (MTT), žute boje, u formazanski precipitat tamno crvene boje (Monks, 1991; Supino i saradnici, 1995). MTT u ćeliji je zapravo preuzimao ulogu koenzima, odnosno elektron akceptora u oksidoredukcionim reakcijama koje katalizuje enzim (na putu razgradnje glukoze) ciklusa glikolize sukcinat-dehidrogenaza. Tako da se reakcija redukcije MTT odvijala samo u metabolički aktivnim ćelijama. Nastali formazan apsorbuje u vidljivom delu spektra sa maksimumom apsorpcije oko 570 nm.

#### **4.15.2.3. KONSTRUKCIJA KALIBRACIONE KRIVE ZA MTT**

Polazeći od suspenzije ćelija (za svaku ispitivanu ćelijsku liniju) u hranljivoj podlozi ( $10^6$ /ml), formirana je serija razblaženja ove suspenzije, tako da broj ćelija/ml bude redom: 12500, 25000, 50000, 100000, 200000, 400000. U središnje bunarčiće plastične ploče (eng. cell culture plate, NUNC) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, zasejano je 100  $\mu$ l pripremljenog razblaženja. U preostale bunarčiće ploče sipana je samo hranljiva podloga po 100  $\mu$ l, kao slepa proba.

Na ovaj način zasejane su dve ploče i ostavljene u inkubatoru na 37 °C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO<sub>2</sub>. U jednu ploču je nakon 4 h sipano u svaki bunarčić po 20  $\mu$ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100  $\mu$ l rastvora (10 % SDS). Nakon 24 h izmerena je absorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na drugu ploču je nakon 20 h inkubacije sipano u svaki bunarčić po 20  $\mu$ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100  $\mu$ l rastvora 10 % SDS. Nakon 24 h izmerena je absorbanca na 570 nm na ELISA čitaču. Na osnovu dobijenih absorbanca formiran je grafik zavisnosti apsorpcije MTT reagensa u funkciji broja ćelija, za vreme inkubacije ćelija t=0 h (T0) i t=20 h (T20).

#### 4.15.2.4. POSTUPAK ODREĐIVANJA PREŽIVLJAVANJA ĆELIJA MTT TESTOM

U središnje bunarčiče plastične ploče sa 96 bunarčiča sa ravnim dnom, zasejano je 2000 ćelija/bunarčiču u 100  $\mu$ l hranljive podloge (za HeLa), 4000 ćelija/bunarčiču (FemX), 5000 ćelija/bunarčiču (EA.hy 926), 7000 ćelija/bunarčiču (A549). Sve je rađeno u triplikatu, tj. na tri bunarčiča ćelija ostavljena su tri bunarčiča u koje je sipana samo hranljiva podloga (slepa proba). Ćelije su gajene 24 h u inkubatoru na 37°C, u atmosferi vazduha zasićenog parom, sa 5 % CO<sub>2</sub>.

Napravljen je štok analiziranog kompleksa 50 mg/ml u DMSO. Za kompleks je od polazećeg štoka ispitivanog kompleksa, formirana serija razblaženja u odgovarajućoj hranljivoj podlozi. Nakon 24 h od zasejavanja ćelija u bunarčiče, pošto su se ćelija zalepile za dno suda, u bunarčiče sa ćelijama, kao i u bunarčiče samo sa podlogom (slepa proba), sipano je u triplikatu 50  $\mu$ l svakog razblaženja ispitivanog kompleksa. Razblaženja kompleksa u odgovarajućoj podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u bunarčiču ploče budu redom: 31.25; 62.5; 125; 250; 500  $\mu$ M (tako da procenat DMSO po bunarčiču ne bude veći od 1 %).

Ćelije su zatim inkubirane sa ispitivanim agensima u inkubatoru sa 5 % CO<sub>2</sub> na 37 °C, tokom 48 h. Nakon inkubacije 20  $\mu$ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru) je dodato u svaki bunarčić. Nakon 4 h dodato je 100  $\mu$ l rastvora 10 % SDS, a nakon 24 h očitana je absorbanca na 570 nm.

#### 4.15.2.5. OBRADA PODATAKA

Izračunavanja parametara koji karakterišu intenzitet citotoksičnog, odnosno citostatičkog dejstva ispitivanog agensa urađena su prema Monksu (Monks i saradnici, 1991). Sa kalibracione krive za MTT je određeno u kom opsegu broja ćelija postoji linearna zavisnost absorbance na 570 nm od broja zasejanih ćelija po bunarčiču. Kasniji eksperimenti su rađeni u tom opsegu broja ćelija.

Nakon inkubacije i gajenja ćelija sa različitim koncentracijama ispitivanog agensa i nakon tretmana bojom MTT i rastvaranjem formazana, određena je absorbanca uzoraka. Ako je  $A_k$  srednja vrednost absorbanca uzoraka ćelija gajenih u hranljivoj podlozi,  $A$  srednja vrednost absorbanca uzoraka ćelija gajenih u prisustvu različitih koncentracija ispitivanog agensa, i ako se kao probe koriste absorbance hranljivog medijuma bez ćelija, sa odgovarajućim koncentracijama ispitivanog agensa, tada je:

$$\text{Preživljavanje ćelija (\%)} = \frac{A}{A_k} \times 100$$

Konstruisan je dijagram preživljavanja ćelija (%) = f (koncentracija agensa) i iz navedene krive dobijen je podatak o koncentraciji agensa koji izaziva smanjenje preživljavanja ćelija za 50 % – IC<sub>50</sub>.

#### 4.16. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Sva merenja su urađena u triplicatu i podaci su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD). Dobijeni rezultati su obrađeni analizom varijanse (ANOVA) trofaktorilanog oglada kod kojih je određivan uticaj vremena ekstrakcije, količine dodate gljive i alkoholnih medijuma i njihove međusobne interakcije na antioksidativne karakteristike, senzornu analizu i boju uzoraka pića, a razlika između uzoraka ispitivana je Tuckey's testom.

Korelacija između sadržaja ukupnih fenola, boje uzoraka analizirane AOAC metodom za analizu boje destilovanih uzoraka i antioksidatnog kapaciteta određenih DPPH, FRAP i TEAC metodom izražena je pomoću programa STAT10.

## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Za proizvodnju ekstrakata i pića korišćeno je plodosno telo gljive *Ganoderma lucidum*, kome je analiziran kvantitativni sastav sledećih jedinjenja: ugljenih hidrata, masti, proteina, suve materije i pepela. Rezultati analiza su predstavljeni u tabeli 10.

Sadržaj osnovnih komponenti u gljivama sakupljenih u zapadnoj Makedoniji i Grčkoj određivali su Ouzouni i saradnici (2009). Na osnovu rezultata, možemo ustanoviti da je *Ganoderma lucidum* u odnosu na analizirane gljive imala znatno veći sadržaj suve materije (89.61%), dok su druge analizirane gljive sadržale od 8.66-17.43%. Sadržaj proteina *G.lucidum* iznosio je 10.33 g/100g, dok je sadržaj proteina drugih analiziranih pečuraka bio znatno veći (21 do 38g/100g). Iako pečurke predstavljaju bogat izvor proteina, *Ganoderma lucidum* se ubraja u medicinske gljive koje se razlikuju od ostalih pripadnika carstva gljiva po niskom sadržaju proteina. Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata *Ganoderma* (68.1 g/100g) je približno jednak sadržaju ukupnih ugljenih hidrata analiziranih gljiva (53.33-66.07 g/100g ), dok je sadržaj masti u sastavu analizirane *Ganoderma lucidum* bio manji.

**Tabela 10. Analiza osnovnog sastava *Ganoderma lucidum***

Analize osnovnog sastava	<i>Ganoderma lucidum</i>
Vlaga (%)	10.39±1.22
Suva materija (%)	89.61±9.89
Protein (g/100g)	10.33±1.15
Masti (g/100g)	1.13±0.11
Ugljeni hidrati (g/100g)	68.10±5.15
Pepeo (g/100g)	0.86±0.05

U analizi neisparljivih jedinjenja *Ganoderma* spp i nekoliko medicinskih gljiva Mau i saradnika (2001), ukupni ugljeni hidrati predstavljaju najzastupljeniji sastojak svih

medicinskih gljiva, a prema njihovom istraživanju od 85.13% ukupnih ugljnih hidrata *Ganoderma lucidum* 59.16% čine vlakna.

Srednji prečnik (d) gljive uzorka *Ganoderma lucidum*, koji je dobijen mlevenjem gljive u mlinu za kafu, određen na setu sita različitih promera iznosio je 0.130 mm. Za proizvodnju ekstrakata gljive korišćeni su i uzorci usitnjene gljive dimenzija oko 1 cm. Vršena je tečno čvrsta ekstrakcija, kod kojih je važan faktor veličina čestica koja utiče na kvantitet i kvalitet transfera komponenti iz čestica u rastvarač. Analiziran je uticaj veličine čestica na hemijski sastav i antioksidativne karakteristike ekstrakata.

Ekstrakti gljive *Ganoderma sp.* proizvedeni upotrebom različiti rastvarača se mogu naći na tržištima širom sveta poslednjih nekoliko decenija. Za dobijanje ekstrakta ove gljive najčešće se kao rastvarači koriste voda i etanol. Savremena medicinska istraživanja su pokazala da ekstrakcijom gljive u alkohol vodenoj smeši postiže efikasnija kompozicija i povećava rastvaranje bioloških aktivnih materija. Prema ranijim studijama antioksidativne komponente polifenolne prirode bolje se rastvaraju u polarnijim nego u nepolarnim rastvaračima, a najpogodniji rastvarači za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja su metanol ili etanol (Oreupoulu, 2003). Etanol je preporučljiviji, jer u odnosu na metanol nema toksično dejstvo na čoveka i može bez dodatnih prerada koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

U proizvodnji ekstrakata je korišćena alkoholno vodena mešavina 60 % etanola. U ranim istraživanjima Nikšić i saradnika (2001) ustanovljeno je da se ekstrakti ove gljive napravljeni od 60% etanola, mogu koristiti kao efikasniji dodatak za brzo sazrevanje alkoholnih pića u odnosu na ekstrakte napravljene od 40, 50 i 70% etanola. U preliminarnim rezultatima dobijenim ekstahovanjem gljiva potvrdili smo ranije zaključke i koristili samo 60 % etanol. U burad za starenja alkoholnih pića se dodaju uzorci destilata sa oko 60 % etanola, tako kao dodatak alkoholima za starenje najbolje je koristiti ekstrakte sa istom količinom etanola. Dodatkom ovih ekstrakata alkoholnim medijuma dolazi do promena senzornih karakteristika i hemijskog sastava alkoholnih pića, koje će biti ispitane u daljem radu.

Ekstrakti su uparavani na vakum uparivaču do petine početne količine, kako bi se koncentracija triterpena i polifenola povećala u ekstraktima i povećala efikasnost dodate supstance.

## 5.2. ANALIZA HEMIJSKOG SASTAVA ALKOHOLNIH MEDIJA

Osnovni alkoholni medijumi koji su korišćeni za proizvodnju specijalnih rakija ekstrakcijom sastojaka plodonosnog tela gljive u istraživanjima bili su: žitni alkohol, šljivova prepečenica, lozova prepečenica i vinski destilat. Parametri kvantitativnog sastava osnovnih alkoholnih medijuma određivani su prema „Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza alkoholnih pića“, Sl. List SFRJ br. 70/87. Rezultati su predstavljeni u tabeli 11. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa Pravilnikom o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića, „Službeni glasnik RS“, broj 73/10.

**Tabela 11.** Analiza hemijskog sastava osnova alkoholnih pića i ekstrakata

Analiza	Lozova prepečenica	Šljivova Prepečenica	Vinski destilat	Rafinisani alkohol
etanol (% v/v)	45	45	45	96.1
ukupne kiseline (mg/L a.a.)	295	440	213	38
estri (mg/laa)	875	2640	1329	38
aldehidi (mg/L aa)	117.00	117.68	100.65	16.25
furfural (mg/laa)	0.19	1.543	0.192	Nema
viši alkoholi (mg/laa)	1670	1470	1800	9.96
metanol (g/laa)	6.7	1.05	0.22	0.09
ekstrakt (g/laa)	0.4	0.45	0.92	0.8
ukupni SO <sub>2</sub> (mg/L)	5.12	-	2.56	-
HCN (mg/laa)	-	-	-	-
benzaldehid (mg/laa)	-	1.82	-	-
proba po Savalu	-	-	-	Izdržao
proba po Barbeu	-	-	-	26 minuta i 15 sekundi

### 5.2.1. ANALIZA AROMATSKOG SASTAVA ALKOHOLNIH MEDIJUMA

Gasna hromatografija, naročito u kombinaciji sa masenom spektrofotometrijom je izuzetno pogodna i često korišćena metoda analize aromatskog kompleksa jakih alkoholnih pića. Unapređenjem instrumentalnih tehnika, omogućeno je detektovanje i supstanci koje su u pićima prisutne u veoma niskim koncentracijama, a koje mogu značajno uticati na njihove senzorne karakteristike. Napredne i sofisticirane tehnike omogućavaju istraživanje uticaja različitih činilaca na formiranje poželjnih i nepoželjnih aromatskih komponenti, i razvijanje najboljih procesnih rešenja u smislu dobijanja optimalnog odnosa ovih jedinjenja.

Rezultati GC-MS analize uzoraka šljivove i lozove prepečenice, vinskog destilata i žitnog alkohola prikazani su u tabeli 12. Gasnohromatografskom analizom žitnog alkohola je utvrđeno da aromatski kompleks čine 12 jedinjenja, koji su u grupi viših alkohola, karbonilnih jedinjenja, estra i ugljovodoničnih jedinjenja. Najveći broj jedinjenja nastaje tokom fermentacije, radom enzimskog kompleksa kvasaca, ugljovodonočna jedinjenja (1,1-dietoksi heksan, tridekan) i keton (4-metil-2-pentanon) detektovana su samo kod rafinisanog žitnog alkohola. Tehnološki postupak proizvodnje je definisan u cilju dobijanja proizvoda sa malim brojem isparljivih jedinjenja.

Aromatski sastav šljivovice bio je predmet velikog broja gasnohromatografskih istraživanja, a najznačajniji radovi bili su Kaina i Bandion-a (1969), Filajdića i Đukovića (1973), Đukovića (1973), Crowella i Gymona (1973), Teševića i saradnika (2005) i Satora i Tuszynski (2010). Analizom uzorka šljivove prepečenice korišćenog za proizvodnju specijalnih rakija identifikovano je 40 jedinjenja, među kojima su najznačajniji alkoholi, estri, aldehidima, ketoni, organske kiseline i fenolna jedinjenja.

Jedinjenje koja svojom koncentracijom dominiraju u uzorku šljivovice su: viši alkoholi (1-propanol, izobutanol, izoamilalkohol) i estar etil-laktat. Etil-laktat je važan sastojak šljivovice i ima dopadljiv voćni miris, u istraživanjima Crowella i Gymona (1973) bio je prisutan u svim ispitivanim eksperimentalnim i tržišnim uzorcima. Aromatske komponente koje su samo detektovane u uzorku šljivovice su: pinokanfol, menten (3p), nonanol,  $\gamma$ -underdekanlakton, eugenol i dodekanska kiselina. Aromatski kompleks šljivovice specifičnim čine jedinjenje koja potiču iz šljive koja je korišćena kao sirovina.

Jedinjenja koja su detektovana i u aromi šljive sorte *Prunus domestica*, koji pripadaju grupi viših alkohola su: n-butanol, 3-penten-2-ol, 1-pentol, 3-metil-pentanol, 4-hidroksi-4-metil-2-pentanol i terpeniski alkoholi: linalol, nonanol, feniletanol, benzilalkohol, a alkohol  $\alpha$ -terpeneol detektovana je kod *Prunus salicina*, a eugenol kod *P. salicina* x *P.americana* (Gomez-Plaza i Ledbetter, 2010).

Estri su važna aromatska jedinjenja, koja nastaju za vreme alkoholne fermentacije, ali i postupcima destilacije i odležavanja. U uzorku šljivovice su detektovani sledeći estri: etil-laktat, etil oktanoat, etil-dekanoat, etil-benzoat, di-etil sukcinat, metil i etil salicinat i metil-cinamat. Iako su detektovane u malim koncentracijama, veoma su važne komponente aromatskog kompleksa šljivovice.

U uzorku je detektovan  $\gamma$ -underdekanlakton, koji u dosadašnjim istraživanjima nije detektovan kao sastojak arome šljiva *Prunus domestica*, već kod *P. salicina* x *P.americana* u istraživanju Gomez i Ledbetter (1994). Važno jedinjenje arome šljivovice je i benzalaldehid koji nastaje enzimskom razgradnjom amigdalina i prunazina i ima miris badema (Nikićević i Paunović, 2013). U uzorku šljivovice su količine slobodnih kiseline relativno veće nego kod ostalih uzoraka, što je zaključeno i u istraživanjima isparivih sastojaka u jugoslovenskim šljivovicama (Filarđić i Đurajković, 1973). Oktanska, heksanska, dekanska, dodekanska i heksadekanska, su kiseline koje formiraju kvasci u toku fermentacije.

Poljski naučnici, Satora i Tuszyński (2008), ispitivali su glavne isparljive komponente domaće poljske šljivovice iz oblasti Łącko, koja je od aprila 2004. godine zaštićena robna marka pod nazivom "Śliwowica Łącka". Takođe, ispitivali su i uticaj različitih sojeva kvasaca na isparljivi profil ovog pića (Satora i Tuszyński, 2010). Poređenjem dobijenih rezultata za Śliwowica Łącka sa isparljivim profilom sličnih proizvoda različitog porekla, utvrđeno je da sadrži veću koncentraciju metanola (5.59-8.74 g/l a.a) i butanola (32-335 mg/l a.a), a da ima manji sadržaj izobutanola (406-491 mg/l a.a), pentanola (4.3-14.9 mg/l a.a) i 2-feniletanola (61-68 mg/l a.a). Ispitivani uzorak sadržao je manju koncentraciju svih navedenih jedinjenja u odnosu na ispitivane uzorke Śliwowica Łącka, butanola (4 mg/l a.a), pentanola (4.1 mg/l a.a) i 2-feniletanola (6.91 mg/l a.a). Odnosi amil-alkohol/1-propanol i izobutanol/1-propanol mogu se koristiti za razlikovanje



rakija dobijenih spontanom fermentacijom od onih kod kojih je korišćena čista kultura kvasca (Satora i Tuszyński, 2008; Tešević i saradnici, 2005).

Analizom aromatskog sastava vinskog destilata detektovano je 20 jedinjenja, koja prema hemijskom sastavu spadaju u više alkohole, aldehide, ketone, estre i kiseline. Najzastupljeni su viši alkoholi izobutanol i izoamil-alkohol, acetaldehid, etil-acetat i 1-propanol, koji se nalazi u značajno većim količinama nego u uzorcima šljivovice, žitnog alkohola i lozovače 4 mg/l a.a. Dati rezultati su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima koja su prezentovana u radu Tsakiris i saradnika (2014). Vinski destilat sadrži najveću koncentraciju izoamil alkohola, koji ima specifičan miris banane. Etil-oleat i meti-linoleat su detektovani u uzorcima lozovače i vinskog destilata, za čiju se proizvodnju koristi grožđe kao sirovina, ali je postupak proizvodnje različit. Fenil-etanol je detektovan u većim koncentracijama, nego u lozovoj i šljivovoj prepečenici. U uzorku vinskog destilata nisu detektovani terpeniski alkoholi, koji potiču iz pokožice grožđa.

Aromatski kompleks lozovače se sastoji od 37 detektovanih jedinjenja, koja pripadaju po hemijskom sastavu višim alkoholima, estrima, aldehydima, kiselinama i terpeniskim alkoholima. Najzastupljenija jedinjenja su kao i kod ostalih uzoraka etil-acetat, izobutanol i izoamilalkohol, ali sadržaj propanola i heksanola je značajan. Heksanol je detektovan samo u uzorku lozovače i daje joj travnati ukus. Njen prag detekcije je 20 mg/l (Nikićević i Paunović, 2013), a u analiziranom uzorku se nalazi u manjoj koncentraciji 3.245 mg/l. Detektovani su terpeniski alkoholi linalol i  $\alpha$ -terpineol koji potiču iz grožđa, a nisu detektovani u uzorku vinskog destilata. Jedinjenja neo menten, mentol neo i estri etil-dekanot i metil-linolat detektovani su samo u uzorku lozovače. Etil-cinamat ima voćni miris (Christopher i Bauer-Christopher, 2007) i detektovan u količini značajno većoj nego u uzorku šljivovice. Za razliku od vinskog destilata lozovača sadrži dekansku i heksadekansku kiselinu, a oktanska kiselina se sadrži u većoj koncentraciji.

Tabela 12. GC-MS analiza isparljivih jedinjenja u alkoholnim medijumima

Jedninjenja	Ž	Š	V	L	Jedinjenja	Š	V	L
aldehid	-	0.026	0.533	-	pinokanfol	0.045	-	-
aceton	-	0.013	0.804	0.483	Linalool	0.098	-	0.452
1.1 dietoksi etan	-	1.551	-	9.342	menten (3p)	0.059	-	-
etil-acetat	5.523	69.52	26.276	28.013	etil-dekanoat	0.483	0.274	-
propil-acetat	-	0.332	-	0.059	Nonanol	0.194	-	-
2-pentanon	-	0.176	-	0.056	ethyl-benzoat	0.603	-	0.054
1-propanol	0.085	40.35	9.58	7.065	di ethil-sukcinat	1.817	0.699	0.084
izobutanol	3.553	35.73	49.884	26.989	$\alpha$ -terpineol	0.204	-	0.142
isoamil-acetat	10.73	0.204	1.244	0.38	metil-salicilat	0.077	-	0.052
n-butanol	0.115	1.806	1.362	1.036	ethyl-salicinate	0.07	-	0.058
3-penten-2-ol	-	0.588	0.627	0.509	heksanska kiselina	0.435	-	-
isoamil-alkohol	5.828	99.73	220.98	164.61	benzil-alkohol	3.357	-	0.064
1-pentanol	0.134	0.185	0.253	0.236	fenil-etanol	3.111	4.654	1.303
ethyl-laktat	-	16.89	4.441	1.996	oktanska kiselina	0.831	0.396	0.928
heksanol	-	-	-	3.245	etil-cinamat	0.073	-	0.277
3-methyl-pentanol	-	0.712	1.358	-	$\gamma$ -undekanlakton	0.097	-	-
4-hidroksi 4-metil	0.402	0.245	-	-	eugenol	0.473	-	-
2-pentanon	-	-	-	-	dekanska kiselina	0.911	-	1.83
1,1 - dietoksi heksan	0.071	-	-	-	dodekanska kiselina	0.408	-	-
etil-heksanoate	0.017	-	0.241	0.444	heksadekanska kiselina	0.744	-	0.467
tridekan	0.212	-	-	-	ethyl oleate	-	0.105	0.085
4-metil- 2-pentanon	0.122	-	-	-	metil-linoleate	-	0.117	3.339
etil-oktanoate	-	0.575	0.372	1.264	menthol neo	-	-	0.126
sirćetna kiselina	-	0.096	-	0.103	menten neo	-	-	0.931
furfural	-	1.543	-	0.192	etil-dodekanoat	-	-	0.109
benzal aldehid	-	1.822	-	0.108	metil-linolat	-	-	0.041

Uzorci. Ž-žitni alkohol, Š-šljivova prepečenica, L-lozova prepečenica, V-vinski destilat.

### 5.3. ANALIZA ETANOLNIH EKSTRAKTA *Ganoderma lucidum*

#### 5.3.1. ANALIZA ŠEĆERA EKSTRAKATA *Ganoderma lucidum*

Udeo rastvorljivih šećera u *Ganoderma lucidum* je veoma mali. U istraživanjima Mau i saradnika (2001) glukoza nije detektovana u sastavu ove gljive, a Kim i saradnici (2009) u svom istraživanju nisu detektovali saharozu i fruktozu u sastavu *G.lucidum*, samo je određen kvantitativni sadržaj glukoze od 6.37 mg/g.

Korišćenjem HPLC metode kvantifikovan je sadržaj šećera glukoze, fruktoze i saharoze u alkoholnim ekstraktima gljive *Ganoderma lucidum* (tabela 13). Sadržaj saharoze i fruktoze u uzorcima je manji od 0.5 g/L. Sadržaj šećera glukoze u uzorcima E1, E2, E3 i E6 detektovan. Uzorci E1 i E3 sadrže 0.7 g/L i napravljeni su sa seckanim uzorcima gljive, a u uzoraku E5 koji je ekstrahovan tokom 24 h na temperaturi od 40°C nije detektovana količina iznad 0.5 g/L

**Tabela 13.** Analiza sadržaja šećera ekstrakta *Ganoderma lucidum* (g/L)

Naziv	Fruktoza	Glukoza	Saharoza
<b>E1</b>	<0.5	0.70	<0.5
<b>E2</b>	<0.5	0.65	<0.5
<b>E3</b>	<0.5	0.70	0.55
<b>E4</b>	<0.5	<0.5	<0.5
<b>E5</b>	<0.5	<0.5	<0.5
<b>E6</b>	<0.5	0.65	<0.5

**Uzorci :** **E1** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E2** – 40 g/L mleveme gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E3** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E4** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E5** – 40 g/L usitnjene gljive je ekstrahovano tokom 24h na 40°C u tamnoj boci; **E6** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 24h na 40°C u tamnoj boci.

Za ekstrakte ove gljive napravljene sa seckanim gljivama sadržaj glukoze se povećava sa dužim vremenom ekstrakcije. Sadržaj glukoze u ekstraktima napravljenim sa

mlevenom gljivom, pokazuje da se glukoza detektuje u uzorcima sa kraćim vremenim ekstrakcije 15 dana na sobnoj temperaturi (E3) i kod uzorka čija je ekstrakcija traje 24 h na 40°C. Sa povećanjem veličine čestica *G. lucidum* koje se koriste za proizvodnju etanolnih ekstrakata povećava se i vreme neophodno za ekstrakciju šećera glukoze, možemo zaključiti da vreme ekstrakcije je proporcionalno veličini čestica.

### 5.3.2. ANALIZA SADRŽAJA $\beta$ -GLUKANA U EKSTRAKTIMA *GANODERMA LUCIDUM*

Biološki aktivni polisaharidi sa širokim spektrom dejstva predstavljaju važne komponente gljive *G.lucidum*. Glavni biološki aktivni polisaharidi ove gljive se nalaze u formi  $\beta$ -1-3 i  $\beta$ -1,6-D-glukana. Pogodan rastvarač za ekstrakciju ovih komponenti je voda, a u etanolno vodenoj mešavini se rastvaraju u neznatim količinama. Dodavanjem u alkoholna pića ekstrakta *Ganoderma* sa većim sadržajem glukana imalo bi negativni efekat na senzorne karakteristike ovih pića, formirao bi se talog ili zamućenje pića.

U ranijim studijama Kozarski i saradnici (2011, 2012) su analizirali sadržaj glukama u ekstraktima plodonosnih tela i spora gljive *G.lucidum*. Sadržaj ukupnih glukana  $\alpha$  - glukana i  $\beta$ -glukana u ekstraktu spora *G.lucidum* iznosili su 20.8, 19.6 i 1.2 g/ 100 g, respektivno (Kozarski i saradnici, 2011). Sadržaj ukupnih glukana u vodenom ekstraktu gljive *G.lucidum* iznosio je 47.1 g/ 100 g, veći deo glukana činili su  $\beta$ -glukani 41.4 g/ 100 g, a manji udeo  $\alpha$ -glukani 5.7 g/ 100 g (Kozarski, 2012). Glukani su slabije rastvorljivi u alkoholno vodenim rastvorima, samim tim je sadržaj u etanolnom ekstraktima analiziranih uzoraka iznosio je 9.44-18.5 g/ 100 g.

Analiziran je efekat vremena ekstrakcije i veličine čestica na sadržaj ukupnih glukana,  $\alpha$ -glukana i  $\beta$ -glukana ekstrakata *Ganoderma lucidum* (tabela 14). Uzorci ekstrakata napravljeni dodavanjem seckane gljive (E1, E3 i E5) sadržali su neznatno veću količinu ukupnih i  $\beta$ -glukana u odnosu na uzorke napravljene od mlevene gljive (E2, E4 i E6). Najveći sadržaj ukupnih i  $\beta$ -glukana imao je uzorak E1, a najmanji uzorak E6. Uzorci

ekstrahovani nakon 15 dana (E1 i E3) imali su veće količine ukupnih i  $\beta$ -glukana u odnosu na ekstrakte sa istom količinom gljive nakon ekstrakcije od 30 dana. Uzorci dobijeni ekstrakcijom *G. lucidum* tokom 24 h sadrže najmanju količine ovih glukana.

Veličina čestica utiče na količinu ekstrahovanih ukupnih i  $\beta$  - glukana, tako za proizvodnju ekstrakata koji će se koristiti u proizvodnji alkoholnih pića potrebno je da sadržaj glukana bude manji. Kod mlevenih čestica gljive korišćenih za proizvodnju uzoraka najmanji sadržaj ukupnih i  $\beta$ -glukana bio nakon 24 h, a najveći sadržaj nakon 15 dana, nakon čega je došlo do smanjenja sadržaja glukana. Kod uzoraka napravljenih korišćenjem seckanih čestica sadržaj ukupnih i  $\beta$ - glukana se neznatno razlikuje nakon 24 h i 30 dana ekstrakcije, a najveći sadržaj ima nakon 15 dana. Količina ekstrahovanih glukana se povećava nakon 24 h, a nakon 15 dana dolazi do neznatnog smanjenja sadržaja. Vreme ekstrakcije ima veliki uticaj na sadržaj glukana, sa povećanjem vremena ekstrakcije njihova količine se povećava, ali do izvesne granice nakon koje dolazi do smanjenja njihovog sadržaja.

**Tabela 14.** Analiza sadržaja glukana u ekstraktima *Ganoderma lucidum*

Uzorak	sadržaj( g/100g)		
	Ukupni glukani	$\alpha$ - glukani	$\beta$ -glukani
<b>E1</b>	18.55±0.04	2.91±0.06	15.64±0.01
<b>E2</b>	15.81±0.04	2.43±0.04	13.38±0.01
<b>E3</b>	16.53±0.07	2.93±0.03	13.62±0.02
<b>E4</b>	13.42±0.05	1.79±0.04	11.63±0.03
<b>E5</b>	14.72±0.03	1.68±0.02	13.03±0.05
<b>E6</b>	9.44±0.03	0.54±0.01	8.90±0.04

**Uzorci :** **E1** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E2** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 15 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E3** – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E4** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **E5** – 40 g/L usitnjene gljive je ekstrahovano tokom 24h na 40°C u tamnoj boci; **E6** – 40 g/L mlevene gljive je ekstrahovano tokom 24h na 40°C u tamnoj boci.

Udeo  $\alpha$ -glukana koji se nalazi u analiziranim ekstraktima je veoma mali. Kod uzoraka napravljenih od seckane i mlevene gljive ekstrakcija  $\alpha$ -glukana je završena nakon 15 dana. Kod uzoraka za čiju proizvodnju je korišćena seckana gljiva nakon 15 dana

ekstrakcije došlo je do neznatnog povećanja, a kod uzoraka sa mlevenom gljivom do znatnog pada u sadržaju ovih komponenti.

### 5.3.3. ANALIZA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNOSTI UZORKA EKSTRAKATA GLJIVE

Prirodni antioksidanti imaju važnu ulogu u prevenciji bolesti sprečavanjem oksidativnih oštećenja organizma izazvanih slobodnim radikalima. Poslednjih godina postoji veliko interesovanje istraživača za pronalaženje novih efikasnih prirodnih supstanci sa antioksidativnim dejstvom. Prema istraživanjima veliki broj medicinskih gljiva, a među njima i *Ganoderma lucidum*, predstavljaju bogat izvor jedinjenja sa antioksidativnom aktivnošću. Širok spektar jedinjenja *Ganoderma lucidum* pokazuje antioksidativno dejstvo *in vivo* testovima. Najznačajna jedinjenja ove gljive sa antioksidativnim karakteristikama predstavljaju polifenoli (Kalač, 2012), ali važnu ulogu imaju i triterpeni i polisaharidi (Galor i saradnici, 2011).

U ranjim studijama, Mau i saradnici (2002) utvrdili su da je antioksidativni kapacitet određen DPPH metodom *Ganoderme lucidum* iznosi 68-74%. Kim i saradnici (2008) analizirali su antioksidativni kapacitet 10 vrsta gljiva i ustanovili da je *Ganoderma lucidum* ima najveću antioksidativnost.

