

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Saša M. Despotović

BIOHEMIJSKA I FUNKCIONALNA
SVOJSTVA PIVA SA DODATKOM
GLJIVE *GANODERMA LUCIDUM*

Doktorska disertacija

Beograd, 2017

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

Saša M. Despotović

**BIOCHEMICAL AND FUNCTIONAL
PROPERTIES OF BEER WITH THE
ADDITION OF *GANODERMA LUCIDUM*
MUSHROOM**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2017

Mentor:

Dr Ida Leskošek-Čukalović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

Dr Viktor Nedović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Miomir Nikšić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Mirjana Pešić, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Ljiljana Gojković-Bukarica, redovni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Jelena Pejin, vanredni profesor
Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Zahvalnica

Veliku zahvalnost za neizmerno razumevanje, podršku, pomoć i dragocene savete dugujem, svom mentoru, prof. dr Idi Leskošek-Čukalović.

Zahvaljujem se prof. dr Viktoru Nedoviću na nesebičnoj pomoći i dragocenim sugestijama.

Veliku zahvalnost dugujem i prof. dr Miomiru Nikšiću na podršci i savetima.

Zahvaljujem se prof. dr Ljiljani Gojković-Bukarica na nesebičnoj pomoći i sugestijama.

Želim da se zhvalim i prof. dr Jeleni Pejin i prof. dr Mirjani Pešić na pruženoj podršci i korisnim savetima.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama sa Poljoprivrednog fakulteta, a naročito Miletu, Sonji, Ani, Aniti, Mileni, Kaji, Stevi, Vesni, Aneti, Maji, Radovanu, Stanimiru i Dragici, na pomoći i razumevanju.

Veliku zahvalnost dugujem kolegama iz BIP-a, posebno Snežani Babarogić, kolegama iz Apatinske pivare, Tanji Popović i Jeleni Mandić, kao i kolegi iz Skopske pivare, Aleksandru Čadikovskom, na pomoći i podršci.

Želim da se zhvalim i kolegama sa Medicinskog fakulteta, Mileni, Radmili i Mirjani, na pruženoj pomoći u eksperimentalnom radu.

Zahvaljujem se dr Lani Filipović i dr Siniši Radulović sa Instituta za onkologiju i radiologiju na pomoći u eksperimentalnom radu.

Neni i Ljubisavu, hvala za divno i iskreno prijateljstvo, razumevanje i podršku.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Stanki i Milenku, na svoj ljubavi, podršci, razumevanju i neizmernom strpljenju tokom svih ovih godina. Bratu, Aleksandru, i njegovoj porodici na ljubavi i podršci.

Beograd, 2017.

Biohemijska i funkcionalna svojstva piva sa dodatkom gljive *Ganoderma lucidum*

REZIME

Pivo možda nije najstarije alkoholno piće, ali je definitivno među najpopularnijim napitcima današnjice. Svoju ogromnu popularnost sticalo je vekovima, služeći ne samo kao osvežavajući napitak već i kao fiziološki značajna namirnica. Poslednjih decenija, vršena su brojna istraživanja koja su se bavila zdravstvenim aspektima piva. Istraživanja potvrđuju da pivo u umerenim količinama ima blagotvorna svojstva poput: smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti, snižavanja holesterola u krvi, regulacije insulina, prevencije osteoporoze i demencije, a ujedno predstavlja izvor vitamina, minerala i antioksidanata. Gljive su od davnina poznate po svojim nutritivnim i medicinskim svojstvima. *Ganoderma lucidum* korišćena je hiljadama godina u tradicionalnoj medicini dalekog istoka, korišćena je u verskim obredima, bila je dragocen poklon i inspiracija mnogim umetnicima, ispričana je u mnogim legendama, a danas predstavlja vredan proizvod sa tržištem od preko 2,5 milijardi US\$. Svoju slavu stekla je u lečenju raznih bolesti i zaslužno je stekla nazive poput „Elikzir života”, „Hrana bogova” i „Gljiva univerzuma”. Hemijskom karakterizacijom plodonosnog tela, spora i micelije *Ganoderma lucidum* otkriveno je preko 400 različitih komponenti. Polisaharidi i triterpeni predstavljaju dominantne grupe jedinjenja u plodonosnom telu gljive, a slede ih fenoli, steroidi, amino-kiseline, micini, vitamini, nukleozidi, masne kiseline, nukleotidi i elementi u tragovima. Trenutna istraživanja fokusirana su na sekvencionisanje genoma *Ganoderma spp.*, izdvajanju bioaktivnih komponenti i *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima.

Osnovni cilj doktorske disertacije bio je dobijanje novog proizvoda, specijalnog piva, sa povećanim funkcionalnim svojstvima koristeći gljivu *Ganoderma lucidum*. U okviru istraživanja izvršena je sveobuhvatna analiza relevantnih faktora potrebnih za sagledavanje opravdanosti i primenljivosti ovakvog rešenja. Detaljna analiza načina ekstrakcije gljive imala je za cilj utvrđivanje optimalnih uslova za izdvajanja bioaktivnih jedinjenja. Ispitivanje različitih uslova proizvodnje piva i uticaj načina dodavanja gljive i dobijenih ekstrakta na brzinu fermentacije i senzorne karakteristike dobijenih proizvoda vršeno je radi iznalaženja optimalnih uslova. Za postizanje što boljih rezultata na polju ekonomičnosti, funkcionalne vrednosti i senzorne

prihvatljivosti finalnog proizvoda. Detaljna karakterizacija odabranog proizvoda i njegova senzorna ocena, imala je za cilj utvrđivanja postignutih efekata obogaćivanja standardnog i bezalkoholnog piva sa aspekta postignute funkcionalne vrednosti i senzorne prihvatljivosti kod različitih ciljnih grupa potrošača. U tom smislu izvreno je senzorno ocenjivanje kod muške i ženske populacije, konzumenata alkoholnih pića i apstinencata, pušača i nepušača, kao i profesionalnih senzoričara, od kojih se očekivalo da daju finalnu senzornu ocenu dobijenih piva. Potencijalni funkcionalni efekat obogaćenih piva definisan je određivanjem sadržaja bioaktivnih komponenti i *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima na način na koji se to vrši u medicinskoj praksi. I konačno, urađena je procena troškova proizvodnje ovakvog piva kako bi se procenila njegova ekonomska isplativost.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je upravo bezalkoholno pivo sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* proizvod koji ima najviše potencijala na tržištu. Svojim senzornim svojstvima, funkcionalnom vrednošću zahvaljujući sadržaju bioaktivnih supstanci i projektovanoj ceni koštanja, mogao bi zauzeti posebno mesto na tržištu i to ne samo kod potrošača koji su opredeljeni za pivo bez sadržaja alkohola, već i potrošača koji teže proizvodima sa dodatom vrednošću koji pri tome imaju superiorna senzorna svojstva u odnosu sa standardne proizvode. Činjenica, da ne sadrži alkohol, jedini ograničavajući faktor kada je standardno pivo u pitanju, svrstava ga u kategoriju funkcionalnih napitaka čime se mogućnost njegove primene proširuje ne samo na osvežavajuća i funkcionalna svojstva. Imajući u vidu činjenicu da njegova proizvodnja ne zahteva posebne uslove, sa industrijskog značaja predstavlja posebnu komparativnu prednost.

Ključne reči: pivo, *Ganoderma lucidum*, funkcionalna hrana, bioaktivna jedinjenja

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Nauka o vrenju

UDK: 663.41+582.284.3(043.3)

Biochemical and functional properties of beer with the addition of *Ganoderma lucidum* mushroom

ABSTRACT

Beer may not be the oldest alcoholic drink, but it is definitely one of the most popular drinks today. It has gained its immense popularity through centuries, serving not only as a refreshing beverage but also as a physiologically important foodstuff. In recent decades, numerous researches including health aspects of beer have been carried out. The researches confirm that beer, in moderate amounts, has beneficial properties such as: reducing the risk of cardiovascular diseases, lowering of blood cholesterol levels, regulation of insulin, prevention of osteoporosis and senile dementia, and it also represents a source of vitamins, minerals and anti-oxidants. Mushrooms have always been known for their nutritional and medical characteristics. *Ganoderma lucidum* has been used in traditional medicine of the Far East for thousands of years; it was used in religious ceremonies and was a precious gift and inspiration for many artists, it was a part of many legends and today it represents a valuable product with a market of over 2.5 billion US \$. It gained its fame in the treatment of various diseases and deservedly got the titles such as "Elixir of Life", "Food of the Gods" and "Mushroom of the universe". More than 400 different components have been discovered by chemical characterization of the fruitful body, spores and mycelia of *Ganoderma lucidum*. Polysaccharides and triterpenes represent dominant groups of compounds in the fruitful body of the mushroom, and they are followed by phenols, steroids, amino-acids, spiramycin, vitamins, nucleosides, fatty acids, nucleotides and trace elements. Current researches are focused on the sequencing of the genome of *Ganoderma spp.*, separation of bioactive components and in vivo and in vitro researches. The main objective of the PhD thesis was to obtain a new product, special beer, with enhanced functional characteristics using the mushroom *Ganoderma lucidum*. A comprehensive analysis of relevant factors necessary for understanding the feasibility and applicability of such a solution has been carried out in the research. A detailed analysis of the way of the extraction of the mushroom was aimed to determine the optimal conditions for the separation of bioactive compounds. The examination of various conditions of beer production and the influence the mushroom addition method and obtained extracts have on the rate of fermentation and sensory characteristics of the obtained products was

carried out in order to find the optimal conditions for achieving the best possible results in the field of cost-efficiency, functional value and sensory acceptability of the final product. The detailed characterization of the selected product and its sensory evaluation aimed at determining the gained effects of the enrichment of standard and non-alcoholic beer from the aspect of the achieved functional value and sensory acceptability with different target groups of consumers. In that regard, the sensory evaluation was carried out with male and female population, consumers of alcoholic drinks and abstainers, smokers and non-smokers, as well as professional connoisseurs, who were expected to give the final sensory assessment of obtained beer. A potential functional effect of enriched beer was defined by determining the content of bioactive components both in vivo and in vitro researches the way in which this is carried out in medical practice. Finally, the cost assessment of production of this beer was done in order to estimate its economic viability.

Based on the gained results, it may be concluded that non-alcoholic beer with extract of *Ganoderma lucidum* is the product that has the most potential on the market. Owing to its sensory characteristics, functional value, thanks to the content of bioactive substances and the projected cost price, it could take a special place on the market, not only with the consumers who are committed to the beer without alcohol content, but also with consumers who seek products with added value, which additionally have superior sensory properties compared to standard products. The fact that it does not contain alcohol, the only limiting factor when it comes to standard beer, puts it in the category of functional beverage which extends the possibility of its application not only to refreshing but functional characteristics, as well. Due to the fact that its production does not require special conditions, it represents a comparative advantage from the industrial point of view.

Key words: beer, *Ganoderma lucidum*, functional food, bioactive compounds.

Scientific area: Biotechnology

Special scientific: The science of fermentation

UDK: 663.41+582.284.3(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 FUNKCIONALNA HRANA	3
2.1.1 Koncept funkcionalne hrane	4
2.1.2 Bioaktivna jedinjenja	7
2.1.2.1 Terpenoidi (Izoprenoidi).....	12
2.1.2.2. Fenolne komponente.....	16
2.1.2.3. Ugljeni hidrati i njihovi derivati	17
2.1.2.4. Masne kiseline i masti	18
2.1.2.5. Amino-kiseline i proteini	18
2.1.2.5. Mikrobi	18
2.1.2.6. Mineralne materije.....	19
2.1.3 Tržište funkcionalne hrane.....	19
2.2 GANODERMA LUCIDUM	23
2.2.1.Hemijski sastav gljive	24
2.2.1.1. Polisaharidi	25
2.2.1.2. Triterpeni <i>Ganoderma lucidum</i>	28
2.2.1.3. Ostali konstituenti prisutni u <i>Ganoderma lucidum</i>	29
2.2.2. <i>Ganoderma lucidum</i> – terapijska primena.....	30
2.2.2.1. Antioksidativna svojstva <i>Ganoderma lucidum</i>	30
2.2.2.2. Antitumorna svojstva.....	33
2.2.2.2.1. Mehanizmi delovanja <i>Ganoderma lucidum</i> na karcinom.....	33
2.2.2.3. Antiviralna aktivnost	41
2.2.2.4. Antimikrobna i antiparazitska svojstva.....	43
2.2.2.5. Uticaj <i>Ganoderma lucidum</i> na urinarni trakt muškaraca	44
2.2.2.6. Neuro-protektivni efekat <i>Ganoderma lucidum</i>	45
2.2.2.7. Antidijabetska svojstva <i>Ganoderma lucidum</i>	45
2.2.2.8. Dejstvo <i>Ganoderma lucidum</i> na kardiovaskularni sistem.....	47
2.2.2.9. Toksičnost <i>Ganoderma lucidum</i>	48
2.3. PIVO.....	49
2.3.1. Pivo nekada	49
2.3.2. Pivo danas	52
2.3.2.1. Piva sa specifičnim senzornim svojstvima.....	52
2.3.2.2. Piva namenjena ciljnoj grupi potrošača sa specifičnim zahtevima u pogledu načina ishrane	54
2.3.3. Tržište piva	57
2.3.4. Hemijski sastav piva	61
2.3.5. Zdravstveni aspekti konzumiranja piva.....	65
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	72
4. EKSPERIMENTALNI DEO.....	73
4.1. MATERIJAL	73
4.2. METODE.....	73
4.2.1. Analiza gljive <i>Ganoderma lucidum</i>	73
4.2.2. Priprema ekstrakata gljive <i>Ganoderma lucidum</i>	74

4.2.2.1. Etanolni ekstrakti.....	74
4.2.2.1. Vodeni ekstrakti.....	75
4.2.3. Određivanje ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta.....	75
4.2.4. Određivanje sadržaja glukana.....	76
4.2.5. Određivanje antimikrobnih svojstava.....	76
4.2.6. Određivanje citotoksičnog efekta.....	77
4.2.7. HPLC i LC-MS analiza.....	78
4.2.8. FT-IR analiza.....	79
4.2.9. CIElab analiza.....	80
4.2.10. NMR analiza.....	80
4.2.11. GC i GC-MS analiza.....	80
4.2.12. Postupci dobijanja piva sa <i>Ganoderma lucidum</i>	81
4.2.12.1. PIVO obogaćeno gljivom <i>Ganoderma lucidum</i> dodatom u ohmeljenu sladovinu.....	81
4.2.12.2. Dobijanje piva sa ekstraktom <i>Ganoderma lucidum</i> dodatom u gotov proizvod.....	82
4.2.13. Analiza osnovnih parametara kvaliteta sladovine i piva.....	82
4.2.14. Određivanje koncentracije kvasca pomoću Thoma komore za brojanje.....	83
4.2.15. Određivanje kvaliteta pene.....	83
4.2.16. Senzorna analiza piva.....	84
4.2.17. In vivo ispitivanja.....	85
4.2.17.1. In vivo ispitivanja na pacovima.....	85
4.2.17.1. In vivo ispitivanja na ljudima.....	85
4.2.17. Statistička obrada podataka.....	86

5. REZULTATI I DISKUSIJA..... 87

5.1. HEMIJSKI SASTAV GLJIVE <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	87
5.2. ANALIZA EKSTRAKTA <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	87
5.2.1. Uticaj načina ekstrakcije na količinu azotnih materija.....	88
5.2.2. Uticaj načina ekstrakcije na količinu masti.....	91
5.2.3. Uticaj načina ekstrakcije na količinu ugljenih hidrata.....	93
5.2.4. Uticaj načina ekstrakcije na količinu fenolnih materija.....	95
5.2.5. Uticaj načina ekstrakcije na prinos ekstrakata.....	98
5.2.6. Senzorna ocena ekstrakata.....	100
5.2.7. BI-PLOT dijagram i analiza ekstrakata <i>Ganoderma lucidum</i>	103
5.2.8. Analiza sadržaja glukana u izabranim ekstraktima.....	107
5.2.9. Antimikrobna svojstva dobijenih ekstrakata.....	109
5.2.10. Citotoksičnost ekstrakata <i>Ganoderma lucidum</i>	111
5.2.11. Analiza antioksidativnog potencijala i ukupnih polifenola izabranih ekstrakata.....	113
5.2.12. HPLC analiza.....	119
5.2.13. LC-MS analiza ekstrakata <i>Ganoderma lucidum</i>	123
5.2.14. Analiza isparljivih komponenti ekstrakata <i>Ganoderma lucidum</i>	125
5.2.15. NMR spektroskopija ekstrakata G5 <i>Ganoderma lucidum</i>	128
5.2.16. Analiza boje ekstrakta CIElab metodom.....	128
5.3. POSTUPCI DOBIJANJA PIVA SA <i>GANODERMA LUCIDUM</i> I SENZORNA OCENA DOBIJENIH PIVA.....	130
5.3.1. Pivo obogaćeno gljivom <i>Ganoderma lucidum</i> dodatom u ohmeljenu sladovinu.....	130
5.3.1.1. Uticaj <i>Ganoderma lucidum</i> na dinamiku fermentacije.....	130
5.3.1.2. Senzorna analiza piva dobijenih fermentacijom sa <i>Ganoderma lucidum</i>	132
5.3.2. Dobijanje piva sa ekstraktom <i>Ganoderma lucidum</i> dodatom u gotov proizvod.....	134
5.3.2.1. Senzorna analiza piva dobijenih dodatkom ekstrakta <i>Ganoderma lucidum</i> u gotov proizvod.....	135
5.3.2.1.1. Razlike senzornih karakteristika analiziranih piva u odnosu na pol.....	142
5.3.2.1.2. Uticaj pušenja na senzorne ocene ispitanika.....	146
5.3.2.1.3. Razlike između konzumenata i nekonzumenata u pogledu senzornih ocena piva.....	147

5.3.2.2. Bezalkoholno pivo sa <i>Ganoderma lucidum</i>	149
5.3.2.3. Senzorni profil dobijenih piva	152
5.4. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA PIVA	157
5.4.1. Osnovni fizičko-hemijski parametri	157
5.4.2. Postojanost i kvalitet pene	159
5.4.3. HPLC i LC-MS analiza	161
5.4.4. GC analiza	165
5.4.5. NMR analiza	167
5.4.6. FT-IR spektroskopija	169
5.4.7. Antioksidativna svojstva ispitivanih bezalkoholnih piva.....	170
5.5. FARMAKOLOŠKA I ANTIMIKROBNA SVOJSTVA PIVA NA BAZI GLJIVE <i>GANODERMA LUCIDUM</i>	171
5.5.1. Citotoksična svojstva	171
5.5.2. Antimikrobna svojstva.....	173
5.5.4. Uticaj alkohola, piva i piva sa ekstraktom <i>Ganoderma lucidum</i> na krvni pritisak i srčanu frekvencu pacova	174
5.5.5. Ispitivanje uticaja piva sa ekstraktom <i>Ganoderma lucidum</i> na krvni pritisak i srčanu frekvencu muškaraca mlađe starosne dobi	180
5.5.5. Ispitivanje uticaja piva sa ekstraktom <i>Ganoderma lucidum</i> na QT i RR intervale	185
5.6. MOGUĆNOSTI PLASIRANJA DOBIJENIH PROIZVODA I TROŠKOVI PROIZVODNJE	187
6. ZAKLJUČAK	190
7. LITERATURA	199
8. BIOGRAFIJA AUTORA.....	265

1. UVOD

Globalni trendovi u pogledu potrošnje piva postavljaju pred proizvođače sve brojnije zahteve u smislu ponude novih proizvoda na savremenom tržištu. To se odnosi na visok nivo kvaliteta, zadovoljavajuće senzorne karakteristike, ali u poslednje vreme sve više i odgovarajuću nutritivnu vrednost. Specijalne vrste piva se razlikuju od tradicionalnih po svojim specifičnim senzornim karakteristikama gde se pored osnovnih sirovina: ječmenog slada, hmelja, vode i pivskog kvasca, za proizvodnju koriste atipične sirovine (voće, razne arome) ili se primenjuje poseban način proizvodnje koji nije karakterističan za pivarsku industriju. Pivo kao potpuno prirodan i biološki uravnotežen proizvod, zbog svog niskog sadržaja alkohola, prisutnih nutrijenata predstavlja odličnu osnovu za dobijanje novih proizvoda sa dodatom vrednošću (Leskošek–Čukalović et al. 2007). Brojna istraživanja pokazuju da zbog sadržaja ugljenih hidrata, aminokiselina, vitamina i provitamina, organskih kiselina, fenolnih jedinjenja i gorkih sastojaka hmelja itd., ukoliko se unosi u umerenoj količini može imati povoljan uticaj na organizam (Leskošek–Čukalović 2016). Veliki broj istraživanja je pokazao i da u umerenim količinama može značajno da poveća nivo vitamina B2, B6, B12 i vitamina A, kao i mineralnih materija kalijuma, magnezijuma i silicijuma (Preedy 2011).

Gljive spadaju u najrasprostranjenije žive organizme na Zemlji. Broj gljiva na svetu se procenjuje na između 550 000 i 1.6 miliona. Vekovima su korišćene kao ukusna hrana, lek, ili po potrebi otrov (Mizuno 1995). Ljudi su ih upotrebljavali za ishranu, ne samo zbog interesantnog ukusa, strukture i hranljive vrednosti, već i zbog dokazanih terapijskih vrednosti (Bishop et al. 2015). Gljive sa lekovitim svojstvima imaju značajno mesto u tradicionalnoj medicini, kao i u tretiranju različitih bolesti i zdravstvenih problema (Teschke et al. 2016, Shaw et al. 1997). Globalno interesovanje za prirodne i alternativne terapije dovelo je do intenziviranja istraživanja na polju njihovih medicinskih svojstava i delovanja na čovekov organizam. Posebnu pažnju i interesovanje zbog svojih terapijskih svojstava privukla je gljiva *Ganoderma lucidum* (Patel and Soni 2014, Mohan et al. 2015).

Ganoderma lucidum je lignokolna gljiva koja raste na panjevima, korenju ili na stablima listopadnog drveća, najčešće hrasta i kestena i to u Aziji, Evropi i Severnoj i Južnoj Americi. Istraživanja vršena do danas pokazala su da polisaharidi gljive

Ganoderma lucidum deluju kao nespecifični stimulatori imunog sistema što je, generalno, posledica aktiviranja makrofaga. Pod uticajem biološki aktivnih supstanci gljive *Ganoderma lucidum* dolazi do aktiviranja T limfocita, makrofaga i ćelija prirodnih ubica, što dovodi do produkcije citokinina, uključujući interleukine, tumor nekrotičnog faktora – α i interferona (Zhao et al. 2011, Boh 2013, Suarez-Arroyo et al. 2013). Smatra se da je terapijska aktivnost kao anti-kancerogenog i anti-inflamatornog faktora povezana sa njenim imunomodulatorskim svojstvima (Kao et al. 2013). Na osnovu ispitivanja *in vivo* i *in vitro* utvrđeni su različiti farmakološki efekti ekstrakata cele gljive kao što su njihovo delovanje kao analgetika, antialergena, antiinflamatorna svojstva i antibakterijska svojstva izražena protiv rodova bakterija *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Bacillus pneumoniae* (Mohan et al. 2015, Nayak et al. 2015, Hasnat et al. 2015). Utvrđeno je da deluju kao antioksidanti tako što eliminišu slobodne radikale, pokazuju antitumornu aktivnost, imaju antivirusni efekat koji se iskazuje time što izaziva produkciju interferona; snižavaju krvni pritisak, povećavaju proliferaciju ćelija koštane srži, snižavaju nivo holesterola, regulišu metabolizam miokarda, obezbeđuju opšte poboljšanje stanja imunog sistema, pokazuju anti-HIV aktivnost *in vitro* i *in vivo*, povećavaju produkciju interleukina-1 i interleukina-2 *in vitro* itd. (Shi et al. 2013, Suarez-Arroyo et al. 2013, Zhang et al. 2014, Kan et al. 2015, Ma et al. 2015).

Ideja da se funkcionalna svojstva gljiva iskoriste za proizvodnju specijalnih piva nije nova. Piva na bazi gljiva već se mogu naći na svetskom tržištu mada je većina njih još uvek u eksperimentalnoj fazi ispitivanja (Leskošek-Čukalović et al. 2010, Leskosek-Cukalovic et al. 2010). Najpoznatiji proizvodi ove vrste su, belgijska piva na bazi gljive Šitake (*Lentinula edodes*) “*Epic Ales Terrasaurus*” i “*Shiimake*”.

2. PREGLED LITERATURE

2.1 Funkcionalna hrana

Još od davnina postojalo je interesovanje ljudi za sastav i ulogu hrane u održavanju zdravlja. Savremena naučna saznanja u oblasti ishrane dokazala su da hrana, pored osnovnih nutritivnih karakteristika, može potencijalno da ima i funkcionalnu ulogu u organizmu (Augustin et al. 2016, Fieldhouse 2013). Stoga i ne čudi konstantna zainteresovanost potrošača za namirnice koje mogu da im pruže određenu zdravstvenu korist (Lappalainen et al. 1998, Lähteenmäki 2013). Sa druge strane, istraživači intenzivno rade na definisanju potencijalnih bioaktivnih komponenti koje imaju funkcionalna svojstva (Siro et al. 2008, Young 2000). Razloga za sve većom potražnjom funkcionalne hrane ima više, a u iste spadaju novi zdravstveni trendovi, inovacije u prehrambenoj tehnologiji i činjenica da je populacija sve starija (Bech-Larsen and Scholderer 2007, Hasler 2002, Kalra 2003).

Zbog ubrzanog tempa života, u ljudskoj ishrani dolazi do pojave deficita, odnosno suficita određenih nutrijenata, što dovodi do toga da sve veći broj ljudi pati od bolesti direktno uzrokovanih neadekvatnim načinom ishrane. Prethodno navedeno za posledicu ima srčana oboljenja i karcinom, i slično, kao glavne uzročnike smrtnosti u svetu (Lozano et al. 2013, Mathers and Loncar 2006). Iako genetika igra glavnu ulogu u razvoju pomenutih bolesti, smatra se da se većina njih može sprečiti ili umanjiti pravilnom ishranom i fizičkom aktivnošću (Badano and Katsanis 2002, Hasler and Brown 2009, Childs and Poryzees 1998). Pored toga, zdravstveno stanje se može dodatno poboljšati uzimanjem odgovarajućih suplemenata i konzumiranjem hrane koja je posebno formulisana i/ili sadrži nutrijente koji doprinose boljem opštem stanju organizma. Upravo u ovome leži ključ uspeha funkcionalne hrane danas. Njena uloga bi bila ne samo da nadomesti nedostatak određenog nutrijenta u organizmu, već i da spreči razvoj hroničnih oboljenja i povoljno deluje na zdravlje (Hasler 2002, Hasler 2000, Hilliam 1996, Childs 1999, Paulionis 2008).

Još jedan od razloga za rastuću popularnost funkcionalne hrane leži i u edukaciji. Razvoj informacionih tehnologija i brojni časopisi koji se bave ishranom omogućili su dostupnost velikom broju podataka i podizanje svesti o značaju hrane i

njenom uticaju na zdravlje (Poelman et al. 2013, Bornkessel et al. 2014, Alexander et al. 2015). Međutim, dugoročno gledano, tržište funkcionalne hrane zavisi, u najvećoj meri, od svesti potrošača i njihovog prihvatanja iste (Childs 1997, Verbeke 2005, Gaston Ares et al. 2008).

2.1.1 Koncept funkcionalne hrane

Koncept funkcionalne hrane nastao je u Japanu 1984. godine. Vlada Japana pokrenula je projekat na polju hrane za specifične zdravstvene namene *Food for specific health uses*, u svetu poznatiji kao *FOSHU* (Kiyoko 1998, MB Roberfroid 2000, James 1988, Dhiman et al. 2014). Nešto kasnije, 1990. godine, SAD započinje sopstveni projekat (*NLEA – Nutrition Labeling and Education Act*) u koncipiranju funkcionalne hrane, dok Evropska komisija istovremeno pokreće projekat pod nazivom *FUFOSE (Functional Food Science in Europe)*, koji uključuje oko 100 eksperata za ishranu i srodne nauke (Nielsen 2014). Danas, još uvek, ne postoji univerzalno prihvaćena definicija šta je to funkcionalna hrana, te tako većina organizacija koje se bave ishranom daju svoje objašnjenje (Shao 2017). Prvo obrazloženje ovog pojma dalo je japansko Ministarstvo zdravlja, rada i socijalne zaštite 1991.godine po kome je u pitanju „hrana od koje se očekuje da pruža određenu zdravstvenu korist, licencirana je i nosi oznaku prema kojoj osoba koja je koristi za određeno zdravstveno stanje može očekivati korist od iste“ (Kwak and Jukes 2001).

Prema Međunarodnom informacionom savetu za hranu (International food information Council (IFIC)), funkcionalna hrana je „hrana ili nutritivne komponente koje mogu da obezbede zdravstvenu korist van okvira osnovne ishrane“ (Bigliardi and Galati 2013). Međunarodni institut za prirodne nauke Severne Amerike (The International life science institute of North America (ILSI)) definiše ovaj pojam kao „hranu koja dejstvom fiziološki aktivnih komponenti obezbeđuje zdravstvenu korist izvan osnovne ishrane“ (Clydesdale 1999). Federalna zdravstvena služba Kanade objašnjava funkcionalnu hranu kao „hranu sličnu konvencionalnoj, koja se konzumira svakodnevno, sa izraženim fiziološkim karakteristikama koje mogu da dovedu do smanjenja hroničnih oboljenja van okvira osnovnih nutritivnih svojstava“ (Hailu et al. 2009). Komitet za funkcionalnu hranu sa centrom u Sjedinjenim Američkim Državama

definiše termin kao „prirodnu ili prerađenu hranu koja sadrži poznate ili nepoznate bioaktivne komponente koje, u definisanim, efektivnim, netoksičnim količinama, pružaju klinički dokazanu i dokumentovanu zdravstvenu korist u prevenciji, regulisanju ili lečenju hroničnih bolesti“ (Martirosyan and Singh 2015).

Evropska komisija za zajedničku akciju na polju funkcionalne hrane Evrope (The European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE)) opisuje funkcionalnu hranu kao „namirnicu koja se može smatrati funkcionalnom ukoliko je na zadovoljavajući način pokazano da povoljno utiče na jednu ili više funkcija organizma, van okvira uobičajenih nutritivnih efekata, i na način koji je značajan za opšte zdravstveno stanje ili za smanjenje rizika od bolesti“ (Action 1999, DIPLOCK et al. 1999). Odatle je krajem devedesetih godina prošlog veka i proizišao Evropski konsenzus za funkcionalnu hranu, po kome se ovaj pojam objašnjava kao:

- a) svakodnevna hrana,
- b) hrana koja je deo uobičajene ishrane,
- c) sastavljena od prirodnih sastojaka, nekada u većim koncentracijama od uobičajenih, ili prisutna u hrani u kojoj se inače ne bi našla,
- d) ima pozitivno dejstvo na specifične funkcije organizma van okvira osnovne nutritivne funkcije,
- e) može dovesti do poboljšanja opšteg zdravlja ili do smanjenja rizika od bolesti kako bi poboljšala kvalitet života,
- f) hrana u kojoj su neki sastojci uklonjeni,
- g) hrana u kojoj su jedan ili više sastojaka modifikovani i
- h) koja poseduje autorizovane i naučno zasnovane dokaze (Echols 1998, Knorr 1998, Bellisle et al. 1998, DIPLOCK et al. 1999).

Osim Japana, trenutno nijedna zemlja u svom zakonodavnom sistemu nema funkcionalnu hranu definisanu kao takvu (Shimizu 2003, Martirosyan and Singh 2015). Evropska unija hranu definiše kao: „konvencionalnu hranu, modifikovanu hranu, hranu za specijalnu namenu i medicinsku hranu“ (Goldberg 2012). Zbog toga proizvođači u Evropi mogu koristiti dve vrste izjava: *nutritivne* i/ili *zdravstvene* izjave. Nutritivne se odnose na nutritivni sastav namirnica i energetske vrednosti, dok se zdravstvene izjave

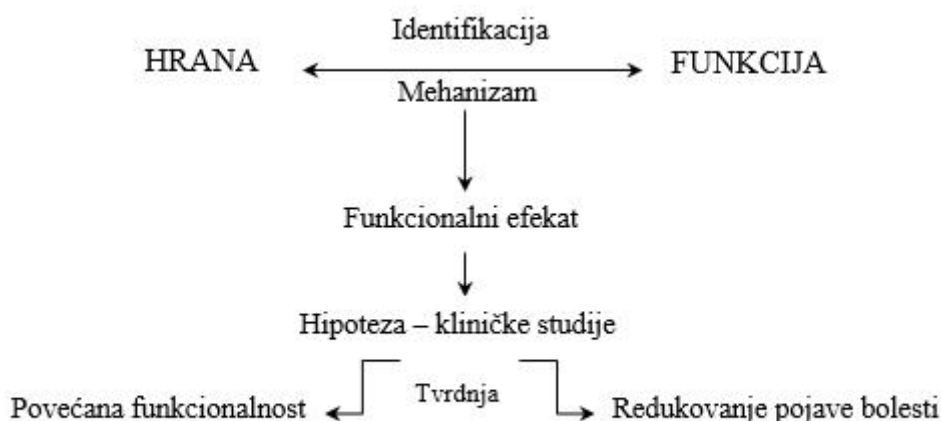
odnose na hranu koja ima sposobnost da spreči, reguliše ili leči (Bragazzi et al. 2017). U Sjedinjenim Američkim Državama Agencija za lekove i hranu (Food and drug administration (FDA)) prepoznaje u svom zakonodavnom sistemu jedino medicinsku hranu i dijetetske suplemente (Blumberg et al. 2010, Food and Administration 2009, Ellwood et al. 2010).

U zakonodavstvu Republike Srbije ne postoji definicija funkcionalne hrane, već se uvodi koncept zdravstvene izjave i izjave o nutritivnim svojstvima, regulisane Zakonom o Oglašavanju, Zakonom o zaštiti potrošača i Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda ('Zakon o oglašavanju' 2016, 'Zakon o zaštiti potrošača' 2016). Prema ovim aktima, oglašavanje bilo kakvih nutritivnih ili zdravstvenih karakteristika mora biti zasnovano na odgovarajućim naučnim nalazima.

Pravilnikom o dijetetskim suplementima se bliže određuje kategorija namirnica sa zdravstvenom izjavom i prema njemu je zdravstvena izjava bilo koja izjava kojom se tvrdi da postoji neka veza između namirnice (njenih sastojaka) i zdravlja (*Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda* 2015).

Funkcionalna hrana, kao i hrana uopšte, mora biti pre svega bezbedna po svim osobinama definisanim u postojećem zakonodavstvu, a potom i ispuniti dopunski zahtev – funkcionalnost, tj. opravdanost određene zdravstvene izjave (Dhiman et al. 2014, Kwak and Jukes 2001, Grunert 2005). Stoga je bilo potrebno ustanoviti proceduru za razvoj ovakve hrane (slika 2.1), koja podrazumeva identifikovanje određenih zdravstvenih aspekata u hrani; razumevanje mehanizama bioaktivnih komponenti prisutnih u hrani i načina njihovog delovanja na organizam; sprovođenje *in vitro* i *in vivo* kliničkih ispitivanja; i, konačno, definisanje zdravstvene izjave (Saarela 2011).

Korišćenje zdravstvene izjave u Republici Srbiji moguće je jedino ako se ona bazira na dokazanim, opšte prihvaćenim naučnim činjenicama, na postojanju podataka koji opravdavaju upotrebu takve izjave i ukoliko je ista odobrena od Ministarstva nadležnog za poslove zdravlja (*Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda* 2015).



Slika 2.1. Strategija razvoja funkcionalne hrane (Saarela 2011)

2.1.2 Bioaktivna jedinjenja

Da bi se razumeli mehanizmi po kojima potencijalna funkcionalna hrana ili njene komponente funkcionišu, neophodno je shvatanje osnovnih principa ishrane. Potrebno je identifikovati jedinjenja i objasniti, bar delimično, mehanizme po kojima takve komponente direktno ili indirektno dovode do poboljšanja zdravstvenog stanja ili smanjenja rizika od pojave bolesti (Nautiyal et al. 2008, Shahidi 2004, Roberfroid 2002, Milner 2000, Mandel et al. 2005, Hasler 2002). Broj bioaktivnih jedinjenja koja se koriste kao komponente funkcionalne hrane svakim danom raste i već dostiže stotine, a sama jedinjenja nije jednostavno klasifikovati: po sredi mogu biti makronutrijenti, mikronutrijenti, fitohemikalije, živi organizam itd. (Zhao 2007, Ho and Zheng 2002). U zavisnosti od interesovanja, bioaktivna jedinjenja se mogu podeliti na različite načine. Tako će npr. kardiolozi najviše biti zainteresovani za komponente koje dovode do smanjenja oboljenja kardiovaskularnog sistema, onkolozi za komponente koje imaju antitumorna svojstva, a prehrambeni inženjeri, pored funkcionalnih karakteristika, posebnu pažnju staviće na senzorne karakteristike, stabilnost i cenu proizvoda (Blumberg et al. 2010, Urala et al. 2003, Urala and Lähteenmäki 2004, Frewer et al. 2003, Gastón Ares et al. 2008). Na ovaj način posmatrane, bioaktivne komponente mogli bismo da grupišemo na nekoliko načina (McClements et al. 2015, Tapas et al. 2008, Shahidi and Naczk 2003, Singh and Sinha 2012, Dillard and German 2000):

- I. Prema izvoru:
 - a) biljne,
 - b) animalne,
 - c) mikrobe;
- II. Prema količini nutrijenata u hrani;
- III. Prema mehanizmu delovanja na organizam;
- IV. Prema hemijskoj strukturi:
 - a) terpeni,
 - b) fenolne supstance,
 - c) masne kiseline i lipidi,
 - d) ugljeni hidrati i njihovi derivati,
 - e) supstance na bazi amino-kiselina,
 - f) mikrobi,
 - g) minerali;

Podela bioaktivnih komponenti prema izvoru ima mnoštvo prednosti i može poslužiti kao pomoć pri kreiranju novih prehrambenih proizvoda. U tabeli 2.1 prikazane su bioaktivne supstance grupisane po ovom principu.

Model grupisanja biokativnih komponenti (BK) prema količini nutrijenata prisutnih u namirnicama prikladniji je u slučaju postojanja zainteresovanosti za specifičnu komponentu prisutnu u namirnici ili povezanosti ovog interesovanja sa geografskim predelom sa koga potiče specifična namirnica, odnosno sa razvojem funkcionalnog proizvoda. U tabeli 2.2 dat je prikaz BK koje su karakteristične za date namirnice (McClements et al. 2015, Shahidi and Naczk 2003, Dillard and German 2000, Wildman and Robert 2001).

Tabela 2.1. Bioaktivne supstance grupisane prema izvoru iz kog potiču (McClements et al. 2015, Tapas et al. 2008, Shahidi and Naczck 2003, Singh and Sinha 2012, Dillard and German 2000, Giavasis 2014a, Khatun et al. 2012)

Biljke	Životinje	Mikrobi
β-glukan	Konjugovana linolenska kiselina (CLA)	<i>Saccharomyces boulardii</i>
Askorbinska kiselina	Eikozapentaenska kiselina (EPA)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Kvercetin	Dokozaheksaenska kiselina (DHA)	<i>Bifidobacterium longum</i>
Celuloza	Holin	<i>Bifidobacterium infantis</i>
Lutein	Koenzim Q ₁₀	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Galna kiselina	Selen	<i>Ganoderam lucidum</i>
Hemiceluloza	Cink	<i>Ganoderma sinesis</i>
Lignin	Kreatin	<i>Ganoderma tsugae</i>
Selen		<i>Lentinus edodes</i>
Geraniol		<i>Grifola fondosa</i>
		<i>Coriolus versicolor</i>

Podela BK prema mehanizmu delovanja na organizam vrši njihovo grupisanje nezavisno od izvora namirnice, na osnovu dokazanih ili pretpostavljenih fizioloških karakteristika poput antioksidativnih, antimikrobnih, antihipertenzivnih, antiagregacionih, antiinflamatornih i antikancerogenih. Ovakva podela može biti od pomoći ne samo za dizajniranje specifične funkcionalne hrane, već i kao pomoć pojedincima koji imaju predispozicije za određene bolesti (McClements et al. 2015, Wildman and Robert 2001, Van Kleef et al. 2005, Hardy 2000). U tabeli 2.3 data je podela BK prema mehanizmu delovanja na organizam.

Prilikom dizajniranja funkcionalne hrane po ovom osnovu, posebna pažnja mora se posvetiti sinergizmu, mogućoj toksičnosti i kompetitivnosti BK, pri čemu se može javiti problem, jer su relacije koje postoje između određenih BK i dalje nepoznanica i još uvek nedovoljno istražene (Marcel B Roberfroid 2000, Smith and Charter 2011, Holdt and Kraan 2011). Postupak za stavljanje određene BK na *GRAS* listu (*Generally regarded as safe*) veoma je komplikovan i dugotrajan, a podrazumeva veliki broj kliničkih ispitivanja njihove apsorpcije, metabolizma i toksičnosti na različitim

modelima u akutnom i hroničnom stanju (Cramer et al. 1976, Burdock and Carabin 2004, Burdock et al. 2006).

Tabela 2.2. Namirnice sa visokim sadržajem specifičnih bioaktivnih komponenti (McClements et al. 2015, Shahidi and Naczk 2003, Dillard and German 2000, Wildman and Robert 2001, Jerkovic and Collin 2007, Rossi et al. 2012)

Bioaktivna komponenta	Namirnica
Izoflavoni	Soja i druge leguminoze
Kvercetin	Luk, crveno grožđe, citrusi
EPA/DHA	Riblje ulje
β -glukan	Ovas, kvasci, gljive, ječam, slad
Katehin	Čaj, bobice šumskih plodova, kakao, jabuke, grožđe
Elaginska kiselina	Grožđe, jagode, maline, lešnici
Celuloza	Većina biljaka
Inulin	Cela zrna žitarica, crni i beli luk
Antocijani	Crveno vino
Geraniol	Nana, hmelj, bosiljak, maslinovo ulje, timijan, ruzmarin, grožđe
Resveratrol	Grožđe, vino, kikiriki, hmelj

Prva supstanca koja je prošla ovakva ispitivanja i dobila odobrenje da se kortisti kao *GRAS* jeste beta-glukan, poreklom iz ovasa. Međutim, mnogo drugih BK je deklarirano na *GRAS* listi isključivo na osnovu toga što se vekovima tradicionalno koriste kao deo ishrane i medicine (Burdock and Carabin 2004, Burdock et al. 2006, Kolberg and Wiemer 2009, Ulbricht 2014). Upravo u tome i leži opasnost, jer biljke mogu sadržati komponente koje su u manjim dozama terapijske, a u većim toksične. U studiji koja je trajala pet godina i pratila preko 1000 različitih slučajeva, u preko 61% utvrđena je toksična doza BK (Shaw et al. 1997, Izzo and Ernst 2001, Izzo and Ernst 2009, Di Lorenzo et al. 2015, Teschke et al. 2016).

Tabela 2.3. Podela bioaktivnih komponenti prema mehanizmu delovanja na organizam (McClements et al. 2015, Wildman and Robert 2001, Van Kleef et al. 2005, Hardy 2000)

Antitumorna svojstva	Pozitivni efekat na lipidni profil krvi	Antioksidativna svojstva	Antiinflamatorna svojstva	Osteo-protektivna svojstva
γ -tokotrienol	β -glukan	Askorbinska kiselina	Linolenska kiselina	Proteini soje
α -tokotrienol	γ -tokotrienol	β -karoten	EPA	Kalcijum
<i>Lb.acidophilus</i>	δ -tokotrienol	Tokoferoli	DHA	Inulin
Limonen	Kvercetin	Lutein	Gama-linolenska kiselina (GLA)	Fruktooligo saharidi
Kaspaicin	Resveratrol	α -tokoferol	Kvercetin	Silicijum
Kurkumin	Tanini	Elaginska kiselina	Kurkumin	8-prenil-naringenin
α -tokoferol	β -sitosteroli	Likopen	Ganoderinske kiseline	
Elaginska kiselina	Pektin	Hidroksitirazol	Lucidinske kiseline	
Lutein		Katehin		
		Tanini		
		Ganoderinske kiseline		
		Lucidinske kiseline		

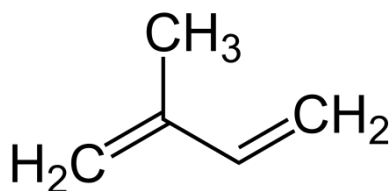
Bioaktivne komponente možemo grupisati i na osnovu njihove hemijske strukture (tabela 2.4). Ovakav način nam omogućava da BK budu klasifikovane prema karakterističnim molekularnim grupama, među kojima se one veće dele na podgrupe (Wildman and Robert 2001, Sut et al. 2016, Park et al. 2016) .

Tabela 2.4. Podela bioaktivnih komponenti na osnovu njihove hemijske strukture (Wildman and Robert 2001, Sut et al. 2016, Park et al. 2016)

Bioaktivne komponente						
Terpeni	Fenolne supstance	Masne kis. i lipidi	Ugljeni hidrati i derivati	Amino-kiseline i derivati	Mikrobi	Minerali
Karotenoidi	Tanini	Monozasićene masne kiseline	Oligosaharidi	Amino-kiseline	Probiotici	Ca
Saponini	Kumarini	Konjugovana linolenska kiselina	Askorbinska kiselina	Folati	Prebiotici	Se
Tokoferoli	Lignini	Polinezasićene masne kiseline	Neskrobni polisaharidi	Holin		K
Tokotrienoli	Stilbeni	Lecitin		Izotiociinati		Cu
Prosti terpeni	Fenolne kiseline			Indoli		Zn
	Flavoni			Kapsicino-idi		
	Izoflavoni					
	Flavonoli					
	Flavonini					
	Antocijanidini					
	Proantocijanidini					

2.1.2.1 Terpenoidi (Izoprenoidi)

Terpenoidi i *izoprenoidi* su termini koji se odnose na istu klasu jedinjenja. Ove supstance su jedna od najvećih grupa sekundarnog metabolizma biljaka, i ujedno osnova mnogih BK. Ovde ubrajamo karotenoide, tokoferole, tokotrienole i saponine. Terpenoidima nazivamo i derivate izoprena (slika 2.2), koji ujedno i čine njihovu osnovu.



Slika 2.2. Strukturna formula izoprena (Clews and Schallamach 1946)

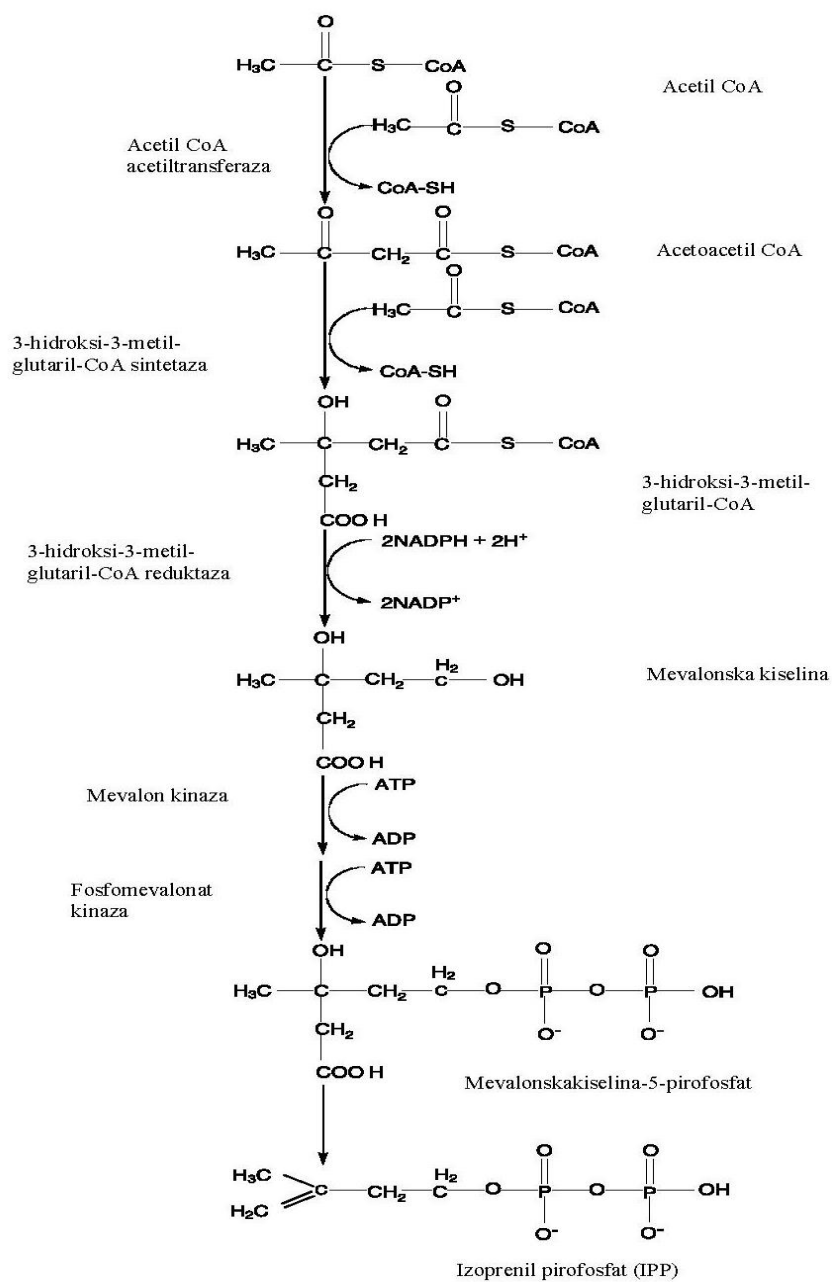
Izopren može nastati sintezom iz acetil-koenzima A (CoA), u tzv. mevalonatnom putu (slika 2.3) ili metaboličkim putem iz piruvata i 3-fosfoglicerinske kiseline. U oba slučaja, krajnji produkt je izoprenil-fosfat (IPP), koji se smatra

osnovnim molekulom većih izoprenilnih lanaca. Jednom nastali IPP može reverzibilno da izomerizuje do dimetilalil-pirofosfata (DMAPP), kao što je prikazano na slici 2.4.

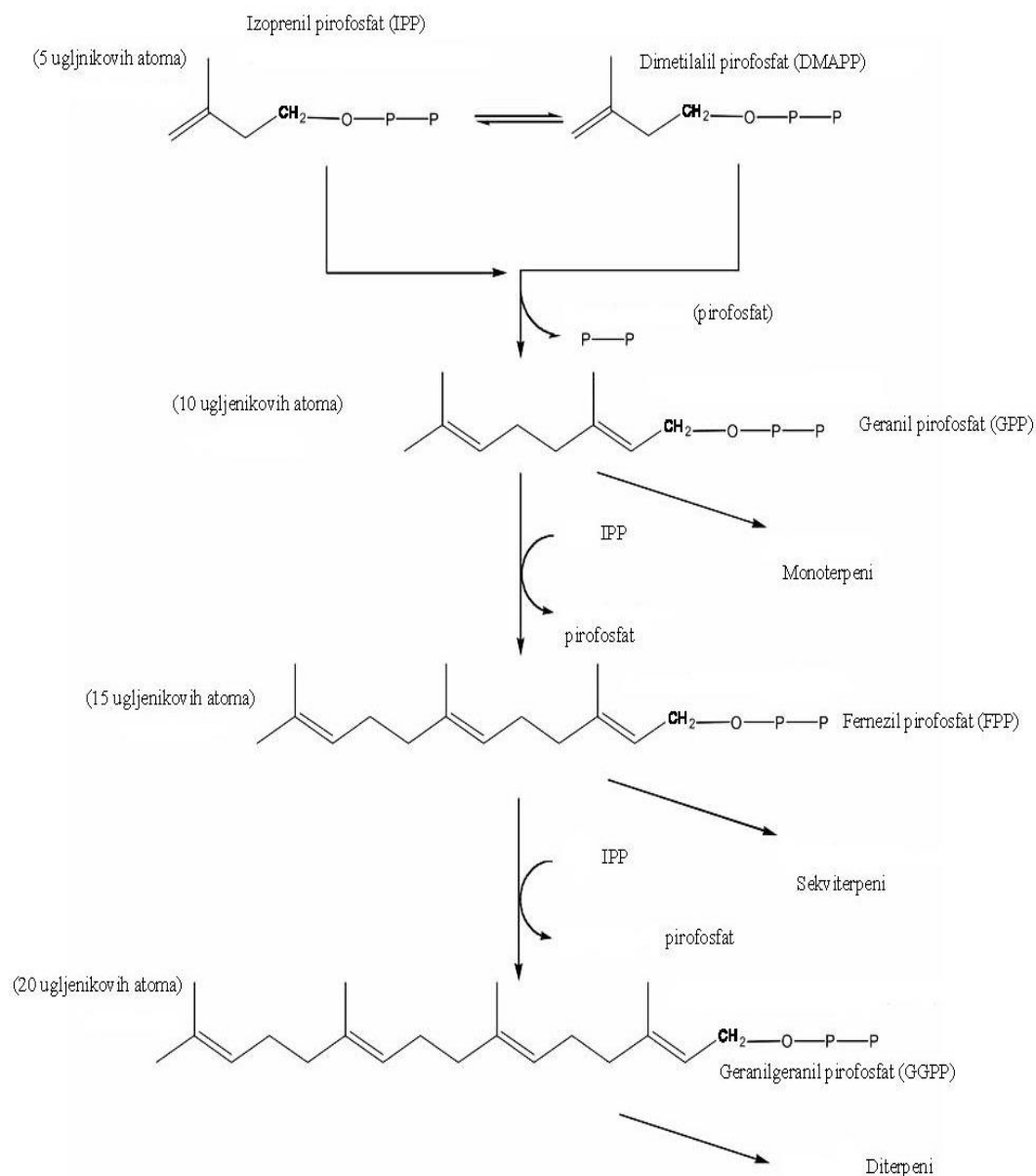
Svaki od ovih pet-karbonskih molekula formira geraniol-pirofosfat (GPP), od koga mogu nastati monoterpeni, među kojima su limonen i perilil-alkohol. GPP sa IPP može nagraditi 15-karbonska jedinjenja, poput fernezil-pirofosfata (FPP), od koga dalje mogu nastati sekviterpeni.

Reakcijom FPP i IPP ili FPP nastaju 20-karbonska jedinjenja, poput geranilgeranil-pirofosfata (GGPP), ili 30-karbonska jedinjenja, poput skvalena. Daljom reakcijom GGPP mogu nastati diterpeni, dok skvalen može da nagradi triterpene i steroide. Kondenzacijom GGPP i GPP nastaju 40-karbonska jedinjenja, koja kasnije mogu da nagrade tetraterpene (Sharkey 1996, Goldstein and Brown 1990, Eisenreich et al. 2004, Hunter 2007, Hemmerlin et al. 2012, Liao et al. 2016).

Monoterpeni i sekviterpeni su isparljive komponente, koje možemo naći kod većine biljaka u obliku esencijalnih ulja. Tako, na primer, BK poput limonena, mircena i α -pinena možemo naći u hmeljnim uljima (Banthorpe et al. 1972, Perrucci et al. 1995, Wang and Dixon 2009, Nance and Setzer 2011).



Slika 2.3. Mevalonatni put (Sharkey 1996, Goldstein and Brown 1990, Eisenreich et al. 2004, Hunter 2007, Hemmerlin et al. 2012, Liao et al. 2016)

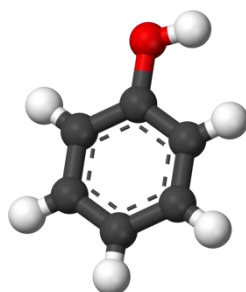


Slika 2.4. Formiranje terpena (Wildman and Robert 2001)

Naučno je dokazano da nekoliko triterpena, od kojih su najpoznatiji limonoidi, ima bioaktivna svojstva. Ovi triterpeni su zastupljeni u biljkama i citrusima i odgovorni su za njihovu gorčinu (Crozier et al. 2008, Edrada et al. 2000). Ukoliko su vezani za glukozu, formiraju limonoid-glikozid, što ih čini rastvorljivijim i manje gorkim, te su samim tim prihvatljiviji za upotrebu u formulaciji funkcionalnih proizvoda (Hasegawa et al. 1989, Ozaki et al. 1991, Hasegawa and Miyake 1996, Craig 1999).

2.1.2.2. Fenolne komponente

Kao i terpenoidi, fenolne komponente se smatraju sekundarnim metabolitima biljaka. Osnova strukture ove velike familije je fenol (slika 2.5), koji je ujedno i polazni molekul za molekule poput antocijana, kumarina, flavonoida, tanina i lignina (Cuvelier et al. 1992, Rice-Evans et al. 1996) . Uloga fenolnih komponenti u biljnom svetu je višestruka i ogleda se u borbi protiv patogenih bakterija, apsorpciji svetlosti, zaštite od biljojeda, redukovanju rasta kompetitivnih biljaka i potpomaganju simbioze sa azotofiksirajućim bakterijama (Hayat et al. 2007, Nicholson and Hammerschmidt 1992, Farkas and Kiraaly 1962).



Slika 2.5. Fenol

Postoji nekoliko biosintetskih puteva koji opisuju nastanak fenolnih komponenata. Dominantni su ciklus šikiminske kiseline i ciklus malonske kiseline. Šikiminski ciklus je karakterističan za više biljke, dok je malonski dominantan u metabolizmu nižih biljaka, gljiva i bakterija. Malonski ciklus počinje sa acetyl-CoA, dok ciklus šikiminske kiseline koristi proste ugljene hidrate (kao intermedijere glikolize) i pentoza-fosfatni put (PPP) za formiranje aromatičnih amino-kiselina, kao što su fenilalanin, triptofan i tirozin. Jednom formiran, fenilalanin se može dalje koristiti za sintezu flavonoida. Nastanak cinaminske kiseline od fenilalanina katalizovan je fenilalanin amonijak-lijazom (PAL), koja se dodatno sintetise u biljkama usled gljivičnih infekcija. Iz *trans*-cinaminske kiseline može nastati nekoliko prostih fenola, poput derivata benzojeve kiseline, vanilina i salicilne kiseline. *Trans*-cinaminska kiselina se može prevesti u *para*-kumarinsku kiselinu, čiji su derivati kofeinska i ferulinska kiselina. Ukoliko dođe do vezivanja CoA sa *para*-kumarinskom kiselinom, dolazi do nastajanja *para*-kumaril-CoA, koji podleže daljoj enzimskoj modifikaciji stvarajući

polifenolne komponente, poput halkona i flavonona (Hrazdina and Wagner 1985, Tomás-Barberán and Espin 2001, Boudet 2007, Treutter 2001, Koes et al. 1994, Neish 1964, Ghasemzadeh and Ghasemzadeh 2011).

Flavononi su prekursori za stvaranje flavona, izoflavona i flavonola, a od njih mogu nastati antocijani i tanini (Tanaka et al. 2008, Delgado-Vargas et al. 2000, Winkel-Shirley 2001).

Flavonoidi su jedna od najzastupljenijih klasa fenolnih komponenata u biljkama. Njihova osnovna struktura sadrži petnaest ugljenikovih atoma sa dva aromatična prstena, povezana sa tri atoma ugljenika. Većina prirodnih flavonoida su zapravo glikozidi. Prisustvo hidroksilne grupe i šećera će povećati hidrofилna svojstva molekula, dok metil-estarske ili modifikovane izoprenilske grupe dovode do povećanja lipofilnih svojstava flavonoida (Delgado-Vargas et al. 2000, Winkel-Shirley 2001, Winkel-Shirley 2002, Bors et al. 1990, Harborne 2013, Cook and Samman 1996, Mabry et al. 2012).

Antocijani i antocijanidini su pigmenti odgovorni za boju većine voća i povrća. Poznato je svega šesnaest antocijana identifikovanih u biljkama poput cijanidina, delfinidina, malvidina i petunidina (Tanaka et al. 2008, Harborne 2013, Mabry et al. 2012).

2.1.2.3. Ugljeni hidrati i njihovi derivati

Vitamin C, verovatno jedna od najpoznatijih bioaktivnih komponenti i sastojak mnogih funkcionalnih proizvoda, zapravo je derivat glukoze. Glavna funkcija askorbinske kiseline jeste njen antioksidativni potencijal (Padayatty et al. 2003, Wheeler et al. 1998, Linster and Van Schaftingen 2007).

Od složenih ugljenih hidrata, najpoznatiju grupu BK čine vlakna, materije koje ljudski organizam ne može da vari zbog nedostatka potrebnih enzima. Njihova uloga je uglavnom u vezi sa bolestima digestivnog trakta i gojaznošću, a glavni predstavnici su celuloza, lignin, pektin i hitin (Ma et al. 2005, Zhong Q Wang et al. 2007, Raninen et al. 2011, Liese et al. 2005, Rojas et al. 2014).

2.1.2.4. Masne kiseline i masti

Trenutno postoji nekoliko masnih kiselina i njihovih derivata koje zaokupljaju pažnju naučnika. Konjugovana linolenska kiselina (CLA) i ω -3 masne kiseline (α -linolenska kiselina – ALA, eikozapentaenska kiselina – EPA, i dokozaheksaenska kiselina – DHA) glavni su predstavnici ove grupe jedinjenja. Njihovo blagotvorno dejstvo na kardiovaskularni sistem dokazano je u brojnim studijama (Marangoni et al. 2012, Pariza et al. 2001, Melagraki et al. 2009, Shinto et al. 2014, Connell et al. 2011, Lopez-Huertas 2010, Sultan et al. 2012, Kris-Etherton et al. 2002, Mozaffarian and Wu 2011).

2.1.2.5. Amino-kiseline i proteini

Bioaktivna svojstva pojedinih amino-kiselina i njihovih derivata ispituju se već duži niz godina, a među njima se posebno ističu arginin, taurin, folna i asparaginska kiselina. Arginin poseduje kardioprotektivna svojstva i može ublažiti tegobe različitih stadijuma ateroskleroze, folna kiselina se smatra nezaobilaznom u prenatalnom periodu, dok taurin ima antioksidativna svojstva (Goldberg 2012, Andlauer and Fürst 2002, Kharb and Singh 2004, Visioli et al. 2006).

2.1.2.5. Mikrobi

Kada se pomenu mikrobi i njihovo bioaktivno delovanje, prva asocijacija jeste njihova probiotska funkcija i njihovo probiotsko delovanje. Ova grupa obuhvata bakterije i kvasce poput *Lactobacillus acidophilus*, *L.plantarum*, *L.casei*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *Streptococcus salvarius subspecies thermophilus* i *Sacharomyces boulardii*. Da bi bakterije, odnosno kvasci, mogli biti klasifikovani kao probiotici, oni moraju biti otporni na pH želuca i na dejstvo digestivnih enzima prisutnih u gastrointestinalnom traktu, sposobni da nasele donji deo intestinalnog trakta, bezbedni za čovekov organizam i sa naučno dokazanim dejstvom (Fuller 1992, Goldin and Gorbach 1992, Nagashima et al. 2013, Johnston et al. 2016, Barrons and Tassone 2008, Sanders and Klaenhammer 2001, Czerucka et al. 2007).

2.1.2.6. Mineralne materije

Prisustvo mineralnih materija kao BK u funkcionalnoj hrani nije novina. Kalcijum i magnezijum se koriste već duži niz godina, kao komponente koje imaju povoljno dejstvo na gustinu koštane mase, karcinom debelog creva, srčana oboljenja i hipertenziju (Huang et al. 2014, Séverin and Wenshui 2005, Nieves 2013, Trimarco et al. 2012, Davì et al. 2010, Mordike and Ebert 2001, De Baaij et al. 2015).

Mikroelementi poput selena, bakra, cinka i mangana, pored značaja za metaboličke procese, poseduju i važna antioksidativna svojstva (Kenfield et al. 2015, Kristal et al. 2014, Anderson et al. 1983, Onakpoya et al. 2013).

2.1.3 Tržište funkcionalne hrane

Kako još uvek nije jasno definisano koja se hrana smatra funkcionalnom, teško je proceniti tržište ovih proizvoda. U zavisnosti od definicije koju primenimo, možemo dobiti različite podatke (Kotilainen et al. 2006). Početkom XXI veka, tržište funkcionalnih proizvoda se procenjivalo u vrednosti između 33 i 61 milijardu US\$. Najveći udeo imale su SAD, a potom Evropa i Japan, čineći zajedno preko 90% (Hilliam 2000, Sloan 2000, Sloan 2002, Benkouider 2005, Benkouider 2004). Prema istraživanjima Sloana, pretpostavlja se da je ovo tržište dostiglo potrošnju od 130 milijardi US\$ u 2015. godini (Sloan and Adams Hutt 2012). Međutim, prema podacima statističke agencije *Statista*, tržište funkcionalne, tj. hrane sa dodatom vrednošću, u 2014. godini dostiglo je vrednost od 258,8 milijardi US\$, dok se pretpostavlja da bi 2020. moglo da bude procenjeno na 378,8 milijardi US\$ (Statista 2016b). Kada govorimo o Republici Srbiji, nema zvaničnih informacija o vrednosti tržišta funkcionalnih proizvoda ili proizvoda sa zdravstvenom izjavom (Stojanović and Barjolle 2012).

Broj funkcionalnih proizvoda u konstantnom je porastu i 2008. godine dostigao je cifru od 1859. Između 2008. i prve polovine 2009. godine, SAD su bile lider u lansiranju tzv. „zdravih“ proizvoda (881), a sledile su ih Japan (314), Italija (325), Ujedinjeno Kraljevstvo (237), Nemačka (235) i Francuska (150 (Sorenson et al. 2009)). U Republici Srbiji se 2012. godine na tržištu moglo naći 166 takvih proizvoda, od kojih

je većina (sa 55,9%) bila domaćeg porekla (Sorenson et al. 2009, Stojanović et al. 2014).

Među funkcionalnim proizvodima, tržište funkcionalnih napitaka zauzima veliki udeo, sa oko 59% u SAD (Sloan and Adams Hutt 2012). Globalni trend njihovog razvoja je veoma heterogen i odvija se različito u svakoj zemlji, zahvaljujući socio-demografskim i socio-kulturološkim razlikama u percepciji potrošača i prihvatanju funkcionalnih napitaka (Sorenson et al. 2009, Bech-Larsen and Scholderer 2007). Tako, na primer, iako su u SAD-u probiotski napici zabeležili impresivan rast poslednjih godina, ova kategorija i dalje nije razvijena u poređenju sa evropskim zemljama, poput Francuske, Nemačke i Španije. Nasuprot tome, kategorija sportskih napitaka ostaje i dalje nerazvijena izvan SAD-a i Japana (Sorenson et al. 2009).

Funkcionalne napitke možemo podeliti u nekoliko kategorija (Corbo et al. 2014, Bigliardi and Galati 2013, McDonald 2017):

- a) napici na bazi mleka,
- b) napici na bazi voća, povrća i žitarica,
- c) sportski napici,
- d) energetske napitke;

Kada se govori o napicima na bazi mleka, prvenstveno se misli na probiotske napitke koji za osnovu imaju mleko, fermentisano mleko ili jogurt (Gürakan et al. 2009). Međutim, danas se može naći sve veći broj mlečnih proizvoda obogaćenih BK poput ω -3 masnih kiselina (EPA, DHA), α -linolenske kiseline, kazeina, biljnih sterola, konjugovane linoleinske kiseline, melatonina, vitamina i minerala (Gürakan et al. 2009, Özer and Kirmaci 2010, Prado et al. 2008).

Pored mleka, voćni sokovi poput soka od borovnica, jabuka, akaia, acerole, manga, guarane, višanja, jagoda, nara i šljiva mogu biti idealni medijum za probiotike (Sakagami et al. 2010, Granato et al. 2010). Zanimljivu osnovu za funkcionalne napitke predstavljaju i sokovi od aromatičnog bilja koji obiluju mikronutrijentima i fitohemikalijama, a mogu poslužiti i kao osnova za pića sa probiotskim kulturama (Soccol et al. 2012).

Značajna grupa funkcionalnih napitaka jesu i oni koji su dobijeni fermentacijom žitarica. Ova grupa proizvoda je naročito popularna u tropskim regionima poput Afrike. Među žitaricama koje se najčešće koriste su kukuruz, proso, ječam, raž, pšenica, ovas, pirinač i sirak (Marsh et al. 2014).

Jedan od poznatijih napitaka ove vrste jeste *Boza*, koja se uglavnom konzumira u Bugarskoj i Turskoj, a dobija se fermentacijom ječma, ovasa, raži, prosa, pšenice ili pirinča (Akpınar-Bayizit et al. 2010).

Togwa, slatko kiseli, bezalkoholni napitak, je popularno piće u Africi. Dobija se od brašna kukuruza, sirka, prosa a ponekad i od korena manioke (Kitabatake et al. 2003). *Mahewu* i *Buhera* su pića koja se dobijaju od sirka (Mugochi et al. 2001, Muyanjanja et al. 2003).

Amazake je bezalkoholni slatki napitak od pirinča koji se dobija kao međuproizvod u procesu proizvodnje *Sakea* i popularan je u Japanu (Yamamoto et al. 2011).

Kvas, fermentisani napitak od raži i slada tradicionalno se koristi u Rusiji, dok je u Meksiku poznat napitak pod nazivom *Pozol* dobijen od kukuruznog brašna koje je fermentisalo u listovima banane (Jargin 2009, ben Omar and Ampe 2000).

Sportska i energetska pića već nekoliko godina su omiljeni napici među mladima između 21 i 35 godina. Sportski napici su prvenstveno namenjeni konzumiranju pre, tokom i nakon treninga, kako bi sprečili dehidraciju, obezbedili energiju, elektrolite i vitamine (Dikici et al. 2015, Duncan and Hankey 2013, Heckman et al. 2010).

Glavni cilj energetskih pića je da povećaju izdržljivost i koncentraciju i poboljšaju kongnitivne performanse, te stoga i ne iznenađuje podatak da ih 30% mladih redovno konzumira (Duncan and Hankey 2013, Gunja and Brown 2012). U tabeli 2.5 dat je prikaz najpoznatijih funkcionalnih napitaka prisutnih na svetskom tržištu.

Tabela 2.5. Primeri komercijalno dostupnih funkcionalnih napitaka (Gürakan et al. 2009, Özer and Kirmaci 2010, Heckman et al. 2010, Hui and Evranuz 2012, Goktepe et al. 2005)

Brend	Proizvođač	Aktivna komponenta
Verum [®]	Essum AB, Švedska	<i>Lactococcuslactis</i> L1A, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LB21
Actimel [®]	Danone, Francuska	<i>L. casei</i> Immunitas TM
Yakult Miru-Miru [®]	Yakult Honsha Co, Japan	<i>L. casei</i> , <i>B. Bifidumor</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. acidophilus</i>
Vitagen [®]	Malaysia Milk SDN.BHD, Malezija	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i>
Natrel Omega-3 [®]	Natrel, Kanada	Omega-3
Night-Time Milk [®]	Cricketer Farm, UK	Melatonin
Danacol [®]	Danone, Francuska	Fitosteroli
Zen [®]	Danone, Belgija	Magnezijum
Evolus [®]	Valio Ltd., Finska	Bioaktivni peptidi
Vita Biosa [®]	Biola Inc., Kanada	Antioksidanti; Probiotici: <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>B. bifidum</i>
Gefilus [®]	Valio Ltd., Finska	Vitamin C i D; Probiotici: <i>L. rhamnosus</i> GG
Whole Grain Probiotic Liquid [®]	Grainfields, Australija	Vitamini, Amino-kiseline i enzimi; Probiotici: <i>L. acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>
Tropicana Farmstand [®]	Tropicana, SAD	Vitamini A i C; Kalijum
Daily Greens [®]	Bolthouse Farms, SAD	Vitamini A i C; Magnezijum, gvožđe i cink
Minute Maid with Calcium & Vitamin D [®]	Minute Maid, SAD	Kalcijum i vitamin D
Oasis Health Break [®]	Lassonde Inc., SAD	Omega-3
Gatorade Endurance [®]	PepsiCo Inc., SAD	Natrijum, kalijum, kalcijum, magnezijum
Powerade Ion4 [®]	Coca-Cola Co., SAD	Natrijum, kalijum, B-vitamini

2.2 *Ganoderma lucidum*

Gljive su od davnina poznate po svojim nutritivnim i medicinskim svojstvima (Lo and Wasser 2011). Predstavljaju vredan izvor prirodnih bioaktivnih komponenti, i vrlo često se smatraju funkcionalnom hranom (Chang 1996, Cheung 2008). Možemo ih grupisati u četiri kategorije: (1) jestive, koje možemo konzumirati (npr. *Agaricus bisporus*); (2) otrovne (npr. *Amanita phalloides*); (3) nejestive i (4) medicinske tj. one za koje se pretpostavlja da imaju lekovita svojstva (npr. *Ganoderma lucidum*) (Cheung 2008). Naravno, ovakav pristup klasifikaciji nije apsolutan i isključiv, jer mnoge gljive, pored toga što su jestive, poseduju i lekovita svojstva (Cheung 2008, Mattila et al. 2000).

Pretpostavlja se da u svetu ima oko 1,5 miliona vrsta, a 82000 njih je okarakterisano, dok se 2000 smatra bezbednim za upotrebu (Hawksworth et al. 1995, Hawksworth 2001, Lorenzen and Anke 1998). Veliko interesovanje naučnika zaokupile su gljive iz klase *Basidiomycetes*, zahvaljujući prisustvu velikog broja biološki aktivnih komponenti (Lorenzen and Anke 1998).

Ganoderma lucidum najpoznatija je i najviše izučavana medicinska gljiva (Lin et al. 2003). Prvi naučni tragovi u vezi sa njenom klasifikacijom datiraju pre 2000. godina i zabeleženi su u prvoj kineskoj farmakopeji. U XVIII veku, prvobitno je nazvana *Boletus lucidus* (Curtis) P. Karst (Curtis 1781). U svetu je poznata pod mnogim nazivima (tabela 2.6), a pretpostavlja se da danas postoji oko 80 rodova *G. lucidum* i preko 400 različitih vrsta (Kirk et al. 2008). Utemeljena je u kineskoj medicini, korišćena je u verskim obredima, bila je dragocen poklon i inspiracija mnogim umetnicima, ispričana je u mnogim legendama, a danas predstavlja vredan proizvod sa tržištem od preko 2,5 milijardi US\$ (Chang 2004, Wasser 2005).

Trenutna istraživanja fokusirana su na sekvencionisanju genoma *Ganoderma spp.*, izdvajanju bioaktivnih komponenti i njihovoj karakterizaciji, *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima (Patel and Soni 2014, Qin 2016, Bishop et al. 2015).

Tabela 2.6. Nazivi *Ganoderma lucidum* u svetu (Chadwick 1996, Halpern 2007, Stamets 2005, De Groot 1964, Bretschneider 1895, Pregadio 2013, Zhou et al. 2015)

Zemlja	Naziv	Značenje
Kina	<i>lingzhi</i> (靈芝, 灵芝)	<i>ling</i> – duh, čudesno, sveto, božanski; <i>zhi</i> – biljka, dugovečnost, gljiva, seme, grana
	<i>ruicao</i> (瑞草)	<i>rui</i> – srećan, povoljan; <i>cao</i> – biljka
	<i>ruizhi</i> (瑞芝)	<i>rui</i> – srećan, povoljan; <i>zhi</i> – gljiva
	<i>shenzhi</i> (神芝)	<i>shen</i> – duh, božanski, božiji; <i>zhi</i> – gljiva
	<i>mulingzhi</i> (木灵芝)	<i>mu</i> – drvo; <i>ling</i> – duh; <i>zhi</i> – gljiva
	<i>xiancao</i> (仙草)	<i>xian</i> – čaroban, besmrtn; <i>cao</i> – biljka
	<i>lingzhicao</i> (灵芝草)	<i>ling</i> – duh; <i>zhi</i> – gljiva; <i>cao</i> – biljka
	<i>zhicao</i> (芝草)	<i>zhi</i> – gljiva; <i>cao</i> – biljka
Japan	<i>reishi</i> (靈芝)	<i>rei</i> – srećan; <i>shi</i> – trava, busen
	<i>mannentake</i> (万年茸)	<i>mannen</i> – 10000 godina; <i>take</i> – gljiva
	<i>kadodetake</i> (門出茸)	<i>kadode</i> – odlazak; <i>take</i> – gljiva
	<i>hijiridake</i> (聖茸)	<i>hijiri</i> – mudra; <i>dake</i> – gljiva
	<i>magoshakushi</i> (孫杓子)	<i>magosha</i> – unuč; <i>kushi</i> – obred
Koreja	<i>Yeong</i> (지령자)	<i>yeong</i> – mudrost; <i>ji</i> – busen
Grčka	<i>Ganoderma lucidum</i> (Γανόδερμα το λαμπερό)	<i>ganos</i> – sjajan; <i>derma</i> – koža; <i>lucidum</i> – isijavati
SAD Engleska	<i>lingzhi</i> ili <i>ling chih</i>	Pozajmljenica iz kineskog jezika
Srbija	<i>Hrastova sjajnica</i>	

2.2.1. Hemijski sastav gljive

Ganoderma lucidum je najpoznatija medicinska gljiva i upravo se zbog toga veliki broj istraživanja bavio njenom analizom. Hemijskom karakterizacijom plodonosnog tela, spora i micelije *Ganoderma lucidum* otkriveno je preko 400 različitih komponenti (Zhou et al. 2015). Polisaharidi i triterpeni predstavljaju dominantne grupe jedinjenja u plodonosnom telu gljive, a slede ih fenoli, steroidi, amino-kiseline, micini,

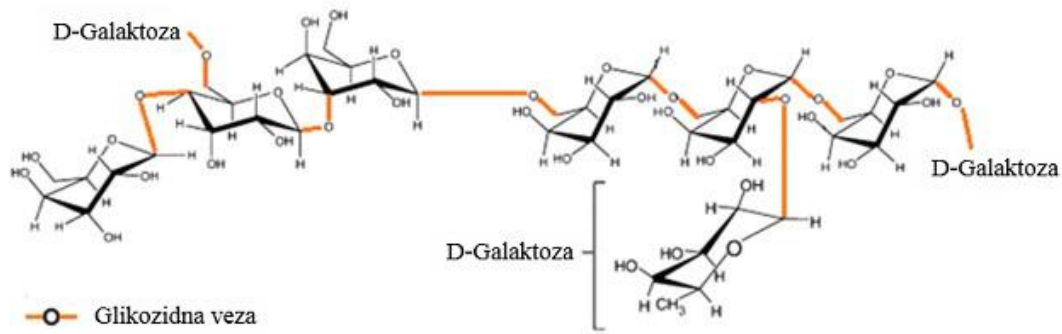
vitamini, nukleozidi, masne kiseline, nukleotidi i elementi u tragovima (Zhu et al. 1999, Mizuno 1995, Mizuno et al. 1995, Gao et al. 2004).

2.2.1.1. Polisaharidi

Polisaharidi predstavljaju polimerne ugljene hidrate, sastavljene od dugih lanaca monosaharida povezanih glikozidnim vezama. Njihova struktura je najčešće veoma razgranata i oni uglavnom imaju osobine različite od monosaharida od kojih su izgrađeni (Aspinall 1980). Te karakteristike ogledaju se upravo u njihovim bioaktivnim svojstvima, jer i mala promena u hemijskoj strukturi i sastavu može dati polisaharide sa sasvim drugačijim osobinama (Nie and Xie 2011). Stoga je bitno izvršiti potpunu karakterizaciju ovih molekula, kako bi se identifikovale glavne bioaktivne grupe i proučio njihov mehanizam delovanja.

Prema različitim istraživačima, polisaharidi izolovani iz *G. lucidum* sastoje se od glukoze, manoze, galaktoze, fukoze, ksiloze i arabinoze, u različitim kombinacijama i sa drugačijom vrstom glikozidnih veza, a mogu se vezati i za proteinske ili peptidne ostatke, gradeći na taj način peptidne komplekse ili komplekse polisaharid-protein (CFR Ferreira et al. 2010, Chen et al. 2008, Nie et al. 2013, Sone et al. 1985, Wang and Zhang 2009, Zhang et al. 2007). Ovi ugljeni hidrati su karakteristični po svojim molekulskim masama, stepenu grananja i strukturi koju čine β -glukan, hetero- β -glukan, hetero-glikani ili α -mano- β -glukanski kompleksi (CFR Ferreira et al. 2010, Moradali et al. 2007).

Homo-glukani su linearni ili razgranati biopolimeri, čiju osnovu sačinjavaju α - ili β - povezane glukozne jedinice, poput β -(1,3)(1,6)-glukana i α -(1,3)-glukana, a mogu sadržati i bočne lance povezane na različitim mestima (slika 2.5). Među homo-glukanima, β -glukan je najzastupljeniji i čini primarnu komponentu ćelijskih zidova viših gljiva. Sastavljen je od glukoznih jedinica koje mogu biti izgrađene β -(1,3)-vezama u linearni molekul ili, pored njih, mogu imati i β -(1,6)-veze i činiti razgranatu strukturu (Moradali et al. 2007, CFR Ferreira et al. 2010).



Slika 2.5. Hemijska struktura polisaharida izolovanog iz *Ganoderma lucidum* koji u osnovi ima galaktozu (Ye et al. 2010)

Hetero-glukani u svojim bočnim lancima mogu da sadrže glukuronsku kiselinu, ksilit, galaktozu, manozu, arabinozu ili ostatke riboze, kao glavne komponente (Wasser 2011, CFR Ferreira et al. 2010). Pored glukana, glikani zauzimaju značajno mesto u hemijskom sastavu gljive. U osnovi ovih polisaharida, pored glukoze, mogu se naći galaktani, fukani ili ksilani-imanani (Moradali et al. 2007). Hetero-glikani u svojim bočnim lancima mogu da sadrže arabinozu, manozu, fukozu, galaktozu, ksilozu, glukuronsku kiselinu i glukoze (Moradali et al. 2007, Wasser 2011). U tabeli 2.7 prikazan je sastav šećera u ekstraktima *Ganoderma lucidum*.

Tabela 2.7. Sastav monosaharida u ekstraktima *Ganoderma lucidum* (Zhao et al. 2010)

	%						
	manozna	riboza	ramnoza	glukuronska kiselina	glukoza	galaktoza	fukoza
Ekstrakt 1	3.10	-	0.53	-	60.11	30.58	5.67
Ekstrakt 2	9.89	-	0.35	1.46	68.04	15.81	4.45

Polisaharidi mogu biti kovalentno vezani za proteine ili peptide, gradeći peptidne komplekse ili komplekse polisaharid-protein (CFR Ferreira et al. 2010, Wasser 2002, Jia et al. 2009). Gliko-proteini predstavljaju komplekse polisaharida i proteina, a među najzastupljenijima su kompleksi poput β -glukan-proteina, α -glukan-proteina i hetero-glikan-proteina. Gliko-peptidi čine grupu jedinjenja strukturno sličnu gliko-proteinima, ali sa manjim lancima amino-kiselina (CFR Ferreira et al. 2010).

Proteoglikani čine drugu klasu gliko-proteina, a sastoje se od jezgra proteina sa jednim ili više kovalentno vezanih glikozo-amino-glikanskih lanaca (Moradali et al. 2007).

Tabela 2.8. Sekundarni metaboliti najzastupljeniji u *Ganoderma lucidum*

(Baby et al. 2015)

C30 lanostani (ganoderinske kiseline)	
Ganoderinska kiselina	A, B, C1, C2, D1, E, F, H, I, J, K, L, M, N, AM1, B8, C6, Df, α , O, U, V, W, Z, Ma, Mc, Md, Mg, Mh, Mi, Mj, β , P, Q, R, S, T, X, Y, Me, Mf, TR1, LM2, δ , γ , ϵ , η , ζ , θ , DM, V1, Sz, TR,
Ganolucidinska kiselina	A, B, D, E, C
C30 lanostani (aldehidi, alkoholi, estri, glikozidi, laktoni, ketoni)	
Ganoderal	A, B
Ganoderol	A, B
Lucilaldehid	A, B, D, E
Ganoderiol	A, C, D, G, H, E, I, B, F
Ganodermatriol	M
Ganodermatetraol	
Lucidal	
Epoksiganoderiol	A, B, C
C27 lanostani (lucidinske kiseline)	
Lucidinska kiselina	A, B, C, D1, D2, E1, E2, F, N, P, G, H, I, J, K, L, M, O
C27 lanostani (alkoholi, laktoni, estri)	
Lucidin-lakton	
Ganolakton	
Metil-lucidenat	A, C, F, N, P, Q, D2
C24, C25 lanostani	
Lucidon	A, B, C
Steroidi	
Ergosterol	
5,6-dihidroergosterol	
22,23-dihidroergosterol	
Ergosterol-peroksid	

2.2.1.2. Triterpeni *Ganoderma lucidum*

Triterpeni predstavljaju glavnu grupu sekundarnih metabolita *Ganoderma lucidum*. Oni nisu uključeni u normalan rast, razvoj i reprodukciju gljive, ali su odgovorni za njen opstanak (Hill and Connolly 2012, Hill and Connolly 2013). Do sada je identifikovano više od 200 triterpena lanostanskog tipa (Paterson 2006). Triterpeni gljive se javljaju u slobodnoj, ali i u formi svojih etara, estara ili derivata glikozida (Mahato and Kundu 1994). Njihova struktura je nastala ciklizacijom skvalen-2,3-epoksida, stvarajući protosterol koji kasnije, uz pomoć enzima lanosterol-sintetaze, dovodi do stvaranja lanosterola. Osnova lanostana (C₃₀H₅₄) je tetraciklična i predstavlja intermedijalni molekul u biosintezi različitih terpenoida lanostanskog karaktera (Hill and Connolly 2012, Hill and Connolly 2013, Ríos et al. 2012). Većina lanostana izolovanih iz *G. lucidum* pokazuje visok stepen oksidacije, čineći na taj način veliki broj derivata (Shi et al. 2010, You et al. 2013). Ganoderinska i lucidinska kiselina predstavljaju najveći broj sekundarnih metabolita izolovanih iz *G. lucidum* (tabela 2.8). Sekundarne metabolite izolovane iz ove gljive možemo podeliti na sledeći način (Paterson 2006, Shi et al. 2010, Baby et al. 2015, Boh et al. 2000, Kim and Kim 1999):

- a) C₃₀ lanostani (ganoderinske kiseline),
- b) C₃₀ lanostani (aldehidi, alkoholi, estri, glikozidi, laktoni, ketoni),
- c) C₂₇ lanostani (lucidinske kiseline),
- d) C₂₇ lanostani (alkoholi, laktoni, estri),
- e) C₂₄, C₂₅ lanostani,
- f) C₃₀ pentaciklični triterpeni,
- g) monoterpenoidi,
- h) fernazil-hidrohinoni,
- i) C₁₅ sekviterpeni,
- j) steroidi,
- k) alkaloidi,
- l) prenil-hidrohinoni,
- m) bezofurani,
- n) 4-benzopiran derivati i
- o) benzoidni derivati.

Do sada je iz *G. lucidum* izolovano oko 112 različitih ganoderinskih i 27 lucidinskih kiselina (Baby et al. 2015), koje su odgovorne za gorki ukus gljive. Najintenzivniju gorčinu imaju ganoderinske kiseline A, C₁ i J, potom lucidinske A i D₁, dok lucidinske kiseline B, C, E₁, G i H i ganoderinska kiselina D nemaju gorak ukus. Njihova gorčina naglašena je u naknadnom ukusu i relativno dugo ostaje u grlu (Nishitoba et al. 1985). Triterpeni su prisutni u svim delovima gljive, a njihova ekstrakcija se najčešće izvodi upotrebom različitih organskih rastvarača. Tako dobijeni ekstrakti mogu se dalje prečišćavati ili koristiti u izvornom obliku (Nishitoba et al. 1985, Hirotsu et al. 1993, Lin et al. 1988b, Lin et al. 1988a).

2.2.1.3. Ostali konstituenti prisutni u *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum u manjim količinama sadrži i polifenole, steroide, lipide, dijetetska vlakna, ganomicine, vitamine, lecitin, nukleozide i nukleotide, germanijum, alkaloide i manju količinu amino-kiselina (Yuen and Gohel 2005, Janeš et al. 2007, Stengler 2005, Smith et al. 2002, Lindequist et al. 2005, Sanodiya et al. 2009, Packer et al. 2004). U tabeli 2.9 dat je prikaz nekih bioaktivnih jedinjenja izdvojenih iz plodonosnog tela gljive, u kom se sadržaj proteina kreće između 8 i 10%, najčešće u vidu kompleksa vezanih za polisaharide, stvarajući na taj način komplekse peptidoglukana (Mau et al. 2001, Wasser 2011, Stengler 2005). Sadržaj slobodnih amino-kiselina je mali i kreće se između 1 i 2%.

Najzastupljenije su amino-kiseline poput L-lizina, L-leucina, L-tirozina, L-fenilalanina i L-alanina (Tanaka et al. 1989, Kino et al. 1989, Mizuno et al. 1995). *G. lucidum* ima i nizak sadržaj lipida, od kog veći deo čine polinezasićene masne kiseline poput oleinske, linolenske i palmitinske (Hossain et al. 2003, Graham et al. 1995). Mineralni sastav gljive umnogome zavisi od podneblja i supstrata na kojima je ona gajena, a najveći procenat čine kalcijum, magnezijum, fosfor i kalijum. Cink, stroncijum i germanijum detektovani su u malim količinama (Stengler 2005, Mau et al. 2001, Sun et al. 2004, Mizuno et al. 1995). *G. lucidum* ima sposobnost koncentrisanja germanijuma, što je vrlo interesantno s obzirom na korelaciju između antitumornih aktivnosti, odnosno indukcije stvaranja interferona i sadržaja germanijuma (Liu and

Chen 2008, Mizuno et al. 1995). Količina ovog elementa u gljivi kreće se između 14 i 57 ppb (Liu and Chen 2008).

Tabela 2.9. Bioaktivna jedinjenja prisutna u *Ganoderma lucidum* (Hasnat et al. 2015)

Jedinjenje	mg/mg na suhu materiju
Kumarinska kiselina	0,02 ± 0,004
Galna kiselina	0,05 ± 0,020
Kofeinska kiselina	0,10 ± 0,040
Katehin	0,01 ± 0,004
Vanilin	0,01 ± 0,006
Naringenin	0,13 ± 0,010
Resveratrol	0,02 ± 0,006
Cinaminska kiselina	0,04 ± 0,004
Timol	0,05 ± 0,002
Kvercetin	0,10 ± 0,006
Naringin	0,10 ± 0,010

2.2.2. *Ganoderma lucidum* – terapijska primena

2.2.2.1. Antioksidativna svojstva *Ganoderma lucidum*

Slobodni radikali i reaktivne vrste kiseonika (ROS) su slobodne radikalske čestice koje u organizmu ispoljavaju pozitivna i negativna svojstva. Nastaju kao nusproizvodi metaboličkih procesa, posledice rada redoks enzima i transfera bioenergetskih elektrona (Valko et al. 2007). Pozitivno dejstvo se ogleda u modulaciji ćelijske signalizacije i njihovoj citotoksičnosti u odbrambenom mehanizmu leukocita protiv raznih mikroorganizama. Međutim, povećana izloženost ovim agensima može dovesti do njihovog značajnog uvećanja i oksidativnog stresa organizma (Riley 1994, Fang et al. 2002) koji, kako se pretpostavlja, dovodi do razvoja bolesti poput artritisa, ateroskleroze, Alchajmerove bolesti, srčanih oboljenja, karcinoma, inflamacionih procesa, starenja, Parkinsonove bolesti i različitih genetskih oštećenja (Mohan et al. 2015). Kako bi se smanjio efekat oksidativnog stresa, danas se koristi veliki broj antioksidativnih preparata. Među njima je znatna većina sintetičkih antioksidanata, koji mogu dovesti do oštećenja jetre i karcinogeneze (Singh and Rajini 2004, Yuan et al. 2008). Nasuprot tome, prirodni antioksidanti iz *G. lucidum* se brzo apsorbuju, nisu

toksični i dovode do povećanja totalne antioksidativne aktivnosti u krvnoj plazmi ljudi (Wachtel-Galor et al. 2004a). Antioksidativna svojstva *G. lucidum* pripisuju se polifenolnim komponentama, polisaharidima, kompleksima polisaharid-peptid i mikroelementima (Kan et al. 2015, Smina et al. 2011). Terpenska jedinjenja, poput ganoderinske kiseline (A, B, C, D, H, F), lucidinske kiseline i ganodermanetriola, predstavljaju glavne komponente koje mogu da neutrališu negativno dejstvo slobodnih radikala na organizam (Zhu et al. 1999, Sun et al. 2004, Smina et al. 2011). Polisaharidi *G. lucidum* odgovorni su za umanjeње produkcije slobodnih radikala kiseonika (Liu et al. 2010). Hemo-glukani i hetero-glukani, izolovani iz gljive, imaju izraženu sposobnost redukcije, što je potvrđeno u brojnim *in vitro* istraživanjima (Liu et al. 2010, Ma et al. 2013, Shi et al. 2010, Shi et al. 2013). Niskomolekularni β -1,3-glukan može dovesti do značajnog smanjenja ROS, dok hemo-polisaharidi, sastavljeni od manoze, ispoljavaju obećavajuća antioksidativna svojstva (Kao et al. 2011). Njihovo dejstvo se pokazuje u redukciji slobodnih radikala i povećanju aktivnosti antioksidativnih enzima: superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i glutation-peroksidaze (GSH-Px) (XiaoPing et al. 2009, YouGuo et al. 2009)). Ništa manju aktivnost nisu pokazali ni hetero-glukani izolovani iz gljive, a pored povećanja aktivnosti antioksidativnih enzima (SOD, CAT i GSH-Px) došlo je do smanjenja koncentracije malonil-dialdehida (MDA) i lipidnih peroksida (LOOH) u mitohondrijama koje su bile izložene γ -zračenju (Li et al. 2007, Lobo et al. 2010, Ajith et al. 2009). Slična svojstva pokazali su i glikopeptidi (GLP) gljive, sprečavajući negativno dejstvo ROS na makrofage. GLP je sastavljen od četrnest amino-kiselina i šećera ramnoze, ksiloze, fruktoze, galaktoze, manoze i glukoze, a povezan je β -glikozidnim vezama (You and Lin 2002). Mehanizam njihovog delovanja potvrđen je u *in vitro* i *in vivo* studijama na antioksidativnu aktivnost, povećavajući životni ciklus makrofaga i štiteći mitohondrije od oksidativnog stresa (Jia et al. 2009, Zhang et al. 2003, Zhao et al. 2004, Li et al. 2012, Wenjuan Li et al. 2011, Wen-Juan Li et al. 2011, Li et al. 2010, Li et al. 2009). U *in vivo* studijama sprovedenim na dijabetičnim modelima, došlo je do povećanja ne-enzimskih i enzimskih antioksidanasa, serumskog insulina i smanjenja lipidne peroksidacije (Jia et al. 2009). U daljim istraživanjima, sprovedenim na pacovima, utvrđeno je protektivno dejstvo na homogenate jetre i do blokiranja auto-hemolize crvenih krvnih zrnaca pacova (Sun et al. 2004). Sirovi ekstrakt polisaharida izolovan iz gljive *G. lucidum* pokazao je

antioksidativnu aktivnost kod pacova sa gastričnim tumorom, tako što je povećao aktivnost antioksidativnih enzima, poput SOD, CAT i GSH-Px (Shi et al. 2013, Zhao et al. 2004, Pan et al. 2013). Drugi polisaharidni ekstrakti pokazali su inhibiciju slobodnih radikala, redukcionu moć i inhibiciju lipidne peroksidacije (Kozarski et al. 2011, Kozarski et al. 2012). U studiji koju je sproveo Zao (sa saradnicima) utvrđeno je postojanje radio-protektivnog efekta polisaharidnih ekstrakata na dezoksiribonukleinskoj kiselini (DNA) miševa, koji su bili izloženi γ -radioaktivnom zračenju, gde je došlo do povećanja nukleinskih kiselina u kičmenoj moždini i SOD aktivnosti, kao i smanjenja MDA. Kod miševa sa ishemičnom reprefuzijom došlo je do smanjenja serumskog MDA i intercelularne adhezije molekula u jetri i srcu i povećanja antioksidativnih enzima (Zhao et al. 2004, Zhao et al. 2012). Kod dijabetičnih pacova, polisaharidni ekstrakt doveo je do redukcije oksidativnog stresa i inhibicije apoptoze, tako što su se povećale antioksidativne enzimske aktivnosti i modifikacije B ćelija limfoma 2 i BCE-2 povezanog proteina (Yang et al. 2010). Studije sprovedene poslednjih godina, koje se tiču antioksidativnih karakteristika polisaharida, glikoproteina i sirovih polisaharidnih ekstrakata, zapravo govore o tome da je inhibicija slobodnih radikala uglavnom povezana sa povećanjem koncentracije antioksidativnih enzima. U *in vivo* studiji koja je obuhvatila 18 odraslih osoba uzrasta od 22 do 52 godine, vršena je suplementacija ekstraktom *Ganoderma lucidum* u količini od 1,44 g/danu (13,2 g sveže gljive/danu). Nakon četiri nedelje, dokazano je da je došlo do povećanja antioksidativnog kapaciteta organizma, dok nije utvrđena renalna ili DNA toksičnost (Wachtel-Galor et al. 2004b). Međutim, nema mnogo studija koje govore o samom mehanizmu delovanja. Većina onih koja se bavila problematikom antioksidativnog potencijala polisaharida zapravo su ispitivanja u *in vitro* uslovima, dok je mali broj izvedenih u *in vivo* uslovima. Upravo zato je teško sa sigurnošću opisati mehanizam delovanja antioksidativnih enzima. Drugi problem je u nekompletnoj hemijskoj karakterizaciji uzoraka, koju daje većina pomenutih istraživanja, gde se sve svodi na molekulsku masu, prisutne šećere i veze koje postoje unutar molekula (Kao et al. 2011, Ferreira et al. 2015, Jia et al. 2009).

2.2.2.2. Antitumorna svojstva

Trenutno postoji preko 6500 naučnih radova koji su se bavili ispitivanjem hemijskih i medicinskih svojstava *Ganoderma lucidum*. Veliki deo njih je ispitivao moguća anti-tumorna svojstva, kako u *in vivo* istraživanjima, tako i citotoksični efekat u *in vitro* studijama (Adams et al. 2010). Različite vrste ekstrakta *Ganoderma lucidum* pokazale su anti-kancerogeni efekat, a njihov mehanizam nije do danas u potpunosti razjašnjen.

2.2.2.2.1. Mehanizmi delovanja *Ganoderma lucidum* na karcinom

Trenutno dostupni podaci pokazuju da *G. lucidum* sprečava ili deluje terapijski na karcinom preko različitih modaliteta, poput aktivacija imunog odgovora domaćina, indukcije ćelijske diferencijacije, indukcije faza II-metaboličkih enzima, inhibicije angiogeneze, inhibicije ekspresije urokinaze plazminogen aktivatora (UPA) i uPA receptora (uPAR) kod ćelija tumora, i direktno delujući citotoksično (Kao et al. 2013, Lin and Zhang 2004).

Aktiviranje imunog odgovora domaćina

Utvrđeno je da imuni sistem ima važnu ulogu u tumorogenezi, dok imunoterapija danas predstavlja jednu od strategija u onkologiji (Baxevanis et al. 2009, Loose and Van de Wiele 2009). Nekoliko studija *in vivo* i *in vitro* su pokazale da ekstrakt *G. lucidum* poseduje imunomodulatorna svojstva. Pretpostavlja se da dolazi do aktivacije imuno-efektorskih ćelija organizma, T i B limfocita, makrofaga i prirodnih ćelija ubica (NK (Wang et al. 1997, Zhang and Lin 1999, Zhang and Lin 1998, Li and Zhang 2000, Gao et al. 2003)). Kada u telu dođe do kancerogeneze, procesa uzrokovanog genetičkim ili epigenetičkim činiocima, dolazi do genetički i fenotipski progresivne transformacije normalne ćelije, koja stiče sposobnost nekontrolisane deobe (Đelić 2000). Prvi odgovor imunog sistema potiče od efektorskih ćelija nespecifičnog imunog sistema, a potom, nekoliko nedelja kasnije, i specifičnog imunog sistema.

T i B limfociti pripadaju imuno-efektorskim ćelijama specifičnog imuniteta i vode poreklo iz timusa (T ćelije) i koštane srži (B ćelije), dok su makrofagi i prirodne ćelije-

ubice sastavni deo imuno-efektorskih ćelija nespecifičnog imuniteta (Linehan et al. 1999, Old 1996). Prirodne ćelije-ubice su mali limfociti koji potiču iz koštane srži i razvijaju se potpuno u odsustvu timusa. One prepoznaju kancerogene ćelije preko aktivacionih i inhibitornih receptora.

Aktivacioni receptori su receptori prirodne citotoksičnosti, koji identifikuju molekule koji se eksprimiraju, nakon čega dolazi do ubijanja ciljane ćelije. Inhibitorni receptori prepoznaju molekule I klase glavnog histokompatibilnog kompleksa, eksprimirane na svim ćelijama sa jedrom. Međutim, maligne transformacije mogu da spreče ekspresiju glavnog histokompatibilnog kompleksa i na taj način blokiraju aktivacioni signal (Challis and Stam 1990, Kiessling et al. 1999, Talmadge et al. 1980). Iz plodonosnog tela gljive izolovan je fukozni glikoprotein (F3), sposoban da stimuliše aktivnost CD56⁺ NK ćelija u krvi. Nakon tretmana F3, citotoksičnost NK ćelija je značajno povećana (Chien et al. 2004). β -(1,6)-D-glukan, takođe izolovan iz gljive, pokazao je povećanu antitumorsku aktivnost i aktivaciju NK ćelija (Miyazaki and Nishijima 1981).

Makrofagi imaju pozitivno i negativno dejstvo, jer mogu stimulisati rast tumorskih ćelija. Direktna tumoricidna aktivnost aktiviranih makrofaga ispoljava se produkcijom reaktivnih metabolita oksida azota i odgovarajućih enzima, dok indirektno mogu da stimulišu druge ćelije imunog sistema tako što prenose antigene na svojoj površini do T-ćelija (Martin-Orozco et al. 2009, Schuster et al. 2006, Banchereau and Steinman 1998). U *in vivo* studiji, izolovani peptidi *G. lucidum* doveli su do povećanja volumena makrofaga i njegove uvećane fagocitoze, značajnog poboljšanja proliferacije makrofaga koštane srži, stvaranja pseudopodina na makrofagima, produkcije azotnih oksida i značajnog povećanja ekspresije gena interleukina-1 β (IL-1 β), IL-12p35, i IL-12p40 i povećanja broja CD14⁺ CD26⁺ monocita/makrofaga kod mononuklearnih ćelija krvi (Cao and Lin 2002, Wang et al. 1997, Gao et al. 2003).

B-limfociti igraju ključnu ulogu u humoralnom imunom odgovoru, proizvodnjom antitela protiv antigena. Pored toga što prezentuju antigene, oni luče citokine i na kraju se mogu razviti u memorijske B ćelije, nakon aktivacije u antigen-interakcijama (Martin-Orozco et al. 2009, Schuster et al. 2006). Sam mehanizam delovanja različitih ekstrakata gljive nije do detalja poznat. Pretpostavlja se da pojedini proteoglukani,

vezani za ugljene hidrate, mogu da stimulišu proliferaciju i aktivaciju B limfocita slezine uvećavajući broj B ćelija, povećavajući CD71 i CD25 ekspresiju na površini ćelije i lučenje imunoglobulina. Pored ovoga, raste i ekspresija protein-kinaze C i protein-kinaze C u B-ćelijama, dok je proizvodnja interleukina-2 (IL-2) blago povećana, pri tom bez uvećanja interleukina-4 (IL-4) (Zhang et al. 2002, Guan Wang et al. 2007, Wang et al. 2002).

T-ćelije pripadaju grupi leukocita poznatih kao limfociti, i imaju višestruku ulogu u posredovanju u međućelijskom imunitetu (Sakaguchi et al. 2008). Ove specifične ćelije reaguju na stimulaciju dendritskih ćelija i peptid-antigena. Razlikuju se od drugih tipova limfocita, poput B-ćelija i NK ćelija, po tome što na svojoj površini imaju specijalne, tzv. T-receptore (Talmadge et al. 1980, Martin-Orozco et al. 2009, Sakaguchi et al. 2008). U procesu maligne transformacije dolazi do ekspresije mutiranih gena. Oni mogu biti prepoznati od strane citotoksičnih CD8⁺ T limfocita, koji imaju ključnu ulogu u ubijanju tumorskih ćelija. Odgovor citotoksičnih CD8⁺ T limfocita se indukuje prepoznavanjem tumorskih antigena na površini dendritskih ćelija, uz pomoć CD4⁺ T limfocita. Sa druge strane, antitela ispoljavaju antitumorsku funkciju aktiviranjem komplekta klasičnim putem ili ćelijskom citotoksičnošću, zavisnom od antitela (Loose and Van de Wiele 2009, Linehan et al. 1999, Old 1996, Sakaguchi et al. 2008). Međutim, pored efektorske uloge u antitumorskoj imunosti, antitela mogu i da blokiraju efikasan imunski odgovor, formiranjem kompleksa sa rastvorljivim tumorskim antigenima (Banchereau and Steinman 1998, Guan Wang et al. 2007). Polisaharidi *G. lucidum* značajno povećavaju proliferaciju limfocita, indukovanu konkavalinom A i produkcijom IL-2. Dalja istraživanja su pokazala da ovi polisaharidi dovode do povećavanja DNA sinteze ćelija slezine u limfocitnim kulturama kroz povećanje DNA polimeraze. Uz to je zapažena i povećana proizvodnja interferona- γ , kao i značajno povećanje interferona- γ iRNK ekspresije u T-limfocitima (Wang et al. 2002, Guan Wang et al. 2007).

Indukcija ćelijske diferencijacije

Diferencijacijska terapija je jedan od pristupa lečenja maligniteta, u kojoj su maligne ćelije tretirane tako da mogu da nastave proces sazrevanja i diferencijacije u zrele ćelije. Zapravo, ćelije raka su normalne ćelije bez sposobnosti za kontrolisanje svog rasta, i

višestruko se umnožavaju neverovatnom brzinom. Diferencijacijska terapija ima za cilj da natera malignu ćeliju da nastavi proces sazrevanja, sputa njen rast i na taj način uspori razvoj maligniteta i omogući efikasniju terapiju drugim konvencionalnim metodama (Almand et al. 2000, Nefedova et al. 2005, Đelić 2000). Nekoliko studija je pokazalo da pojedine komponente *G. lucidum* poseduju diferencijalno-indukcijsku aktivnost kod primene na ćelijskim linijama leukemije (Chung et al. 2001), te da je efekat diferencijacije najverovatnije posledica reakcije ras/ekstracelularnih signal-regulisane kinaze (Erk) i cAMP-odgovora. Ovi rezultati impliciraju da antikancerogeni efekti gljive mogu biti u vezi sa modulacijom neke signalne transdukcije molekula, što dovodi do regulacije rasta malignih ćelija (Cheung et al. 2000, Wang et al. 1997).

Indukcija reakcijske faze II-metaboličkih enzima

Veliki broj jedinjenja odgovornih za karcinogenezu zahteva aktivaciju metaboličkih enzima, klasifikovanih kao Faza I, i detoksikaciju od enzima faze II (Casson et al. 2003, Iqbal et al. 2003). Metabolizam lekova je mehanizam za eliminaciju egzogenih jedinjenja iz organizma, uz kontrolu endogenih jedinjenja u organizmu. Glavnu ulogu u metabolizmu imaju metabolički enzimi, zaduženi za eliminaciju i/ili detoksikaciju egzogenih i endogenih jedinjenja u organizmu. Na taj način, oni štite telo od štetnih uticaja, kroz delovanje ovih enzima u dve različite faze, tj. reakcije I faze ili reakciju funkcionalizacije, koja obuhvata procese poput oksidacije, redukcije i hidrolize, i reakcije II faze – reakcije sinteze (Maeda et al. 2001, Manson et al. 1997, Higuchi 1963, Xu et al. 2005). Enzimi Faze I sastoje se prvenstveno od citohroma P450 superfamilije mikrozomalnih enzima, koji se nalaze u jetri, gastrointestinalnom traktu, plućima i bubrezima, a sastoje se od velikog broja enzima, koji se klasifikuju na osnovu njihovog amino-kiselinskog sastava. Enzimi Faze II sastoje se od mnogo superfamilija enzima, uključujući sulfotransferaze, UDP-glukuronaziltransferaze, NAD(P)H dehidrogenaze, epoksidne hidrolaze, glutation-transferaze i *N*-acetiltransferaze. Svaka superfamilija enzima Faze II sastoji se od familija i porodica gena, šifriranih u različite izoforme sa različitim specifičnostima (Casson et al. 2003, Maeda et al. 2001, Higuchi 1963). Ovi enzimi povećavaju hidrofilnost, čime se poboljšava lučenje u žuči i urinu, a samim tim i detoksikacioni efekat. Enzimi Faze II imaju upravo centralnu ulogu u detoksikaciji kancerogenih i toksičnih elektofilnih jedinjenja (Casson et al. 2003, Maeda et al. 2001, Manson et al. 1997, Higuchi 1963, Xu et al. 2005). Nekoliko studija je pokazalo da su i

polisaharidi i terpenoidi *G. lucidum* sposobni da indukuju aktivnost glutation-transferaze i povećaju aktivnost NAD(P)H dehidrogenaza, što dovodi do lakše detoksikacije u slučaju pojedinih karcinogena (Kim and Kim 1999, Casson et al. 2003, Gerhäuser et al. 2000). Stoga, *G. lucidum* poseduje, pored imunomodulatornog dejstva, i dodatni detoksikacioni efekat u borbi protiv tumora.

Inhibicije angiogeneze

Angiogeneza je proces koji se karakteriše rastom novih krvnih sudova iz već postojećeg vaskularnog tkiva. Javlja se tokom celog života, kako u zdravlju tako i bolesti, započinjući u materici i nastavljajući dalje kroz starost. Metabolički neaktivno tkivo u telu nalazi se na ne više od nekoliko stotina mikrometara od kapilarne krvi, koja se formira procesom angiogeneze (Folkman 1995, Carmeliet and Jain 2000, Folkman 1971, Risau 1997). Kapilari su potrebni svim tkivima za razmenu hranljivih materija i metabolita. Promene u metaboličkoj aktivnosti dovode do proporcionalnih promena u angiogenezi i, stoga, proporcionalno promenama u kapilarama. Kiseonik igra ključnu ulogu u ovim odnosima. Hemodinamički faktori su od glavnog značaja za opstanak vaskularne mreže i za strukturne adaptacije zidova krvnih sudova. Zbog specifične genetike i biologije, maligne ćelije stvaraju sopstvenu mrežu krvnih sudova, kroz koju se hrane, rastu i šire po organizmu. Ovaj proces se zove angiogeneza tumora, i posebno je bitan prilikom rasta zloćudnih tumora. Nakon što tumor dostigne veličinu od 1 do 2 mm, mora uspostaviti sopstveni krvotok. Naime, maligne ćelije u početku koriste hranu i kiseonik iz okolnog tkiva. Kada tumor poraste do veličine od 1 do 2 mm, nedostaje mu hrana iz okoline, te počinje da proizvodi tzv. Angiogene signale, što za posledicu ima povezivanje ovakvih ćelija sa krvnim sudovima. Na ovaj način, tumor se snabdeva i dalje preko potrebnim kiseonikom i hranljivim materijama i nastavlja da se razvija. Kroz mrežu tumorskih krvnih sudova, koji su povezani sa ostatkom cirkulacije, može doći do rasejavanja malignih ćelija na udaljene delove tela ili tzv. Metastaze (Folkman 1995, Carmeliet and Jain 2000, Folkman 1971, Risau 1997). U nedavno sprovedenim studijama, utvrđeno je da frakcije triterpenoida *G. lucidum* mogu da izvrše inhibiciju anginogenoze, gde se blokira dejstvo anginogenih signala koje luči tumor i tako zaustavlja snabdevanje tumora kiseonikom i hranljivim komponentama, a samim tim i njegov dalji rast (Kimura et al. 2001, Carmeliet and Jain 2000, Folkman 1971, Risau 1997). Analizom ekstrakta utvrđeno je da je aktivna komponenta u istom ganoderinska

kiselina F (Kimura et al. 2001). U drugoj studiji, u kojoj je takođe korišćen 70%-alkoholni ekstrakt svežeg plodonosnog tela *G. lucidum*, dokazana je jaka antianginogena aktivnost. Pored toga, ekstrakt je pokazao snažnu inhibitornu aktivnost na produkciju indukovano lipopolisaharidnog azot-oksida u RAW 264,7 (ćelijske linije tumora) makrofagima, što ukazuje da anginogeneza može biti posledica (VEGF)-NOS-signalnog puta (Song et al. 2004, Risau 1997, Rufino-Palomares et al. 2015). U drugim istraživanjima dokazano je da i polisaharidi gljive poseduju antiangiogenu aktivnost (Chien et al. 2004, Paterson 2006, Cao and Lin 2004).

Inhibicije ekspresije urokinaze plazminogen aktivatora (UPA) i uPA receptora (uPAR) kod ćelija tumora

Plazminogeni aktivacioni sistem igra važnu ulogu u procesu tumorske invazije i metastaziranja, preko efekata na angiogenezu i migraciju ćelija. Jedan od ključnih medijatora procesa karcinogeneze je serinska proteaza urokinaznog aktivatora plazminogena (Dass et al. 2008, Sliva et al. 2002). Sistem aktiviranja plazminogena sastoji se od pet esencijalnih molekula: urokinaznog aktivatora plazminogena (UPA), receptora urokinaznog aktivatora plazminogena, inhibitora aktivatora plazminogena (PAI-1, PAI-2) i tkivnog aktivatora plazminogena. Urokinazni aktivator plazminogena je primarno vezan za degradaciju i regeneraciju bazalne membrane i ekstracelularnog matriksa, što dovodi do metastaziranja (Mazar 2001, Sliva et al. 2002, Odekon et al. 1992). UPA se smatra multifunkcionalnim proteinom, koji je uključen u proteolize i signalnu transdukciju. Kao proteaza, uPA katalizuje aktivaciju plazminogena u plazmin, koji olakšava oslobađanje nekoliko proteolitičkih enzima, uključujući gelatinazu, fibronektin, fibrin i latentnu formu kolagenaze. Plazmin može aktivirati ili osloboditi specifične faktore rasta, kao što su fibroblastni faktor rasta 2, vaskularni endotelni faktor rasta i transformišući faktor rasta β (Dass et al. 2008, Sliva et al. 2002, Odekon et al. 1992). Ovi faktori imaju mogućnost da podstaknu tumorsku progresiju stimulisanjem angiogeneze, kao i povećanjem ćelijske proliferacije i migracije. Uloga uPA u procesu širenja karcinoma ostvaruje se putem sposobnosti uPA da stimuliše angiogenezu, mitogenezu i migraciju ćelija i modulira adheziju ćelija. Takođe, pokazano je da uPA sprečava apoptozu, čime povećava preživljavanje malignih ćelija (Werb 1997, Mazar 2001, Sliva et al. 2002). Inhibitori aktivatora plazminogena su antiproteaze koje inhibiraju uPA. Postoje dva podtipa: PAI-1 i PAI-2. U različitim studijama, dokazano je

da oba inhibitora imaju ulogu u metastaziranju, rastu tumora i, uopšteno, preživljavanju pacijenata sa karcinomom. PAI-1 je glavni inhibitor uPA i njegova funkcija nije objašnjena do kraja. Logično bi bilo da PAI-1, inhibirajući uPA, negativno utiče na proliferaciju karcinoma. Međutim, u mnogim studijama je pokazano da PAI-1 pozitivno utiče na invaziju tumora i angiogenezu. Suprotno tome, gubitak PAI-1 je bio povezan sa redukcijom rasta tumora, invazije i metastaziranja (Dass et al. 2008, Werb 1997, Mazar 2001, Sliva et al. 2002, Odekon et al. 1992). Pretpostavlja se da je PAI-1 neophodan za angiogenezu, kao i da modulira adheziju i migraciju ćelija, čime ubrzava proces metastaziranja. PAI-1 takođe inhibira apoptozu. Pokazano je da prekomerna ekspresija PAI-2 inhibira apoptozu i podstiče razvoj tumora, ali deluje znatno sporije nego PAI-1. Međutim, nema dokaza da PAI-2 kontroliše adheziju i migraciju tumorskih ćelija (Dass et al. 2008, Werb 1997, Mazar 2001, Odekon et al. 1992, Kwaan and McMahon 2009, Andreasen et al. 1997). U nekoliko studija je primećeno da i spore i plodonosno telo gljive dovode do značajne inhibicije visoko invazivnog tumora dojke i prostate (Sliva et al. 2002). Daljom analizom, utvrđeno je da je došlo do inhibicije konstitutivno aktivnih faktora transkripcije aktivatora protein-1 i nuklearnih faktora. Urokinaze plazminogen aktivator i uPA receptor sadrže aktivator protein-1 (AP-1) i nuklearni faktor (NF) u svojim kancerogenim ćelijama. Antikancerogeno delovanje *G. lucidum* može biti posledica inhibicije transkripcije faktora AP-1 i NF, pri čemu dolazi do suzbijanja ekspresije uPA i uPAR i izlučivanje uPA, što dovodi do inhibicije ćelijske pokretljivosti visoko invazivnih tumora (Sliva et al. 2002, Sliva 2003, Slivova et al. 2004).

Citotoksično dejstvo

Ćelijska citotoksičnost se odnosi na sposobnost određenih hemikalija ili medijatora ćelije da unište žive ćelije (Smyth et al. 2003). Korišćenjem citotoksičnog jedinjenja, žive, maligne ili zdrave ćelije mogu biti izazvane da se podvrgnu nekrozi ili apoptozi (Gardner et al. 1997, Smyth et al. 2003). Nekroza predstavlja nekontrolisan proces koji obično zahvata veliki broj ćelija, dok je apoptoza kontrolisan i energetski zavisian proces, koji obuhvata jednu ili nekoliko ćelija. Nekroza nastaje kao posledica oštećenja ćelije, dok je apoptoza programirana ćelijska smrt, tj. određeni vid ćelijske autodestrukcije. Kada dođe do nekroze ćelija, dešava se niz karakterističnih promena: ćelije i njihove organele bubre i dolazi do oslobađanja ćelijskog sadržaja i njegovog izlivanja u međućelijski prostor, što dovodi do inflamatornih procesa i nekroze okolnog

tkiva. Usled prskanja ćelijske membrane, vrlo često dolazi i do ruptуре ćelijskih organela, što ima za posledicu izlivanje lizozomalnih enzima, koji mogu uzrokovati destrukciju okolnih ćelija i tkiva (Trinchieri 1989, Lanier et al. 1986, Gardner et al. 1997, Kuhajda 2006, Smyth et al. 2003). Apoptoza je poželjan vid ćelijske smrti, jer predstavlja tzv. programiranu ćelijsku smrt. U toku ovog procesa ćelijska smrt se javlja na mestima gde nema ruptуре ćelijske membrane, pa samim tim ne dolazi do izlaska unutarćelijskog sadržaja u ekstracelularni prostor. To je fiziološki proces eliminisanja nefunkcionalnih ćelija, kao odgovor na određena patološka stanja. Apoptoza se dešava u jednoj ćeliji, nezavisno od okolnih događanja (Gardner et al. 1997). Ćelija gubi volumen, citoplazma postaje gušća, a organele zbijeno raspoređene, dolazi do inverzije ćelijske membrane i u isto vreme se razara ćelijski matriks, fragmentiše jedro i rasparčava DNA. Delovi ćelije se odvajaju u apoptotska telašća, koja brzo bivaju fagocitovana, te izostaje zapaljenska reakcija. U prosečnom ljudskom organizmu umre oko 10 milijardi ćelija putem apoptoze svakog dana (Old 1996, Schuster et al. 2006, Trinchieri 1989, Lanier et al. 1986, Gardner et al. 1997, Kuhajda 2006, Smyth et al. 2003). Veliki broj studija je utvrdio da triterpenoidi *Ganoderma lucidum* pokazuju direktnu citotoksičnost prema ćelijama tumora u *in vitro* istraživanjima (Wu et al. 2001, Gao et al. 2002, Zhu et al. 2000, Byung-Sun et al. 2000). Nekoliko triterpena izolovanih iz spora gljive, poput ganoderinske kiseline γ , ganoderinske kiseline ϕ i drugih, pokazale su citotoksični efekat na malignim ćelijama pluća *in vitro* (Byung-Sun et al. 2000). Ganoderinska kiselina E, lucidinska kiselina N i lucidinska kiselina A, izolovane iz suvog plodonosnog tela gljive, manifestovale su značajnu citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama jetre HEP G2 i krvi P-388 (Wu et al. 2001, Gao et al. 2002, Byung-Sun et al. 2000). U studiji koja je sprovedena na ćelijama karcinoma pluća (LLC), karcinoma dojke (T-47D) i sarkoma (S-180) sa lucialdehidom B, lucialdehidom C, gandermanonomom i ganodermanondiolom, pokazana je citotoksičnost u koncentracijama od 3,8 do 10,7 $\mu\text{g/mL}$ (Gao et al. 2002). U istraživanju rađenom sa alkoholnim ekstraktom *G. lucidum* na ćelijskim linijama tumora dojke MCF-7, došlo je do apoptoze i inhibicije ćelijske proliferacije (Hu et al. 2002). U drugoj studiji je dokazano da ekstrakt deluje selektivno toksično na HL-60 ćelije leukemije, dok citotoksični efekat nije primećen kod normalnih mononuklearnih ćelija periferne krvi (Kim et al. 2007). Ekstrakt je indukovao apoptozu preko Bcl-2 proteina, koji ima pro-

apoptotska svojstva, i mitohondrijalnog citohroma C (Wang et al. 2002, Kim et al. 2007). U studiji rađenoj na malignim ćelijama prostate, (PC 3) *G. lucidum* je indukovala apoptozu PC 3 ćelija sa blagim smanjenjem ekspresije NF faktora, regulisanog Bcl-2 proteinom (Jiang et al. 2004). U tabeli 2.10 dat je prikaz sprovedenih *in vivo* istraživanja i primenjenih količina gljive.

Tabela 2.10. Antitumorna svojstva *Ganoderma lucidum* u *in vivo* studijama

Tip	Doza	Efekat	Referenca
<i>In vivo</i> model HepG2 (miš) (karcinom jetre)	200-800 mg/kg 68 dana sirov <i>G. lucidum</i> ekstrakt	Inhibicija metastaza karcinoma	(Weng et al. 2009)
<i>In vivo</i> model Colon-26 (miš) (karcinom kolona)	300 mg/kg 5 dana <i>G. lucidum</i> polisaharidni ekstrakt	Inhibicija angiogeneze	(MiuRA et al. 2002)
<i>In vivo</i> model LLC (miš) (karcinom pluća)	100-200 mg/kg Triterpenoidni ekstrakt <i>G. lucidum</i>	Inhibicija: a) angiogeneze b) metastaza	(Kimura et al. 2001)
<i>In vivo</i> model LLC (miš) (karcinom pluća)	28 mg/kg 10 dana Ganoderinska kiselina Me	Povećanje: a) Il-2, IFN- γ b) NK ćelija c) Inhibicija metastaza	(Guan Wang et al. 2007)
<i>In vivo</i> model LLC (miš) (karcinom dojke)	28 mg/kg 13 nedelja Ekstrakt spora i plodonosnog tela <i>G. lucidum</i>	Inhibicija tumora > 50%	(Suarez-Arroyo et al. 2013)
<i>In vivo</i> model (ljudi) Različite vrste karcinoma	1800 mg/dan 12 nedelja Polisaharidni ekstrakt <i>G. lucidum</i>	Pojačan imuni odgovor (NK ćelije, Il-2, IFN- γ)	(Gao et al. 2003)

2.2.2.3. Antiviralna aktivnost

Virusi predstavljaju najmanje mikoorganizame, sa veličinom od svega 10 do 300 nm. Najčešće su građeni od samo dve komponente nukleinskih kiselina i proteina, dok neretko imaju i lipoproteinski omotač koji ih dodatno štiti (Herrero-Uribe 2011).

Pretpostavlja se da na svetu postoji oko milion različitih virusa, a do sada je identifikovano svega nekoliko hiljada (Morse 1996, Lipkin 2008). Prehlada je jedan od najzastupljenijih oblika virusne infekcije širom sveta. Iako uglavnom ispoljava vrlo blage posledice, ima veliki socio-ekonomski uticaj. Glavni virusni agens koji prouzrokuje prehladu je humani rino-virus (HRV) (Ledford et al. 2004). Ganodermicin, izolovan iz gljive, inhibirao je aktivnost virusa na dozno zavisani način, u količini od 15 do 20 µg/ml (Jung et al. 2011). Hepatitis C (HCV) je virusna infekcija kojom je zahvaćeno oko 170-200 miliona ljudi i koja dovodi do oštećenja jetre i karcinoma. HCV NS5B-RNA polimeraza je identifikovana kao ključna za replikaciju virusa. Alkoholni ekstrakt *G. lucidum*, u kombinaciji sa drugim biljkama, dovodi do inhibicije HCV NS5B-RNA polimeraze i mogućnosti replikacije samog virusa (Alexopoulou and Papatheodoridis 2012, Simon et al. 2016). Različiti tipovi virusne influence odgovorni su za epidemije širom sveta svake godine. Pored vakcinacije, dostupne su dve klase antivirusnih jedinjenja za lečenje gripa, koje se baziraju na inhibiciji matriksa-proteina i enzima neuroaminidaze. Međutim, njihova upotreba je ograničena zbog visoke cene i visokog stepena otpornosti virusa (Kamali and Holodniy 2013, Hurt et al. 2012, Ison 2013, Nicholls et al. 2013). U nekoliko studija pokazano je da pojedine komponente izolovane iz gljive, poput ganodermediola, lucidadiola i aplanoksinske kiseline, imaju inhibitorna svojstva prema virusu influence tipa A. Pretpostavlja se da ova jedinjenja ispoljavaju svoja antiviralna svojstva prema enzimu neuroaminidaza. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio put dejstva ovih jedinjenja (De Jong et al. 2005, Eo et al. 1999).

HIV je veoma zarazni virus koji pogađa oko 35 miliona ljudi širom sveta (Paydary et al. 2013). Izaziva smrtonosna i neizlečiva stanja, poznata kao sindrom stečene imunodeficijencije (AIDS (Antinori et al. 2011)). Trenutna strategija u borbi protiv HIV-a uključuje odlaganje progresije i sprečavanje bolesti da se razvije u AIDS, a akcenat ispitivanja se stavlja na HIV proteazu i reverznu transkriptazu (Scanlon and Vreeman 2013, Cohen and Fauci 2000, Wu et al. 2004). Reverzna transkriptaza potpomaže konverziju virusne RNA u DNA, koja potom može biti integrisana u genom domaćina. Sa druge strane, ekspresija ciljanih gena proizvodi poliproteine, koji se uz pomoć HIV proteaze prevode u potpuno funkcionalne virusne proteine (Scanlon and Vreeman 2013, Cohen and Fauci 2000). Istraživanja sprovedena sa *G. lucidum* na HIV

identifikovala su brojna jedinjenja koja pokazuju različite inhibitorne efekte prema virusu. Tako su, na primer, triterpenoidi *G. lucidum* identifikovani kao glavne komponente sa anti-HIV-1 efektima, koji se uglavnom odnose na inhibiciju HIV-1 proteaze (El-Mekkawy et al. 1998). Iako su triterpenoidi gljive označeni kao glavna grupa jedinjenja sa anti-HIV sposobnostima, *G. lucidum* poseduje i enzim lakazu, koji može dovesti do inhibicije HIV-1 reverzne transkriptaze (HX Wang and TB Ng 2006). U istraživanju sprovedenom na HIV pacijentima sa niskim brojem CD4 ćelija (100-200), nakon 7 dana suplementacije sa 1080 mg/dan ekstrakta *G. lucidum* u kombinaciji sa antiretro virusnom terapijom, došlo je do povećanja broja CD4 ćelija za 60, u odnosu na kontrolnu grupu koja je primala samo antiretro virusnu terapiju (Guan 2005). Pored pomenutih virusa, antiviralna aktivnost različitih ekstrakata *Ganoderma lucidum* dokazana je i prema herpes simpleks virusu 1 i 2, vazikularnom stomačnom virusu, hepatitisu B i enterovirusu 71 (Zhang et al. 2014, Li and Wang 2006, Liu et al. 2015, Stanberry et al. 2000, Kim et al. 2000, GIaVaSIS 2014b, Eo et al. 2000, HX Wang and TB Ng 2006).