Sadržaj polifenola analiziranih ekstrakata iznosi od 406.82 do 658.48 mg/L. U eksperimentu je korišćen i poluprečišćeni ekstrakt, koji je rastvoren u 45% etanolu. Dodatkom ekstrakta dolazi do pojave zamućenja alkoholnih medijuma, pa je nakon dekantacije uzorka određen smo sadržaj ukupnih polifenola, koji je iznosio 22.4 mg/L GAE. Na osnovu rezultata je zaključeno da korišćeni poluprečišćeni ekstrakt nije dobra sirovina za proizvodnju alkoholnih pića.

Uslovi ekstrakcije imaju veliki efekat na sadržaj šećera i glukana ekstrakta, tako da je analiziran uticaj vremena ekstrakcije i veličine čestica na sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativno dejstvo ekstrakata. Rezultatima dvofaktorijanog ogleđa izvršena je analiza varijanse (ANOVA), a Tuckey's test je korišćen za određivanje razlike između sredina.

Statističkom proverom utvrđeno je da na sadržaj ukupnih fenola statistički značajno utiče vreme ekstrakcije ( $F=9.45$ ,  $p=0.00$ ) i interakcija oba faktora ( $F=15.30$ ,  $p=0.00$ ), a veličina čestica ( $F=1.57$ ,  $p=0.25$ ) nije imala statistički značajan efekat.

Sa povećanjem vremena ekstrakcije kod uzoraka ekstrakata napravljenih sa seckanom gljivom, količina polifenola se povećava sa vremenom ekstrakcije, tako da sadržaj polifenola u uzorcima može rangirati  $E5 < E1 < E3$ . Najveći sadržaj polifenola uzoraka napravljenih sa mlevenom gljivom je nakon 30 dana ekstrakcije. Sadržaj polifenola kod uzoraka ekstrakata napravljenih od mlevene gljive se smanjuje sa povećanjem vremena ekstrakcije. Možemo zaključiti da kod malih čestica rastvarač lakše dopire do unutrašnjosti čestica, a transfer jedinjenja je intenzivniji i period ekstrakcije je kraći. Nakon ekstrakcije jedinjenja dolazi do njihove degradacije ili reakcije sa drugim jedinjenjima tako da se sadržaj ukupnih polifenola smanjuje. Transfer ukupnih polifenola iz unutrašnjosti čestica u rastvarač kod uzorka seckane *G. lucidum* je sporiji, ali dužim vremenom ekstrakcije efikasnost je veća i dolazi do povećanja sadržaja analiziranih jedinjenja.

**Tabela 15.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativnost uzoraka ekstrakata gljive *Ganoderma lucidum*

Uzorci	TPC (mg/L GAE)	DPPH (mM TE)	FRAP (FRAP unit)	TEAC (mM TE)
E1	445.15±19.16 <sup>a</sup>	2.08±0.16 <sup>a</sup>	4.85±0.1 <sup>a</sup>	3.64±0.22 <sup>a</sup>
E2	557.58±47.86	2.33±0.14 <sup>b</sup>	5.40±0.26 <sup>ab</sup>	4.40±0.10 <sup>b</sup>
E3	647.88±65.94 <sup>d</sup>	1.40±0.05 <sup>c</sup>	4.32±0.08 <sup>abf</sup>	2.51±0.06 <sup>c</sup>
E4	406.82±13.18 <sup>abd</sup>	2.05±0.06 <sup>bd</sup>	6.46±0.10 <sup>abf</sup>	3.79±0.15 <sup>bd</sup>
E5	415.45±10.48 <sup>bc</sup>	1.81±0.12 <sup>f</sup>	4.48±0.06 <sup>bef</sup>	3.29±0.19 <sup>bc</sup>
E6	658.48±15.00 <sup>acd</sup>	3.07±0.20 <sup>acdf</sup>	6.65±0.13 <sup>abef</sup>	5.95±0.35 <sup>acdf</sup>

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se statistički značajno razlikuju prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ ;

<sup>a</sup> Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup> Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Trolox

Rezultati antioksidativnog kapaciteta analiziranih uzoraka ekstrakata određivani su DPPH, FRAP i TEAC metodom prikazani su u tabeli 15. Rezultati DPPH analize se nalaze u intervalu između 1.4-3.07 mM TE, a TEAC analize 2.51-5.95 mM TE. Prema rezultatima statičke analize utvrđeno je da na antioksidativni kapacitet određen DPPH i TEAC metodom veličina čestica gljive nema statistički značajan uticaj. Kod uzoraka ekstrakata napravljenih

od seckane gljive, vremenom se antioksidativnost povećava, tako da nakon 24 h ekstrakcija komponenti koje utiču na antioksidativnost nije završena. Nakon 15 dana ekstrakcije antioksidativnost uzoraka se smanjuje, jer dolazi do razgradnje jedinjenja koja imaju antioksidativno dejstvo. Za uzorke ekstrakata napravljenih od mlevene gljive antioksidativnost se vremenom smanjuje, tako je ekstrakcija jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom završena nakon 24 h na 40°C. Prema rezultatima DPPH i TEAC metoda uzorak sa najvećom antioksidativnošću je uzorak E6, koji je napravljen od mlevene gljive ekstrahovane tokom 24h.

Analiza antioksidativnog kapaciteta uzoraka FRAP metodom, pokazuje da vreme ima mali uticaj na antioksidativni kapacitet ekstrakta napravljenih od seckane gljive. Nakon 15 dana ekstrakcije imamo blago povećanje AO u odnosu na 24 h ekstrakcije, a zatim blagi pad kod uzorka nakon 30 dana ekstrakcije. Analizom uzoraka ekstrakata napravljenih od seckane gljive, utvrđeno je da uzorci kod kojih je ekstrakcija trajala 24 h i 30 dana statistički se ne razlikuju, a kod ekstrakata nakon 15 dana ekstrakcije dolazi do smanjenja antioksidativnog kapaciteta. Moguće objašnjenje je da nakon 24 h časa dolazi do degradacije jedinjenja koja poseduju antioksidativni potencijal, a zatim nakon 15 dana nastaju nova jedinjenja ili se ekstrahuju jedinjenja koja imaju veliki efekat na antioksidativnost uzoraka.

#### **5.3.4. ANALIZA FENOLNIH JEDINJENJA EKSTRAKATA GLJIVE**

##### ***Ganoderma lucidum***

Gljive sintetišu veliki broj sekundarnih metabolita sa biološki aktivnim dejstvom. U ovu grupu se ubrajaju i polifenolna jedinjenja, koja čine raznovrsnu grupu i klasifikuju se na proste fenole i polifenolne kiseline, i na polifenole, koji se zatim dele na flavonoide, tanine, stilbene i kumarine.



Analizirali smo sastav polifenolnih jedinjenja ekstrakata napravljenih ekstrahovanjem tokom 30 dana 40 g/L seckane (E3) i mlevene gljive (E4). Rezultati su prikazani u tabeli 15.

**Tabela 16.** Analiza polifenolnih komponenti uzoraka ekstrakata gljive *Ganoderma lucidum* (mg/L)

Jedinjenja	uzorci	
	E3	E4
Galna kiselina	-	0.422±0.012
Kvercetin	-	0.399±0.007
Trans-cimetna kiselina	0.022±0.003	0.029±0.000
Kemferol	0.276±0.005	0.407±0.002
Hesperetin	0.922±0.001	1.522±0.002
Naringin	1.212±0.013	1.584±0.011
<b>Ukupan sadržaj fenola</b>	<b>2.432</b>	<b>3.542</b>

Sadržaji fenolnih jedinjenja su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD.

Uzorci: E3- 40g/L seckana ganoderma ekstrahovana 30 dana; E4- 40g/L mlevena ganoderma ekstrahovana 30 dana;

Sledeće polifenolne komponente su analizirane: galna kiselina, hlorogena, p-hidroksibenzoeva kiselina, katehin, vanilin, siringin, kafa kiselina, kumarna, rutin, benzoeva kiselina, resveratrol, kvercetin, trans-kumarna kiselina, kemferol, hesperetin i naringenin.

Kim i saradnici (2008) su analizirali sastav i sadržaj polifenolnih jedinjenja u veštački gajenim jestivim i medicinskih gljivama u Koreji. Analiziran je sastav medicinske gljiva *Ganoderma lucidum* kod koje su od 30 analiziranih polifenolnih jedinjenja detektovane sledeće supstance: galna kiselina, pirogalol, 5-sulfosalicilna kiselina, protokatehinska kiselina, katehin, naringin, miricetin, kvercetin, kemferol, hesperetin, formononetin i biokanin. Za razliku od uzorka koji su analizirani Kim i sardanici (2008), u ekstraktu E3 nisu detektovani galna kiselina, kvercetin i katehin, a u uzorku E4 katehin. Fenoli hesperitin i naringin su bili najzastupljenija u analiziranim uzorcima ekstrakata gljive, dok u koreanskom uzorku njihova koncentraciji je bila nezatna u odnosu na druge detektovane fenole.

Sastav polifenolnih jedinjenja u fenolnim i polisaharidnim ekstraktima pripremljenim od plodonosnog tela, spora i micelijuma *G.lucidum* analizirali su Heleno i saradnici (2012). U uzorcima su detektovane *p*-hidroksibenzoeva, *p*-kumarna i cimetna kiselina. U ekstraktima spora nije detektovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina, a u micelijama *p*-kumarna kiselina. Fenolni ekstrakt plodonosnog tela gljive imalo je najveći sadržaj fenola (1.23 mg /100 g s.m.). U analiziranim uzorcima ekstrakta gljive (E3 i E4) ova jedinjenja nisu detektovana. Analiziran je sadržaj trans-cimetne kiseline, koja je detektovana u oba uzorka.

Veličina čestica ima intenzivniji efekat na količinu estrahovih jedinjenja, nego na njihovu kompoziciju. Kod uzoraka E3 napravljenog od seckane gljive nije detektovana galna kiselina i kvercetin, a trans-cimetna kiselina, kemferol i hesperetin i naringin su detektovani u statistički značajno manjoj količini. Veličina čestica nije imala značajan uticaj na sadržaj trans cimetne kiseline, ali njen sadržaj je zanemarljivo manji u odnosu na koncentraciju drugih polifenolnih komponenti. Sadržaj ukupnih fenola određen HPLC analizom za uzorak E3 i E4, iznosio je 2.432 mg/L i 3.542 mg/L, respektivno. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da veličina čestica ima važan uticaj na sadržaj fenola, da je ekstrakcija potpunija kod uzorka mlevene gljive.

Na osnovu klasifikacije kemferol i kvercetin spadaju u flavonole, koji su bojene materije bele do žute boje. U bojene materije klase flavonona spadaju naringin i hesperetin.

### **5.3.5. HPLC-DAD/ESI-TOF-MS ANALIZA TRITERPENSKIH KISELINA EKSTRAKATA *GANODERMA LUCIDUM***

Korišćenjem HPLC-DAD/ESI-ToF-MS analize ispitivan je uticaj parametara ekstrakcije (veličine čestica, vremena ekstrakcije i temperature) na kvalitativni i kvantitativni sastav triterpenskih kiselina u ekstraktima *G.lucidum*. Ekstrakcioni parametri nisu uticali na kompoziciju triterpenskih kiselina, već samo na njihov kvantitativni sadržaj što je u saglasnosti sa ranijem istraživanjem prema kome sastav ekstrahovanih jedinjenja,

uključujući i triterpenske kiseline, zavisi od soja i uslova rasta gljive *G.lucidum* (Keypor i saradnici, 2010).

LC-MS analizom Leskošek-Čukalović i saradnici (2010a) su ispitivali sastav etanolnog ekstrakta *G.lucidum*. U sastavu ekstrakta identifikovana su sledeća triterpenska jedinjenja: ganoderinske kiseline (A, B, C6, C2, D, E, F, G, H, J) i lucidenska kiselina (LM1, E) i ganodermanontriol.

U ekstraktima je identifikovano 15 triterpenskih kiselina: ganoderinske kiseline (A, B, C2, C6, D, F, G, J), ganoderenske kiseline (D), lucidenske kiseline (A, E, D2, LM1), 12-hidroksi-ganoderinska kiselina D i elfingeniska kiselina A.

U tabeli 17 predstavljen je sadržaj triterpenskih kiselina u datim uzorcima. Hemijske i strukturne karakteristike jedinjenja utiču koji će ekstrakcioni parameter imati dominantan uticaj na kvantitativni sadržaj detektovanih jedinjenja. U zavisnosti od parametara možemo optimizirati ekstrakciju željenih jedinjenja koja imaju najznačajniji uticaj na senzorne karakteristike i adekvatno medicinsko dejstvo..

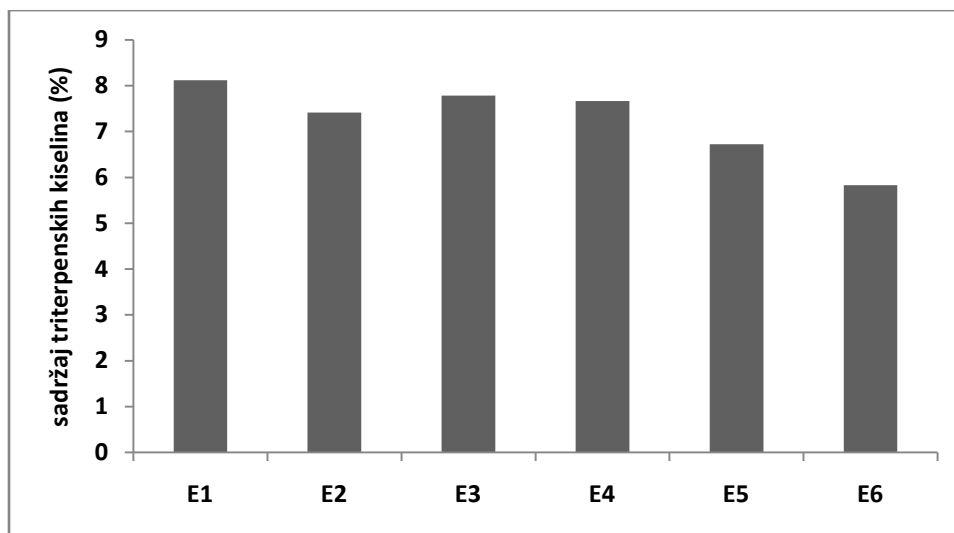
Ganoderinska kiselina A (GK) predstavlja dominantnu triterpensku kiselinu ekstrahovanu u datim ekstraktima, njen sadržaj iznosi od 0.58 – 0.78 %, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Zhao i saradnici, 2006). Najveći sadržaj ove GK ima uzorak ekstrakta E2 za čiju proizvodnju je korišćena mlevena gljiva i ekstrakcija je trajala 15 dana. Dominantan uticaj na količinu estrahove GK A ima veličina čestica, ekstrakcija je kompletnija kod mlevenih čestica, ali sa povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja njenog sadržaja usled degradacije. Na povećanoj temperaturi od 40°C u toku 24 h, ekstrakcija je kompletnija kod uzoraka seckanih uzoraka.

Su i saradnici (2001) su analizirali sadržaj ganoderinskih kiselina B i C2 u uzorcima gljiva *Ganoderma lucidum* sakupljenih na prostoru Tajvana, Indije, Argentine i Severne Amerike. Sadržaj ganoderinske kiseline B u ispitivanim uzorcima gljiva je iznosio od 0.0883 – 0.5104 mg/g, a ganoderinske kiseline C2 je bio značajno manji i iznosio je od 0.0289 – 0.1317 mg/g. U ispitivanim uzorcima ekstrakata gljive sadržaj ispitivanih ganoderinskih kiselina zavisio je od granulacije. Uzorci napravljeni sa seckanom gljivom sadržali su veću koncentraciju ganoderinske kiseline C2, a napravljeni sa mlevenom gljivom ganoderinsku kiselinu B.

Sadržaj ganoderinskih kiselina C2, B, AM, K, H i D analiziran je u uzorcima gljive *Ganoderma lucidum* i srodnih vrsta (Wang i saradnici, 2006), ganoderinska kiselina H bila je dominantna u svim analiziranim gljivama. U uzorcima ekstrakta gljive (E1-E6) nisu detektovane ganoderinske kiseline H, K i AM.

Kod sledećih triterpenskih kiselina ekstrakcija je efikasnija kod seckanih uzoraka u odnosu na mlevene ekstrakte sa istim vremenom ekstrakcije: lucidenska kiselina LM1, E, A, D2, 12-hidroksi ganoderinska kiselina, ganoderinska kiselina G i elfiginska kiselina A. Ekstrakcija analiziranih jedinjenja je efikasnija kod mlevenih uzoraka: ganoderinska kiselina C6, B, D, F i J. Veličina čestica nema uticaj na količinu ekstrahovane ganoderinske kiseline C2.

Kod uzoraka ekstrahovanih na 40°C u toku 24h ekstrakcija je efikasnija kod uzoraka napravljenih od seckanih gljiva. Izuzetak jedino čine ganoderinska kiselina D i ganoderinske kiseline C2 kod koje u datim uslovima veličina čestica nema uticaj na ekstrakciju ove kiseline.

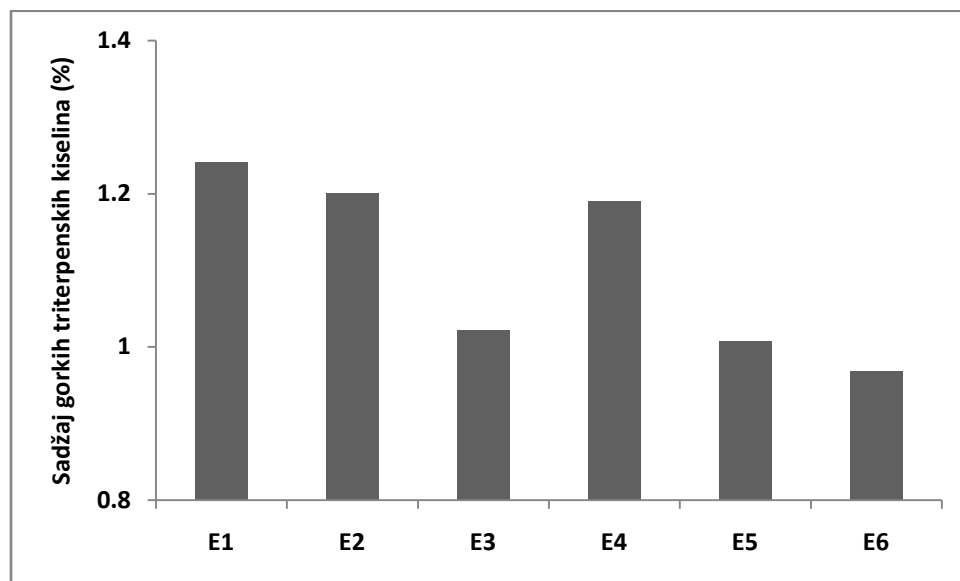


**Grafik 1.** Sadržaj ukupnih triterpenskih kiselina u ekstraktima gljive *G.lucidum*

Na osnovu ukupnog sadržaja analiziranih triterpenskih kiselina (grafik 1) najefikasnija je ekstrakcija uzorka E1 kod koga je korišćena seckana gljiva ekstrahovana

tokom 15 dana. Možemo zaključiti da je 24 h nedovoljno efikasan period za potpunu ekstrakciju i temperaturni tretman ne povećava prelazak jedinjenja u alkoholni medijum, mada postoji mogućnost da na datoj temperaturi analizirana jedinjenja se degradiraju.

Sadržaj gorkih triterpenskih kiselina (grafik 2) se sa povećanjem vremena ekstrakcije značajno smanjuje kod uzoraka ekstrakta proizvedenih od seckane gljive, pa se gorčina kod analiziranih uzoraka smanjuje. Seckana *G. lucidum* se pokazala kao efikasnija sirovina za proizvodnju ekstrakata, tako da će se koristiti kao sirovina za proizvodnju jakih pića.



**Grafik 2.** Sadržaj gorkih kiselina u uzorcima ekstrakata *Ganoderma lucidum*

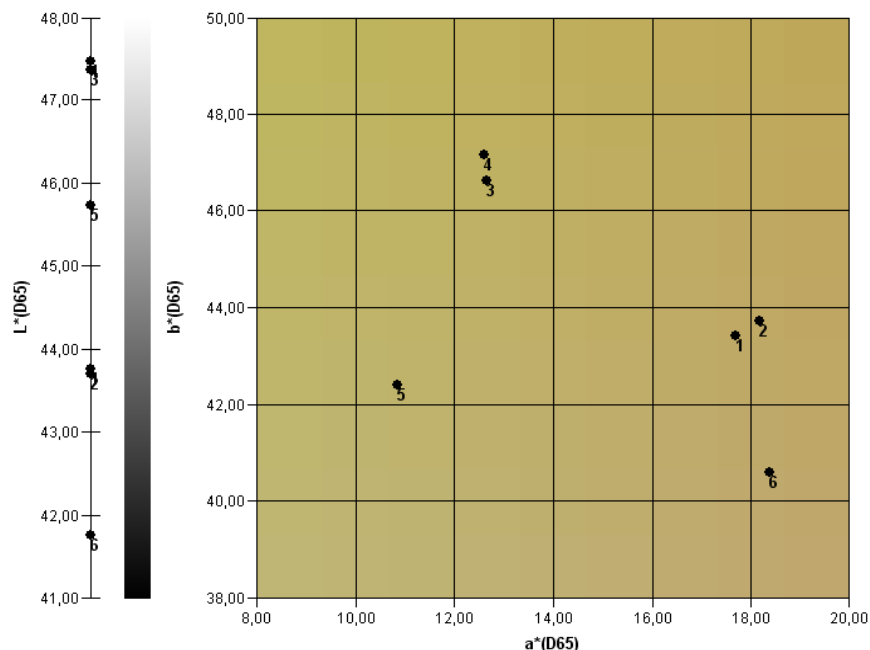
**Tabela 17.** Sadržaj triterpenskih kiselina u uzorcima ekstrakata *G.lucidum*

No $t_R$ (min) DAD/MS	Sadržaj komponenti u liofiliziranim uzorcima (%)						$\lambda_{max}$ (nm)	Molekularna formula i masa	Masa i m/z (izmereno)	MRM transition	Jedinjenja
	E1	E2	E3	E4	E5	E6					
1 8.00/8.08	0.2850	0.2199	0.2308	0.2257	0.1663	0.1662	256	$C_{30}H_{46}O_7$ (518.3087)	518.3244; 517.3168; 563.3232; 1035.6402	517→499	Ganoderinska kiselina C2
2 8.36/8.45	0.2467	0.1152	0.2138	0.1271	0.1232	0.0795	256	$C_{27}H_{40}O_6$ (460.2825)	460.2824; 459.2750; 505.2812; 919.5583	459→441 459→385	Lucideninska kiselina LM1
3 8.51/8.59	0.1133	0.1447	0.1103	0.1440	0.1229	0.0902	254	$C_{30}H_{42}O_8$ (530.2879)	530.2879 529.2806 575.2862	529→511 511→467	Ganoderinska kiselina C6
4 8.83/8.92	0.5378	0.3720	0.4864	0.3773	0.4027	0.2694	256	$C_{30}H_{44}O_8$ (532.3036)	532.2927; 531.2851; 1063.583	531→513 513→469	Ganoderinska kiselina G
5 9.10/9.19	0.1994	0.2764	0.1904	0.2536	0.2276	0.2121	254	$C_{30}H_{44}O_7$ (516.3087)	516.3087; 515.3016; 561.3054; 1031.6068	515→497 497→453	Ganoderinska kiselina B
6 9.24/9.33	0.3612	0.2250	0.3304	0.2383	0.2546	0.1651	258	$C_{29}H_{40}O_8$ (516.2723)	516.2810; 515.2738	515→473	Lucideninska kiselina E
7 9.55/9.65	0.4633	0.3694	0.3799	0.3684	0.3422	0.2500	254	$C_{30}H_{40}O_8$ (528.2723)	528.2723 527.2651 573.2757	527→509 509→465	Elfvingska kiselina A
8 9.93/10.04	0.6671	0.7818	0.5827	0.7319	0.6333	0.6172	256	$C_{30}H_{44}O_7$ (516.3087)	516.3088; 515.3015; 561.3073; 1031.6099	515→497	Ganoderinska acid A

Nastavak tabele 17											
9	0.5229	0.3572	0.4136	0.3904	0.3216	0.2902	254	$C_{27}H_{38}O_6$ (458.2668)	458.2669; 457.2595; 503.2652; 915.5264	457→439 457→287	Lucideninska kiselina A
10	0.1715	0.1119	0.1822	0.1240	0.0980	0.0728	254	$C_{30}H_{42}O_8$ (530.2879)	530.2877; 529.2804; 575.2854; 1059.5595	529→511 511→467	12-Hidroksi- ganoderinska kiselina D
11	/	0.3003	/	0.2885	0.2274	0.2447	254	$C_{30}H_{42}O_7$ (514.2930)	514.2930; 513.2854; 559.2932; 1027.5754	513→495 495→451	Ganoderinska kiselina D
12	0.5107	0.2454	0.4584	0.3952	0.2846	0.2496	254	$C_{29}H_{38}O_8$ (514.2566)	514.2627; 513.2554	513→471	Lucideniska kiselina D2
13	0.0485	0.0690	0.3908	0.1054	0.0540	0.0743	254	$C_{30}H_{40}O_7$ (512.2774)	512.2773; 511.2697; 557.2763; 1023.5455	511→493 493→449	Ganoderenska kiselina D
14	0.2309	0.3271	0.1891	0.2789	0.2838	0.2707	254	$C_{32}H_{42}O_9$ (570.2829)	570.2829; 569.2757; 1139.5577	569→551 551→509	Ganoderinska kiselina F
15	0.0517	0.0621	0.0258	0.0678	0.0520	0.0615	254	$C_{30}H_{42}O_7$ (514.2930)	514.2930; 513.2854; 559.2932; 1027.5754	513→451 513→437	Ganoderinska kiselina J

### 5.3.6. ANALIZA BOJE EKSTRAKATA GLJIVE *Ganoderma lucidum*

Boja ekstrakta gljive predstavlja važnu komponentu, jer dodavanjem u bezbojne alkoholne medijume unosimo komponente rastvorne u alkoholno vodenoj smeši i menjamo njihovu boju. Dobijena boja alkoholnih pića određuju vizuelnu dopadljivost proizvoda konzumentima i potrošačima. Uparavanjem ekstrakata gljive smanjujemo sadržaj etanola i koncentrišemo ekstrahovane materije.



**Slika 12.** Rezultati CIElab analize boje uzoraka ekstrakata gljive

Uzorci: 1- E1- 40g/L seckana *Ganoderma* ekstrahovana 15 dana; 2- E2- 40g/L mlevena *Ganoderma* ekstrahovana 15 dana; 3- E3- 40g/L seckana *Ganoderma* ekstrahovana 30 dana; 4- E4- 40g/L mlevena *Ganoderma* ekstrahovana 30 dana; 5- E5 - 40g/L seckana *Ganoderma* ekstrahovana 24h na 40°C; 6- E6- 40g/L mlevena *Ganoderma* ekstrahovana 24h na 40°C.

Može se zaključiti da se bez obzira na veličinu ekstrahovane gljive u istom vremenskom intervalu vrši se transfer komponenti koje imaju isti uticaj na analizirane parametre. Izuzetak se javlja kada vreme ekstrakcije iznosi 24 h, kod kojih je efikasnija



ekstrakcija komponenti kod uzoraka mlevene gljive, jer zbog manjih dimenzija čestica efektivniji je transfer komponenti koje utiču na analizirane parametre.

Rezultati CIElab metode (slika 12) boje ekstrakata pokazuju da se  $L^*$  vrednost, koja definiše svetlinu proizvoda, smanjuje sa povećanjem ekstrahovanih komponenti iz gljive. Kod uzoraka ekstrakata seckane i mlevene gljive vreme ekstrakcije nije imalo efekta na svetlinu uzoraka ekstrakata. Razlika u svetlini proizvoda se javlja kod uzorka koji su ekstrahovani tokom 24 h, kod kojih je uzorak napravljen od seckane gljive značajnije svetliji. Analizom sadržaja uzorka E6 utvrđeno je da ima najveći sadržaj ukupnih polifenola, a najmanji ukupnih glukana. Sa povećanjem sadržaja ukupnih polifenola proporcionalno se smanjuje svetlina uzorka. Svi uzorci imaju određeni udeo crvene boje i rangirani su prema povećanju te vrednosti  $E5 < E3 = E4 < E1 < E2 < E6$ . Na osnovu analizirane vrednosti za parametar  $b^*$ , svi analizirani uzorci ekstrakata imaju određeni udeo žute boje, koji se kod uzoraka sa istim vremenom ekstrakcije neznatno menja. Može se zaključiti da veličina čestica nema uticaj na vrednost parametra  $b^*$ , samo utiče faktor vreme ekstrakcije.

## 5.4. PIĆA OBOGAĆENA GLJIVOM *Ganoderma lucidum*

### 5.4.1. SADŽAJ UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET SPECIJALNIH RAKIJA

U istraživanjima ispitivana je mogućnost proizvodnje specijalnih rakija sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* i efekat faktora: vremena ekstrakcije (7, 21 i 60 dana), vrste alkoholnog medijuma (šljivove prepečenice, lozove prepečenice, žitnog alkohola i vinskog destilata) i koncentracije gljive (1, 2.5% i 4%).

Za proizvodnju specijalnih rakija korišćena je seckana *Ganoderma lucidum*. Senzornom analizom uzoraka mlevene i seckana gljive utvrđeno je da uzorci kojima je dodavana mlevena gljiva imaju neprijatnu naknadnu gorčinu, smatra se da zbog sitnijih čestica ekstrakcija gorkih materija intezivnija. Sa povećanjem vremena ekstrakcije kod uzoraka ekstrakata napravljenih od seckane gljive sadržaj intezivno gorkih triterpenskkih kiselina se smanjivao. Uzorci ekstrakata napravljeni korišćenjem seckane gljive sadržali su veću količinu ekstrahovanih triterpenskkih kiselina.

Jaka alkoholna pića proizvedena destilacijom predstavljaju proizvode koji ne sadrže polifenolne materije, jer sam način proizvodnje utiče na sastav destilata u koje se prevode samo lako isparljiva jedinjenja. Sadržaj biloški aktivnih materija u jakim alkoholnim pićama može se povećati starenjem alkoholnih pića u drvenim buradima ili dodatkom biljnih ekstrakata.

Ispitivan je uticaj koncentracije dodate gljive i vremena ekstrakcija na sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet (DPPH, FRAP i TEAC metodama) specijalnih šljivovih rakija sa dodatkom *G.lucidum* (Tabela 18). Rezultatima dvofaktorijalnog ogleada izvršena je analiza varijanse (ANOVA), a Tuckey's test je korišćen za određivanje razlike između sredina. Na osnovu rezultata sadržaja ukupnih fenola analiziranih uzoraka utvrđeno je da faktori (vreme ekstrakcije i koncentracija gljive), kao i njihova međusobna interakcija imaju značajan efekat.

Analizom šljivove prepečenice korišćene kao alkoholna baza za proizvodnju specijalnih rakija utvrđeno je da sadržaj polifenola iznosio 3.02 mg/L GAE. Dodatkom gljive dolazi do statistički značajnog povećanja sadržaja polifenola u svim uzorcima specijalnih rakija, i kreće se u rasponu od 41.8 do 133.17 mg/L GAE. Antioksidativni kapacitet uzorka šljivove prepečenice korišćene za proizvodnju specijalnih rakija iznosio je 0.05 FRAP jedinica i 0.02 mmol TE za DPPH.

Kod specijalnih rakija napravljenih od šljivove prepečenice, vreme ekstrakcije kod uzoraka napravljenih sa 1% gljive nema statistički značajan efekat na sadržaj polifenola, tako da je ekstrakcija polifenolih materija završena nakon 7 dana. Rezultati antioksidativnosti (AO) određeni DPPH, FRAP i TEAC metodom, pokazuju da tokom vremena dolazi do povećanja antioksidativnosti, koja statistički nije značajna između uzoraka Š1 i Š2, Š2 i Š3. Ekstrakcija komponenti iz gljive koji utiču na AO je završena nakon 21 dana, jer nakon ovog perioda ne dolazi do statistički značajnog povećanja antioksidativnosti kod datih uzoraka.

Kod uzoraka sa 2.5% dodate gljive dolazi do statistički značajnog povećanja sadržaja polifenola kod uzoraka ekstrahovanih tokom 21 dana u odnosu na uzorke ekstrahovane 7 dana. Nakon perioda ekstrakcije od 21 dana kod uzoraka sa 60 dana se statistički značajno ne povećava sadržaj polifenola. Antioksidativnost uzorka određena FRAP analizom se statistički značajno povećava tokom vremena. Na osnovu rezultata DPPH i TEAC metoda, jedinjenja gljive ekstrahovana nakon 21 dana ne utiču na antioksidativnost analiziranih uzoraka.

Kod uzoraka napravljenih sa 4% gljive sadržaj ukupnih fenola se statistički značajno menja sa povećanjem vremena ekstrakcije. Sadržaj polifenola se smanjuje nakon ekstrakcije od 7 dana, a povećava produženjem vremena ekstrakcije sa 21 na 60 dana. Pretpostavlja se da nakon 7 dana dolazi do dekompozicije ili reakcije fenola sa drugim jedinjenjima, tako da se njihov sadržaj statistički značajno smanjuje sa prolongiranjem ekstrakcije na 21 dana. Uzorak sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovan 60 dana ima statistički značajno veći sadržaj polifenola u odnosu na uzorak ekstrahovan tokom 21 dana. Sa produženjem vremena ekstrakcije dolazi do razgradnje veza polifenola sa drugim materijama i njihove naknadne ekstrakcije. Rezultati antioksidativnosti pokazuju isti trend

ponašanja, tako da je najveća AO uzoraka ekstrahovanih tokom 60 dana. Ekstrakcija polifenola i komponenti koje utiču na antioksidativnost se nastavlja i nakon 21 dana.

Može se zaključiti da dodatkom *G.lucidum* statistički se značajno povećava sadržaj polifenola i AO u svim uzorcima specijalnih šljivovih prepečenica. Sa povećanjem koncentracije dodate gljive povećava se i sadržaj polifenola, ali sa povećanjem dodate količine gljive potreban je duži period za kompletniju ekstrakciju analiziranih komponenti.

**Tabela 18.** Sadržaj polifenola i antioksidativnost uzoraka specijalnih šljivovih prepečenica sa dodatkom *G.lucidum*

Uzorci	Rezultati			
	TPC (mg/L GAE) <sup>a</sup>	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	TEAC (mM TE) <sup>b</sup>
Š1	41.80±0.40 <sup>a</sup>	0.152±0.030 <sup>a</sup>	0.404±0.011 <sup>a</sup>	2.153±0.025 <sup>a</sup>
Š2	42.83±2.53 <sup>ab</sup>	0.169±0.004 <sup>ab</sup>	0.401±0.016 <sup>ab</sup>	2.320±0.036 <sup>ab</sup>
Š3	44.85±0.55 <sup>ab</sup>	0.177±0.025 <sup>ab</sup>	0.432±0.014 <sup>ab</sup>	2.670±0.141 <sup>ab</sup>
Š4	82.70±1.20	0.320±0.003	0.885±0.013 <sup>c</sup>	2.950±0.050 <sup>c</sup>
Š5	89.60±4.93 <sup>c</sup>	0.337±0.007	0.985±0.020 <sup>cd</sup>	3.053±0.132 <sup>c</sup>
Š6	90.57±2.83 <sup>c</sup>	0.380±0.006	1.059±0.017 <sup>d</sup>	3.387±0.101
Š7	124.33±1.62	0.520±0.003	1.378±0.029	3.847±0.050
Š8	109.45±0.75	0.442±0.017	1.185±0.016	3.527±0.101
Š9	133.17±2.20	0.586±0.050	1.602±0.025	3.957±0.076

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajno prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ ; Š – šljivova prepečenica.

<sup>a</sup> Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup> Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Troloxa.

Za proizvodnju specijalnih rakija korišćena je i lozova prepečenica kao alkoholni medijum. Rezultati antioksidativnog kapaciteta uzoraka specijalnih rakija sa *G. lucidum* za čiju proizvodnju je korišćena lozova prepečenica prikazani se u tabeli 19.

Kod uzorka kod kojih je dodato 1% gljive uticaj vremena ekstrakcije je izraženiji u odnosu na uzorke za čiju osnovu je korišćena šljivova prepečenica. Uzorak L1 nakon 7 dana etrahovao je 34.3 mg/l GAE, a sa povećanjem vremena ekstrakcije na 21 dan sadržaj ukupnih fenola kod uzorka L2 (27.6 mg/l GAE) statistički značajno se smanjuje, usled dekompozicije fenola, dok kod uzorka L3 ekstrahovanog tokom 60 dana dolazi do

povećanja sadržaja ukupnih polifenola. Možemo zaključiti da i nakon 60 dana ekstrakcija fenola se još uvek odvija.

Kod uzoraka lozovih specijalnih rakija napravljenih sa 1% gljive AO određena DPPH i TEAC metoda se vremenom statistički značajno smanjuje. Ekstrakcija komponenti koje utiču na AO se završava nakon 7 dana, a vremenom dolazi do statistički značajnog smanjenja AO. Karakteristično je da  $L1 > L3 > L2$ , pa možemo zaključiti da se i nakon 21 dana ekstrahuju polifenolne komponente. AO uzoraka određenih FRAP metodom imaju isti trend, dolazi do statistički neznačajnog pada antioksidativnosti nakon 21 dana i do statistički značajnog povećanja nakon 60 dana, što je u korelaciji sa rezultatima sadržaja ukupnih polifenola. Fenolne komponente ekstrahovane nakon 21 dana kod uzorka L3 imaju veći uticaj na antioksidativni kapacitet određen FRAP metodom u odnosu na DPPH i TEAC metodu.

Kod uzoraka specijalnih lozovih prepečenica kojima je dodavano 2.5 % gljive vrednosti sadržaja ukupnih polifenola možemo rangirati  $L6 > L4 > L5$ . Kao i kod uzoraka sa 1% gljive nakon 7 dana dolazi do porasta sadržaja ukupnih polifenola, a zatim do pada sadržaja ukupnih polifenola uzoraka kod kojih je vreme ekstrakcije 21 dan. Sadržaj ukupnih polifenola se statistički značajno povećava nakon 60 dana, ekstrakcija fenolnih materija još uvek traje. Rezultate antioksidativnosti analiziranih uzoraka specijalnih lozovih prepečenica se rangiraju kao rezultati sadržaja ukupnih polifenola  $L6 > L4 < L5$ , ekstrakcija komponenti koja utiču na AO kapacitet se nastavlja i nakon 60 dana.

Sa povećanjem koncentracije gljive u uzorcima vreme ekstrakcije ima statistički značajniji efekat na sadržaj ekstrahovanih fenola. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da uzorcima sa 4% gljive sadržaj ukupnih polifenola i nakon 60 dana se povećava, tako da ekstrakcija ukupnih polifenola se nastavlja i nakon 60 dana. U odnosu na druge alkoholne medijume sadržaj ukupnih polifenola kod uzoraka lozove prepečenice kod kojih je vršena ekstrakcija tokom 60 dana u odnosu na uzorke napravljene od šljivove prepečenice, vinskog destilata i žitnog alkohola je statistički značajno veći i iznosi 100.27 (L6) i 141.17 mg/L GAE (L9), respektivno.

Antioksidativni kapacitet uzoraka specijalnih lozovih rakija sa istom koncentracijom gljive se statistički značajno smanjuje sa povećanjem vremena ekstrakcije

sa 7 na 21 dan. Najveću antioksidativnost ima uzorak L9 sa 4% gljive ekstrahovane tokom 60 dana. Rezultati AO dobijeni analizom obe metode su u saglasnosti i možemo reći da ekstrakcija jedinjenja koji utiču na AO još uvek traje nakon 60 dana.

**Tabela 19.** Sadržaj polifenola i antioksidativnost uzoraka specijalnih lozovih prepečenica sa dodatkom *G.lucidum*

Uzorci	Rezultati			
	TPC (mg/L GAE) <sup>a</sup>	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	TEAC (mM TE) <sup>b</sup>
L1	34.30±2.15	0.163±0.008 <sup>a</sup>	0.253±0.004 <sup>a</sup>	2.497±0.045
L2	27.60±1.80	0.102±0.009	0.212±0.009 <sup>a</sup>	1.977±0.025 <sup>a</sup>
L3	43.83±0.80	0.147±0.008 <sup>a</sup>	0.401±0.016	2.067±0.076 <sup>a</sup>
L4	80.27±1.79	0.281±0.005	0.830±0.008	2.920±0.026 <sup>b</sup>
L5	59.40±1.42	0.225±0.008	0.675±0.010	2.777±0.075 <sup>c</sup>
L6	100.27±1.46 <sup>a</sup>	0.349±0.006 <sup>b</sup>	1.138±0.025 <sup>b</sup>	3.180±0.075 <sup>d</sup>
L7	115.27±1.67	0.357±0.010 <sup>b</sup>	1.342±0.030	3.250±0.050 <sup>d</sup>
L8	98.80±0.36 <sup>a</sup>	0.312±0.009	1.110±0.006 <sup>b</sup>	2.910±0.010 <sup>bc</sup>
L9	141.17±1.66	0.492±0.002	1.580±0.024	3.687±0.032

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajni prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ ; L- lozova prepečenica.

<sup>a</sup>Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup>Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Trolox

Kod uzoraka specijalnih rakija napravljenih od žitnog alkohola (45 % etanola) u koje je dodavana gljiva *Ganoderma lucidum* statistički značajan uticaj imaju oba faktora na sadržaj ukupnih polifenola, ali ne i njihov međusobni uticaj (koncentracija\*vreme). Rezultati analiza su predstavljeni u tabeli 20. Povećavajući vreme ekstrakcije za iste koncentracije dodate gljive statistički značajno se povećava sadržaj ukupnih polifenola samo kod uzoraka sa koncentracijom od 1%, kod kojih ekstrakcija datih jedinjenja se nastavlja i nakon 60 dana. Uzorcima sa 2.5 i 4% nije se statistički značajno povećavala količina ukupnih polifenola sa različitim periodima ekstrakcije, pa je ekstrakcija završena nakon 7 dana. Kod uzoraka specijalnih rakija napravljenih od žitnog alkohola uticaj vremena ekstrakcije se smanjuje sa povećanjem koncentracije dodate gljive.

Na rezultate AO uzoraka žitnih rakija određenih DPPH i TEAC metodom statistički značajan uticaj imaju oba faktora, ali ne utiče njihova međusobna interakcija kao

i kod sadržaja ukupnih polifenola. Koncentracija gljive nije imala statistički značajan efekat na AO uzoraka određenih FRAP metodom, a vreme ekstrakcije i interakcija faktora imaju statistički značajan efekat. Kod uzoraka sa 1% i 4% ekstrakcija komponenti koje statistički značajno povećavaju AO završena je nakon 7 dana, a kod uzoraka napravljenih dodatkom 2.5% gljive nakon 21 dana.

**Tabela 20.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet izračunat pomoću FRAP i DPPH metode specijalnih rakija od žitnog alkohola sa gljivom *Ganodermom lucidum*

Uzorci	Rezultati			
	TPC (mg/L GAE) <sup>a</sup>	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	TEAC (mM TE) <sup>b</sup>
Ž1	35.13±0.42 <sup>a</sup>	0.148±0.008 <sup>a</sup>	0.338±0.012 <sup>a</sup>	2.060±0.053 <sup>a</sup>
Ž2	34.07±0.64 <sup>a</sup>	0.138±0.001 <sup>ab</sup>	0.330±0.005 <sup>ab</sup>	1.980±0.075 <sup>ab</sup>
Ž3	51.40±6.20	0.151±0.006 <sup>ab</sup>	0.405±0.034 <sup>ab</sup>	2.353±0.187 <sup>ab</sup>
Ž4	77.13±3.01 <sup>b</sup>	0.296±0.000 <sup>c</sup>	0.867±0.009 <sup>c</sup>	2.853±0.050 <sup>c</sup>
Ž5	84.60±8.23 <sup>b</sup>	0.311±0.004 <sup>cd</sup>	1.014±0.115 <sup>cd</sup>	2.880±0.026 <sup>cd</sup>
Ž6	88.07±7.64 <sup>b</sup>	0.321±0.012 <sup>cd</sup>	0.924±0.026 <sup>cdf</sup>	3.017±0.031 <sup>cd</sup>
Ž7	114.60±0.80 <sup>c</sup>	0.432±0.015 <sup>f</sup>	1.318±0.037	3.410±0.101 <sup>f</sup>
Ž8	110.90±1.90 <sup>c</sup>	0.417±0.013 <sup>fg</sup>	0.976±0.008 <sup>cdfg</sup>	3.240±0.010 <sup>cdf</sup>
Ž9	118.10±2.30 <sup>c</sup>	0.438±0.005 <sup>fg</sup>	1.043±0.031 <sup>dfg</sup>	3.477±0.071 <sup>f</sup>

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajni prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ . Ž- žitni alkohol.

<sup>a</sup> Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup> Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Trolox

Na sadržaj ukupnih polifenola i AO određenu pomoću DPPH, FRAP i TEAC metoda uzoraka vinskih destilata sa dodatkom gljivom statistički značajno utiču oba faktora koncentracija i vreme ekstrakcije, kao i njihova interakcija. Rezultati analiza su predstavljeni u tabeli 22.

Kod uzoraka napravljenih sa 1 % i 4 % dodate gljive ekstrakcija ukupnih fenola je završena nakon 7 dana, a kod uzoraka sa 2.5 % nakon 21 dana. Kod uzoraka koji su ekstrahovani tokom 7 i 21 dana sadržaj ukupnih polifenola se statistički značajno ne razlikuje izuzev kod uzoraka sa 2.5% gljive, kod koga je statistički najveći sadržaj nakon 21 dana. Kod proizvodnje ovih uzoraka ekstrakcija fenolnih materija kod svih dodatih koncentracija gljive se završava nakon 7 dana. Karakteristično je da sadržaj ukupnih

polifenola kod uzoraka sa 4 % gljive ekstrahovanih tokom 60 dana statistički neznačajno razlikuje od uzorka sa 2.5 % ekstrahovanih tokom 21 dana.

**Tabela 21.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet izračunat pomoću FRAP i DPPH metode specijalnih vinjaka sa *Ganoderma lucidum*

uzorci	Rezultati			
	TPC (mg/L GAE) <sup>a</sup>	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	TEAC (mM TE) <sup>b</sup>
V1	54.00±0.80 <sup>a</sup>	0.240±0.004 <sup>a</sup>	0.264±0.003 <sup>a</sup>	2.530±0.026 <sup>a</sup>
V2	53.87±1.50 <sup>ab</sup>	0.250±0.004 <sup>a</sup>	0.293±0.061 <sup>a</sup>	2.530±0.030 <sup>ab</sup>
V3	33.20±1.59	0.170±0.008	0.065±0.031	2.503±0.042 <sup>ab</sup>
V4	102.13±3.16 <sup>c</sup>	0.433±0.006 <sup>b</sup>	1.120±0.066	3.460±0.053 <sup>c</sup>
V5	117.93±11.84 <sup>cd</sup>	0.552±0.006 <sup>c</sup>	1.426±0.032	3.750±0.050
V6	70.47±3.45 <sup>ab</sup>	0.325±0.001	0.808±0.040 <sup>b</sup>	3.023±0.006 <sup>d</sup>
V7	148.20±8.30 <sup>e</sup>	0.641±0.008	1.852±0.009	3.963±0.055
V8	139.87±0.76 <sup>c</sup>	0.544±0.004 <sup>c</sup>	1.661±0.045	3.663±0.038 <sup>d</sup>
V9	101.27±3.90 <sup>cd</sup>	0.445±0.001 <sup>b</sup>	1.406±0.094 <sup>b</sup>	3.520±0.026 <sup>c</sup>

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajni prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ . V- dinski destilat.

<sup>a</sup>Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup>Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Troloxa.

Kod svih uzoraka specijalnih rakija i vinskih destilata sadržaj ukupnih fenola se proporcionalno povećavao sa povećanjem koncentracije dodate gljive. Vreme ekstrakcije za uzorke sa istom koncentracijom dodate gljive imalo je različit uticaj na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet u odnosu na korišćeni medijum. Optimalno vreme ekstrakcije se za iste koncentracije razlikovalo u odnosu na primenjeni medijum.

Analizom korelacije između rezultata analize sadržaja ukupnih fenola (TPC) i antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i TEAC metodama uzoraka specijalnih rakija i vinskih destilata (Tabela 22), utvrđena je visoka korelacija između ovih uzoraka ( $r_{\text{TPC-FRAP}}=0.9702$ ,  $r_{\text{TPC-DPPH}}=0.9618$ ,  $r_{\text{TPC-TEAC}}=0.9462$ ). Može se zaključiti da sadržaj ukupnih polifenola ima važan uticaj na antioksidativni kapacitet uzoraka.



**Tabela 22.** Korelacija između rezultata analiza TPC i AO uzoraka specijalnih rakija

Analize	FRAP		DPPH		TEAC	
	r	p	r	p	r	p
<b>TPC</b>	0.9702	0.000	0.9618	0.000	0.9462	0.000
<b>FRAP</b>			0.9422	0.000	0.9276	0.000
<b>TEAC</b>					0.9737	0.000

Gorjanović i saradnici (2010) analizirali su sadržaj ukupnih polifenola u uzorcima komercijalnih alkoholnih pića koja se mogu kupiti na tržištu. Sadržaj ukupnih polifenola u uzorku šljivovice „Mučenice 5“, koja je sazrevala u drvenom buretu 5 godina je bio 153.7 mg/L GAE, a sadržaj polifenola kod uzorka Mučenice koja je starila u inertnom sudu bio je 8.4 mg/L GAE. Na osnovu rezultata može se zaključiti da ne postoji značajna statistička razlike između sadržaja polifenola uzoraka L9 i V6 i uzorka Mučenice 5, dok su ostali uzorci imali manji sadržaj polifenola. Dodatkom gljive sadržaj ukupnih polifenola se značajno povećava u odnosu na sadržaj ukupnih polifenola Mučenice.

Pecić i saradnici (2012) analizirali su sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet šljivovih rakija koji su sazrevali u drvenim buradima (11-56 godina). Utvrđeno je da je sadržaj ukupnih polifenola ima vrednosti od 230.26 do 890.26 mg/L GAE kod uzoraka šljivovih prepečenica, a 110.38 mg/L GAE kod uzorka meke šljivove rakije. Uzorci specijalnih rakija imaju manji sadržaj ukupnih fenola u odnosu na uzorke šljivovih prepečenica koji su sazrevali u drvenim sudovima. Vreme ekstrakcije uzoraka specijalnih rakija je znatno kraće i ekonomičnije, jer tokom vremena sazrevanja u drvenim buradima dolazi do smanjenja sadržaja alkohola, etanala i drugih sastojaka kratkog lanca, koji prolaze kroz duge i isparavaju (Nikićević i Tešević, 2008).

#### 5.4.2. ANALIZA BOJE UZORAKA SPECIJANIH RAKIJA

Nakon destilacije dobijeni proizvod je bezbojan i neharmoničnog ukusa i oštrog mirisa, da bi dobio karakteristične osobine za dato alkoholno piće skladišti se u inertne sudove u kojima se odigrava proces starenja ili u drvene sudove u kojima se odigrava proces sazrevanja. U procesu starenja u inertnim sudovima dolazi do hemijskih reakcija u kojima se obrazuju nove komponente, koji su nosioci mirisa i ukusa. Sazrevanjem u drvenim buradima, destilat ekstrahuje ekstrabilne komponente drveta pri čemu se menja aroma i boja od žute do braon boje. Boja jakih alkoholnih pića je intezivnija što je period sazrevanja duži.

Etanolnom ekstrakcijom komponenata gljive *Ganoderma lucidum* dolazi do promene boje bezbojnih alkoholnih medijuma lozove prepečenice, šljivove prepečenice, žitnog alkohola i vinskog destilata. Ispitivan je uticaj vremena ekstrakcije, koncentracije dodate gljive i upotrebljenog alkoholnog medijuma na intenzitet boje pomoću metoda: AOAC metode za određivanje boje destilisanih pića i CIElab metoda.

Rezultatima intenziteta boje određenih AOAC metodom trofaktorijalnog ogleda izvršena je analiza varijanse (ANOVA) i korišćen je Tuckey's test za određivanje razlike između sredina (Tabela 23). Na sadržaj ukupnih polifenola rakija utiču sva tri faktora, kao i njihovo međusobno dejstvo (AM\*VE; AM\*KG; VE\*KG; VE\*AM\*KG)

Sa povećanjem koncentracije dodate gljive u uzorcima povećava se i intenzitet boje kod svih alkoholnih medijuma. Kod uzoraka koji su dobijeni dodavanjem 1% gljive, vreme ekstrakcije ima neznačajan uticaj na intenzitet boje uzoraka. Intenzitet boje uzoraka napravljenih dodavanjem 1% gljive u alkoholne medijume šljivovu i lozovu prepečenicu statistički se ne razlikuje sa promenom vremena ekstrakcije. Izuzetak su uzorci za čiju proizvodnju se koristi vinski destilat, koji u odnosu na druge alkoholne medijume sa istim sadržajem gljive imaju statistički značajno veći intenzitet boje. Uzorci od vinskog destilata specifični su i po tome što nakon 21 dana ekstrakcije dolazi do statistički značajnog pada intenziteta boje. Boja uzoraka napravljenih od žitnog alkohola kod koga je 1% gljive

ekstrahovan tokom 60 dana se statistički značajno razlikuje od uzoraka napravljenih sa 1% gljive za čiju proizvodnju su korišćeni drugi alkoholni medijumi.

Vreme ekstrakcije uzoraka napravljenih dodavanjem 2.5% gljive ima značajniji uticaj na intenzitet boje ukoliko je za proizvodnju je korišćena lozova prepečenica i vinski destilat kao alkoholni medijum. Kod uzorka žitnog alkohola i šljivove prepečenice kod kojih je gljiva ekstrahovana 21 dana dolazi do statistički neznačajnog pada intenziteta boje u odnosu na uzorke kod kojih je ekstrakcija vršena 7 dana, a zatim do statistički neznačajnog povećanja nakon 60 dana. Kod uzoraka lozove prepečenice postoji isti trend da nakon 21 dana dolazi do statistički značajnog smanjenja intenziteta boje, i zatim do rasta nakon 60 dana ekstrakcije. Kod uzoraka vinskog destilata intenzitet boje u odnosu na druge alkoholne medijume je znatno intezivniji za iste dodate koncentracije gljive. Ekstrakcija jedinjenja koja utiču na boju završena je nakon 21 dana kod uzoraka žitnog alkohola, vinskog detilata i šljivove prpečenice, dok kod lozove prepečenice se nastavlja i nakon 60 dana.

**Tabela 23.** Analiza boje AOAC metodom uzoraka specijalnih rakija sa dodatom *Ganodermom lucidum*

Uzorci		CIU			
Ekstrakciono vreme (dani)	koncentracija G.L. (%)	Alkoholne baze			
		Šljivova prepečenica	Lozova prepečenica	Žitni alkohol	Vinski destilat
7	1	4.24±0.05 <sup>a</sup>	4.43±0.00 <sup>b</sup>	4.93±0.02	6.35±0.01
21	1	4.42±0.05 <sup>b</sup>	4.32±0.17 <sup>a</sup>	4.84±0.00 <sup>k</sup>	6.50±0.00 <sup>j</sup>
60	1	4.28±0.01 <sup>ac</sup>	5.17±0.04 <sup>c</sup>	8.99±0.00 <sup>fnk</sup>	3.67±0.01
7	2.5	8.26±0.17 <sup>d</sup>	9.09±0.01 <sup>fn</sup>	8.99±0.01 <sup>a<sup>fn</sup></sup>	14.10±0.01 <sup>l</sup>
21	2.5	9.04±0.11 <sup>f</sup>	7.25±0.01	9.32±0.00	16.52±0.00
60	2.5	8.20±0.03 <sup>d</sup>	12.34±0.05 <sup>g</sup>	8.48±0.00	9.78±0.01
7	4	15.18±0.00	13.14±0.01 <sup>j</sup>	14.18±0.00 <sup>l</sup>	17.76±0.01
21	4	12.41±0.02 <sup>g</sup>	11.74±0.01	13.11±0.00	17.14±0.01
60	4	12.93±0.03	17.35±0.00	12.62±0.00	11.10±0.01

Različitim slovima u označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajnio prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ .

Kod uzoraka sa 4% dodate gljive intenzitet boje je znatno intenzivniji u odnosu na uzorke sa dodatih 2.5% gljive. Kod uzoraka žitnog alkohola, šljivove prepečenice i vinskog destilata intenzitet boje se sa vremenom statistički značajno smanjuje. Uzorcima lozove prepečenice napravljenih sa 4% dodate gljive intenzitet boje se nakon 21 dana statistički značajno smanjuje, a usled razgradnje ekstrahovanih jedinjenja. Kod uzoraka sa vremenom ekstrakcije od 60 dana intenzitet se statistički značajno povećava, usled potpunijeg ekstrahovanja jedinjenja koje povećavaju intenzitet boje.

Ispitivanjem međusobne povezanosti između rezultata intenziteta boje, sadržaja ukupnih fenola i antioksidativnosti uzoraka specijalnih rakija i vinskih destilata utvrđen je visok stepen korelacije (Tabela 24). Visok stepen korelacije ( $r^2=0.9618$ ) između sadržaja ukupnih polifenola i intenziteta boje nam ukazuje da fenolne materije su važna jedinjenja koja utiču na intenzitet boje i da sa povećanjem sadržaja ukupnih fenola povećava se intenzitet boje uzoraka.

**Tabela 24.** Korelacija između rezultata sadržaja ukupnih polifenolnih materija, rezultata antioksidativnog kapaciteta (FRAP i DPPH metodom) i boje uzoraka specijalnih rakija

Analize	FRAP		DPPH		Boja	
	R	p	r	p	r	P
TPC	0.9702	0.000	0.9618	0.000	0.9618	0.000
FRAP		0.000	0.9422	0.000	0.9291	0.000
Boja					0.9231	0.000

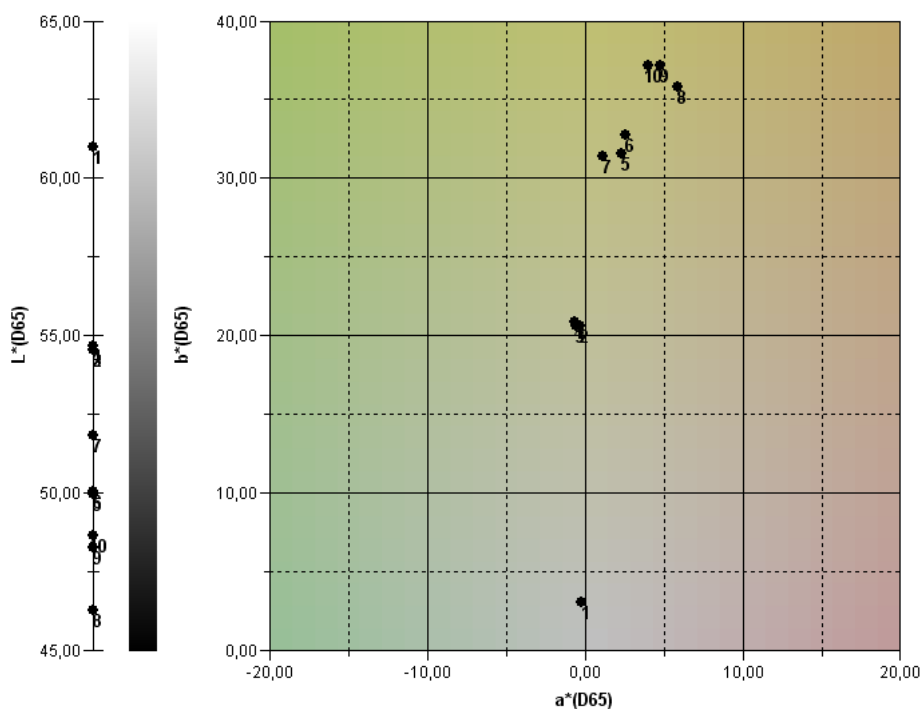
Upoređivanjem intenziteta boje uzoraka šljivovih rakija, koje su sazrevale u drvenim buradima (11-56 godina) sa uzorcima specijalnih šljivovih rakija sa 40 g/L *G.lucidum* može se zaključiti da se dodatkom gljive postiže intenzitet boje koji se statistički značajno ne razlikuje od intenziteta boje uzoraka šljivovih rakija koje su sazrevale tokom 21 i 33 godina u hrastovom buretu (kitnjak *Quercus petrea*) i tokom 18 godina u dudovom buretu (*Mulberry*) (Pecić i saradnici, 2012).

Rezultati boje šljivovih prepečenica sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* analiziranih CIElab metodom prikazani su slici 13. CIElab metodom smo određivali uticaj dodate gljive na parameter  $L^*$ , koji predstavlja svetlinu uzorka i može imati vrednosti od 0 (uzorak crne boje) do 100 (uzorak bele boje). Dodatkom gljive u alkoholne medijume dolazi do statistički važnog smanjenja svetline uzoraka. Analizom rezultata trofaktorijalnog ogleda utvrđeno je da na svetlinu uzoraka statistički važan uticaj imaju sva tri faktora, kao i njihove međusobne interakcije.

Dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* u šljivovu prepečenicu dolazi do ekstrakcije jedinjenja koja statistički značajno smanjuju svetlinu uzoraka. Svetlina uzorka se smanjuje sa povećanjem dodate količine gljive, ali ekstrakcija jedinjenja koja utiču na smanjenje vrednosti parametra  $L^*$  se kod svih koncentracija završava nakon 21 dana.

Analizom parametra  $a^*$  utvrđivana je zastupljenost zelene i crvene boje kod datih uzoraka. Ukoliko parametar ima negativnu vrednost označava zelenu nijansu, a pozitivna označava crvenu nijansu. Kod uzoraka šljivovih prepečenica sa dodatkom 10 g/L gljive intenzitet zelene boje se statistički neznačajno menja, vreme ekstrakcije kod dodate gljive nema značajan uticaj na parametar. Sa povećanjem dodate gljive uticaj crvene boje se povećava, ali najveći udeo crvene boje imaju uzorci sa 1 i 4 % gljive koji su ekstrahovani tokom 21 dan.

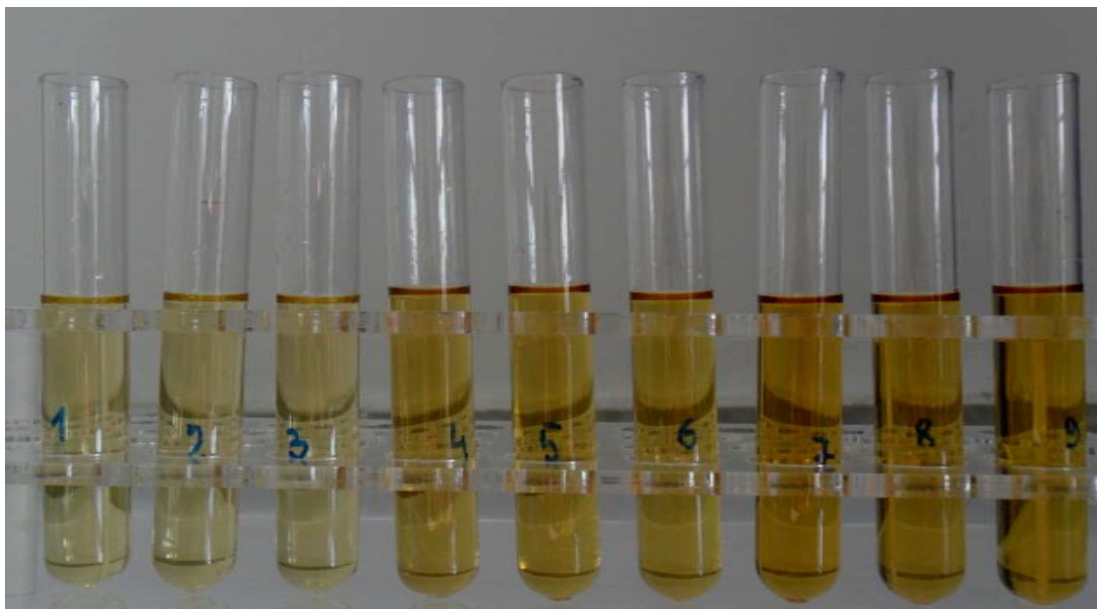
Analizom parametra  $b^*$  utvrđivan je uticaj dodate gljive na intenzitet plave ili žute boje uzoraka. Šljivova prepečenica kao polazni medijum ima pozitivnu vrednost, što označava da ima samo uticaj žute boje. Dodatkom gljive uticaj žute boje se statistički značajno povećava sa povećanjem koncentracije gljive. Sa povećanjem koncentracije dodate gljive povećava se i uticaj vremena ekstrakcije kod ispitivanih uzoraka.