2.2.2.4. Antimikrobna i antiparazitska svojstva

Malarija je infektivna bolest koju izaziva parazit *Plasmodium* i koja je svake godine uzrok oko 2,5 miliona smrtnih slučajeva (Mendis et al. 2000). Veoma mali broj lekova je delotvoran protiv ove bolesti, a aktivna direktna terapijska sredstva do sada nisu dostupna (Kulangara et al. 2012, Gamo et al. 2010, Anthony et al. 2012, Wells et al. 2009). Ganoderinska kiselina TR i S, ganoderin-aldehid TR i ganodermanondiol, izolovani iz *Ganoderma lucidum*, pokazali su umerenu *in vitro* antiplazmodialnu aktivnost (Adams et al. 2010). U velikom broju različitih studija dokazana je antibakterijska i antifungalna aktivnost *G. lucidum*. Kao glavne komponente koje poseduju ova svojstva, identifikovani su polisaharidi i triterpeni gljive (Keypour et al. 2008, Quereshi et al. 2010), čija aktivnost je bila podjednako efikasna kako u obliku neprečišćenih, tako i prečišćenih ekstrakata. U tabeli 2.11 dat je prikaz antimikrobnog delovanja *G. lucidum*.

Tabela 2.11. Antimikrobna svojstva *Ganoderma lucidum*

Antibakterijska aktivnost	Tip testa	Referenca
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Acitenobacter aerogenes</i> , <i>Acrobacter aerogenes</i> , <i>Arthrobacter citreus</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Corynebacterium insidiosum</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium pasteurianum</i> , <i>Micrococcus roseus</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	<i>in vitro</i>	(Heleno et al. 2013, Christopher 1995, Boh 2013, Isaka et al. 2013, Mehta 2014, Nayak et al. 2015, Stamets 2000, Suay et al. 2000, Sridhar et al. 2011, Yoon et al. 1994, Klaus and Nikšić 2007, Wang et al. 2011, Ferreira et al. 2015, Bhattacharyya et al. 2006, Skalicka-Wozniak et al. 2012, Keypour et al. 2008, Quereshi et al. 2010, Adams et al. 2010, Gao et al. 2003)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>in vivo</i>	(Wang et al. 2011)
Antifungalna aktivnost		
<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus tamarri</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Malassezia sloffiae</i> , <i>Malassezia sympodialis</i> , <i>Mucor indicus</i> , <i>Pache dermatitis</i> , <i>Penicillium oxalium</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>Penicillium digitatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Physalospora piricola</i> i <i>Trichoderma viride</i>	<i>in vitro</i>	(Boh 2013, Sridhar et al. 2011, Klaus and Nikšić 2007, Wang et al. 2011, Gao et al. 2003, Smania et al. 2003, Hexiang Wang and TB Ng 2006, Nayak et al. 2015)

2.2.2.5. Uticaj *Ganoderma lucidum* na urinarni trakt muškaraca

Problemi sa donjim urinarnim traktom kod muškaraca obično su povezani sa benignom hiperplazijom prostate, i vrlo su česti u poznim godinama (Liu et al. 2007). U

dva klinička ispitivanja sprovedena u Japanu, kod muškaraca sa blagim do umerenim problemima u donjem urinarnom traktu etanolni ekstrakt *G. lucidum* u dozi od 6mg pokazao se kao efektivan i bezbedan (Noguchi et al. 2008b, Noguchi et al. 2008a). Supresivni efekat na prostatu je najverovatnije posledica svojstva *Ganoderma lucidum* da inhibira enzim 5 α -reduktazu, prisutnu u velikim količinama u slučaju benigne hiperplazije prostate (Noguchi et al. 2008b, Liu et al. 2007). Enzim 5 α -reduktaza je odgovoran za negativne efekte pretvaranja testosterona u dihidrotestosteron, koji pospešuje rast ćelija prostate, stimulišući androgene receptore (Liu et al. 2007).

2.2.2.6. Neuro-protektivni efekat *Ganoderma lucidum*

Smeša triterpenoidnih jedinjenja izolovanih iz gljive *Ganoderma lucidum* dovela je do dužeg preživljavanja neurona i smanjenja umora (Zhou et al. 2012, Zhao et al. 2011, Zhang et al. 2011). U drugoj studiji, uzimanjem *G. lucidum* duži vremenski period došlo je do smanjenja napredovanja Alchajmerove bolesti (Lai et al. 2008, Zhou et al. 2012). Pretpostavlja se da neuroprotektivni efekat gljive potiče od stimulisanja neuritogeneze i usporavanja starenja neurona (Seow et al. 2013). U istraživanju sprovedenom na miševima, vodeni ekstrakt *G. lucidum* imao je protektivno dejstvo na cerebralnu ishemijsku povredu, tako što je inhibirao apoptozu (Zhou et al. 2010). U kliničkoj studiji koja je vršila ispitivanja dejstva *G. lucidum* na neurasteniju, funkcionalni poremećaj bez poznatog uzroka kod koga dominira nesanica, umor i zujanje u ušima, nakon 8 nedelja je među ispitanicima došlo do značajnog smanjenja stanja umora, dok se nakon 56 dana veliki broj pacijenata osećao dobro (Tang et al. 2005). U istraživanju sprovedenom 2013. godine, polisaharidi *G. lucidum* imali su nešto poput antidepresivnog dejstva i doveli do smanjenja anksioznosti kod pacova (Zhou et al. 2010).

2.2.2.7. Antidijabetska svojstva *Ganoderma lucidum*

Polisaharidi, proteoglikani, proteini i triterpeni gljive *Ganoderma lucidum* odgovorni su za hipoglikemijska svojstva (Teng et al. 2011, Kino et al. 1990, Hikino et

al. 1989, Hikino et al. 1985, Fatmawati et al. 2009). Polisaharidi gljive ispoljavaju svoje hipoglikemijske efekte na više načina. Povećavanjem nivoa insulina i istovremenog smanjenja nivoa šećera u plazmi, pojačavaju aktivnost enzima jetre gluko-kinaze, fosfofrukto-kinaze i glukoza-6-fosfat dehidrogenaze inhibiranjem sinteze glikogena, smanjujući na taj način proizvodnju glukoze u jetri i nivo mRNA ključnih enzima, uključenih u glikogenolizu i glukoneogenezu, i štiteći ćelije pankreasa inhibiranjem NF- κ B aktivnosti (Xiao et al. 2012, McCormack et al. 2001, Agius 2007). Problemi sa ranama kod pacijenata sa dijabetesom vrlo su česti, i neretko mogu dovesti do amputacija (He et al. 2005). Zarastanje rana kod pacijenata koji su koristili polisaharide *G. lucidum* bilo je brže za preko 20% (Seto et al. 2009). Proteoglikanski ekstrakti, dobijeni iz *G. lucidum*, mogu inhibirati protein-tirozin-fosfatazu 1B (PTP1B) *in vitro*. PTP1B ima važnu ulogu u negativnoj regulaciji insulinske signalizacije receptora i smanjuje ekspresiju subjedinice insulinskog receptora B (Feldhammer et al. 2013, Combs 2009, Teng et al. 2011). Triterpenoidi *G. lucidum* predstavljaju inhibitore aldehyd-reduktaze i α -glukozidaze (Fatmawati et al. 2011, Fatmawati et al. 2010b, Fatmawati et al. 2013, Fatmawati et al. 2010a, Feldhammer et al. 2013). Aldehyd-reduktaza je enzim koji se prvi javlja u poliolnom putu, u kome nastaje sorbitol iz glukoze (Schemmel et al. 2010, Gabbay 1975, Bhatnagar and Srivastava 1992). Akumulacija sorbitola može dovesti do dijabetičkih komplikacija, kao što su neuropatija, nefropatija, retinopatija i katarakta. Ganoderinske kiseline C, A i D_f pokazale su da mogu da inhibiraju rad enzima aldehyd-reduktaze. α -glukozidaza vrši konverziju disaharida i oligosaharida u glukozu, i nalazi se u epitelu tankog creva. Inhibiranjem ovog enzima vrši se ublažavanje simptoma hiperglikemije. Ganoderol B identifikovan je kao supstanca koja poseduje izrazito jaka inhibitorna svojstva kada je u pitanju α -glukozidaza. Njegova aktivnost veća je i u odnosu na *Akarbozu*, lek koji se koristi za suzbijanje nivoa glukoze u krvi posle obroka, a koji zapravo inhibira α -glukozidazu (Bhatnagar and Srivastava 1992, Fatmawati et al. 2011, Fatmawati et al. 2010b, Fatmawati et al. 2013, Fatmawati et al. 2010a, Feldhammer et al. 2013). Proteini izolovani iz gljive, poput proteina Ling Zhi-8 (LZ-8), pored antidijabetičkog efekta poseduju i imunomodulatorska svojstva. LZ-8 ima mitogensku aktivnost i može da snizi koncentraciju glukoze u plazmi (Kino et al. 1990, Kino et al. 1989). Pretpostavlja se da

ovaj protein može da stimuliše stvaranje supresornih T-ćelija koje su sposobne da inhibiraju određene mitogene, nastale usled dejstva limfocita (Hsu et al. 2013).

2.2.2.8. Dejstvo *Ganoderma lucidum* na kardiovaskularni sistem

Kardiovaskularne bolesti danas su jedno od najčešćih oboljenja savremenog društva i vodeći uzrok smrti u velikom broju zemalja (Isomaa et al. 2001). One utiču na strukturu ili funkciju srca, a među njima su najpoznatije bolest koronarnih arterija (sužavanje arterija), infarkt, aritmije, otkazivanje srca, kardiomiopatija, bolesti aorte i bolesti krvnih sudova (Opie et al. 1984). Studija sprovedena sa vodenim ekstraktom *Ganoderma lucidum* na pacovima i zečevima pokazala je da je ekstrakt smanjio sistolni i dijastolni krvni pritisak, ali nije doveo do smanjenja broja otkucaja srca (Lee and Hee 1990). Pretpostavlja se da *G. lucidum* dovodi do hipotenzije zbog centralne inhibicije simpatikusa, što bi značilo da je hipotenzija indukovana tretmanom ekstrakta bila sekundarnog, a ne primarnog karaktera (Kanmatsuse et al. 1985, Y KABIR et al. 1988, Lee and Hee 1990). *G. lucidum* i α -tokoferol, kada se koriste zajedno, mogu da zaštite mitohondrije sprečavanjem smanjenja antioksidativnog statusa, smanjujući kardiotsičnost. Polisaharidi izolovani iz gljive pokazali su se vrlo dobro kod ljudi koji pate od koronarnih srčanih oboljenja. Značajno smanjuju procenat abnormalnih EKG vrednosti, krvnog pritiska i nivoa holesterola, a mogu dovesti i do smanjenja oksidativnog oštećenja i apoptoze kod proksimalnih cevastih epitelnih ćelija, izazvanih dejstvom serumskog albumina (Mizuno et al. 1995, Kanmatsuse et al. 1985, Rajasekaran and Kalaimagal 2012, Liu et al. 1993, Lee and Hee 1990, Lai et al. 2004, Chu et al. 2012). Kanmatsus (sa saradnicima) 1985. godine je sproveo ispitivanje na 53 pacijenta koji su bolovali od umerene i teške hipertenzije. Suplementacija je vršena liofilizovanim ekstraktom *Ganoderma lucidum* u dozi od 1440 mg/danu. Nakon perioda od 6 meseci, kod pacijenata sa visokom hipertenzijom došlo je do značajne redukcije krvnog pritiska, dok kod pacijenata sa umerenom hipertenzijom nije došlo do značajnijih promena (Kanmatsuse et al. 1985). U drugoj studiji, koju je sproveo Jin (sa saradnicima), takođe je kod pacijenata sa hipertenzijom nakon 4 nedelje, pri suplementaciji od 330 mg/dan ekstrakta *G. lucidum*, došlo do značajnog pada sistolnog i dijastolnog pritiska (Jin et al. 1996). U istraživanju koje je ispitalo dejstvo ekstrakta *Ganoderma lucidum* na koronarne bolesti, pacijenti su koristili 5400 mg ekstrakta

dnevno. Tretman je doveo do poboljšanja osnovnih simptoma, smanjenja pojave abnormalnih kardiograma i sniženja holesterola i krvnog pritiska (Gao et al. 2004).

2.2.2.9. Toksičnost *Ganoderma lucidum*

Ganoderma lucidum se već vekovima smatra lekovitom gljivom, te ne iznenađuje što je u kineskoj medicini stekla gotovo božanski status. Do danas je sproveden veoma veliki broj istraživanja u vezi sa njenim potencijalnim zdravstvenim efektima. Međutim, postoji i deo ispitivanja koji se bavio mogućim toksičnim delovanjem ove gljive. U studiji koja se bavila *in vitro* istraživanjima dejstva ekstrakta *Ganoderma lucidum* na određene ćelijske linije, došlo se do zaključka da dodavanje ekstrakta u visokim koncentracijama prestaje da ima pozitivna dejstva i može da ispolji citotoksičnost (Gill and Rieder 2008). Osetljivost na gljivu u obliku alergije je prvi put zabeležena 1979. godine u Ontariju u Sjedinjenim Američkim Državama, kod pacijenta koji je bio pozitivan na antigen *G. lucidum*. Većina zabeleženih slučajeva jesu zapravo različiti vidovi alergija, uglavnom na spore, a ređe i na celo plodonosno telo gljive (Singh et al. 1995, Tarlo et al. 1979, Cutten et al. 1988). Posebna pažnja mora se obratiti kod osoba sa različitim vidovima hroničnih oboljenja. Tako se, na primer, kod pacijenata koji pate od hipoglikemije mora biti posebno oprezan, jer *G. lucidum* može dodatno da smanji nivo šećera u krvi (Hikino et al. 1989). Oprez je potreban i u slučajevima čira na želucu i gastrointestinalnih krvarenja, kao i kod pacijenata koji koriste antikoagulanse i prilikom svih ostalih problema sa zgrušavanjem krvi, jer *G. lucidum* ima antikoagulativna svojstva (Ulbricht et al. 2010, Shulman et al. 2014). Kako ne postoje podaci u vezi sa uticajem gljive na trudnice i dojilje, to treba biti obazriv pri upotrebi iste. Kod osoba koje koriste antihipertenzivnu terapiju treba takođe obratiti posebnu pažnju, jer upotreba gljive može dovesti do dodatnog sniženja pritiska (Lee et al. 2009, Ulbricht et al. 2010, Shulman et al. 2014, Hikino et al. 1989, Wanmuang et al. 2007, Cutten et al. 1988, Gill and Rieder 2008).

2.3. Pivo

2.3.1. Pivo nekada

Istorija nastanka piva seže u daleku prošlost, verovatno oko 7000. godine pre n.e., na šta ukazuje analiza organskih ostataka sadržaja keramičkih posuda iz ranog neolita, poteklih od pirinča, meda i voća i otkrivenih u kineskom selu Jiahu u provinciji Hena (McGovern, P. et al, 2004). Drevno pivo nije bilo ovakvo kakvim ga danas poznajemo, i svoja svojstva, sastav i izgled je menjalo, uvek se prilagođavajući okolnostima i zahtevima potražnje.

Postojbina piva su nesumnjivo i Mesopotamija i dolina Nila, a tragove o njemu ostavile su sve civilizacije nastale na ovom podneblju. Najpoznatiji artefakt čini 12 glinenih ploča na kojima je zapisan „Ep o Gilgamešu“ najstarije literarno delo i najsvršeniji ep starog sveta, čiji se značaj pokazuje kako u činjenici da je Gilgameš bio istorijska ličnost (kralj sumerskog grada-države Urk) i opisu potopa i spašavanja veoma sličnih onima u „Bibliji“ (nastaloj nekoliko vekova kasnije), tako i u tome što navodi pivo kao piće koje je imalo svoju istorijsku ulogu u formiranju ljudskog roda. Naime, u poemi „Divlji čovek“ upravo je ovo piće bilo uzrok preobražavanja divljeg Enkidua, dovoljno da ga humanizuje (Andrew, 2003; Hornsey, 2003; Sicard & Legras, 2011; Damerow 2012, Hornsey 2003, William et al. 2011).

Kako je izgledalo drevno pivo i kako se proizvodilo najviše otkrivaju tekstovi koji potiču iz područja Mesopotamije. Jedan od najpoznatijih je „Himna o Ninkasi“, u kome se navode ne samo sirovine, već i recepture. Informacije o tome od čega i kako se proizvodilo pivo nisu toliko iznenađujuće, koliko činjenica o broju različitih vrsta ovog pića. U periodu Urka od ječma i ječmenog slada proizvodilo se bar 9 vrsta piva, dok se u Vavilonskom carstvu taj broj povećao na 70, a kao sirovina se koristio i emer, preteča današnje pšenice (Meussdoerffer, 2009; Damerow, 2012). Različiti podaci svedoče da se pivo koristilo i u medicinske svrhe. Nađeni su zapisi o melemima koji su pripremani na bazi ovog pića, ali na žalost nema dovoljno tragova i o svim njihovim lekovitim sastojcima (Teall, 2014). Pivo je u tom periodu bilo značajan proizvod, njegova

proizvodnja i promet bili su zakonom regulisani (Codex Hammurabi) i nije se smelo prodavati, već samo menjati za žito (Nagarajan, 2011).

Egipatska kultura nije pridavala ništa manji značaj ovom piću. Artefakti iz perioda 5000 godina pre n.e., slike i glinene figure nađene u grobnicama, prikazuju proces proizvodnje i posude koje su se u pivari koristile. Pivo se smatralo neophodnim pokojniku na njegovom putu u zagroban život, bez obzira da li je on bio bogat trgovac koji je sebi mogao da priušti grobnicu ili faraon. U to doba, proizvodila su se piva od različitih sirovina, sa različitim sadržajem alkohola i u različite svrhe. Ovo piće se koristilo u ishrani, medicini i religijskim obredima. Lakša piva bila su namenjena svakodnevnoj ishrani, a posebno pripremljena su se koristila u verskim obredima i medicini. „Pivo istine“ se, primera radi, pripemalo isključivo za 12 bogova koji su čuvali Ozirisov hram na nebu i sveštenike koji su to činili u hramu. Budući da je imalo za cilj dovođenje u specifično spiritualno stanje, može se samo pretpostaviti koliko je sadržalo alkohola i čime je bilo obogaćivano (Adamski & Rosińska-Balik, 2014). Najviše podataka o tome od čega se i sa čim proizvodilo pivo dobijeno je analizom organskih ostataka posuda u kojima je ostavljano u grobnicama. Zaključeno je da se u medicinske svrhe najčešće koristilo „slatko pivo“, u kome su tokom noći ekstrahovani različiti dodaci, zavisno od zdravstvenog problema koji je trebalo da ublaži ili izleči, od oralnih, ginekoloških i gastroenteroloških do inflamatornih.

Pod vođstvom Aleksandra Velikog, Grci pokoravaju Egipat 331. godine pre n.e. i sa sobom donose vino kao plemenito piće viših klasa. Pod izgovorom zloupotrebe alkohola, uvode stroga pravila za proizvodnju i prodaju piva, prve namete u vidu poreza, ali organizuju proizvodnju piva kao državni monopol (Hornsey 2003). Opšte je prihvaćena teza da su Grci, kao i Rimljani, prezirali pivo i da ga nisu pili. Međutim, nova saznanja daju nešto drugačiju sliku. Činjenica je da su Egipćani Grcima i Rimljanima preneli veliku količinu znanja i logično je da su to učinili i kada je proizvodnja piva u pitanju. Nema pouzdanih podataka da Grci i Rimljani nisu pili pivo, već pre svega obilje zapisa koji insistiraju na prednostima koje daju vinu i kulturi vina, piću koje je nesumnjivo bilo omiljeno i jednimai drugima, i – nedvosmisleno – statusni simbol, nedostupan plebsu. Jedno od tumačenja je da su niži slojevi društva i dalje održavali tradiciju piva, a da su predrasude protiv ovog pića i minimiziranje negovog

značaja svesno građene. Primer su i sami termini koji su se u zapisima sretali: „ječmeno vino“ i „pšenično pivo“ (Nelson, 2003), a za koje se može samo pretpostavljati na koju vrstu pića su se odnosili. Motiva za ovakav stav ima sigurno više, a po jednom od njih su ovakve okolnosti zapravo bile manifestacija želje za isticanjem superiornosti nad ostalim narodima i susedima, bazirane na nesumnjivom znanju, kulturi i filozofiji, u cilju distance od „varvarske“ populacije. I Grci i Rimljani su širili kult vina na područjima koja su osvajali i ono je postalo popularno u svim regijama u kojima je vinova loza uspevala. No, bez obzira na značaj koji su mu pridavali u kulturološkom smislu, pivo je i dalje ostalo prisutno u provincijama Galije i Španije (Bouby, 2011).

U ostatku sveta, tradicija piva je već uveliko postojala. Prvi podaci koji govore o proizvodnji piva u različitim delovima Evrope datiraju iz perioda 3600. godine pre n.e. U vreme rimskih osvajanja, u centralnim evropskim regijama, Kelti su posedovali veliko iskustvo u proizvodnji ovog pića. Oni su širili kulturu piva sve od Španije na jugu i do Irske na severu (Townns 1992, Stika 1996). O germanskim počecima spravljanja ovog pića nema mnogo informacija, ali se zasigurno zna da je ovaj narod bio veliki uživatelj piva i da ga je spravljaao od ječma ili pšenice, uz dodatak začina i meda (Nelson 2005). Skandinavska plemena na severu Evrope, pre svega Vikinzi, bili su poznati moreplovci, ali i farmeri i ljubitelji ovog pića, koje su proizvodili od ječma i raži sa dodatkom kleke, po recepturi koja se i danas može naći. O važnosti i ulozi piva na ovim područjima najveći broj zapisa ostavili su grčki i rimski putopisci i istoričari, ali o tome govore i stari zapisi, rune i epovi. Među njima je najpoznatiji „Kalevala“, finski ep sigurno 3000 godina star (Hornsey, 2003), koji pridaje ovom piću neverovatno veliki značaj, posvećujući mu čak 400 redova, naspram 200 rezervisanih za nastanak sveta (Crawford, 2010).

U 9. veku, Evropom se širi hrišćanstvo i gradi sve veći broj manastira. Oni locirani na jugu Starog Kontinenta bili su orjentisani na gajenje vinove loze i proizvodnju vina, a oni u centralnom delu i na severu postaju centri pivarstva. Manastirske pivare niču širom britanskih ostrva, Nemačke, Skandinavije i Centralne Evrope. Proizvodnja počinje u domaćinstvima u kojima su dominirale žene i prerasta u zanat, koji će postajati sve ozbiljniji, profesionalniji i stručniji. Manastiri su prvobitno proizvodili pivo samo za sopstvene potrebe, ali kasnije, u 12. i 13. veku, proširuju proizvodnju i počinju sa prodajom. Tako počinje nova era pivarstva, u kojoj je uveden

hmelj kao osnovna sirovina, donesen prvi Zakon o pivu, uvedene brojne tehničke inovacije i postignuta naučna saznanja. Za sve to vreme, pivo je menjalo i svoja svojstva. Osnovne sirovine od kojih se proizvodilo ostale su uglavnom iste, ali su se dodaci kojima je obogaćivano menjali, zavisno od tradicije i namene.

2.3.2. Pivo danas

Pivo se danas, kao i nekada, proizvodi od ječma, odnosno slada, vode, hmelja i kvasca kao osnovnih, pored kojih se koristi i veliki broj drugih sirovina. Njihova svrha je kreiranje specifičnih ukusa i ispunjavanje zahteva tržišta u pogledu sadržaja alkohola, glutena, energetske vrednosti ili cene. Tako možemo sresti piva sa dodatkom voća, voćnih sirupa, lekovitog i aromatičnog bilja, gljiva, meda ili pak ono sa različitim vrstama žitarica (Belščak-Cvitanovića et al., Kalušević et al. 2011, Leskošek-Čukalović et al. 2010, Leskošek-Čukalović 2002). Proces proizvodnje se vremenom menjao, ali je suština samog postupka ostala ista.

Pretpostavlja se da u svetu postoji oko 5000 komercijalnih pivara i oko 40000 različitih vrsta piva (Papazian 2006). Prvi podaci sa njihovim detaljnim opisima publikovani su 1977. godine u knjizi „World Guide to Beer“. Piva su bila razvrstana uglavnom po geografskom poreklu, boji i vrsti kvasca koji se koristio (Jackson 1977). Danas, skoro četrdeset godina kasnije, postoji 96 različitih kategorija, tipova i vrsta ovog pića, sa 58 podvrsta (Walsh 2016). Međutim, podela piva na ovaj način predstavlja problem, jer je pojedine kategorije teško precizno definisati (Hughes 2016).

2.3.2.1. Piva sa specifičnim senzornim svojstvima

U ovu kategoriju se mogu ubrojiti piva koja se izdvajaju po specifičnosti ukusa i/ili arome, koja treba da oslikava posebnost upotrebljenog sastojka. Izgled zavisi od osnovnog upotrebljenog piva i može imati svojstvenu boju i penu, ukus sa prepoznatljivim karakterom, harmoničan i ne previše dominantan, zadovoljavajuću unocu i reskost. Opšti utisak treba da bude skladan spoj između sirovina, tehnološkog procesa i piva, dok će sveopšta harmoničnost, unikatnost i pitkost učiniti ova piva specifičnim (BJCP 2015).

Njihova podela bi mogla da se napravi na sledeći način:

A. Nestandardni postupci proizvodnje:

- a. *Steinbier* (kamenno pivo) – dominantan tip piva u austrijskoj pokrajini Koruška, sve do početka 20. veka. Specifičnost njegove proizvodnje ogledala se u načinu ukomljavanja, izvođenog u drvenim kadama, u koje se stavljalo vrelo kamenje kako bi se postigla željena temperatura. Otuda i potiče njegov naziv („kamenno“). Među najpoznatijim danas su *Gänstaller bräu rocks steinbeir*, *Port brewing hot rocks lager* i *Hofstettner granitbock* (BJCP 2015, Daniels 1998, Rhodes 2014, Räsänen 1975),
- b. *Eisbier/Eisbock* (ledeno pivo) – nastalo u nemačkoj pokrajini Bavarskoj u Kulmbahu. Tradicionalno se dobija parcijalnim smrzavanjem jakog piva i uklanjanjem leda, kako bi se koncentrovale arome i alkohol. Sadržaj alkohola je između 9 i 13%, a pivo je tamno-bakarne boje, intenzivne arome i bogatog, ponekad voćnog, ukusa. Među poznatijima su *Kulmbacher Reichelbräu Eisbock*, *Eggenberg* i *Schorschbräu* sa 57% alkohola (Rhodes 2014, Cornell 2011, Walton and Glover 1998, Newman 2016, Papazian 2006);

B. Nestandardne sirovine (npr. krompir, heljda...);

C. Nestandardni sastojci (npr. javorov sirup, med, bundeva, melasa...):

Piva sa dodatkom specijalnih aroma – *Karmi* je bilo staroegipatsko pivo, sa jedinstvenim aromatičnim ukusom, koji je dolazio do izražaja nakon dodatka smreke. Danas je to Calsberg-ov regionalni brend, koji se već neko vreme proizvodi u Poljskoj. Do nedavno, *Karmi* se proizvodio kao tamno pivo sa prepoznatljivim ukusom karamele, bez određene grupe potrošača. Međutim, u želji da osvoji i ženski deo populacije, 2006. godine preinačen je u nešto sasvim novo – pivo za žene, aromatizovano, sa niskim sadržajem alkohola (0,1%). *Karmi* se proizvodi sa dodatkom različitih aroma, poput guave i mente (*Lamai*), kafe (*Poema di Caffè*), ananasa (*Seula*), tiramisua, karamele i brusnice (Cymanow 2004, <http://www.karmi.pl/> 2017);

D. Istorijska, tradicionalna ili autohtona piva – piva specifičnih svojstava od kojih su najpoznatija:

- a. *Louvain Petermann* – belgijsko pivo iz 18. i početka 19. veka, sa dodatkom *Lactobacillus sp* i drugih mikroorganizama (Jelinek 1946, Tepedelen 2013, Hornsey 2003, Cornell 2011),
- b. *Sahti* – tradicionalno pivo iz Finske, dobijeno od različitih žitarica i kleke (Goheen 2015, Reid et al. 2006, Mosher 2004),
- c. *Vatted Poter* – poter dobijen fermentacijom uz dodatak *Brettanomyces sp.* (*B.claussenii*, *B.bruxellensis* ili *B.lambicus* (Snyder 1893, Foster 1992)),
- d. *Colonial Spruce* – severno-američko pivo iz 16. veka, dobijeno dodatkom iglica omorike (Ellis 1783, Stubbs 2003),
- e. *Grätzer* – pivo iz Poljske dobijeno od pšeničnog slada, sušenog tako što je hrastov dim cirkulisao kroz zrna. Dim i mineralni sastav vode dali su mu specifičan karakter (Dredge 2014, Gifhorn 1901, Tepedelen 2013, BJCP 2015, Rhodes 2014).

2.3.2.2. Piva namenjena ciljnoj grupi potrošača sa specifičnim zahtevima u pogledu načina ishrane

Ovu kategorija predstavlja sva ona piva čiji su tehnološki postupak dobijanja i glavna ideja bili okrenuti ka nutritivnim karakteristikama. U tom pogledu, mogli bismo napraviti sledeću podelu:

- A. *Dijetalna* ili skraćeno *dijet* piva – imaju niži sadržaj ugljenih hidrata, a nastala su kao potreba borbe sa gojaznošću u savremenom dobu (Gallus et al. 2015). Izrazito su popularna u Severnoj Americi, a po svom sastavu su slična *lakim* pivima. Sadržaj ugljenih hidrata kreće se od 0,75-0,85g/100ml (Cornell 2011, Walton and Glover 1998, Bottorff and Meason 2008, Kunze et al. 2004). Nedavno je razvijen i novi koncept dijet sportskih piva – proteinsko pivo. *Barbell brew* sadrži 85% manje ugljenih hidrata od standardnog piva (0,5g/100ml), 95% više proteina (6,6g/100ml), 3,6% v/v alkohola i svega 29 kalorija na 100ml (Arts et al. 2016);
- B. *Bezalkoholna* piva po pravilu smeju da sadrže najviše 0,5% v/v, a izuzetak čine islamske zemlje u kojima je gornja granica 0,05% v/v, odnosno 0% v/v. Ova piva poslednjih godina dobijaju sve veći značaj i to iz više razloga. Jedan od

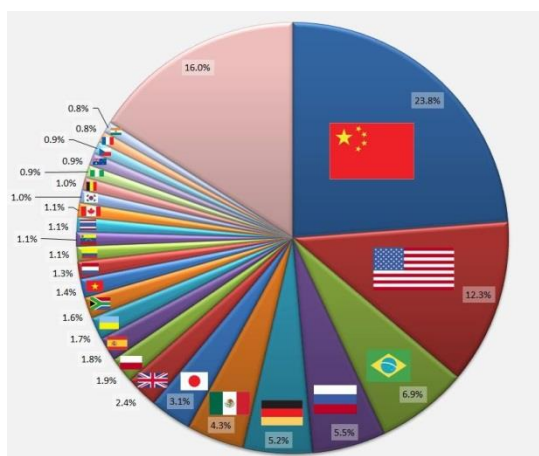
veoma važnih je Zakon o bezbednosti saobraćaja, koji u svim zemljama postavlja sve strožije zahteve u pogledu dozvoljenog sadržaja alkohola u krvi vozača. Religijski razlozi u državama Bliskog istoka zabranjuju konzumiranje alkohola, a sve prisutnija je i kampanja protiv alkoholizma (Back and Bohak 2005, Montanari et al. 2009, Narziss et al. 1995);

- C. *Pivo bez glutena* – gluten je protein pronađen u plodu nekih žitarica. Najviše ga ima u plodovima pšenice, raži i ječma i u maloj količini u ovsu, a ne sadrže ga kukuruz, sirak, proso, heljda, amarant, kvinoja i pirinač. Celijakija je bolest trajnog poremećaja tolerancije na gluten, tj. protein prisutan u brašnu pšenice, raži i ječma. Otuda jedini mogući lek koji osobama sa alergijom omogućava zdravlje i normalno funkcionisanje jeste striktna i doživotna dijeta bez glutena. Postoji nekoliko različitih postupaka za proizvodnju bezglutenskog piva: upotreba genetski modifikovanih ili žitarica koje ne sadrže gluten, korišćenje sirovina kod kojih se enzimskom modifikacijom smanjuje sadržaj glutena, upotreba šećernih sirovina (Zweytick and Berghofer 2009, Hager et al. 2014, Colgrave et al. 2011, Gallagher 2009, Real et al. 2014, Green and Cellier 2007, Kupper 2005, Lammers et al. 2014, Dieterich et al. 1997);
- D. *Piva sa dodatkom bilja* – datiraju još iz drevnog Egipta kada su se tradicionalno koristili anis i šafran, kojima se u srednjem veku pridružuju kim, hajdučka trava, pelen, lincura, ruzmarin, bunika itd (Dredge 2014, Goheen 2015, Mosher 2004, Yeo and Liu 2014). Među najpoznatijima bilo je pivo *Gruit*, u koje se dodavala smeša različitih biljaka, poput divljeg pelina, hajdučke trave, dobričice, očajnice i vresa, dok su neki proizvođači dodavali i cimet, muskatni oraščić, đumbir, kim i anis. Sve dok je nije zamenio hmelj, *Mirica gale* L. (slatki gal) korišćena je tokom čitavog srednjeg veka. Svi delovi ove biljke imaju aromatičan miris, zbog ulja koje se izlučuje kroz žlezde u listovima i cvetovima. Upotreba slatkog gala bila je ograničena samo na područje na kom je prirodno rasla. Danas se više ne koristi kao dodatak pivu, iako je postojala duga tradicija takve njene upotrebe u Holandiji, Nemačkoj i Skandinaviji, što je dokumentovano u mnogim pisanim izvorima (Viklund 2011, Stika 2011, Simpson et al. 1996, Skene et al. 2000, Hornsey 2003, Cornell 2011, Walton and Glover 1998, Bottorff and Meason 2008). Još uvek se mogu sresti tradicionalna i istorijska piva u nekim zemljama,

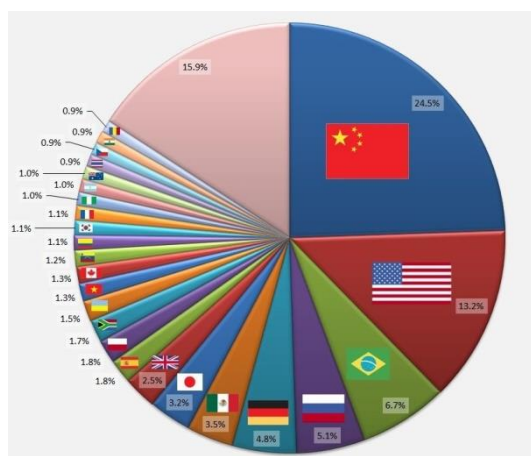
- a pored njih i nova sa timijanom, matičnjakom, koprivom, klekom i sl (Despotovic et al. 2007, Veljovic et al. 2010, Veljovic et al. 2011, Leskošek-Čukalović et al. 2010);
- E. *Piva sa povećanim farmakodinamičkim dejstvom* – kao potpuno prirodan proizvod, pivo sadrži preko 2000 različitih sastojaka koji mogu imati povoljno delovanje na organizam. Ukoliko se unosi u razumnoj količini, može dovesti do poboljšanja opšteg zdravstvenog stanja organizma. U isto vreme, ono je i dobra osnova za dobijanje proizvoda sa dodatom vrednošću. Mogućnosti ima dosta.
- XAN™*-pšenično pivo – za razliku od pšeničnog piva koje je proizvedeno kao komercijalno, ono proizvedeno *XAN™*-tehnologijom odlikuje se povećanim sadržajem ksantohumola, polifenola koji se nalazi u lepljivim zrcima hmelja i ima pozitivan uticaj na zdravlje ljudi. Radi postizanja veće koncentracije ove supstance u pivu, dodatak hmelja za obogaćenje ksantohumulom zamenjen je dodavanjem etanolnih ekstrakata ksantohumola. Prilikom primene tzv. *XAM™*-tehnologije, dobija se pivo sa višim sadržajem alkohola, hmelja i količinom ksantohumola koji može dosegnuti 10 mg/l (Walker et al. 2003, Gerhauser et al. 2002);
- E. *Pivo sa spirulinom* – osmislila ga je i proizvela pivara Mandalej sa Mjanmara. Verovalo se da ovako dobijeno pivo poseduje svojstva koja mogu dovesti do podmlađivanja. Sadržaj alkohola je iznosio 5% v/v, a ekstrakta 0,5% (Liang et al. 2004, Jianhua 2000);
- F. U želji da pridobije i ženski deo populacije, 2005. godine pivara Carlsberg je plasirala na tržište *Karlu*, mešavinu piva (min. 70%) i voćnih sokova sa dodatkom vitamina, folne kiseline, lecitina i matičnjaka i sadržajem alkohola od 1% v/v. Cilj je bio dobiti prirodan proizvod koji doprinosi poboljšanju opšteg zdravstvenog stanja i koji je preventiva u borbi protiv osteoporoze. Pivo se prodavalo putem distribucije apotekarskim ustanovama i porizvodilo u tri varijante: 1) kao blend piva, hmelja i matičnjaka (*Melissa officinalis*), deluje umirujuće), 2) Well Be – sa sojinim lecitinom, koji pozitivno deluje na nivo holesterola u krvi, i sa folnom kiselinom, koja se preporučuje trudnicama i 3) Acti fit – namenjeno sportistima (DW 2004, 2006).

2.3.3. Tržište piva

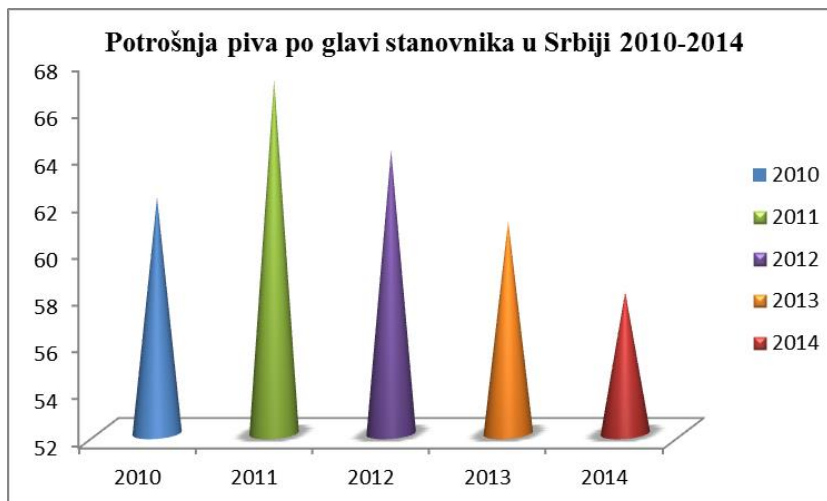
Globalno posmatrajući, pivo je napitak koji se najviše konzumira na svetu (Halonen et al. 2014). Međutim, u poslednjih 50 godina došlo je do velikih promena u njegovoj proizvodnji i potrošnji (Nelson 2005, Poelmans and Swinnen 2011, Unger 2004). Možda najveće, a ujedno i najviše iznenađujuće, jesu one u tradicionalno pivarskim zemljama, kao što su Velika Britanija, Nemačka i Belgija (Swinnen 2011), gde je potrošnja piva u konstatnom opadanju, dok se u ostalim državama može zapaziti drugačiji trend. Tako je, na primer, u Rusiji, došlo do povećanja potrošnje ovog pića, s obzirom da su potrošači sa tradicionalne votke prešli na pivo. Sličan trend je zabeležen i u Italiji i Španiji, gde se, u skladu sa tradicijom, pije vino (Jargin 2013, MACLEOD et al. 1997, Guallar-Castillón et al. 2001, Pyörälä 1990, Selvanathan and Selvanathan 2007, Swinnen 2011). U 2003. godini dolazi do velikih promena. Kina preuzima primat u proizvodnji i potrošnji piva (slika 2.6 i 2.7) (Statista 2016a). U Evropi, Nemačka i dalje prednjači po proizvodnji, a slede je Britanija, Poljska i Španija (Brewers 2015). Međutim, najveću potrošnju po glavi stanovnika i dalje ima Češka (144 l), dok se u Srbiji (58 l) beleži konstatni pad proizvodnje i potrošnje (slika 2.8 (www.pks.rs 2016, Brewers 2015)). Iako se u pojedinim zemljama beleži konstatni pad potrošnje, globalno su proizvodnja i potrošnja piva u porastu (Brewers 2015). Pretpostavlja se da će rast svetskog tržišta piva u periodu između 2015. i 2020. godine biti povećan za 6%, i dostići vrednost od 688,4 milijardi US\$ (Bisht 2016).



Slika 2.6. Proizvodnja piva u svetu u 2014. godini



Slika 2.7. Potrošnja piva u svetu u 2014. godini



Slika 2.8. Potrošnja piva u litrima po glavi stanovnika u Srbiji 2010-2014.

Smatra se i da je povećanje potrošnje izazvano rastom populacije (kao ključnim faktorom), ekonomskom liberalizacijom i povećanjem platežne moći potrošača, koja se pre svega odnosi na Kinu (Beer and Boswell 2001, Aizenman and Brooks 2008, Arora et al. 2011). Međutim, prema ekonomskoj teoriji, smatra se da je potražnja u korelaciji sa drugim faktorima, poput cene piva, cena supstituenata piva, zarada, karakteristika proizvoda i potrošačkih preferencija (Tremblay and Tremblay 2005, Stigler and Becker 1977). Takođe, činjenica da je pivo, kao i ostala alkoholna pića, potencijalno adiktivno, može znatno uticati na njegovu potrošnju (Waters and Sloan 1995, Akerlof 1991, Becker and Murphy 1988).

Prema podacima WHO, u 2010. godini svaki stanovnik sveta stariji od petnaest godina popio je 6,2 litra čistog alkohola, što čini 13,5 g/dan (Organization 2014). Ta količina ekvivalentna je jednom pivu (330 ml) koje sadrži 4% v/v alkohola (Kerr et al. 2005, Baxter and Hughes 2001). Pod teškim alkoholizmom smatra se konzumiranje šezdeset ili više grama čistog alkohola (šest ili više pića) najmanje jedanput mesečno (Vaillant 2009, Boyd and Weissman 1983, Organization 2014). U Srbiji, prema podacima za period od 2008. do 2010. godine, svaki stanovnik stariji od petnaest godina u proseku je popio 10,9 litara alkohola na godišnjem nivou. Međutim, kada se izuzmu osobe koje apsolutno ne piju, dolazi se do rezultata po kojima muškarci u organizam

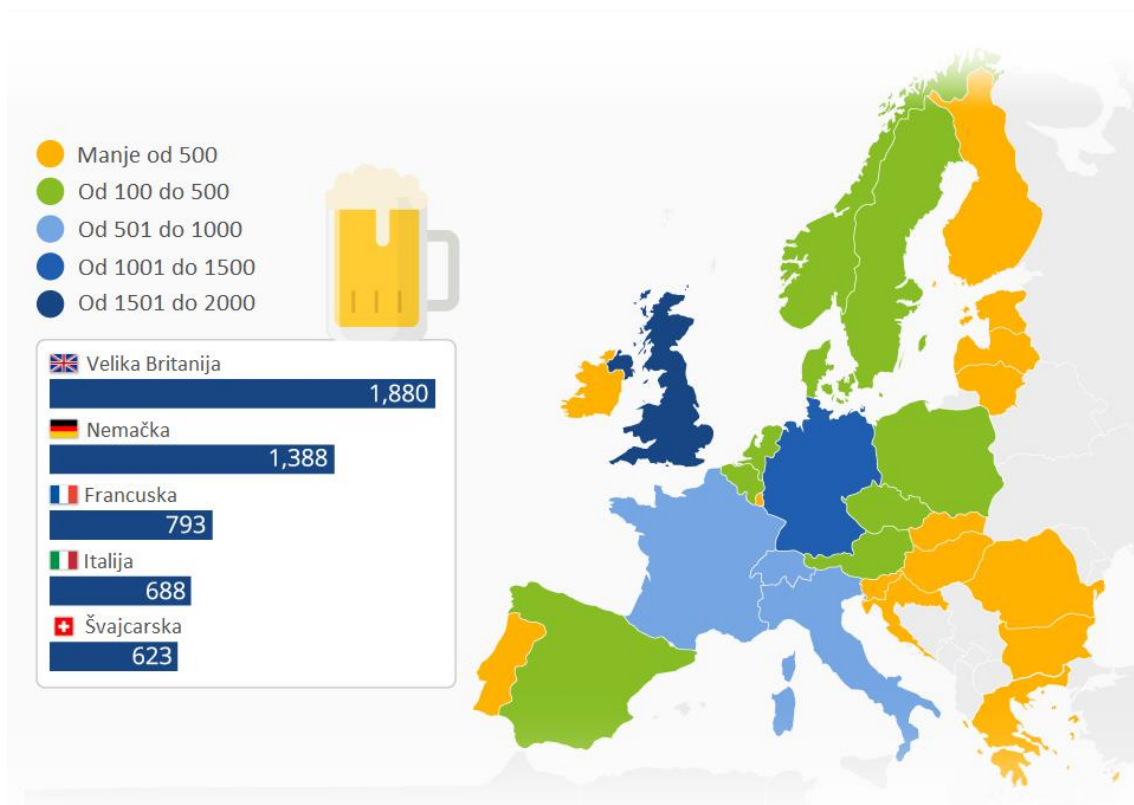
unesu 27, a žene 9,9 litara alkohola godišnje. U Republici Srbiji, najomiljenije alkoholno piće bilo je pivo, potom jaka alkoholna pića i vino (Organization 2014).

Od velikog uticaja na potrošnju mogu biti i socio-ekonomski uslovi, kao što su pritisak vršnjaka, socijalni status, potencijalni negativni zdravstveni efekti, propisi vlade i državni nameti (Okrent 2010, Cutler and Lleras-Muney 2010, Deconinck and Swinnen 2015, Akerlof and Kranton 2011, Akerlof and Kranton 2000, Lee and Tremblay 1992).

Kao što je već pomenuto, u zemljama sa malim i srednjim primanjima koje imaju privredni rast, poput Kine, Rusije, Poljske i Indije, potrošnja piva raste. Sa druge strane, iako dolazi do rasta zarada u bogatim zemljama, ujedno dolazi i do smanjenja potrošnje piva, što ukazuje na njihov nelinearan odnos, nasuprot očekivanom (Nelson 2003, Selvanathan and Selvanathan 2005, Gallet and Eastman 2007, Fogarty 2010, Campbell and Fogarty 2006, Okrent 2010, Selvanathan and Selvanathan 2007). Za to postoji nekoliko mogućih objašnjenja. Prvo, pretpostavlja se da porast standarda i obrazovanja prati povećana svest i briga o potencijalnim negativnim efektima po zdravlje. Drugo, sve bolja informisanost omogućava veći broj saznanja o štetnosti alkohola. Treće, politika uređuje finansije i uslove marketinga: vlade mnogih država nametnule su velike poreze i ograničile reklamiranje alkoholnih pića (Cutler and Glaeser 2009, Lakdawalla et al. 2005, Cutler and Glaeser 2005, Nelson 2003, Lee and Tremblay 1992). Naravno, ne može se zanemariti ni efekat globalizacije i povećanja tržišta i trgovine alkoholnih pića. Uz sve navedeno, i kulturna globalizacija, kroz povećanje migracija i turističkih putovanja, značajno doprinosi konvergenciji ukusa. Komunikacija među narodima takođe je bitan faktor, jer ljudi postaju manje povezani tradicionalnim kulturološkim obrascima, što za posledicu ima homogenizaciju ili, u najmanju ruku, hibridizaciju životnih stilova i ukusa (Meloni and Swinnen 2013, Vanormelingen et al. 2011, Anderson 2004, Okrent 2010, Beer and Boswell 2001, Aizenman and Brooks 2008).

Većina piva na tržištu danas dolazi iz makro pivara. Međutim, u poslednjih nekoliko godina značajan rast u proizvodnji beleže i male pivare (slika 2.9) (Brewers 2015). U Srbiji trenutno posluje 7 makro (Apatinska pivara – članica Molson Coors grupe, Hajneken Srbija, Karlsberg Srbija, Beogradska industrija piva (BIP), Valjevska pivara, Niška pivara) i oko 30 malih, kraft pivara. Najveći deo tržišta naše zemlje i dalje

zauzimaju velike pivare, sa preko 90% . Međutim, po mišljenju privrednih stručnjaka, sve veća popularnost kraft piva u budućnosti može doneti nešto drugačija kretanja, za šta su zaslužna njihova specifična piva i dinamičnije praćenje zahteva tržišta od velikih makro sistema.



Slika 2.9. Broj pivara u Evropi

Trendovi velikih pivarskih korporacija se vrlo sporo menjaju, te većina proizvodi tradicionalno najpopularnija lager piva (Howard 2014). Pored njih, blagi rast u proizvodnji beleže i manje standardni proizvodi kao što su: laka (dijet) piva, bezalkoholna piva, piva sa različitim aromama, bezglutenska piva i radleri (Thacker 2016). Kada su u pitanju kraft pivare, situacija je drugačija: najvećim delom, one stavljaju akcenat na vladajuće trendove na tržištu i senzorna svojstva koja privlače potrošače. Potražnja za jako zahmeljenim pivima ne jenjava, te se i dalje nastavlja dominacija IPA (*Indian Pale ale*). U Americi je zapažen porast proizvodnje piva sa spontanom fermentacijom, kiselih piva i *sezona*, čiji naziv potiče od francuske reči *seson* – sezonski, tipa *pale ale* piva sa oko 7% alkohola, jako karbonizovanog,

začinjenog, sa izrazito voćnim mirisom i aromom. Na tržištu su se pojavila i nova piva, poput *milkshake IPA* (IPA fermentisana sa dodatkom laktoze) i voćnog *guzea* (tradicionalni belgijski Guze sa voćem (Thacker 2016, Skypeck 2016)), za koja se pretpostavlja da biti popularna i u narednim godinama. Srbija ne zaostaje u pogledu trenutnih trendova, te tako najveći primat u velikim pivarama i dalje imaju lageri, a u kraft pivarama različite vrste *ale* piva, među kojima dominiraju piva sa izraženom hmeljnom aromom (IPA).

2.3.4. Hemijski sastav piva

Pivo je kompleksno piće. Sadrži preko 800 različitih komponenti, od kojih mnoge poseduju bioaktivna svojstva. Neke su posledica upotrebe različitih sirovina, koje u toku proizvodnje ostaju nepromenjene, dok su neke posledica hemijskih i biohemijskih transformacija nastalih u toku komljenja, kuvanja, fermentacije i odležavanja (Briggs et al. 2004, Frías et al. 2016, Buiatti 2009). Zajedno, sve ove komponente daju jedinstven karakter pivu. Međutim, razni tipovi piva imaju sličan, a opet različit hemijski sastav (tabela 2.112 (Ferreira 2009, Baxter and Hughes 2001, Briggs et al. 2004, Buiatti 2009)).

Tabela 2.12. Hemijski sastav različitih tipova piva

	<i>Lager</i>	<i>Ale</i>	Bezalkoholno pivo
Alkohol [% v/v]	3,00-6,00	5,00-12,00	0,01-0,50
Ekstrakt [%]	3,52-5,17	3,31-10,24	6,52-10,64
pH	3,74-4,63	3,81-4,83	4,87-5,01
Diacetil [mg/l]	0,01-0,08	0,06-0,30	0,06-0,51
DMS [μ g/l]	>15	>15	22-45
Glukoza [%]	0,49	1,0	0,61
Fruktoza [%]	0,18	1,0	0,25
Saharoza [%]	*	*	0,16
Maltoza [%]	0,25	0,7	5,00
Maltotrioza [%]	0,33	1,7	0,92

*- u tragovima

Voda predstavlja najdominantniji sastojak piva i, u zavisnosti od tipa, kreće se u granicama od 88 do 95% (Buiatti 2009, Bamforth 2002). Minerološki sastav vode koja se koristi za proizvodnju ima značajan uticaj na karakteristike piva i specifična senzorna svojstva (Bamforth 2009), dok je u prošlosti bio uslov za dobijanje definisanih tipova i senzornih svojstava. Danas to više nije slučaj, jer se sastav vode tehnološki veoma lako može prilagoditi bilo kom tipu (Buiatti 2009). Pored vode, upotrebljene sirovine umnogome doprinose hemijskom sastavu piva, koje sadrži oko 30 različitih minerala. Njihov sadržaj se kreće između 0,5 i 2,0 g/l, a među najzastupljenijim su kalijum, kalcijum, magnezijum i natrijum (Frías et al. 2016, Fillaudeau et al. 2006, Rodrigo et al. 2014, Sánchez-Martínez et al. 2012). U tabeli 2.13 dat je prikaz neorganskih komponenti piva.

Tabela 2.13. Sadržaj neorganskih komponenti u pivu (Rodrigo et al. 2015, Briggs et al. 2004, Baxter and Hughes 2001)

Neorganske komponente	Koncentracija mg/l	Neorganske komponente	Koncentracija mg/l
Kalijum	200-450	Kiseonik	0,4-4
Natrijum	20-350	Gvožđe	0,01-0,3
Kalcijum	25-120	Mangan	0,03-0,2
Magnezijum	50-90	Azot	1-14
Oksalati	5-30	Silicijum-dioksid	10,2-22,4
Fosfati	170-600	Selen	0,006-0,01
Hrom	do 0,04	Cink	0,01-1,48

Posle vode, u pivu ima najviše ugljenih hidrata i alkohola. Sadržaj ugljenih hidrata varira i iznosi od 3 do 5%, mada jaka piva mogu imati i do 10% (Ferreira 2009, Briggs et al. 2004, Leskošek-Čukalović 2016). Među njima najviše ima dekstrina, koji čine skoro 2/3 svih prisutnih ugljenih hidrata. Dijetalna vlakna su prisutna u malim količinama (1,6-2,1 g/l (Molla et al. 1994, DIAZ-RUBIO and Saura-Calixto 2009, Goñi et al. 2009)), kao i monosaharidi (riboza, arabinoza, ksiloza, glukoza, fruktoza, galaktoza), disaharidi (maltoza, izomaltoza), trisaharidi (panoza, izopanoza,

maltotrioze), polioli (glicerol, inozitol) i polisaharidi (β -glukan (Ferreira 2009, Briggs et al. 2004, Leskošek-Čukalović 2016)).

Sadržaj etanola zavisi prvenstveno od vrste piva i najčešće iznosi od 4 do 6% v/v. Tokom fermentacije, pored etanola nastaju i male količine drugih alkohola, organskih kiselina, estara, etara, aldehida i dr (tabela 2.14-15).

Od organskih kiselina prisutne su mlečna, mravlja, ćilibarna, ugljena i, u najvećem procentu (40-80%), sirćetna (Buiatti 2009, Bottorff and Meason 2008, Bamforth 2009).

Tabela 2.14. Sadržaj alkohola i fenolnih kiselina najčešće prisutnih u pivu (Bamforth 2002, Buiatti 2009)

Alkoholi	mg/l	Fenolne kiseline	mg/l
Metanol	0,5-0,3	Kofeinska	1-10
1-propanol	3-16	<i>para</i> -kumarinska	0,1-0,2
2-propanol	3-6	Cinaminska	0,5
2-metilbutanol	8-30	Elaginska	1-10
3-metilbutanol	30-70	Ferulinska	1,1-6
2-feniletanol	8-35	Galna	1-5
1-oktan-triol	0,03	Hidroksibenzoeva	0,13
2-dekanol	0,005	Sinapinska	1-10
glicerol	1200-2000	Vanilinska	1-10

Sadržaj azotnih materija u pivu kreće se između 0,2% i 0,7%, mada kod nekih specijalnih piva može iznositi i više od 1%. Amino-kiseline, peptidi i proteini prisutni su u malim količinama. Međutim, postoje specijalne vrste piva kod kojih sadržaj proteina iznosi 6,6 g/100ml (Gómez-Alonso et al. 2007, Nord et al. 2004, Perpète et al. 2005, Fontana and Buiatti 2009, Didier and Bénédicte 2009, Arts et al. 2016).

Pivo sadrži i male količine masti, koje potiču od slada, hmelja i kvasca. To su uglavnom masne kiseline (< 1 mg/l), mono-, di- i trigliceridi, steroli i fosfolipidi (Wainwright 1980, Leskošek-Čukalović 2016).

Tabela 2.15. Sadržaj estara i aldehida prisutnih u pivu (Briggs et al. 2004, Buiatti 2009, Briggs et al. 1982)

		mg/l	Opis ukusa
	Etil acetat	10-60	na rastvarač, sladak
	Izoamil acetat	0,5-5,0	na banane
Estri	Etil heksanoat	0,1-0,5	na jabuke, voće, sladak
	Etil oktanoat	0,1-1,5	na jabuke, tropsko voće, sladak
	2-feniletil acetat	0,05-2,0	na ruže, med, jabuke, sladak
	Acetaldehid	2-20	na zeleno
	Propanal	0,01-0,3	na zeleno, voćni
Aldehidi	Butanal	0,03-0,02	na dinje
	C ₅ -aldehidi	0,01-0,3	na travu, jabuke, sir
	Oktanal	0,001-0,02	na citrusne, gorko

Za pivo su karakteristični vitamini B grupe, i to pre svega niacin (B3), folna kiselina (B9) i folat. Pirodaksin (B6), riboflavin (B2), tijamin (B1), pantenonska kiselina (B5), biotin (B7) i kobalamin (B12) prisutni su u manjim količinama. Od ostalih vitamina, pivo sadrži A, C, D i E koji potiču, u najvećem procentu, od slada i hmelja (tabela 2.16 (Briggs et al. 1982, Buiatti 2009)).

Tabela 2.16. Sadržaj vitamina B prisutnih u pivu (Briggs et al. 1982, Briggs et al. 2004, Buiatti 2009)

Vitamini	mg/l	Vitamini	mg/l
Tijamin	0,003-0,08	Folna kiselina	0,04-0,6
Riboflavin	0,02-0,8	Kobalamin	3,0-30,0*
Niacin	3,0-8,0	Biotin	2,0-15,0*
Pantenonska kiselina	1,09-1,81	Pirodaksin	0,07-1,7

* µg/l

Od ostalih komponenti, polifenoli (i to pogotovo oni koji potiču od hmelja) zaslužuju posebnu pažnju zbog funkcionalnog delovanja koje imaju. Pored njih, prisutni su i melanoidini (produkti Majardovih reakcija), isparljive komponente (preko 200) i specifične komponente poput humulona, lupulona, α - i β - kiselina, geraniola i linalola. Međutim, u pivu se mogu, u veoma malim količinama, naći i furfural i njegovi derivati, pirazin, pirol, pirolidin, azepin, sumpor dioksi, nitrozamin i biogeni amini (histamin, tiramin, triptamin, feniletilamin i dr. (Daniel et al. 2015, Redruello et al. 2017, Quifer-Rada et al. 2015, Whittle et al. 1999, Kaneko et al. 2009, Peacock and Deinzer 1981, De Keukeleire 2000, Leskošek-Čukalović 2016)).

Kao posledica ovako profilisanog hemijskog sastava i specifičnog odnosa pojedinih sastojaka, pivo ima definisano farmakološko delovanje i, ako se konzumira u umerenim količinama, može imati povoljan uticaj na organizam (naravno, kod osoba kod kojih alkohol nije kontraindikovano).

2.3.5. Zdravstveni aspekti konzumiranja piva

Pivo se smatra blagim alkoholnim pićem (4–6% v/v) i, kao takvo, tretira se jednako ostalim alkoholnim pićima. Slobodno se može reći da je alkohol najkontroverznije jedinjenje, jer nijedno drugo ne može naneti toliko štete, a u isto vreme i doneti toliko koristi (Vreeswijk 1995). Kada je reč o njegovoj ulozi u svakodnevnom životu i uticaju na zdravlje, kontroverza je takođe prisutna. Prema podacima Svetske zdravstvene organizacije (WHO), alkohol je odgovoran za smrt oko 2,5 miliona ljudi, uzrokujući tako 4% svih smrtnih slučajeva u svetu (Organization 2014). Prekomerna upotreba alkohola je vodeći svetski rizik od smrtnosti muškaraca dobi od 15 do 29 godina, i to uglavom kao posledica nastalih povreda, ali i brojnih patoloških promena u organizmu (Stahre 2014, Mordovsky et al. 2014, Ryan and Crowther 2013), dok je istovremeno povezana sa bolestima poput kardiovaskularnih, oboljenja jetre, trovanja i različitih tumora (kolona, dojke, grla i jetre (Green et al. 2001, Poli et al. 2013, Ryan and Crowther 2013)). Nasuprot tome, višegodišnja obimna istraživanja pokazuju da umereno konzumiranje alkohola može imati povoljno delovanje na organizam (Poli et al. 2013, Vaillant 2009). Opšti je zaključak da

prekomerno unošenje ima fatalne posledice, dok ono s merom može potencijalno poboljšati opšte zdravstveno stanje organizma. Vrlo je teško utvrditi specifičnost delovanja samog etanola na čovekov organizam, jer se on nikada ne konzumira izolovano, već uvek u vidu određenih alkoholnih napitaka.

Postoje brojna epidemiološka ispitivanja koja svedoče o postojanju ravnoteže između rizika i koristi od konzumiranja alkohola (Diaz et al. 2002, De Bree et al. 2001, Romeo et al. 2008, Romeo et al. 2007, Kaplan et al. 2000). Rezultati studije, sprovedene na milion osoba koje su konzumirale alkohol u umerenim količinama (do 40 g kod muškaraca i 20 g kod žena), pokazali su da je prevremena smrt manja za 18% kod žena i 17% kod muškaraca nego kod osoba koje prekomereno piju ili ne piju uopšte (Di Castelnuovo et al. 2006). U drugoj velikoj studiji, koja je obuhvatila 245.000 odraslih osoba, praćeni su umereni konzumenti (do tri pića nedeljno ili manje) i oni koji to nisu, a rezultati su pokazali da je smrtnost usled kardiovaskularnih bolesti kod umerenih konzumenata i apsolutnih apstinenata bila znatno niža (Mukamal et al. 2010).