**Slika 13.** Analiza boje šljivovih prepečenica sa dodatkom *G. lucidum* pomoću CIElab metode

Uzorci: 1- šljivova prepečenica; 2 - šljivova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (Š1); 3- šljivova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (Š2); 4 - šljivova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (Š3); 5 - šljivova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (Š4); 6 - šljivova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (Š5); 7 - šljivova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (Š6); 8 - šljivova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (Š7); 9 - šljivova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (Š8); 10 - šljivova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (Š9).

Uzorci specijalnih rakija sa dodatkom gljive *G. lucidum* prikazani su fotografiji 5.

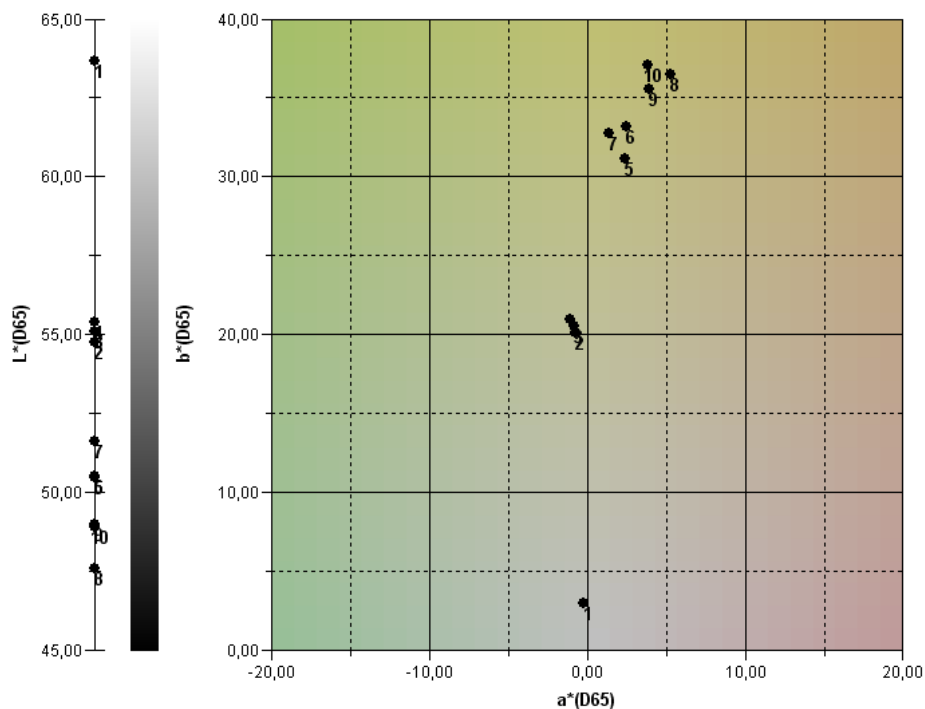


Fotografija 5. Šljivove prepečenice sa *Ganodermom lucidum*  
Uzorci: 1-Š1; 2-Š2; 3-Š3; 4-Š4; 5-Š5; 6-Š6; 7-Š7; 8-Š8; 9-Š9.

Rezultati boje lozovih prepečenica sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* analiziranih CIElab metodom prikazani su slici 14. Dodatkom gljive lozovim prepečenicama intenzitet svetlosti ovog alkoholnog medijuma se smanjuje. Kod uzorka sa 1% gljive vreme ekstrakcije ima statistički neznačajan efekat na intenzitet svetlosti. Kod uzoraka sa 2.5% i 4% dodate gljive ekstrakcija komponentni koje dovode do smanjenja svetlosti se završava nakon 21 dana.

Lozova prepečenica i uzorci napravljeni dodatkom 1 % gljive imaju mali intenzitet zelene boje. Dodatkom 2.5 i 4 % gljive vrednost parametra  $a^*$  se povećava, samim tim uticaj crvene boje kod uzoraka. Sa dodatkom većih količina gljive intenzitet crvene boje se povećava, ali povećanje nije proporcijalno dodatnoj količini.

Vrednost parametra  $b^*$  je pozitivna kod lozove prepečenice i svih uzoraka napravljenih sa dodatkom gljive. Na osnovu vrednosti parametra  $b^*$ , može se zaključiti da svi uzorci imaju uticaj žute boje, koji se povećava sa povećanjem dodate količine gljive. Koncentracija dodate gljive ima veći uticaj na promenu vrednosti parametra  $b^*$  u odnosu na  $a^*$  kod datih uzoraka, tako da povećanjem dodate količine gljive imamo veći uticaj na intenzitet žute boje, a manji na intenzitet crvene boje.



**Slika 14.** Analiza boje lozovih prepečenica sa dodatkom *G. lucidum* pomoću CIElab metode

Uzorci: 1- lozova prepečenica; 2 - lozova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**L1**); 3- lozova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**L2**); 4 - lozova prepečenica sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**L3**); 5 - lozova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**L4**); 6 - lozova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**L5**); 7 - lozova prepečenica sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**L6**); 8 - lozova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**L7**); 9 - lozova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**L8**); 10 - lozova prepečenica sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**L9**).





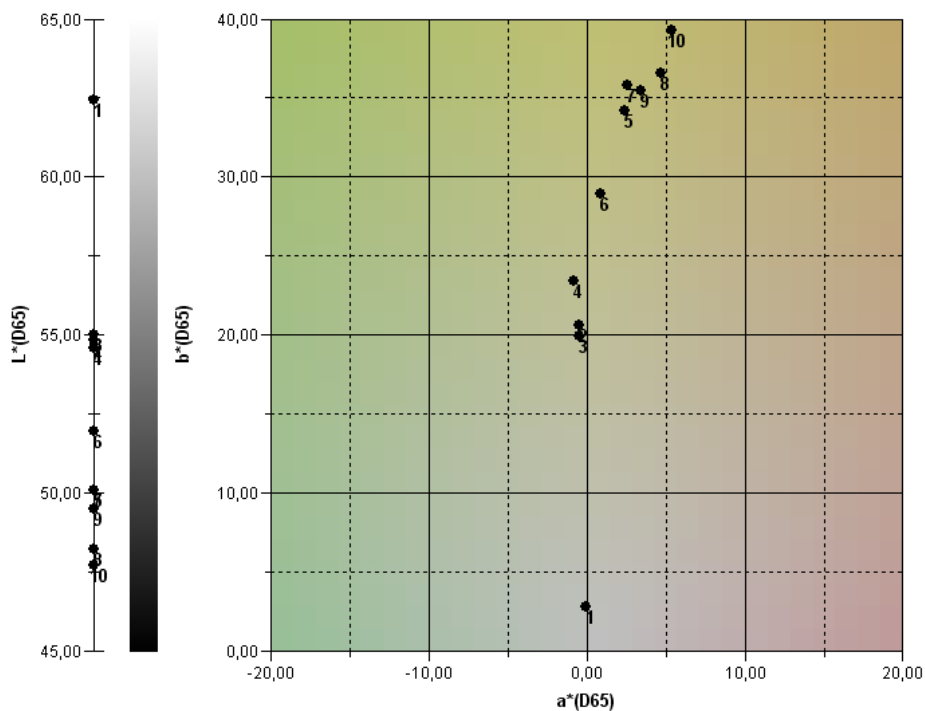
**Fotografija 6.** Lozove prepečenice sa *Ganodermom lucidum*

Uzorci: 10-L1; 11-L2; 12-L3; 13-L4; 14-L5; 15-L6; 16-L7; 17-L8; 18-L9

Ekstrakcijom jedinjenja gljive u žitnom alkoholu dolazi do smanjenja svetline uzoraka. Faktor vreme ekstakcije ima veći uticaj na intenzitet svetlosti uzoraka napravljenih od žitnog alkohola, nego kod šljivovih i lozovih prepečenica. Vreme ekstrakcije nema statistički značajan uticaj na intenzitet svetlosti uzoraka sa 1% dodate gljive. Ekstrakcija jedinjenja koja utiču na svetlost je završena nakon 7 dana kod uzoraka sa 2.5 i 4% *G.lucidum*.

Analizom parametra  $a^*$  žitnog alkohola određeno je da analizirani alkoholni medijum ima mali intenzitet zelene boje, koji se statistički neznajno povećava kod uzoraka sa 1% gljive. Uzorcima žitnog alkohola sa 2.5 i 4% gljive vrednost parametra  $a^*$  se povećava, samim tim intenzitet crvene boje se statistički značajno povećava.

Na osnovu analize parametra  $b^*$  žitnog alkohola i uzoraka žitnog alkohola sa *G.lucidum* utvđeno je da imaju mali intenzitet žute boje, koji se povećava sa količinom dodate gljive. Uzorcima žitnog alkohola sa 1% gljive sa povećanjem vremena ekstrakcije povećava se intenzitet žute boje, koji je najintezivniji nakon 60 dana ekstrakcije. Ekstrakcija jedinjenja koja povećavaju intenzitet žute boje kod uzoraka žitnih alkohola se kod svih dodatih koncentracija gljive nastavlja i nakon 60 dana.



**Slika 15.** Analiza boje uzoraka žitnog alkohola sa dodatkom *G. lucidum* pomoću CIElab metode

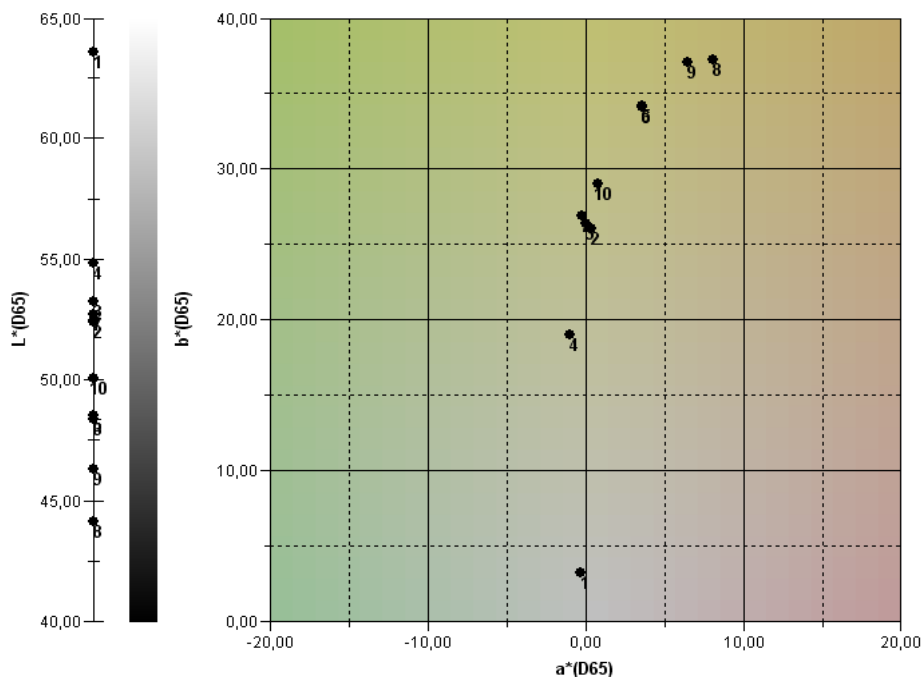
Uzorci: 1-žitni alkohol; 2 - žitni alkohol sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**Ž1**); 3- žitni alkohol sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**Ž2**); 4 - žitni alkohol sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**Ž3**); 5 - žitni alkohol sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**Ž4**); 6 - žitni alkohol sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**Ž5**); 7 - žitni alkohol sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**Ž6**); 8 - žitni alkohol sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (**Ž7**); 9 - žitni alkohol sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (**Ž8**); 10 - žitni alkohol sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (**Ž9**).



**Fotografija 7.** Uzorci žitnog alkohola sa *G.lucidum*

Uzorci: 19 – Ž1; 20 – Ž2; 21 – Ž3; 22 – Ž4; 23 – Ž5; 24 – Ž6; 25 – Ž7; 26 – Ž8; 27 – Ž9.

Kao alkoholni medijum je korišćen i vinski destilat, koji se tradicionalno koristi za proizvodnju vinjaka višegodišnjim odležanjem u hrastovim buradima. Sazvrevanjem u hrastovim buradima vinski destilat ekstrahuje jedinjenja koja smanjuju svetlinu uzoraka, sa povećanjem perioda odležavanja svetlina uzoraka se smanjuje, a kvalitet povećava. Dodatkom gljive *G.lucidum* vinskom destilatu ekstrahuju se jedinjenja, koja imaju isti efekat na svetlinu alkoholnog medijuma. Sa povećanjem koncentracije gljive u datim uzorcima vinskog destilata dolazi do statistički značajnog smanjenja svetline uzoraka. U uzorcima sa istim koncentracijama dodate gljive vreme ekstrakcije značajno utiče na svetlinu uzoraka. Na osnovu vrednosti  $L^*$  parametra, možemo zaključiti da sa povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do statistički značajnog smanjenja vrednosti  $L^*$  usled degradacije jedinjenja. Ekstrakcija komponenti gljive koje smanjuju svetlost uzoraka završena je nakon 7 dana kod uzoraka sa istim koncentracijama gljive.



**Slika 16.** Analiza boje uzoraka vinskog destilata sa dodatkom *G. lucidum* pomoću CIElab metode. Uzorci: 1 - vinski destilat; 2 - vinski destilat sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (V1); 3 - vinski destilat sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (V2); 4 - vinski destilat sa 10 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (V3); 5 - vinski destilat sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (V4); 6 - vinski destilat sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (V5); 7 - vinski destilat sa 25 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (V6); 8 - vinski destilat sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 7 dana (V7); 9 - vinski destilat sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 21dana (V8); 10 - vinski destilat sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana (V9).

Intenzitet zelene boje se dodatkom gljive kod uzoraka vinskog destilata smanjuje, a povećava se intenzitet crvene boje. Vrednost parametra  $a^*$  ima negativnu vrednost za uzorke V2, V3 i V6, možemo zaključiti da se intenzitet crvene boje smanjuje sa povećanjem vremena ekstrakcije kod uzoraka sa istom koncentracijom *G.lucidum*. Ekstrakcija jedinjenja koja utiču na intenzitet crvene boje kod uzoraka sa 1 %, 2.5 % i 4% gljive se završava nakon 7 dana.

Sa dodatkom gljive kod uzoraka vinskog destilata povećava se intenzitet žute boje, ali intenzitet žute boje se smanjuje sa povećanjem vremena ekstrakcije kod uzoraka sa istom koncentracijom gljive.



**Fotografija 8.** Uzorci vinskog destilata sa dodatkom *G.lucidum*

Uzorci: 28 – V1; 29 - V2; 30 – V3; 31 – V4; 32 – V5; 33 – V6; 34 – V7; 35 – V8; 36 – V9.

Na osnovu analiziranih rezultata može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije dodate gljive kod svih alkoholnih medijuma dolazi do smanjenja svetline uzoraka, a povećava se intenzitet crvene i žute boje. Vreme ekstrakcije ima različit efekat kod istih koncentracija u zavisnosti od korišćenog medijuma.

**Tabela 25.** CIELab chromatic parametri specijalnih rakija sa *Ganoderma lucidum*

Alkoholni Medijum	estrakciono vreme (dani)	konc. <i>G.L.</i> (%)	CIELab chromatic parametric				
			L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)
Š1	7	1	54.75±0.01	-0.75±0.02	20.06±0.02	20.07±0.01	92.13±0.04
Š2	21	1	55.09±0.01	-0.85±0.01	20.49±0.01	20.51±0.01	92.37±0.02
Š3	60	1	55.38±0.01	-1.10±0.03 <sup>a</sup>	20.91±0.02 <sup>a</sup>	20.94±0.02	93.03±0.08
Š4	7	2.5	50.46±0.01 <sup>a</sup>	2.37±0.04	31.10±0.02	31.19±0.01	85.64±0.08
Š5	21	2.5	50.49±0.01 <sup>a</sup>	2.48±0.03	33.13±0.01	33.22±0.01	85.73±0.06
Š6	60	2.5	51.58±0.01	1.34±0.02 <sup>b</sup>	32.70±0.02	32.73±0.01	87.64±0.03
Š7	7	4	47.56±0.00	5.20±0.02	36.44±0.01	36.80±0.02	81.88±0.03
Š8	21	4	48.97±0.01	3.92±0.04	35.56±0.03	35.77±0.03	83.71±0.06

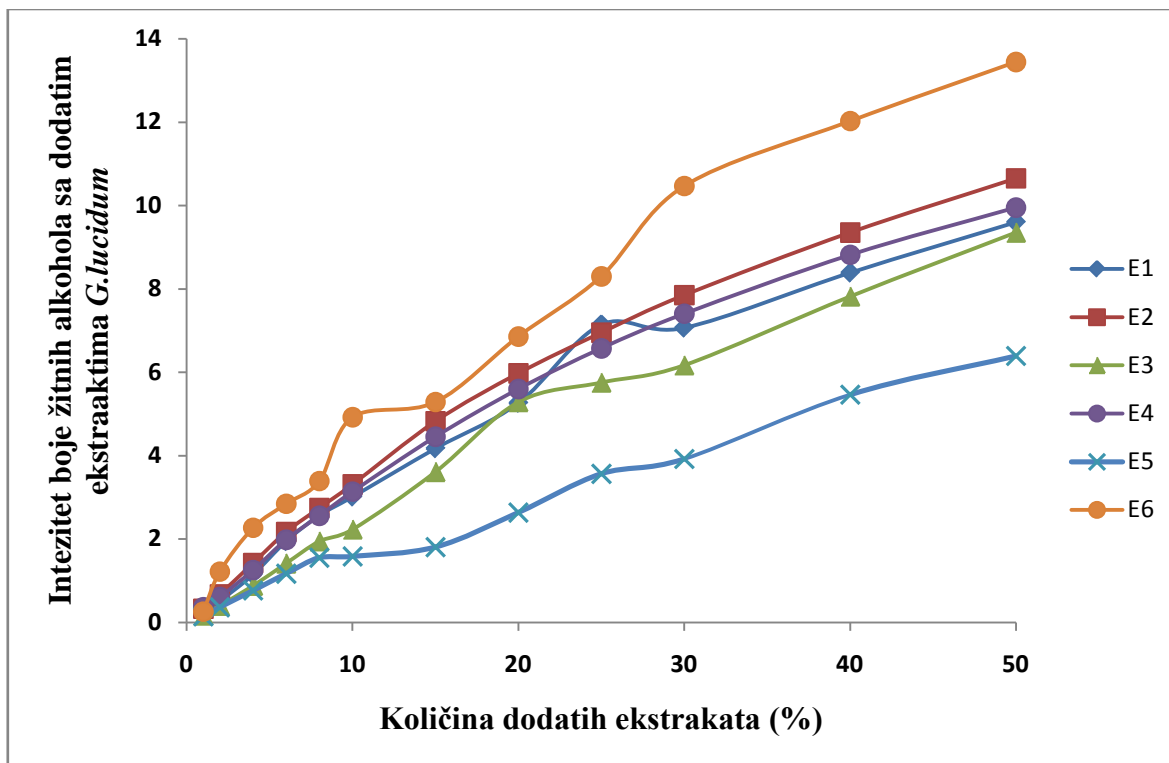
Nastavak tabele 25

Š9	60	4	48.91±0.01	3.81±0.03 <sup>c</sup>	37.04±0.02	37.23±0.02	84.13±0.04
L1	7	1	54.84±0.01 <sup>b</sup>	-0.55±0.00 <sup>d</sup>	20.59±0.02	20.60±0.02	91.54±0.02
L2	21	1	54.98±0.01	-0.54±0.02	19.90±0.02	19.91±0.01	91.56±0.06
L3	60	1	54.55±0.01 <sup>c</sup>	-0.78±0.02	23.41±0.01	23.43±0.01	91.91±0.08
L4	7	2.5	50.07±0.01 <sup>d</sup>	2.35±0.01 <sup>e</sup>	34.16±0.00	34.24±0.00	86.07±0.01
L5	21	2.5	51.93±0.01	0.86±0.01	28.90±0.02	28.91±0.02	88.29±0.02
L6	60	2.5	50.06±0.00 <sup>de</sup>	2.57±0.01 <sup>f</sup>	35.76±0.01	35.85±0.01	85.89±0.02
L7	7	4	48.22±0.01	4.67±0.03	36.52±0.02	36.82±0.02	82.72±0.05
L8	21	4	49.47±0.01	3.46±0.03	35.42±0.01	35.59±0.01	84.42±0.05
L9	60	4	47.72±0.01	5.39±0.04	39.18±0.04	39.55±0.03	82.16±0.07
Ž1	7	1	54.52±0.01 <sup>cf</sup>	-0.34±0.00 <sup>dg</sup>	20.59±0.01	20.59±0.00	90.94±0.01
Ž2	21	1	54.52±0.01 <sup>f</sup>	-0.56±0.02 <sup>dg</sup>	20.56±0.01	20.57±0.01	91.57±0.05
Ž3	60	1	54.67±0.01	-0.70±0.02	20.87±0.01 <sup>a</sup>	20.88±0.01	91.93±0.05
Ž4	7	2.5	49.94±0.02	2.31±0.04	31.54±0.02	31.63±0.02	85.81±0.07
Ž5	21	2.5	50.03±0.01	2.53±0.01	32.76±0.02	32.86±0.02	85.59±0.02
Ž6	60	2.5	51.80±0.01	1.12±0.03 <sup>a</sup>	31.35±0.01	31.37±0.01	87.96±0.05
Ž7	7	4	46.28±0.00	5.79±0.02	35.81±0.01	36.27±0.01	80.82±0.03
Ž8	21	4	48.27±0.01 <sup>eg</sup>	4.73±0.03 <sup>b</sup>	37.07±0.02	37.37±0.02	82.73±0.04
Ž9	60	4	48.64±0.01	4.05±0.03	37.13±0.01	37.35±0.01	83.78±0.04
V1	7	1	52.39±0.01	0.34±0.02 <sup>f</sup>	26.02±0.02	26.02±0.01	89.25±0.03
V2	21	1	53.25±0.00	-0.04±0.02 <sup>ch</sup>	26.39±0.01	26.39±0.01	90.09±0.04
V3	60	1	54.81±0.01 <sup>bg</sup>	-1.01±0.00 <sup>j</sup>	19.00±0.01	19.02±0.01	93.03±0.01
V4	7	2.5	48.51±0.00	3.51±0.03 <sup>e</sup>	34.19±0.02	34.37±0.02	84.14±0.06
V5	21	2.5	48.34±0.02	3.64±0.02	34.05±0.02	34.25±0.02	83.94±0.04
V6	60	2.5	52.70±0.01	-0.27±0.02	26.87±0.01	26.87±0.01	90.58±0.04
V7	7	4	44.11±0.01	8.07±0.02 <sup>j</sup>	37.14±0.02	38.01±0.02	77.74±0.03
V8	21	4	46.32±0.02	6.41±0.06 <sup>ch</sup>	37.06±0.05	37.61±0.04	80.19±0.01
V9	60	4	50.05±0.01 <sup>de</sup>	0.76±0.01	28.98±0.02	28.99±0.02	88.50±0.02

Različitim slovima u označeni su uzorci, koji se ne razlikuju statistički značajno prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ .

Da bi ubrzali i standardizovali proces sazrevanja i proizvodnje likera i travarica u industriji uobičajena je praksa da se koriste ekstrakti hrasta ili bilja. Cilj proizvodnje ekstrakta gljive *G.lucidum* je koncentrisanje bojenih i biološki aktivnih jedinjenja, tako da

se ekstrakt može dodati u malim količinama i ubrzati postupak proizvodnje. Maceracija gljive kod analiziranih uzoraka je trajala od 7 do 60 dana. U datom eksperimentu smo ispitivali uticaj dodatih ekstrakata gljive na intenzitet boje žitnih alkohola i upoređivali sa intenzitetom boje macerata date gljive. Ekstrakti su dodavani u različitim procentima od 2% do 50%.



**Figura 2.** Uticaj dodatih ekstrakata *G. lucidum* na intenzitet boje žitne rakije

Na osnovu datih rezultata može se zaključiti da u zavisnosti od načina proizvodnje ekstrakti imaju različit uticaj na intenzitet boje žitne rakije. Efikasnije dejstvo imaju ekstrakti napravljeni od mlevene gljive (E2, E4, E6). Na figuri 2, vidimo da najefikasnije dejstvo na intenzitet boje imaju male koncentracije ekstrakta E6, koji je napravljen od mlevene gljive koja je ekstrahovana tokom 24 h na temperaturi od 40°C. Ekstrakt E5 ima najmanji uticaj na boju žitnog alkohola, koji je napravljen od mlevene gljive koja je ekstrahovana tokom 24 h na temperaturi od 40°C. Može se zaključiti da pri ekstrahovanju bojenih materija u kratkom vremenskom periodu ekstrakcija je efikasnija kod manjih

čestica. Data ekstrakcija predstavlja čvrsto tečnu ekstrakciju, alkoholno vodeni rastvarač u datim uslovima ima veću aktivnu površinu. Sa povećanjem vremena alkoholna vodena mešavina dublje prodire u čestice gljive i povećava se aktivna površina, tako da razlika u efikasnosti ekstrakcije jedinjenja gljive u zavisnosti od veličine čestica se smanjuje.

Da bi dodatkom ekstrakta postigli isti intenzitet boje kao maceracijom 1% gljive tokom 7 dana u žitnom alkoholu neophodno je dodati 10 - 15% u zavisnosti od korišćenog ekstrakta gljive. Dodatkom većih količina ekstrakta intenzitet boje se povećava kod ispitivanih uzoraka. Doziranje je veoma veliko i efekasnije je korišćenje neprerađene gljive. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da usled vakum uparavanja, dolazi do degradacije ili gubitka bojnih materija. Intenzitet boje žitne rakije koja je nastala maceriranjem 4% gljive tokom 60 dana ne može se dobiti dodatkom ekstrakta napravljenih sa istom koncentracijom gljive u ispitivanim količinama.

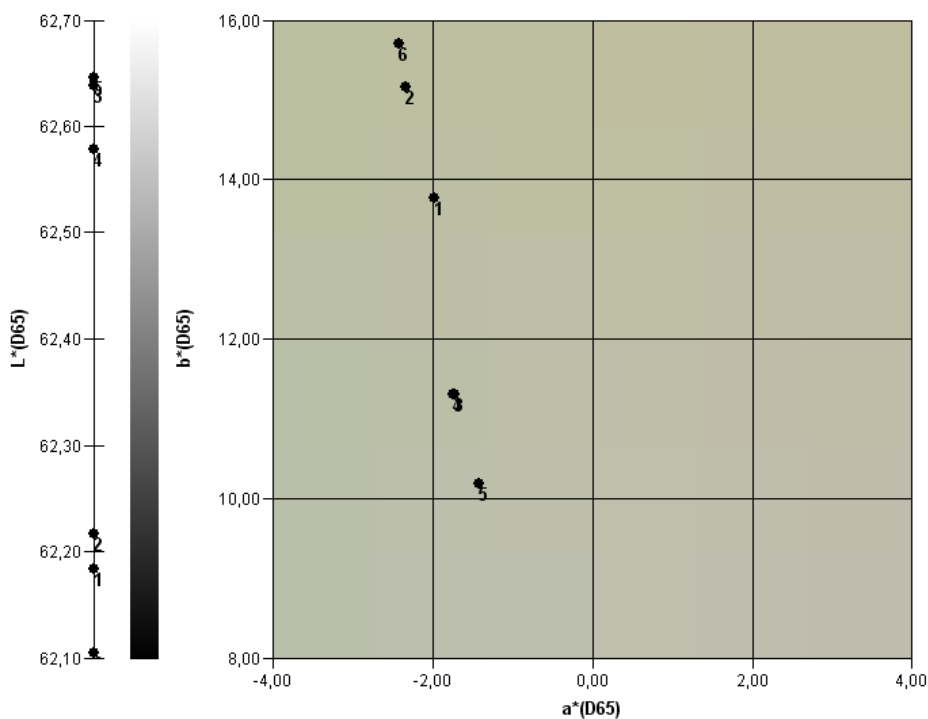
**Tabela 26.** Intenzitet boje uzoraka žitnog alkohola sa različitim procentima dodatog ekstrakta gljive *G. lucidum*

Količina ekstrakta (%)	Intenzitet boje (CU)					
	E1	E2	E3	E4	E5	E6
1	0.21±0.00	0.33±0.00	0.17±0.00	0.36±0.00	0.14±0.00	0.26±0.01
2	0.51±0.00	0.68±0.00	0.40±0.00	0.61±0.00	0.36±0.00	1.22±0.02
4	1.15±0.01	1.42±0.01	0.88±0.01	1.26±0.00	0.77±0.00	2.27±0.06
6	1.95±0.00	2.17±0.01	1.42±0.01	1.98±0.00	1.17±0.00	2.84±0.02
8	2.56±0.02	2.75±0.01	1.95±0.01	2.56±0.01	1.55±0.00	3.39±0.02
10	3.01±0.00	3.31±0.00	2.23±0.00	3.14±0.01	1.58±0.01	4.92±0.03
15	4.18±0.00	4.82±0.01	3.61±0.01	4.45±0.01	1.81±0.00	5.29±0.02
20	5.27±0.08	5.97±0.01	5.29±0.00	5.60±0.00	2.64±0.00	6.86±0.06
25	7.14±0.00	6.95±0.00	5.75±0.00	6.57±0.01	3.56±0.03	8.30±0.03
30	7.06±0.00	7.85±0.00	6.17±0.00	7.40±0.01	3.92±0.01	10.47±0.01
40	8.39±0.00	9.35±0.01	7.82±0.01	8.82±0.02	5.46±0.01	12.03±0.06
50	9.60±0.00	10.65±0.01	9.35±0.01	9.95±0.00	6.39±0.00	13.44±0.00

Rezultati u tabeli su prestavljeni kao srednja vrednost ± SD.



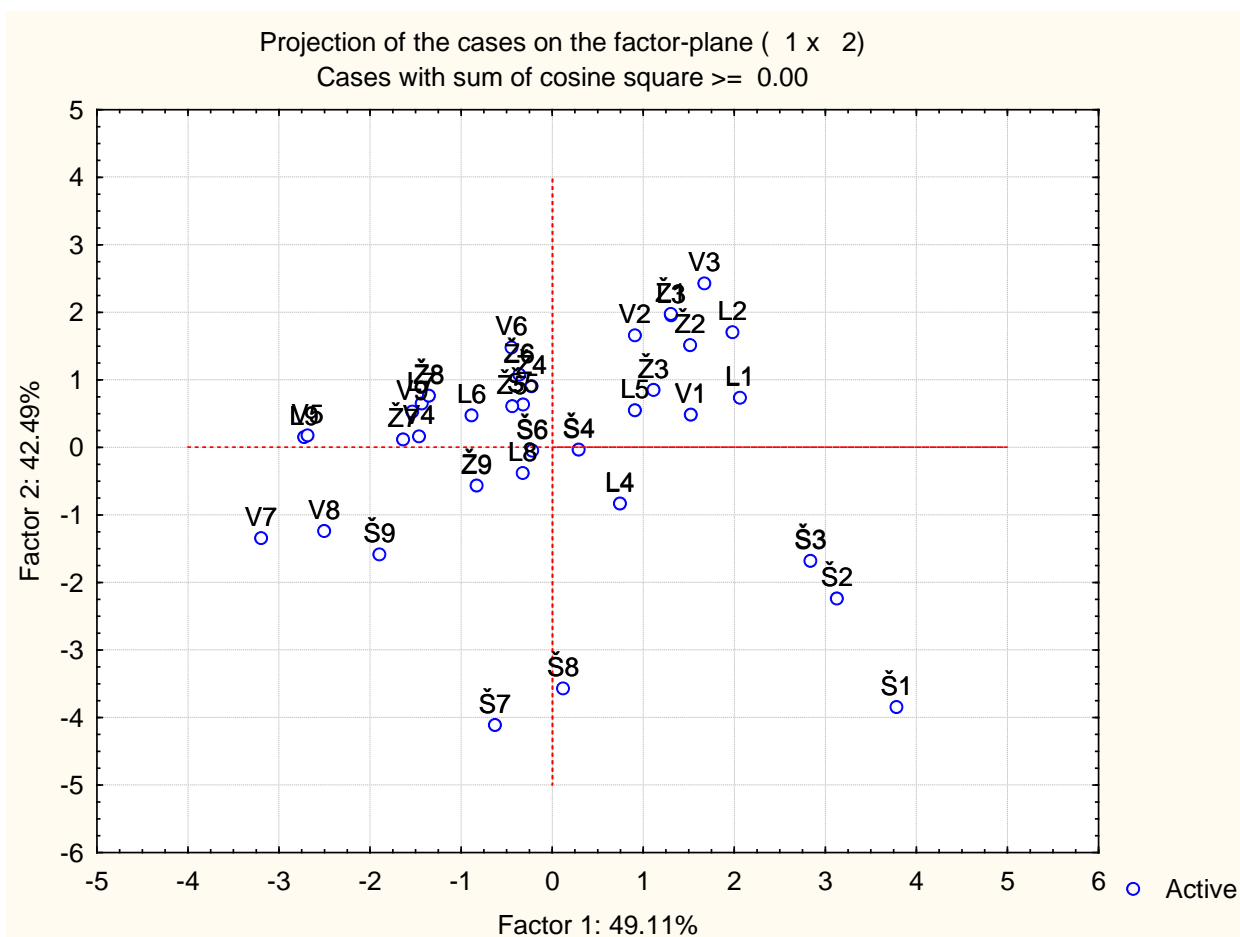
Boju uzoraka dobijenih dodatkom 5 % ekstrakta gljive u žitne rakije ispitivali smo CIELab metodom. Za razliku od vrednosti parametra  $L^*$  za uzorke macerata žitne rakije (48.6-54.5) dodatkom ekstrakta  $L^*$  vrednost ispitivanih uzoraka je statistički značajno manja (62.1-62.6). Svetlina uzoraka napravljenih dodatkom ekstrakata gljive je intenzivnija nego kod napravljenih macerata. Kod datih uzoraka  $a^*$  parametar pokazuje da je u datim uzorcima veći udeo zelene boje u odnosu na analizirane macerate. Analizom parametra  $b^*$  ispitivanih uzorka udeo žute boje je značajno manji nego kod uzoraka žitne rakije u kojima je macerirana gljiva.



**Slika 17.** Analiza boje uzoraka žitnog alkohola sa dodatkom ekstrakata *G. lucidum* pomoću CIELab metode

Uzorci: 1 – žitni alkohol sa 5 % ekstrakta E1; 2 - žitni alkohol sa 5 % ekstrakta E2; 3- žitni alcohol sa 5 % ekstrakta E3; 4 - žitni alkohol sa 5 % ekstrakta E4; 5 - žitni alkohol sa 5 % ekstrakta E5; 6 - žitni alkohol sa 5 % ekstrakta E6.

U proizvodnji alkoholnih pića “Pravilnikom o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića” je dozvoljeno korišćenje čistog karamela usključivo u svrhe doterivanja boje. Utvrđeno je da jedinjenje 4 (5)-(1,2,3,4-tetrahidroksibutil)-imidazol izolovano iz amonijačnog karamela predstavlja najznačnije, ali ne jedino jedinjenje, koje redukuje broj krvnih limfocita prema istraživanjima (Conway i Paina, 1986; Conway i Paina, 1989; Noltes i Chapela, 1985; Sinkeldam i saradnika, 1988). Međunarodna organizacija za ishranu (FAO) ne preporučuje da se koristi amonijačni karamel. Njegova upotreba je ograničena na 200 mg/kg. Ovaj tip karamela daje ujedno i najintenzivnije obojenje. Zbog štetnog dejstva karamela, upotreba gljive *G. lucidum* i njenih ekstrakata bi bila interesantna zamena za bojenje alkoholnih pića.



**Figura 3.** Raspored uzoraka na osnovu dva glavna faktora

Na figuri 3 prikazani su rezultati PCA analize uzoraka specijanih rakija sa dodatkom gljive *G.lucidum*. Na sadržaj ukupnih fenola faktor 1 (rezultati FRAP analize) utiče sa 49.11%, a faktor 2 (intenzitet boje) sa 42.4 %, oni u ukupnom varijetetu utiču sa 91.51%. Na osnovu PCA analize možemo zaključiti da grupi uzoraka sa najlošije ocenjenim karakteristikama pripadaju L4, Š1, Š2 i Š3. U posebnoj grupi su uzorci sa malim intenzitetom boje i niskim antioksidativnim kapacitetom pripadaju uzorci specijalnih rakija sa 1% gljive za čiju proizvodnju su korišćeni vinski destilat, lozova i šljivova prepečenica. Grupu uzoraka sa visokim antioksidativnim kapacitetom i intenzitetom boje čine uzorci L8, L7, Š9 i Ž9.

#### **5.4.3. SADRŽAJ TRITERPENSKIH KISELINA U UZORCIMA ŽITNOG ALKOHOLA SA DODATKOM GLJIVE *G. lucidum***

Kubota i saradnici (1982) su prvi izolovali triterpene ganoderinsku kiselinu A i B iz gljive *G. lucidum*. Daljim istraživanjima ekstrakata gljive prijavljeno je više od sto triterpena sa definisanim hemijskim strukturama i molekulskim konfiguracijama, od kojih velika većina analiziranih jedinjenja pripada ganoderinskim i lucidenskim kiselinama (Watcher-Galor i saradnici, 2011).

Pored medicinskog dejstva, mnoge od triterpenskih kiselina izolovanih iz *G. lucidum* imaju gorak ukus i važan uticaj na senzorne karakteristike ekstrakata i prehrambenih proizvoda u čijoj proizvodnji se koriste. Na osnovu intenziteta gorčine, triterpenoidi su podeljeni na tri grupe: intezivno gorke (ganoderinska kiselina A, C1, J; lucidenska kiselina A, D1; lucidon A, C), umereno gorke (ganoderinska kiselina B, C2, K) i veoma malo gorke (bez gorčine) (ganoderinska kiselina acid D; lucidenska kiselina B,C, E1, G, H; ganolucidinska kiselina C, D; lucidon B) (Nishitoba i saradnici, 1988).

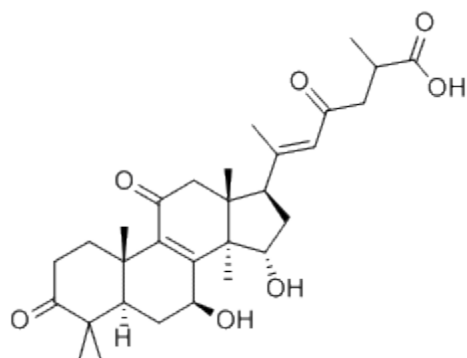
HPLC-DAD/ESI-ToF-MS analizom uzoraka žinog alkohola sa dodatkom *G.lucidum* analiziran je uticaj vremena ekstrakcije i koncentracije gljive na kvalitativni i kvantitativni sadržaj triterpenskih kiselina.

Analizom sastava triterpenskih kiselina u uzorcima žitnih alkohola sa *G. lucidum* identifikovana su sledeća jedinjenja: ganoderinske kiseline (A, B, C2, C6, D, F, G, and J), ganodereninske kiseline (D), lucideniska kiselina (A, E, D2, and LM1), 12-hidroksi-ganoderinske kiseline D i elfingenska kiselina A. Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 26 utvrđeno je da je sastav datih jedinjenja identičan kao i kod uzoraka ekstrakata za čiju je proizvodnju korišćen žitni alkohol sa sadržajem etanola od 60 %. Parametri ekstrakcije nisu uticali na kvalitativni sastav ispitivanih uzoraka ekstrakata i žitnog alkohola sa dodatkom gljive *G. lucidum*.

Kvantitativnom analizom uzoraka specijalnih žitnih rakija utvrđeno je da je najzastupljenija ganoderinska kiselina A (slika 18), čiji je sadržaj u zavisnosti od uslova ekstrakcije od 0.528 do 0.781 %. Uzorak Ž4 ima najveći sadržaj analiziranog jedinjenja, tako da optimalni uslovi za ekstrakciju date kiseline su koncentracija gljive 2.5%, koja se estrahuje tokom 21 dana. U dosadašnjim istraživanjima dokazano je da ganoderinska kiselina A ima širok spektar medicinskog dejstva, uključujući antitumorno (Jiang i saradnici, 2008), antioksidativno (Zhu i saradnici, 1999) i anti-imflamatorno dejstvo (Akihisa i saradnici, 2007). Kod analiziranih uzoraka sa povećanjem koncentracije ekstrahovane gljive, vreme ekstrakcije neophodne za potpunu ekstrakciju datog jedinjenja se proporcijalno smanjuje.

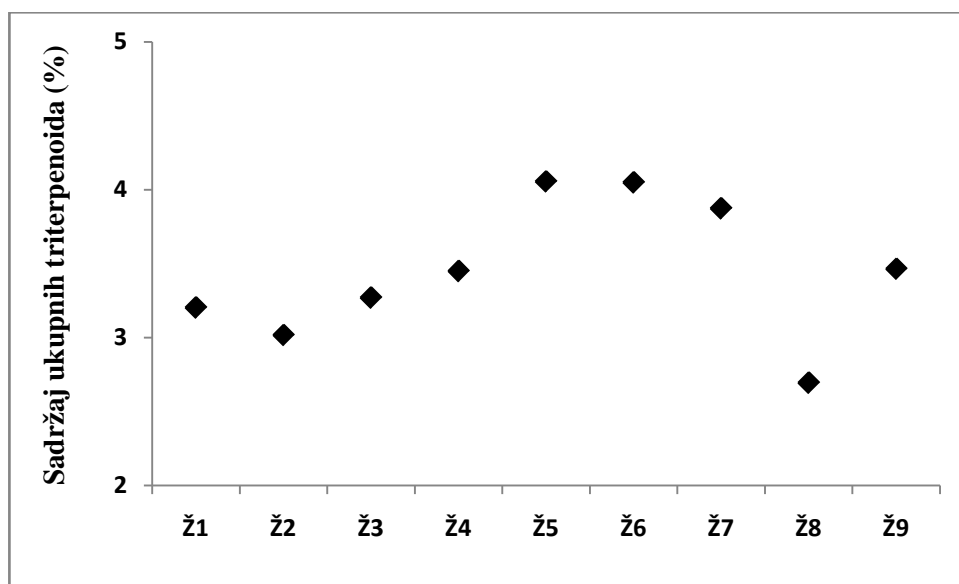
Optimalno vreme neophodno za kompletnu ekstrakciju analiziranih jedinjenja kod uzoraka sa 10 g/L dodate gljive zavisi od strukture i hemijskih karakteristika analiziranih komponenti. Ekstrakcija ukupnih triterpenoida kod uzoraka sa 25 g/L gljive završena je nakon 21 dana ili još uvek traje. Uzorcima sa 40 g/L gljive ekstrakcija ukupnih terpenoida je završena nakon 7 dana. Može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije gljive, vreme ekstrakcije neophodno za ekstrakciju ukupnih triterpenoida se smanjuje.

Na osnovu rezultata analizirani uzorci prema sadržaju ukupnih triterpenskih kiselina mogu se rangirati: Ž5>Ž6>Ž7>Ž4>Ž9>Ž3>Ž1>Ž2>Ž8 (Figura 3). Može se zaključiti da uzorci sa 2.5% gljive imaju najveći sadržaj ukupnih triterpenskih kiselina i da sa povećanjem dodate gljive, sadržaj analiziranih jedinjenja se ne povećava.



Slika 18. Ganoderinska kiselina A

([http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9373916.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9373916.htm))



**Figura 3.** Sadržaj ukupnih triterpenoida u specijanim žitnim rakijama

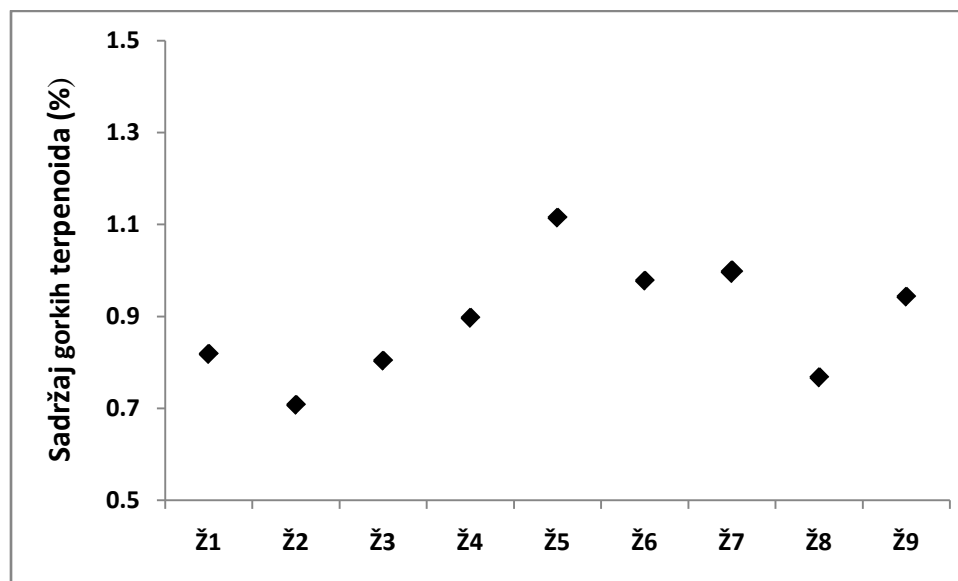
**Tabela 27.** Sadržaj triterpenskih kiselina u liofilizovanim uzorcima specijalnih rakija

Broj $t_R$ (min) DAD/MS	Sadržaj triterpenskih kiselina u liofilizovanim uzorcima (%)									$\lambda_{max}$ (nm)	Molekularna formula i masa	Mass i $m/z$ (mereno)	MRM transition	Jedinjenja
	Ž1	Ž2	Ž3	Ž4	Ž5	Ž6	Ž7	Ž8	Ž9					
1 8.00/8.08	0.2379	0.1893	0.2115	0.2115	0.2621	0.2586	0.2483	0.0690	0.2345	256	$C_{30}H_{46}O_7$ (518.3087)	518.3244; 517.3168; 563.3232; 1035.6402 460.2824;	517→499	Ganoderinska kiselina C2
2 8.36/8.45	0.1212	0.1275	0.0866	0.1113	0.1545	0.1841	0.1427	0.2004	0.1033	256	$C_{27}H_{40}O_6$ (460.2825)	459.2750; 505.2812; 919.5583 530.2879	459→441 459→385	Lucideninska kiselina LM1
3 8.51/8.59	0.0890	0.1210	0.1062	0.0938	0.1157	0.1333	0.0993	0.1010	0.0897	254	$C_{30}H_{42}O_8$ (530.2879)	529.2806 575.2862	529→511 511→467	Ganoderinska kiselina C6
4 8.83/8.92	0.3525	0.3836	0.4092	0.3495	0.4258	0.4551	0.4382	0.0877	0.4316	256	$C_{30}H_{44}O_8$ (532.3036)	532.2927; 531.2851; 1063.583 516.3087;	531→513 513→469	Ganoderinska kiselina G
5 9.10/9.19	0.2155	0.2070	0.2951	0.2576	0.3214	0.2948	0.2991	0.2160	0.2829	254	$C_{30}H_{44}O_7$ (516.3087)	515.3016; 561.3054; 1031.6068	515→497 497→453	Ganoderinska kiselina B
6 9.24/9.33	0.2441	0.2789	0.2553	0.2246	0.3034	0.3306	0.2586	0.2258	0.2431	258	$C_{29}H_{40}O_8$ (516.2723)	516.2810; 515.2738	515→473	Lucideninska kiselina E
7 9.55/9.65	0.2540	0.2525	0.2407	0.2966	0.3205	0.3212	0.3070	0.2330	0.0330	254	$C_{30}H_{40}O_8$ (528.2723)	528.2723 527.2651 573.2757 516.3088;	527→509 509→465	Elfvinginska kiselina A
8 9.93/10.04	0.5480	0.5433	0.6177	0.5852	0.7813	0.6589	0.6664	0.5285	0.6340	256	$C_{30}H_{44}O_7$ (516.3087)	515.3015; 561.3073; 1031.6099	515→497	Ganoderinska acid A

## Nastavak tabele 27

9 10.52/10.63	0.2195	0.1226	0.1384	0.2448	0.2490	0.2466	0.2497	0.1722	0.2375	254	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> O <sub>6</sub> (458.2668)	458.2669; 457.2595; 503.2652; 915.5264 530.2877;	457→439 457→287	Lucideninska kiselina A
10 10.63/10.74	0.0896	0.0677	0.0639	0.0913	0.0887	0.1128	0.1047	0.0238	0.0870	254	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>8</sub> (530.2879)	529.2804; 575.2854; 1059.5595 514.2930;	529→511 511→467	12-Hidroksi- ganoderinska kiselina D
11 11.11/11.22	0.2141	0.1874	0.2181	0.2959	0.3049	0.2682	0.3051	0.2186	0.3075	254	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> (514.2930)	513.2854; 559.2932; 1027.5754	513→495 495→451	Ganoderinska kiselina D
12 11.29/11.40	0.2211	0.1538	0.1820	0.1882	0.2106	0.2264	0.2227	0.1733	0.1960	254	C <sub>29</sub> H <sub>38</sub> O <sub>8</sub> (514.2566)	514.2627; 513.2554 512.2773;	513→471	Lucideniska kiselina D2
13 11.40/11.52	0.0844	0.0888	0.0886	0.1029	0.0832	0.1011	0.1228	0.0848	0.1298	254	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O <sub>7</sub> (512.2774)	511.2697; 557.2763; 1023.5455	511→493 493→449	Ganoderenska kiselina D
14 11.94/12.06	0.2613	0.2527	0.3089	0.3291	0.3510	0.3847	0.3277	0.2935	0.3845	254	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>9</sub> (570.2829)	570.2829; 569.2757; 1139.5577	569→551 551→509	Ganoderinska kiselina F
15 12.10/12.23	0.0505	0.0420	0.0477	0.0667	0.0846	0.0722	0.0810	0.0666	0.0715	254	C <sub>30</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> (514.2930)	514.2930; 513.2854; 559.2932; 1027.5754	513→451 513→437	Ganoderinska kiselina J

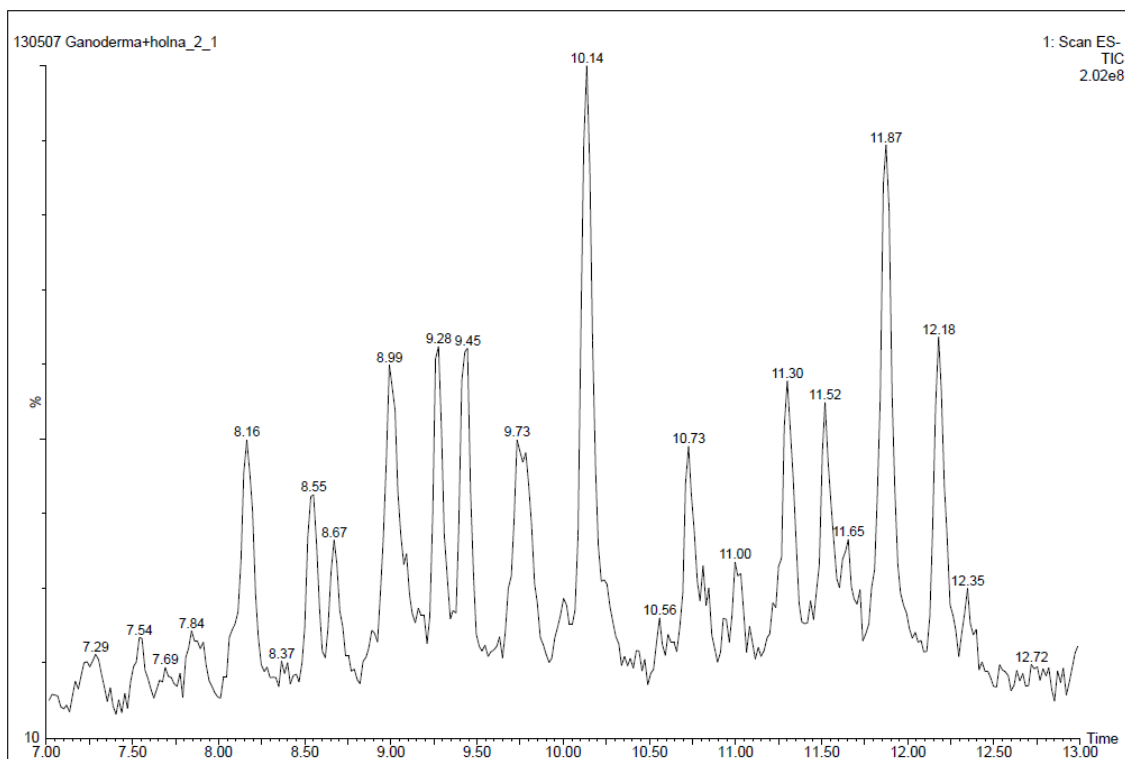
Pored medicinskog dejstva, ganoderinske kiseline A i J, i lucidenska kiselina A imaju važan efekat na senzorne karakteristike analiziranih uzoraka, jer analizirane kiseline imaju intenzivno gorak ukus (Nishitoba i saradnika, 1988). Sadržaj gorkih triterpenskih kiselina u uzorcima specijalnih žitnih rakija predstavljen je na figuri 4. Na osnovu sadržaja gorkih terpenki kiselina analizirani uzorci se mogu rangirati:  $\check{Z}5 > \check{Z}6 > \check{Z}7 > \check{Z}9 > \check{Z}4 > \check{Z}3 > \check{Z}1 > \check{Z}2 > \check{Z}8$ . Na osnovu rezultata sadržaja ukupnih triterpenskih kiselina i sadržaja intenzivno gorkih triterpena, može se zaključiti da sa povećanjem ukupnih triterpenskih kiselina povećava se i sadržaj gorkih kiselina.



**Figura 4.** Sadržaj ukupnih gorkih terpenoida u uzorcima specijalnih rakija sa *G.lucidum*

LC-MS hromatogram triterpenskih kiselina uzorka žitnog alkohola sa sadržajem 10 g/L gljive *G.lucidum* prikazan je na slici 19.





Slika 19. LC-MS hromatogram triterpenskih kiselina u uzorku Ž1

#### 5.4.4. ANALIZA ISPARLJIVIH JEDINJENJE SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM GLJIVE *G. lucidum*

Kvaternerne aromatske materije nastaju u složenim hemijskih procesima tokom sazrevanja destilata jakih alkoholnih pića. Aromatski kompleks pića može se obogatiti ekstraktibilnim jedinjenja iz drvenih buradi tokom sazrevanja destilata ili ekstrakcijom jedinjenje iz bilja koje se dodaje u jaka pića. Destilati predstavljaju multikomponentne alkoholno-vodne smeše, čije komponente tokom sazrevanja reaguju međusobom, razlažu se, isparavaju ili bivaju apsorbovane, tako da se njihova koncentracija menja tokom procesa (Tešević i saradnici, 2005).

Tradicionalno na dalekom istoku se u jaka pića dodaje lekovita gljiva *G.lucidum*, koja sadrži triterpenske kiseline koje daju gorčinu pićima. Dodatkom gljive u rakije ekstrahuju se i jedinjenja, koja pored ukusa menjaju i aromatski kompleks specijalnih rakija. Promene aromatskog kompleksa nastale usled ekstrakcije jedinjenja iz dodate gljive u žitni alkohol, šljivovu i lozovu prepečenicu i vinski destilat analizirane su GC-MS metodom i rezultati su prikazani u tabeli 28.

**Tabela 28.** Analiza aromatskog kompleksa šljivove i lozove prepečenice, žitnog alkohola i vinskog destilata sa dodatkom gljive *G.lucidum*

SASTOJAK	Ž9	V9	Š9	L9	SASTOJAK	Ž9	V9	Š9	L9
acetaldehid	-	0.209	0.020	0.330	dietil-sukcinat	-	0.304	1.605	0.030
aceton	0.081	-	-	-	$\alpha$ -terpineol	-	-	0.161	0.120
1.1-dietoksi etan	2.877	0.122	5.778	10.447	metil-salicilat	-	-	0.059	-
etil-acetat	0.078	3.885	58.223	26.227	etil-salicinat	-	0.032	0.064	0.046
propil-acetat	-	-	0.310	0.067	heksanska kiselina	-	-	0.545	0.591
2-pentanon	0.012	2.065	0.153	0.061	benzil-alkohol	-	-	2.827	-
1-propanol	0.899	-	24.806	8.671	fenil-etanol	-	2.239	2.741	1.300
izobutanol	13.564	16.800	27.362	31.623	oktanska kiselina	-	0.284	0.823	1.604
izoamil-acetat	-	-	-	-	etil-cinamat	-	-	0.086	0.376
n-butanol	0.034	0.501	1.457	1.234	$\gamma$ -undekanlakton	-	-	-	-
3-penten- 2-ol	0.536	0.542	0.514	0.604	eugenol	-	-	0.502	0.119
izoamil-alkohol	3.717	105.200	89.080	186.171	dekanska kiselina	0.112	0.153	0.853	2.978
1-pentanol	-	0.084	-	0.246	dodekanska kiselina	-	-	0.680	1.420
etil-laktat	0.024	1.988	15.279	2.268	heksadekanska kiselina	1.217	0.594	-	1.710
heksanol	0.014	0.730	0.642	3.628	etil-oleat	3.513	0.153	-	-
etil-heksanoat	-	-	-	0.593	metil-linoleat	-	-	0.238	6.406
tridekan	-	-	-	-	mentol neo	-	0.73	0.642	-
etil-oktanoat	-	0.037	0.572	1.729	menten neo	-	-	-	-
sirćetna kiselina	-	-	1.814	0.349	etil -dodekanoat	-	0.118	0.199	0.578
furfural	0.143	0.347	1.447	0.313	metil-linolat	3.465	0.112	-	-
benzalaldehid	-	0.054	1.848	0.112	trans pinakanfon	-	-	0.056	-
linalol	-	-	0.081	-	dekanol	-	-	0.198	-
menten (3p)	-	-	0.072	0.438	fitol	-	-	0.294	0.402
etil-dekanoat	-	-	0.490	0.126	etil-tertradekanoat	-	-	0.861	0.838
etil-benzoat	-	-	0.544	0.283	dekanol	-	-	0.198	0.053

Prema istraživanjima isparljivih aromatičnih jedinjenja *Ganoderma lucidum*, Chen i saradnici (2010) su detektovali 58 komponenti, koje uključuju 7 alkena, 2 aromatična ugljovodonika, etar, 12 alkohola, 5 alkana, 8 aldehida, 2 kiseline, 7 estara i 3 furana. Glavne isparljive komponente arome micelije *Ganoderma lucidum* su bile 1-octen-3-ol, etanol, heksanal, 1-heksanol, sesquirosefuran, 3-oktanol i 3-oktanon.

Taşkin i saradnici (2013) su analizirali isparljive komponente arome uzoraka *Ganoderma lucidum* sakupljene u provinciji Mersin (Turska) tokom 2010-2011 godine. U ovom istraživanju je identifikovano osamnaest komponenti arome, kao glavne komponente označeni su alkoholi 1-okten-3-ol, 3-oktanol, 1-oktanol, 2-etil -1-heksanol koji učestvuju sa oko 48.05% u sastavu arome.

Na osnovu rezultata istraživanja može se zaključiti da ekstrahovanjem jedinjenja gljive dolazi do većih promena u koncentraciji već postojećih komponenata alkoholnih medijuma, nego u njihovom sastavu. Upoređivani su uzorci sa istom količinom gljive da bi uporedili interakciju hemijskih jedinjenja različitih alkoholnih medijuma sa jedinjenjima gljive.

Analizom aromatskog sastava žitnog alkohola sa gljivom *Ganoderma lucidum* detektovano je 15 jedinjenja. Jedinjenja koja se nakon ekstrakcije pojavljuju su: aceton, 1,1-dietoksi etan, 2-pentanon, 3-penten-2-ol, etil-laktat, heksanol, furfural, dekanska i dodekanska kiselina i metil-linolat. Jedinjenja koja su detektovana u žitnom alkoholu, a nakon ekstrakcije nisu nađena u uzorcima su: izoamil acetat, 4-hidroksi-4-metil 2-pentanon, 1,1-dietoksi heksan, etil-heksanoat, tridekan, 4-metil-2-pentanon. Koncentracija izobutanola je značajno povećana usled ekstrakcije. Usled dodatka gljive i samog procesa starenja, možemo zaključiti da dolazi do značajnih promena u sastavu analiziranih uzoraka. Nakon dodatka *G.lucidum* sadržaj kiselina se značajno povećava, za razliku od ranijih istraživanja u kojima su navodili alkohole kao glavne komponente arome gljive. Heksadekanska kiselina je najzastupljenija u datom uzorku, što je u saglasnosti sa istraživanjem Taşkin i saradnika (2013).

Aromatski sastav šljivove prepečenice sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum* sastoji se od 41 jedinjenja. U samom procesu sazrevanja usled velikog broja reakcija mnoga jedinjenja koja su detektovana u alkoholnom medijumu nisu utvrđenja u sastavu uzoraka nakon ekstrahovanja gljive. Jedinjenja detektovana nakon ekstrakcije *G. lucidum* su:

heksanol, etil-dekanoat, metil-linolat fitol, etil-tetradekanoat i dekanol. Kod šljivove prepečenice se povećava količina dodekanske i heksanske kiseline, a ostalih kiselina se neznatno smanjuje. Triterpenski alkoholi, eugenol,  $\alpha$ -terpineol, nonanol, linanol su važne primarne komponente detektovane u neznatno smanjenoj ili u istoj koncentraciji u šljivovoj prepečenici sa dodatkom gljivom. Sadržaj kiselina se smanjuje usled reakcije sa alkoholima i obrazovanja estara, koji su glavni konstituenti arome odnegovanih pića.

Analizom aromatskog sastava vinskog destilata sa *G.lucidum* detektovano je 24 jedinjenja. Jedinjenja koja se detektuju u uzorku nakon dodatka gljive su: heksanol, furfural, benzaldehid, etil-oleat, etil-dodekanoat i metil-linoleat. Nakon dodavanja gljive detektovane su heksadekanska i dekanska kiselina koje uzorak vinskog destilata nije sadržao. Koncentracija ostalih kiselina detektovanih u uzorku vinskog destilata se smanjuje usled obrazovanja estara.

Aromatski sastav lozove prepečenice sa dodatkom gljive čine 38 jedinjenja, po hemijskom sastavi spadaju u aldehide, ketone, alkohole, estre, kiseline itd. Nakon dodatka gljive kod uzoraka specijalne rakije detektovana su sledeća jedinjenja: acetaldehid, etil-dekanoat, heksanska kiselina, eugenol, dodekanska kiselina, fitol, etil tetradekanoat i dekanol. Sadržaj kiselina se nakon dodatka gljive povećava, dodekanska kiselina je detektovana u uzorku nakon dodavanja gljive.

U svim uzorcima jakih pića sa dodatkom gljivom detektovan je alkohol heksanol, koga je u početnim medijumu sadržala samo lozova prepečenica. U uzorku lozove prepečenice koncentracija heksanola je povećana. Izoamil acetat nije detektovan kod alkoholnih pića sa gljivom, iako su ga svi polazni medijumi sadržali. Sadržaj kiselina se povećava kod svih uzoraka, a dodatkom gljive dolazi i do promena u kvalitativnom sastavu kiselina u ispitivanim uzorcima. Usled reakcije kiselina i alkohola u ispitivanim medijumima obrazuju se estri, koji obogaćuju aromu pića. Iako se kod lozove prepečenice nakon dodatka gljive koncentracija izoamil alkohola smanjuje nakon dodatka gljive, ovo jedinjenje je najdominantnije u svim uzorcima specijalnih rakija. U alkoholno vodenoj smeši odigrava se veliki broj reakcija, među kojima je nastanak acetala 1.1-dietoksi etana u reakciji acetaldehida sa etanolom, tako da u svim analiziranim uzorcima sadržaj datog acetala povećava i redukuje se opor miris. Furfural se detektuje u svim uzorcima sa

dodatkom gljivom, a u alkoholnim medijumima u kojima je detektovan dolazi do povećanja koncentracije. U uzorcima specijalnih rakija detektovana su jedinjenja eugenol i furfural, koji spadaju u karakteristične kvaternerne materije detektovane u jakim pićima nakon sazrevanja u drvenim buradima.

#### **5.4.5. SENZORNA ANALIZA SPECIJALNIH RAKIJA SA *Ganoderma lucidum***

Finalnu ocenu senzornog kvaliteta jakih alkoholnih pića proizvedenih od najkvalitetnijih sirovina upotrebom savremenih tehnologija dobijamo kao povratnu informaciju od krajnjih konzumenata-potrošača. Upotreba savremenih analitičkih metoda u kojima je analiziran hemijski sastav ne daje nam konačan sud o senzornoj prihvatljivosti proizvoda, već ocenjivanjem senzornih karakteristika pomoću obučenih i iskusnih ocenjivača eksperata. Senzornom analizom pokušavamo da ocenimo i opišemo karakteristike pića pomoću univerzalnih i razumljivih termina korišćenjem prirodnih čula vida (boja i čistoća), mirisa (aroma/flavor), ukusa i dodira (tekstura i temperatura) (Buglass i Caven-Quantrill, 2011).