Poznato je da pivo sadrži prirodne antioksidante (polifenole) koji pozitivno deluju na zdravlje (Van der Gaag et al. 2000, Singh et al. 2007). Njihovo prisustvo uslovljeno je u najvećoj meri upotrebljenim sirovinama i vrstom piva, a većina njih potiče od slada i hmelja (Briggs et al. 1982, Baxter and Hughes 2001, Briggs et al. 2004). Količina polifenolnih materija u pivu kreće se između 150 i 500 mg/l, i upravo je zato veliki broj istraživanja imao za cilj analizu efekata koje one imaju na zdravlje ljudi (Buiatti 2009, Leskošek-Čukalović 2016). Kako su još uvek podeljena mišljenja o tome da li alkohol ili polifenoli iz piva imaju protektivno dejstvo, sprovedena je predklinička studija, gde su upoređeni rezultati nivoa holesterola osoba koje su konzumirale standardno i bezalkoholno pivo. Utvrđeni efekat pripisan je bezalkoholnim komponentama piva. Došlo je do smanjenja oksidativnog stresa organizma, povećanja izoksantohumola u urinu i aktivacije AKT/eNos signalnih puteva (Vilahur et al. 2012, Vilahur et al. 2014). U sličnoj studiji, u kojoj su se tokom četiri nedelje pratili identični parametri i grupa osoba koja je konzumirala džin, autori su zaključili da su fenolne komponente piva bile odgovorne za povećanje antagonih receptora IL-1, smanjenje ekspresije limfocita funkcionalno povezanog antigena 1 i monocita ekspresije CCR2, dok je alkohol uglavnom poboljšao lipidni status i smanjio one inflamatorne biomarkere

u plazmi koji su u vezi s aterosklerozom (Chiva-Blanch et al. 2014, Chiva-Blanch et al. 2015), za šta je uzrok, zapravo, bilo povećanje HDL-a (dobrog holesterola). Pokazalo se i da je nivo HDL-a u direktnoj korelaciji s kardiovaskularnim oboljenjima: što je njegova količina u krvi veća, to su manje šanse za takve vrste bolesti (Gordon et al. 1989, Hokanson and Austin 1996). Nekoliko različitih ispitivanja dokazalo je da konzumiranje piva u umerenim količinama može znatno povećati nivo HDL holesterola u krvi i popraviti lipidni status (Imhof et al. 2004, Romeo et al. 2008, Miura et al. 2005). U nekoliko drugih istraživanja, uočeno je i da alkohol pospešuje cirkulaciju i sprečava nastanak krvnih ugrušaka (Gorelick 1987, Zakhari 1997, Friedman and Rosenman 1959), dok je u studiji sprovedenoj na životinjama utvrđeno da postoji direktna veza između efekta antioksidanata iz piva i smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti (Vinson et al. 2003). Pretpostavlja se i da antioksidanti sprečavaju zgrušavanje krvi i tako smanjuju rizik od srčanog udara (Pignatelli et al. 2000). *In vitro* studija, u kojoj je ispitivano dejstvo piva na biomarkere oksidativnog stresa, pokazala je da pivo štiti DNA od oštećenja, sprečavajući rupturu u lancu molekula (Rivero et al. 2005). Međutim, treba napomenuti i da *in vivo* efekti zavise od biovijabilnosti komponenti prisutnih u ovom piću, kao i od načina na koji su metabolizovane. Tako se biovijabilnost različitih polifenola bitno razlikuje, te pojedine fenolne komponente mogu pretrpeti glukuronizaciju i sumporizaciju, menjajući biološka svojstva (Manach et al. 2005). Nardini (sa saradnicima) je sproveo istraživanje apsorpcije fenolnih kiselina piva (ferulinske, vanilinske, kofeinske, para-kumarinske), mereći njihovu koncentraciju u plazmi 30 minuta nakon konzumiranja. Rezultati pokazuju da je apsorpcija izvršena u duodenumu, u početnom delu tankog creva, a da se ferulinska, vanilinska i kofeinska kiselina uglavnom metabolišu u sulfate (Nardini et al. 2006). Međutim, u nekoliko studija dokazano je da pojedine hmeljne komponente (ksantohumol i izo-ksantohumol, na primer), podležu isključivo glukuronizaciji i mogu biti detektovane u urinu i fecesu u izvornom ili u obliku svojih metabolita. Brojna ispitivanja bavila su se i apsorpcijom polifenola u prisustvu alkohola (Scalbert and Williamson 2000, Manach et al. 2005, Peter CH Hollman and Martijn B Katan 1999, P_C H Hollman and Martijn B Katan 1999). Pokazano je da je apsorpcija polifenola mnogo brža (30 minuta) kod alkoholnih nego kod bezalkoholnih piva (90 minuta (Ghiselli et al. 2000)). Pretpostavlja se da su alkohol, polifenoli i druge prisutne bioaktivne komponente odgovorne za

kardioprotektivno dejstvo ovog pića – naravno, samo u slučaju kada se ono umereno konzumira.

Različiti inflamatorni (upalni) procesi u organizmu takođe mogu biti jedan od faktora za nastajanje kardiovaskularnih oboljenja, a ujedno su i deo metaboličkog sindroma (Geronikaki and Gavalas 2006), kog čini skup faktora rizika, posledice insulinske rezistencije i nakupljanja masnog tkiva (Alberti et al. 2005). Nekoliko studija je pokazalo da pivo poseduje antiinflamatorne supstance (flavoni, ksantohumol) koje inhibiraju iNOS (azot-monoksid-sintetaze) i COX-1 (ciklo-oksigenaze (Milligan et al. 2000, Arranz et al. 2012). Pored toga, pivo reguliše i nivo endotelnih progenitorskih ćelija koje imaju važnu ulogu u anginogenezi (Chiva-Blanch et al. 2014)). Uz to, utvrđeno je da i alkohol i različiti polifenoli regulišu ekspresiju fibrinolitičkih proteina (uPA, uPAR, PAI-1) na ćelijskom, molekularnom i genetskom nivou. Povećanjem fibrinolitičke aktivnosti bitno se smanjuju kardiovaskularna oboljenja (Parks and Booyse 2002, Booyse et al. 2007, Arranz et al. 2012). Potrebno je naglasiti i blagotvorno dejstvo prisutnih minerala na kardiovaskularni sistem (Leskošek-Čukalović 2009). Kako je pivo bogato kalijumom i magnezijumom, a ima nizak sadržaj natrijuma, to ga čini pogodnim za upotrebu od strane osoba s povišenim krvnim pritiskom (Perez and Chang 2014, Mente et al. 2014, Bain et al. 2015, Dyckner and Wester 1983).

Ksantohumol, 8-prenilnaringenin, izoksanthumol, flavoni, humuloni i proantocijani su supstance koje se u pivu nalaze u malim količinama. One potiču iz hmelja i imaju antitumorna svojstva (Arranz et al. 2012, Leskošek-Čukalović 2009, Milligan et al. 1999). Iako je količina ksantohumola koja se dobija iz piva mala, pretpostavlja se da on ima određeni protektivni efekat na zdravlje zahvaljujući lipofilnim karakteristikama i biovijabilnosti (Negrao et al. 2012, Ming et al. 2013), odnosno antiinflamatornom, antioksidativnom, anti HIV-1 i antikancerogenom dejstvu, dokazanom u nekoliko *in vivo* i *in vitro* studija. Smatra se da ksantohumol utiče na nekoliko načina: tako što inaktivira prokarcinogene; indukuje produkciju detoksifikacionih enzima; poseduje angiogeni efekat; inhibira inflamacije; inhibira Akt/NF-κB put; inhibira produkciju NO enzima; aktivira cisteinske proteaze koje su esencijalne za apoptozu i reguliše Bcl-2 proteinske regulatore apoptoze (Monteiro et al. 2008, Lee et al. 2011, Wang et al. 2004, Tronina et al. 2013, Stevens and Page 2004,

Negrao et al. 2012). Sa druge strane, 8-prenilnaringenin predstavlja jedan od najjačih biljnih fitoestrogena. Posедуje jaka antioksidativna svojstva i pokazuje umerenu aktivnost prema nekim ćelijskim linijama tumora (Miranda et al. 2000, Allsopp et al. 2013, Blanquer-Rosselló et al. 2013, Pepper et al. 2004, Ming et al. 2013).

Osteoporoza je bolest koja se manifestuje smanjenjem koštane mase, usled čega se smanjuje i mehanička otpornost kostiju (Kanis et al. 1994). Sa njom se suočava uglavnom starija populacija, a naročito osobe ženskog pola nakon menopauze. Pretpostavlja se da se prelom dešava kod jedne od tri žene starije od 50 godina (Hernlund et al. 2013, Cosman et al. 2014). Taker (sa saradnicima) je istraživao odnos između konzumiranja piva i gustine koštane mase, i ustanovio da umereno konzumiranje ovog pića utiče na povećanje koštane mase (Tucker et al. 2009, Reffitt et al. 2003). Studija sprovedena na zdravim pojedincima izmerila je nivo silicijuma u serumu i urinu nakon konzumiranja piva, i pokazala da je nivo silicijuma porastao za 50%, što dokazuje njegovu biorasploživost. Pivo sadrži između 6,4 i 56,5 mg/l silicijuma. Iako ne postoji preporučena dnevna doza za unos tog minerala, prema nekim istraživanjima se pretpostavlja da više od 40 mg/l može povećati gustinu koštane mase (Tucker et al. 2009, Sripanyakorn et al. 2004, Reffitt et al. 2003). Pored silicijuma, fitoestrogeni, prisutni u pivu, imaju bitnu ulogu u regulaciji koštane mase kod žena (Milligan et al. 2002, Pedrera-Zamorano et al. 2009) i, kako se smatra, stimulišu lučenje kalcitonina, polipeptidnog hormona, čija je uloga regulacija koncentracije kalcijuma u krvi (Pedrera-Zamorano et al. 2009).

Dijabetes melitus je bolest povezana s poremećajem rada endokrinog pankreasa, organa koji luči dva hormona, insulin i glukagon, od kojih prvismanjuje, a drugi povećava koncentraciju glukoze u krvi. Usled nedostatka insulina, javlja se hiperglikemija i šećerna bolest. Jedna od prvih faza u razvoju dijabetesa jeste otpornost organizma na insulin, što prevenira umereno konzumiranje piva (Weitzman et al. 1985, de Luis et al. 2003, Kerner and Brückel 2014).

Metabolički sindrom je bolest koja, zapravo, obuhvata više različitih oboljenja. Obolele osobe imaju visok nivo triglicerida u krvi, gojazne su, imaju nizak nivo HDL-a, visok krvni pritisak i rezistentne su na insulin, što su ujedno i uzročnici dijabetesa melitusa II. Nekoliko studija je zaključilo da konzumiranje piva u umerenim količinama

smanjuje rizik od pojave metaboličkog sindroma (Baik and Shin 2008, Kaur 2014, Alberti et al. 2005).

S obzirom na to da ovo piće ne sadrži masti, već samo malu količinu prostih šećera, jasno je da njegova energetska vrednost potiče uglavnom od alkohola. U istraživanju sprovedenom među osobama ženskog pola, utvrđeno je da umereno konzumiranje piva nije u korelaciji s povećanom telesnom masom, odnosno da nema uticaja na gojaznost (Bobak et al. 2003, Bendsen et al. 2013, Preedy 2011).

Slično važi i za dejstvo ovog pića na dojilje. Tokom porođaja, majka i dete izloženi su velikom oksidativnom stresu, posledici hiperprodukcije reaktivnih vrsta kiseonika. Kvalitet majčinog mleka, najprirodnije hrane za novorođenče, zavisi od brojnih faktora, dok dijeta bogata antioksidantima podjednako smanjuje oksidativni stres i majke i deteta (Weber et al. 2014, Robles et al. 2001). Ispitivanje u trajanju od 30 dana, vršeno na majkama koje su konzumirale bezalkoholno pivo radi poboljšanja antioksidativnog kapaciteta organizma, utvrdilo je da je mleko bilo bogatije antioksidantima i da su biomarkeri različitih organa pokazivali manji oksidativni stres. Analiza urina beba utvrdila je i da su oksidativna oštećenja novorođenčadi, čije su majke konzumirale bezalkoholno pivo, bila manja nego u kontrolnoj grupi (Matos et al. 2015, Codoñer-Franch et al. 2013).

Uz sve navedeno, istraživana su i imunomodulatorna svojstva piva, i to u studiji koja je obuhvatila odrasle Špance i dala sledeće rezultate: nakon konzumiranja ovog pića u količini od 330 ml za žene i 660 ml za muškarce, kod prvih se povećao broj CD3+ koreceptora, imunoglobulina (IgG, IgM, IgA), interleukina (IL-2, IL-4, IL-10) i IFN- γ , dok je kod drugih utvrđeno povećanje bazofila (Romeo et al. 2007). Drugo ispitivanje, rađeno na eksperimentalnim životinjama, utvrdilo je stimulatívni efekat ovog pića na nespecifični imunosistem (Kaplan et al. 2000, Sohrabvandi et al. 2012).

Na kraju, vršene su i analize uticaja piva na giht. Ova, obično nasledna bolest metabolizma, za posledicu ima upalu zglobnih struktura i mekih tkiva. Uzrokuje je nagomilavanje mokraćne kiseline u telesnim tečnostima, a potom i taloženje mokraćnih kristala u tkivima (Shiozawa et al. 2017, Neogi et al. 2015, Kuo et al. 2009). Konzumiranje alkohola posebno doprinosi razvoju gihta. Kako ono povećava nivo seruma mokraćne kiseline i izaziva iznenadne bolove prouzrokovane njenim nagomilavanjem (Choi et al. 2004), tako je nekoliko studija potvrdilo da, od svih

alkoholnih pića, pivo najnepovoljnije deluje na osobe sa ovim oboljenjem. Razlog tome je, jednim delom, određena količina purina, pivskog sastojka koji izaziva hiperurikemiju. Stoga bi pojedinci koje boluju od gihta trebalo da izbegavaju konzumiranje većih količina piva (Muthuri et al. 2015, Holzgreve 2014, Rees and Doherty 2014, Li et al. 2015, Leskošek-Čukalović 2009).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja ove disertacije je bio dobijanje specijalnog piva povećanih funkcionalnih svojstava dodatkom gljive *Ganoderma lucidum*. *G. lucidum* obiluje biološki aktivnim molekulima (polisaharidima, triterpenima i proteinima) i kao takva predstavlja vrlo važan izvor nutrijenata koji deluju bimodulatorno i protektivno na ljudski organizam. Stoga ciljevi ovog rada su:

- Ispitivanje uslova alkoholne ekstrakcija gljive u cilju dobijanja standardizovanog ekstrakta optimalnog kvaliteta.
- Hemijska karakterizacija, utvrđivanje antioksidativnih i antimikrobnih svojstava dobijenog ekstrakta.
- Utvrđivanje optimalnih uslova fermentacije i načina dodavanja gljive kako bi se dobilo pivo sa najprihvatljivijim senzornim karakteristikama.
- Fizičko-hemijska karakterizacija dobijenog proizvoda.
- Utvrđivanje antioksidativnih i antimikrobnih svojstava dobijenog piva.
- Senzorna analiza dobijenog piva u okviru različitih grupa potrošača.
- *In vivo* i *in vitro* ispitivanja postignutih efekata analizom uticaja dobijenog proizvoda na kardiovaskularni sistem.

4. EKSPERIMENTALNI DEO

4.1. Materijal

Sve hemikalije upotrebljene u eksperimentalnom delu ove disertacije su bile analitičke čistoće i nabavljene od sledećih proizvođača: Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka), Lachnema (Nerastovice, Češka), J.T. Baker (New Jersey, USA), POCH (Gliwice, Poljska), Merck (Darmstadt, Nemačka), „Zorka“ (Šabac, Srbija) i Vrenje-špiritana d.o.o (Beograd, Srbija).

Suvo plodonosno telo gljive *Ganoderma lucidum* GL-I dobijeno je iz kolekcije za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Gljiva je izolovana u okolini Beograda, na lokalitetu Bojčinske šume. Plodonosna tela su proizvedena na supstratu od hrastove strugotine i pšeničnih mekinja u poluindustrijskim uslovima, a potom osušena.

Za proizvodnju eksperimentalnih piva korišćena je ohmeljena industrijska sladovina namenjena za proizvodnju svetlog lager piva dobijena od „BIP a.d u stečaju“, Beograd. Kvasac donjeg vrenja *Saccharomyces pastorianus* dobijen je iz kolekcije iste pivare. Nabavljeno je i bezalkoholno i komercijalno pivo tipa *pils* sa lokalnog tržišta.

Za potrebe mikrobioloških ispitivanja upotrebljene su sledeće kulture: *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 35150, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953, *Pediococcus cerevisiae* DSM 20289, *Megasphaera cerevisiae* DSM 20462, *Lactobacillus brevis* DSM 1268 i *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20763.

4.2. Metode

4.2.1. Analiza gljive *Ganoderma lucidum*

- Azotne materije i proteini: AOAC analička metoda „Total Nitrogen or Crude Protein - Method 990.03“;
- Pepeo: AOAC analička metoda „Ash Determination - Method 942.05“;
- Masti: AOAC analička metoda „Crude Fat - Method 920.39“;
- Ugljeni hidrati: AOAC analička metoda „Total Carbohydrates, by difference - BFM156“;

- Aktivnost vode (a_w): određena je na uređaju Novasina Thermoconstanter TH-2 (Novasina, Švajcarska);

4.2.2. Priprema ekstrakata gljive *Ganoderma lucidum*

4.2.2.1. Etanolni ekstrakti

Usitnjena suva plodonosna tela gljive korišćena su za dobijanje sirovih alkoholnih ekstrakata, a kao ekstrakciono sredstvo upotrebljen je 40% v/v i 70% v/v etanol. Primjenjena su dva načina dezintegracije gljive (sitno seckana i mlevena), kao i upotreba ultrazvučnih tretmana od 45kHz i 60kHz. Odnos gljive i ekstrakcionog sredstva je bio 1:4, i identičan kod dobijanja svih uzoraka. Ekstrakcija je trajala 21 dan na temperaturi od $21 \pm 2^\circ\text{C}$, dok su uzorci čuvani na tamnom mestu.

Procedure za proizvodnju ekstrakata su bile sledeće:

- G1 – sitno seckana gljiva, 70 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 45kHz u trajanju od 60 minuta.
- G2 – sitno seckana gljiva, 70 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 60kHz u trajanju od 60 minuta.
- G3 – mlevena gljiva, 70 % v/v etanol, bez primene ultrazvučnog tretmana.
- G4 – mlevena gljiva, 70 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 45kHz u trajanju od 60 minuta.
- G5 – mlevena gljiva, 70 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 60kHz u trajanju od 60 minuta.
- G6 – sitno seckana gljiva, 70 % v/v etanol, bez primene ultrazvučnog tretmana.
- G7 – sitno seckana gljiva, 40 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 45kHz u trajanju od 60 minuta.
- G8 – sitno seckana gljiva, 40 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 60kHz u trajanju od 60 minuta.
- G9 – mlevena gljiva, 40 % v/v etanol, bez primene ultrazvučnog tretmana.
- G10 – mlevena gljiva, 40 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 45kHz u trajanju od 60 minuta.

- G11 – mlevena gljiva, 40 % v/v etanol, ultrazvučni tretman 60kHz u trajanju od 60 minuta.
- G12 – sitno seckana gljiva, 40 % v/v etanol, bez primene ultrazvučnog tretmana.

4.2.2.1. Vodeni ekstrakti

Vodeni ekstrakti su dobijeni kuvanjem ($100\pm 2^{\circ}\text{C}$) mlevenog uzorka gljive u peridu od 120 minuta u poklopljenoj posudi . Količina ekstraktanta (vode) i gljive je bila 1:4.

Procedure za proizvodnju estrakata su bile sledeće:

- G13 – mlevena gljiva, voda, bez primene ultrazvučnog tretmana.
- G14 – mlevena gljiva, voda, ultrazvučni tretman 45kHz u trajanju od 60 minuta.
- G15 – mlevena gljiva, voda, ultrazvučni tretman 60kHz u trajanju od 60 minuta.
- G515 – mešavina uzoraka G5:G15=1:1.

4.2.3. Određivanje ukupnih fenola i antioksidativnog kapaciteta

Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja određivan je upotrebom metode po *Folin-Ciocalteu*-u, koja se zasniva na njihovoj reakciji sa jonima gvožđa (Fe^{3+}) u alkalnoj sredini, pri čemu nastaje crveno obojeni kompleks sa apsorpcionim maksimumom na talasnoj dužini od 600 nm. Koncentracija fenolnih jedinjenja je očitavana sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline a rezultati su izraženi u ekvivalentima galne kiseline (mg/l GAE) (Singleton and Rossi 1965).

Antioksidativni potencijal uzoraka određen je:

- primenom DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testa - rezultati su izraženi u milimolima *Trolox* ekvivalenata (KANEDA et al. 1988, Lee et al. 2005),

- primenom FRAP (Ferris reducing ability of plasma) testa - rezultati su izraženi u mili-molima *Trolox* ekvivalenata (Benzie and Strain 1996, KANEDA et al. 1988),
- primenom ABTS^{*+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) testa - rezultati su izraženi u mili-molima *Trolox* ekvivalenata (Re et al. 1999, KANEDA et al. 1988);

4.2.4. Određivanje sadržaja glukana

Sadržaj α -, β - i ukupnih glukana u ekstraktima određen je uz pomoć specifičnog enzimskog kita „Mushroom and Yeast β -glucan Assay“, K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Irska).

4.2.5. Određivanje antimikrobnih svojstava

Za određivanje antimikrobnih svojstava korišćene su ATTC i DSM kulture, navedene u materijalu. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) ekstrakata i piva korišćen je mikrodilucioni metod. Test mikroorganizmi koji su se nalazili u liofilizovanom stanju su pripremljeni u Miler-Hilton bujonu (MHB), tako da im koncentracija iznosi 10^5 CFU/ml. 50 μ l suspenzije kulture mikroorganizama definisane koncentracije je dodato u bunariće mikrotitarske ploče (Sarstedt, Germany). U svaki od bunarića je prethodno dodato 50 μ l serijski razblaženog ekstrakta u MHB. Koncentracije ekstrakata su iznosile od 0.0097 do 40 mg/ml. Pozitivna kontrola su bili bunarići sa 50 μ l MHB i bunarići sa suspenzijom mikroorganizama u MHB sa DMSO. Neposredno pred inkubaciju sadržaj mikrotitarskih ploča je promešan na šejkeru (1 min, 900 obr). Rezultati su očitani na Microplate čitaču (BioTek, ELx808, USA). Trifenil tetrazolijum hlorid, TTC (0.05%), je dodat u podlogu za inkubaciju da bi se ćelijska aktivnost učinila vidljivom. Ova boja koristi se za razlikovanje metabolički aktivnih ćelija od inaktivnih, tj. neživih ćelija. Žive ćelije poseduju enzime koji redukuju TTC, pri čemu ovaj indikator iz bezbojnog prelazi u crveno obojeno jedinjenje. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), definisana kao najniža koncentracija koja ispoljava potpunu inhibiciju rasta test-mikroorganizama, minimalna baktericidna koncentracija (MBC), koja predstavlja najnižu koncentraciju bez vidljivog porasta bakterija nakon

subkultivacije, su korišćene za izražavanje rezultata metode. MBC je određen na osnovu serije subkultiviranih uzoraka dobijenih dodavanjem 50 μ l uzorka iz svakog od bunarića u 50 μ l MHB nakon čega su inkubirani 24 h na 37°C, a kod kojih nije došlo do promene boje (Klaus et al. 2015).

4.2.6. Određivanje citotoksičnog efekta

Citotoksičnost je izvršena na kulturama iz kolekcije ćelijskih linija Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije. U ovom radu upotrebljene su: ćelije humanog melanoma (FemX), ćelije adenokarcinoma pluća (A549), ćelije humanog karcinoma grlića materice (HeLa) i transformisane epitelijalne humane somatske ćelije (EA.hy 926). 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 μ l/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 μ l/ml i L-glutationa (3 mM). Antiproliferativni potencijal ispitivanog kompleksa, utvrđen je kolorimetrijskim MTT testom (Supino 1995). Izvršena je konstrukcija kalibracione krive. Sa serijom razblaženja tako da broj ćelija/ml bude redom: 12500, 25000, 50000, 100000, 200000, 400000. U središnje bunarčice plastične ploče (eng. cell culture plate, NUNC) sa 96 bunarčića sa ravnim dnom, zasejano je 100 μ l pripremljenog razblaženja. U preostale bunarčice ploče sipana je samo hranljiva podloga po 100 μ 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 % CO₂. U jednu ploču je nakon 4 h sipano u svaki bunarčić po 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ 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 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru). Nakon 4 h inkubacije dodato je 100 μ 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). 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 bunarčice, pošto su se ćelija zalepile za dno suda, u bunarčice sa ćelijama, kao i u bunarčice samo sa podlogom (slepa proba), sipano je u triplikatu 50 μ l svakog razblaženja ispitivanog kompleksa. Razblaženja kompleksa u odgovarajućoj podlozi su formirana tako da finalne koncentracije kompleksa u bunarčicu ploče budu redom: 31.25; 62.5; 125; 250; 500 μ M (tako da procenat DMSO po bunarčicu ne bude veći od 1 %). Ćelije su zatim inkubirane sa ispitivanim agensima u inkubatoru sa 5 % CO₂ na 37 °C, tokom 48 h. Nakon inkubacije 20 μ l MTT rastvora (5 mg MTT/ml u fiziološkom rastvoru) je dodato u svaki bunarčić. Nakon 4 h dodato je 100 μ l rastvora 10 % SDS, a nakon 24 h očitana je absorbanca na 570 nm. Sa kalibracione krive su očitani rezultati i prikazani su u vidu IC₅₀ vrednosti, što predstavlja procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog ekstrakta i izražava se u μ g/ml. Što su vrednosti niže, to je citotoksični efekat određene supstance veći (Savić et al. 2014).

4.2.7. HPLC i LC-MS analiza

HPLC - Kvantifikacija fenolnih jedinjenja je obavljena tečnom hromatografijom visoke rezulucije (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) metodom sa primenom eksternih standarda. Kao standardi korišćena su sledeća jedinjenja: rutin, naringenin, hlorogenska kiselina, *trans*-cinaminska kiselina, kvercetin, *para*-kumarinska kiselina, kofeinska kiselina, *para*-hidroksibenzoeva kiselina, siringinska kiselina, vanilinska kiselina, resveratrol, kempferol, hesperetin, katehin, benzoeva kiselina i galna kiselina. Rastvori standarda pripremani su sa dimetilsulfoksidom (DMSO) u sledećim koncentracijama: 1; 2,5; 5; 10; 15 i 25 mg/L. Kalibracione krive svih standarda su imale visok stepen linearnosti ($r^2 > 0,99$). Svi uzorci i rastvori standarda su filtrirani kroz filter sa veličinama pora od 0,45 μ m pre direktnog injektovanja na kolonu. Uslovi hromatografisanja su bili sledeći: fenolna jedinjenja su određivana upotrebom tečnog hromatografa Agilent 1100 Series (USA) opremljenog sa UV/DAD detektorom, a razdvajanje jedinjenja je vršeno sa kolonom Poroshell 120 EC-C18 (4,6 \times 100 mm, 2,7

µm). Sistem rastvarača je imao konstantan protok od 1,0 ml/min. Mobilna faza je bila destilovana voda sa 0,1 % glacijalne sirćetne kiseline (rastvarač A) i acetonitril sa 0,1 % glacijalne sirćetne kiseline (rastvarač B). Korišćen je sledeći gradijent: 0-3,25 min, 8-10 % B; 3,25-8 min, 10-12% B; 8-15 min, 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. Injekciona zapremina je bila 5 µl a temperatura je održavana konstantnom na 25°C. Talasna dužina detekcije je birana na osnovu apsorpcionog maksimuma analiziranih fenolnih jedinjenja: 225 nm za vanilinsku i benzoevu kiselinu, 280 nm za galnu kiselinu, *para*-hidroksibenzoevu kiselinu, katehin, siringinsku kiselinu, *trans*-cinaminsku kiselinu, hesperetin i naringenin, 305 nm za *para*-kumarinsku kiselinu i resveratrol, 330 nm za hlorogensku i kofeinsku kiselinu i 360 nm za rutin, kvercetin i kemferol (Đorđević et al. 2016).

LC-MS analiza je izvršena na Agilent MSD TOF kuplovanog sa Agilent 1200 serije 168. Kolona koja se koristila je bila Zorbax Eclipse XDB-C18 (RR, 30×2.1 mm i.d., 1693.5 µm). Mobilna faza A je bila 0.2% mravlja kiselina u vodi, mobilna faza B je bio acetonitril. Injekciona zapremina je iznosila 5 µl, eluiranje je iznosilo 0.7 ml/min sa gradijentom (0–1.5 min 5% B, 1.5–10 min 5–95% B, 10–15 min 95% B, 15–16 min). Maseni spektar je dobijen korišćenjem Agilent ESI-MSD TOF. Radni parametri su bili: kapilarna voltaža 4000 V, fragmentacija 140 V, pritisak kod nebulajzer 45 psi, protok gasa za sušenje 12 l/min, temperatura gasa 350 °C, raspon masa (100-1500) m/z, negativni i pozitivni mod. Obrada podataka je urađena koristeći softver „Molecular Feature Extractor“ (Leskosek-Cukalovic et al. 2010).

4.2.8. FT-IR analiza

Analiza spektara ekstrakata i piva vršena je na infracrvenom spektrometru sa Furijeovom transformacijom (FT-IR) Shimadzu (Japan) tehnikom prigušene ukupne refleksije (ATR). Opseg analize spektara bio je 4000- 500 cm⁻¹, dok je rezolucija bila 4 cm⁻¹.

4.2.9. CIElab analiza

Boja je analizirana korišćenjem kolorimetra Chromometer model CR410 (Minolta, Ramsey, NJ) sa izvorom svetlosti D65. Rezultati su predstavljeni grafički (Pecić et al. 2016).

4.2.10. NMR analiza

Svi uzorci su analizirani pomoću NMR tehnike. ^1H NMR (200 MHz) spektri su snimljeni na 27°C na Varian Gemini 2000 spektrometru u DMSO-u. Hemijska pomeranja su data relativno u odnosu na TMS interni standard, na 200 MHz za protonski spektar (Leskosek-Cukalovic et al. 2010).

4.2.11. GC i GC-MS analiza

GC analiza. Metodom gasne hromatografije u uzorcima su kvantifikovana sledeća isparljiva jedinjenja: acetaldehid, izoamilacetat, etil-acetat, etil-propionat, n-propanol, izobutanol, amilalkoholi, dimetil sulfid, diacetil i 2,3-pentandion. Analiza je vršena sa gasnim hromatografom Perkin Elmer tip Clarus 500 sa uređajem za automatsko uzimanje uzoraka Turbomatrix 40. Razdvajanje jedinjenja je obavljano upotrebom dve kolone: Elite-5 i Elite-WAX (Perkin Elmer). Elite-5 (60×0,53 mm, 1,5 μm) je kapilarna nepolarna kolona sa stacionarnom fazom 5% difenil/95% dimetilpolisiloksan, a korišćena je za razdvajanje vicinalnih diketona. Elite-WAX (30×0,53 mm, 1,0 μm) je polarna kapilarna kolona kod koje je stacionarna faza polietilen glikol i veoma je pogodna za razdvajanje polarnih jedinjenja kao što su aminoalkoholi, alkoholi, karboksilne kiseline, amini, masne kiseline, estri, aromatična isparljiva jedinjenja itd. Gasni hromatograf je bio opremljen sa dva detektora: detektor sa zahvatom elektrona (ECD – *electron capture detector*) i plameno-jonizacioni detektor (FID – *flame ionization detector*). Vicinalni diketoni su detektovani sa ECD detektorom, pri čemu je noseći gas bio azot. Za detekciju ostalih ispitivanih jedinjenja korišćen je FID detektor a noseći gasovi su bili vodonik i kiseonik. Dobijeni hromatogrami su analizirani pomoću softvera *Total Chrome*. Kao interni standardi korišćeni su 2,3-heksandion, n-butanol i n-heksan. Uzorci za hromatografisanje su

pripremani na sledeći način: u 250 ml hladnog piva (ne sme da peni) dodavani su interni standardi i to 2 ml 2,3-heksandiona i 2 ml smeše n-butanola i n-heksana. Od ovako dobijenog rastvora 5 ml je uzeto za analizu i prebačeno u specijalnu posudu za uzorke koja je zatim smeštena u uređaj za automatsko uzimanje uzoraka. U ovom uređaju uzorci su temperirani na temperaturi od 40°C u trajanju od 20 minuta, nakon čega je gasna faza iznad uzorka nosećim gasom injektovana na kolone .

GC-MS analiza. Uzorci su analizirani na aparatu Agilent 7890A sa MS-detektorom Agilent 5975C. Ubrizgavano je po 1 µl svake probe (split 25:1). Korišćena je kolona Agilent 19091N- 30 m x 320 µm x 0.25 µm 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 temperature kolone je iznosila 40°C, a zatim rasla 3°C/min do 230°C. Kao detektori su korišćeni istovremeno FID i MSD (Leskosek-Cukalovic et al. 2010).

4.2.12. Postupci dobijanja piva sa *Ganoderma lucidum*

4.2.12.1. PIVO obogaćeno gljivom *Ganoderma lucidum* dodatom u ohmeljenu sladovinu

Prvi deo ekperimentalnih piva dobijen je korišćenjem industrijski ohmeljene sladovine i *Ganoderma lucidum* u obliku etanolnog ekstrakta (G5), suvog plodonosnog tela gljive i njihovom kombinacijom. Sva piva su dobijena sa istim sojem kvasca *Saccharomyces pastorianus*, ohmeljena hladovina je bila iz Beogradske industrije piva, temperatura primarne fermentacije je iznosila 10±2°C, temperatura sekundatna fermentacija je iznosila 1±2°C. Primarna fermentacija je trajala pet dana, dok je sekundarna fermentacija trajala 14 dana.

Procedure za proizvodnju piva su bile sledeće:

- SF – bez dodate *G.lucidum*,
- PF1 – 3,0 g/l gljive na primarnoj fermentaciji,
- PF2 – 6,0 g/l gljive na primarnoj fermentaciji,
- PF3 – 1,5 g/l ekstrakta gljive na primarnoj fermentaciji,
- PF4 – 3,0 g/l ekstrakta gljive na primarnoj fermentaciji,

- PF5 – 3,0 g/l gljive na primarnoj fermentaciji i 1,5 g/l ekstrakta gljive na sekundarnoj fermentaciji;

4.2.12.2. Dobijanje piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* dodatom u gotov proizvod

Kao poseban način dobijanja piva ispitana je mogućnost dodavanja dobijenog ekstrakta (G5) u komercijalno pivo tipa *pils* i bezalkoholno pivo nabavljeno sa lokalnog tržišta. Pivo je rashlađeno na temperaturu od $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, otvoreno i u aseptičnim uslovima dodat ekstrakt gljive. Nakon toga, pivo je zatvoreno i ostavljeno na odležavanje 24h na temperaturi od $4\pm 2^{\circ}\text{C}$. Procedure za proizvodnju piva su bile sledeće:

- SP – bez dodatog ekstrakta,
- PG1 – 0,5 ml/l ekstrakta gljive,
- PG2 – 1,0 ml/l ekstrakta gljive,
- PG3 – 1,5 ml/l ekstrakta gljive,
- PG4 – 3,0 ml/l ekstrakta gljive,
- PG5 – 4,5 ml/l ekstrakta gljive;

4.2.13. Analiza osnovnih parametara kvaliteta sladovine i piva

Analiza osnovnih parametara kvaliteta izvršena je koristeći EBC i MEBAK analitiku (Analytica 2008, MEBAK 2011) upotrebom *Alcolyzer Beer ME Analyzing System*, *Carbo QC* i *AMVn* (Anton Paar GmbH - AUSTRIA). Pregled metoda:

- °P (ekstrakt u osnovnoj sladovini) – EBC 8.1; EBC 8.3; MEBAK 2.1,
- Er (pravi ekstrakt) – EBC 8.3,
- Ea (prividni ekstrakt) – EBC 8.3,
- RDF (pravi stepen fermentacije) – EBC 9.2.6; EBC 9.4, EBC 9.5; MEBAK 2.9; 2.9.1; 2.9.3; 2.9.6.1-3,
- ADF (prividni stepen fermentacije) – EBC 9.2.6; EBC 9.4, EBC 9.5; MEBAK 2.9; 2.9.1; 2.9.3; 2.9.6.1-3,
- Alkohol – EBC 9.2.6; EBC 9.4, EBC 9.5; MEBAK 2.9; 2.9.1; 2.9.3; 2.9.6.1-3,

- pH – EBC 9.35,
- Boja – EBC 9,6; MEBAK 2.12,
- Gorčina – MEBAK 2.17,
- Viskozitet – EBC 8.4; EBC 9,38,
- α – glukan – EBC 9.31.1, „Mushroom and Yeast β -glucan Assay", K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Irska),
- β – glukan – EBC 9.31.1, „Mushroom and Yeast β -glucan Assay", K-YBGL 09/2009 (Megazyme Int., Wicklow, Irska),
- CO₂ – EBC 9.28.5,
- Vazduh u boci – EBC 9.28.5,
- Kalorije - MEBAK 2.10;

4.2.14. Određivanje koncentracije kvasca pomoću *Thoma* komore za brojanje

Pre određivanja uzorci su mešanjem dobro homogenizovani. Odmah posle homogenizovanja, 1 ml suspenzije je pipetom nanet na komoru za brojanje, koja je zatim prekrivena staklenom pokrovnicom. Mikroskopiranje je vršeno pri uvećanju od 400 puta, da bi se u vidnom polju mogao posmatrati jedan veliki kvadrat. Brojane su ćelije u 10 velikih kvadrata. Uzorci kod kojih je koncentracija kvasca bila suviše velika, pre određivanja su razblaživani fiziološkim rastvorom.

4.2.15. Određivanje kvaliteta pene

Za određivanje parametara postojanosti i kvaliteta pene urađene su dve metode:

NIBEM test stabilnosti – MEBAK 2.18.2. Ovom metodom se meri vreme u kome se površina pene snižava za 10, 20 i 30 mm. Nivo pene piva se meri sistemom pokretnih elektroda, koje reaguju na elektroprovodljivost pene. Dugačka, centralno postavljena igla se nalazi u peni. Kada jedna od četiri spoljne igle dodirne penu, zaustavlja se kretanje elektroda prema dole, sve dok se ne prekine kontakt usled opadanja pene. Štoperica se uključuje kada se nivo pene nalazi 10 mm ispod ivice čaše. Sve do dostizanja narednog nivoa na 30 mm.

NIBEM Cling metar – MEBAK 2.18.5 Nakon završene metode za test stabilnosti, čaša se stavlja u NIBEM Cling metar i meri površina čaše koja je prekrivena penom. Rezultat se daje u %.

4.2.16. Senzorna analiza piva

Senzorna analiza uzoraka obavljena je od strane potrošača (laika) i obučениh ocenjivača.

Test prihvatljivosti je sproveden na 105 netreniranih subjekata, od kojih 74 muškog i 31 ženskog pola. Potrošačima su prethodno dati anketni listići na kojima su se izjasnili o količini alkoholnih pića koja konzumiraju na nedeljnom nivou i o statusu u pogledu konzumiranja cigareta. Njihov starosni profil je bio od 20 do 25 godina. Potrošači nisu imali nikakvu formalnu obuku ili iskustvo u ocenjivanju piva. Senzorno ocenjivanje je sprovedeno u skladu sa preporukama Analytica EBC i MEBAK (EBC 13-13.3; MEBAK 1-1.8; MEBAK 4.5.2.1). Uzorci su prezentovani u plastičnim čašama sa poklopcima, na $8\pm 1^{\circ}\text{C}$, i ocenjeni sistemom bodovanja od 1 do 5 (1-najniža ocena, 5-najviša ocena). Testirani su aroma, ukus, punoća, gorčina, svežina, opšti utisak i dopadljivost. Rezultati su statistički obrađeni i predstavljeni putem pokazatelja deskriptivne statistike i grafički u vidu radar dijagrama („paukova mreža“), nakon čega je urađena analiza korelacije, t-test, diskriminaciona analiza, Levanov test, t-test za nezavisne i zavisne uzorke i Vilkinsonov test parova.

Deskriptivna senzorna analiza je sprovedena sa pet obučениh ocenjivača kako bi se dobio šematski opis senzornih karakteriska piva. Utvrđena su atributivna obeležija piva, i definisana je skala intenziteta traženih atributa. Skala se određuje tako što se pruža kompromis između najjasnijih razlika između intenziteta i najlakše obrade dobijenih rezultata. Ocenjivači prilikom ocenjivanja obeležavaju na skali, koji intenzitet, po njima, ima traženi deskriptor. Od pedeset mogućih atributivnih obeležija odabrani je petnaest i to: slatko, slano, gorko, naknadna gorčina, kiselo, sladni ukus, hmeljni, cvetni, voćni, med, reskost, punoća, trpkost i pečen. Intenzitet svakog pojedinačnog atributa je dat u rasponu od 1 do 9, pri čemu je 1 predstavlja odsustvo, a 9 visoki intenzitet

pojedinačnog obeležija. Sva piva su prezentovana u čaše od 80ml sa 20ml piva u njima. Temperatura serviranja piva je bila $8\pm 1^{\circ}\text{C}$. Između uzoraka, ocenjivači su koristili vodu kako bi isprali nepca. Eksperimentalni dizajn je bio zasnovan na latiskom kvadratu. Analiza podataka je vršena tako što se za svaki od atributa računa srednja vrednost i rezultati se upisuju u formi tabele ili u formi radar dijagrama ili tzv. „paukove mreže“. Korišćene metode su EBC 13.10; 13.12; 13.13; i MEBAK 1.6; 2.1-2.4; 3.2.1-2.

4.2.17. *In vivo* ispitivanja

4.2.17.1. *In vivo* ispitivanja na pacovima

U farmakološkom *in vivo* ispitivanju korišćeni su laboratorijski pacovi ženskog pola *Wistar* soja. Sva ispitivanja su bila obavljena u skladu sa zahtevima Etičkog komiteta za životinje Medicinskog fakulteta u Beogradu. Osnovni cilj ovog eksperimenta bilo je utvrđivanje dejstva dobijenih piva proizvedenog sa dodatkom *Ganoderma lucidum* na kardiovaskularne funkcije pacova i poređenje dejstva sa kontrolnim pivom, vodom i alkoholom. Kao slepa proba korišćena je voda i 5 % v/v etanol. Uzorak (7,125 ml/kg pacova uzorka, kontrolnog piva, vode ili 5 % v/v etanola) je peroralnim putem, upotrebom nazogastrične sonde, unet u želudac pacova, nakon čega je vršen kontinualni monitoring krvnog pritiska, srčane frekvence i EKG u trajanju od dva časa. Zapremina unetog uzorka je određena na bazi preporučene dnevne doze piva (pivo sa 5 % v/v alkohola) od 500 ml, računajući da je prosečna masa čoveka 70 kilograma. Rezultati su prikazani u vidu grafika.

4.2.17.1. *In vivo* ispitivanja na ljudima

Farmakološka *in vivo* ispitivanja su sprovedena nad 18 muškaraca, starosne dobi od 26 ± 1 godina, indeks telesnih masti je iznosio $24,5\pm 0,5$ kg/m². Svi su bili dobrog opšteg zdravlja, bez simptoma ili istorije srčanih oboljenja, hipertenzije ili dijabetesa, sa normalnom kliničkom slikom, i bez problema zavisnosti. Sva ispitivanja su bila obavljena u skladu sa zahtevima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu, dok je svaki pojedinac dobrovoljno potpisao pristanak o učešću. Ispitanicima su prethodno dati anketni listići na kojima su se izjasnili o količini alkoholnih pića koja

konzumiraju na nedeljnom nivou i o statusu u pogledu konzumiranja cigareta. Protokol: Ispitanici su imali dve sesije u razmaku od mesec dana. Na prvoj sesiji konzumirali su 500 ml piva sa *G.lucidum* a na drugoj kontrolni napitak koji se sastojao od etanola (96% v/v) i vode u identičnom odnosu kao pivo sa *G.lucidum*. Ispitanici su zamoljeni u oba slučaja da ne doručkuju, ne piju kafu, čaj i slična stimulaturna pića izuzev vode. Obe sesije su bile izvršene u 11:00 časova pre podne. Vreme konzumiranja pića je iznosilo do pet minuta. U oba slučaja EKG je beležen u ležećem položaju: 20 minuta pre (u relaksaciji) i 60 minuta neposredno posle uzimanja pića. Iz digitalizovanog zapisa EKG-a izdvojeni su nizovi RR i QT intervala. Iz oba niza su izračunali kratko-dometni (α_1) i dugo-dometni skalirajući eksponent (α_2), kao i entropiju uzorka (SampEn). Iz nizova RR intervala određene su spektralne komponente niskih i visokih frekventnih opsega (LF i HF), a iz nizova QT intervala varijabilnost QT intervala (QTV). Krvni pritisak je meren svakih 10 minuta (Platiša et al. 2014, Platiša et al. 2016).

4.2.17. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podaci su statistički obrađeni u Statistica programu verzija 12 (Statistica, Tulsa, OK, SAD), SPSS programu, verzija 20 (SPSS Inc, Chicago, IL, SAD) i Biplot excel makrou (Ilya A. Lipkovich, Eric P. Smith, 2002). Pojedini parametre su izračunati deskriptivni statistički pokazatelji: srednja vrednost, standardna devijacija, standardna greška, minimalna i maksimalna vrednost, dok su ostali izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija. Za ispitivanje odnosa ekstrakata i parametara kvaliteta, korišćena je analiza glavnih komponenti a njihov odnos je vizualizovan pomoću biplota i klastergrama. Bi plot je korišćen i za vizualizaciju odnosa ekstrakata i fenolnih komponenti, antioksidativnog potencijala i glukana. Kod senzorne ocene urađena je korelaciona analiza, χ^2 -test, deskriptivna analiza, Levanov test, *t*-test za nezavisne i zavisne uzorke i Vilkinsonov test ekvivalentnih parova. Jednofaktorska ANOVA je korišćena za ispitivanje uticaja alkohola, piva i piva sa ekstraktom na krvni pritisak i srčanu frekvencu pacova, u svakom vremenskom trenutku u kome su ovi parametri registrovani. Za naknadna poređenja korišćen je Dankanov test. Ispitivanje značajnosti razlika srednjih vrednosti sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska, kao i srčane frekvence, za etanol i pivo, korišćen je *t*-test za zavisne uzorke. U skoro svim testovima je korišćen nivo značajnosti 0,05.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Hemijski sastav gljive *Ganoderma lucidum*

Hemijski sastav gljiva u okviru iste vrste jednog roda može se značajno razlikovati. Gljive mogu da sintetišu biološki aktivne komponente sa sličnom strukturom, ali podneblje i dostupni nutrijenti u velikoj meri određuju količinu i odnos ovih komponenti. U tabeli 5.1 prikazani su rezultati analize osnovnog sastava gljive koja je upotrebljena za dobijanje piva i različitih ekstrakata.

Tabela 5.1. Osnovni hemijski sastav gljive *Ganoderma lucidum*

	Srednja vrednost	Varijansa	Standardna devijacija	Koeficijent varijanse	Standard na greška
Azotne materije (g/100g)	1,74	0,001	0,035	2,014	0,020
Proteini (g/100g)	10,90	0,048	0,219	2,012	0,127
Masti (g/100g)	2,68	0,050	0,223	8,311	0,129
Ugljeni hidrati (g/100g)	82,62	1,342	1,159	1,402	0,669
Pepeo (%)	2,93	0,000	0,012	0,394	0,007
a _w	0,34	0,000	0,015	4,537	0,009

Ugljeni hidrati predstavljaju dominantnu grupu jedinjenja u plodonosnom telu gljive, a za njima slede proteini i ostale komponente. Upoređivanjem dobijenih podataka sa podacima Mau i saradnika, zapaža se da su količine polisaharidnih materija bile približno iste (82,62–85,13%). Kako bi se dobile bioaktivne komponente od interesa (polisaharida, triterpena, fenola, nukleotida) izvršena je ekstrakcija plodonosnog tela i spora gljive, uz primenu različitih tretmana i ekstraktanata.

5.2. Analiza ekstrakta *Ganoderma lucidum*

Pripremljeno je 15 različitih ekstrakata *G. lucidum*, pri čemu su korišćene različite metode i različita ekstrakciona sredstva. U tabeli 5.2 je dat prikaz pripremljenih ekstrakata.

Tabela 5.2. Način ekstrakcije gljive i primenjeni uslovi

	Dezintegracija		Ekstraktant		Voda	Ultrazvučni tretman		Termički tretman (100°C/2h)
	Sitno seckana	Mlevena	Etanol (%)			45 kHz	60 kHz	
			40	70				
G1	+	-	-	+	-	+	-	-
G2	+	-	-	+	-	-	+	-
G3	+	-	-	+	-	-	-	-
G4	-	+	-	+	-	+	-	-
G5	-	+	-	+	-	-	+	-
G6	-	+	-	+	-	-	-	-
G7	+	-	+	-	-	+	-	-
G8	+	-	+	-	-	-	+	-
G9	+	-	+	-	-	-	-	-
G10	-	+	+	-	-	+	-	-
G11	-	+	+	-	-	-	+	-
G12	-	+	+	-	-	-	-	-
G13	-	+	-	-	+	-	-	+
G14	-	+	-	-	+	+	-	+
G15	-	+	-	-	+	-	+	+

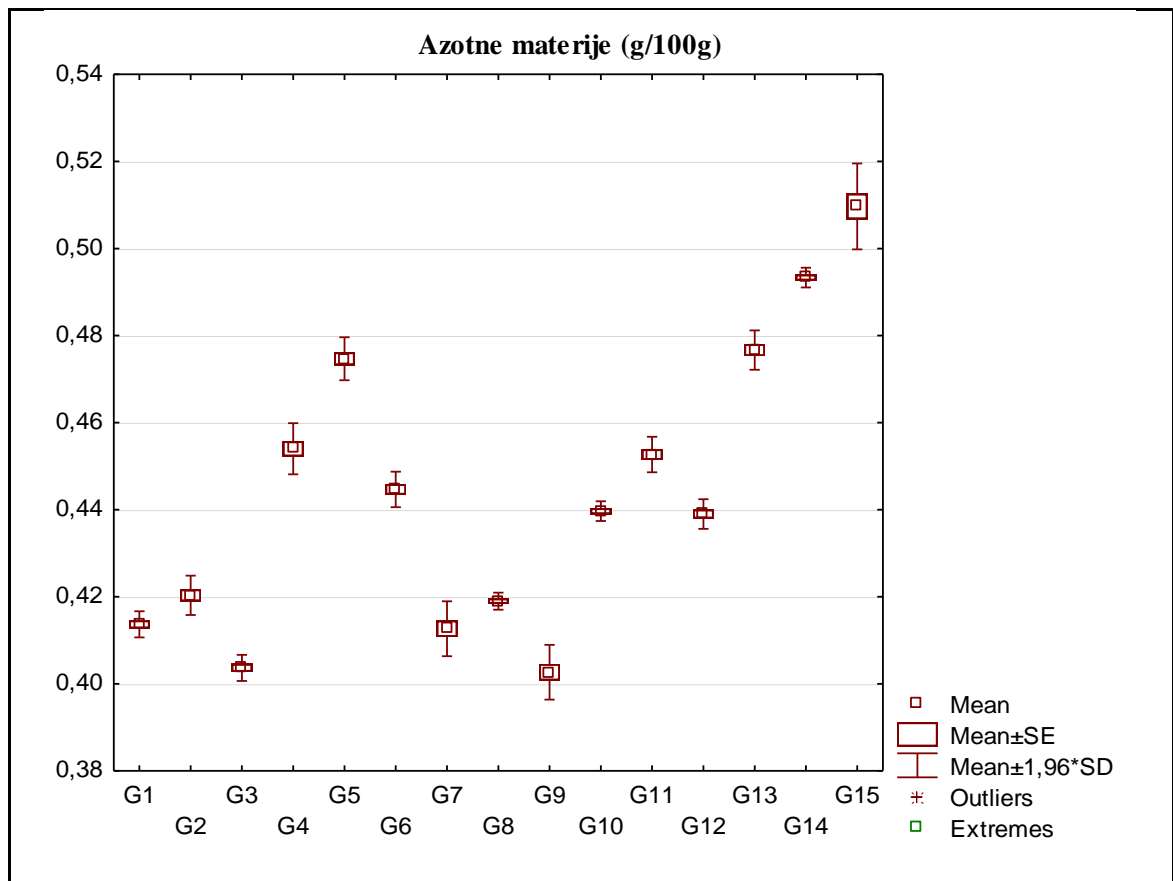
5.2.1. Uticaj načina ekstrakcije na količinu azotnih materija

Sadržaj azotnih materija u ekstraktima je kvantifikovan i rezultati su dati u tabeli 5.3. Primećuje se da je količina azotnih materija u ekstraktima bila slična i kretala se od 0,403 do 0,510g/100g. Upoređivanjem dobijenih vrednosti sa vrednostima za plodonosno telo gljive (1,74g/100g), zapaženo je da je u ekstrakt prešla oko jedna trećina azotnih materija prisutnih u gljivi.

Tabela 5.3. Količina azotnih materija dobijenih ekstrakata (g/100g)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	0,414	0,002	0,001
G2	0,420	0,002	0,001
G3	0,404	0,002	0,001
G4	0,454	0,003	0,002
G5	0,475	0,003	0,001
G6	0,445	0,002	0,001
G7	0,413	0,003	0,002
G8	0,419	0,001	0,001
G9	0,403	0,003	0,002
G10	0,440	0,001	0,001
G11	0,453	0,002	0,001
G12	0,439	0,002	0,001
G13	0,477	0,002	0,001
G14	0,493	0,001	0,001
G15	0,510	0,005	0,003

Dobijeni podaci su predstavljeni u vidu *boks-plota* (slika 5.1). Najveći sadržaj azotnih materija (AM) se nalazio u vodenom ekstraktu (G15), koji je rezultat termičkog i ultrazvučnog tretmana (60 kHz), dok je u uzorcima G3 i G9 dobijenih sa 40% v/v odnosno 70% v/v etanola, kako je očekivano, zabeležen najniži sadržaj. Iz prikazanih rezultata evidentno je da je količina AM najviši kod ekstrakata dobijenih vodenom ekstrakcijom (G14, G15), kao i da je tretman ultrazvukom (UZ) od 60 kHz imao najveći učinak. Najniže vrednosti su dobijene kod ekstrakcije 40% v/v etanolom, dok je uticaj dezintegracije značajno uticao na količinu AM.



Slika 5.1. Boks-plot azotnih materija ekstrakata

Na osnovu Takijevog testa, uočava se statistički značajna razlika između primenjenih načina ekstrakcije na količinu AM, izuzev u nekoliko slučajeva (Tabela 5.4). Zapravo su ekstrakti G1 i G2, kao i G7 i G8 u velikoj meri slični, što znači da koncentracija upotrebljenog etanola nije imala efekat prilikom ekstrakcije, kao i da razlike ne postoje ni pri upotrebi različitih UZ tretmana u slučaju seckane gljive. Kod uzoraka G3 i G9 takođe ne postoje razlike, što potvrđuje prethodnu konstataciju da koncentracija upotrebljenog etanola nema efekata kod sitno seckane gljive. Statistički značajna neslaganja ne postoje ni među uzorcima G4 i G11, kao ni među uzorcima G6 i G10, G12. Iz ovoga se zaključuje da kod navedenih ekstrakata koncentracija etanola i UZ tretman nije imala efekata. Ukoliko se isti postupak vrši vodom i termičkim tretmanom (TT), može se očekivati da se dobiju iste količine AM kao i primenom 70% v/v etanola i UZ tretmanom od 60 kHz (G5 i G13).

Tabela 5.4. Takijev test za količinu azotnih materija u ekstraktima*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2		0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3			0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4				0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G5					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
G6						0,00	0,00	0,00	0,49	0,03	0,30	0,00	0,00	0,00
G7							0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G8								0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G9									0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G10										0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
G11											0,00	0,00	0,00	0,00
G12												0,00	0,00	0,00
G13													0,00	0,00
G14														0,00

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

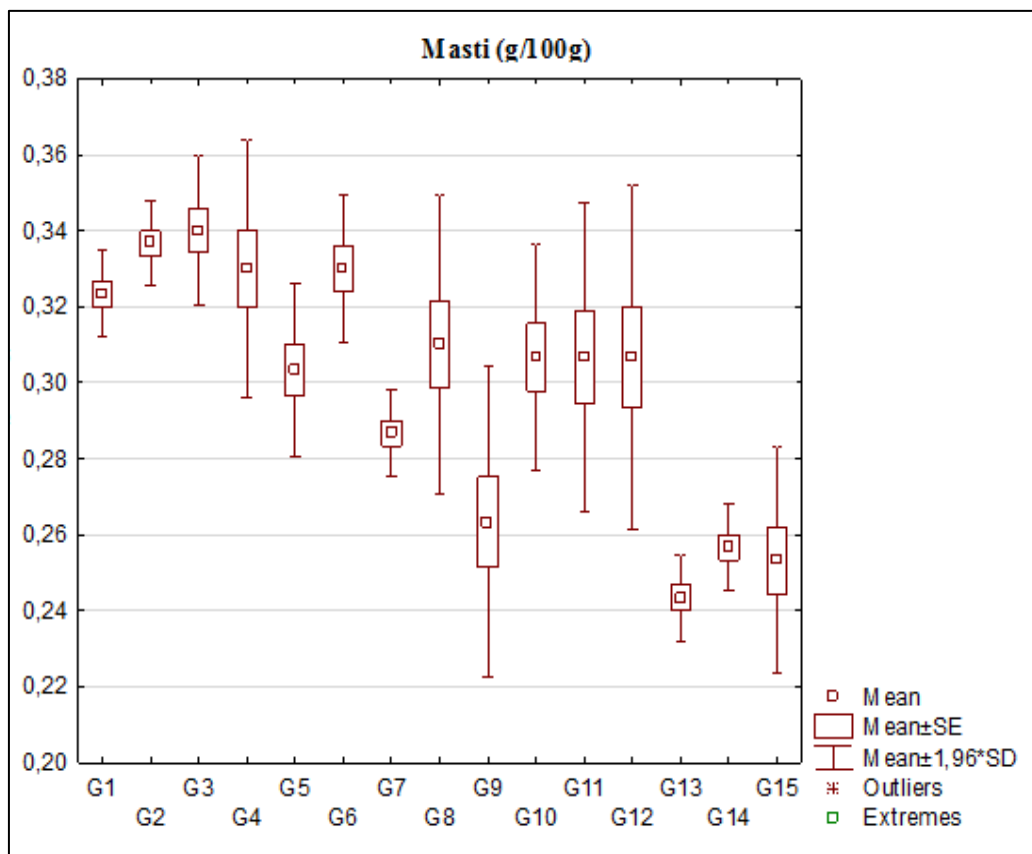
5.2.2. Uticaj načina ekstrakcije na količinu masti

Sadržaj masti u ekstraktima je prikazan u tabeli 5.5. Kao što je i očekivano, količina masti u dobijenim ekstraktima je bila relativno mala. Njen sadržaj se kretao od 0,243 do 0,340 g/100g ekstrakta.

Tabela 5.5. Količina masti u ekstraktima (g/100g)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	0,323	0,006	0,003
G2	0,337	0,006	0,003
G3	0,340	0,010	0,006
G4	0,330	0,017	0,010
G5	0,303	0,012	0,007
G6	0,330	0,010	0,006
G7	0,287	0,006	0,003
G8	0,310	0,020	0,012
G9	0,263	0,021	0,012
G10	0,307	0,015	0,009
G11	0,307	0,021	0,012
G12	0,307	0,023	0,013
G13	0,243	0,006	0,003
G14	0,257	0,006	0,003
G15	0,253	0,015	0,009

Kao što se može zapaziti na slici 5.2, sadržaj masti u dobijenim ekstraktima bio je sličan. Jedino grupisanje može se zapaziti kod uzoraka dobijenih vodenom ekstrakcijom, u kojima je sadržaj masti bio relativno niži u odnosu na ostale, što se može objasniti većom ekstrakcionom moći alkohola.



Slika 5.2. Boks-plot sadržaja masti u ekstraktima

U tabeli 5.6. su prikazani rezultati Takijevog testa. Uočeno je da su uzorci G1, G2, G3, G4, G5, G6 i G8 slični, što znači da primenjena variranja nisu imala efekta na količinu masti u ekstraktima. Najveće razlike se uočene kod uzoraka kod kojih je ekstrakcija izvršena vodom i 40% v/v etanolom pri čemu je sadržaj masti bio manji u odnosu na ostale uzorke.

Tabela 5.6. Takijev test za količinu masti u ekstraktima*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	1,00	0,98	1,00	0,91	1,00	0,16	1,00	0,00	0,98	0,98	0,98	0,00	0,00	0,00
G2		1,00	1,00	0,27	1,00	0,01	0,61	0,00	0,43	0,43	0,43	0,00	0,00	0,00
G3			1,00	0,16	1,00	0,01	0,43	0,00	0,27	0,27	0,27	0,00	0,00	0,00
G4				0,61	1,00	0,05	0,91	0,00	0,78	0,78	0,78	0,00	0,00	0,00
G5					0,61	0,98	1,00	0,09	1,00	1,00	1,00	0,00	0,02	0,01
G6						0,05	0,91	0,00	0,78	0,78	0,78	0,00	0,00	0,00
G7							0,78	0,78	0,91	0,91	0,91	0,05	0,43	0,27
G8								0,02	1,00	1,00	1,00	0,00	0,01	0,00
G9									0,05	0,05	0,05	0,91	1,00	1,00
G10										1,00	1,00	0,00	0,01	0,01
G11											1,00	0,00	0,01	0,01
G12												0,00	0,01	0,01
G13													1,00	1,00
G14														1,00

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

5.2.3. Uticaj načina ekstrakcije na količinu ugljenih hidrata

Ugljeni hidrati predstavljaju najdominantniju grupu jedinjenja *G. lucidum*. Među njima je najviše polisaharida, sastavljenih od dugih lanaca monosaharida (povezanih glikozidnim vezama), koji predstavljaju komponente od značaja. Te karakteristike ogledaju se upravo u njihovim bioaktivnim svojstvima, jer i mala promena u hemijskoj strukturi i sastavu može dati polisaharide sa sasvim drugačijim osobinama (Nie and Xie 2011).

U tabeli 5.7 prikazani su rezultati ispitivanja sadržaja ugljenih hidrata (UH) u ekstraktima, među kojima se kao najniži izdvojio onaj u etanolnim ekstraktima, sa 32,77 do 36,88 g/100g, dok je u vodenim ekstraktima dobijena vrednost od 63,70 g/100g. Na slici 5.3 prikazan je *boks-plot* ugljenih hidrata u ekstraktima, gde zapažamo da su uzorci G13, G14 i G15 imali najveći sadržaj UH. Kod ostalih, sadržaj UH bio je približno sličan.

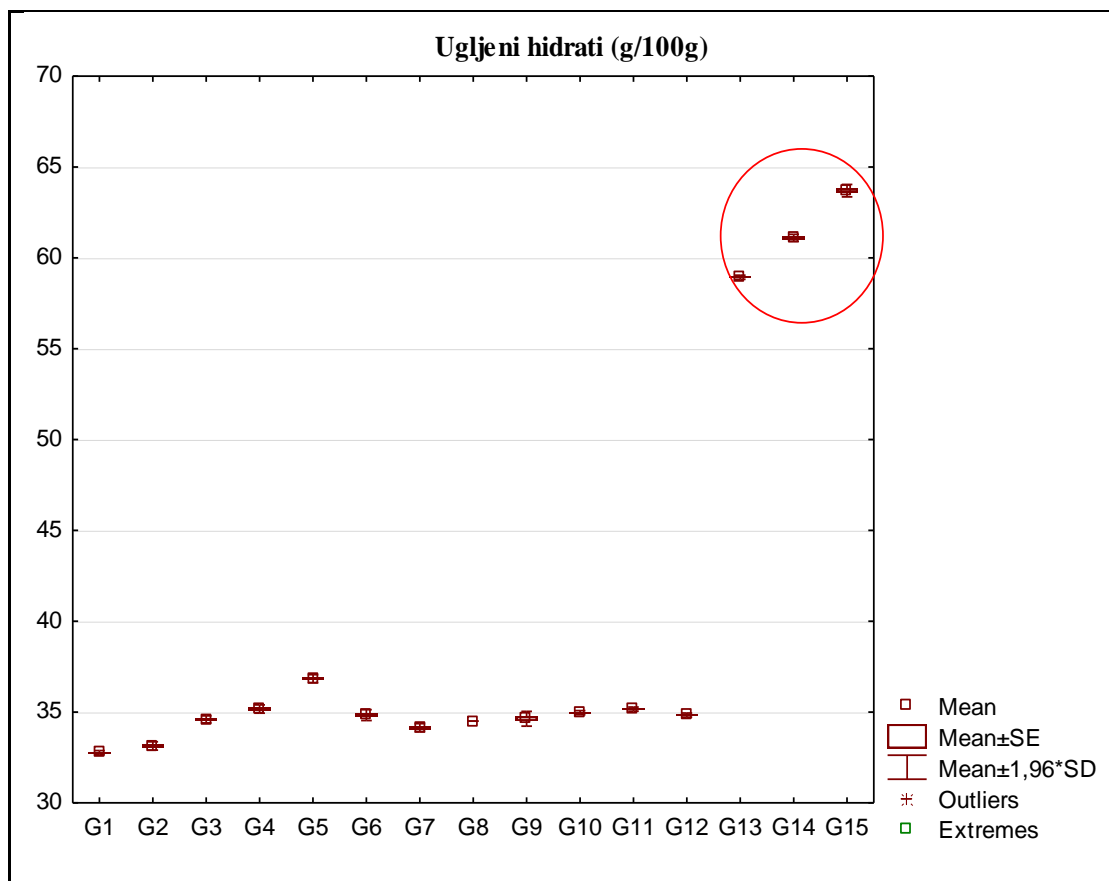
Tabela 5.7. Količina ugljenih hidrata u ekstraktima (g/100g)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	32,77	0,06	0,033
G2	33,13	0,12	0,067
G3	34,60	0,10	0,058
G4	35,17	0,12	0,067
G5	36,83	0,12	0,067
G6	34,83	0,15	0,088
G7	34,13	0,12	0,067
G8	34,50	0,00	0,000
G9	34,63	0,21	0,120
G10	34,97	0,06	0,033
G11	35,17	0,06	0,033
G12	34,83	0,06	0,033
G13	58,93	0,06	0,033
G14	61,10	0,10	0,058
G15	63,70	0,17	0,100

Daljom statističkom analizom, primenom Takijevog testa, mogu se uočiti razlike između pojedinačnih uzoraka (tabela 5.8). Ukoliko posmatramo ekstrakte dobijene od sitno seckane ganoderme i 70% v/v etanola, zapažamo da postoji statistički značajna

razlika među uzorcima G1, G2 i G3, što znači da je tretman UZ imao pozitivan efekat na sadržaj UH. Kod ekstrakata dobijenih sa istim ekstrakcionim sredstvom (70% v/v etanol), primećuje se da su uzorci G4 i G6 gotovo isti, što znači da UZ tretman od 40 kHz nije imao značajnog efekta na promenu sadržaja UH u datim uslovima. Na osnovu poređenja uzoraka G1, G2 i G3 sa uzorcima G7, G8 i G9, može se zaključiti da koncentracija etanola nema značajnog efekta pri ekstrakciji UH, sem u slučaju primene UZ tretmana od 60 kHz.

Kod uzoraka koji su bili mleveni ne primećuju se značajne razlike, izuzev u primeru korišćenja 70% v/v etanola i UZ tretmana od 60 kHz, kada su dobijene veće količine UH. Kao najpogodniji tretman za dobijanje veće količine UH pokazao se termički tretman vodom u trajanju od 2h, uz UZ tretman od 60 kHz. Kao što se i očekivalo, dezintegracijom se značajno povećao sadržaj UH u skoro svim uzorcima.



Slika 5.3. *Boks-plot* ugljenih hidrata ekstrakata

Tabela 5.8. Takijev test za količinu ugljenih hidrata u ekstraktima*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3			0,00	0,00	0,43	0,00	1,00	1,00	0,02	0,00	0,43	0,00	0,00	0,00
G4				0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,67	1,00	0,05	0,00	0,00	0,00
G5					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G6						0,00	0,05	0,67	0,97	0,05	1,00	0,00	0,00	0,00
G7							0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G8								0,97	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
G9									0,05	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00
G10										0,67	0,97	0,00	0,00	0,00
G11											0,05	0,00	0,00	0,00
G12												0,00	0,00	0,00
G13													0,00	0,00
G14														0,00

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

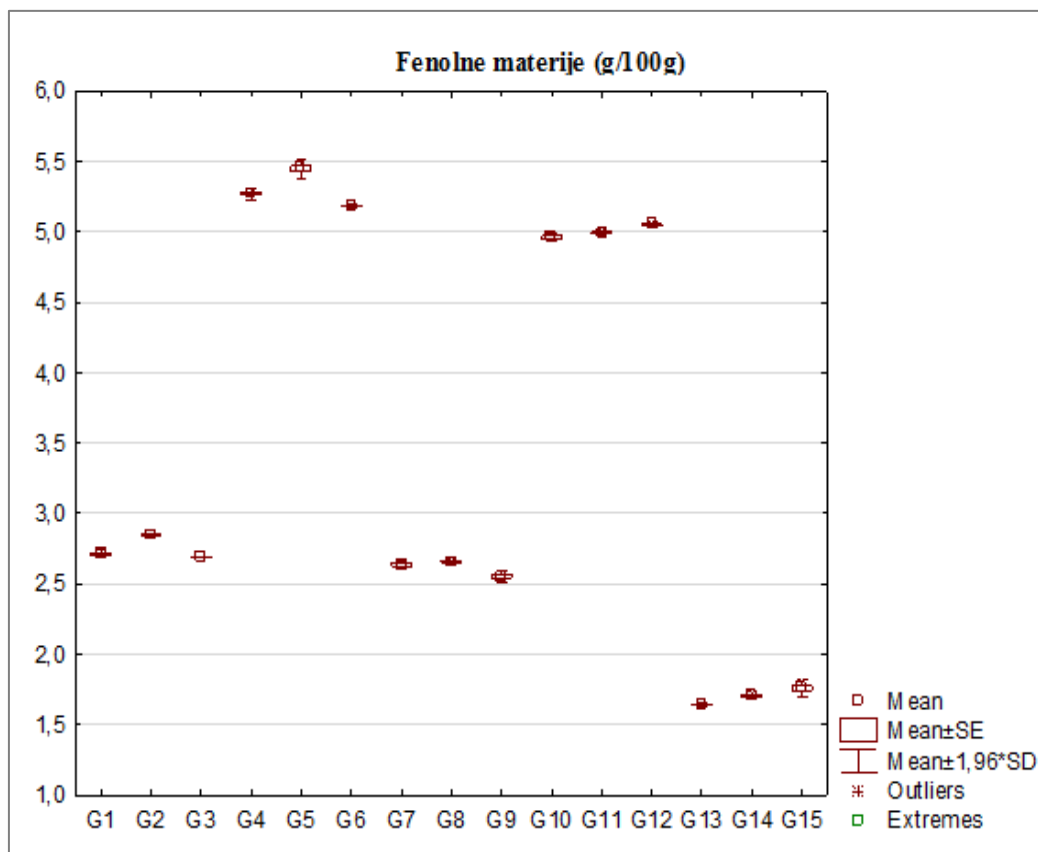
5.2.4. Uticaj načina ekstrakcije na količinu fenolnih materija

Polifenoli *G. lucidum* predstavljaju drugu najvažniju grupu jedinjenja sa bioaktivnim svojstvima. Njihova količina je utvrđena i prikazana u tabeli 5.9. Kao što se očekivalo, sadržaj fenolnih materija je bio najniži u uzorcima dobijenim vodenom ekstrakcijom (1,64–1,76g/100g), dok se u ekstraktima koji su rezultat alkoholne ekstrakcije njihov sadržaj kretao od 2,71 do 5,45 g/100g.

Tabela 5.9. Količina fenolnih materija u ekstraktima (g/100g)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	2,71	0,015	0,009
G2	2,85	0,006	0,003
G3	2,69	0,000	0,000
G4	5,27	0,021	0,012
G5	5,45	0,035	0,020
G6	5,18	0,006	0,003
G7	2,64	0,015	0,009
G8	2,66	0,010	0,006
G9	2,56	0,021	0,012
G10	4,96	0,015	0,009
G11	5,00	0,012	0,007
G12	5,05	0,012	0,007
G13	1,64	0,006	0,003
G14	1,71	0,015	0,009
G15	1,76	0,030	0,017

Na slici 5.4 prikazan je sadržaj fenolnih materija u obliku *boks-plota*. Jasno se uočava pet grupa ekstrakata. Prvu (G1,G2 i G3) i treću (G7,G8 i G9) grupu čine ekstrakti dobijeni od sitno seckane gljive uz primenu različitih tretmana. Zapaženo je da ove dve grupe imaju približno slične vrednosti. Nasuprot njima izdvajaju se druga (G4, G5 i G6) i četvrta (G10, G11 i G12) grupa dobijene od mlevene gljive primenom različitih tretmana. Može se reći, takođe, da ove dve grupe imaju približno slične vrednosti. Peta (G13, G14 i G15) grupa uzoraka koja se izdvaja su uzorci dobijeni vodenom ekstrakcijom. Uočeno je da su ekstrakti dobijeni ekstrakcijom mlevene gljive, kod alkoholne ekstrakcije, dali veću količinu fenolnih materija u odnosu na ostale postupke. Vodena ekstrakcija je dala najmanje obojene rastvore i, očekivano, najmanji sadržaj polifenolnih materija. Daljom analizom utvrđene su razlike među pojedinačnim ekstraktima (tabela 5.10). Može se primetiti i da su primenjeni tretmani imali statistički značajne efekte u odnosu na količinu fenolnih materija. Međutim, između uzoraka G1 i G3 ne postoje statistički značajna razlikovanja, što znači da, u njihovom slučaju, UZ tretman od 45 kHz nije imao efekta. Pri alkoholnoj ekstrakciji, kako sitno usitnjenog tako i mlevenog plodonosnog tela gljive, i primene UZ tretmana od 45 i 60 kHz, nije bilo važnijih razlika na količinu fenolnih materija u ekstraktima (G7i G8; G10 i G11). I uzorci G3 i G8 su, takođe, slični, što dovodi do zaključka da pri koncentraciji etanola od 70% v/v možemo očekivati jednake količine fenolnih materija kao i pri ekstrakciji sa 40% v/v etanola i UZ tretmanom od 60 kHz, kada je u pitanju sitno seckana gljiva.



Slika 5.4. Boks-plot fenolnih materija ekstrakata

Može se zaključiti: da se sadržaj polifenolnih materija značajno povećava sa povećanjem dezintegracije gljive; da voda nije pogodan ekstraktant; da se ekstrakcija polifenolnih materija povećava sa povećanjem koncentracije etanola; da sa povećanjem frekvence, pri UZ tretmanu, dolazi do povećanje sadržaja polifenolnih materija.

U tom pogledu kao najpovoljniji tretman za izdvajanje najvećeg sadržaja polifenolnih materija je upotreba mlevene gljive, 70% v/v etanola i UZ tretman od 60 kHz.

Tabela 5.10. Takijev test za količinu fenolnih materija u ekstraktima*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	0,00	0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3			0,00	0,00	0,00	0,04	0,70	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G5					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G6						0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G7							0,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G8								0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G9									0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G10										0,54	0,00	0,00	0,00	0,00
G11											0,02	0,00	0,00	0,00
G12												0,00	0,00	0,00
G13													0,01	0,00
G14														0,04

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

5.2.5. Uticaj načina ekstrakcije na prinos ekstrakata

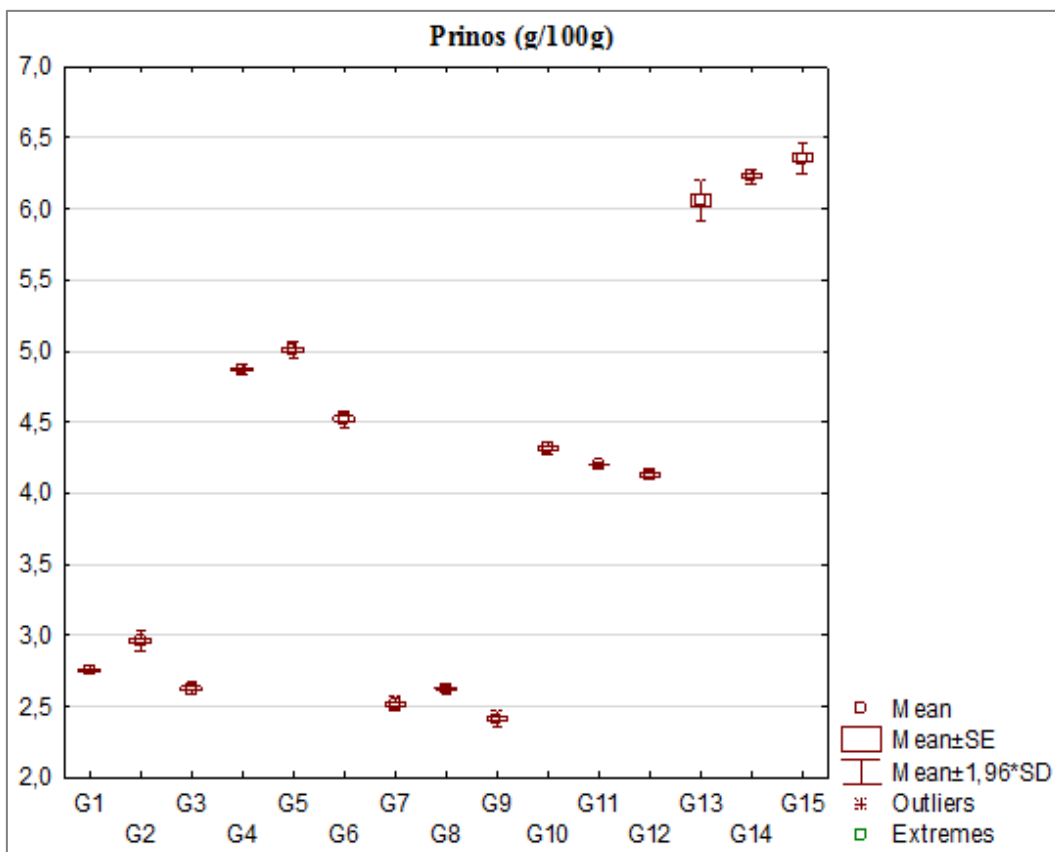
Prinos ekstrakata dobijenih iz plodonosnog tela gljive prikazan je u tabeli 5.11 i putem *boks-plota* na slici 5.5. Najveći prinos primetan je kod vodenih (6,06–6,36 g/100g), a najmanji kod alkoholnih ekstrakata, dobijenih iz sitno usitnjenog plodonosnog tela (2,41–2,96 g/100g).

Iz *boks-plota* se može videti da je najveći prinos bio kod vodenog ekstrakta kao rezultata primene UZ tretmana od 60 kHz (G15). U svim uzorcima, primena UZ tretmana od 60 kHz imala je za posledicu veći prinos, izuzev u slučaju G11. Očekivano, bolje rezultate dali su uzorci kod kojih je izvršena dezintegracija mlevenjem, što je sasvim logično kada se uzme u obzir površina dostupna za ekstrakciju. Ekstrakcija etanolom veće koncentracije je dala i veći prinos.

Tabela 5.11. Prinos ekstrakata (g/100g)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	2,75	0,015	0,009
G2	2,96	0,035	0,020
G3	2,63	0,021	0,012
G4	4,87	0,017	0,010
G5	5,01	0,032	0,019
G6	4,52	0,029	0,017
G7	2,52	0,026	0,015
G8	2,63	0,012	0,007
G9	2,41	0,030	0,017
G10	4,31	0,021	0,012
G11	4,20	0,010	0,006
G12	4,13	0,017	0,010
G13	6,06	0,075	0,044
G14	6,23	0,025	0,015
G15	6,36	0,056	0,032

Daljom statističkom analizom mogu se uočiti značajne razlike između svih pojedinačnih uzoraka (tabela 5.12), izuzev G3, G8 i G11, G12. Možemo zaključiti da će efekat na prinos biti identičan primenom alkoholne ekstrakcije sa 70% v/v etanolom bez ikakvih dodatnih tretmana i alkoholne ekstrakcije sa 40% v/v etanolom i primenom UZ tretmana od 60 kHz, kada se koristi sitno seckana gljiva. Međutim, ne može se logično objasniti izostanak razlike između uzoraka G11 i G12. Očekivalo se, da kao i u prethodnim slučajevima, prinos bude veći kod uzorka kod koga je primenjen UZ tretman od 60 kHz.



Slika 5.5. Boks-plot za prinos

Tabela 5.12. Takijev test za prinos*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3			0,00	0,00	0,00	0,02	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G5					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G6						0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G7							0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G8								0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G9									0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G10										0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
G11											0,40	0,00	0,00	0,00
G12												0,00	0,00	0,00
G13													0,00	0,00
G14														0,00
G15														

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

5.2.6. Senzorna ocena ekstrakata

Pored utvrđivanja prisustva i sadržaja bioaktivnih komponenata, ekstrakti su podvrgnuti i senzornoj oceni, u cilju eliminisanja uzoraka nezadovoljavajućeg

senzornog profila. Ocenjivanje je izvršeno od strane obučениh senzoričara. Rezultati su prikazani u tabeli (5.13) i putem *boks-plota* (slika 5.6).

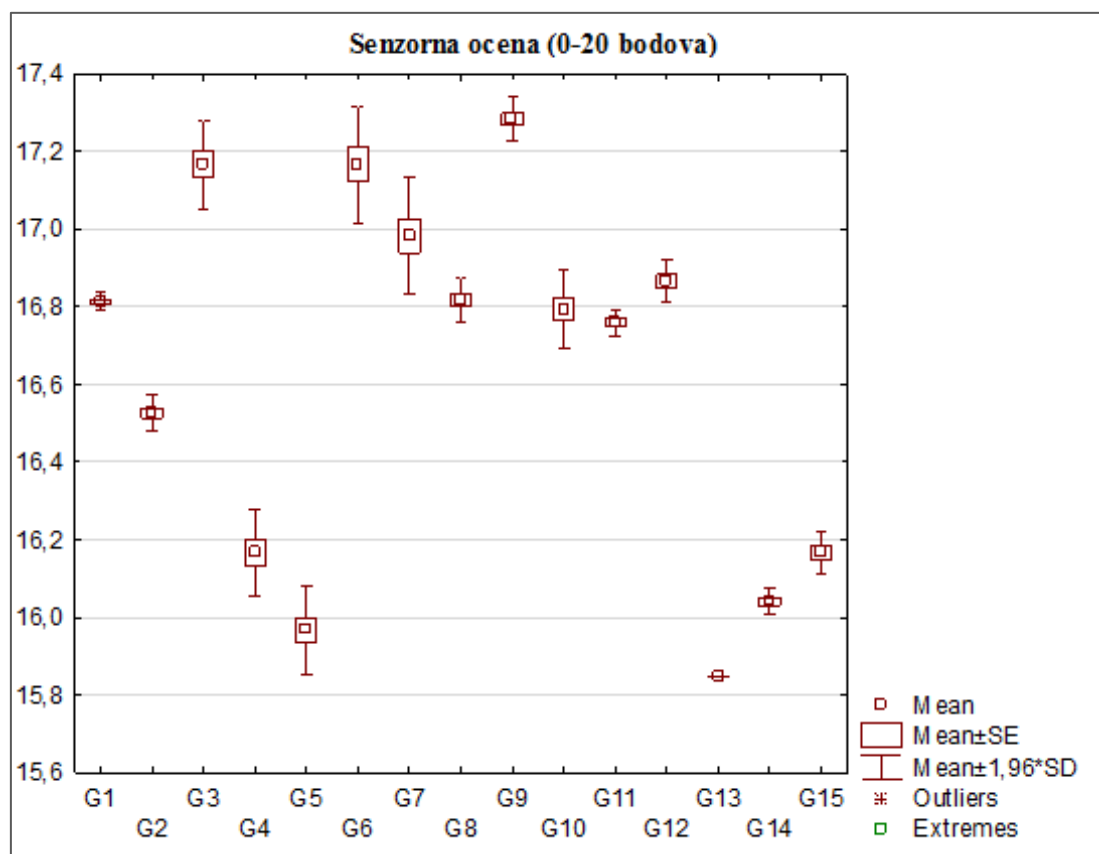
Tabela 5.13. Senzorne ocene ekstrakata (0-20 bodova)

	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
G1	16,81	0,012	0,007
G2	16,53	0,023	0,013
G3	17,17	0,058	0,033
G4	16,17	0,058	0,033
G5	15,97	0,058	0,033
G6	17,17	0,076	0,044
G7	16,98	0,076	0,044
G8	16,82	0,029	0,017
G9	17,28	0,029	0,017
G10	16,79	0,051	0,030
G11	16,76	0,017	0,010
G12	16,87	0,029	0,017
G13	15,85	0,000	0,000
G14	16,04	0,017	0,010
G15	16,17	0,029	0,017

Kao što se može primetiti, među najlošije ocenjenim su uzorci dobijeni vodenom ekstrakcijom i uzorci G4 i G5 dobijeni ekstrakcijom mlevenog plodonosnog tela gljive 70% v/v etanolom. Najbolje senzorne ocene osvojili su alkoholni ekstrakti dobijeni sitno sekanim plodonosnim telom i ekstrakcijom sa 40% v/v etanolom.

Primenom Takijevog testa, utvrđene su razlike među uzorcima i njihovi rezultati su prikazani u tabeli 5.14. Uočeno je da su uzorci dobijeni mlevenjem i ekstrakcijom sa 40% v/v etanolom dali isti senzorni profil kao i uzorak dobijen 70% v/v etanolom i sitno sekanom gljivom.

Kod G10, G11 i G12 takođe ne postoje značajne razlike, te je zaključak da UZ tretman kod uzoraka dobijenih iz mlevenog plodonosnog tela i 40% v/v etanola nije imao nikakvih efekata na senzorni profil, kao ni kod uzoraka G14 i G15.



Slika 5.6. Boks-plot za senzorne ocene

Tabela 5.14. Takijev test za senzornu ocenu*

	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15
G1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,97	0,97	0,00	0,00	0,00
G2		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G3			0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4				0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	1,00
G5					0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,76	0,00
G6						0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G7							0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00
G8								0,00	1,00	0,95	0,98	0,00	0,00	0,00
G9									0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G10										1,00	0,76	0,00	0,00	0,00
G11											0,22	0,00	0,00	0,00
G12												0,00	0,00	0,00
G13													0,00	0,00
G14														0,07

*naglašenom bojom su označene statistički značajne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

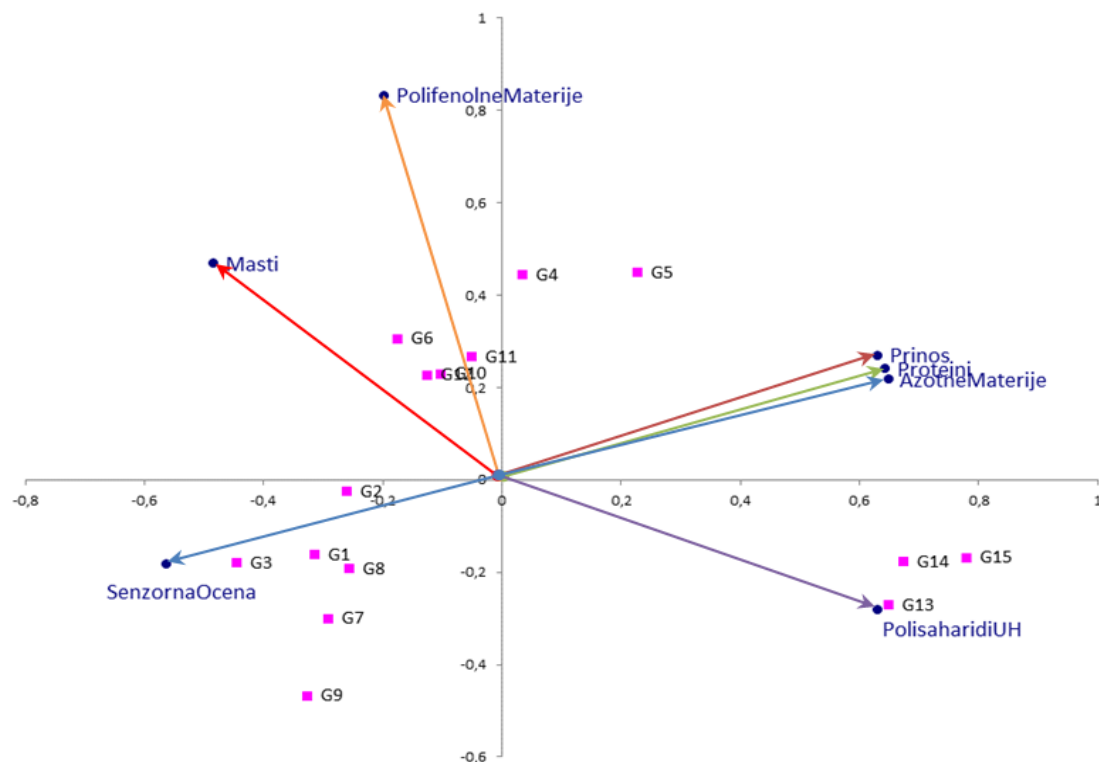
5.2.7. BI-PLOT dijagram i analiza ekstrakata *Genoderma lucidum*

Rezultate sprovedenih analiza možemo prezentovati i grafički, pomoću *bi-plot* dijagrama koji omogućavaju istovremeno prikazivanje informacije uzoraka i varijabli matrice. Uzorci su prikazani kao tačkaste vrednosti, a varijable kao vektori (slika 5.7). Uočeno je da postoji jaka pozitivna zavisnost između AM i proteina, što je sasvim očekivano. Druga pozitivna zavisnost se javlja između prinosa i AM i proteina, što znači da sa povećanjem prinosa se može očekivati i povećan sadržaj AM i proteina. Sadržaj fenolnih materija je u pozitivnoj korelaciji sa mastima i među njima postoji relativno snažna zavisnost. Očekivano je i da se kod uzoraka sa povećanim sadržajem fenolnih materija može javiti povišen sadržaj masti. Nešto slabija pozitivna korelacija postoji i između senzorne ocene i masti. Pretpostavka je da se, što je sadržaj masti veći, može predvideti veća senzorna ocena. Pozitivna korelacija se uočava i između prinosa i sadržaja polisaharida, tj. ugljenih hidrata. Proteini, AM i prinos se nalaze u skoro apsolutnom negativnom odnosu sa senzornom ocenom. Može se zaključiti da, što je veći prinos, to je niža senzorna ocena i obrnuto. Negativna korelacija se uočava i između prinosa, AM i proteina i masti, između fenolnih materija i polisaharida i između polisaharida i senzorne ocene.

Međutim, zanimljivo je istaći da među pojedinim varijablama ne postoji korelacija, što je slučaj sa proteinima, azotnim materijama i fenolnim materijama, kao i senzornom ocenom i fenolnim materijama i prinosima i fenolnim materijama.

Ukoliko pogledamo raspored uzoraka, možemo primetiti određena grupisanja. G1, G2, G3, G7, G8 i G9 se pozicioniraju u skupinu u donjem levom kvadrantu u pravcu senzorne ocene. Na osnovu prethodnih rezultata, ovakav trend je i bio očekivan, jer su to uzorci dobijeni alkoholnom ekstrakcijom sitno seckane gljive. Kod njih je prinos bio relativno mali, kao i sadržaj azotnih materija i ugljenih hidrata. Količina fenolnih materija je takođe bila relativno manja u poređenju sa ostalim uzorcima.

Drugu grupu čine G4, G5, G6, G10, G11 i G12, koji se koncentrišu oko Y ose u gornjem kvadrantu i u pravcu fenolnih materija. Ovi ekstrakti su dobijeni alkoholnom ekstrakcijom mlevene gljive i sadržaj fenolnih materija kod njih je bio najveći.



Slika 5.7. Bi-plot ekstrakata

Treću skupinu čine G13, G14 i G15, grupisani u donjem desnom kvadrantu u pravcu polisaharida. Ovo su upravo i uzorci kod kojih je sadržaj ugljenih hidrata bio najveći, dobijeni vodenom ekstrakcijom i, kao što se vidi na grafiku, u negativnoj korelaciji sa senzornom ocenom.

Primenom *klaster* analize vrši se pozicioniranje objekata tako da su oni u istoj grupi slični po nekom osnovu. Na slici 5.8 prikazan je *klastergram* ekstrakata. Ukoliko pogledamo varijable, možemo primetiti dva velika klastera.

Jedan čine UH, AM, proteini i prinos, a drugi fenolne materije, masti i senzorna ocena. Klaster 1 je podeljen na pod-klastere (2 i 3). Pod-klaster 2 čine UH, a pod-klaster 3 čine AM, proteini i prinos. Klaster 2 je takođe podeljen na dva pod-klastera: jedan, u okviru kog su fenolne materije i masti, i drugi, koji predstavlja senzornu ocenu. I sagledavanjem uzoraka možemo, podjednako, uočiti dva klastera, od kojih jedan čine G13, G14 i G15, a drugi svi ostali.

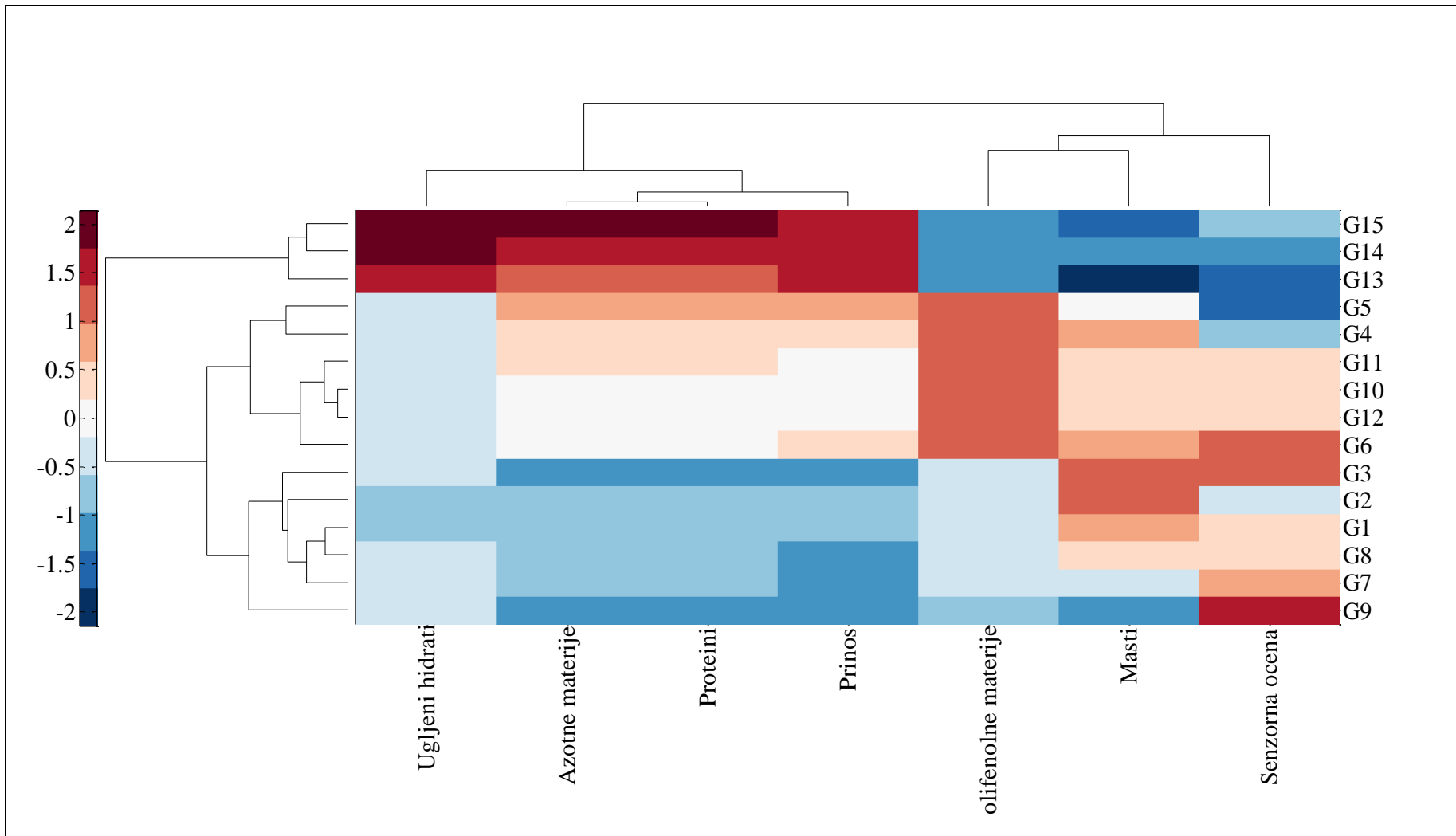
Primećujemo da su ovde grupisani uzorci dobijeni vodenom i uzorci dobijeni alkoholnom ekstrakcijom. Njihovom daljom klasifikacijom izdvajaju se dve podgrupe: prva, uzorci dobijeni alkoholnom ekstrakcijom sitno usitnjenog plodonosnog tela, i druga, uzorci dobijeni iz mlevenog plodonosnog tela. Svaka podgrupa se dalje deli na akcesije i svrstava u podgrupe po određenom obeležju.

Na grafikonu, boja svake podgrupe varira od tamno-plave do tamno-crvene, i predstavlja količinu prisutnih materija u određenom uzorku.

Ukoliko uporedimo rezultate *klaster* analize i *bi-plota*, primetićemo korelaciju sa dobijenim vrednostima.

Međutim, prilikom *klaster* analize se dobija veći broj podgrupa, te je lakše odabrati uzorke za dalju analizu.

Za dalju analizu odabrani su uzorci iz klastera jedan i pod-grupe koja ima dve akcesije (G14, G15), i iz klastera dva, uzorci koji pripadaju prvom pod klasteru, prvoj grupi sa dve akcesije (G5, G4).



Slika 5.8. Klastergram ekstrakata

5.2.8. Analiza sadržaja glukana u izabranim ekstraktima

Glukani predstavljaju primarnu komponentu ćelijskih zidova viših gljiva. Mogu se naći u obliku linearnih ili razgranatih biopolimera, čiju osnovu sačinjavaju α - ili β -povezane glukozne jedinice. U gljivama su najčešće prisutni u vidu kraćih β -(1,6)-lanaca, nerastvorivih u vodi (Moradali et al. 2007, CFR Ferreira et al. 2010). Glukani pokazuju različite biološke i imunološke aktivnosti, od kojih su mnoge potvrđene u brojnim studijama. U tabeli 5.15 prikazane su vrednosti sadržaja glukana u ispitivanim ekstraktima, među kojima se mogu videti značajne razlike u zavisnosti od vrste ekstrakta (slika 5.9). Najviši sadržaj ukupnih glukana zapažen je kod G15 i G14 (62,18-57 i 16 g/100g), dobijenih vodenom ekstrakcijom uz korišćenje termičkog tretmana, dok su ostali ekstrakti imali značajno niže vrednosti.

Tabela 5.15. Količina glukana ekstrakata gljive *Ganoderma lucidum* (g/100g)

	Uzorak	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
α -glukan	G4	1,76	0,006	0,004
	G5	1,77	0,001	0,001
	G14	1,70	0,001	0,000
	G15	2,04	0,003	0,001
	G515	1,80	0,005	0,003
β -glukan	G4	18,72	0,003	0,001
	G5	20,91	0,001	0,001
	G14	55,46	0,003	0,002
	G15	60,14	0,002	0,001
	G515	37,84	0,011	0,006
Ukupni glukani	G4	20,49	0,004	0,002
	G5	22,67	0,001	0,001
	G14	57,16	0,002	0,001
	G15	62,18	0,001	0,001
	G515	39,64	0,014	0,008

Ukoliko pogledamo sadržaj α -glukana, možemo primetiti da je on u svim ekstraktima relativno nizak. Podaci iz literature govore u prilog ovim vrednostima, jer se

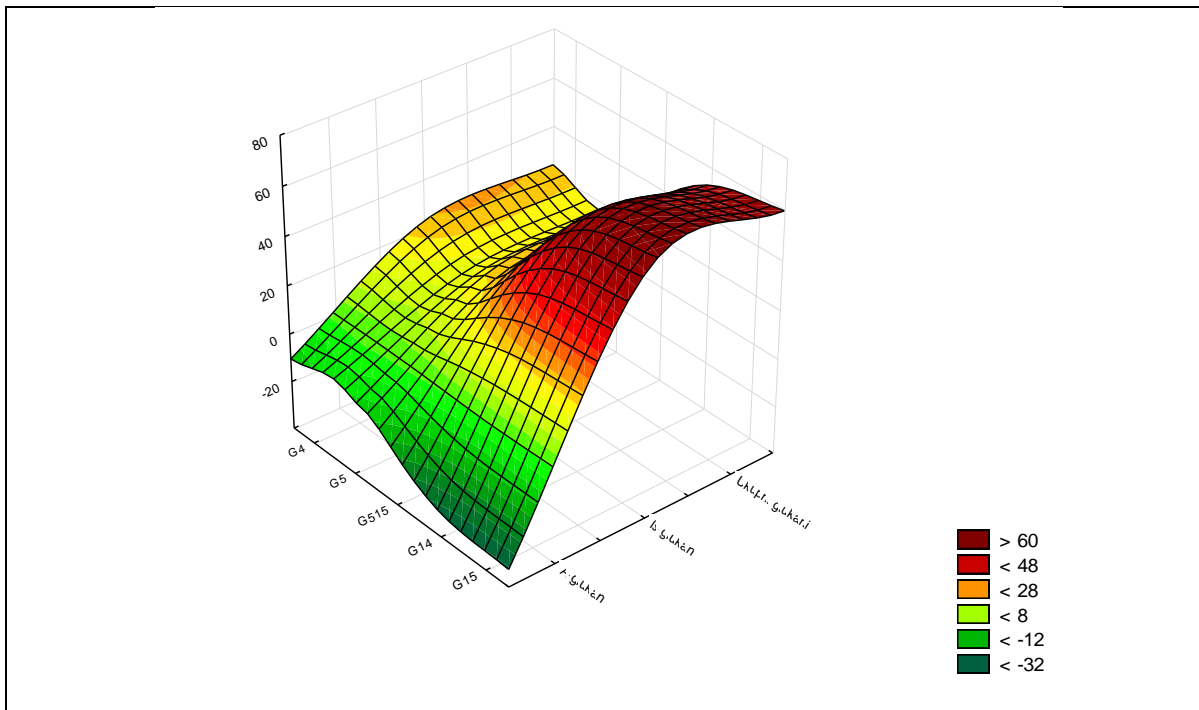
sadržaj α -glukana u različitim gljivama najčešće kretao oko 1% (Lee i Kim, 2005). Međutim, sadržaj β -glukana se znatno razlikovao u ostalim uzorcima. Više vrednosti pokazali su vodeni ekstrakti, što se može objasniti boljom rastvorljivošću glukana u vodenim rastvorima. Ukoliko se uzme u obzir i činjenica da su vodeni ekstrakti dobijeni termičkim tretmanom u trajanju od 2h, rezultati su sasvim očekivani. Daljom primenom statističke analize možemo utvrditi postojanje razlika između pojedinačnih uzoraka (tabela 5.16). Primećujemo da korišćenjem alkoholne ekstrakcije i UZ tretmana ne dolazi do značajnih promena pri ekstrakciji α -glukana. Ipak, ovaj tretman ima značajan uticaj na sadržaj ukupnih i β -glukana, bilo da se ekstrakcija vrši vodom ili etanolom. Evidentno je i da, kada su u pitanju β -glukani, vodena ekstrakcija ima prednost nad alkoholnom. Ukoliko primenimo UZ tretman od 60 kHz, možemo očekivati veći sadržaj glukana.

Tabela 5.16. Takijev test za glukane*

		G5	G14	G15	G515
α -glukan	G4	0,65	0,00	0,00	0,00
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,00	0,00
	G15				0,00
β -glukan	G4	0,00	0,00	0,00	0,00
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,00	0,00
	G15				0,00
Ukupni glukani	G4	0,00	0,00	0,00	0,00
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,00	0,00
	G15				0,00

*naglašenom bojom su označene statistički važne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

Primenom klaster analize možemo grafički prikazati sličnosti između uzoraka (slika 5.9). Tamno-crvena boja ukazuje na povećan sadržaj ukupnih i β -glukana, a zelena na nizak sadržaj α -glukana. Uočavamo razdvajanje na dve grupe, od kojih jednu čine uzorci G14 i G15, drugu uzorci G4 i G5, dok se uzorak G515 nalazi između.



Slika 5.9. Grafički prikaz sličnosti uzoraka u odnosu na sadržaj glukana

5.2.9. Antimikrobna svojstva dobijenih ekstrakata

U posljednjih nekoliko godina uočava se povećana otpornost mikroorganizama na postojeće antibiotike. Usled njihove nekontrolisane primene, dolazi do mutiranja bakterija i njihove sve veće otpornosti (Oldfield, 2014). Stoga ne iznenađuje podatak da naučnici širom sveta stalno ispituju nove antimikrobne supstance.

Kako bismo proverili dodatnu funkcionalnost dobijenih ekstrakata, ispitan je uticaj postojećih ekstrakata na odabrane patogene bakterijske vrste: *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* i *Listeria monocytogenes*. Kako je cilj ovog rada dobijanje specijalne vrste piva, odabrani su mikroorganizmi koji mogu da prouzrokuju mikrobiološko kvarenje piva. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti su prikazani u tabeli 5.17. Standardne devijacije nisu prikazane jer su rezultati svih ponavljanja bili identični.

Tabela 5.17. Antimikrobna aktivnost ekstrakata *G. lucidum* izražena kao MIC (mg/ml) i MBC (mg/ml)

Bakterija	Poreklo		G4	G5	G14	G15	G515
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC	MIC	3.75 ^{cb}	1.875 ^d	15.0 ^a	3.75 ^{cb}	15.0 ^a
	35150	MBC	7.5 ^c	15.0 ^b	30.0 ^a	7.5 ^c	30.0 ^a
<i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	ATCC	MIC	0.468 ^d	0.468 ^d	1.875 ^c	0.468 ^d	7.5 ^a
	27729	MBC	3.75 ^d	15.0 ^b	7.5 ^c	3.75 ^d	30.0 ^a
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	ATCC	MIC	0.234 ^e	0.058 ^f	1.875 ^c	0.234 ^e	7.5 ^a
	19115	MBC	7.5 ^c	7.5 ^c	15.0 ^b	7.5 ^c	-
<i>Geobacillus</i> <i>stearothermoph.</i>	ATCC	MIC	0.468 ^d	0.234 ^e	3.75 ^b	0.468 ^d	7.5 ^a
	7953	MBC	-	-	-	-	-
<i>Pediococcus</i> <i>cerevisiae</i>	DSM	MIC	0.937 ^d	0.468 ^e	0.468 ^e	0.937 ^d	3.75 ^b
	20289	MBC	3.75 ^d	7.5 ^c	1.875 ^e	3.75 ^d	30.0 ^a
<i>Megasphaera</i> <i>cerevisiae</i>	DSM	MIC	0.937 ^d	0.215 ^{e15}	0.937 ^d	0.937 ^d	3.75 ^b
	20462	MBC	7.5 ^c	.0 ^b	30.0 ^a	7.5 ^c	30.0 ^a
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM	MIC	0.468 ^d	0.115 ^f	1.875 ^c	0.468 ^d	3.75 ^b
	1268	MBC	3.75 ^d	7.5 ^c	3.75 ^d	3.75 ^d	15.0 ^b
<i>Pectinatus</i> <i>cerevisiiphilus</i>	DSM	MIC	0.937 ^d	0.468 ^e	1.875 ^c	0.937 ^d	15.0 ^a
	20763	MBC	7.5 ^c	7.5 ^c	7.5 ^c	7.5 ^c	30.0 ^a

U istom redu, sredine obeležene različitim slovima se značajno razlikuju na nivou značajnosti $p < 0,05$; - nije postignuto

Upoređivanjem minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) kod *E. coli* O157:H7 zapažamo da G5 ima najjače inhibitorno dejstvo. Sličan trend je uočen i kod *Listeria monocytogenes*. U slučaju *Yersinia enterocolitica* utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između uzoraka G4, G5 i G15, dok je minimalna inhibitorna koncentracija iznosila 0,468 mg/ml. Moglo bi se reći da nije bilo značajnih razlika između etanolnih i vodenih ekstrakata na patogene mikroorganizme. Najjači efekat ispoljen je prema *Listeria monocytogenes* > *Yersinia enterocolitica* > *E. coli* O157:H7, pri čemu ekstrakti nisu samo inhibirali rast bakterija već su imali i značajno baktericidno dejstvo. Zanimljiva je činjenica da su svi analizirani ekstrakti imali inhibitornu aktivnost i prema svim uzročnicima mikrobiološkog kvarenja piva, što može biti od velikog značaja za industriju piva. Iz

prikazanih rezultata se uočava veća osetljivost *Lactobacillus brevis*, dok je najslabija bila kod *Pectinatus cerevisiiphilus* DSM 20763. Intersantno je da su i u ovom slučaju vođeni i alkoholni ekstrakti pokazali slične efekte, međutim potrebno je istaći i da je etanolni ekstrakt G5 iskazao najveći potencijal. Potvrđeno je i da su svi upotrebljeni ekstrakti imali MIC aktivnost, dok baktericidna aktivnost nije ispoljena samo u slučaju *Geobacillus stearothermophilus*. Antimikrobna aktivnost *G. lucidum* dokazana je u mnogim studijama, ali u dostupnoj literaturi nema podataka o njihovom delovanju na uzročnike mikrobiološkog kvarenja piva.

5.2.10. Citotoksičnost ekstrakata *Ganoderma lucidum*

Citotoksičnost se odnosi na sposobnost određenih supstanci da unište žive ćelije, bilo da su zdrave ili maligne. Veliki broj studija utvrdio je da triterpenoidi *G. lucidum* pokazuju direktnu citotoksičnost prema različitim ćelijskim linijama u *in vitro* istraživanjima. Citotoksični potencijal dobijenih ekstrakata *G. lucidum* ispitan je korišćenjem MTT testa na različite ćelijske linije (tabela 5.18). Skrining je urađen na FemX ćelijama, da bi potom ekstrakt sa najvećom apoptotskom moći bio proveren na još tri ćelijske linije. Rezultati su prikazani u vidu IC₅₀ vrednosti, što predstavlja procenat preživljavanja ćelija u funkciji koncentracije ispitivanog ekstrakta i izražava se u µg/ml. Što su vrednosti niže, to je citotoksični efekat određene supstance veći (tabela 5.19.).

Tabela 5.18. Karakteristike ćelijskih linija

Ćelijska linija	Morfologija	Vrsta	Tkivo/Organ	Tumor
HeLa	epitelijalna	humane	cerviks	adenokarcinom
A549	epitelijalna	humane	pluća	adenokarcinom
EA.hy 926	epitelijalna	humane	hibrid	-
			somatskih ćelija	
FemX	epitelijalna	humane	koža	melanom

Tabela 5.19. Uticaj ekstrakata *G. lucidum* na FemX ćelije

Ćelijska linija	G4	G5	G14	G15
FemX	IC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]
24 h	486.9±2.0	240,9±4,5	946.1±4.8	762.6±1.4
48 h	250.7±3.4	110,5±3,8	686.1±7.4	399.6±1.0

Kao što možemo da primetimo, najniža IC₅₀ vrednost za FemX ćelije melanoma iznosila je 240,9±4 µg/ml u prvih 24h, dok je nakon inkubacije u narednih 24h uzorak G5 dostigao vrednost od 110,5±3,8µg/ml. Povećanjem perioda delovanja ekstrakta, IC₅₀ vrednost se smanjuje, što znači da je potrebna manja količina uzorka kako bi se izazvala apoptoza. Ekstrakt G4 je imao nešto veće vrednosti, dok uzorci vodenih ekstrakata nisu pokazali jaku citotoksičnost. Daljim ispitivanjem utvrđeno je delovanje ekstrakta G5 na ćelijske linije adenokarcinoma humanog cerviksa, pluća i na hibrid humanih somatskih ćelija (tabela 5.20). Najveći efekat zabeležen je na HeLa ćelijama nakon 48h (123,8±8,4µg/ml). Dobijene vrednosti su u skladu sa navedenim literarnim podacima navedenim u prethodnom delu.

Tabela 5.20. Uticaj ekstrakta G5 *G. lucidum* na EA.hy926, A549 i HeLa ćelije

Ćelijska linija	IC ₅₀ (µg/ml)	
	24 h	48 h
EA.hy926	305,3±8,9	204±3,7
A549	376,0±7,8	177,1±8,5
HeLa	212,7±8,9	123,8±8,4

5.2.11. Analiza antioksidativnog potencijala i ukupnih polifenola izabranih ekstrakata

Antioksidativna svojstva *G. lucidum* pripisuju se polifenolnim komponentama, polisaharidima, kompleksima polisaharid-peptid i mikroelementima (Kan et al. 2015, Smina et al. 2011). Pretpostavlja se da su za antioksidativni potencijal gljive najzaslužnija terpenaska jedinjenja, poput ganoderinske kiseline (A, B, C, D, H, F), lucidinske kiseline i ganodermanintriola (Zhu et al. 1999, Sun et al. 2004, Smina et al. 2011). Međutim, i polisaharidi *G. lucidum* odgovorni su za umanjeње produkcije slobodnih radikala kiseonika (Liu et al. 2010). Pretpostavlja se da, sa porastom ukupne količine fenolnih materija, proporcionalno raste i antioksidativni potencijal.

Odabranim uzorcima iz *klaster* analize dodat je još jedan ekstrakt, nastao kombinacijom G5 i G15 (G515). Ekstrakt G5 je imao najviši sadržaj fenolnih materija, a ekstrakt G15 najviši sadržaj UH. Pretpostavlja se da će dobijeni ekstrakt imati najveći sadržaj bioaktivnih komponenti. Za ispitivanje antioksidativnih karakteristika odabranih ekstrakata, izvršena je analiza sa tri različite metode obzirom da nijedan test ne odražava u potpunosti dejstvo antioksidanasa *in vivo*.

Određivanje sadržaja polifenola izvršeno je pomoću *Folin-Ciocalteu* reagensa, pri čemu je utvrđena količina fenolnih materija i izražena u ekvivalentima galne kiseline (mg/L GAE). Antioksidativni potencijal uzoraka je ispitan DPPH, TEAC i FRAP metodom, dok su rezultati izraženi u mili-molima *Trolox* ekvivalenta (mM TE).

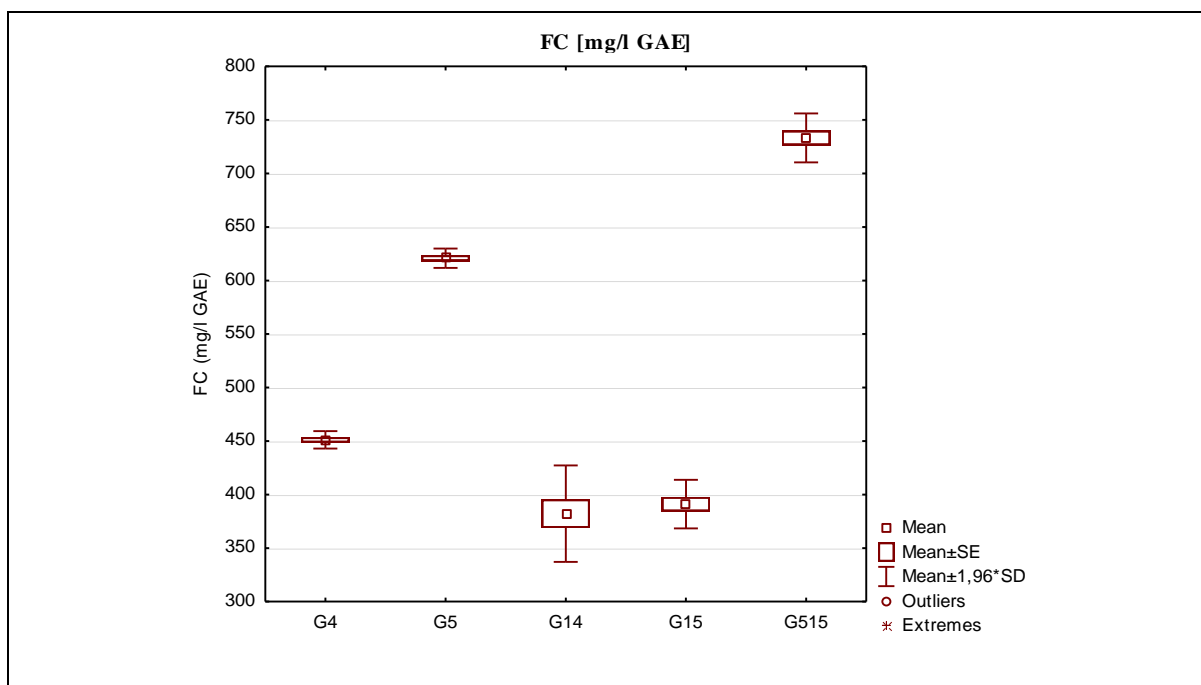
U tabeli 5.21 prikazani su rezultati za ukupnu količinu polifenola i antioksidativni potencijal. Najveći sadržaj polifenola imao je G515 (733,23 mg/l GAE) a, najmanji – uzorak G14 (382,33 mg/l GAE), dobijen vodenom ekstrakcijom (slika 5.9). Ovi podaci su u korelaciji sa prethodnim ispitivanjima i navedenim literarnim podacima.

Tabela 5.21. Količina ukupnih polifenola i antioksidativnog potencijala ekstrakata gljive *Ganoderma lucidum*

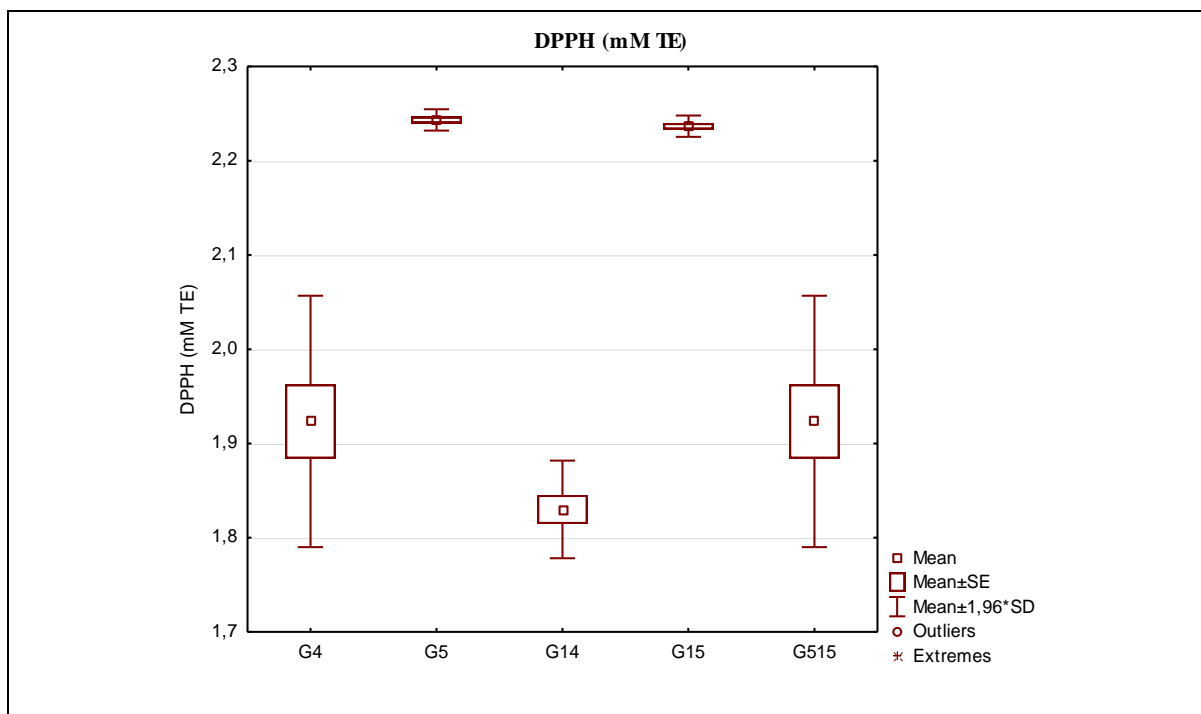
Metoda	Uzorak	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
Folin-Ciocalteu (mg/L GAE)	G4	451,13	4,18	2,41
	G5	620,83	4,61	2,66
	G14	382,23	23,00	13,28
	G15	391,10	11,57	6,68
	G515	733,23	11,65	6,73
DPPH (mM TE)	G4	1,92	0,07	0,04
	G5	2,24	0,01	0,00
	G14	1,83	0,03	0,02
	G15	2,24	0,01	0,00
	G515	1,92	0,07	0,04
TEAC (mM TE)	G4	3,32	0,03	0,01
	G5	5,62	0,07	0,04
	G14	2,87	0,12	0,07
	G15	3,80	0,06	0,03
	G515	3,53	0,04	0,02
FRAP (mM TE)	G4	3,15	0,04	0,03
	G5	6,50	0,06	0,03
	G14	3,60	0,25	0,14
	G15	4,78	0,35	0,20
	G515	4,87	0,09	0,05

Iz prikazanih rezultata, predstavljenih putem *boks-plota* (slike 5.10 – 5.12) za tri antioksidativne metode, možemo uočiti da uzorak G5 pokazuje najveće vrednosti, koji je sasvim u skladu sa sadržajem polifenolnih materija u istom uzorku: 620,83 mg/l GAE. Uzorak G515, i pored velikog sadržaja polifenolnih materija, nije imao očekivani antioksidativni potencijal. Kod uzorka G15, pored relativno nižeg sadržaja ukupnih polifenolnih materija, primećujemo znatnu amtiradikalisku sposobnost. Interesantno je da uzorak G5 dobijen alkoholnom ekstrakcijom, ima visoki sadržaj polifenolnih materija, dok uzorak G15 dobijen vodenom ekstrakcijom ima znatno niži sadržaj polifenolnih materija, ali veliki sadržaj polisaharida i da oba uzorka pokazuju slično ponašanje. U brojnim istraživanjima utvrđeno je da terpenska jedinjenja, poput ganoderinske kiseline (A, B, C, D, H, F), lucidinske kiseline i ganondermanintriola, mogu da neutrališu negativno dejstvo slobodnih radikala (Zhu et al. 1999, Sun et al. 2004, Smina et al. 2011). Međutim, i polisaharidi, homo-glukani, hetero-glukani i niskomolekularni β -1,3-glukan dovode do

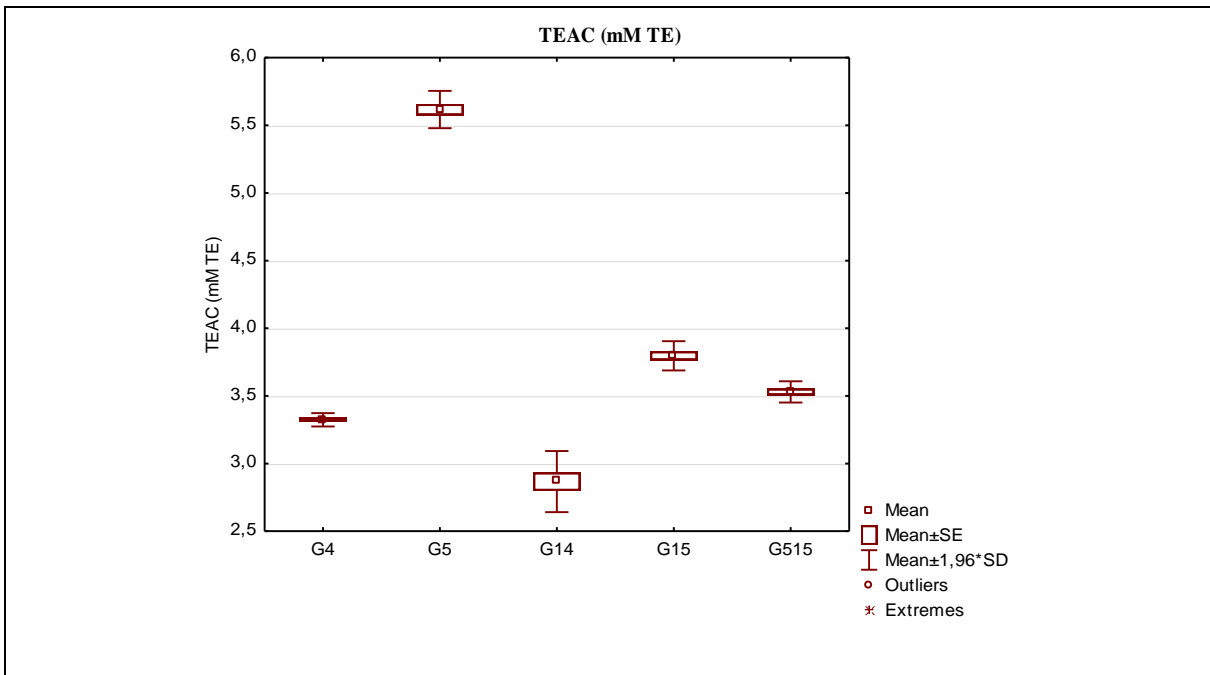
redukcije slobodnih radikala i povećanja antioksidativnosti (Liu et al. 2010, Ma et al. 2013, Shi et al. 2010, Shi et al. 2013), što je, pretpostavlja se, slučaj i sa uzorcima G5 i G15.