Dodatkom gljive alkoholnim medijumima ekstrahuju se jedinjenja gljive koja menjaju senzorne karakteristike alkoholnih pića. Ocenjivanjem senzornih karakteristika (boja, bistrina, tipičnost, miris i ukus) ispitivali smo uticaj koncentracije dodate gljive, vremena ekstrakcije i korišćenog alkoholnog medijuma na ukupnu senzornu ocenu specijalnih rakija sa dodatkom gljive *G. lucidum*. Za obradu podataka korišćena je multivariocina analiza ANOVA, a Tuckey's test je korišćen za određivanje razlike između sredina. Na osnovu statističke analize rezultata možemo zaključiti da sva tri faktora, kao i njihova međusobna interakcija, imaju statistički značajan uticaj na senzorne karakteristike analiziranih pića. Rezultati senzorne analize prikazani su u tabeli 29.

Konačna senzorna ocena analiziranih uzoraka je bila između 16.20 i 18.26, što je veoma dobar rezultat. Najbolje su bili ocenjeni uzorci za čiju proizvodnju je korišćen vinski destilat kao alkoholna osnova. Povećanje vremena ekstrakcije gljive *G.lucidum* kod

uzoraka vinskih destilata sa istom količinom gljive imalo je pozitivan efekat na senzorne karakteristike analiziranih uzoraka. Koncentracija dodate gljive nije imala statistički značajan uticaj na senzorne karakteristike uzoraka.

Ekstrahovana jedinjenja gljive nisu imala značajan uticaj na senzornu ocenu uzoraka specijalnih rakija za čiju proizvodnju je korišćena šljivova prepečenica. Najbolje senzorne karakteristike imao je uzorak Š5.

Dodatak veće količine gljive nije imao značajan efekat na senzorne karakteristike specijalnih lozovih rakija. Na osnovu prikazanih rezultata možemo zaključiti da sa povećanjem vremena estrahuju se jedinjenja koja imaju negativan uticaj na senzorne karakteristike. Povećanje vremena ekstrakcije imalo je negativan uticaj na senzorne karakteristike uzoraka sa istom koncentracijom dodate *G. lucidum*.

Estrakcioni faktori imali su najmanji efekat na senzorne karakteristike uzorka specijalnih žitnih rakija. Senzorne ocene uzoraka specijalnih žitnih rakija su najujednačenije i sa najmanjim uticajem ispitivanih faktora. Sadržaj gorkih triterpenkih kiselina u ovim uzorcima nije imao značajan efekat na senzorne ocene.

Na osnovu rezultata, možemo zaključiti da hemijski sastav korišćenih alkoholnih medijuma ima značajan uticaj na senzornu ocenu analiziranih pića. Upoređivanjem rezultata GC-MS analize aromatskog sastava i senzorne analize uzoraka (Š9, L9, Ž9 i V9) ispitivali smo koja jedinjenja imaju najznačajniji efekat na senzornu ocenu analiziranih uzoraka. Uzoraci Š9 i Ž9 za čiju proizvodnju su korišćene šljivova i žitna rakija imali su značajno manju konačnu senzornu ocenu u odnosu na uzorke lozove rakije (L9) i vinskog destilata (V9). Aromatski sastav uzorak Ž9 je najmanje kompleksan i sa najmanjim udelom estara, koji jakim pićima daju prijatan miris. Iako u malim koncentracijama mnoga detektovana jedinjenja imaju veliki uticaj na senzorne karakteristike. Na osnovu rezultata, možemo zaključiti da se ekstrabilna jedinjenja gljive najbolje kombinuju sa lozovom rakijom i vinskim destilatom i daju jaka pića sa poboljšanim senzornim karakteristikama.

Tabela 29. Senzorna analiza specijalnih rakija sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum*

uzorci	Senzorne karakteristike					
	Boja	bistrina	tipičnost	miris	Ukus	Ukupni
Š1	1	1	2	5.00±0.16	7.72±0.13	16.20±0.22 <sup>a</sup>
Š2	1	1	2	4.98±0.08	8.04±0.11	17.02±0.08
Š3	1	1	2	5.03±0.08	8.16±0.11	17.18±0.08 <sup>a</sup>
Š4	1	1	2	5.40±0.08	8.42±0.15	17.76±0.18 <sup>ab</sup>
Š5	1	1	2	5.50±0.08	8.52±0.08	18.00±0.12 <sup>abc</sup>
Š6	1	1	2	5.45±0.13	8.40±0.07	17.82±0.16 <sup>abd</sup>
Š7	1	1	2	5.20±0.13	7.68±0.08	16.86±0.21 <sup>cde</sup>
Š8	1	1	2	5.23±0.06	7.70±0.07	16.92±0.08 <sup>cde</sup>
Š9	1	1	2	5.44±0.11	8.18±0.08	17.62±0.15 <sup>abdfg</sup>
L1	1	1	2	5.34±0.11	8.48±0.08	17.82±0.08 <sup>abf</sup>
L2	1	1	2	5.42±0.08	8.64±0.05	18.06±0.11 <sup>abfgi</sup>
L3	1	1	2	5.50±0.16	8.68±0.08	18.18±0.13 <sup>abcgf</sup>
L4	1	1	2	5.30±0.16	8.26±0.05	17.56±0.15 <sup>abdfik</sup>
L5	1	1	2	5.40±0.16	8.48±0.08	17.88±0.08 <sup>abfj</sup>
L6	1	1	2	5.38±0.08	8.68±0.15	18.06±0.11 <sup>abghk</sup>
L7	1	1	2	5.50±0.16	8.64±0.11	18.12±0.20 <sup>abghk</sup>
L8	1	1	2	5.38±0.06	8.40±0.07	17.76±0.11 <sup>ablf</sup>
L9	1	1	2	5.50±0.16	8.64±0.11	18.14±0.26 <sup>abcgflk</sup>
Ž1	1	1	2	5.66±0.11	8.48±0.08	18.14±0.09 <sup>abcgflk</sup>
Ž2	1	1	2	5.64±0.11	8.36±0.11	18.00±0.19 <sup>abf</sup>
Ž3	1	1	2	5.50±0.16	8.40±0.07	17.90±0.19 <sup>a bfgk</sup>
Ž4	1	1	2	5.68±0.22	8.34±0.05	18.02±0.22 <sup>abfk</sup>
Ž5	1	1	2	5.70±0.16	8.26±0.05	17.96±0.18 <sup>abgfk</sup>
Ž6	1	1	2	5.62±0.13	8.48±0.08	18.10±0.20 <sup>abfk</sup>
Ž7	1	1	2	5.48±0.08	8.54±0.05	18.02±0.08 <sup>abgfk</sup>
Ž8	1	1	2	5.62±0.13	8.50±0.07	18.12±0.11 <sup>abgfk</sup>
Ž9	1	1	2	5.38±0.08	8.40±0.07	17.78±0.08 <sup>abfl</sup>
V1	1	1	2	5.36±0.11	8.45±0.05	17.80±0.16 <sup>abfo</sup>
V2	1	1	2	5.52±0.08	8.62±0.08	18.14±0.11 <sup>abcgfk</sup>
V3	1	1	2	5.52±0.08	8.74±0.05	18.26±0.13 <sup>abceghjklmnop</sup>
V4	1	1	2	5.52±0.08	8.48±0.08	18.00±0.07 <sup>abfk</sup>
V5	1	1	2	5.52±0.08	8.62±0.08	18.14±0.05 <sup>abcfkno</sup>

Nastavak tabele 29.

<b>V6</b>	1	1	2	5.52±0.15	8.72±0.08	18.24±0.18 <sup>abceghl pq</sup>
<b>V7</b>	1	1	2	5.44±0.11	8.38±0.08	17.82±0.18 <sup>abflpq</sup>
<b>V8</b>	1	1	2	5.44±0.15	8.32±0.08	17.78±0.23 <sup>abfq</sup>
<b>V9</b>	1	1	2	5.50±0.16	8.62±0.08	18.12±0.18a <sup>bfgk</sup>

Različita slova u istim kolonama onačavaju značajnu razliku Tukey's testu,  $p < 0.01$

Š-šljivova prepečenica; L- lozova prepečenica; Ž- žitni alcohol; V-vinski destilat.

## 5.5. SPECIJALNE TRAVARICE SA *G. lucidum*

Za proizvodnju specijalnih rakija koristi se veliki broj različitih vrsta aromatičnog, lekovitog i začinskog bilja, kao i njihovi ekstrakti i etarska ulja. Najveći broj travarica se proizvodi po tradicionalnim receptima u srpskim domaćinstima i smatra se da ima lekovito dejstvo na zdravlje konzumenta. Travarice mogu biti monotravarice kod kojih dominira miris i ukus jedne biljke po kojoj često nose i ime. Najčešće travarice se proizvode korišćenjem složene mešavine bilja, kod kojih aroma zavisi od količine i odnosa dodatog bilja.

U zemljama dalekog istoka proizvodi se veliki broj jakih alkoholnih pića sa dodatkom multikomponentnih biljnih mešavina u kojima je jedna od najvažnih komponenti *G.lucidum*. U kineskoj medicinskoj literaturi može se naći preko 100 hiljada različitih formula, koje najčešće sadrže od 4 do 12 biljaka sa različitim farmakološkim efektom (Lee i saradnici, 2003).



### 5.5.1. ANTIOKSIDATIVNI KAPACITET SPECIJALNIH TRAVARICA SA *G.*

#### *lucidum*

Ispitivan je uticaj biljne mešavine na sadržaj polifenola i antioksidativni kapacitet uzoraka specijalnih rakija za čiji proizvodnju su korišćeni alkoholni medijumi žitni alkohol, šljivova i lozova prepečenica i vinski destilat u koje je dodavano 40 g/L *G.lucidum*, koja je macerirana 7, 21 i 60 dana. Biljna mešavina sastojala se od 39 vrste lekovitog i aromatičnog bilja, 4 vrste sušenog voća i kore hrasta. Rezultati dvofaktorijanog ogleada statistički su obrađeni analizom varijanse (ANOVA), a Tuckey's test je korišćen za utvrđivanje značajnosti razlike između srednjih vrednosti. U statističkoj analizi, interval poverenja je bio 99%.

Na sadržaj ukupnih polifenola na osnovu rezultata analize varijanse, utvrđeno je da statistički značajno utiču oba faktora vreme ekstrakcije gljive i korišćeni medijum, ali i njihova međusobna interakcija. Dodatkom ekstrakta bilja specijalnim rakijama sa *G.lucidum* statistički značajno povećava se sadržaj ukupnih polifenola u svim analiziranim uzorcima.

Kod uzoraka specijalnih travarica za čiju su proizvodnju kao alkoholna osnova korišćeni žitni alkohol, lozova i šljivova prepečenica, sa povećanjem vremena ekstrakcije gljive povećava se i sadržaj ukupnih fenola. Izuzetak su uzorci vinskog destilata kod kojih sa povećanjem vremena ekstrakcije dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih fenola. Analizom sadržaja ukupnih fenola u specijalnim rakijama napravljenim sa dodatkom iste količine gljive, sa povećanjem vremena ekstrakcije na 21 dan dolazi do smanjenja sadržaja fenola u odnosu na uzorke ekstrahovane tokom 7 dana. Kod uzoraka kod kojih je gljiva ekstrahovana tokom 60 dana dodatkom ekstrakta bilja dolazi do statistički najznačajnijeg povećanja sadržaja ukupnih fenola.

Antioksidativni kapacitet uzoraka specijalnih travarica napravljenih korišćenjem gljive *Ganoderma lucidum* određivan je pomoću DPPH i FRAP metoda. Na osnovu rezultata AO analiziranih uzoraka utvrđeno je da korišćenje različitih alkoholnih medijuma za proizvodnju travarica sa *G. lucidum* ima statistički značajan efekat, kao i interakcija faktora vremena ekstrakcije i alkoholnog medijuma, dok samo vreme ekstrakcije nema

statistički važan uticaj na antioksidativni kapacitet uzoraka. Dodatkom ekstrakta bilja kod svih analiziranih uzoraka dolazi do statistički značajnog povećanja antioksidativnog kapaciteta, iako su dodate iste količine bilja efekat nije imao srazmeran uticaj na AO svih uzoraka.

**Tabela 30.** Sadržaj ukupnih polifenola i antioksidativni kapacitet specijalnih rakija sa dodatkom *G.lucidum* i biljne mešavine.

Uzorci	Metode		
	TPC (mg/L GAE) <sup>ja</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>
<b>T1</b>	160.11±9.91 <sup>a</sup>	1.22±0.07 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>a</sup>
<b>T2</b>	192.33±8.17 <sup>ab</sup>	1.52±0.02 <sup>ab</sup>	0.61±0.05 <sup>ab</sup>
<b>T3</b>	207.33±9.56 <sup>ac</sup>	1.51±0.02 <sup>ac</sup>	0.70±0.06 <sup>a</sup>
<b>T4</b>	167.11±0.84 <sup>cd</sup>	1.45±0.03 <sup>ad</sup>	0.67±0.01 <sup>ac</sup>
<b>T5</b>	181.66±6.36 <sup>e</sup>	1.32±0.03 <sup>bcd</sup>	0.58±0.02 <sup>d</sup>
<b>T6</b>	209.00±7.75 <sup>adf</sup>	1.29±0.03 <sup>bcd</sup>	0.64±0.10 <sup>ae</sup>
<b>T7</b>	192.56±8.00 <sup>ag</sup>	1.34±0.04 <sup>bcg</sup>	0.69±0.04 <sup>af</sup>
<b>T8</b>	196.11±4.76 <sup>ad</sup>	1.41±0.02 <sup>a</sup>	0.69±0.01 <sup>ag</sup>
<b>T9</b>	202.67±7.80 <sup>ad</sup>	1.45±0.00 <sup>af</sup>	0.73±0.02 <sup>ad</sup>
<b>T10</b>	223.67±3.28 <sup>abdegi</sup>	1.53±0.02 <sup>ae</sup>	0.85±0.01 <sup>abcdgdei</sup>
<b>T11</b>	223.00±15.18 <sup>abdegij</sup>	1.49±0.07 <sup>ae</sup>	0.84±0.07 <sup>abcde</sup>
<b>T12</b>	178.89±7.00 <sup>fj</sup>	1.32±0.06 <sup>bcij</sup>	0.63±0.01 <sup>aij</sup>

Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se razlikuju statistički značajno prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ ;

Uzorci: **T1**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T2**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T3**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana; **T4**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T5**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T6**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana, **T7**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T8**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T9**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana; **T10**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T11**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T12**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana.

<sup>a</sup>Sadržaj ukupnih polifenola, izražen kao miligram ekvivalenta galne kiseline na litar uzorka

<sup>b</sup>Ukupni antioksidativni kapacitet izražen kao mmol Troloxa.

Analizom korelacije između rezultata sadržaja ukupnih polifenola (TPC) i antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP i DPPH metodom uzoraka specijalnih rakija

sa ekstraktima bilja (Tabela 31), utvrđena je visoka korelacija između ovih uzoraka ( $r_{\text{TPC-DPPH}}=0.833$ ,  $r_{\text{FRAP-DPPH}}=0.734$ ). Možemo zaključiti da sadržaj ukupnih polifenola ima važan uticaj na antioksidativni kapacitet određivan metodom DPPH, dok je sadržaj ukupnih polifenola imao manje značajan uticaj na rezultate AO određivane FRAP metodom. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da metode nisu podjednako selektivne i sa povećanjem sadržaja polifenola, antioksidativni kapacitet se ne povećava srazmerno kod svih analiziranih uzoraka. Bilje sadrži veliki broj hemijskih jedinjenja koja povećavaju antioksidativni kapacitet, koje po hemijskom sastavu ne pripadaju polifenolima.

**Tabela 31.** Korelacija rezultata analiza TPC i AO uzoraka specijalnih rakija sa ekstraktima bilja

Analize	FRAP		DPPH	
	r	p	r	p
TPC	0.598	0.000	0.833	0.000
FRAP			0.734	0.000

Podaci o sadržaju ukupnih fenola i AO jakih alkoholnih pića za čiju proizvodnju je korišćena gljiva *G. lucidum* nisu dostupni u literaturi. U radu smo analizirali sadržaj ukupnih polifenola komercijalnih vinjaka i travarica da bi uporedili sa rezultatima uzoraka specijalnih rakija. Na osnovu rezultata možemo zaključiti da svi uzorci travarica sa dodatkom gljive statistički značajno sadrže veću količinu ukupnih polifenola i imaju veći AO od komercijalnih travarica pod nazivom Stomaklija i Pelinkovac i vinjaka Gardoša. Uzorak Vinjaka Gardoš sadrži statistički značajnu količinu polifenola u odnosu na uzorake T1 i T4, šljivove i lozove prepečenice. Liker biter 55 sadržao je statistički značajno veću količinu ukupnih polifenola u odnosu na uzorke travarica sa *G. lucidum*, ali AO određivana pomoću FRAP metode se statistički značajno ne razlikuje od uzoraka travarica sa *G. lucidum*, a AO određivana pomoću DPPH metoda je statistički značajno veća. Možemo zaključiti da uzorci sa ekstraktom bilja sadrže veliki broj jedinjenja koja povećavaju AO uzorka, ali metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta nisu podjednako selektivne.

**Tabela 32.** Antioksidativni kapacitet komercijalnih jakih alkoholnih pića

Uzorci	Metode		
	TPC (mg/L GAE) <sup>a</sup>	FRAP (FRAP jedinice)	DPPH (mmol TE) <sup>b</sup>
<b>EB</b>	3780.56±19.25	37.04±0.78	19.71±0.66
<b>Vinjak</b>	134.72±10.22	0.80±0.03	0.29±0.01
<b>Gardoš</b>	168.17±14.81	1.10±0.01	0.47±0.08
<b>stomaklija</b>	108.83±1.92	0.66±0.02	0.35±0.01
<b>B55</b>	474.89±8.80	1.42±0.09	7.70±0.28
<b>Gorki list</b>	56.50±0.44	0.14±0.02	-

Uzorci: **EB** - ekstrakt bilja; Vinjak – vinjak proizvođač ogledno dobro Radmilovac; Gardoš-vinjak proizvođač ogledno dobro Radmilovac; Stomaklija-travarica proizvođač Prokupac; B55-gorki liker sa dodatkom 54 bilja i gljivom *G.lucidum*; Gorki list – monotravarica proizvođač Si&Si.

### 5.5.2. ANALIZA AROMATSKIH JEDINJENJA SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM GLJIVE *G. lucidum*

Veliki broj lekovitog i aromatičnog bilja se koristi za aromatizaciju jakih pića. Dodatkom bilja menja se miris i ukus proizvoda usled kombinovanja aromatskog kompleksa alkoholne osnove i upotrebljenih biljnih sirovina. U datom eksperimentu analizirali smo uticaj biljne mešavine na isparljive komponente specijalnih rakija sa *G. lucidum*. Rezultati GC-MS analize prikazani su u tabeli 33.

GC-MS analizom travarica sa gljivom *G.lucidum* detektovana su sledeća jedinjenja koja specijalne rakije nisu sadržale: dekanol, anetron, etil-tetradekanoat, etil-stearat, heksanal, terpinen-4-ol, neomentol, spatulenol, vanilin, oleinska kiselina i linolna kiselina.

Zbog upotrebe različitih alkoholnih osnova za proizvodnju travarica dominantna jedinjenja u analiziranim uzorcima se razlikuju. Najzastupljenija jedinjenja kod uzorka T3 za čiju proizvodnju je korišćena žitna rakija su viši alkoholi 3-metil-butanol (izoamil alkohol) i 2-metil-propanol (izobutanol). Uzrok T6 za čiju proizvodnju je korišćena šljivova rakija je senzorno najlošije ocenjen uzorak sa konačnom senzornom ocenom 17.95. Dominatno jedinjenje u sastavu ovog uzorka je izoamil-alkohol (63.75 mg/L), koji uzorku

daje patočni ton (Nikićević i Paunović, 2013). U manjoj koncentraciji u T6 uzorku detektovani su 1-propanol i 2-metil-propanol, koji daju zapaljajući i alkoholni ukus, respektivno (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). Na osnovu rezultata GC-MS analize, možemo zaključiti da sadržaj datih jedinjenja negativno utiče na konačnu senzornu ocenu uzorka.

**Tabela 33.** Aromatične komponente uzorka travarica sa dodatkom gljive *G.lucidum* (mg/L)

SASTOJAK	T3	T6	T9	T12	SASTOJAK	T3	T6	T9	T12
Acetaldehid	0.09	-	0.30	0.07	mentol neo	-	0.48	0.11	-
Aceton	-	1.31	-	5.42	dekanol	-	0.180	-	0.07
1.1-dietoksi etan- 2-pentanon	-	0.17	15.15	0.41	anetron (E)	0.05	0.04	-	-
1-propanol	1.00	25.93	3.60	5.84	heksanal	-	-	-	0.03
2-metil-propanol	10.81	22.89	0.36	22.79	terpinen - 4 ol	-	0.04	-	0.06
n-butanol	-	1.19	25.64	0.43	neomentol	-	0.48	-	1.66
3-penten- 2-ol	0.39	0.53	0.11	0.02	spatulenol	-	0.07	-	-
Izoamil alkohol	3.13	63.75	0.22	-	vanilin	-	-	1.40	-
1-pentanol	0.01	0.13	-	0.21	dekanska kiselina	0.17	0.85	-	-
etil-laktat	0.17	11.64	0.17	1.88	dodekanska kiselina	0.22	0.79	-	2.54
Heksanol	-	0.48	0.25	2.98	heksadekanska kiselina	1.75	1.12	2.52	1.25
propil-acetat	-	0.08	-	0.19	oleinska kiselina	-	-	0.21	-
etil-acetat	-	0.04	39.03	0.01	linolna kiselina	-	-	0.54	-
izoamil-acetat	-	-	-	0.89	oktanska kiselina	0.08	0.67	4.98	1.80
sirćetna kiselina	0.06	2.23	0.14	0.22	heksanska kiselina	-	0.14	0.37	-
Furfural	0.15	1.09	0.30	0.26	metil-linoleat	3.25	-	0.47	0.21
Benzalaldehid	0.03	1.25	0.19	0.14	metil-linolat	-	3.03	-	3.84
Linalool	-	0.05	-	0.38	metil-salicilat	-	0.08	-	-
menten (3p)	0.02	0.06	-	0.15	etil-salicinat	-	0.07	-	-
dietil-sukcinat	-	1.25	0.08	0.23	etil-teradekanoat	1.01	0.67	-	-
$\alpha$ -terpineol	-	0.24	-	0.10	etil-stearat	0.08	-	-	-
etil-cinamat	-	0.08	-	0.34	etil-tertradekanoat	-	0.08	-	0.24
eugenol	0.56	0.88	0.22	0.58	etil -dodekanoat	0.17	-	-	-
benzil-alkohol	0.09	2.26	0.16	0.12	etil-oleat	-	2.27	-	1.38
fenil-etanol	0.05	2.12	0.26	1.33	etil-dekanoat	0.13	0.19	-	0.60
Fitol	0.16	-	-	-	etil-benzoat	-	0.43	-	-
					etil-heksanoat	0.02	-	-	-

Uzorak T9 za čiju proizvodnju kao osnova korišćena lozova rakija, kao najzastupljenije jedinjenje sadrži n-butanol i etil-acetat (39.03 mg/L) i 1.1-dietoksi etan. Etil acetat uzorcima jakih pića daje miris na razređivač i njegov prag detekcije u etanolnom rastvoru je 7.5 mg/L. U aromatskom sastavu uzorka T9 detektovano jedinjenje vanilin koje uzorku daje prijatnu aromu vanile. Vanilin spada u kvaternerna jedinjenja, ekstrahovan iz hrastovih buradi u kojima su jaka alkoholna pića sazrevala (Christoph i Bauer-Christoph, 2007). U aromatskom sastavu uzorka T12 najzastupljenija su jedinjenja 1-propanol, 2-metil-propanol i aceton.

Uzorci travarica za čiju je proizvodnju korišćena i gljiva *G.lucidum* sadrže širok spektar etil-estra masnih kiselina, koje daju prijatan voćni i cvetni miris uzorcima (Karagiannis i Lanaridis, 2002). Kvalitativni i kvantitativni sastav etil-estara varira u uzorcima u zavisnosti od korišćene alkoholne baze.

Na osnovu rezultata GC-MS analize uzoraka može se zaključiti da korišćena osnova u mnogome definiše aromatski sastav uzoraka. Alkoholni medijumi u zavisnosti od korišćenih sirovina i tehnoloških postupaka se međusobno razlikuju po kvantitativnom i kvalitativnom sastavu aromatskih jedinjenja. U toku procesa starenja hemijska jedinjenja međusobno reaguju i dolazi do analize postojećih i sinteze novih jedinjenja, tokom kojih se hemijski sastav uzoraka vremenom menja.

### 5.5.3. SENZORNA ANALIZA SPECIJALNIH TRAVARICA

U radu je ispitivan uticaj ekstrakta bilja na senzorne karakteristike specijalnih rakija za čiju je proizvodnju korišćena gljive *G.lucidum* (40 g/L) ekstrahovana u različitim vremenskim periodima. Senzorne ocene analiziranih uzorka iznosile su od 16.85 do 18.55, što je veoma dobar rezultat na osnovu koga može se zaključiti da aromatične materije bilja senzorno obogaćuju i oplemenjuju uzorke specijalnih rakija. Najbolje ocenjeni uzorak je T5 za čiju proizvodnju je korišćena lozova rakija i gljiva ekstrahovana tokom 21 dana, dok kod

uzoraka T4 i T6 za čiju osnovu je korišćena lozova rakija nije došlo do značajnog poboljšanja senzornih karakteristika.

**Tabela 34.** Senzorna analiza specijalnih travarica

Uzorci	Senzorne karakteristike					
	boja	bistrina	tipičnost	miris	ukus	ukupno
<b>Stomaklija</b>	1	1	2	5.50±0.03	8.30±0.05	17.80±0.05 <sup>a</sup>
<b>T1</b>	1	1	2	5.60±0.05	8.90±0.03	18.50±0.08 <sup>b</sup>
<b>T2</b>	1	1	2	5.45±0.02	7.40±0.08	16.85±0.15
<b>T3</b>	1	1	2	5.65±0.08	8.70±0.05	18.35±0.06 <sup>bc</sup>
<b>T4</b>	1	1	2	5.35±0.15	8.65±0.01	18.10±0.04 <sup>d</sup>
<b>T5</b>	1	1	2	5.60±0.07	8.95±0.03	18.55±0.07 <sup>bc</sup>
<b>T6</b>	1	1	2	5.45±0.04	8.50±0.02	17.95±0.07 <sup>a</sup>
<b>T7</b>	1	1	2	5.50±0.06	8.70±0.01	18.20±0.06 <sup>cde</sup>
<b>T8</b>	1	1	2	5.40±0.02	8.50±0.05	17.90±0.07 <sup>a</sup>
<b>T9</b>	1	1	2	5.60±0.10	8.50±0.07	18.10±0.11 <sup>ef</sup>
<b>T10</b>	1	1	2	5.50±0.03	8.60±0.04	18.25±0.07 <sup>cdefg</sup>
<b>T11</b>	1	1	2	5.50±0.03	8.60±0.01	18.10±0.04 <sup>defge</sup>
<b>T12</b>	1	1	2	5.50±0.07	8.70±0.03	18.20±0.06 <sup>efge</sup>

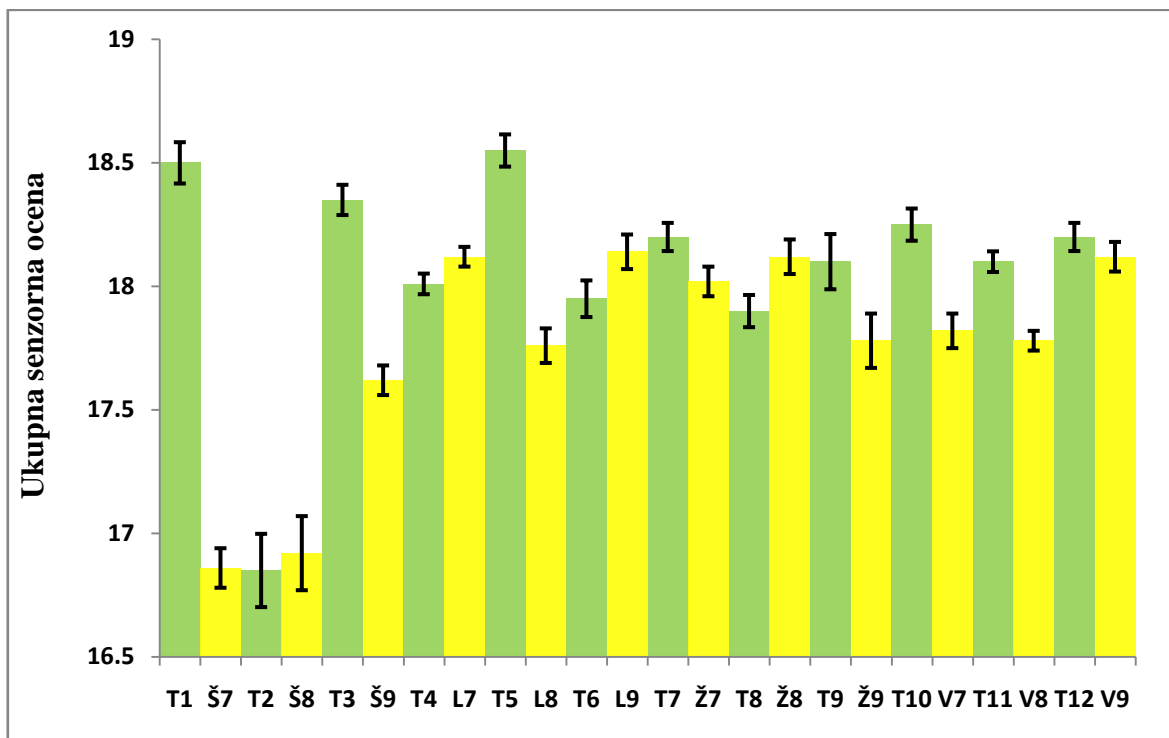
Različitim slovima u istoj koloni označeni su uzorci, koji se razlikuju statistički značajno prema Tukey's test, sa značajnošću  $p < 0.01$ . **Uzorci:** **Stomaklija**–travarica sa dodatkom 40 g/L gljive *G.lucidum* ekstrahovane tokom 60 dana; **T1**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T2**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T3**- travarica proizvedena od šljivove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana; **T4**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T5**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T6**- travarica proizvedena od lozove prepečenice sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana; **T7**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T8**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T9**- travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana; **T10**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 7 dana; **T11**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 21 dana; **T12**- travarica proizvedena od vinskog destilata sa 40 g/L *G.lucidum* maceriranom 60 dana.

Na srpskom tržištu može se naći veliki broj travarica, ali najpoznatija se prodaje pod nazivom Stomaklija i proizvedena je od šljivove prepečenice oplemenjene sa deset odabranih lekovitih trava. Travarici Stomakliji smo dodali 40 g/L gljive *G.lucidum* da bi uporedili senzorni potencijal uzoraka travarica sa gljivom *G.lucidum*. Rezultati senzorne analize su prikazani u Tabeli 34. Ukupna ocena senzorne analize uzoraka je ispitivana

jednofaktornom analizom varijanse (ANOVA), a razlike sredina su određene Tuckey's testom. Rezultati analize varijanse ANOVA ( $F=160$ ,  $p=0.00$ ) ukazuju da postoji statistički značajna razlika između uzoraka. Između uzorka Stomaklije sa dodatkom gljive *G.lucidum* ne postoji statistički značajna razlika sa uzorcima T6 i T8. Na osnovu upoređenja senzorne ocene uzoraka specijalnih rakija i travarice Stomaklije kojima je dodata gljiva, možemo zaključiti da senzorno su kompatibilnija jedinjenja gljive i ekstrakt bilja u uzorcima specijalnih travarica. Sastav biljne mešavine dodate specijalnim rakijama je kompleksiji u odnosu na sastav travarice Stomaklije, pa je aroma ovih uzorka plemenitija.