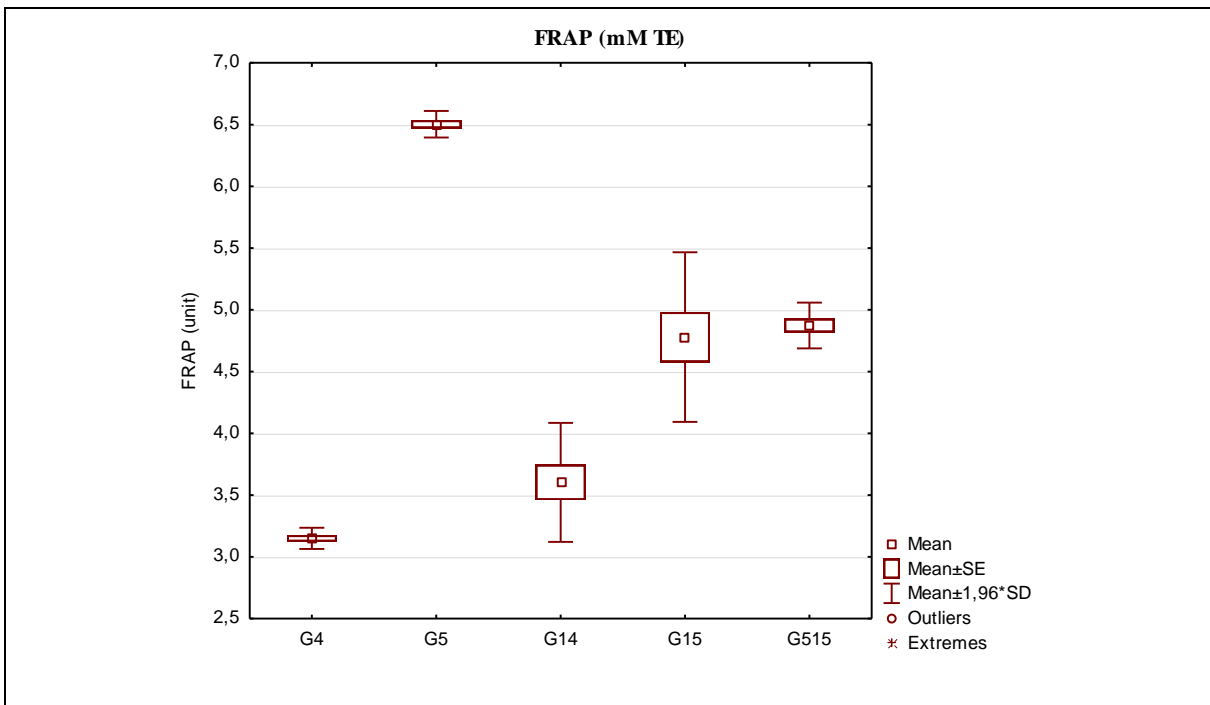
Slika 5.10. Boks-plot za Folin-Ciocalteu



Slika 5.11. Boks-plot za DPPH



Slika 5.12. Boks-plot za TEAC



Slika 5.13. Boks-plot za FRAP

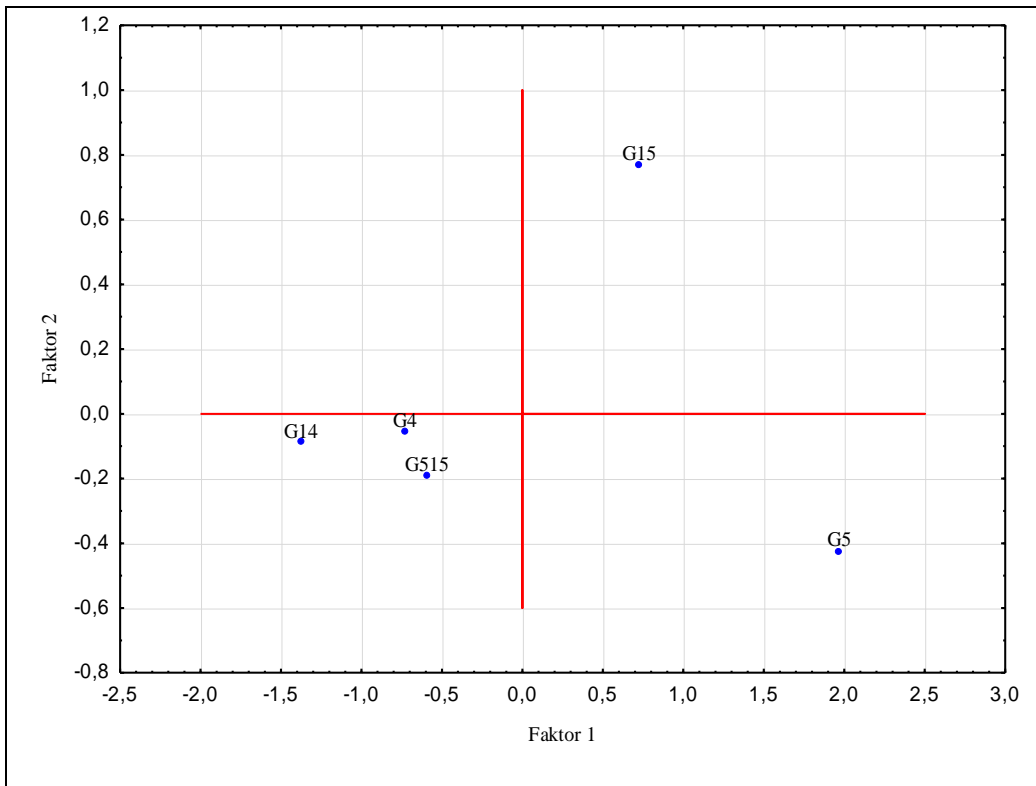
Primenom Takijevog testa mogu se uočiti razlike između pojedinačnih uzoraka dobijenih za sadžaj polifenolnih komponenti i antioksidativni potencijal ekstrakata (tabela 5.22).

Tabela 5.22. Takijev test za *Folin-Ciocalteu*, DPPH, TEAC i FRAP*

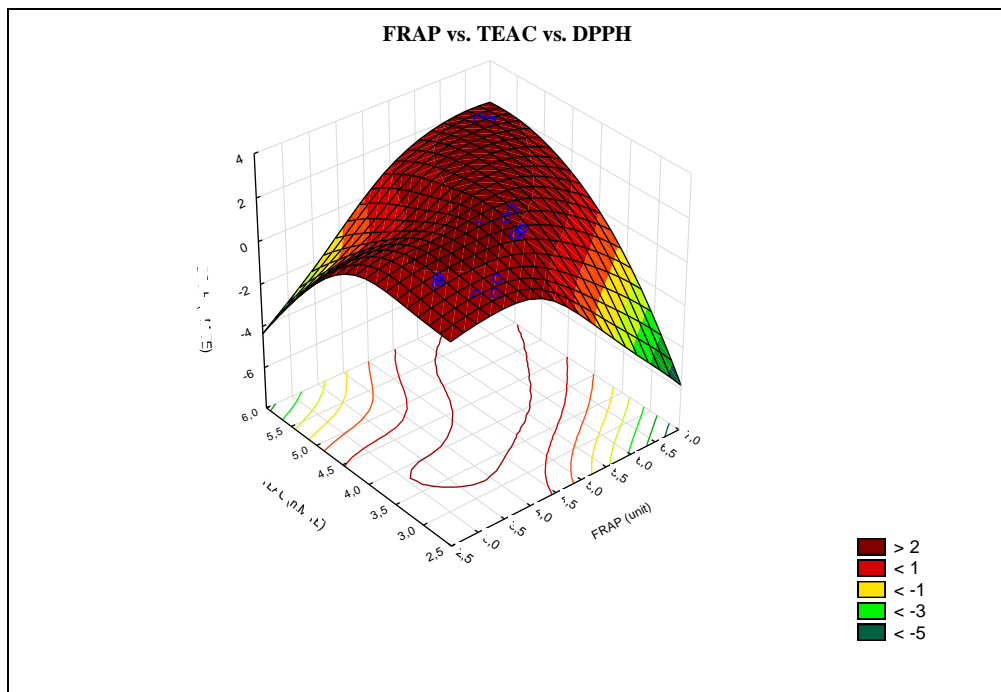
	Uzorak	G5	G14	G15	G515
Folin-Ciocalteu	G4	0,00	0,00	0,00	0,00
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,91	0,00
	G15				0,00
DPPH	G4	0,00	0,15	0,00	1,00
	G5		0,00	1,00	0,00
	G14			0,00	0,15
	G15				0,00
TEAC	G4	0,00	0,11	0,00	0,00
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,00	0,00
	G15				0,98
FRAP	G4	0,00	0,00	0,00	0,03
	G5		0,00	0,00	0,00
	G14			0,00	0,00
	G15				0,01

*naglašenom bojom su označene statistički važne razlike između uzoraka na nivou značajnosti $p < 0,05$

Analizom glavnih komponenti, dobijen je *bi-plot* (slika 5.13) pri čemu je došlo do izdvajanja dva ekstrakta G5 i G15, po svojim osobenostima prema antiradikalnoj aktivnosti. Preostali ekstrakti (G4, G14 i G515) čine heterogenu grupu što nam ukazuje na njihove sličnosti u pogledu antioksidativnosti. Na slici 5.14 prikazan je korelacioni odnos između primenjenih antioksidativnih metoda. Dobijena parabola ukazuje na pozitivnu zavisnost između dobijenih podataka, a dobijene vrednosti među uzorcima su visoko korelisane. Ovakvi rezultati su u skladu sa ranije sprovedenim istraživanjima koja su dokazala visoku korelaciju između upotrebljenih antioksidativnih metoda. Grupisanje tačaka, koje predstavljaju uzorke, na vrhu parabole potvrđuje da su sve metode dale podjednake rezultate za antioksidativni potencijal ispitivanih uzoraka. Te se stoga mogu potvrditi činjenice o njihovoj antiradikalnoj aktivnosti. Dobijeni rezultati ukazuju i na činjenicu da analizirani ekstrakti mogu biti značajan izvor prirodnih antioksidanata, te da imaju potencijalni medicinski značaj.



Slika 5.14. Bi-plot ispitivanih ekstrakata DPPH, FRAP i TEAC



Slika 5.15. Površinski i kontur plot odnosa FRAP vs. TEAC vs. DPPH

5.2.12. HPLC analiza

Fenolna jedinjenja predstavljaju veoma rasprostranjenu grupu sekundarnih biljnih metabolita, čiji su glavni predstavnici derivati benzoeve i cinaminske kiseline. Podgrupu benzoevih kiselina čine *p*-benzoeva, protokatehinska, vanilinska, galna, siringinska i salicilna kiselina. Protokatehinska kiselina široko je rasprostranjena i u prirodi se najčešće sreće kao dimer, odnosno kao elaginska kiselina. *P*-hidroksibenzoeva, vanilinska i sinirginska kiselina su konstituenti lignina, iz kog se dobijaju alkalnom hidrolizom. Podgrupu cinaminskih kiselina čine *p*-kumarinska, kofeinska, ferulinska i sinapinska kiselina.

U literaturi ne postoji veliki broj podataka o sadržaju fenolnih kiselina koji se odnose na *G. lucidum*. Kim sa saradnicima je vršio ispitivanje sadržaja fenolnih kiselina kod jestivih i medicinskih gljiva, u okviru kog je, od ukupno 30 fenolnih kiselina, u ekstraktu *G. lucidum* detektovano svega njih 12. U tabeli 5.23 su prikazani rezultati ispitivanja sadržaja fenolnih kiselina u dobijenim ekstraktima. Može se primetiti da su ekstrakti dobijeni alkoholnom ekstrakcijom imali daleko veći sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na vodene ekstrakte. Interesantno je da je u uzorcima primećeno najviše naringenina, i to kod G5 (8,10µg/g), dok je u ostalim uzorcima njegova količina bila znatno niža, i to u vodenim ekstraktima čak do četiri puta. Naringenin je bioflavonoid koji je karakterističan za citrusne plodove, ima ga u hmelju, dok se ne retko može naći i u kori paradajza (Mishra et al. 2013, Vallverdú-Queralt et al. 2012). U više različitih studija dokazana su njegova medicinska svojstva, poput redukcije oksidativnog stresa na ćelijama, inhibiciji hepatitisa C, snižavanju holesterola i sl. (Yao et al. 2004). U dostupnoj literaturi nije pronađeno mnogo podataka o sadržaju naringenina u *G. lucidum*, međutim njegovo prisustvo je detektovano u drugim gljivama (Mishra et al. 2013). Pronađeni sadržaj katehina je bio sličan u svim ispitivanim uzorcima i predstavlja drugu najdominantniju komponentu u ekstraktima. U brojnim istraživanjima dokazan je njegova efikasnost u neutralisanju reaktivnih vrsta kiseonika *in vitro* i antioksidativna svojstva *in vivo* (Higdon and Frei 2003). Sadržaj hesperetina je bio sličan u svim uzorcima i u skladu sa vrednostima koje je utvrdio Kim i saradnici. Dobijene vrednosti za vanilinsku, *p*-kumarinsku i

siringinsku kiselinu se nisu bitno razlikovale u okviru svojih grupa, što znači da ekstraktant nije imao bitnijeg uticaja kao ni UZ tretman. Zanimljivo je da kod vodenih ekstrakata nije detektovana *p*-hidroksibenzoeva kiselina, dok kempferol nije detektovan kod etanolnih ekstrakata. Analizom je i utvrđen jako nizak sadržaj kvercetina i *trans*-cinaminske kiseline kod G5 i G15, dok u ostalim uzorcima ova jedinjenja nisu detektovana. U ispitivanim ekstraktima nije detektovano prisustvo galne, kofeinske, benzoeve, hlorogenske kiseline, rutina i resveratola.

Može se zaključiti da ekstrakcija vodom i UZ tretmanom na nižim frekvencama neće dovesti do većeg izdvajanja fenolnih materija. Ukoliko uporedimo ove sa podacima iz literature, možemo zaključiti da su vrednosti u skladu sa do sada objavljenim istraživanjima.

Tabela 5.23. Količina fenolnih jedinjenja ekstrakata *Genoderma lucidum* (µg/g)

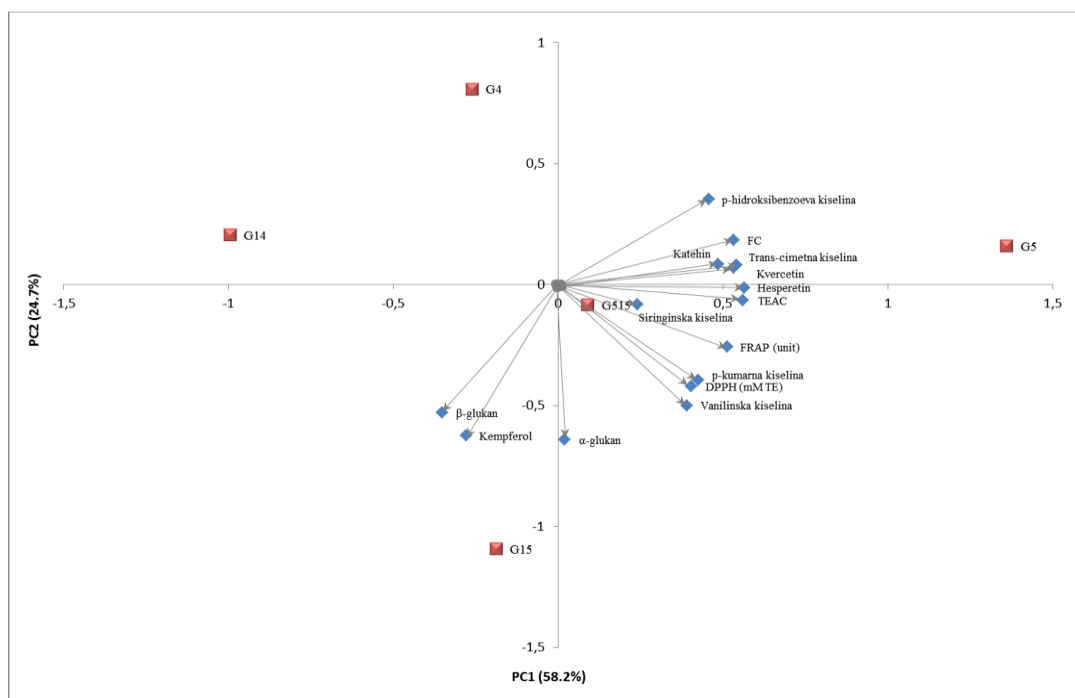
	Uzorak	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	G4	0,46	0,01	0,01
	G5	0,82	0,03	0,02
	G14	n.d.	-	-
	G15	n.d.	-	-
	G515	0,02	0,00	0,00
katehin	G4	4,49	0,04	0,02
	G5	4,93	0,08	0,05
	G14	2,35	0,10	0,06
	G15	3,90	0,01	0,00
	G515	4,05	0,04	0,02
vanilinska kiselina	G4	1,51	0,06	0,03
	G5	2,06	0,03	0,02
	G14	1,50	0,20	0,12
	G15	2,08	0,03	0,01
	G515	2,02	0,01	0,00
siringinska kiselina	G4	1,22	0,05	0,03
	G5	0,82	0,03	0,02
	G14	n.d.	-	-
	G15	1,08	0,08	0,04
	G515	0,98	0,00	0,00

<i>p</i> -kumarinska kiselina	G4	0,29	0,02	0,01
	G5	0,65	0,02	0,01
	G14	0,41	0,02	0,01
	G15	0,54	0,06	0,03
	G515	0,48	0,02	0,01
kvercetin	G4	n.d.	-	-
	G5	0,02	0,00	0,00
	G14	n.d.	-	-
	G15	n.d.	-	-
	G515	0,01	0,00	0,00
<i>trans</i> -cinaminska kiselina	G4	n.d.	-	-
	G5	0,06	0,00	0,00
	G14	n.d.	-	-
	G15	n.d.	-	-
	G515	0,02	0,00	0,00
kempferol	G4	n.d.	-	-
	G5	n.d.	-	-
	G14	0,28	0,01	0,00
	G15	0,50	0,05	0,03
	G515	0,26	0,01	0,00
hesperetin	G4	3,47	0,05	0,03
	G5	5,53	0,00	0,00
	G14	1,41	0,00	0,00
	G15	3,42	0,04	0,02
	G515	3,87	0,12	0,07
naringenin	G4	6,84	0,07	0,02
	G5	8,10	0,09	0,08
	G14	1,99	0,04	0,02
	G15	2,12	0,02	0,01
	G515	5,44	0,14	0,05

n.d. – nije detektovano

Kako bi se lakše uočila razdvajanja, urađena je multivarijantna statistička obrada (slika 5.16). Uzorci su prikazani kao tačkaste vrednosti, a varijable kao vektori. Na slici se uočava sličan trend kao u slučaju ispitivanja antioksidativnog potencijala: izdvajaju se ekstrakti G5 i G15, dok se uzorci G4 i G14 grupišu u levom gornjem kvadrantu, što bi se

moglo objasniti ukupnom količinom dobijenih fenolnih materija u pojedinačnim uzorcima. Zapažamo da postoji jaka pozitivna zavisnost između svih fenolnih komponenti međusebno, izuzev u slučaju kempferola. Ukoliko pogledamo odnos antioksidativnih metoda i pojedinačnih fenola uočavamo da postoji pozitivna zavisnost kod svih, izuzev kod kempferola. Ovakav podatak ne iznenađuje jer kempferol ima najnižu antiradikalnu sposobnost od svih ispitanih fenola (Khanduja and Bhardwaj 2003, Granato et al. 2017). Moglo bi se pretpostaviti i da najveći uticaj na DPPH vrednosti imaju vanilinska i *p*-kumarinska kiselina, na FRAP vrednosti siringinska kiselina, na TEAC vrednosti hesperetin, siringinska, kvercetin, *trans*-cinaminska kiselina i katehin. Kempferol je u negativnoj korelaciji sa svim antioksidativnim metodama izuzev DPPH analize sa kojom nije korelisan. Ovakvi rezultati sugerišu na njegov slab uticaj na antioksidativni potencijal i doprinos ukupnom sadržaju polifenolnih materija. Uočavamo da postoji slaba zavisnost između α -glukana i DPPH, dok β -glukan nije u korelaciji. Međutim, u pogledu svih ostalih analiza glukani su negativno korelisani što ukazuje na njihov slab doprinos ukupnoj antiradikalnoj vrednosti. Ovakav podatak je očekivan jer njihovo dejstvo se uglavnom ispoljava na dejstvo makrofaga (Tsiapali et al. 2001). U cilju izdvajanja ekstrakta sa najvećim biološkim potencijalom, a na osnovu do sada izvršenog analiziranja, mogu se izdvojiti ekstrakti G5 i G15. To su ekstrakti koji pokazuju najveća biološka delovanja i najveći sadržaj bioaktivnih komponenata u sprovedenim analizama. Naime uzorak G5 je imao najveći sadržaj azotnih materija, ugljenih hidrata, β -glukana i fenolnih komponenti od svih etanolnih uzoraka, dok je kod uzoraka dobijenih vodenom ekstrakcijom to bio uzorak G15. Pored ovoga, antioksidativni potencijal, po svim ispitivanim metodama je bio najviši. U skladu sa tim, dalja ispitivanja usmerena su ka tim uzorcima.



Slika 5.16. *Bi-plot* ispitivanih ekstrakata za fenolne komponente, antioksidativni potencijal i glukane

5.2.13. LC-MS analiza ekstrakata *Ganoderma lucidum*

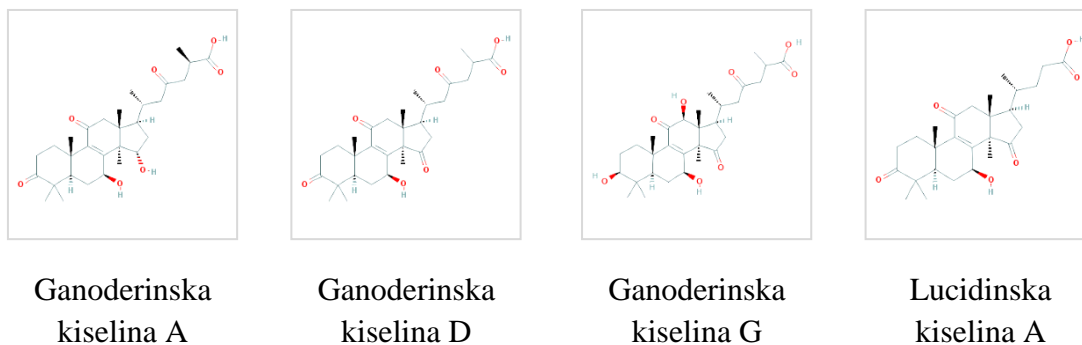
Od posebnog je interesa činjenica da je rod *Ganoderma* bogat izvor gorkih terpena, čiji sadržaj varira u zavisnosti od vrste, mesta gajenja i uslova pod kojima gljiva raste. Iz *G. lucidum* je izolovan čitav niz oksidisanih triterpena, među kojima su veoma značajne ganoderinske kiseline, jedinstvene za ovaj rod i podeljene u tri tipa, prema lokaciji u telu gljive. Ganoderinske kiseline A, B i H, koje pripadaju tipu I, detektovane su samo u plodonosnom telu, dok su R, S i T, koje pripadaju tipu III, glavni triterpeni micelijuma. Ekstrakcija triterpena obavlja se obično uz prisustvo organskih rastvarača (metanola, etanola, acetona, hloroforma, etra ili pomoću njihove mešavine). Ekstrakt se može prečišćavati različitim metodama, u zavisnosti od toga da li sadrži kisele ili nekisele triterpene. Danas se sve veći broj istraživanja posvećuje neprečišćenim, tj. sirovim ekstraktima. Pretpostavlja se da pojedinačne komponente nemaju tako visoku efikasnost,

već je njihov efekat mnogo izraženiji kada se nalaze sa ostalim bioaktivnim jedinjenjima. U tabeli 5.24 prikazan je sadržaj triterpenskih kiselina dobijen analizom ekstrakata G5 i G15.

Tabela 5.24. Količina triterpenskih kiselina u uzorcima ekstrakata *Ganoderma lucidum*

No	G5	G15	λ_{max}	Molekularna	Masa i m/z	MRM	Jedinjenja
t_R (min)	(%)	(%)	(nm)	formula i	(izmereno)	tranzicija	
DAD/MS				masa			
1 8.00/8.08	0.2465	0.2222	256	C ₃₀ H ₄₆ O ₇ (518.3087)	518.3244; 517.3168; 563.3232; 1035.6402	517→499	Ganoderinska kiselina C ₂
2 8.36/8.45	0.1013	0.1239	256	C ₂₇ H ₄₀ O ₆ (460.2825)	460.2824; 459.2750; 505.2812; 919.5583	459→441 459→385	Lucideninska kiselina LM ₁
3 8.51/8.59	0.1829	0.1529	254	C ₃₀ H ₄₂ O ₈ (530.2879)	530.2879 529.2806 575.2862	529→511 511→467	Ganoderinska kiselina C ₆
4 8.83/8.92	0.3979	0.3811	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	0.3121	0.2557	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	0.2099	0.2258	258	C ₂₉ H ₄₀ O ₈ (516.2723)	516.2810; 515.2738	515→473	Lucideninska kiselina E
7 9.55/9.65	0.4529	0.3822	254	C ₃₀ H ₄₀ O ₈ (528.2723)	528.2723 527.2651 573.2757	527→509 509→465	Elfvinginska kiselina A
8 9.93/10.04	0.8571	0.7293	256	C ₃₀ H ₄₄ O ₇ (516.3087)	516.3088; 515.3015; 561.3073; 1031.6099	515→497	Ganoderinska kiselina A
9 10.52/10.63	0.4228	0.3941	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 10.63/10.74	0.1242	0.1262	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 11.11/11.22	0.3382	0.2945	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 11.29/11.40	0.2613	0.3232	254	C ₂₉ H ₃₈ O ₈ (514.2566)	514.2627; 513.2554	513→471	Lucideninska kiselina D ₂
13 11.40/11.52	0.0565	0.0466	254	C ₃₀ H ₄₀ O ₇ (512.2774)	512.2773; 511.2697; 557.2763; 1023.5455	511→493 493→449	Ganoderinska kiselina D
14 11.94/12.06	0.3330	0.2610	254	C ₃₂ H ₄₂ O ₉ (570.2829)	570.2829; 569.2757; 1139.5577	569→551 551→509	Ganoderinska kiselina F
15 12.10/12.23	0.0756	0.0586	254	C ₃₀ H ₄₂ O ₇ (514.2930)	514.2930; 513.2854; 559.2932; 1027.5754	513→451 513→437	Ganoderinska kiselina J

Kao najdominantnije komponente izdvojile su se ganoderinske kiseline (GK) A, D i G (slika 5.17) dok je sadržaj ganoderinskih kiselina C i B bio nešto niži. Ganoderinska i lucidinska kiselina (LK) predstavljaju najveći broj sekundarnih metabolita izolovanih iz *G. lucidum*, i dobijeni rezultati su u skladu sa podacima koji se mogu naći u literaturi. Primećeno je i da je sadržaj svih detektovanih komponenti bio značajno veći kod ekstrakta dobijenog alkoholnom ekstrakcijom, izuzev u slučaju LK LM₁, E i D₂. Količina 12-hidroksi-ganoderinske kiseline se nije značajno razlikovala u uzorcima. Utvrđeno je i prisustvo jako (GK A, J i LK A) i umereno (GK B i C₂) gorkih triterpena, te se može očekivati izražena gorčina dobijenih ekstrakata. Kao što je već napomenuto medicinska svojstva GK i LK su opisana u brojnim studijama, a njihova prisutnost u uzorcima ukazuje na moguća medicinska svojstva dobijenih ekstrakata.



Slika 5.17. Najdominantnije triterpenske kiseline u ekstraktima G5 i G15

5.2.14. Analiza isparljivih komponenti ekstrakata *Ganoderma lucidum*

Mali broj istraživanja bavio se aromatskim kompleksom *G. lucidum* i medicinskih gljiva uopšte. U tabeli 5.25 dat je prikaz aromatskog kompleksa navedenih ekstrakata. Kako je G5 dobijen alkoholnom ekstrakcijom (upotrebom žitnog alkohola), moguće je u uzorku očekivati i isparljive komponente, koje potiču od rastvarača.

Identifikovano je 30 komponenti, a među najdominantnijim su etil-acetat, heksadekanska kiselina, izobutanol i etil oleat, respektivno.

Uz ovakav aromatski kompleks, može se očekivati oštar, karakterističan miris ekstrakata, koji ne odgovara aromatskom kompleksu piva. U G15 detektovane su manje

količine isparljivih komponenti, jer je uzorak imao veliki sadržaj polisaharida i nije bio pogodan za standardnu gasno-hromatografsku analizu. Kod njega je potrebno primeniti *head space* tehniku za dobijanje preciznijih rezultata.

U ispitivanjima koje je sproveo Taskin i saradnici detektovano je 18 aromatskih komponenti iz micelijuma gljive. Ekstrakcija je vršena vodom i TT na 121°C, a ekstrakt je podvrgnut gasnoj analizi sa upotrebom *head space* tehnike.

Kao najdominantnije komponente, izdvojeni su 1-okten-triol, 3-oktanol, 1-oktanol i 2-etil-1-heksanol.

U istraživanjima koja je izvršio Čen sa saradnicima, izolovano je 58 isparljivih komponenti iz micelijuma *G. lucidum*, među kojima su najdominantnije 1-okten-triol, etanol, heksanal, 3-oktanol i 3-oktanone.

U svim navedenim studijama, micelija je korišćena za određivanje isparljivih aromatičnih jedinjenja gljive, pri čemu je kvantifikacija rađena preko površine pikova, te se dobijeni rezultati ne mogu adekvatno uporediti sa prethodno navedenim literarnim podacima.

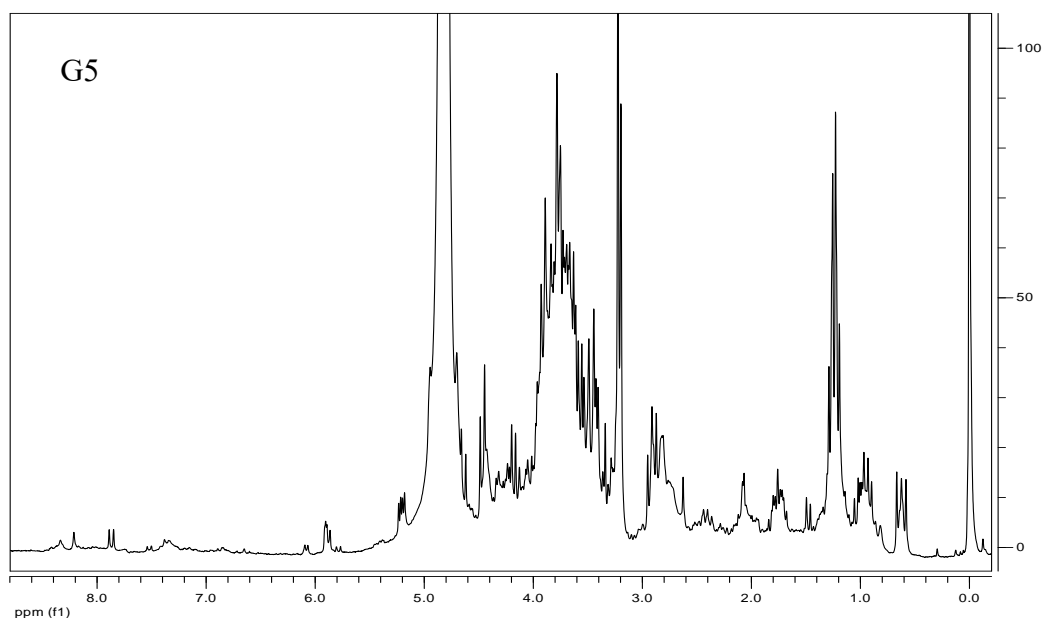
Tabela 5.25. Kvantitavna analiza aromatskog kompleksa ekstrakata *Ganoderma lucidum*

Supstanca	G5 (mg/l)	G15 (mg/l)	Supstanca	G5 (mg/l)	G15 (mg/l)
1 acetaldehid	0,119	-	16. furfural	0,803	-
2 1,1 dietoksietan	6,082	-	17. STD	2,000	2,000
3 etil-acetat	15,662	-	18. etil-dodekanoat	0,088	-
4 propanol	1,446	-	19. heksanska kiselina	0,560	-
5 heksanal	0,146	-	20. benzil-alkohol	0,055	-
6 izobutanol	10,291	-	21. oktanska kiselina	1,010	-
7 n-Butanol	0,035	-	22. Eugenol	0,264	-
8 3-penten-2-ol	0,558	0,308	23. etil-tetradekanoat	1,724	-
9 izoamil-alkohol	4,695	0,050	24. Vanilin	0,504	-
1 etil-heksanoat	0,102	-	25. etil-stearat	0,147	-
1 pentanol	0,063	-	26. etil-oleat	9,885	0,250
1 etil-laktat	0,076	-	27. dodekanska kiselina	0,803	0,065
1 heksanol	0,047	-	28. Fitol	0,690	-
1 etil-oktanoat	0,034	-	29. metil-linoleat	1,705	-
1 sirćetna kiselina	0,373	-	30. heksadekanska kiselina	12,092	2,050

5.2.15. NMR spektroskopija ekstrakata G5 *Ganoderma lucidum*

Protonskom NMR spektroskopijom izvršena je analiza ekstrakta G5 (slika 5.20). U alifatičnom delu spektra (0-3 ppm) uočavaju se pikovi koji potiču uglavnom od terpenkih komponenata (Ganoderinske kiseline), amino-kiselina i masnih kiselina.

Na srednjem delu spektra (3-6 ppm) vidljivi su pikovi ugljenih hidrata i triterpenkih kiselina u opsegu od 4 do 4,5 ppm. Signali između 6 i 8,5 ppm karakteristični su za aromatski region i ukazuju na prisustvo aromatičnih amino-kiselina, nukleozida, aromatičnih alkohola i polifenolnih jedinjenja. Protonskom NMR spektroskopijom dodatno je potvrđeno prisustvo bioaktivnih komponenti u ekstraktu G5.

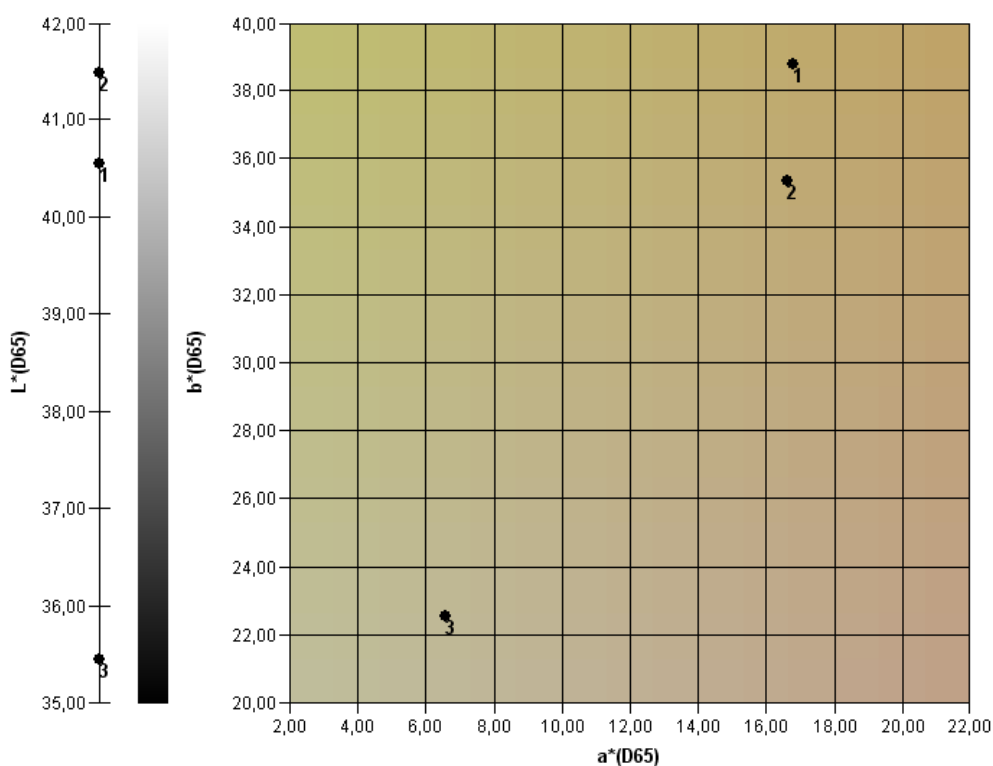


Slika 5.20. 200 MHz ¹H NMR spektar ekstrakta *Ganoderma lucidum*

5.2.16. Analiza boje ekstrakta CIElab metodom

Boja ekstrakata može se standardno analizirati primenom klasične spektroskopije na određenoj talasnoj dužini. Međutim, CIElab sistem pruža mogućnost snimanja boje –

predstavljene kao tačke – u trodimenzionalnom prostoru, locirane između koeficijenta svetlosti i dve koordinate. U nekoliko studija, vršena su ispitivanja zavisnosti sadržaja polifenolnih materija i boje dobijene ovim postupkom. Upotrebom ove tehnike bilo je moguće na brz i jednostavan način predvideti količinu polifenolnih materija kod vina. Međutim, primena iste tehnike na plodove višnje imala je negativno korelisan odnos sa sadržajem polifenolnih materija (Viljevac et al. 2012). Na slici 5.21 prikazani su rezultati merenja za tri ekstrakta, G515 (1), G15 (2) i G5 (3). Ekstrakt G515 (3) je uzet kao kontrolni uzorak, s obzirom da je nastao iz G5 i G15. Zapaženo je da je ekstrakt G5 najtamniji i da se nalazi u donjem delu dijagrama, a da za njim slede uzorci G15 i G515. Ukoliko se rezultati uporede sa sadržajem polifenolnih materija, može se pretpostaviti da su ove vrednosti u direktnoj korelaciji i međusobno zavisne.



Slika 5.21. Rezultati CIElab analize uzoraka G515 (1), G15 (2) i G5 (3) (L* definiše svetlost i ima vrednosti od 0 do 100, pri čemu 0 predstavlja crnu boju, 100 belu, dok su a* i b* parametri koji nemaju brojčana ograničenja (a* pozitivna vrednost određuje crvenu boju, b* pozitivna vrednost definiše žutu boju))

5.3. Postupci dobijanja piva sa *Ganoderma lucidum* i senzorna ocena dobijenih piva

U okviru drugog dela istraživanja izvršeno je ispitivanje mogućih postupaka za dobijanje piva sa dodatkom bioaktivnih komponenata gljive *Ganoderma lucidum*.

5.3.1. Pivo obogaćeno gljivom *Ganoderma lucidum* dodatom u ohmeljenu sladovinu

Prvi deo ekperimentalnih piva dobijen je korišćenjem industrijski ohmeljene sladovine i *Ganoderma lucidum* u obliku etanolnog ekstrakta (G5), suvog plodonosnog tela gljive i njihovom kombinacijom (tabela 5.26). U tom smislu, bilo je potrebno utvrditi optimalne količine kako bi se dobio proizvod što prihvatljivijih senzornih karakteristika. Proizvedeno je pet piva sa različitim količinama i kombinacijama gljive. Količine dodate u sladovinu odabrane su na osnovu literarnih podataka za preporučene dnevne doze. Praćena je dinamika fermentacije, aktivnost kvasca i senzorna svojstva dobijenih proizvoda.

Tabela 5.26. Proizvodnja eksperimentalnih piva

	Ohmeljena sladovina	Kvasac	<i>G. lucidum</i>		Temperatura fermentacije (°C)
			Usitnjeno plodonosno telo (g/l)	Ekstrakt (ml/l)	
SF	+	<i>S. pastorianus</i>	-	-	10
PF1	+	<i>S. pastorianus</i>	3,0	-	10
PF2	+	<i>S. pastorianus</i>	6,0	-	10
PF3	+	<i>S. pastorianus</i>	-	1,5	10
PF4	+	<i>S. pastorianus</i>	-	3,0	10
PF5	+	<i>S. pastorianus</i>	3,0	1,5	10

5.3.1.1. Uticaj *Ganoderma lucidum* na dinamiku fermentacije

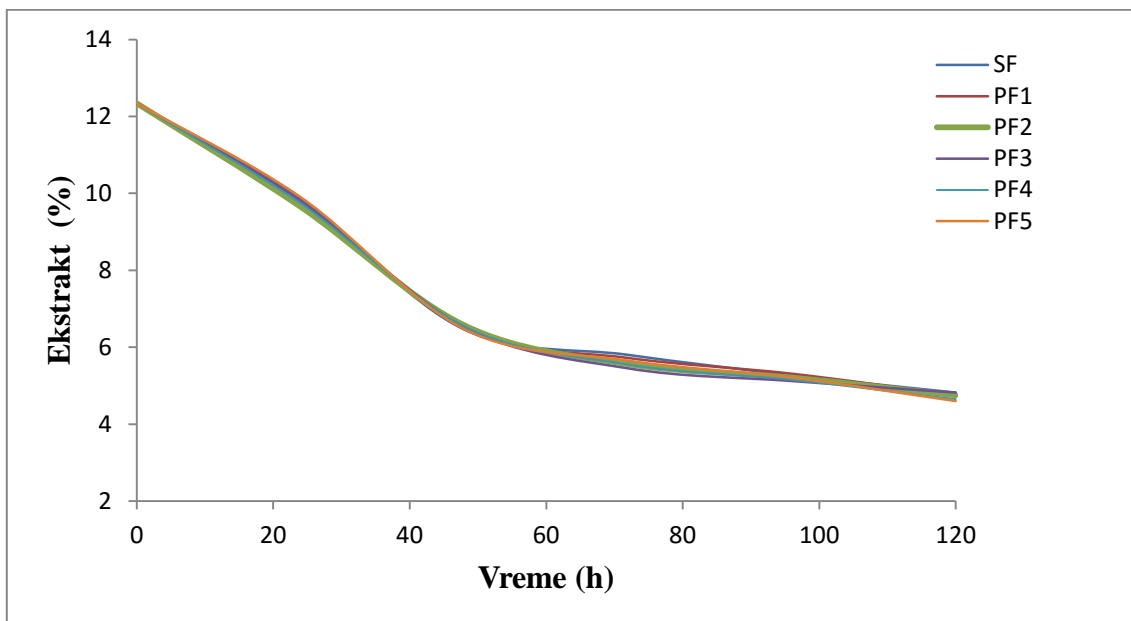
Proces fermentacije započinje zasejavanjem sladovine kvascem, pri čemu se mora voditi računa o velikom broju faktora koji utiču na sam proces. Glavni među njima su:

izbor soja kvasca, generacija kvasca, raspodela kvasca unutar suda, geometrija fermentora, aeracija, pH sladovine, količina fermentabilnih šećera, količina inokuluma koji se dodaje i temperatura. Najveći uticaj na brzinu fermentacije imaju dva poslednja. Cilj je bio utvrditi uticaj plodonosnog tela i ekstrakta *Ganoderma lucidum* na brzinu fermentacije. Svi uzorci su fermentisani pod identičnim sudovima (slika 5.22).



Slika 5.22. Izgled sudova za fermentaciju

Početni sadržaj ekstrakta u osnovnoj sladovini iznosio je 12,34%. Tokom pet dana praćena je promena polaznog ekstrakta, a dobijeni rezultati su predstavljeni na slici 5.23. Kao što se može zapaziti na grafikonu, trend-linije su preklopljene, što ukazuje na to da u ispitivanim uzorcima nije bilo značajnih razlika u pogledu uticaja *Ganoderma lucidum* na brzinu fermentacije. Do sličnih podataka došlo se i ispitivanjem uticaja gljive na aktivnost i broj ćelija kvasca, koji je na početku iznosio od 2,22 do $2,48 \times 10^7$ ćelija/ml, nakon 36h 3,92 do $3,99 \times 10^7$ ćelija/ml, i na samom kraju fermentacije 4,55 do $4,67 \times 10^7$ ćelija/ml. Sadržaj alkohola nakon fermentacije bio je sličan u svim uzorcima i iznosio je 4,95 do 5,14% v/v. Iz prikazanih vrednosti može se zaključiti da *Ganoderma lucidum* nije imala značajnih efekata na broj ćelija i aktivnost kvasaca.



Slika 5.23. Promena sadržaja ekstrakta tokom primarne fermentacije

5.3.1.2. *Senzorna analiza piva dobijenih fermentacijom sa Ganoderma lucidum*

Senzorno ocenjivanje dobijenih piva izvršeno je od strane muških i ženskih potrošača. Kao degustaciona metoda ocenjivanja, koristio se metod bodovanja. Svakom parametru određenog uzorka pripisana je ocena (1-5) za njih šest: aroma, ukus, punoća, gorčina, svežina i opšti utisak. Osnovni statistički parametri i analiza varijanse za senzorna svojstva dobijenih piva prikazani su u tabeli 5.27.

Tabela 5.27. Osnovni statistički parametri senzornih svojstava analiziranih vrsta piva i rezultati analize varijanse

Senzorna osobina	Pivo	Srednja vrednost	Medijana	Std. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	F test	p
Aroma	SF	3,90	4,0	0,661	16,95	0,561	0,729
	PF1	3,68	4,0	0,748	20,36		
	PF2	3,95	4,0	0,776	19,65		
	PF3	3,65	4,0	0,564	15,46		
	PF4	3,73	4,0	0,786	21,10		
	PF5	3,75	4,0	0,819	21,84		
Ukus	SF	3,75	4,0	0,881	23,50	1,923	0,096
	PF1	3,35	3,5	0,844	25,21		
	PF2	4,05	4,0	0,647	15,97		
	PF3	3,85	4,0	0,489	12,71		
	PF4	3,73	4,0	0,91	24,43		
	PF5	3,75	4,0	0,526	14,02		
Punoća	SF	3,83	4,0	0,922	24,09	1,097	0,366
	PF1	3,48	3,5	0,697	20,07		
	PF2	4,03	4,0	0,716	17,79		
	PF3	3,73	4,0	0,617	16,57		
	PF4	3,85	4,0	0,961	24,96		
	PF5	3,85	4,0	0,709	18,41		
Gorčina	SF	3,33	3,5	0,893	26,84	1,846	0,109
	PF1	3,63	4,0	0,686	18,92		
	PF2	4,00	4,0	0,725	18,14		
	PF3	3,88	4,0	0,705	18,19		
	PF4	3,85	4,0	1,027	26,68		
	PF5	3,88	4,0	0,741	19,13		
Svežina	SF	4,23	4,0	0,697	16,50	2,233	0,056
	PF1	3,78	4,0	0,658	17,44		
	PF2	4,45	4,5	0,583	13,09		
	PF3	4,23	4,0	0,638	15,10		
	PF4	4,03	4,0	0,85	21,13		
	PF5	4,20	4,0	0,637	15,16		
Opšti utisak	SF	3,85	4,0	0,709	18,41	1,875	0,104
	PF1	3,55	4,0	0,667	18,79		
	PF2	4,08	4,0	0,613	14,68		
	PF3	3,88	4,0	0,483	12,47		
	PF4	3,85	4,0	0,829	21,53		
	PF5	3,90	4,0	0,528	13,54		
Dopadljivost	SF	3,60	4,0	0,94	26,12	1,483	0,201
	PF1	3,45	4,0	0,759	22,00		
	PF2	3,85	4,0	0,605	14,93		
	PF3	3,60	4,0	0,754	20,94		
	PF4	3,70	4,0	0,979	26,45		
	PF5	3,40	3,0	0,995	29,26		

Iz prikazanih rezultata statističke analize, može se videti da nijedna ispitivana senzorna karakteristika piva nije dala statistički značajne razlike između pojedinih vrsta piva, jer su sve p vrednosti bile veće od 0,05. Na osnovu ovakvog ishoda, može se zaključiti da ocenjivači ne primećuju razlike između dobijenih piva ni u jednom segmentu, što znači da korišćenje plodonosnog tela i ekstrakata, u postupku fermentacije, nije dovelo do značajnih promena u senzornim karakteristikama i da se može podjednako koristiti u procesu proizvodnje. Cilj daljeg istraživanja bio je pojednostavljenje postupka proizvodnje piva, i u tom pogledu u nastavku rada korišćen je samo ekstrakt plodonosnog tela *Ganoderma lucidum* (G5).

5.3.2. Dobijanje piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* dodatom u gotov proizvod

Postupak proizvodnje piva, sam po sebi, predstavlja dug i komplikovan proces. Uvođenje novih sirovina u tehnološki postupak, poput plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum*, otežalo bi ga i poskupelo. Još jedan od problema predstavljala bi velika količina gljive koju je potrebno skladištiti, dodatne mašine za proces dezintegracije i, na kraju, mogući izvori kontaminacije usled prisustva spora gljive.

U tom pogledu, potrebno je bilo pronaći jednostavniji postupak za dobijanje ovakvih piva. Ispitana je mogućnost dodavanja već pripremljenog ekstrakta (G5) u gotov proizvod, nakon otakanja. Ovakav pristup u najmanjoj meri opterećuje postupak, zahteva minimalna ulaganja u tehnološkom i investicionom smislu i omogućava lakšu standardizaciju finalnog proizvoda. Shodno tome, odabrano je komercijalno pivo tipa *pils* sa lokalnog tržišta. Izvršena je analiza njegovog hemijskog sastava i utvrđene su sledeće vrednosti: sadržaj alkohola 4,72% v/v; ekstrakt u osnovnoj sladovini 10,99%; prividni ekstrakt 2,04%; pH 4,38; boja 8,35 EBC jedinica; CO₂ 5,23 g/l; gorčina 24,51 EBC jedinica; diacetil 18,1 µg/l; acetaldehid 5,8 mg/l; dimetilsulfid 18,0 mg/l; etilacetat 12,1 mg/l; propanol 11,9 mg/l; pentadion 21,4 µg/l, izobutanol 9,8 mg/l; izoamilacetat 1,3 mg/l; izo-amilalkohol 45,4 mg/l; viši alkoholi ukupno 67,1 mg/l; estri ukupno 13,3 mg/l. U tabeli

5.28 prikazane su količine ekstrakta dodate u pivo, čiji je izbor utvrđen na osnovu literarnih podataka različitih studija.

Naime, u većini sprovedenih istraživanja korišćeno je ili samleveno plodonosno telo gljive ili ekstrakt. Količine gljive upotrebljene u različitim *in vitro* istraživanjima kretale su se od 1 do 72g suvog plodonosnog tela u dužem vremenskom periodu, zavisno od tipa bolesti koji se tretirao (Gao et al. 2002, Gao et al. 2003, Chu et al. 2012, Li et al. 2007, Liu et al. 2007, Hijikata and Yamada 1998). Kako cilj ovog rada jeste dobijanje proizvoda sa dodatkom vrednošću, a ne dijetetskih proizvoda, započelo se sa najmanjim količinama gljive, tj. 1,6 g, što je odgovaralo 0,50ml dobijenog ekstrakta. Ostale količine ekstrakta rasle su proporcionalno, dostižući maksimalnu vrednost od 4,5 ml ekstrakta po litri piva, što je odgovaralo količini od 14,4g plodonosnog tela *Ganoderma lucidum* (tabela 5.28).

Tabela 5.28. Količine ekstrakta *Ganoderma lucidum* dodate u komercijalno pivo

	<i>Ganoderma lucidum</i> ekstrakt (G5) (ml/l)	Ekvivalent plodonosnog tela (g)	Temperatura odležavanja (°C)	Vreme odležavanja (h)
SP	-	-	4	24
PG1	0,50	1,6	4	24
PG2	1,00	3,2	4	24
PG3	1,50	4,8	4	24
PG4	3,00	9,6	4	24
PG5	4,50	14,4	4	24

5.3.2.1. Senzorna analiza piva dobijenih dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum* u gotov proizvod

Senzorna svojstva (aroma, ukus, punoća ukusa, gorčina, svežina, opšti utisak i dopadljivost) oglednih piva ocenjena su od strane muških i ženskih potrošača metodom bodovanja, a rezultati su prikazani u tabeli 5.29.

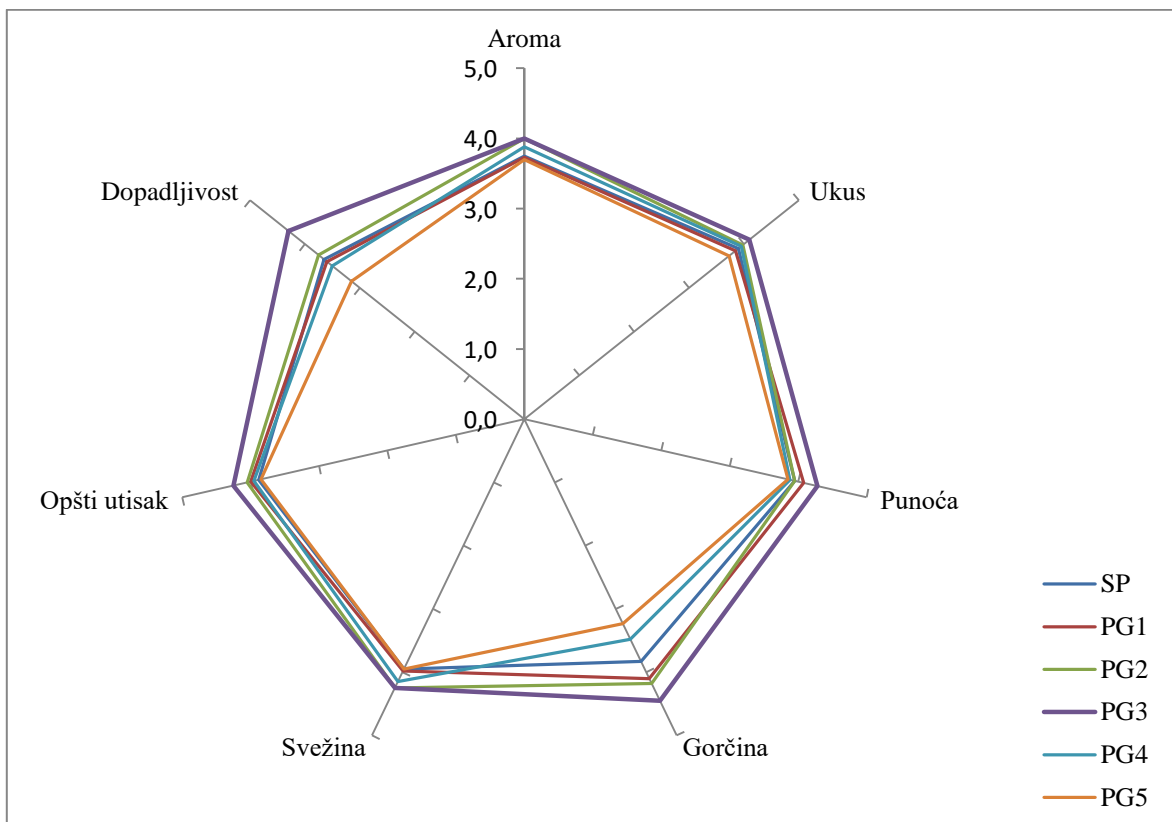
Tabela 5.29. Osnovni statistički parametri senzornih ocena oglednih piva

Senzorna ocena	Pivo	Sr. vredn.	Med.	Min.	Max.	St. dev.	St. greška	Koef. var. (%)
Aroma	SP	3,75 ^a	4,0	3,0	4,5	0,50	0,11	13,33
	PG1	3,73 ^a	4,0	2,0	5,0	0,77	0,17	20,65
	PG2	4,00 ^a	4,0	3,0	5,0	0,51	0,11	12,82
	PG3	4,00 ^a	4,0	3,0	4,5	0,46	0,1	11,47
	PG4	3,88 ^a	4,0	2,0	5,0	0,76	0,17	19,58
	PG5	3,70 ^a	4,0	2,0	5,0	0,77	0,17	20,75
Ukus	SP	3,90 ^a	4,0	3,0	5,0	0,60	0,13	15,34
	PG1	3,85 ^a	4,0	2,0	5,0	0,78	0,17	20,25
	PG2	3,98 ^{ab}	4,0	3,0	5,0	0,73	0,16	18,47
	PG3	4,10 ^b	4,0	3,0	5,0	0,48	0,11	11,60
	PG4	3,95 ^{ab}	4,0	2,0	5,0	0,74	0,17	18,78
	PG5	3,73 ^{ac}	4,0	2,0	5,0	0,70	0,16	18,72
Punoća	SP	3,95 ^a	4,0	3,0	5,0	0,43	0,1	10,79
	PG1	4,08 ^a	4,0	3,0	5,0	0,65	0,15	16,06
	PG2	3,95 ^a	4,0	3,0	5,0	0,69	0,15	17,38
	PG3	4,28 ^b	4,0	3,5	5,0	0,41	0,09	9,06
	PG4	3,88 ^a	4,0	2,0	5,0	0,67	0,15	17,20
	PG5	3,85 ^a	4,0	2,0	5,0	0,93	0,21	24,24
Gorčina	SP	3,83 ^{abc}	4,0	3,0	5,0	0,59	0,13	15,45
	PG1	4,10 ^{bcd}	4,0	3,0	5,0	0,64	0,14	15,63
	PG2	4,18 ^{cd}	4,3	3,0	5,0	0,77	0,17	18,34
	PG3	4,45 ^d	4,5	4,0	5,0	0,39	0,09	8,85
	PG4	3,48 ^{ab}	4,0	2,0	5,0	0,90	0,20	25,77
	PG5	3,23 ^a	3,0	2,0	4,5	0,97	0,22	29,96
Svežina	SP	3,95 ^a	4,0	3,0	4,5	0,36	0,08	9,09
	PG1	3,98 ^a	4,0	2,0	5,0	0,75	0,17	18,91
	PG2	4,25 ^b	4,0	3,0	5,0	0,66	0,15	15,50
	PG3	4,25 ^b	4,5	3,0	5,0	1,08	0,24	25,46
	PG4	4,15 ^{ab}	4,0	2,0	5,0	0,81	0,18	19,58
	PG5	3,95 ^a	4,0	2,0	5,0	0,67	0,15	16,88
Opšti utisak	SP	3,88 ^a	4,0	3,0	4,5	0,36	0,08	9,24
	PG1	4,00 ^a	4,0	2,0	5,0	0,69	0,15	17,21
	PG2	4,05 ^a	4,0	3,0	5,0	0,69	0,15	16,95
	PG3	4,25 ^b	4,0	4,0	5,0	0,30	0,07	7,14
	PG4	3,95 ^a	4,0	2,0	5,0	0,71	0,16	17,85
	PG5	3,85 ^a	4,0	2,0	5,0	0,69	0,15	17,93
Dopadljivost	SP	3,65 ^a	4,0	3,0	4,0	0,59	0,13	16,09

PG1	3,60 ^a	4,0	3,0	5,0	0,82	0,18	22,80
PG2	3,75 ^a	4,0	2,0	5,0	0,91	0,20	24,28
PG3	4,30 ^b	4,0	4,0	5,0	0,47	0,11	10,93
PG4	3,50 ^a	4,0	3,0	5,0	0,76	0,17	21,74
PG5	3,15 ^a	3,0	2,0	5,0	0,93	0,21	29,63

U istoj koloni sredine obeležene različitim slovima značajno se razlikuju na nivou značajnosti $p < 0,05$

Dobijene ocene za pojedinačne senzorne karakteristike piva kretale su se od 2,0 do 5,0. Najniže su bile za aromu, u proseku oko 2,0, dok su najviše dodeljene ukusu, gorčini i punoći ukusa (4,5 do 5,0). Dobijene vrednosti za sve ispitane parametre bile su homogene ($C_v < 30\%$), od kojih najviše one za uzorak PG3 i to za opšti utisak, gorčinu i punoću ukusa ($C_v = 7,14\%$, $C_v = 8,85\%$ i $C_v = 9,06\%$, respektivno). Na osnovu analize varijanse, uočava se da postoje statistički značajne razlike u gorčini, dok se većina ostalih parametara nije značajno razlikovala. Grafički prikaz senzornih karakteristika svih piva prikazan je na slici 5.24.

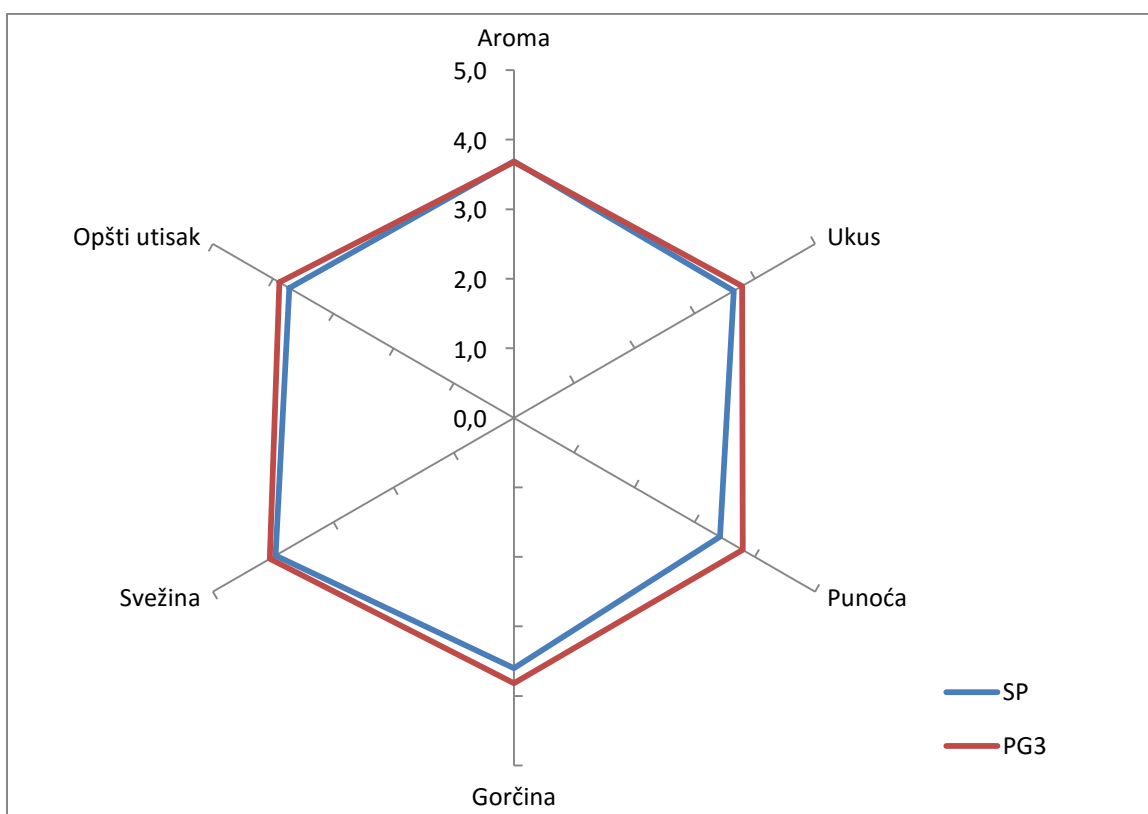


Slika 5.24. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena osnovnih senzornih karakteristika analiziranih piva

Na dijagramu se uočavaju male razlike ocena za aromu, ukus i svežinu. Većina uzoraka, izuzev uzorka PG3, poklapa se u vrednostima za opšti utisak. Po dopadljivosti izdvaja se PG5, sa najvišim sadržajem ekstrakta, kao najlošiji. Razdvajanje uzoraka se najbolje uočava kod gorčine, pri čemu PG5 i PG4 imaju približne vrednosti. Ovakav ishod može biti posledica veoma intenzivne gorčine piva, usled velike koncentracije prisutnih ganoderinskih kiselina. Sa druge strane, uzorci PG1, PG2 i PG3 ocenjeni su kao bolji od polaznog piva. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je dodavanje ekstrakta u količinama od 0,5 i 1,0 ml/l dalo pivo sa približno istim karakteristikama kao polazno pivo, dok je dodavanje ekstrakta u količinama od 3,0 i 4,5 ml/l dovelo do lošijih senzornih karakteristika, posebno u pogledu gorčine i dopadljivosti uzorka. Statistički značajne razlike imao je PG3 (1,5 ml/l), u pogledu punoće ukusa, gorčine, opšteg utiska i dopadljivosti i u odnosu na sve ostale uzorke. U cilju dobijanja detaljnijih podataka, za

senzornu prihvatljivost proizvedenog piva (PG3) sprovedeno je ispitivanje na većem uzorku potrošača (105) sa detaljnijom statističkom analizom.

Rezultati senzorne prihvatljivosti potrošača prezentovanih piva i osnovnih senzornih parametara prikazani su na slici 5.25 putem *radar* dijagrama (*paukove mreže*).



Slika 5.25. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena osnovnih senzornih karakteristika polaznog standardnog piva (SP) i piva obogaćenog ekstraktom gljive (PG3)

Očigledno je da je pivo dobijeno sa dodatkom 1,5 ml/l ekstrakta *Ganoderma lucidum* dobro prihvaćeno. Prema dobijenim srednjim vrednostima, ono je ocenjeno isto ili bolje nego standardno. Više informacija o eksperimentalnim rezultatima prikazano je u tabeli 5.30.

Dobijene ocene za pojedinačne senzorne osobine piva kretale su se u rasponu od 1,0 do 5,0. Najniža ocena (1,0) dodeljena je za gorčinu SP, dok je u ostalim senzornim

parametrima iznosila 2,0. Značajno je napomenuti i to da su vrednosti za sve ispitane parametre oba piva bile homogene ($Cv < 30\%$). Najhomogenije su bile za svežinu PG3 i SP ($Cv = 17,704\%$ i $Cv = 18,162$, respektivno) i gorčinu piva PG3 ($Cv = 18,879\%$). Najheterogenije ocene dodeljene su punoći i gorčini SP ($Cv = 24,123\%$ i $Cv = 23,542\%$, respektivno) i aromi PG3 ($Cv = 23,157\%$).

Tabela 5.30. Osnovni statistički parametri senzornih ocena za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum*

Pivo	Senzorna osobina	Sr. vrednost	Medijana	Min.	Max.	Std. devijacija	Std. greška	Koeficijent varijacije Cv (%)
SP	Aroma	3.690	4.0	2.0	5.0	0.715	0.070	19.378
	Ukus	3.648	4.0	2.0	5.0	0.703	0.069	19.285
	Punoća	3.424	3.5	2.0	5.0	0.826	0.081	24.123
	Gorčina	3.600	4.0	1.0	5.0	0.848	0.083	23.542
	Svežina	3.962	4.0	2.0	5.0	0.720	0.070	18.162
	Opšti utisak	3.729	4.0	2.0	5.0	0.717	0.070	19.239
PG3	Aroma	3.681	4.0	2.0	5.0	0.852	0.083	23.157
	Ukus	3.790	4.0	2.0	5.0	0.849	0.083	22.387
	Punoća	3.800	4.0	2.0	5.0	0.745	0.073	19.618
	Gorčina	3.819	4.0	2.0	5.0	0.721	0.070	18.879
	Svežina	4.057	4.0	2.0	5.0	0.718	0.070	17.704
	Opšti utisak	3.895	4.0	2.0	5.0	0.736	0.072	18.897

Statistički, veoma jaka korelacija dobijena je za sve analizirane parametre za oba piva. Podaci za opšti utisak su u vrlo snažnom odnosu sa dobijenim ocenama za ispitane senzorne parametre. Koeficijent višestruke determinacije ukazuje na varijacije u ocenama za opšti utisak, koje se mogu objasniti istovremenim promenama u ocenama ispitanih senzornih parametara za SP 83,93% i PG3 93,59%. Najniži particioni uticaj na opšti utisak SP ima punoća ($r = 0,057$; $p > 0,05$), dok je u slučaju piva sa *Ganoderma lucidum* to aroma ($r = 0,249$; $p < 0,05$). Opšti utisak za SP ($r = 0,526$; $p < 0,01$) i PG3 ($r = 0,549$; $p < 0,01$) zavisi uglavnom od ukusa.

Rezultati diskriminacione analize ukazuju na to da se piva statistički značajno razlikuju u aromi, ukusu, punoći, gorčini i svežini, onda kada su analizirana zajedno (Wilks

Lambda=0,883; F=5,409; p<0,01). Pivo sa *Ganoderma lucidum* imalo je više srednje ocene za sve senzorne parametre i opšti utisak, izuzev za aromu (slika 5.25). Prema *t*-testu ili Vilkoksonovom testu ekvivalentnih parova (kada varijanse uzoraka nisu homogene), statistički su značajno bolje ocenjene punoća ukusa i gorčina PG3 nego SP (tabela 5.31, slika 5.25).

Tabela 5.31. Anaizirane razlike srednjih ocena svih senzornih parametara i opšteg utiska za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum*

Senzorna svojstva i opšti utisak	Levenov test		<i>t</i> -test		Vilkoksonov test	
	F	p	t	p	Z	p
Aroma	6,023*	0,015	-	-	0,334	0,739
Ukus	2,616	0,107	1,579	0,117	-	-
Punoća	1,052	0,306	3,872**	0,000	-	-
Gorčina	4,252*	0,040	-	-	1,975*	0,048
Svežina	0,068	0,794	1,177	0,242	-	-
Opšti utisak	0,072	0,788	1,937	0,055	-	-

F, *t* i Z – uzoračke vrednosti primenjenih testova; p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou p<0,05; ** - statistički značajna razlika na nivou p<0,01

Evidentno je da obogaćivanje piva datim količinama ekstrakta *Ganoderma lucidum* ne pogoršava senzorna svojstva, već se dobija piće sa prijatnijim karakteristikama. Punoća je značajno izraženija, kao i svežina, ukus i opšti utisak. Međutim, gorčina je i dalje najdominantniji faktor ovog piva. Kako je u ekstraktu G5 detektovano prisustvo jako (GK A, J i LK A) i umereno (GK B i C₂) gorkih triterpena, ovakvi rezultati su sasvim očekivani. Dobijene vrednosti za senzornu ocenu PG3 ukazuju da se gorčina, koja potiče od hmelja i od ekstrakta, može kombinovati do određene granice, i da je ona dobijena ocenjena kao prijatnija nego gorčina standardnog piva.

5.3.2.1.1. Razlike senzornih karakteristika analiziranih piva u odnosu na pol

Među 105 osoba koje su učestvovala u senzornom ocenjivanju, udeo onih ženskog pola (70,48%) je bio statistički značajno veći ($\chi^2 = 17,48; p < 0,01$) od onih muškog pola (29,52%). Njihovo ocenjivanje senzorne prihvatljivosti analiziranih piva donekle se razlikovalo: ženski konzumenti su, u poređenju sa muškim, dali nešto više ocene za sva senzorna svojstva za standardno pivo, izuzev za ukus (tabela 5.32).

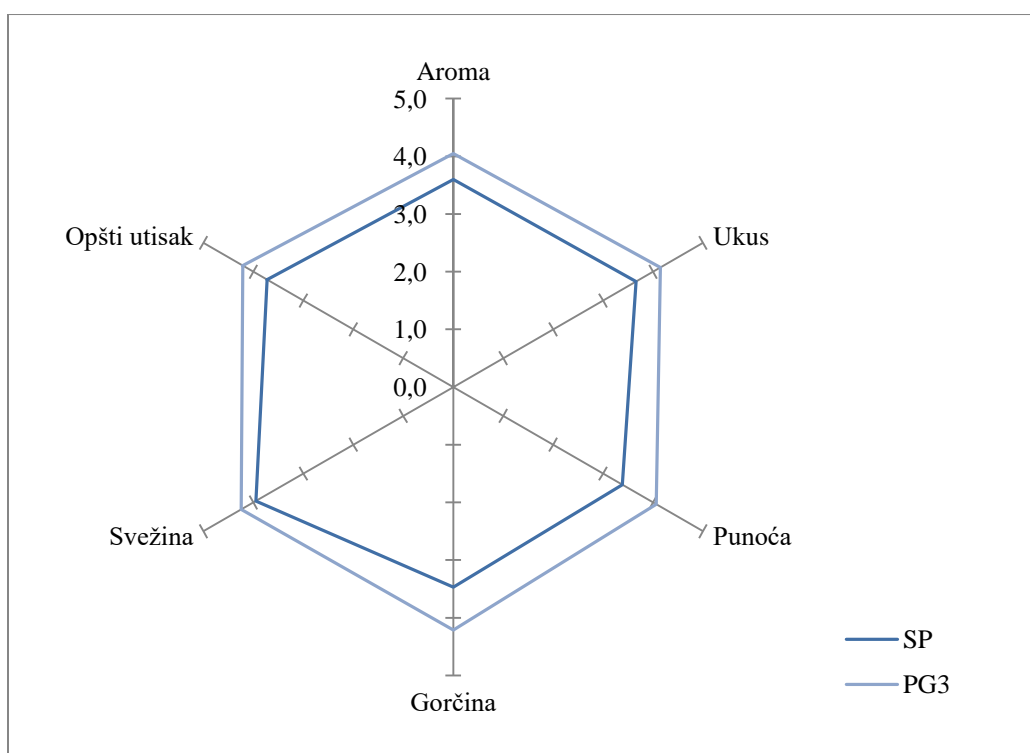
Tabela 5.32. Osnovni statistički parametri i analizirane razlike ocena senzornih svojstava piva i opšteg utiska u odnosu na pol (M-muški ocenjivači, Ž-ženski ocenjivači)

	Senzorna svojstva i opšti utisak	Srednja vrednost		Std. devijacija		Koeficijent varijacije Cv (%)		Levenov test		t-test	
		M	Ž	M	Ž	M	Ž	F	p	t	p
Standardno pivo	Aroma	3.597	3.730	0.651	0.741	18.096	19.870	1.033	0.312	0.868	0.387
	Ukus	3.661	3.642	0.688	0.714	18.787	19.617	0.089	0.765	0.128	0.898
	Punoća	3.387	3.440	0.750	0.860	22.130	25.015	0.462	0.498	0.296	0.768
	Gorčina	3.468	3.655	0.921	0.815	26.570	22.290	2.153	0.145	-1035	0.303
	Svežina	3.952	3.966	0.663	0.746	16.772	18.818	0.488	0.486	0.094	0.925
	Opšti utisak	3.726	3.730	0.693	0.732	18.608	19.621	0.274	0.602	0.025	0.980
Pivo sa <i>G. lucidum</i>	Aroma	4.048	3.527	0.800	0.831	19.749	23.569	1.091	0.299	2.964**	0.004
	Ukus	4.145	3.642	0.721	0.858	17.395	23.564	1.516	0.221	2.867**	0.005
	Punoća	4.065	3.689	0.727	0.730	17.895	19.775	0.015	0.901	2.407*	0.018
	Gorčina	4.210	3.655	0.643	0.692	15.264	18.932	0.438	0.509	3.821**	0.000
	Svežina	4.242	3.980	0.669	0.728	15.776	18.300	0.403	0.527	1.722	0.088
	Opšti utisak	4.210	3.764	0.616	0.746	14.635	19.818	2.011	0.159	2.935**	0.004

F, t i Z – uzoračke vrednosti primenjenih testova; p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ** - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Sve istovremeno testirane senzorne karakteristike od strane ženskih i muških ocenjivača pokazale su sledeće rezultate: statistički značajno, one se ne razlikuju za standardno pivo (Wilks Lambda=0,963; F=0,754; p=0,585), ali se vrlo značajno razlikuju

za PG3 (Wilks Lambda=0,855, F=3,350,p=0,008). Kako su svi rezultati bili homogeni ($C_v < 30\%$), uključujući i varijanse (Levenov test), značajne razlike u srednjim vrednostima ocena za senzorne karakteristike između muškog i ženskog pola analizirane su *t*-testom. Dobijene brojke ukazuju da nije bilo statistički značajnih razlika za svaku pojedinačnu senzornu karakteristiku i opšti utisak standardnog piva. Kada je u pitanju pivo sa *Ganoderma lucidum*, ženski i muški ocenjivači su dali iste srednje ocene za svežinu, statistički značajno drugačije za punoću i statistički vrlo značajno drugačije za aromu, ukus, gorčinu i opšti utisak (slika 5.26).



Slika 5.26. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena osnovnih senzornih karakteristika polaznog standardnog piva (SP) i piva obogaćenog ekstraktom gljive (PG3) – muški pol

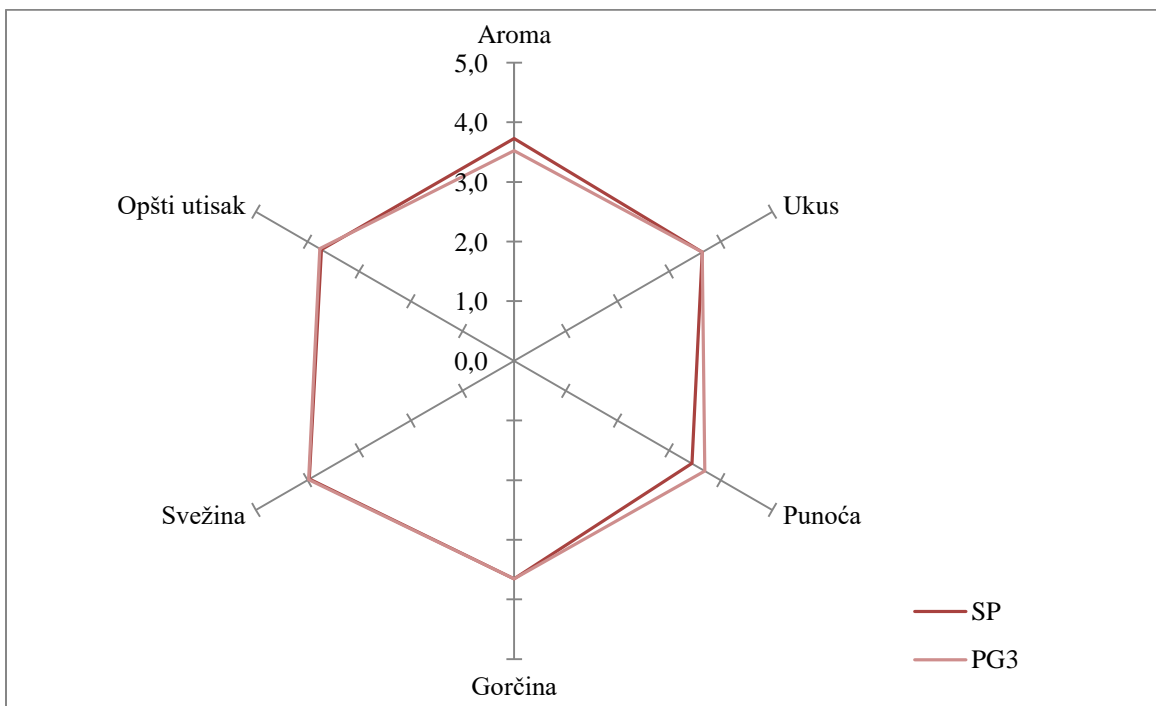
Rezultati diskriminacione analize sugerišu da su muški konzumenti razlikovali analizirana piva vrlo značajno u svim senzornim karakteristikama, kada se parametri analiziraju zajedno (Wilks Lambda=0,769; F=3,368; p=0,010). Prema njihovom mišljenju, piva se razlikuju značajno u svežini i veoma značajno u svim ostalim senzornim osobinama (Tabela 5.33).

Tabela 5.33. Anaizirane razlike srednjih ocena svih senzornih parametara i opšteg utiska za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum* od strane muških ocenjivača

Senzorna svojstva i opšti utisak	Srednja vrednost		Levenov test		<i>t</i> -test		Vilkoksonov test	
	SP	PG3	F	p	t	p	Z	p
Aroma	3.597	4.048	0.485	0.489	-3.535**	0.001	-	-
Ukus	3.661	4.145	0.001	0.975	-5.483**	0.000	-	-
Punoća	3.387	4.065	0.139	0.711	-5.375**	0.000	-	-
Gorčina	3.468	4.210	7.980	0.006**	-4.945**	0.000	3.711* *	0.000-
Svežina	3.952	4.242	0.456	0.502	-2.683**	0.012	-	-
Opšti utisak	3.726	4.210	0.255	0.616	-5.483**	0.000	-	-

F, t i Z – uzoračke vrednosti primenjenih testova; p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ** - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Rezultati diskriminacione analize ukazuju na to da ženski konzumenti daju slične rezultate kao muški, ali se prema njihovom mišljenju ispitivana piva vrlo značajno statistički razlikuju (Wilks Lambda=0,871; F=4,222;p=0,0001). To se ne odnosi na ukus i gorčinu, ali je primetno u pogledu ostalih parametara. Ženski konzumenti su dali prednost standardnom pivu u pogledu arome, a sa *Ganoderma lucidum* u pogledu punoće i svežine (slika 5.28). Ipak, PG3 se, u poređenju sa standardnim pivom, statistički značajno razlikuje samo u punoći (tabela 5.34).



Slika 5.27. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena osnovnih senzornih karakteristika polaznog standardnog piva (SP) i piva obogaćenog ekstraktom gljive (PG3) – ženski pol

Tabela 5.34. Analizirane razlike srednjih ocena svih senzornih parametara i opšteg utiska za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum* od strane ženskih ocenjivača

Senzorna svojstva i opšti utisak	Srednja vrednost		Levenov test		t-test	
	SP	PG3	F	p	t	p
Aroma	3.730	3.527	1.841	0.177	1.781	0.079
Ukus	3.642	3.642	2.019	0.157	0.000	1.000
Punoća	3.440	3.689	1.631	0.204	- 2.000*	0.049
Gorčina	3.655	3.655	1.445	0.231	0.000	1.000
Svežina	3.966	3.980	0.669	0.415	-0.129	0.897
Opšti utisak	3.730	3.764	0.119	0.730	-0.299	0.766

F, t i Z – uzoračke vrednosti primenjenih testova; ; p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ** - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Ovakvi rezultati su veoma interesantni i mogu biti od koristi proizvođačima piva koji se, poslednjih godina, trude da osvoje upravo žensku populaciju koja je tradicionalno manje zastupljena na tržištu piva. Ženske osobe po pravilu daju prednost manje gorkim pivima i onima sa kompleksnijom aromom (Muggah and McSweeney 2017). U našim istraživanjima se pokazalo da je aroma bila bolje ocenjena kod standardnog piva, koje je imalo manje kompleksna svojstva u odnosu na pivo sa *Ganoderma lucidum*, a da se gorčina nije statistički značajno razlikovala ($p=1,000$). To govori o složenosti načina na koji se percipira gorčina, odnosno na koji potrošači doživljavaju neki proizvod. *Ganoderma lucidum* je upravo poznata po svom gorkom karakteru i njega je teško maskirati, dok je aroma piva parametar na koji se može uticati. Naravno, brojni su faktori koji se mogu pronaći kao razlog za ovakve rezultate, od demografskih do različitih unutrašnjih i spoljašnjih, objektivnih i subjektivnih (Gabrielyan et al. 2014).

5.3.2.1.2. Uticaj pušenja na senzorne ocene ispitanika

Pored ispitivanja polnih razlika, izvršeno je i ispitivanje uticaja pušenja na senzorne ocene ispitanika. Zapravo, ocenjivači su se prilikom degustacije anonimno izjašnjavali o statusu (ne)pušača. Za ispitivanje značajnih razlika srednjih vrednosti između pušača i nepušača korišćen je *t*-test za nezavisne uzorke, a rezultati su prikazani u tabeli 5.35. U literaturi nema mnogo podataka koji govore o eventualnom uticaju pušenja na senzornu percepciju pojedinačnih proizvoda, izuzev opšte poznatog stava da pušenje „zamara“ čula i da redovni konzumenti duvana ne mogu biti dobri senzorni ocenjivači. Interesantno je da ni u jednom analiziranom parametru nije bilo statistički značajne razlike. Uslovno, moglo bi se reći da je najveća razlika uočena u ocenama arome pušača i nepušača, ali ona nije bila statistički značajna. Zanimljivo je i da su gorčina, svežina i opšti utisak bili vrlo bliski. Možemo zaključiti da, u konkretnom slučaju, nije bilo razlike u senzornim ocenama pušača i nepušača, po svim ispitivanim parametrima.

Tabela 5.35. Analizirane razlike ocena glavnih senzornih karakteristika i opšteg utiska za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum* u odnosu na pušače i nepušače

Senzorna osobina	Status		p vrednost
	pušač	nepušač	
Aroma	3,43±0,87	3,52±0,81	0,256
Ukus	3,40±0,88	3,48±0,84	0,357
Punoća	3,54±0,82	3,47±0,78	0,437
Gorčina	3,46±0,75	3,50±0,87	0,578
Svežina	3,86±0,91	3,81±0,82	0,570
Opšti utisak	3,56±0,79	3,59±0,77	0,724
Dopadljivost	3,23±1,02	3,30±1,01	0,493

p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ** - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

5.3.2.1.3. Razlike između konzumenata i nekonzumenata u pogledu senzornih ocena piva

Dalja istraživanja su sprovedena i u pogledu efekta količine konzumiranog alkohola na senzorno ocenjivanja piva. Cilj je bio utvrditi da li osobe koje redovno konzumiraju alkohol (pivo, vino ili žestoka pića) različito ocenjuju analizirana piva. Ocenjivači su podeljeni u dve grupe: konzumente – one koje su konzumirali alkoholna piće minimalno jedanput nedeljno u umerenim preporučenim količinama i nekonzumente – one koji ne konzumiraju alkoholna pića uopšte. Za ispitivanje značajnih razlika srednjih vrednosti između konzumenata i nekonzumenata korišćen je *t*-test za nezavisne uzorke i rezultati su prikazani u tabeli 5.36.

Tabela 5.36. Analizirane razlika ocena glavnih senzornih karakteristika i opšteg utiska za standardno pivo i pivo sa *Ganoderma lucidum* u odnosu na konzumente i nekonzumente alkoholnih pića

Senzorna osobina	Status		p vrednost
	konzument	nekonzument	
Aroma	3,51±0,83	3,49±0,82	0,760
Ukus	3,49±0,86	3,41±0,82	0,259
Punoća	3,51±0,77	3,41±0,81	0,153
Gorčina	3,56±0,83	3,32±0,86	0,001**
Svežina	3,82±0,81	3,80±0,90	0,763
Opšti utisak	3,61±0,76	3,51±0,79	0,186
Dopadljivost	3,36±1,02	3,10±0,95	0,004**

p – nivo značajnosti; * - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,05$; ** - statistički značajna razlika na nivou $p < 0,01$

Iz prikazanih rezultata može se videti da su nekonzumenti drugačije reagovali na gorčinu i dopadljivost uzorka. Primećuje se da, u pogledu srednjih ocena za aromu i svežinu, nije bilo značajne razlike između konzumenata i nekonzumenata. Nešto veće razlike uočene su kod ukusa, punoće i opšteg utiska. Međutim, iskazane razlike nisu bile značajne na nivou značajnosti $p < 0,1$. Statistički veoma značajna razlika se zapaža kod gorčine i dopadljivosti, i može se zaključiti da nekonzumenti daju prednost pivu sa manjom gorčinom, u ovom slučaju standardnom pivu.

Rezultati senzorne ocene potrošača su obećavajući i ukazuju na to da se alkoholni ekstrakt *Ganoderma lucidum* može koristiti kao sirovina za proizvodnju novih vrsta piva. Ocenjivači su prihvatili pivo na svojstven način. Iako postoje razlike između polova u pogledu senzorne ocene, potrebno je istaći da su svi ocenjivači slično ili bolje u najvažnijim senzornim karakteristikama ocenili obogaćeno pivo. Činjenica je da su muški konzumenti pokazali veći afinitet za nova senzorna svojstva od ženskih i ocenili pivo sa *Ganoderma lucidum* kao značajno bolje. Međutim, osobe ženskog pola ocenile su oba piva slično i nisu pronašle značajne razlike u kvalitetu. Činjenica koju je potrebno naglasiti jeste i dopadljiva gorčina piva sa *G. lucidum*, koju su istakli muški ocenjivači. Kvalitet gorčine je opisan kao prijatan. Sa praktične tačke gledišta, ovakva reakcija ocenjivača je veoma bitna. Nasuprot tome, gorčina piva je veoma kompleksno pitanje i zavisi od psihofizičkih percepcija i

interakcije ukusa sa jedne i individualne percepcije pojedinca sa druge strane. U tom pogledu, zanimljivo je da nije bilo razlika u ocenjivanju od strane pušača i nepušača, dok su nekonzumenti iskazali određeni stepen uzdržanosti. Evaulacija gorčine piva zavisi od nekoliko faktora: punoće, stepena slatkoće, sadržaja i vrste fenola, sadržaja etanola i temperature degustacije. Povećanje stepena punoće može maskirati gorčinu pića, dok etanol povećava intenzitet gorkog ukusa, kao i produženo trajanje takvog osećaja. Kako je količina etanola bila slična (4,7-4,8% v/v) u svim uzorcima, ne može se govoriti o uticaju ovog efekta.

5.3.2.2. Bezalkoholno pivo sa *Ganoderma lucidum*

Bezalkoholna piva imaju dugu tradiciju, iako njihova popularnost nikada nije bila veća od standardnih alkoholnih. Ona predstavljaju kompromisno rešenje kada je konzumiranje alkohola iz bilo kog razloga ograničeno (verskog, zdravstvenog, profesionalnog). Maksimalna dozvoljena količina alkohola u bezalkoholnom pivu ograničena je zakonom i varira od države do države. Najčešće je to 0,5% v/v, dok je u zemljama Bliskog istoka ta granica daleko strožija i iznosi 0,05% v/v, ili čak 0,0%. Iako je proizvodnja bezalkoholnog piva danas još uvek zanemarljiva u odnosu na ukupnu proizvodnju piva u svetu, ona sve više raste. Proces njegovog dobijanja nije nimalo jednostavan, jer nije jednostavno eliminisati jedan bitan sastojak koji nastaje u toku fermentacije, a zadržati sva ostala svojstva piva. Najveći problem je punoća ukusa i aroma, odnosno opšti utisak. Zbog toga ovakva piva predstavljaju poseban izazov.

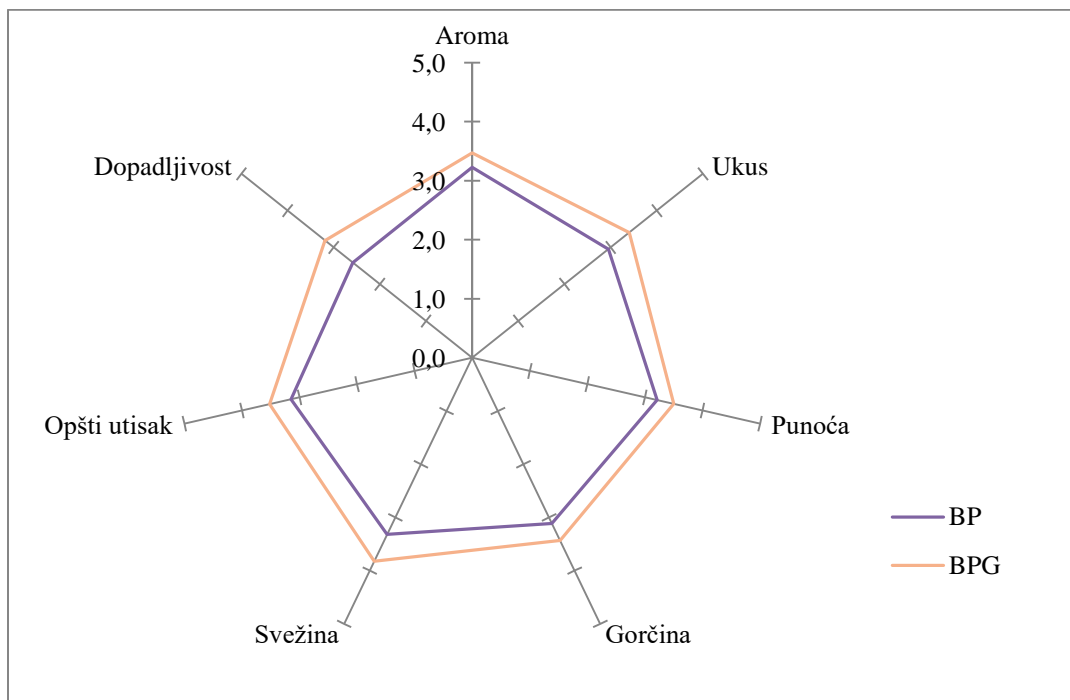
U ovom slučaju korišćeno bezalkoholno pivo sa lokalnog tržišta u koje je dodata identična količina (1,5 ml/l) ekstrakta *Ganoderma lucidum* (G5) kao i uzorku standardnog svetlog piva, pod identičnim uslovima. Dobijeni uzorci su obeleženi sa BP (bezalkoholno pivo) i BPG (bezalkoholno pivo sa gljivom *Ganoderma lucidum*). Ispitane su senzorne karakteristike od strane muških i ženskih potrošača, a osnovni statistički rezultati analize varijanse prikazani su u tabeli 5.37.

Dobijene ocene za pojedinačne senzorne karakteristike piva kretale su se od 2,0 do 4,0. Najniže su dodeljene dopadljivosti standardnog bezalkoholnog piva, u proseku oko 2,0, dok je najvišim ocenjena svežina bezalkoholnog piva sa *Ganoderma lucidum* (4,0). Konačne vrednosti za sve ispitivane parametre bile su homogene ($C_v < 30\%$), u najvećoj meri one za uzorak BPG po svim parametrima, izuzev dopadljivosti ($C_v = 29,26\%$). Koeficijent varijacije kod BP bio je heterogeniji u odnosu na BPG. Na osnovu analize varijanse, uočava se da postoje statistički veoma značajne razlike u svim ispitivanim parametrima. Grafički prikaz senzornih karakteristika piva prikazan je na slici 5.28.

Tabela 5.37. Osnovni statistički parametri za senzorna svojstva analiziranih bezalkoholnih piva i rezultati analize varijanse

Senzorna osobina	Pivo	Srednja vrednost	Medijana	Std. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	F test	p
Aroma	BP	3,23	3,0	0,986	29,48	5,062	<0.001
	BPG	3,47	3,5	0,799	23,02		
Ukus	BP	2,95	3,0	0,911	29,85	13,312	<0.001
	BPG	3,40	3,5	0,805	23,70		
Punoća	BP	3,21	3,0	0,868	27,02	6,535	<0.001
	BPG	3,50	3,5	0,726	20,76		
Gorčina	BP	3,11	3,0	0,856	27,47	8,568	<0.001
	BPG	3,43	3,5	0,772	22,49		
Svežina	BP	3,32	3,0	0,963	28,98	10,716	<0.001
	BPG	3,82	4,0	0,794	20,79		
Opšti utisak	BP	3,15	3,0	0,838	26,61	12,374	<0.001
	BPG	3,52	3,5	0,700	19,89		
Dopadljivost	BP	2,59	2,0	1,071	29,36	17,634	<0.001
	BPG	3,19	3,0	1,029	29,26		

p – nivo značajnosti



Slika 5.28. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena osnovnih senzornih karakteristika bezalkoholnog piva sa tržišta (BP) i njegove obogaćene varijante ekstraktom *Ganoderma lucidum* (BPG)

Primenom linearnog kontrasta sa jednim stepenom slobode, dobijena je statistički značajna razlika u punoći ukusa, dok kod arome nije bilo značajnih razlika (tabela 5.38). U svim ostalim parametrima, ukus, gorčina, svežina, opšti utisak i dopadljivost dali su statistički veoma značajne razlike za poređenja srednjih vrednosti. Upotreba ovakvog testa daje preciznije podatke o razlikama prisutnim u proizvodima. Prezentovani podaci su veoma značajni, jer je dobijen proizvod koji je po svim parametrima, sem arome, imao bolje senzorne karakteristike. Ukoliko se pogleda slika 5.28, primećuje se da se ukus, svežina i dopadljivost najviše diferenciraju u korist obogaćenog piva. Ovakvi rezultati mogu se objasniti činjenicom da je bezalkoholno pivo samo po sebi, vrlo često, prazno na ukusu i sa osetnom slatnom notom. Ekstrakt gljive značajno je uticao na punoću ukusa i gorčinu, ublažavajući slatni ukus piva.

Tabela 5.38. Upoređivanje razlika srednjih vrednosti senzornih osobina linearnim kontrastom

BP sa BPG							
	Aroma	Ukus	Punoća	Gorčina	Svežina	Opšti utisak	Dopadljivost
P vrednost	0,056	0,000**	0,012*	0,005**	0,000**	0,001**	0,000**

5.3.2.3. *Senzorni profil dobijenih piva*

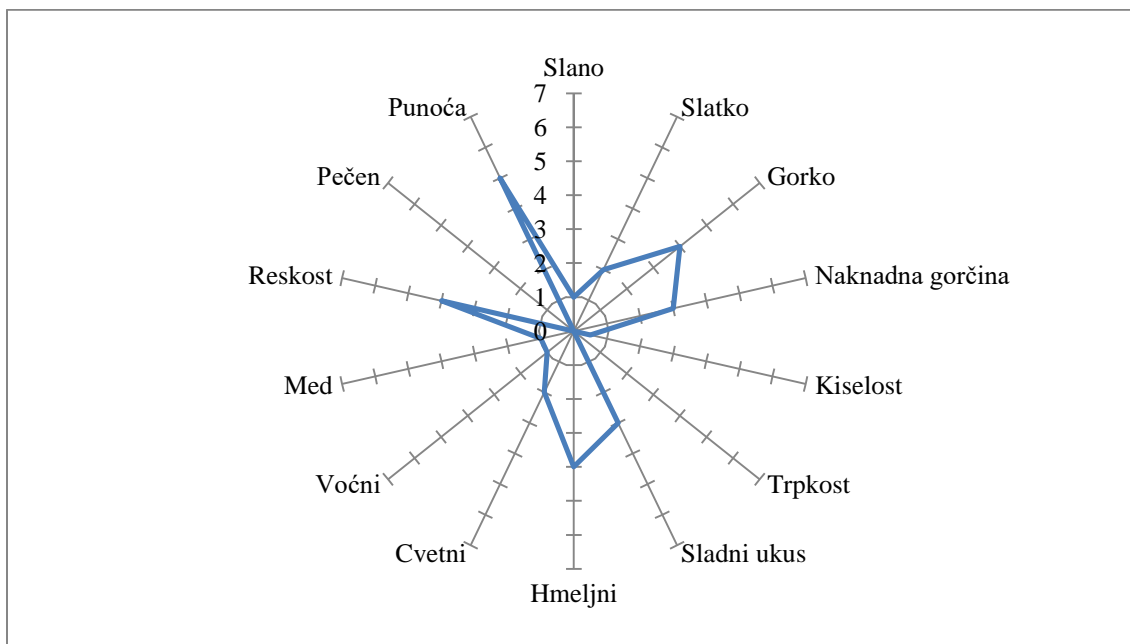
U pivu se može identifikovati više od 1000 različitih aromatičnih komponenti, zahvaljujući modernim analitičkim metodama. Neke od njih potiču od sirovina (slada, hmelja, vode), ali većina nastaje kao proizvod rada kvasca prilikom fermentacije. Hemijske i fizičke metode analize mogu da pruže veliki broj informacija o ovim komponentama, ali nijedan instrument ne može da zameni iskusnog ocenjivača. Pre nego što se odobri prodaja jednog piva, potrebno je napraviti ocenu njegovih senzornih svojstava. Prilikom ocenjivanja, akcenat se stavlja na percepciju vizuelnih, olfaktornih, gustatornih, haptičkih, trigeminalnih, kinestetičkih i autitivnih utisaka. Deskriptivno-senzorno profilisanje se izvodi sa obučenim ocenjivačima, kako bi se dobio šematski opis senzornih karakteristika uzorka koji se ispituje. Ovaj test se može primeniti na bilo koju vrstu piva, za poređenja 2 do 6 uzoraka. Pre njegovog izvođenja, vrši se izbor atributa koji se ocenjuju, pri čemu je isti potrebno ograničiti na 10 do 20 za jednostavne testove, odnosno 50 za punu deskriptivnu analizu (tabela 5.39). Analiza podataka radi se tako što se za svaki od atributa računa srednja vrednost, a rezultati se prikazuju u vidu *radar* dijagrama (*paukove mreže*). Deskriptivno-senzorno profilisanje daje objektivni opis, koji može poslužiti za menjanje postojećih proizvoda i identifikovanje ključnih senzornih karakteristika, kasnije upotrebljivih za marketinške svrhe (Tomić, 2016). U tom pogledu, izvršena je senzorna analiza od strane obučenih ocenjivača.

Tabela 5.39. Atributivna obeležja korišćena u kvantitativnoj deskriptivnoj analizi

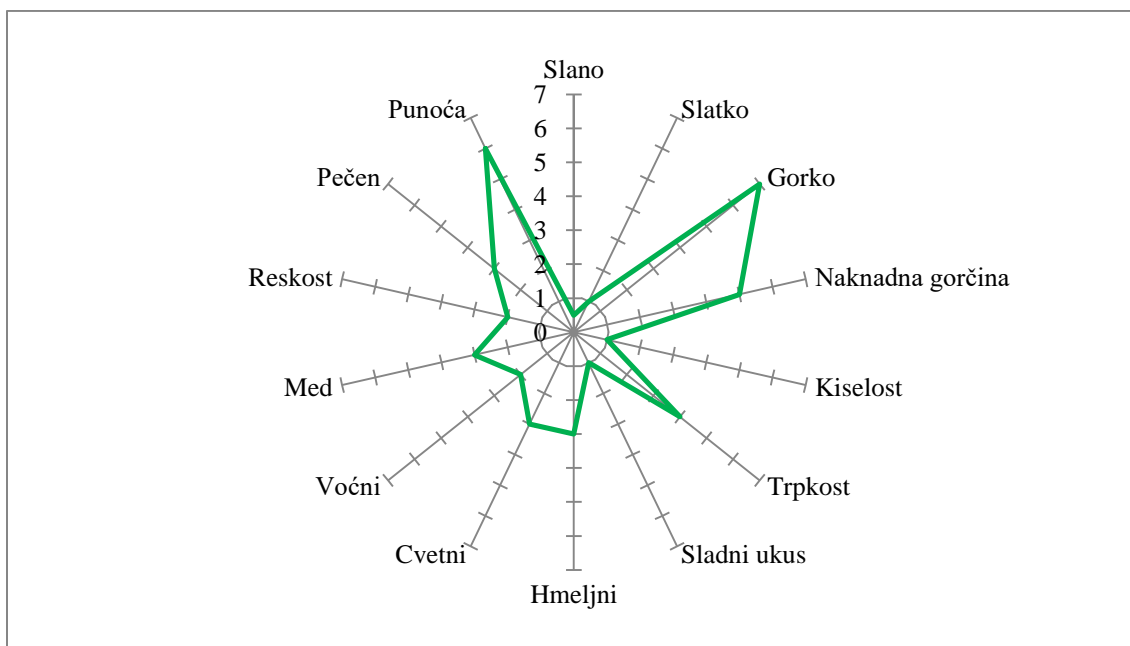
Atributivno obeležje	Opis
Slatko	Ukus poput šećera
Slano	Ukus soli
Gorko	Ukus poput kofeina ili kinin-hidrohlorida
Naknadna gorčina	Gorčina koja se dugo zadržava u grlu
Kiselo	Ukus poput limuna
Sladni ukus	Asocira na slad
Hmeljni	Asocira na hmelj
Cvetni	Asocira na cveće
Voćni	Asocira na voće
Med	Asocira na med
Reskost	Osećaj koji asocira na oporost usled CO ₂
Punoća	Dugotrajni osećaj u ustima
Trpkost	Osećaj skupljanja usta
Pečen	Obeležje koje asocira na karamel, koru hleba, lešnike i smeđi šećer

Dobijene vrednosti za standardno pivo (SP) i pivo sa *Ganoderma lucidum* (PG3) prikazane su grafički na slikama 5.29 i 5.30.

Na osnovu rezultata za kvantitativnu deskriptivnu analizu (KDA) srednjih vrednosti ocena za atributivna obeležja standardnog piva, može se zapaziti da kompleksnost ukusa i mirisa nije bila visoka, ali da je pivo bilo izbalansirano, sa prijatnom gorčinom i izraženom reskosti. Punoća je bila dominantna, dok je sladni ukus bio slabo izražen. Pretpostavlja se i da u procesu dobijanja nisu korišćene aromatične hmeljne vrste, jer su voćni i cvetni mirisi bili slabo izraženi.



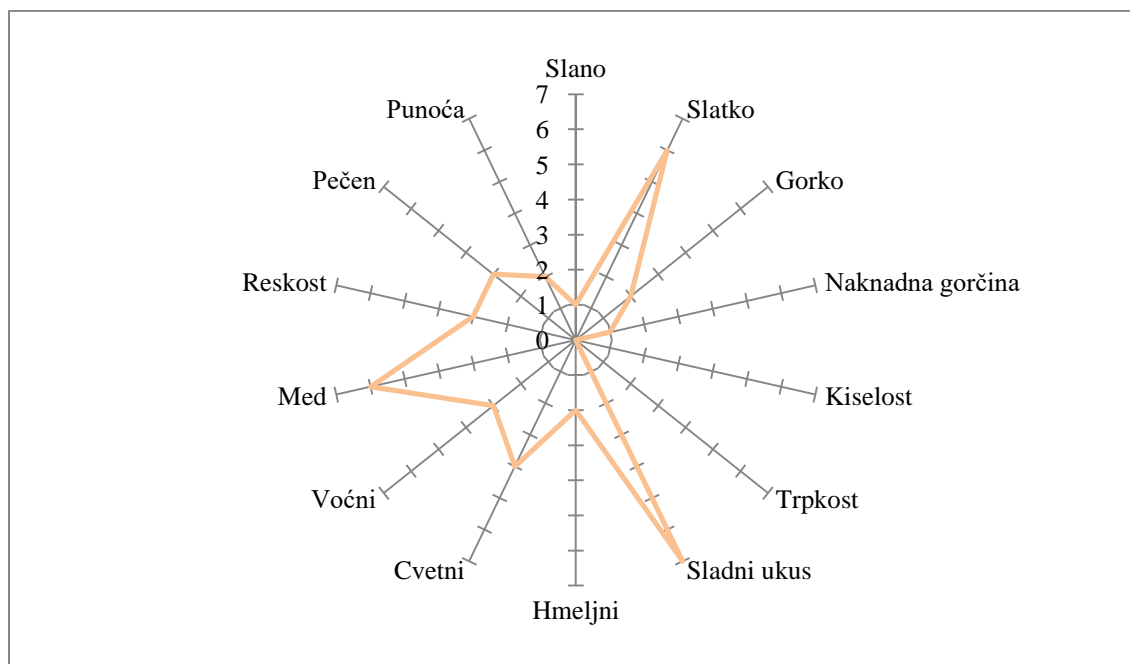
Slika 5.29. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena senzornih karakteristika standardnog piva (SP)



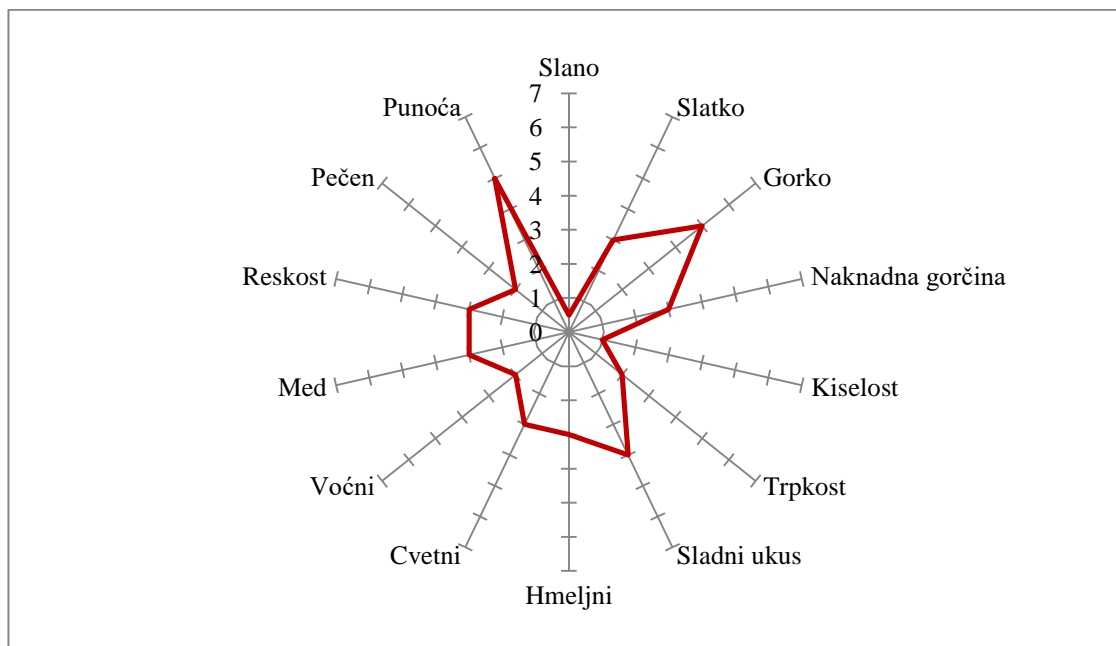
Slika 5.30. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena senzornih karakteristika standardnog piva obogaćenog ekstraktom *Ganoderma lucidum* (PG3)

Na osnovu rezultata za KDA srednjih vrednosti ocena za atributivna obeležja piva dobijenog sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, može se primetiti da je došlo do znatnih promena u izgledu krive. Sam dijagram je mnogo kompleksniji, sa karakterističnim izraženim pikovima za gorčinu, što je i bilo očekivano. Naknadna gorčina bila je izraženija, ali nije ocenjena kao negativna. Hmeljna aroma je bila nešto niža, što se može objasniti delimičnim maskiranjem mirisa od strane ekstrakta. Međutim, uočavaju se i blaga cvetna i medna nota, koje mogu biti posledice međusobnih interakcija ekstrakta i komponenti piva. Punoća i trpkost veoma su izraženi, ali se izgubilo na reskosti, što je posledica pripreme uzorka u toku eksperimenta (otvaranja i zatvaranja boce). Zanimljive su razlike koje se pojavljuju između obučenih senzoričara i potrošača, koji u mnogo manjoj meri registruju gorčinu dobijenog piva (s tim da oni muškog pola, ipak, ocenjuju piva približnije obučenim senzoričarima).

Dobijene vrednosti za standardno bezalkoholno pivo (BP) i bezalkoholno pivo sa *Ganoderma lucidum* (BPG) dati su na slikama 5.31 i 5.32 u vidu radar dijagrama.



Slika 5.31. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena senzornih karakteristika standardnog bezalkoholnog piva (BP)



Slika 5.32. Radar dijagram srednjih vrednosti ocena senzornih karakteristika standardnog bezalkoholnog piva obogaćenog ekstraktom *Ganoderma lucidum* (BPG)

Na osnovu rezultata za KDA srednjih vrednosti ocena za atributivna obeležja standardnog bezalkoholnog piva, uočava se tipična karakteristika ovih piva: dominantni sladni ukus, koji sa sobom povlači medni ukus i miris. Gorčina je slabo izražena, kao i punoća i reskost. Senzoričari su ga ocenili kao jako oksidovano pivo, što može biti i posledica velikog sadržaja neprevrelih šećera. U većini slučajeva, potrošači izbegavaju ovakva piva jer „ne podsećaju na pivo, već više na napitke poput boze i kvasa“.

KDA dijagram standardnog bezalkoholnog piva obogaćenog *Ganoderma lucidum* (BPG) izgleda sasvim drugačije. Pivo odaje utisak harmoničnijeg i zaokruženijeg napitka, koje više podseća na „pravo“ pivo. Sladni ukus je jako ublažen, kao i medna nota i slatkoća polaznog proizvoda. Punoća ukusa i gorčina su skoro udvostručeni. Opšti utisak svih ocenjivača jeste da ovakvo pivo u veoma maloj meri asocira na osnovu od koje je dobijeno. Senzorne ocene ukazuju na to da bi, u ovom slučaju, možda čak i veće doze ekstrakta mogle biti dodate. Na taj način bi se postiglo i dodatno povećanje sadržaja bioaktivnih komponenti prisutnih u proizvodu.

5.4. Hemijska karakterizacija piva

5.4.1. Osnovni fizičko-hemijski parametri

Pivo sadrži više od 2000 različitih supstanci (mikro- i makroelementi, vitamini, polifenoli, proteini, organske kiseline i slično). Ono je, po definiciji, niskoalkoholno osvežavajuće piće koje preko 90% čini voda (oko 92%), oko 4,5% v/v alkohol, a ostatak sastojci od kojih skoro svi imaju više ili manje povoljno delovanje na organizam. Izvršena je detaljna analiza piva korišćenih u radu. Osnovne fizičko-hemijske karakteristike standardnog svetlog i piva sa *Ganoderma lucidum* prikazane su u tabeli 5.40.

Tabela 5.40. Fizičko-hemijske karakteristike standardnih i piva obogaćenih sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*

	Uzorak			
	SP	PG3	BP	BPG
P (°Plato)	10,99±0,50 ^a	11,15±0,52 ^a	7,72±0,55 ^a	7,84±0,54 ^a
Er (% m/m)	3,89±0,04 ^a	4,02±0,07 ^a	7,29±0,04 ^a	7,37±0,08 ^a
Ea (% m/m)	2,04±0,02 ^a	1,98±0,04 ^a	6,71±0,02 ^a	6,81±0,02 ^a
RDF (%)	65,54±1,01 ^a	66,75±0,98 ^a	-	-
ADF (%)	79,42±1,25 ^a	80,25±1,05 ^a	-	-
Alkohol (% v/v)	4,72±0,03 ^a	4,82±0,03 ^a	0,26±0,04 ^a	0,44±0,06 ^a
pH	4,38±0,02 ^a	4,42±0,02 ^a	4,33±0,02 ^a	4,39±0,01 ^a
Boja (EBC)	8,35±0,60 ^a	8,41±0,55 ^a	5,90±0,50 ^a	6,10±0,20 ^a
Gorčina (EBC)	24,51±3,52 ^a	24,78±2,89 ^a	21,03±2,53 ^a	21,43±1,98 ^a
Viskozitet (mPa s)	1,4528±0,002 ^a	1,5411±0,005 ^b	1,4762±0,009 ^a	1,5547±0,003 ^b
α – glukan (mg/l)	12±1,27 ^a	137±2,32 ^b	4±2,85 ^a	137±5,92 ^b
β – glukan (mg/l)	425±5,59 ^a	1578±9,44 ^b	457±10,22 ^a	1628±15,54 ^b
CO ₂ (g/l)	5,23±0,03 ^a	4,82±0,03 ^b	5,22±0,00 ^a	5,11±0,01 ^a
Vazduh u boci (ppm)	0,00±0,00 ^a	2,00±1,0 ^b	0,00±0,00 ^a	1,00±0,00 ^a
Trajnost pene (s)	302,0±12 ^a	358,0±11 ^b	280±9 ^a	328±14 ^b
Visina pene (cm)	8,00±0,5 ^a	11,00±0,7 ^b	7,50±0,50 ^a	9,30±0,50 ^b
Kalorije (kJ/100 ml)	174,99±5,52 ^a	175,69±4,71 ^a	111,86±2,17 ^a	113,54±3,03 ^a

P- sadržaj ekstrakta u osnovnoj sladovini; Er, Ea- pravi i prividni ekstrakt, respektivno; RDF, ADF- pravi i prividni stepen fermentacije, respektivno; ^aRazličita slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku na nivou statističke značajnosti p<0,05.

Analizom je utvrđeno da ne postoje značajne razlike između sadržaja ekstrakta u osnovnoj sladovini, količine pravog i prividnog ekstrakta, alkohola, pH vrednosti i gorčine. Iako je evidentno da je pivo sa dodatkom *Ganoderma lucidum* imalo izraženiju gorčinu od polaznog, rezultati nisu ukazali na povećan sadržaj gorkih materija, a razlog tome je korišćena metodologija. Gorčina *Ganoderma lucidum* potiče od ganoderinskih i lucidinskih kiselina, a standardnom metodom za ispitivanje gorčine piva određuje se isključivo gorčina koja potiče od izo- α -kiselina hmelja. Viskozitet se, sa druge strane, statistički značajno razlikuje, što može biti posledica povećanog sadržaja glukana prisutnih u pivu.

Utvrđeno je da se sadržaj α - i β - glukana statistički značajno razlikuje u uzorcima sa i bez *G. lucidum*. Iz literarnih podataka poznato je da je sadržaj β -glukana u pivu u granicama od 400 do 600 mg/l, te je evidentno da je njegov sadržaj u oba piva sa *Ganoderma lucidum* bio povećan (PG3=1578 mg/l; BPG=1628 mg/l) i da potiče od dodatog ekstrakta. Sličan zaključak može se izvesti i za α -glukane. U brojnim istraživanjima, o kojima je bilo reči u pregledu literature, dokazano je pozitivno dejstvo glukana na imuni sistem, koje se ogleda u stimulisanju imunog sistema i aktivaciji makrofaga, pa bi se moglo očekivati da će dobijeni proizvod imati slična svojstva. Pored toga, izvestan je i povoljan uticaj obogaćenih piva (PG3 i BPG) na lipidni status i holesterol uopšte. Naime, veliki broj studija dokazao je lekovito dejstvo β -glukana na ove faktore. Različiti literarni podaci pokazuju da se preporučene dnevne doze β -glukana kreću od 0,5g do 15g (Mayell 2001, Meena et al. 2013, Othman et al. 2011, Daou and Zhang 2012, Preedy 2011). Pošto i pivo poseduje slična svojstva, sasvim je izvesno da će dobijeni proizvod imati povoljni uticaj na nivo HDL i LDL (Leskošek-Čukalović 2016, Preedy 2011, Sohrabvandi et al. 2012, Kaplan et al. 2000).

Među ispitanim parametrima uzoraka SP i PG3 uočene su i značajne razlike u sadržaju CO₂ i vazduha. Uzrok ovakvih rezultata može biti u načinu pripreme dobijenih uzoraka, pri čemu se izgubio deo ugljen-dioksida. Uočene su i značajne razlike u pogledu trajnosti i visine pene, većih kod uzorka sa dodatim ekstraktom gljive. To može biti

posledica prisutnih α - i β -glukana ili interakcije između određenih komponenti piva i ekstrakta gljive.

5.4.2. Postojanost i kvalitet pene

Prvi kontakt potrošača sa pivom jeste trenutak sipanja ovog pića u čašu. Konzumenti uglavnom pretpostavljaju da fina, kremasta i postojana pena znači i dobar ukus. Koliko je ona bitan faktor, govori i činjenica da u pojedinim zemljama potrošači neće popiti pivo servirano bez pene. Zbog toga je ispitivanje njenog kvaliteta vršeno uz pomoć dve metode: jedne koja meri vreme za koje pena nestaje (NIBEM-T) i druge koja meri površinu koju pena zauzima u čaši (CLING). Rezultati analize za NIBEM-T metodu prikazani su u tabeli 5.41.

Tabela 5.41. Osnovni statistički pokazatelji rezultata standardnog (SP i BSP) i obogaćenih piva (PG3 i BPG) dobijenih NIBEM metodom

Piva	Srednja vrednost (s)	Min.	Max.	Std. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Std. greška
SP	307,00 ^a	305,00	309,00	2,00	0,65	1,15
PG3	335,33 ^b	334,00	337,00	1,53	0,45	0,88
BP	318,00 ^a	315,00	320,00	2,62	0,83	1,52
BPG	351,00 ^b	350,00	352,00	1,00	0,28	0,57

U istoj koloni, sredine obeležene različitim slovima značajno se razlikuju na nivou značajnosti $p < 0,05$

Koeficijenti varijacije kod svih uzoraka bili su veoma niski ($C_v < 30\%$), što ukazuje na to da su podaci homogeni, odnosno da je variranje rezultata unutar uzoraka bilo malo. Korišćenjem analize varijanse i Takijevog testa, utvrđeno je da između uzoraka SP i PG3, kao i BP i BPG, postoji statistički veoma značajana razlika. Dobijena pena kod uzoraka sa *Ganoderma lucidum* bila je kremasta i sitnozrna, dok je njena stabilnost znatno produžena.

Nakon merenja stabilnosti, izvršeno je određivanje sposobnosti pene da se veže za zidove staklene čaše, pri čemu su se dobili rezultati koji mogu dati bolju i objektivniju procenu o vizuelnom doživljaju potrošača (slika 5.33). Rezultati ove analize predstavljeni su u % površine koju pena zauzima u čaši (tabela 5.42).

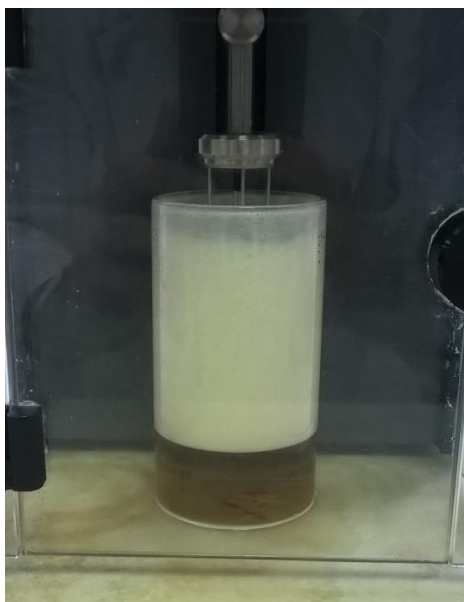
Tabela 5.42. Osnovni statistički pokazatelji rezultata dobijenih CLING metodom

Piva	Srednja vrednost (%)	Min.	Max.	Std. devijacija	Koeficijent varijacije (%)	Std. greška
SP	48,06 ^a	47,80	49,54	1,38	5,63	0,79
PG3	63,06 ^b	62,78	64,89	1,12	4,34	0,64
BP	54,84 ^a	54,20	55,22	0,55	2,24	0,32
BPG	74,04 ^b	73,69	75,85	1,18	3,51	0,68

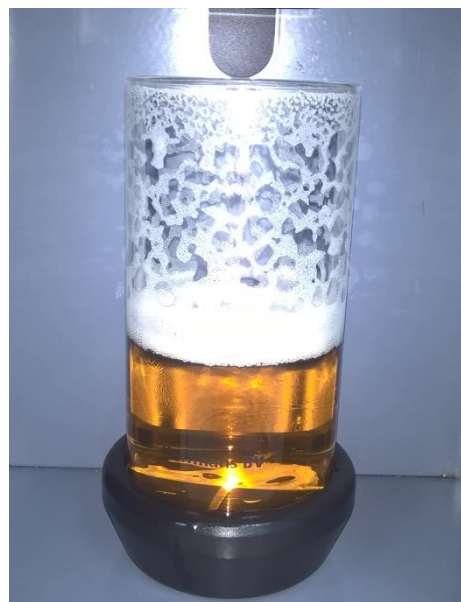
U istoj koloni, sredine obeležene različitim slovima se značajno razlikuju na nivou značajnosti $p < 0,05$

Koeficijenti varijacije kod svih uzoraka bili su veoma niski ($C_v < 30\%$), što ukazuje na to da su podaci homogeni, odnosno da je variranje rezultata unutar uzoraka bilo malo. Korišćenjem analize varijanse i Takijevog testa utvrđeno je da između uzoraka SP i PG3, kao i BP i BPG, postoji statistički veoma značajana razlika.

Površina koju zauzimaju piva u čaši sa *Ganoderma lucidum* povećava se za 15% (PG3), odnosno 19,2% (BPG). Dobijene vrednosti mogu biti veoma korisne za dalja istraživanja u ovom pravcu i korišćenje ekstrakta gljive kao potencijalne sirovine za poboljšanje ne samo senzornih i funkcionalnih svojstava, nego i kvaliteta pene piva.



a)



b)

Slika 5.33. Određivanje kvaliteta pene NIBEM (a) i CLING (b) metodom

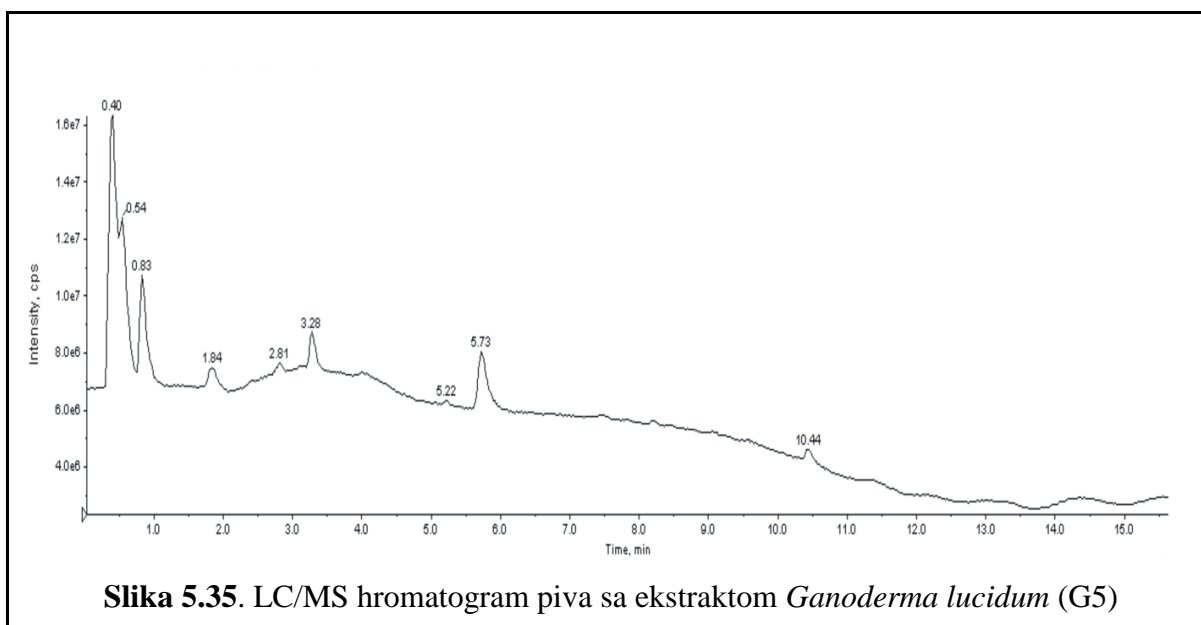
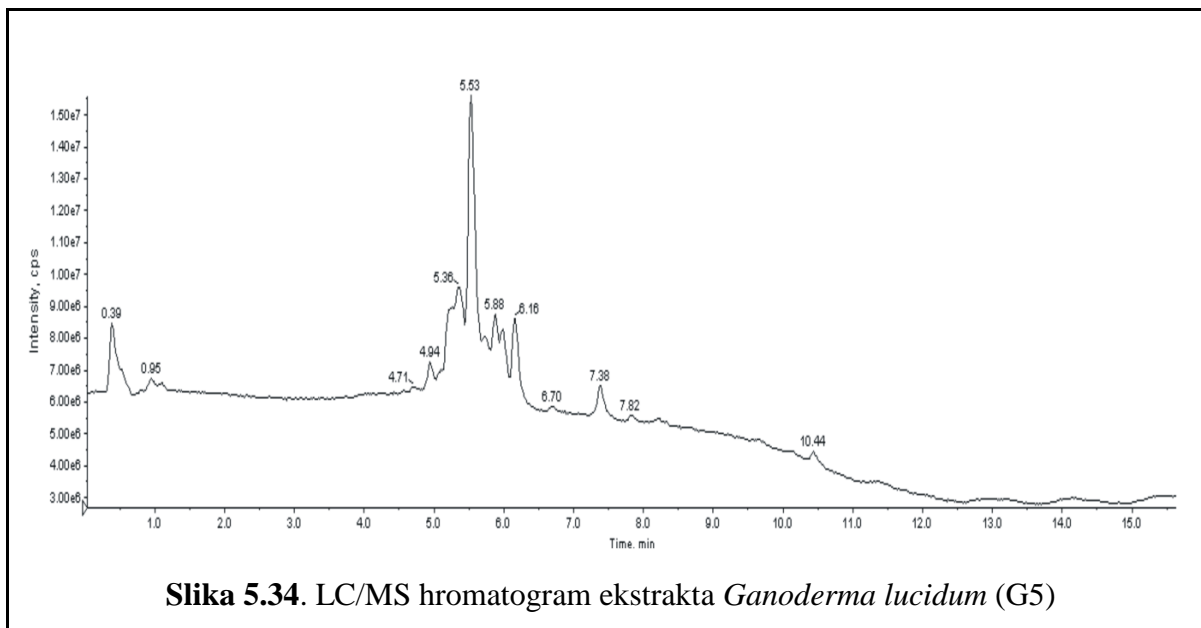
5.4.3. HPLC i LC-MS analiza

Dobijeni uzorci okarakterisani su i putem kvalitativne analize. Kako su uzorci za ovaj vid merenja bili prethodno liofilizovani, pri čemu se iz piva gube alkohol i voda, a količine ekstrakta *Ganoderma lucidum* bile identične u standardnom i bezalkoholnom pivu, sprovedena je samo analiza ekstrakta *Ganoderma lucidum* i bezalkoholnog piva sa njegovim dodatkom. Dobijene vrednosti predstavljene su u tabeli 5.43. Iz prikazanih rezultata uočava se da triptofan i *N*-etil-L-glutmin-L-treonin nisu detektovani u G5, ali jesu u BPG, te bi se moglo zaključiti da one potiču iz piva.

Ganoderinske kiseline E, C₆, F, J i lucidinska kiselina LM₁ detektovane su u tragovima u BMP, dok ganoderinska kiselina C₂, lucidinska kiselina E i ganodermanotriol nisu bile prisutne u uzorku. Kako se i očekivalo, utvrđeno je prisustvo ganoderinskih kiselina A, G i D, koje su ujedno bile i najdominantnije u prethodnim ispitivanjima u ekstraktu G5. Pored ovih, pronađene su i ganoderinske kiseline B i H. Na slikama 5.34 i 5.35 prikazani su hromatogrami analiziranih uzoraka.