Na grafiku 3 predstavljeni su uzorci specijalnih rakija (žute kolone) i uzorci travarica (zele kolone), travarice su napravljene od specijalnih rakija kojima je dodat ekstrakt bilja. Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da dodatkom ekstrakta bilja senzorna ocena se značajno povećava. Komponente biljne mešavine značajno oplemenjuju senzorne karakteristike uzoraka T1 i T3 za čiju proizvodnju su korišćeni uzorci specijalnih šljivovih rakija sa *G.lucidum*. Senzorna ocena uzorka T2 za čiju proizvodnju je korišćena šljivova rakija dodatkom bilja je smanjena, komponente biljne mešavine imale su negativan efekat na senzorne karakteristike ovog uzorka. Vreme ekstrakcije gljive imalo je najmanji uticaj na senzornu ocenu uzoraka specijalnih rakija pripremljenih od vinskog destilata. Kod uzoraka travarica pripremljenih od specijalnih rakija kod kojih je vreme ekstrakcije gljive *G.lucidum* bilo 21 dan, senzorna ocena je manja u odnosu na uzorke pripremljenih od istih alkoholnih osnova kod kojih je ekstrakcija obavljena tokom 7 ili 60 dana. Izuzetak je uzorak T5 za čiju osnovu je korišćena lozova rakija sa dodatkom gljive *G.lucidum* i koji je senzorno najbolje ocenjeni uzorak travarica. Na osnovu rezultata senzornih analiza možemo zaključiti da gorki ekstrakt bilja ima delotvorniji efekat ukoliko je uzorak specijalnih rakija lošije ocenjen.





**Grafiku 3.** Ukupna senzorna ocena uzoraka specijalnih rakija i specijalnih rakija sa dodatkom bilja

## 5.6. ANTIMIKROBNO DEJSTVO EKSTRAKTA I SPECIJALNIH RAKIJA SA DODATKOM *G. LUCIDUM*

Rezultati antimikrobnog dejstva selektovanih uzorka ekstrakta *G.lucidum*, specijalnih rakija sa *G.lucidum*, specijalnih travarica sa dodatkom gljive *G.lucidum* i ekstrakta bilja na standardne sojeve mikroorganizama prikazani su u tabeli 35. Slepa proba pokazuje da dimetilsulfoksid (DMSO) nije pokazivao nikakvu antimikrobnu reakciju na ispitivane mikroorganizme.

**Tabela 35.** Antimikrobna aktivnost selektovanih uzorka izražena preko dijametra inhibicije rasta (u mm)

Mikroorganizam	E3	Ž9	T9	Eb
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 31806	9.33±0.58*	-	-	8.67±0.58*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 35032	7.67±0.58*	-	7.67±0.58 <sup>+</sup>	13.00±1.00*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	8.33±0.58 <sup>+</sup>	-	8.00±1.00 <sup>+</sup>	17.00±1.00*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	8.68±0.58 <sup>+</sup>	-	8.67±0.58 <sup>+</sup>	17.00±1.00*

Vrednosti zona su predstavljene kao srednja vrednost ± Sd. \*stimulacija, +inhibicija, - nema reakcije  
**Uzorci:** **E3-** E3 – 40 g/L seckane gljive je ekstrahovano tokom 30 dana na sobnoj temperaturi na tamnom mestu; **Ž9-** žitni alkohol sa 40 g/L *G. lucidum* ekstrahovana 60 dana **T9-** travarica proizvedena od žitnog alkohol sa 40 g/L *G. lucidum* maceriranom 60 dana; **Eb-** ekstrakt bilja.

Etanolni ekstrakt *G. lucidum* (E3) inhibitorno je delovao na G + bakterije *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a stimulatívno dejstvo je imao na rast G (-) bakterija *Salmonella enteritidis* ATCC 31806 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa ranijim rezultatima Kosanića i Rankovića (2011) koji su pokazali da su Gram+ bakterije osetljivije na različite ekstrakte pečuraka u odnosu na G- bakterije zbog građe ćelijskog zida u kome one ne sadrže lipoproteine. Keypour i saradnici (2008) su utvrdili da hloroformni ekstrakt ima antimikrobno dejstvo na G + bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) i na G - bakterije (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), dok analizirani etanolni ekstrakt nije imao antimikrobno dejstvo na *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032.

Rezultati antimikrobnog dejstva uzorka etanolnog ekstrakta E3 su u saglasnosti sa ranijim istraživanjima Turkoglu i saradnika (2007) koji su ustanovili da su polifenoli glavni nosioci antimikrobnog dejstva ekstrakata pečuraka. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktu gljive E3 (647.88 mg/L EGA) je bio znatno veći u odnosu na uzorak žitne rakije (118.10 mg/L EGA).

Uzorak specijalne travarice T9 pripremljen sa dodatkom 40 g/L gljive *G. lucidum* i ekstrakta bilja pokazivao je inhibitorno dejstvo na *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, a nije

delovao na rast bakterije *Salmonella enteritidis* ATCC 31806. Sadržaj ukupnih polifenola uzorka T9 iznosio je 209.00 mg/L EGA.

Uzorak bilja Eb iako ima najveći sadržaj ukupnih polifenola u svom sastavu pokazao je stimulatívno dejstvo na rast mikroorganizama. Efekat stimulacije je bio izraženiji na rast ispitivanih G+ organizama *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 u odnosu na ispitivane G- bakterije *Salmonella enteritidis* ATCC 31806 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032.

Na osnovu rezultata antimikrobne aktivnosti ispitivanih uzorka, može se zaključiti da uzorak travarica sa gljivom *G.lucidum* imao najefikasnije antimikrobno dejstvo na ispitivane mikroorganizme.

## **5.7. POSTUPAK ISPITIVANJA ANTIPROLIFERATIVNOG POTENCIJALA KOMPLEKSA OBOGAĆENOG *G. lucidum***

U terapiji pacijenata najčešće se koriste ekstrakti u obliku kompleksne mešavine sa nedefinisanim hemijskom kompozicijom, koja može sadržati više od 100 aktivnih molekula. Većina potencijalnih imunomodulatora i/ili antioksidanata poseduje i hemopreventívno i tumoricidno dejstvo (Gao i saradnici, 2004b; Min i saradnici, 2000b; Zhu i saradnici, 2000). Upoređivanjem antikancerogenog dejstva ekvivalentne doze frakcija polisaharida i sirovog ekstrakta utvđeno je da sirovi ekstrakt je efikasniji. Pretpostavlja se da mnogobrojne komponente ekstrakta imaju sinergistično dejstvo i povećavaju biološku aktivnost (Liu i saradnici, 2002). Različit efekat ekstrakta može biti uslovljen sastavom smeše triterpena, jer je aktivnost triterpena zavisna od strukture (Gan i saradnici, 1998).

Lu i saradnici (2004) su ispitivali efikasnost inhibiranja poliferacije ćelija kancera ekstraktima gljive *G. lucidum* koristeći MTT test. Efikasnost delovanja etanolnog ekstrakta plodonosnog tela gljive, etanolnog ekstrakta spora, vodenog ekstrakta spora i vodenog ekstrakt plodonosnog tela na HUC-PC ćelije izražena je IC<sub>50</sub> vrednostima iznosila su 325,

521, 362 i 1000  $\mu\text{g/ml}$ , respektivno. Efikasnost delovanja etanolnog ekstrakta plodonosnog tela gljive, etanolnog ekstrakta spora, vodenog ekstrakta spora i vodenog ekstrakta plodonosnog tela na MTC-11 ćelije izražena je  $\text{IC}_{50}$  vrednostima iznosila su 129.3, 274.7, 365.4 i 509  $\mu\text{g/ml}$ , respektivno. Na osnovu  $\text{IC}_{50}$  vrednosti, Lu i saradnici (2004) su zaključili da netransformisane ćelije HUC-PC su više otporne na citotoksičnost etanolnog ekstrakta nego MTC-11. Ispitivan je efekat sirovog metanolnog ekstrakta na L1210 i LLC ćelijske linije i ustanovljeno je da su  $\text{IC}_{50}$  vrednosti 15 i 10  $\mu\text{g/ml}$  (Tomasi i saradnici, 2004), a  $\text{IC}_{50}$  vrednost za dejstvo komercijalnog ekstrakta na PC-3 ćelijskoj liniji iznosila je 250  $\mu\text{g/ml}$  (Jiang i saradnici, 2004). Zhu i saradnici (2000) ispitivali su uticaj alkoholnog ekstrakta razbijenih spora na HeLa ćelijske linije i ustanovili da je  $\text{IC}_{50}$  vrednost 4460  $\mu\text{g/ml}$ .

Alkoholni ekstrakt *G. lucidum* inhibira poliferaciju kod MCF-7 ćelija humanog kancera dojke vremenski i dozno zavisno. Posle 48 h tretmana sa 500  $\mu\text{g/ml}$ , alkoholni ekstrakt je skoro 70% inhibirao rast ćelija u poređenju sa kontrolnim uzorkom (Hu i saradnici, 2002).

U radu ispitivan je antiproliferativni efekat liofilizovanih uzoraka ekstrakta gljive (E2 i E6) i šljivove rakije obogaćene jedinjenjima gljive *G. lucidum* i mešavine bilja (T3) na ćelijske humanog carcinoma grlića materice (HeLa). Rezultati su prikazani u tabeli 36. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da uzorci E2 i T3 imaju vremenski i dozno zavisno delovanje, dok je dejstvo uzorka E6 samo dozno zavisno. Najefikasnije dejstvo pokazivao je uzorak T3, čije dejstvo će biti ispitano i na FemX, A549 i EA.hy 926 ćelijske linije. Dejstvo preparata zavisno je i od ćelijskih linija koje su korišćenje, tako upoređivanjem  $\text{IC}_{50}$  vrednosti za dejstvo alkoholnog ekstrakta razbijenih spora na HeLa ćelijske linije sa dejstvom analiziranih uzoraka može se zaključiti da su uzorci E3, E6 i T3 značajno efikasniji.

**Tabela 36.** Antiproliferativni potencijal ekstrakata gljive *G.lucidum* i specijalne rakije obogaćene kompleksom gljive *G. lucidum* i lekovitim biljem ispitivan na HeLa ćelijskim linijama

Uzorak	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	
	24h	48h
<b>E2</b>	364.8±1.5	244.3±3.7
<b>E6</b>	394.3±4.5	335.5±11.5
<b>T3</b>	212.7±8.9	123.8±8.4

IC<sub>50</sub> - označava koncentraciju pri kojoj supstanca ubija 50% tumorskih ćelija.

Ispitivan je antiproliferativni efekat liofilizovanog uzorka šljivove rakije obogaćenog jedinjenjima gljive *G. lucidum* i mešavine bilja (T3) (tabela 37). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je dejstvo uzorka dozno i vremenski zavisno. Najefikasnije dejstvo uzorak je imao na HeLa ćelije za koje IC<sub>50</sub> vrednost za 24 h iznosi 212.7 µg/ml. Sa povećanjem perioda delovanja IC<sub>50</sub> vrednost se smanjuje, pa je ustanovljen da je potrebna manja količina uzorka za postizanje istog efekta. Na osnovu IC<sub>50</sub> vrednosti rangirano je dejstvo uzorka T3 na ćelijske linije: HeLa >FemX>EA.hy 926>A549.

Na ćelijama humanog melanoma FemX ispitivan je uticaj liofilizovanog ekstrakta mešavine bilja (EB) ustanovljeno je da je nakon 24 h IC<sub>50</sub> vrednost iznosi 775.7 µg/ml. Poređenjem rezultata vrednosti za IC<sub>50</sub> vrednost uzorka T3 i EB, može se zaključiti da uzorak T3 ima jače antikancerogeno dejstvo u datim uslovima.

**Tabela 37.** Antiproliferativni potencijal specijalne rakije obogaćene kompleksom gljive *G. lucidum* i lekovitim biljem

Ćelijske linije	IC <sub>50</sub> [µg/ml]	
	24 h	48 h
<b>EA.hy 926</b>	305.3±8.9	204.0±3.7
<b>A549</b>	376.0±7.8	177.1±8.5
<b>FemX</b>	240.9±4.5	110.5±3.8
<b>HeLa</b>	212.7±8.9	123.8±8.4

Kulture ćelija: **Hela** -ćelije humanog karcinoma grlića materice, **FemX** -ćelije humanog melanoma, **A549** -ćelije adenokarcinoma pluća; **EA.hy 926** -transformisane endotelijalne linije humanog.

Efekat sirovog metanolnog ekstrakta na L1210 i LLC ćelijske linije (Tomasi i sardanici, 2004) je značajno efikasniji u odnosu na dejstvo uzorka T3 na ispitivane ćelijske linije. IC<sub>50</sub> vrednosti za dejstvo komercijalnog ekstrakta na PC-3 ćelijske linije (Jiang I saradnici, 2004) bile su neznačajno veće od IC<sub>50</sub> vrednosti za dejstvo uzorka T3 za FemX i HeLa ćelijske linije, a efikasnije u odnosu na dejstvo na Ea.hy 926 i A549.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu je analizirana mogućnost korišćenja viševjekovnog iskustva azijskih naroda u proizvodnji jakih pića sa dodatkom gljive *G.lucidum* i njegovu primenu u proizvodnji tradicionalnih srpskih rakija.

Na osnovu postavljenih ciljeva u radu dobijeni su sledeći rezultati:

- Na osnovu analize sadržaja ukupnih polifenola uzoraka specijalnih rakija za čiju proizvodnju su korišćeni lozova i šljivova prepečenica, žitna rakija i vinski destilat kao alkoholni medijumi u kojima je macerirana gljiva *Ganoderma lucidum* u koncentracijama od 1, 2.5 i 4 %, koja se ekstrahovala tokom 7, 21 i 60 dana može se zaključiti, da dodatkom gljive dolazi do statistički značajnog povećanja sadržaja fenola u svim uzorcima u odnosu na polazne medijume. Sa povećanjem koncentracije dodate gljive povećava se i sadržaj polifenola, ali sa povećanjem dodate količine gljive potreban je duži period za kompletniju ekstrakciju analiziranih komponenti. Izuzetak je vinski destilat kod koga je ekstrakcija polifenolnih materija sa 4% gljive završena nakon 7 dana.
- Vreme ekstrakcije za uzorke sa istom koncentracijom dodate gljive imalo je različit uticaj na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativno kapacitet u odnosu na korišćeni medijum. Optimalno vreme ekstrakcije se za iste koncentracije razlikovalo u odnosu na primenjeni medijum. Analizom korelacije između rezultata sadržaja ukupnih fenola (TPC) i antioksidativnog kapaciteta određenog FRAP, DPPH i TEAC metodom uzoraka specijalnih rakija i vinjaka, utvrđena je visoka korelacija između ovih uzoraka ( $r_{\text{TPC-FRAP}}=0.9702$ ,  $r_{\text{TPC-DPPH}}=0.9618$ ,  $r_{\text{TPC-TEAC}}=0.9462$ ). Na osnovu rezultata zaključuje se da sadržaj ukupnih polifenola ima važan uticaj na antioksidativni kapacitet uzoraka i sa povećanjem sadržaja polifenola povećava se i antioksidativnost uzoraka. Najveći sadržaja ukupnih polifenola i ujedno najveću antioksidativnost imali su uzorci sa 4% gljive. Najveći sadržaj ukupnih polifenola imao je uzorak vinskog destilata V7 sa 4% *G.lucidum* ekstrahovane tokom 7 dana

(148 mg/L GAE), antioksidivni kapacitet za dati uzorak određivan DPPH, FRAP i TEAC metodom iznosio je 0,641 mM TE, 1.852 FRAP jedinica i 3.963 mM TE, respektivno.

- Ispitivanjem uticaja vremena ekstrakcije, veličine čestica ekstrahovane gljive i temperature ekstrakcije određeni su optimalni uslovi za dobijanje ekstrakta sa najvećim sadržajem polifenolnih jedinjenja i sa najboljim aromatskim kompleksom. Kod krupnih čestica (seckanih) sa povećanjem vremena ekstrakcije povećava se sadržaj fenola sa povećanjem aktivne površine usled prodora etanola unutar čestice. Sadržaj gorkih triterpenskkih kiselina se sa povećanjem vremena ekstrakcije značajno smanjuje kod uzoraka ekstrakata proizvedenih od seckane gljive, pa se gorčina kod analiziranih uzoraka smanjuje. Seckana *G. lucidum* se pokazala kao efikasnija sirovina za proizvodnju ekstrakata. Uzorak sa najboljim aromatskim kompleksom i najvećim sadržajem fenolnih materija je uzorak napravljen od seckane gljive ekstrahovane tokom 30 dana (E3). Sadržaj ukupnih fenola uzoraka E6 napravljenog ekstrahovanjem 40 g/L gljive *Ganoderma lucidum* tokom 24 h na 40°C se statistički neznajno razlikuje u poređenju sa uzorkom E3, ali sadržaj ukupnih i gorkih triterpenskkih kiselina je znatno manji.
- Na osnovu analize antimikrobnog dejstva metodom difuzije sa filter diskova utvrđeno je da etanolni ekstrakt *G.lucidum* (E3) inhibitorno je delovao na G + bakterije *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, a stimulatívno dejstvo je imalo na rast G (-) bakterija *Salmonela enteritidis* ATCC 31806 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032. Uzorak specijalne travarice T9 pripremljen sa dodatkom 40 g/L gljive *G. lucidum* i ekstrakta bilja pokazivao je inhibitorno dejstvo na *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 35032, a nije delovao na rast bakterije *Salmonela enteritidis* ATCC 31806. Najefikasnije antimikrobno dejstvo pokazivao je uzorak specijalnih travarica sa dodatkom 40 g/L gljive, dok uzorak specijalne rakije Ž9 nije pokazivao antimikrobno dejstvo na ispitivane bakterije.



- Ispitivan je antiproliferativni efekat liofilizovanih uzoraka ekstrakta gljive (E2 i E6) i šljivove rakije obogaćene jedinjenjima gljive *G. lucidum* i mešavine bilja (T3) na ćelijske humanog karcinoma grlića materice (HeLa). Nakon tretmana od 24 h  $IC_{50}$  vrednosti za ispitivane uzorke iznosile su 364.8  $\mu\text{g/ml}$  (E2), 394.3  $\mu\text{g/ml}$  (E6) i 212.7  $\mu\text{g/ml}$  (T3), a nakon 48 h 244.3, 335.5 i 123.8  $\mu\text{g/ml}$ , respektivno. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da uzorci E2 i T3 imaju vremenski i dozno zavisno delovanje, dok je dejstvo uzorka E6 samo dozno zavisno. Najefikasnije antiproliferativno dejstvo na HeLa ćelije pokazivao je uzorak T3.
- Antiproliferativni efekat liofilizovanog uzorka šljivove rakije obogaćenog jedinjenjima gljive *G. lucidum* i mešavine bilja (T3) ispitivan je na ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa), ćelije humanog melanoma (FemX), ćelije adenokarcinoma pluća (A549) i transformisane endotelijalne linije humanog (EA.hy 926). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je dejstvo uzorka dozno i vremenski zavisno. Sa povećanjem perioda delovanja  $IC_{50}$  vrednost se smanjuje, pa možemo ustanoviti da je potrebna manja količina uzorka za postizanje istog efekta. Na osnovu  $IC_{50}$  vrednosti rangirali smo dejstvo uzorka T3 na ćelijske linije: HeLa > FemX > EA.hy 926 > A549. Na ćelijama humanog melanoma FemX ispitivan je uticaj liofilizovanog ekstrakta mešavine bilja (EB) ustanovljeno je da je nakon 24 h  $IC_{50}$  vrednost iznosi 775.7  $\mu\text{g/ml}$ . Porđenjem rezultata vrednosti za  $IC_{50}$  vrednost uzorka T3 i EB, može se zaključiti da uzorak T3 ima jače antikancerogeno dejstvo u datim uslovima.
- Maceracijom gljive *Ganoderma lucidum* u vinskom destilatu, šljivovici, lozovači i travaricama dolazi do promene hemijskog sastava i senzornih karakteristika usled prelaska jedinjenja gljive rastvorljivih u alkoholno vodenoj smeši. Na osnovu analize sadržaja ukupnih fenola, antioksidativnih karakteristika i senzornih karakteristika može se zaključiti da ekstrabilna jedinjenja gljive su se najbolje uklapala u hemijskih kompleks vinskog destilata i povećala funkcionalne karakteristike pića, a ujedno oplemenjivala i njihove senzorne karakteristike. Vinski

destilati obogaćeni gljivom *G.lucidum* imaju najujednačenije senzorne ocene i najveći intenzitet boje koji se kod uzorka sa 4% postiže nakon 7 dana ekstrakcije. Vinski destilat se pokazao kao najbolja alkoholna sirovina za proizvodnju specijalnih travarica sa gljivom *G.lucidum*.

- Uzorci ekstrakata napravljeni dodavanjem seckane gljive sadržali su neznatno veću količinu ukupnih i  $\beta$ -glukana u odnosu na uzorke napravljene od mlevene gljive. Najveći sadržaj ukupnih i  $\beta$ -glukana imao je uzorak E1 (18.56 mg/g), a najmanji uzorak E6 (9.438 mg/g). Vreme ekstrakcije ima veliki uticaj na sadržaj glukana, sa povećanjem vremena ekstrakcije njihova količine se povećavala, ali do izvesne granice nakon koje dolazi do smanjenja njihove količine. Udeo  $\beta$ -glukana koji se nalazi u analiziranim ekstraktima je veoma mali. Kod uzoraka napravljenih od seckane i mlevene gljive ekstrakcija  $\alpha$ -glukana je završena nakon 15 dana. Kod uzoraka seckane gljive nakon 15 dana ekstrakcije došlo je do neznatnog povećanja, a kod uzoraka mlevene gljive do znatnog pada u sadržaju ovih komponenti. Sadržaj saharoze i fruktoze u uzorcima je manji od 0.5 g/L. Sadržaj šećera glukoze u uzorcima E1, E2, E3 i E6 je detektovan. Uzorci E1 i E3 sadrže 0.7 g/L i napravljeni su sa seckanim uzorcima gljive, a u uzoraku E5 koji je ekstrahovan tokom 24 h na temperaturi od 40°C nije detektovana količina iznad 0.5 g/L.
- Proizvodnjom specijalnih pića sa gljivom *Ganoderma lucidum* dolazi do kvalitativnih i kvantitativnih promena u aromatskom i hemijskom kompleksu tokom postupka sazrevanja. Ekstahovana jedinjenja gljive imaju veći uticaja na koncentraciju komponenti koje čine aromatski kompleks pića u odnosu na kvalitativni sastav. U svim uzorcima jakih pića sa dodatom gljivom detektovan je alkohol heksanol, koga je u početnim medijumu sadržala samo lozova prepečenica, a kod koje je povećana koncentracija. Izoamil acetat nije detektovan kod alkoholnih pića sa gljivom, iako su ga svi polazni medijumi sadržali. Sadržaj kiselina se povećao kod svih uzorka, kao i u pojedinim se detektuju kiseline koje u

polaznim medijumima nisu određene. Dolazi do reakcije kiselina i alkohola i nastaju estri, koji obogaćuju aromu pića. Iako se kod lozove prepečenice nakon dodatka gljive koncentracija izoamil alkohola smanjuje, nakon dodatka gljive ovo jedinjenje je najdominantnije u uzorcima specijalnih rakija. U alkoholno vodenoj smeši odigrava se veliki broj reakcija, među kojima je nastanak acetala 1.1-dietoksi etana u reakciji acetaldehida sa etanolom, tako da u svim analiziranim uzorcima sadržaj datog acetala povećava i redukuje se opor miris. Furfural se detektuje u svim uzorcima sa dodatkom gljivom, a u alkoholnim medijumima u kojima je detektovan dolazi do povećanja koncentracije. U uzorcima specijalnih rakija detektovana su jedinjenja eugenol i furfural, koji spadaju u karakteristične kvaternerne materije detektovane u jakim pićima nakon sazrevanja u drvenim buradima. Korišćena alkoholna osnova u mnogome definiše aromatski sastav uzoraka specijalnih rakija i travarica sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum*. Alkoholni medijumi u zavisnosti od korišćenih sirovina i tehnoloških postupaka se međusobno razlikuju po kvantitativnom i kvalitativnom sastavu aromatskih jedinjenja. U toku procesa starenja hemijska jedinjenja međusobno reaguju i dolazi do analize postojećih i sinteze novih jedinjenja, tokom kojih se hemijski sastav uzoraka vremenom menja.

- Etanolni ekstrakti mogu biti interesantna zamena karamelu, koji se danas koristi za standardizaciju boje jakih alkoholnih pića. Na osnovu datih rezultata može se zaključiti da u zavisnosti od načina proizvodnje ekstrakti imali su različit uticaj na intenzitet boje žitne rakije. Za iste količine dodatog ekstrakta efikasnije dejstvo imaju ekstrakti napravljeni od mlevene gljive. Najefikasnije efekat na intenzitet boje uzoraka pri dodatim malim količinama imao je ekstrakt od mlevene gljive koja je ekstrahovana tokom 24 h na temperaturi 40°C. Na osnovu rezultata može se zaključiti da usled vakum uparavanja, dolazi do degradacije ili gubitka bojenih materija. Da bi dodatkom ekstrakta postigli isti intenzitet boje kao maceracijom 1 % gljive tokom 7 dana u žitnom alkoholu neophodno je dodati 10 - 15 % u zavisnosti od korišćenog ekstrakta gljive. Dodatkom većih količina ekstrakta intenzitet boje se

povećava kod ispitivanih uzoraka. Doziranje je veoma veliko i efekasnije je dodavanje neprerađene gljive.

Na osnovu prikazanih podataka jasno je da je *Ganoderma lucidum* interesantana sirovina za proizvodnju jakih alkoholnih pića, dodatkom ove gljive dobijamo senzorno prihvatljiva pića sa poboljšanim funkcionalnim karakteristikama. Vinski destilat je najpogodnija alkoholna baza, jer su se ekstrabilna jedinjenja gljive najbolje uklapala u njegov hemijskih kompleks i oplemenjivala senzorne karakteristike.

## 7. LITERATURA

1. Adaskaveg J.E. i Ogawa J.M. (1990) Wood decay pathology of fruit and nut trees in California. *Plant Disease*, 74:341-352.
2. Adaskaveg J.E., Blanchette, R.W., Gillertson, R.L. (1991) Decay of date palm by white-rot and brown-rot fungi. *Canadian Journal of Botany*, 69:615-629.
3. Adaskaveg J.E., Miller R.W., Gillertson, R.L. (1993) Wood decay, lignicolous fungi and decline of peach trees in South Carolina. *Plant disease*, 77:707-711.
4. Ahmed S. (1995) Antioxidative stress and antioxidative diffence in biology. Chapman and Call, New York.
5. Alañón M. E., Castro-Vázquez L., Maroto D.M.C., Gordon M.H., Coello M.S.P. (2011) A study of the antioxidant capacity of oak wood used in wine ageing and the correlation with polyphenol composition. *Food Chemistry*, 4:997-1002.
6. Alves R.R.N. i Rosa I.M.L. (2007) Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3:14.
7. Akihisa T., Nakamura Y., Tagata M., Tokuda H., Yasukawa K., Uchiyama E., Suzuki T., Kimura Y. (2007) Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum*. *Chemistry & Biodiversity*, 4:224–231.
8. AOAC. (1998) AOAC Official method of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA (1998).
9. Apostolopoulou A.A., Fluoros A.I., Demertzis P.G., Akrida-Demertzi K. (2005) Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food Control*, 16:157–164.
10. Bao X., Wang X.S., Dong Q., Fang J.N., Li X.Y. (2001) Structural features of immunologically active polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 59:175-18.

11. Bao X., Duan J.Y., Fang X.Y., Fang J.N. (2002) Chemical modifications of the (1→3)- $\alpha$ -D-glucan from spores of *Ganoderma lucidum* and investigation of their physicochemical properties and immunological activity. *Carbohydrates research*, 336:127-140.
12. Barasi, M. (1997) *Human Nutrition: A Health Perspective*. Arnold, London.
13. Battle J., Ha T.Z., Li C.F., Dellabeffa V., Rice P., Kalbfleisch J., Browder W., Williams D. (1998) Ligand binding to the (1,3)-beta-D-glucan receptor stimulates NF-kappa B activation, but not apoptosis in U937 cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 249:499-504.
14. Benzie I.F.F. i Strain J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239:70-76.
15. Blanchette, R.A. (1984) Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Applied Environmental Microbiology*, 48, 647-653.
16. De Bod P. J., Snyman C., Rossouw A., de Kock T., le Roux J. (2008) Brandy and distillation, Class Notes for the Oenology 454 Module. Stellenbosch, South Africa.
17. Boh B., Berovic M., Zhang J., Zhi-Bin L. (2007) *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology annual review*, 13:265-301.
18. Buglass A. J., McMay M., Lee C. G. (2011) Distilled spirits. In: *Handbook of alcoholic spirits, Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, A. Burglass (Ed.). John Wiley & Sons, Velika Britanija.
19. Buglass A.J. i Caven-Quantrill D. (2011) Analytical Methods. In: *Handbook of alcoholic spirits, Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, A. Burglass (Ed.). John Wiley & Sons, Velika Britanija.
20. Chen R.Y. i Yu D.Q. (1990) Progress of studies on the chemical constituents of *Ganoderma triterpens*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25:940-953.
21. Chen A.W. i Miles Ph. (1996) Biomedical research and the application of mushroom nutraceuticals from *Ganoderma lucidum*. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*, Royse. Ed. Pennsylvania State University.

22. Chen T.Q., Li K.B., He X.J., Zhu P.G., Xu J. (1998) Micro-morphology, chemical components and identification of log –cultivated *Ganoderma lucidum* spore. Proceeding Nanjing international symposium Science and Cultivation of Mushrooms, M. Lu, K. Gao, H.F. Si, M.J. Chen (Eds.). 214. Nanjing, China. JSTC-ISMS.
23. Chen D.H., Shiou W.Y., Wang K.C., Huang S.Y., Shie Y.T., Tsai C.M., Shie J.F. Chen K.D. (1999) Chemotaxonomy of terpenoids pattern of HPLC of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsungae*. Journal of Chinese Chemical Society, 46:47-51.
24. Chen W.Q., Huang J.W., Luo L.Q., Luo S.H., Yang H. (2005) Study of *Ganoderma* polysaccharides modulating the blood sugar and lipid in experimental rats. Chinese Journal of Gerontology, 25:957-958.
25. Chen Z.J., Yang Z.D., Gu Z.X. (2010) Determination of volatile flavor compounds in *Ganoderma lucidum* by HS-SPME-GC-MS. Food Research and Development, 31:132-135.
26. Chang, S.T. i Buswell, J.A. (1999) *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) P. Karst. (Aphyllphoromycetideae) A mushrooming medical mushroom. International Journal of Medicinal Mushroom, 136-146.
27. Christoph N. i Christoph-Bauer C. (2007). Flavour of spirits drinks: raw materials, fermentation, distillation, and ageing. In: Flavours and Fragrances, Chemistry, bioprocessing and sustainability, V. G. Berger (Ed). Springer, Berlin.
28. Conway C. T. i Paine A. J. (1986) Studies on constituents of ammonia caramel: the lymphocyte effects of substituted pyridines and 2-acetyl-4-tetrahydroxybutyl-imidazole in rat. Biochemical Society Transactions, 14:1040-1041.
29. Conway C. T. i Paine A. J. (1988) The lymphopenic effects of ammonia caramels: The paradox of vitamin. Human & Experimental Toxicology, 7:65-67.
30. Crowell E. A. i Guymon J. F. (1973) Aroma constituents of plum brandy. American Journal of Enology and Viticulture, 24:159-165.
31. Donk M.A. (1964) A conspectus of the families of Aphyllporales. Persoonia, 19-24.

32. Dulbecco R. i Freeman G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology*, 8:396-7.
33. Đuković J. (1973) Određivanje organskih kiselina u domaćim šljivovicama. *Kemija u industriji*, 10:489 – 495.
34. Etievant P, Guichard E, Issanchou S. (1986) The flavour components of Mirabelle plums. Examination of the aroma constituents of fresh fruits: Variation of the headspace composition induced by deep-freezing and thawing. *Si saradniciiments*, 6:417-32.
35. EEC. (1989) Council regulation 1576/89 on the definition, description and presentation of spirit drinks. *Official Journal of European Communities*, L160, 1-17.
36. Filajdić M. i Đuković J. (1973) Gas Chromatographic determination of volatile constituents in Yugoslavian plum brandies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 24:835-842.
37. Galor S.W., Yuen J., Buswell A.J., Benzie F.F. (2011) *Ganoderma lucidum* (Linghi or Reshi) A medicinal mushroom. In: *Herbal medicine Biomolecular and clinical aspects*, J. Barnes, L.A. Anderson, J.D. Phillipson, (Eds.). CRC Press, Boca Ralon.
38. Gan K.H., Fann Y.F., Hsu S.H., Kuo K.W., Lin C.N. (1998) Mediation of the cytotoxicity of lanostanoids and steroids of *Ganoderma tsugae* through apoptosis and cell cycle. *Journal of Natural Products*, 61: 485-487.
39. Gao Y., Zhou Sh., Chen G., Dai X., Ye J. (2002) A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Krast. extract (gonopoly) in patients with advanced cancer. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4:207-214.
40. Gao Y., Zhou Sh., Huang M., Xu A. (2003) Antibacterial and antiviral values of the genus *Ganoderma* P. Krast. Species (Aphyllorphomycetideae): a review. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 5:235-246.
41. Gao Y., Lan J., Dai X., Ye J., Zhou Sh. (2004a) A phase I/II study of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum*. (W. Curst.: Fr.) Lloyd (Aphyllorphomycetideae) extract in patients with type II diabetes mellitus. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 6:33-40.



42. Gao Y.H., Tang W.B., Gao H., Lam J., Zhou S.F. (2004b) Chemopreventive and tumoricidal properties of Lingzhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curst.: Fr.) Lloyd (Aphyllphoromycetidae). I. Preclinical studies (review). International Journal of Medicinal Mushrooms, 6:95-106.
43. Gomez E. i Ledbetter C. (1994) Comparative study of the aromatic profiles of two different plum species: *Prunus salicina* and *Prunus simonii* L. Journal of Science and Food Agriculture, 65:111-115.
44. Gomez-Plaza E. i Ledbetter C. (2010) The flavor of plums. In: Handbook of Fruit and Vegetable Flavors. Hui Y. H. (Ed.). John Wiley & Sons, Inc, New Jersey.
45. Gonzalez A.G., Leon F., Rivera A., Pardon J.I., Gonzales-Plata J., Zuluaga J.C., Quintana J., Estevez F., Bermejo J. (2002) New lanostanoids from the fungus *Ganoderma concinna*. Journal of Natural Products, 65:417-421.
46. Gorjanović S., Novaković M., Vukosavljević P., Pastor F., Tešević V., Sužnjević D. (2010) Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:8400-8406.
47. Halpern G.M. (2007) Healing mushrooms: ancient wisdom for better health. Square One Publishers, New York.
48. Heleno S.A., Barros L., Martins A., Queiroz M.J.R.P, Santos-Buelga C., Ferreira I.C.F.R. (2012) Fruiting body, spores and *in vitro* produced mycelium of *Ganoderma lucidum* from Northeast Portugal: A comparative study of the antioxidant potential of phenolic and polysaccharides extracts. Food Research International, 46:135-140.
49. Hepting G.H. (1971) Disease of forest and shade trees of the United States. US Department of Agriculture. Agricultural Handbook, 386:1-658.
50. Hirotsani M. i Furuya T. (1990) Studies on metabolites of higher fungi. Part 5. Ganoderic acid derivatives, highly oxygenated lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lucidum*. Phytochemistry, 25: 1189-1193.
51. Hobbs Ch. (1995) Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing and culture. Botanica Press, Santa Cruz.

52. Honda J. i Sakamura S. (1985) Cholane steroids. Jpn. Pat. 85 258,197.
53. Hu H., Ahn N.S., Yang X., Lee Y.S., Kang K.S. (2002) *Ganoderma lucidum* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer. International Journal of Cancer, 102: 250-253.
54. Hu T.X., Chen J.W., Xu J.Y., Lu J.Y., Yang Q.Y. (1992) Scavenging effects of polysaccharide peptide of *Coriaria* and polysaccharide of *Ganoderma* on active oxygen species. Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebo, 24: 465-470.
55. Hudson J. i Buglass A. (2011) Introduction, Background and History. In: Handbook of alcohol beverages, Buglass A., (Ed.). John Wileys and Sons, Chichester.
56. Huie C.W., Di X. (2004) Chromatographic and electrophoretic methods for Lindzhi pharmacologically active components. Journal of Chromatography B, 812:241-257.
57. Ilić R. (1987) Proizvodnja jakih alkoholnih pića. Nolit, Beograd.
58. Ismail H, Williams A, Tucknott O. (1981) The flavour components of plums: An examination of the aroma components present in the headspace above four cultivars of intact plums, Marjorie's seedling, Merton Gem, NA 10 and Victoria. Journal of Science and Food Agriculture, 32:498-50.
59. Jackson R. S. (2000) Wine Science, Principles, Practice and Perception, 2<sup>nd</sup> Edn. Academic Press, New York.
60. Jackson R. S. (2003) Grape. In: Encyclopedia of Food Science and Nutrition, 2<sup>th</sup> Edn., Cabalero B. (Ed). Academic Press, New York.
61. Jiang J., Grieb B., Thyagarajan A., Silva D. (2008) Ganoderic acids suppress growth and invasive behavior of breast cancer by modulating AP-1 and NF-kappa B signaling. International Journal of Molecular Medicine, 21:577-584.
62. Jiang J., Slivova V., Harvey K., Valachovicova T., Silva D. (2004a) *Ganoderma lucidum* suppresses growth of breast cancer through the inhibition of Akt/NF-κB signaling. Nutrition and Cancer, 49: 209-216.
63. Jiang J., Slivova V., Valachovicova T., Harvey K., Silva D. (2004b) *Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cell PC-3. International Journal of Cancer, 102: 250-253.

64. Jong S.C., Birmingham J.M. (1992) Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. In: Advances in applied microbiology, S. Neidleman, A. Laskin, (Eds.). Academic Press, San Diego.
65. Jović S. (2003) Priručnik za spravljanje rakije. Partenon, Beograd.
66. Kellsall D. R. I Lyons P.T. (2003) Grain dry and cooking procedures: extracting sugars in preparation for fermentation. In: The Alcohol textbook, a reference for the beverages, fuels and industrial alcohol industries, 4<sup>th</sup> Ed. K. A. Jacques, T.P. Lyons, D.R. Kellsall D.R. (Eds.). Nottingham University Press, Nottingham, Velika Britanija.
67. Kain W. i Bandion F. (1969) *Gaschromatographische Untersuchung von Spirituosen I Uber de fraktionierte Destillation und die Ausgiebigkeit von Weinbranderzeugnisse*. Z. Lebensmittel –Untersuchung und Forschung, 2: 124 – 139.
68. Kalač P. (2012) Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms. In: Mushroom: Type, properties and Nutrition, S. Andres i N. Braumann, (Eds.). Nova Science publisher, Inc.
69. Karagiannis S. i Lanaridis P. (2002) Insoluble grape material present in must affects the overall fermentation aroma of dry white wines made from three grape cultivars cultivated in Greece. Journal of Food Science, 67:369–374.
70. Kaneda H., Kobayashi N., Furusho S., Sahara H., Koshino, S. (1995) Reducing activity and flavor stability of beer. Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly, 32:90-94.
71. Keypour S.H., Riahi H., Moradali M.F., Rafati H. (2008) Investigation of antibacterial activity of chloroform extract of Ling Zhi or Reshi medicinal mushroom. *Ganoderma lucidum* (W.Curst.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 10:345-349.
72. Keypour S., Rafati H., Raihi H., Mirzajani F., Moradali M.F. (2010) Qualitative analysis of ganoderic acids in *Ganoderma lucidum* from Iran and China by RP-HPLC and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS). Food Chemistry, 11:1704-1708.

73. Kim H.W. i Kim B.K. (1999) Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1:121-138.
74. Kim J.H., Lee D.H., Lee S.H., Choi S.Y., Lee J.S. (2004) Effect of *Ganoderma lucidum* on the quality and functionality of Korean tradition wine rice,yakja. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1:24-28.
75. Kim M. Y., Seguin P., Ahn J. K., Kim J. J., Chun S. C., Kim E. H., Seo S. H., Kang E. Y., Kim S. L., Park Y. J., Ro H. M., Chung I. M. (2008) Phenolic compounds concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56:7265-7270.
76. Kim M.J., Chung I.M., Lee S.J., Ahn J.K., Kim E.H., Kim E.H., Kim M.J., Kim S.L., Moon H.I., Ro H.M., Kang E.Y., Seo S.H., Song H.K. (2009) Comparison of free amino acid, carbohydrates concentrations in Korean edible and medicinal mushrooms. Food Chemistry, 113:386-393.
77. Klaus A., Nikšić M., Savić M., Despotović S., Vukosavljević P. (2008) Više gljive novi-stari izvor sirovina za farmaceutsku industriju. Lekovite sirovine, 2008:3-10.
78. Kolesnikova O.P., Tuzova M.N., Kozlov V.A. (1997) Screening of immunoactive properties of alkanecarbonic acid derivates and germanium-organic compounds in vivo. Immunologiya, 10:36-38.
79. Konopski Z., Smedsrod B., Seljelid R., Eskelend T. (1994) A novel immunomodulator soluble aminated  $\beta$ -1,3-D-glucan: binding characteristics to mouse peritoneal macrophages. Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research, 1221:61-65.
80. Kosanović M. i Ranković B. (2011) Antioxidant and antimicrobial properties of some lichens and their constituents. Journal of Medicinal Food, 14:1624–1630.
81. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Jakovljević D., Helsper J.P.F.C., Griensven L.J.L.. (2011) Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus linteus*. Food Chemistry, 129:1667-1675.

82. Kozarski M., Klaus A., Nikšić M., Vrvić M., Todorović N., Jakovljević D., Griensven L.J.L. (2012) Antioxidative activities and chemical characterisation of polysaccharide extracts from widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*. *Journal of Food Composition and Analyses*, 26:144-153.
83. Kubota T., Asaka Y., Miura I., Mori H. (1982) Structures of ganoderic acid A and B, two new lanostane type bitter triterpens from *Ganoderma lucidum* (Fr.) Kratst. *Helvetica Chimica Acta*, 62:611-619.
84. Lai T., Gao Y., Yhou S. (2004) Global marketing of medicinal mushroom Ling Zhi *Ganoderma lucidum* (W.Curst.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) Products and Safety Concerns, *International Journal for Medicinal Mushrooms*, 6.
85. Lee K.H., Itokawa H., Kozuka M. (2003) Oriental herbal products: the basic for development of dietary supplements and new medicines in the 21<sup>st</sup> century. In: *Oriental Food and Herbs - Chemistry and Health Effects*, C.T. Ho, J.K. Lin, Q.Y. Zheng, (Eds). American Chemical Society Press, Washington DC.
86. Lee K.M., Lee S.Y., Lee H.Y. (1999) Bistage control of pH for improving exopolysaccharides production in an air-lift fermentor. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 88:646-650.
87. Lee J.M., Kwon H., Jeong H., Lee J.W., Lee S.Y., Beak S.J., Surh Y.J. (2001) Inhibition of lipid peroxidation and antioxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. *Phytoterapy Research*, 15:245-249.
88. Leskošek-Čukalović I., Despotović S., Lakić N., Nikšić M., Nedović V., Tešević V., (2010a) *Ganoderma lucidum* — Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. *Food Research International*, 43:2262–2269.
89. Leskošek-Čukalović I., Despotović S., Nedović V., Lakić N., Nikšić M. (2010b) New Type of Beer – beer with improved functionality and defined pharmacodynamic properties. *Food Technology and Biotechnology*, 48:384-391.
90. Liddle P. i Boero L. (2003) Vermouth. In: *Encyclopedia of food science and Nutrition*, Caballero B., Trugo L., Finglas P., (Eds). Academic Press, London.

91. Lin L.J., Shiao M.S., Yeh S.F. (1988) Triterpens from *Ganoderma lucidum*. *Phytochemistry*, 27:2269-2271.
92. Lin Y.J., Shen J., Yong M.Y., Zheng J., Park H.S. (2012) The polysaccharides from *Ganoderma lucidum*: Are they always inhibitors a human hepatocarcinoma cells? *Carbohydrate Polymers*, 90:1210-1215.
93. Lin S.C. (2000) Medicinal fungi of Chine - production and products development. Beijing, China: Chinese Agricultural Press.
94. Lin S.B., Li C.H., Lee S.S., Kan S.S. (2003) Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibits growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G-2phase cell cycle arrest. *Life Science*, 72:2381-2390.
95. Liu X., Yuan J.P., Chung C.K., Chen X.J. (2002) Antitumor activity of sporoderm-broken germinating spores of *Ganoderma lucidum*. *Cancer Letters*, 182:155-161.
96. Lu Q.Y., Jin Y.S., Zhang Q., Zhang Z., Heber D., Go V.L.W., Li F.P., Rao J.Y. (2004) *Ganoderma lucidum* extracts inhibits growth and induced actin polymerization in bladder cancer cells in vitro. *Cancer Letters*, 216:9-20.
97. Mahato S.B. i Sen S. (1997) Advances in triterpenoids research.1990-1994. *Phytochemistry*, 44: 1185-1236.
98. Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C. (2001) Non volatile component s of several medicinal mushrooms. *Food Research International*, 34: 521-526.
99. Mau J.L., Lin H.C., Chen C.C. (2002) Antioxidant properties of several medicinal mushrooms. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50: 6072-6077.
100. McKenna D.J., Jones K., Hughes K. (2002) *The Desk Reference for Major Herbal Supplements*. The Haworth Herbal Press, New York.
101. Min B.S., Gao J.J., Nakamura N., Hattori M. (2000a) Triterpens from the spores of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory activiti against HIV-1 protease. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46:1607-1612.
102. Min B.S., Gao J.J., Nakamura N., Hattori M. (2000b) Triterpens from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against Meth-A and LLC tumor cells. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 48:1026-1033.

103. Miyahara R., Yoshimoto T., Asawa K. (1987) Chemical structures and changes of extracts during growth of reishi (*Ganoderma lucidum*). *Makazai Gakkaishi*, 33:416-422.
104. Mizuno, T. (1995) Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects. *Food Review International*, 11:151-166.
105. Mizuno T. (1997) Studies of bioactive substances and medicinal effects of Reishi (*Ganoderma lucidum*). Shizuoka University, Japan.
106. Mizushima Y., Hanashima L., Yamaguchi T., Takemura M., Sugawara F., Saneyoshi M., Matsukage A., Yoshida S., Sakagushi K.A. (1998) A mushroom fruiting body-inducing substance inhibits activities of replicative DNA polymerases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 249:17-22.
107. Mohatny P.S., Harsh N.S.K., Pandey A. (2011) First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from north India based on ITS sequence analysis and micromorphology. *Mycosphere*, 4:469-474
108. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83:757-66.
109. Mueller A., Raptis J., Rice P.J., Kalbfleisch J.H., Stout R.D., Ensley H.E., Browder W., Williams D.L. (2000) The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1,3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology*, 10:339-346.
110. Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2007) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Vol. 26, No.3.
111. Nikićević N. (2000) Prilog izučavanju važnijih aromatičnih sastojaka šljive požegače i rakije šljivovice. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
112. Nikićević N. (2008) Voćne Rakije. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
113. Nikićević N. (2011) Aromatični sastojci šljive požegače i šljivove prepečenice proizvedene od istoimene sorte, Poljoprivredni fakultet – Beograd.

114. Nikićević N. (2013) Srpska šljivovica, Poljoprivredni fakultet-Beograd.
115. Nikićević N. i Tešević V. (2008) Jaka alkoholna pića – analitika i praksa. Poljoprivredna knjiga, Beograd.
116. Nikićević N. i Tešević V. (2010) Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta, Poljoprivredni fakultet, Nik Pres – Beograd.
117. Nikićević N. i Paunović R. (2013) Tehnologija jakih alkoholnih pića. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
118. Nikšić M., Nikićević N., Tešević V., Klaus A. (2001) Evaluation of alcohol beverages based on *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P. Karst. Extract. International Journal of Medicinal Mushrooms, 3:192.
119. Nikšić M., Nikićević N., Tešević V., Debeljak J., Klaus A. (2002) Proizvodnja alkoholnih pića na bazi gljive *Ganoderma lucidum*, VI Savetovanje industrije alkoholnih i bezalkoholnih pića i sirćeta sa međunarodnim učešćem, Zbornik radova, Vrnjačka Banja, 191-196.
120. Nishiyama S. (1981) Preparation of sake drink containing *Ganoderma* extracts. Jpn. Pat. 81 6,985.
121. Nisitoba T., Sato H., Sakamura S. (1985) New terpenoids from *Ganoderma lucidum* and their bitterness. Agricultural biology and chemistry 49:1547-1549.
122. Nisitoba T., Sato H., Shirasu S., Sakamura S. (1987) Novel triterpenoids from the mycelia mat at the previous stage of fruiting of *Ganoderma lucidum*. Agricultural biology and chemistry 52: 1791-1795.
123. Nisitoba T., Sato H., Sakamura S. (1988) Bitterness and structure relationships of the triterpenoids from *Ganoderma lucidum* (Reishi). Agricultural biology and chemistry 52:1791-1795.
124. Noltes A.W. i Chappel C.A. (1985) Toxicology of caramel colours: Current status. In: Food Toxicology, G. G. Gibson and R. Walker, (Eds.). Taylor & Francis, London.
125. Ohno N., Mitura N.N., Sugawara N., Tokunaka K., Kirigaya N., Yadomac T. (1998) Immunomodulation by hot water and ethanol extracts of *Ganoderma lucidum*. Pharmaceutical and Pharmacological Letters, 4:174-177.



126. Ooi V.E. i Liu F. (2000) Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharideprotein complexes. *Current Medicinal Chemistry*, 7:715-729.
127. Oreupoulu V. (2003) Extraction of Natural Antioxidants. In: *Extraction optimization in food engineering*, C. Tzia i G. Liadakis (Eds.). Marcel Dekker.
128. Ouzouni K. P., Petridis D., Koller W. D., Riganakos K. A. (2009) Nutritional value and metal content of wild edible mushroom collected from West Macedonia and Epirus, Greece. *Food Chemistry*, 115:1575-1580.
129. Pecić S., Veljović M., Despotović S., Tešević V., Nikićević N., Nikšić M. (2011) The sensory properties of special brandy with *G. lucidum*, *Proceeding of 7<sup>th</sup> International Congress of food technologists and biotechnologists*, Opatija, Hrvatska.
130. Pecić S., Veljović M., Despotović S., Leskošek-Čukalović I., Jadranin M., Tešević V., Nikšić M., Nikićević N. (2012a) Effect of maturation conditions on sensory and antioxidant properties of old Serbian plum brandies. *European Food Research and Technology*, 235:479-487.
131. Pecić S., Veljović M., Despotović S., Leskošek-Cukalović I., Nikšić M., Vukosavljević P., Nikićević N. (2012b) Antioxidant capacity and sensory characteristics of special herb brandy. *Proceeding of 6<sup>th</sup> CEFood*, Novi Sad, Serbia.
132. du Plessis H. W., Steger C. L. C., du Toit M., Lambrechts M. G. (2002) The occurrence of malolactic fermentation in brandy base wine and its influence on brandy quality. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 1005-1013.
133. Pravilnik o svojstvima kvaliteta etil alkohola (etanol) fermentisan. (1985) Službeni list Savezne Federativne Republike Jugoslavije (SFRJ), 47/85.
134. Pravilnik o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakija i drugih alkoholnih pića. (2010) „Službeni glasnik RS“, broj 73/10.
135. Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza alkoholnih pića. (1988) Sl. List SFRJ br. 70/87.
136. Radovanović R. i Popov-Raljić J. (2000) Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakultet, Beograd, i Tehnološki fakultet, Novi Sad.

137. Rai M., Tidke G., Wasser S. (2005) Therapeutic potential of mushrooms. *Natural Product Radiance*, 4:246-257.
138. 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 Radical Biology & Medicine*, 26:1231-7.
139. Rosillo L., Salinas M. R., Garijo J., Alonso G. L. (1999) Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera*. *Journal of Chromatography A*, 847:155-159.
140. Sadler, M. i Saltmarch, M. (1998) *Functional Food: The consumer, the products and evidence*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
141. Satora P. i Tuszynski T. (2008) Chemical characteristics of Śliwowica Łącka and other plum brandies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88:167-174.
142. Satora, P., Tuszynski, T. (2010) Influence of indigenous yeast on the fermentation and volatile profile of plum brandy. *Food Microbiology*, 27:418-424.
143. Seo G.S. i Kirk P.M. (2000) *Ganodermataceae: Nomenclature and Classification*. In: *Ganoderma disease and perennial crops*. CABI Publishing, New York.
144. Sheena N., Lakshimi B., Janardhanan K.K. (2005) Therapeutic potential of *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst.. *Natural Product Radiance*, 4:382-386.
145. Saroya, A.S. (2011). *Herbalism, phytochemistry and ethnopharmacology*. Science Publishers, New Hampshire .
146. Sigma Chem Co. (1997) *Biochemicals and reagents for life science research*, 1752.
147. Singleton V.L i Rossi J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphor molybdic-phospho tungstic acid reagents. *American Journal for Enology and Viticulture*, 16:144-158.

148. Sinkeldam E.J., de Groot A.P., van den Berg H., Chappel, C. I. (1988) The effect of pyridoxine on the number of lymphocytes in the blood of rats fed caramel colour (III). *Food and Chemical Toxicology*, 26:195-203.
149. Smith J.E., Rowan N., Sullivan R. (2002) Medicinal mushroom: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*, 24:1839-1845.
150. Soo T.S. (1996) Effective dosage of the extract of *Ganoderma lucidum* in the treatment various ailments, 177-185. In: *Mushroom Biology and Mushroom Products*; D.J. Royse. (Ed.); The Pennsylvania State University.
151. Stamets P. (2005) *Mycelium running. How mushrooms can help save the world*. Ten Speed Press, Toronto.
152. Stamets P. (1993) *Growing gourmet and medical mushrooms*. Ten Speed Press, Toronto.
153. Stegers C. L. i Lamprechts M.G. (2000) The selection of yeast stains for production of premium quality South African brandy base products. *Journal of Industrial, Microbiological I Biotechnology*, 24,431-440
154. Su C.H., Yang, Y.Z., Ho H., Hu C.H., Sheu M.T. (2001) High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *Journal of Chromatographic Science*, 39:93-100.
155. Sullivan R., Smith J.E., Rowan N.J. (2006) Medicinal mushrooms and cancer therapy: translating a traditional practice into western medicine. *Perspectives in Biology and Medicines*, 49:159-170.
156. Sun J., He H., Xie B.J. (2004) Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:6646-6652.
157. Supino R. (1995) *Methods in Molecular Biology*. In: *Vitro Toxicity Testing Protocols*, S. O'Hare i C.K. Atterwill, (Eds.). Humana press, New Jersey.
158. Taşkın H., Kafkas E., Çakıroğlu O., Büyükalaca S. (2013) Determination of volatile aroma of *Ganoderma lucidum* by gas chromatography mass spectrometry

- (HS-GC/MS). *African Journal of Traditional, Complementary and Traditional Medicine*, 10:353-355.
159. Tešević V., Nikićević N., Jovanović A., Đoković D., Vujisić Lj., Vučković I., Bonić M. (2005) Volatile components from old plum brandies. *Food Technology and Biotechnology*, 43:367-372.
160. Tomasi S., Lohezic-Le D.F., Sauleau P., Bezivin C., Boustie J. (2004) Cytotoxic activities of methanol extracts from Basidiomycetes mushroom on murine cancer cell line. *Pharmazie*, 59:290-293.
161. Tonutti I. i Liddle P. (2010) Aromatic plants in alcoholic beverages. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25:341-350.
162. Tosko J.E., Chang C.C. (2001) Mechanism of up-regulation gap junctional intracellular communication during chemoprevention and chemotherapy of cancer. *Mutation Research*, 480-481:219-229.
163. Tsakiris A., Kallithraka S., Kourkoutas Y. (2014) Grape brandy production, composition and sensory evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94:404-414.
164. Turkoglu A., Duru M.E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. (2007) Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101:267–273.
165. Tuszyński T. (1989) Changes in methanol content during fractional distillation of water–ethanol solutions. *Acta Alim Polon*, 15:143–151.
166. Van Der Hem L., Van Der Vilet A., Brocken C.F.M., Kino K., Hoitsma A.J., Tax W.J.M. (1995) Lingzhi-8: Studies of a new immunomodulating agent. *Transplantation*. 60:438-443.
167. Vukosavljević P., Novaković M., Bukvić B., Nikšić M., Stanisavljević I., Klaus A. (2009) Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process. *Journal of Agricultural Sciences*, 54:24-28. .
168. Wang H., Ng T.B. (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides*, 27:27-30.

169. Wang S.Y., Hsu M.L., Hsu H.C., Tzeng H.C., Lee S.S., Shiao M.S., Ho C.K. (1997) The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *International Journal of Cancer*, 70:699-705.
170. Wang X.M., Yang M., Guan S.H., Liu R.X., Xia J.M., Bi K.S., Guo D.A. (2006) Quantitative determination of six major triterpenoids in *Ganoderma lucidum* and related species by highperformance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41:838–844.
171. Wang G., Zhang J., Mizuno T., Zhuang C., Ho H., Muyuzumi H., Okomoto H., Li J. (1993) Antitumor active polysaccharides of Chinese mushroom Song Shan Lingzhi, the fruitbody of *Ganoderma tsunze*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry Journal*, 57: 894-900
172. Wasser S.P. (2002) Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:258-274.
173. Wasser S.P. (2005) Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*). In: *Encyclopedia of dietary supplements*, P.M. Coates, J.M. Betz, M.R. Blackman, G.M. Grass, M. Levine, J. Moss, J. White, (Eds.). Marcel Dekker, New York.
174. Wasser S.P. i Weis A.L. (1997) Reshi Mushroom - *Ganoderma lucidum*, (Curtis: Fr.), P. Karst. In: *Medicinal Mushroom*, E. Nevo, (Ed.). Peledfus Pub House, Haifa.
175. Watcher-Galor S., Szeto Y.T., Tomlinson B., Benzie I.F.F. (2004) *Ganoderma lucidum* (Lingzhi): Acute and short-term biomarker response to supplementation. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 1: 75-83.
176. Weng C.J., Yen G. C. (2010) The in vitro and in vivo experimental evidences disclose the chemopreventive effects of *Ganoderma lucidum* on cancer invasion and metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 27:361-369.
177. WHO (World Health Organization). (2008) Mortality Statistic. *World Health Report*.

178. Wojdyło A., Oszmiański J., Czemerys R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105:940-949.
179. Xu J.W. i Xu Y.N., Zhong J.J. (2010a) Production of individual ganoderic acids and expression of biosynthetic genes in liquid static and shaking cultures of *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85:941–948.
180. Xu W.J., Zhao W., Zhong J.J. (2010b) Biotechnological production and application of ganoderic acids. *Applied Microbiological Biotechnology*, 87: 457-466.
181. Yen G.C., Wu J.Y. (1999) Antioxidant radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65:375-379.
182. Ying J., Mao X., Ma Q., Zong Z., Wen H. (1987) Icons of medicinal fungi form China, X Yuehan, (Ed.), Science Press, Beijing. (prevedeno)
183. Yoon S.Y., Eo S.K., Kim Y.S., Lee C.K., Han S.S. (1994) Antimicrobial activity of *Ganoderma lucidum* alone and in combination with some antibiotics. *Archives of Pharmaceutical Research*, 17: 438-442.
184. You Y.H., Lin Z.B. (2002) Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species. *Acta Pharmacologica Sinica*, 23: 787-791.
185. Yuen J.W. i Gohel M.D. (2005) Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: A review of scientific evidence. *Nutrition and Cancer*, 53:11-17.
186. Zakon o etanolu. (2009) Službeni glasnik Republike Srbije, 41/2009.
187. Zakon o rakiji i drugim alkoholnim pićima. (2009) Službeni glasnik Republike Srbije 41/2009.
188. Zaidman B.Z., Yassin M., Mahajna J., Wasser S.P. (2005) Medical mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67:453-468.
189. Zhang M., Cui S.W., Cheung P.C.K., Wang O. (2007) Antitumor polysaccharides from mushroom: a review of their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trend in Food Science & Technology*, 18:4-19.

190. Zhang L., Zhang M., Chen J. (2001) Solution properties of antitumor caroxymethylated derivatives of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. Chinese Journal of Polymer Science, 19:283-289.
191. Zhao L., Dong Y., Chen G., Hu Q. (2010) Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. Carbohydrate Polymers, 80:783-789.
192. Zhao J.D. i Zhang X. Q. (1994) Resources and taxonomy of Lingzhi (*Ganoderma*) in China. From program and extracts of the 1994 International Symposium in *Ganoderma* Research, Beijing, Beijing Medical University.
193. Zhao J., Zhang X.Q., Li S.P., Yang F.Q., Wang Y.T., Ye W.C. (2006) Quality evaluation of *Ganoderma* through simultaneous determination of nine triterpenes and sterols using pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography. Journal of Separation Science, 29:2609–2615
194. Zhong L., Jiang D.Z., Wang Q.R. (1999) Effects of *Ganoderma lucidum* (Leyss ex Fr.) Karst. Compound on the proliferation and differentiation of K652 leukemic cells. Journal of Human Medicinal University, 24:521-524.
195. Zhou Sh., Gao Y., Chen G., Dai X., Ye J., Gao H. (2002) A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curst.: Fr.) P. Karst. (Ling Zhi, Reshi) extract (ganopoly) in patients with chronic hepatitis B. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 207-214.
196. Zhou X., Lin J., Yin Y., Zhao J., Sun X., Tang K. (2007) *Ganodremataceae*: Natural products and their related pharmacological functions. American Journal of Chinese Medicine, 35: 559-574.
197. Zhu H.S., Yang X.L., Wang L.B., Zhao D.X., Chen L. (2000) Effect of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells in vitro. Cell Biology and Toxicology, 16: 201-206.
198. Zhu M., Chang Q., Wong L.K., Chong F.S., Li R.C. (1999) Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*. Phytotherapy Research, 13: 529-531.
199. Zhuang C., Mizuno T., Shimada A., Ito H., Suzuki C., Mayuzumi Y., Okomoto H. Ma Y., Li J. (1993) Antitumor protein-containing polysaccharides

from a Chinese mushroom Fengweigu or Houbitake, *Pleurotussajor-caju* (Fr.)  
Sing. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 57: 901-906.

200. <http://www.hbp.usm.my/1b/GT/ganoderma.htm>
201. <http://www.tehnologijahrane.com/hemijahrane/boja-prehrambenih-proizvoda>)
202. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB9373916.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB9373916.htm)



## 8. BIOGRAFIJA KANDIDATA

Sonja (Pecić) Veljović je rođena 13.03.1984. godine u Kraljevu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu (Gimnazija, opšti smer) završila je u Vrnjačkoj Banji. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Odsek za prehrambenu tehnologiju biljnih proizvoda, završila je 2008. godine, sa prosečnom ocenom tokom studiranja 9,03. Diplomski rad pod naslovom: „Mogućnost korišćenja alternativnih žita (heljde) u savremenoj ishrani“ odbranila je sa ocenom 10 (deset). Upisala je doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu školske 2008/09. godine.

Od 2009.-2012. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od maja. 2012. godine angažovana je na Ekonomskom institutu, Beograd, kao istraživač saradnik. U zvanje istraživač saradnik izabrana je 29.12.2011. godine.

Tokom istraživačkog rada učestvovala je na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Razvoj novih prehrambenih i dijetetskih proizvoda sa medicinskim gljivama i lekovitim biljem“ (br.20049, 2009-2010).U novom projektnom ciklusu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije angažovana je na projektima „Razvoj novih inkapsulacionih i enzimskih tehnologija za proizvodnju biološki aktivnih supstanci i drugih komponenti hrane u cilju povećanja njene konkurentnosti, kvaliteta i bezbednosti“, (br. 46010, 2010-2011) i „Razvoj i primena novih i tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za domaće i svetsko tržište – STVORIMO BOGATSTVO IZ BOGATSTVA SRBIJE“ (br. 46001, 2010- ).

Član je udruženje mikrobiologa Srbije od 2009. godine.

Udata je i majka je devojčice Jane.

**Prilog 1.**

**Izjava o autorstvu**

Potpisani-a Sonja (Pecić) Veljović

broj upisa 08/33

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Uticaj plodonosnog tela gljive Ganoderma lucidum na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu, 25.1.2015. godine

**Potpis doktoranda**  
Sonja Bevoluč

**Prilog 2.**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Sonja (Pecić) Veljović  
Broj upisa 08/33  
Studijski program Prehrambena tehnologija  
Naslov rada „Uticaj plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum* na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija“  
Mentor prof. dr Ninoslav Nikićević

Potpisani Sonja (Pecić) Veljović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

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

U Beogradu, 25.1.2015. godine

**Potpis doktoranda**  
Sonja Bebobut

**Prilog 3.****Izjava o korišćenju**

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

**„Uticaj plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum* na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
- 3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade**
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

U Beogradu, 25.1.2015. godine

**Potpis doktoranda**  
*Sonja Beboluh*

- 1. Autorstvo** - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
- 2. Autorstvo** – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 3. Autorstvo** - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
- 4. Autorstvo** - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
- 5. Autorstvo** – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
- 6. Autorstvo** - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.