Tabela 5.43. Kvalitativna analiza ekstrakta *Ganoderma lucidum* i dobijenog piva sa dodatkom ovog ekstrakta

Ret. vreme (min)	Molekularna formula	Molekulska masa (-/+) mod skeniranja	Jedinjenje	G5	Pivo sa <i>G.lucidum</i>
0.40	C ₆ H ₁₂ O ₇	196.0582 (-)	D-glukonska kiselina	+	+
0.42	C ₄ H ₆ O ₅	134.0212 (-)	2-hidroksi-butandionska kiselina	+	+
0.54	C ₆ H ₈ O ₇	192.0270 (-)	Limunska kiselina	+	+
0.95	C ₆ H ₁₀ O ₅	162.0525 (-) 162.0521 (+)	3,6-anhidro-L-galaktoza	+	+
1.84	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.0896 (-) 204.0823 (+)	Triptofan	-	+
3.28	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₅	275.1477 (+)	<i>N</i> -etil-L-glutmin-L-treonin	-	+
4.57	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512.2728 (+)	Ganoderinska kiselina E	+	tr.
4.59	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530.2873 (-)	Ganoderinska kiselina C ₆	+	tr.
4.72	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532.3019 (-)	Ganoderinska kiselina G	+	+
4.82	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.3090 (-)	Ganoderinska kiselina A	+	+
4.94	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	518.3242 (-)	Ganoderinska kiselina C ₂	+	-
5.09	C ₂₈ H ₄₂ O ₆	460.2712 (+)	Lucidinska kiselina LM ₁	+	tr.
5.22	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514.2919 (-) 514.2930 (+)	Ganoderinska kiselina D	+	+
5.36	C ₂₉ H ₄₀ O ₈	516.2784 (-) 516.2740 (+)	Lucidinska kiselina E	+	-
5.53	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.3073 (-)	Ganoderinska kiselina B	+	+
5.55	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	572.2976 (-)	Ganoderinska kiselina H	+	+
5.88	C ₃₀ H ₄₀ O ₆	496.2814 (-)	Absintin	+	-
6.00	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512.2768 (-)	Aplanoksidinska kiselina A	+	tr.
6.16	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	570.2820 (-)	Ganoderinska kiselina F	+	tr.
6.18	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514.2899 (-)	Ganoderinska kiselina J	+	tr.
7.38	C ₃₀ H ₄₈ O ₄	472.3552 (+)	Ganodermanotriol	+	-
7.82	C ₁₈ H ₃₀ O ₂ (+)	278.2239 (+)	α -Linoleinska kiselina	+	+
8.05	C ₁₈ H ₃₂ O ₄ (+)	312.2297 (-)	Oktadekadienska kiselina	+	+
8.20	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.2200 (-) 294.2189 (+)	(10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-9-hidroksi-10,12,15-oktadekatrienoinska kiselina	+	+



Ispitivanjem je dokazano prisustvo bioaktivnih jedinjenja *Ganoderma lucidum* u analiziranom pivu, te se shodno tome može očekivati da dobijeni proizvod ima povećana biološka svojstva. U kojoj meri će se ova svojstva ispoljiti zavisi od velikog broja faktora, među kojima je svakako i količina proizvoda koja se konzumira.

Kvantitativnom HPLC analizom dobijene su vrednosti za fenolna jedinjenja eksperimentalnih piva. Rezultati su prikazani u tabeli 5.44.

Tabela 5.44. Količina fenolnih jedinjenja ispitivanih bezalkoholnih piva

	Uzorci (mg/l)	
	BP (mg/l)	BPG (mg/l)
Galna kiselina	0,40±0,01 ^a	0,43±0,04 ^a
Hlorogenska kiselina	-	-
Benzoeva kiselina	0,63±0,03 ^a	0,75±0,03 ^b
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	0,60±0,01 ^a	0,70±0,10 ^b
<i>trans</i> -cinaminska kiselina	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^a
Naringenin	-	-
Vanilinska kiselina	1,42±0,06 ^a	1,69±0,04 ^b
Siringinska kiselina	0,60±0,01 ^a	0,75±0,00 ^b
Rutin	-	-
Kofeinska kiselina	0,52±0,01 ^a	0,53±0,04 ^a
<i>p</i> -kumarinska kiselina	0,35±0,02 ^a	0,41±0,05 ^a
Kempferol	-	-
Katehin	0,16±0,09 ^a	0,18±0,07 ^a
Kvercetin	-	-
Hesperetin	0,19±0,05 ^a	0,20±0,07 ^a
Resveratrol	-	-

Različita slova u redovima označavaju statsitički značajnu razliku na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$

Pivo sadrži veliki broj fenolnih komponenti, pri čemu većina njih potiče od slada i hmelja. Njihovo prisustvo je, zbog svojih specifičnih osobina, interesantno kako sa tehnološkog, tako i fiziološkog aspekta. Jedni su od ključnih faktora odgovornih za kvalitet pene, fizičku i hemijsku stabilnost i rok trajanja (ne biološko zamućenje piva). Njihovo

prisustvo je bitno i zbog senzornih karakteristika koje mogu da daju pivu. Tako, na primer, *p*-kumarinska kiselina može da doprinese kiselkastom, gorkom i taninskom ukusu. Galna kiselina može doprineti gorkom, oporom, taninskom i slatkastom, dok vanilinska daje slatko-gorak, papirni i taninski ukus (Preedy 2011). Pored ovoga, fenolna jedinjenja mogu da deluju kao antioksidansi, o čemu je bilo reči u opštem delu. Količina fenolnih jedinjenja je bila približno slična u oba uzorka i u skladu je sa navedenim literarnim podacima. Primećuje se da je kod uzorka sa dodatim ekstraktom *Ganoderma lucidum* došlo do povećanja pojedinačnih fenolnih komponenti. Međutim, statistički značajne razlike se mogu uočiti samo kod pojedinih kiselina. Količina *p*-hidroksibenzoeve kiseline je povećana za 0,10 mg/l, benzoeve kiseline za 0,12 mg/l, vanilinske kiseline za 0,27 mg/l i siringinske kiseline za 0,15 mg/l.

5.4.4. GC analiza

Aroma pivu daje specifičan karakter. Više od 800 različitih, prirodnih, hemijskih materija, doprinose jedinstvenoj aromi. S obzirom na hemijsku kompleksnost, ona nije određena sa jednom ili nekoliko komponenti, već je rezultat individualnog, sinergističkog i antagonističkog delovanja velikog broja različitih jedinjenja (Preedy 2011). Glavne komponente arome su one koje degustator može da detektuje: sladna aroma koja potiče od slada, hmeljna aroma, koja potiče od gorkih kiselina hmelja, i alkoholna aroma koja potiče iz etanola. Pivo, u velikoj meri, svoj ukus i miris duguje nusproizvodima koji nastaju tokom metabolizma kvasca. Brojna sumporna jedinjenja, oko 50 viših alkohola, približno 100 estara i karbonilnih jedinjenja, rezultat su aktivnosti kvasca. Međutim, veliki broj jedinjenja koji prate pivo još uvek nije poznat.

Pored etil-alkohola, koji je najdominantnija isparljiva komponenta, veći značaj se daje grupama lako isparljivih alifatičnih alkohola od C₃ do C₅ atoma. U zavisnosti od koncentracije, senzorne karakteristike pojedinih alkohola mogu znatno uticati na aromatski kompleks. Tako, na primer, n-propanol u nižim koncentracijama nema uticaja na ukus piva, kao ni n-butanol, koji je prisutan u tragovima. Izobutanol (6-11,3 mg/l) daje pivu gorčinu, grub ukus i loš miris i nije poželjan u većim koncentracijama. Izoamil-alkohol (30-70 mg/l)

u većim koncentracijama se jako loše odražava na kvalitet piva. Njegov najveći negativan uticaj je na miris i ukus. U većim koncentracijama pivo dobija sladak, aromatičan i težak ukus. Međutim, ukoliko je koncentracija izoamil-alkohola veća od 70 mg/l, javlja se loš gorak ukus koji dugo ostaje na jeziku i nepcima.

Estri su velika i veoma važna grupa jedinjenja, koja učestvuje u formiranju arome i ukusa piva. Metilacetat (1-20 mg/l) u povećanim koncentracijama daje adstringentnu gorčinu. Etilacetat koji čini oko 50% od ukupnog sadržaja estara u pivu (10-27 mg/l), u većim količinama daje pivu miris voća i slatkast ukus, a gorčina u prisustvu većih koncentracija postaje adstringentna. Izoamilacetat (1-6 mg/l) daje pivu ukus i miris banane, i ima nisku granicu osetljivosti. Etilkaproat (0.09-0.17 mg/l) ističe ukus starenja piva.

Aldehidi i ketoni su važna grupa jedinjenja koja je redovno prisutna u pivu. Po procentualnom učešću su najmanje zastupljeni, ali njihov efekat delovanja na ukus i miris piva veoma je izražen. Predstavljaju sastojke arome mladog piva, koji uslovljavaju pojavu nečistog i neharmoničnog ukusa i mirisa. Acetaldehid (8-10 mg/l) je odgovoran za zeleni priokus mladog piva, koji se još naziva i podrumski priokus. Tokom daljeg vrenja, njegova koncentracija se smanjuje i postepeno nestaje. Diacetil (<0.1 mg/l) je veoma važan sastojak arome mladog piva, koji u povećanim koncentracijama pivu daje nečist, osladak do veoma odbojan ukus, koji u povećanim koncentracijama prelazi u aromu poput maslaca.

Merkaptani su sumporna jedinjenja, koji nastaju kao produkti metabolizma kvasca tokom fermentacije i negativno utiču na aromu piva. U gotovom pivu, mogu se naći u količini od 0.003mg/l. Dimetilsulfid potiče iz slada. Ova isparljiva jedinjenja stvaraju ukus i miris svojstven nezrelom mladom pivu.

Tipična jedinjenja odgovorna za senzorne karakteristike piva, odnosno za formiranje njegove arome, analizirana su gasnom hromatografijom i predstavljena u tabeli 5.45. Iz dobijenih rezultata može se videti da su oni u skladu sa navedenim literaturnim podacima i da se nalaze u donjim granicama. Aromatski kompleks oba piva je bio sličan. Statistički značajne razlike su zapažene kod svih parametara, izuzev izobutanola i amil-alkohola. Interesantno je da je količina 2,3-pentandiona kod bezalkoholnog piva obogaćenog ekstraktom bila skoro tri puta viša, dok je acetaldehid bio dva puta veći nego u

polaznom pivu. 2,3 pentadion se odlikuje slatkom aromom po medu i predstavlja nepoželjnu komponentu u pivu. U većim količinama, može dati neprijatan odbojan miris. Međutim, detektovane količine su daleko ispod granice tolerancije (20 µg/l). Acetaldehid u većim koncentracijama može dati pivu ukus poput zelenih jabuka i sveže pokošene trave. Uobičajeno se kreće u granicama do 20 mg/l.

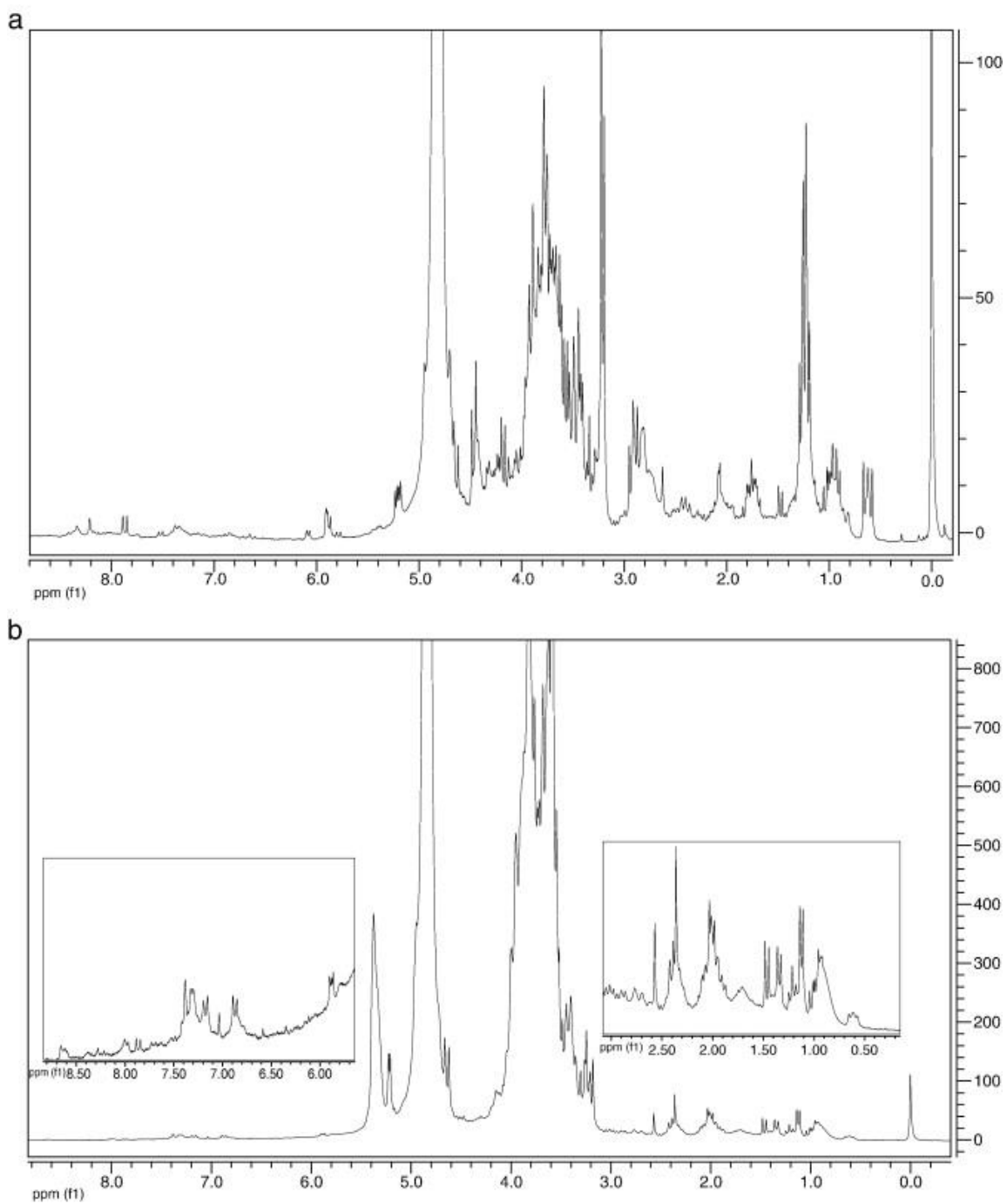
Tabela 5.45. Aromatski kompleks ispitivanih bezalkoholnih piva

	Uzorci	
	BP	BPG
Acetaldehid (mg/l)	1,87±0,44 ^a	3,43±0,24 ^b
Izoamilacetat (mg/l)	1,30±0,13 ^a	1,78±0,24 ^b
Etil-acetat (mg/l)	12,10±1,04 ^a	15,70±0,60 ^b
Etil-propionat (mg/l)	-	-
n-propanol (mg/l)	11,09±1,22 ^a	13,9±0,91 ^b
Izobutanol (mg/l)	1,01±0,21 ^a	1,53±0,33 ^a
Amil-alkoholi (mg/l)	45,04±2,34 ^a	48,80±1,55 ^a
Dimetil sulfid (mg/l)	7,96±1,02 ^a	11,30±1,07 ^b
Diacetil (µg/l)	7,79±1,49 ^a	11,18±1,35 ^b
2,3-pentandion (µg/l)	5,25±2,20 ^a	15,95±1,22 ^b
Ukupni estri	13,40±1,17 ^a	17,48±0,84 ^b

Različita slova u redovima označavaju statsitički značajnu razliku na nivou statističke značajnosti $p < 0,05$.

5.4.5. NMR analiza

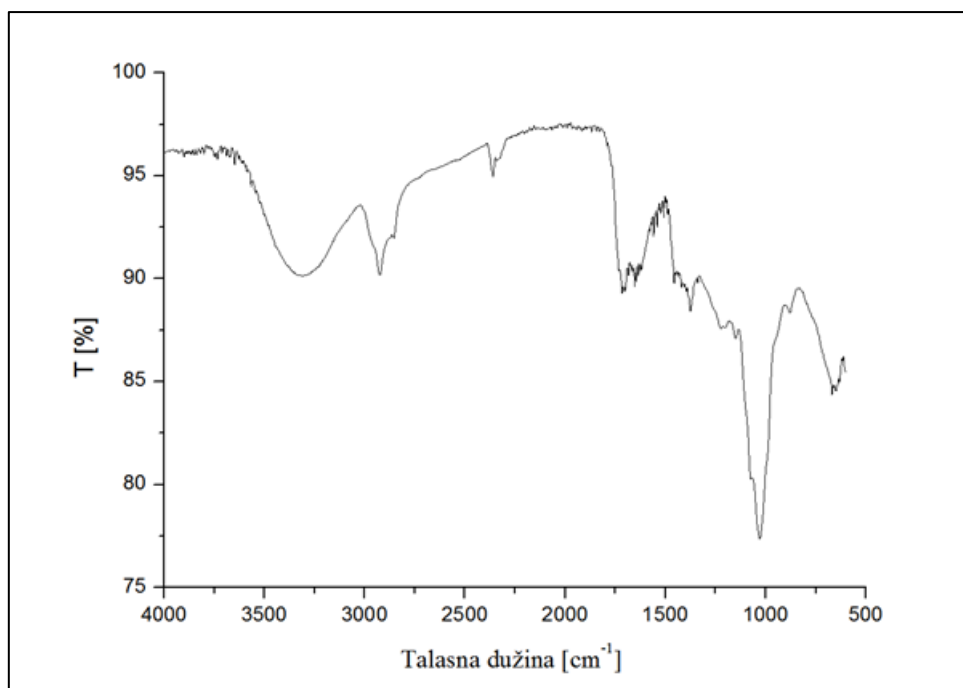
Protonskom NMR spektroskopijom izvršena je analiza piva dobijenog sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* (slika 5.21). Na slici je, zbog lakšeg poređenja, prikazan i ekstrakt objašnjen u prethodnom poglavlju. Na osnovu vizuelne procene spektara, jasno je da su spektralni profili oba uzorka veoma slični. Male promene se mogu primetiti u svim regionima u relativnoj proporciji nekih pikova. Srednja oblast spektra je vrlo karakteristična i pretpostavlja se da potiče od fermentabilnih šećera i dekstrina prisutnih u pivu. Terpenska jedinjenja, prisutna u uzorku, mogu se uočiti u području od 3,8 do 4,7 ppm. Protonskom NMR spektroskopijom dodatno je potvrđeno prisustvo bioaktivnih komponenti prisutnih u pivu, a koje potiču od ekstrakta gljive.



Slika 5.36. NMR spektar ekstrakta *G. lucidum* (a) i piva sa *G. lucidum* (b).

5.4.6. FT-IR spektroskopija

Savremeni trendovi u analizi hrane teže ka korišćenju brzih, jednostavnih i pouzdanih analitičkih tehnika, koje bi mogle delimično ili u potpunosti da zamene kompleksne i skupe referentne metode. Ne postoji veliki broj literarnih podataka koji opisuju upotrebu FT-IR spektroskopske metode u analizi piva. Jedan od razloga za to je velika kompleksnost smeše koja čini pivo, te su dobijeni pikovi teški za dodeljivanje specifičnim molekulskim vibracijama, jer svako jedinjenje koje apsorbuje IR zračenje pravi različit i jedinstven apsorpcioni profil u delu spektra. Spektar bezalkoholnog piva sa *Ganoderma lucidum* prikazan je na slici 5.37.



Slika 5.37. FT-IR liofilizovanog piva sa *Ganoderma lucidum*

Na FT-IR spektru uočava se karakteristična široka apsorpciona traka u oblasti od 3000 cm⁻¹ do 3500 cm⁻¹, koja je posledica jakih vibracija OH grupa. Traka koja se nalazi na 2900 cm⁻¹ najverovatnije potiče od vibracija istežanja metilenskih grupa, sastavnog dela

alkoholnih grupa na C-6 monomernim jedinicama polisaharida. Apsorpciona traka koja se javlja između 2400-2300 cm^{-1} može biti rezultat atmosferskog ugljen-dioksida, dok ona na 1650-1750 cm^{-1} odgovara istežućoj vibraciji karbonilne grupe. Apsorpciona traka na 1600 cm^{-1} može poticati od C=C, C=O vibracija i može predstavljati polifenole u uzorku. Druga karakteristična traka koja se nalazi između 1000 i 1100 cm^{-1} uslovljena je C-O vibracijama istezanja i C-O-C valentnim vibracijama, i može predstavljati prisustvo α -glikozidnih veza. Karakteristična traka na 890 cm^{-1} ukazuje na β -glikozidnu vezu, koja potiče od prisutnih ugljenih hidrata.

Poređenjem FT-IR spektara za ekstrakt *Ganoderma lucidum* (slika 5.18) i piva sa *Ganoderma lucidum*, zapaža se da se kod uzorka piva sa *Ganoderma lucidum* pojavljuju dodatne trake, a da pojedine postojeće postaju znatno veće (3000 cm^{-1} do 3500 cm^{-1}), te se može pretpostaviti prisustvo specifičnih komponenata gljive *Ganoderma lucidum* u dobijenom pivu. Međutim, neke trake su bile ublažene, dok su neke nestale (2400-2300 cm^{-1}), što može biti posledica određenih interakcija.

5.4.7. Antioksidativna svojstva ispitivanih bezalkoholnih piva

U tabeli 5.46 je dat prikaz antioksidativnog kapaciteta dobijenih piva. Danas postoji veliki broj metoda i uređaja koji mogu da određuju antioksidativna svojstva. U zavisnosti od matriksa proizvoda, svaku metodu je potrebno prilagoditi određenom tipu uzorka. Veliki problem prilikom određivanja antiradikalske sposobnosti piva predstavlja izo-električna tačka proteina prisutnih u pivu. Naime, ukoliko se standardne metode ne modifikuju upotrebom odgovarajućeg pufera, dolazi do izdvajanja taloga i svaki dalji rad je uzaludan.

U tom pogledu, metode su modifikovane, a rezultati predstavljeni u mili molima troloks ekvivalenta (mM TE). Metoda po Folin-Ciocalteu ne meri direktni antioksidativni potencijal, već sadržaj polifenolnih materija na osnovu kojih se može predvideti njihova antiradikalska sposobnost.

Tabela 5.46. Antioksidativni kapacitet eksperimentalnih piva

Uzorak	Metoda			
	DPPH (mM TE)	FRAP (mM TE)	TEAC (mM TE)	FOLIN (mg/l)
BP	1,01±0,07 ^a	2,54±0,04 ^a	3,30±0,01 ^a	494,45±1,48 ^a
BPG	1,15±0,05 ^a	3,40±0,06 ^b	3,76±0,04 ^b	512,79±2,11 ^a

Različita slova u istim kolonama označavaju statsitički značajnu razliku na nivou statističke značajnosti $p < 0,10$.

Iz dobijenih rezultata može se primetiti da postoji manje povećanje u antioksidativnim svojstvima piva. Međutim, dok FRAP i TEAC metoda pokazuju da postoji statistički značajna razlika na nivou značajnosti $p < 0,10$, DPPH nije dala takve rezultate. Sadržaj polifenolnih materija prema Folin-Ciocalteu se takođe nije statistički razlikovao za oba uzorka. Dobijene vrednosti su u skladu sa literaturnim podacima za piva.

5.5. Farmakološka i antimikrobna svojstva piva na bazi gljive *Ganoderma lucidum*

5.5.1. Citotoksična svojstva

Rezultati u vidu IC_{50} vrednosti za BP prikazani u tabeli 5.47. Kao što se primećuje, bezalkoholno pivo nije imalo efekta na odabrane ćelijske linije, jer su sve vrednosti i nakon 24h i 48h bile veće od 1000.

Tabela 5.47. Uticaj bezalkoholnog piva na odabrane ćelijske linije

Ćelijska linija	IC_{50} [µg/ml]	
	24 h	48 h
FemX	>1000	>1000
EA.hy926	>1000	>1000
A549	>1000	>1000
HeLa	>1000	>1000

Urađeni su preliminarni rezultati sa bezalkoholnim pivom obogaćenim ekstraktom G5, za koji je utvrđeno da poseduje najizraženije citotoksično delovanje. Međutim, kao što je i očekivano, dodate količine su suviše male da bi se u pivu moglo ustanoviti citotoksično delovanje. Eksperiment je ponovljen sa utrostručenom koncentracijom (BPG*) i dobijeni rezultati su prezentovani u tabeli 5.48. Dobijene vrednosti ukazuju na to da u toku prvih 24h nije bilo efekata na odabrane ćelijske kulture. Međutim, nakon 48h došlo je do redukcije broja na svim ćelijskim linijama. Iz ovoga se zaključuje da je dejstvo bezalkoholnog piva zavisilo od koncentracije i vremena. Potrebno je naglasiti da su korišćene količine bile tri puta veće od inicijalnih. Najjače dejstvo je ispoljeno prema HeLa humanim epitelnim ćelijama cerviksa, dok je nešto slabije bilo prema FemX humanom melanomu. Ćelije adenokarcinoma pluća (A549) su nakon 48h redukovane za 50%, usled izazvane apoptoze u koncentraciji od 927 µg/ml. Može se zaključiti da dobijeni proizvod ima antitumorna svojstva, ali su ona uslovljena koncentracijom, odnosno količinom proizvoda koji se konzumira. Pretpostavka je da je dobijeno bezalkoholno pivo sa *Ganoderma lucidum*, ukoliko se konzumira u količini od 3 litra po danu, imalo navedena svojstva. Količina ekstrakta koja se unosi na ovaj način je jednaka masi od 14,4 g suvog plodonosnog tela gljive. Uz sve navedeno, može se pretpostaviti i dodatni efekat, koji mogu dati i bioaktivne komponente prisutne u pivu, u zapremini od 3 l slabo zanemarljive.

Tabela 5.48. Uticaj bezalkoholnog piva sa dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum* (BPG*) na odabrane ćelijske linije

Ćelijska linija	IC ₅₀ [µg/ml]	
	24 h	48 h
FemX	>1000	886,0±4,4
EA.hy926	>1000	924,0±6,8
A549	>1000	954,7±3,9
HeLa	>1000	803,4±5,1

5.5.2. Antimikrobna svojstva

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dobijenih piva sprovedeno je na patogenim bakterijama i najčešćim uzročnicima mikrobiološkog kvarenja piva (tabela 5.49). Iz prikazanih rezultata može se uočiti povećano mikrobistatičko delovanje u odnosu na kontrolna piva. Ovo je posebno značajno kada se govori o bezalkoholnom pivu, u kome je sadržaj etanola manji od 0,5 % i u kome je količina dodatog hmelja manja. Sličan efekat se ispoljio i prema uzročnicima mikrobiološkog kvarenja piva, te se može pretpostaviti da će piva biti stabilnija u dužem vremenskom periodu i otpornija na dejstvo već pomenutih mikroorganizama. Ovakvi podaci su u skladu s već navedenim literaturnim i prethodno sprovedenim istraživanjima.

Tabela 5.49. Antimikrobna aktivnost kontrolnih piva i piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*

Bakterija	Poreklo		BP	BPG	SP	SPG
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC	MIC	15.0 ^a	7.5 ^b	15.0 ^a	15.0 ^a
	35150	MBC	30.0 ^a	30.0 ^a	30.0 ^a	30.0 ^a
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC	MIC	3.75 ^b	3.75 ^b	7.5 ^a	7.5 ^a
	27729	MBC	30.0 ^a	30.0 ^a	30.0 ^a	30.0 ^a
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC	MIC	7.5 ^a	3.75 ^b	3.75 ^b	7.5 ^a
	19115	MBC	-	30.0 ^a	-	-
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC	MIC	7.5 ^a	3.75 ^b	3.75 ^b	7.5 ^a
	7953	MBC	-	-	-	-
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	DSM	MIC	15.0 ^a	3.75 ^b	3.75 ^b	3.75 ^b
	20289	MBC	30.0 ^a	15.0 ^b	15.0 ^b	30.0 ^a
<i>Megasphaera cerevisiae</i>	DSM	MIC	7.5 ^a	1.875 ^c	7.5 ^a	3.75 ^b
	20462	MBC	-	-	-	30.0 ^a
<i>Lactobacillus brevis</i>	DSM	MIC	3.75 ^c	1.875 ^c	7.5 ^a	3.75 ^b
	1268	MBC	15.0 ^b	15.0 ^b	30.0 ^a	15.0 ^b
<i>Pectinatus cerevisiiphilus</i>	DSM	MIC	7.5 ^b	0.937 ^d	15.0 ^a	15.0 ^a
	20763	MBC	-	3.75 ^d	30.0 ^a	30.0 ^a

U istom redu, sredine obeležene različitim slovima se značajno razlikuju na $p < 0,05$; - nije postignuto

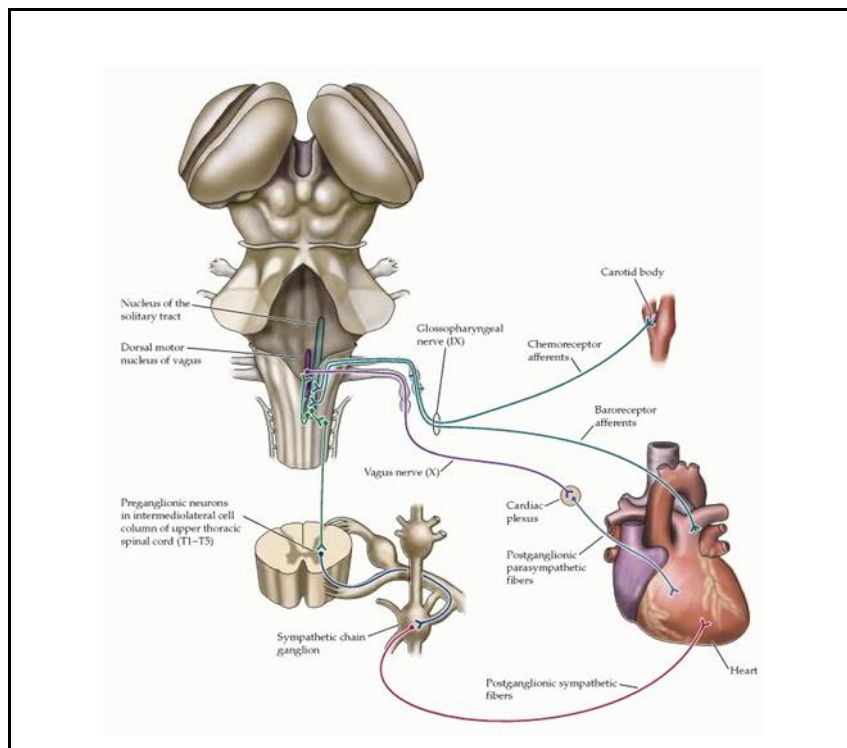
5.5.4. Uticaj alkohola, piva i piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na krvni pritisak i srčanu frekvencu pacova

Kardiovaskularni problemi su vodeći uzročnici smrtnosti u svetu. S obzirom na visoku procentualnu zastupljenost ovih bolesti, od velikog je značaja prevencija i odlaganje nastanka istih. Najčešće bolesti srca jesu slabljenje snage, poremećaj ritma rada i nedostatak kiseonika u srčanom mišiću, od kojih poslednja nastaje zbog oštećenja koronarnih sudova. Međutim, bolest koja zauzima primat je hipertenzija, tj. povišen arterijski pritisak, faktor razvoja brojnih ostalih bolesti kardiovaskularnog sistema (Parks and Booyse 2002).

Regulacija rada srca nije jednostavan proces i odvija se na dva osnovna načina, autoregulacijom i kontrolom frekvecije i snage srčane kontrakcije putem autonomnog nervnog sistema. Kada se govori o nervnoj regulaciji, najznačajniji deo autonomnog nervnog sistema jeste simpatički, a potom i parasimpatički nervni sistem. Simpatičkom stimulacijom dolazi do značajnog povećanja srčane aktivnosti, povećanja frekvence srčanog rada, kao i do povećanja snage srčane kontrakcije. Parasimpatička kontrola srčane funkcije ogleda se u kontroli frekvence srčanog rada preko parasimpatičkih nervnih vlakana, koji do srca dolaze putem nerva vagusa. Njegovom stimulacijom dolazi do oslobađanja hormona acetilholina, koji dovodi do smanjenja frekvence u sinusnom čvoru. Nasuprot njemu, stimulacija simpatičkih nerava izaziva oslobađanje noradrenalina, koji povećava propustljivost membrana mišićnih vlakana za natrijum i kalijum, i povećava srčanu frekvencu (Guyton 1961).

Druga bitna uloga nervnog sistema jeste sposobnost veoma brzog povećanja arterijskog krvnog pritiska. Sve vazokonstriktorne i kardioakceleratorne funkcije simpatičkog nervnog sistema se ponašaju kao funkcionalna celina. Istovremeno se, sa povećanjem pritiska, javlja recipročna inhibicija parasimpatičkih vagusnih inhibitornih impulsa za srce. Na primer, porast krvnog pritiska aktivira baroreceptore, koji inhibiraju aktivnost simpatičkih preganglionih neurona u kičmenoj moždini (slika 5.38). Paralelno, povećanje pritiska stimuliše aktivnost parasimpatičkih preganglionih neurona u dorzalnom

motornom jedru živca i nukleusa ambiguusa koji utiče na srčanu frekvencu. Kao rezultat ove smene u balansu simpatičke i parasimpatičke aktivnosti smanjuju se stimulatorni noradrenergički efekti postganglionske simpatičke intervencije na srčani pejsmejker i srčanu muskulaturu (Purves et al. 2008).



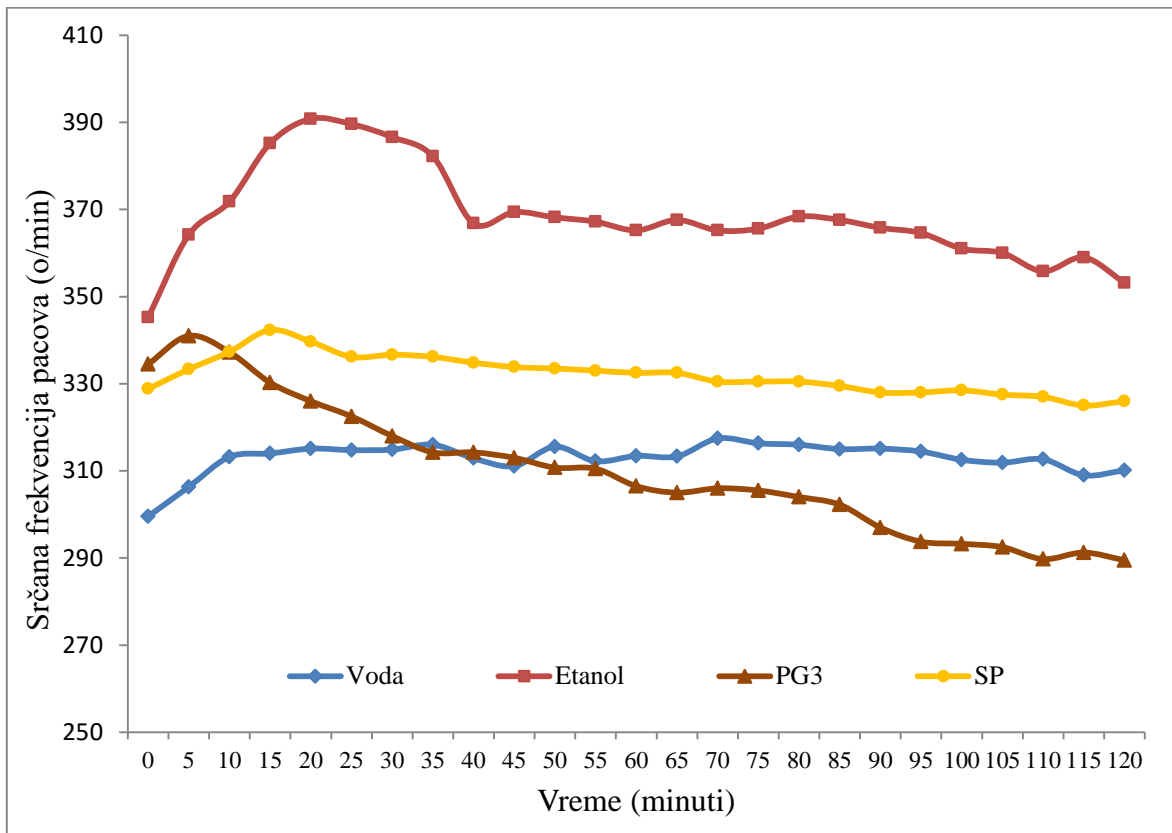
Slika 5.38 Autonomna kontrola kardiovaskularnih funkcija (Purves et al. 2008)

Za utvrđivanje potencijalnih farmakodinamičkih karakteristika dobijenog piva, izvršeno je ispitivanje uticaja akutnog dejstva dobijenih proizvoda na krvni pritisak i srčanu frekvenciju pacova. Primenom jednofaktorske Anove ispitana je statistička značajnost razlike srednjih vrednosti frekvence između pojedinih tretmana, u svakom trenutku u kome su frekvence registrovane. U svim vremenskim intervalima dobijena je statistička značajnost, a *post-hok* komparacija sprovedena je Dankanovim testom. Rezultati su prikazani u tabeli 5.50, a grafički na slici 5.39.

Tabela 5.50. Osnovni statistički podaci i analiza varijanse za srčanu frekvencu pacova u čiji je digestivni trakt izvršena implikacija vode, etanola, standardnog piva (SP) i standardnog piva obogaćenog ekstraktom *Ganoderma lucidum* (PG3)

Tretman	Vreme (minuti)	Srednja vrednost +- st. dev.	Vreme (minuti)	Srednja vrednost +- st. dev.	Vreme (minuti)	Srednja vrednost +- st. dev.
Voda		299,6±38,9 ^a		311,1±34,2 ^a		315,1±24,3 ^a
Etanol	0	380,2±30,6 ^b	45	369,4±39,0 ^b	90	365,8±28,9 ^b
PG3		334,5±42,3 ^{ab}		313,0±52,1 ^a		297±36,8 ^a
SP		328,8±37,6 ^a		333,8±20,0 ^{ab}		328±16,1 ^a
Voda		306,3±37,9 ^a		315,6±33 ^a		314,4±23,5 ^a
Etanol	5	384,2±17,6 ^b	50	368,2±35,8 ^b	95	364,6±29,9 ^b
PG3		327,0±51,7 ^a		310,8±48,1 ^a		293,8±39,8 ^a
SP		333,3±30,5 ^a		333,5±18,3 ^{ab}		328±16,1 ^a
Voda		313,2±34,5 ^a		312,2±33,4 ^a		312,6±25,7 ^a
Etanol	10	391,8±19,6 ^b	55	367,2±35,1 ^b	100	361±26,6 ^b
PG3		325,3±45 ^a		310,5±46,8 ^a		293,3±40,7 ^a
SP		337,3±27,1 ^a		333±19,3 ^{ab}		328,5±17 ^{ab}
Voda		314±35,8 ^a		313,4±31,2 ^a		311,9±26,9 ^a
Etanol	15	394,2±21,6 ^b	60	365,2±32,2 ^b	105	360±30,7 ^b
PG3		324,3±42,3 ^a		306,5±46,6 ^a		292,5±40,7 ^a
SP		342,3±21,6 ^a		332,5±17,8 ^{ab}		327,5±17,1 ^{ab}
Voda		315,1±34,4 ^a		313,3±31,5 ^a		312,7±27,2 ^a
Etanol	20	394,8±21 ^b	65	367,6±33,5 ^b	110	355,8±30,5 ^b
PG3		326±41,5 ^a		305±46,3 ^a		289,8±44,2 ^a
SP		339,7±19 ^a		332,5±18,4 ^{ab}		327±17,3 ^{ab}
Voda		314,8±34,2 ^a		317,4±27,2 ^a		309±27,8 ^a
Etanol	25	389,6±20,2 ^b	70	365,2±35,2 ^b	115	359±25,6 ^b
PG3		322,5±43,6 ^a		306±41 ^a		291,3±44,8 ^a
SP		336,2±20,1 ^a		330,5±16,9 ^{ab}		325±16,6 ^{ab}
Voda		314,9±35,4 ^a		316,3±25,8 ^a		310,1±29,8 ^a
Etanol	30	386,6±20 ^b	75	365,6±32 ^b	120	353,2±33,6 ^b
PG3		318±49,8 ^a		305,5±42,5 ^a		289,5±41 ^a
SP		336,7±20,8 ^a		330,5±15,6 ^{ab}		326±16,9 ^{ab}
Voda		316±35,8 ^a		316±26,6 ^a		
Etanol	35	382,2±26,1 ^b	80	368,4±30,4 ^b		
PG3		314,3±49,7 ^a		304±39,9 ^a		
SP		336,2±20,9 ^a		330,5±17,4 ^a		
Voda		312,9±34,5 ^a		315±27,1 ^a		
Etanol	40	366,8±38,1 ^b	85	367,6±28,4 ^b		
PG3		314,3±50 ^a		302,3±38,2 ^a		
SP		334,8±20,8 ^{ab}		329,5±16,9 ^a		
Voda						

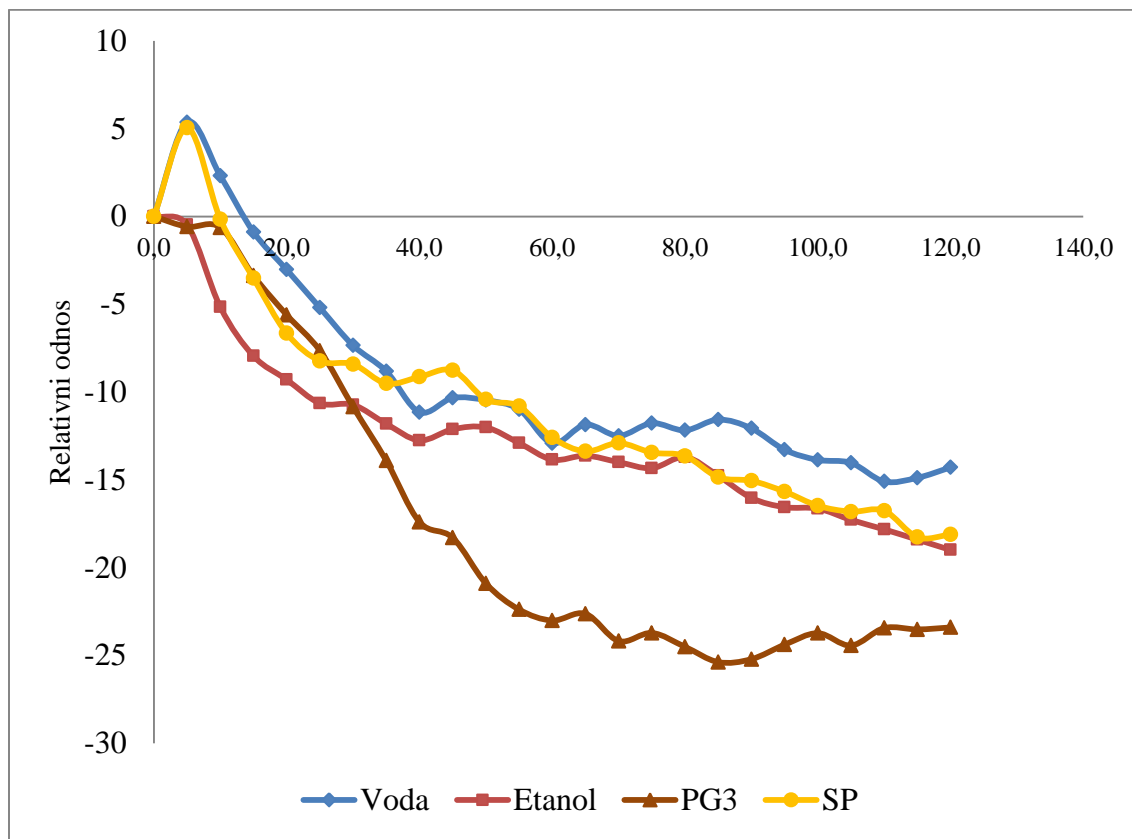
¹U istom redu, sredine obeležene različitim slovima se značajno razlikuju na p<0.05



Slika 5.39. Promena frekvence srca pacova tokom vremena izražena preko relativnih vrednosti

Iz prikazanih rezultata može se zapaziti da, nakon implikacije uzoraka u digestivni trakt pacova, dolazi do skoka frekvence. Najveći je kod etanola, zatim vode i na kraju kod uzoraka piva. Primećuje se da, kod vode, broj otkucaja srca nakon blagog skoka ostaje konstantan, bez tendencije da se vrati u prvobitno stanje. Nasuprot njemu, srčana frekvencija kod etanola ima nagli skok koji traje sve do 25-og minuta, nakon čega blago opada, što je trend koji se nastavlja do kraja ispitivanja. Interesantno je da se dijagrami za vodu i standardno pivo ne razlikuju značajno, jer kod oba nije došlo do značajnih oscilacija u frekvenci. Međutim, za razliku od vode, kod standardnog piva u prvim minutima beleži se sporiji rast broja otkucaja srca, dok je kasnije evidentan ujednačen broj, sa blagom tendencijom snižavanja. Kod piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* nakon desetog minuta dolazi do konstantnog i ujednačenog pada srčane frekvencije, koji se nastavlja do

kraja samog ispitivanja. Uporedo sa frekvencom, praćena je i promena pritiska u svim tačkama (slika 5.40). Uočava se da, u prvih deset minuta, dolazi do naglog povećanja pritiska kod pacova koji su konzumirali vodu i standardno pivo. Međutim, kod alkohola i piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, ovaj skok je izostao i kod njih je pritisak ostao konstantan. Nakon desetog minuta, kod svih životinja je uočen značajniji pad pritiska koji se nastavlja do četrdesetog minuta, izuzev kod piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, gde se isti odvija sve do sedamdesetog minuta. Nakon perioda opadanja, dolazi do blagih oscilacija u pritisku, ali su one zanemarljivo niske u odnosu na pređašnji period i traju sve do kraja eksperimenta. Zanimljivo je da je najmanji pad pritiska zabeležen kada su životinje tretirane vodom, dok su tretirani etanolom i standardnim pivom imali identičan efekat. Uočeno je i to da je brzina pada pritiska bila najveća kod pacova koji su tretirani etanolom, dok je kod vode taj pad bio najniži. Nakon četrdesetog minuta, javlja se statistički značajna razlika u padu pritiska pacova koji su tretirani pivom sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* i ostalih uzoraka, sve do 105-og minuta nakon čega se ta razlika smanjuje. Pretpostavlja se da je to posledica završetka metaboličkih procesa, koji su doprineli snižavanju sistolnog krvnog pritiska pacova. Dobijeni rezultati ukazuju da za pad pritiska nije odgovoran etanol, već određene bioaktivne komponente ekstrakta *Ganoderma lucidum*. Naime, u brojnim istraživanjima je dokazan dvofazni efekat alkohola na srčanu frekvencu i krvni pritisak. U prvi mah dolazi do blagog pada pritiska, usled vazodilatacije, nakon čega sledi vazokonstrikcija i rast krvnog pritiska i srčane frekvence (Guyton 1961).



Slika 5.40. Promena krvnog pritiska tokom vremena iskazana preko relativnih odnosa

Ovakvi rezultati su sasvim očekivani i u skladu sa sličnim istraživanjima koja su sprovedena na pacovima. Naime, u dve odvojene studije vršeno je ispitivanje uticaja *Ganoderma lucidum* na krvni pritisak pacova, u periodu od nekoliko nedelja i u akutnom stanju. Prva studija je pokazala da su određene bioaktivne komponente gljive dovele do smanjenja sistolnog krvnog pritiska (Y KABIR et al. 1988), dok je u drugoj studiji vršeno ispitivanje vodene i etarske frakcije (EF) ekstrakta *Ganoderma lucidum* na pritisak. Vodena frakcija nije dovela do hipotenzije, dok je EF izazvala redukciju pritiska od oko 90 mmHg (360 mg/kg) i 40 mmHg (36 mg/kg) na dozno zavisani način. Daljim ispitivanjem utvrđeno je da uzrok hipotenzije nije posledica inhibicije postganglione funkcije simpatičkog nervnog sistema, kako se u početku smatralo (Kanmatsuse et al. 1985, ADAcHI et al. 1988).

5.5.5. Ispitivanje uticaja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na krvni pritisak i srčanu frekvencu muškaraca mlađe starosne dobi

Veliki broj istraživanja bavio se uticajem alkohola na kardiovaskularni sistem. Pretpostavlja se da ne postoji bitna razlika između alkoholnih pića koja se konzumiraju, već da je jedini relevantni parametar količina unetog alkohola, odnosno njegovo pozitivno dejstvo na kardiovaskularni sistem u slučajevima umerene konzumacije. Do danas nije postignut konsenzus na svetskom nivou o bezbednim količinama alkohola, već svaka zemlja, u tom pogledu, ima svoje smernice. U većini država preporučene dnevne doze za osobe muškog pola kreću se od 10 do 40 g, ograničavajući se na maksimalnih 160 g na nedeljnom nivou. Za osobe ženskog pola te vrednosti se smanjuju na količinu između 8 i 20 g na dan. Institut za mentalno zdravlje Srbije u tom pogledu preporučuje do dva alkoholna pića dnevno (330 ml 5% piva, 140ml 12% vina ili 40 ml 40% jakog alkoholnog pića) za muškarce i jedno za žene (Knott et al. 2015).

Ispitivanje uticaja akutnog efekta piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, uz kontrolu na istu količinu etanola, izvršena je među muškom populacijom mlađe dobi. Rezultati ispitivanja delovanja na sistolni krvni pritisak (BPS), dijastolni krvni pritisak (BPD) i broj otkucaja srca (HR) za etanol (s) i pivo (p) prikazani su u tabeli 5.51 i na slici 5.41. Ispitivanje značajnosti razlika srednjih vrednosti praćenih parametara u svakom segmentu (vremenskoj tački) provereno je *t*-testom za zavisne uzorke.

Tabela 5.51. Akutni efekat etanola (s) i piva sa *Ganoderma lucidum* (p) na srčanu frekvencu (HR), sistolni (BPS) i dijastolni pritisak (BPD)

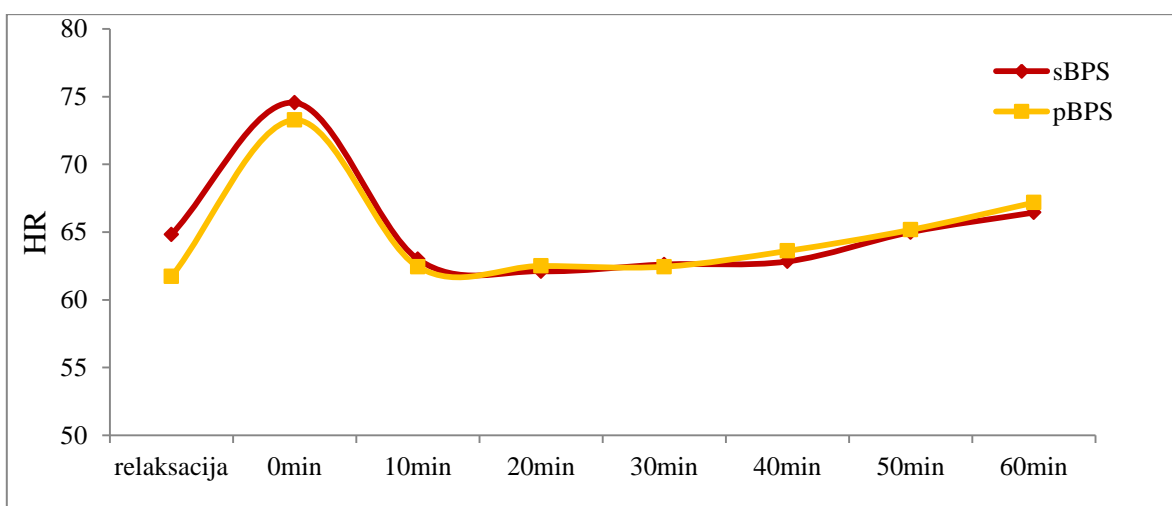
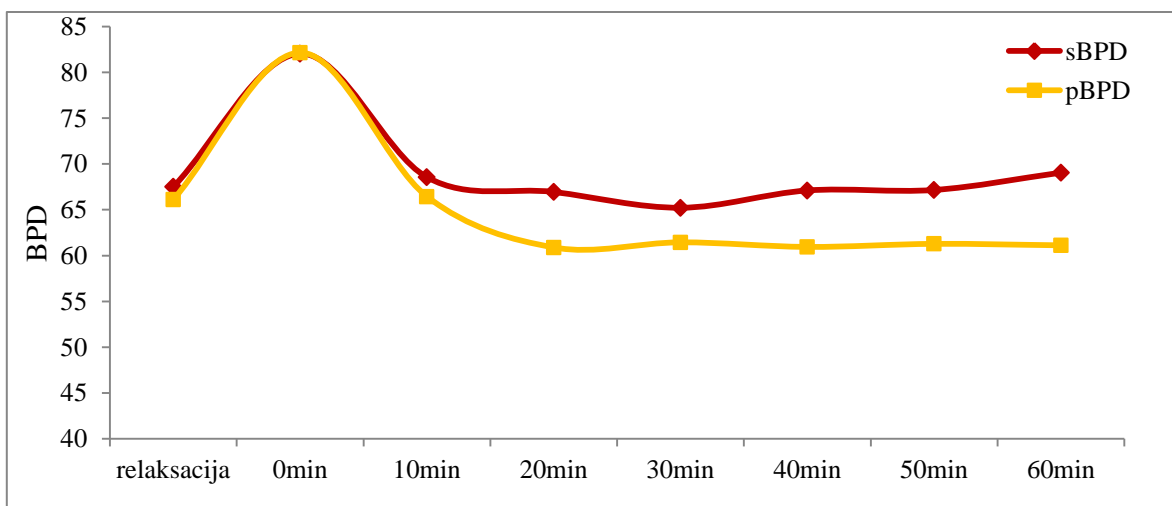
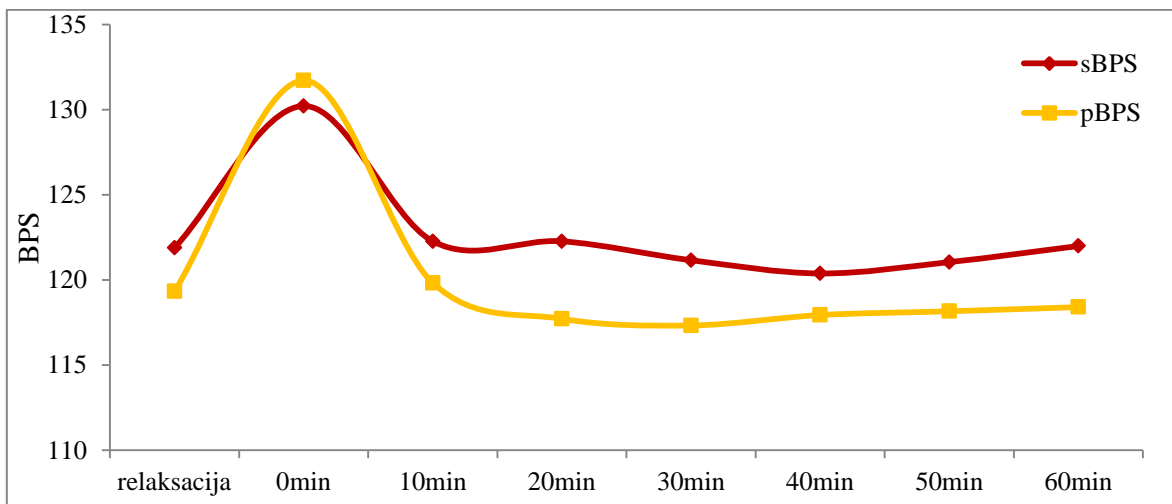
Segment (minuti)	sBPS	pBPS	p vrednost
relaksacija	121,89±7,23	117,33±9,36	0,022
0	130,22±10,03	131,72±9,34	0,454
10	122,28±7,15	119,83±9,98	0,245
20	122,28±7,21	117,72±10,13	0,015
30	121,17±9,38	117,33±7,98	0,050
40	120,39±8,71	117,94±8,77	0,093
50	121,06±8,81	118,17±8,45	0,100
60	122,00±10,59	118,41±8,79	0,226
segment	sBPD	pBPD	p vrednost
relaksacija	67,5±8,18	66,11±8,71	0,425
0	82,069,08	82,17±10,74	0,959
10	68,567,01	66,44±9,53	0,322
20	66,945,95	60,89±10,23	0,013
30	65,229,08	61,44±9,40	0,098
40	67,119,63	60,94±10,75	0,016
50	67,178,43	61,28±10,40	0,022
60	69,0610,47	61,12±10,91	0,005
segment	sHR	pHR	p vrednost
relaksacija	64,83±9,10	61,72±7,46	0,168
0	74,56±9,45	73,28±12,12	0,676
10	63,00±7,45	62,44±8,12	0,776
20	62,11±10,16	62,5±8,33	0,866
30	62,61±8,37	62,44±8,10	0,931
40	62,83±9,28	63,61±7,88	0,686
50	65,00±8,67	65,17±7,32	0,930
60	66,44±8,75	67,18±10,16	0,745

Iz prikazanih rezultata uočava se da, odmah nakon konzumiranja, kontrole i piva, dolazi do naglog skoka broja otkucaja srca, dijastolnog i sistolnog krvnog pritiska. Međutim, nakon deset minuta, njihove vrednosti se vraćaju na početni nivo. Ukoliko se uporede linije frekvencije, može se videti da između njih nema značajnih razlika, što je potvrđeno i statističkom analizom. Zanimljivo je da broj otkucaja srca opada sve do desetog

minuta, nakon čega se beleži stagnacija do tridesetog minuta, a potom u poslednjih dvadeset minuta dolazi do laganog i ravnomernog rasta broja otkucaja srca (slika 5.41c).

Kod sistolnog krvnog pritiska, situacija je malo drugačija. Naime, u dvadesetom i tridesetom minutu vrednosti se statistički značajno razikuju na nivou značajnosti $p < 0,05$, što znači da je pivo, u odnosu na kontrolni uzorak, dovelo do značajnog snižavanja pritiska. U četrdesetom i pedesetom minutu dolazi do smanjenja razlika na nivou značajnosti $p < 0,1$, dok u šezdesetom minutu nije bilo statistički značajnih razlika (slika 5.41a).

Kada pogledamo dobijene vrednosti za dijastolni pritisak, primećujemo da se ponavlja trend identičan slučaju sistolnog, izuzev što na kraju šezdesetog minuta postoje značajne razlike između uzoraka (slika 5.41b).



Slika 5.41. Promene srčane frekvence, sistolnog i dijastolnog pritiska kod muškaraca

Daljom analizom izvršeno je poređenje dve grupe muškaraca. Prvoj su pripadali apstinenti od alkohola, a drugoj oni koji piju najmanje jedno, a najviše četrnaest alkoholnih pića nedeljno. Između ove dve grupe nisu uočene statistički značajne razlike, na osnovu čega se može pretpostaviti da konzumiranje alkohola u preporučenim nedeljnim dozama nema negativnih efekata na srčanu frekvenciju i krvni pritisak.

Ovakvi rezultati bi se mogli objasniti činjenicom da su u pitanju mlade osobe, većinom nepušači, koje se umereno bave fizičkom aktivnošću. Međutim, kako je broj osoba u eksperimentu bio relativno mali, potrebno je sprovesti dodatna istraživanja.

Upoređivanjem podataka unutar samih grupa došlo se do interesantnih podataka. Zapravo, u okviru grupe koju čine mladići koji redovno konzumiraju alkohol, nije bilo statistički značajnih razlika unutar ispitivanih parametara. Nasuprot tome, u grupi apstinenata uočene su statistički značajne razlike od dvadesetog do pedesetog minuta na nivou značajnosti $p < 0,1$ za sistolni krvni pritisak. Kod dijastolnog krvnog pritiska, razlike su bile daleko uočljivije i za većinu testiranih segmenata na nivou značajnosti $p < 0,05$. Kod srčane frekvence nisu uočene statistički značajne razlike ni u jednom segmentu (tabela 5.52). Ovakvi rezultati ukazuju na potencijalnu povećanu osetljivost i snažniji farmakološki odgovor apstinenata na pivo sa dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum*.

Tabela 5.52. Razlike među ispitanicima u pogledu srčane frekvence (HR), sistolnog (BPS) i dijastolnog pritiska (BPD) za kontrolni uzorak (S) i pivo sa *Ganoderma lucidum* (PG)

		Uzorci		
Parametar	segment	S	PG	p vrednost
BPS	r	122,00	115,67	0,138
	0	132,17	130,67	0,394
	10	123,50	117,33	0,183
	20	122,50	114,83	0,027
	30	121,67	115,10	0,098
	40	123,17	115,57	0,074
	50	121,83	116,50	0,100
	60	123,33	116,00	0,201
BPD	r	68,17	64,33	0,119
	0	83,83	80,17	0,323
	10	70,50	64,67	0,027
	20	68,67	60,50	0,036
	30	69,83	60,67	0,087
	40	71,00	58,50	0,017
	50	70,50	59,00	0,017
	60	73,00	60,50	0,003
HR	r	66,50	61,67	0,340
	0	72,00	70,00	0,740
	10	64,83	61,00	0,284
	20	60,83	60,33	0,874
	30	63,67	61,67	0,590
	40	63,17	62,83	0,907
	50	65,83	62,83	0,224
	60	66,83	63,83	0,195

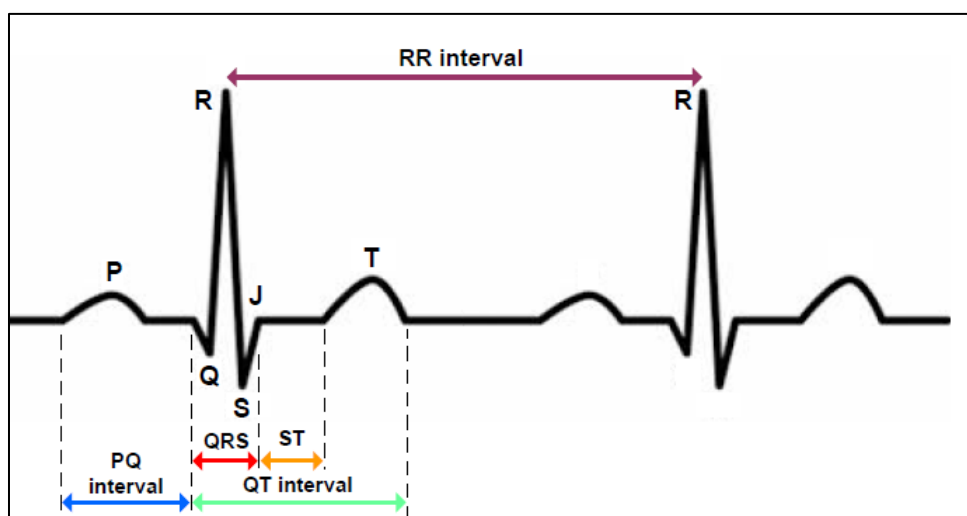
p – nivo značajnosti

5.5.5. Ispitivanje uticaja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na QT i RR intervale

Srce je centralni organ čovekovog krvotoka i svojom snagom pumpa krv u krvne sudove. Iz leve komore, preko aorte, krv se odvodi po telu. Aorta se grana u arterije, a one u arteriole, preko kojih krv dospeva u sva tkiva. Kako je srce autoritmičan organ, sve počinje istovremenim grčenjem, tj. sistolom obe pretkomore, pri čemu su obe komore opuštene, tj. nalaze se u dijastoli. Srce se nalazi pod kontrolom simpatičkog (stimulatornog) i parasimpatičkog vegetativnog, tj. nerva vagusa (inhibitornog) nervnog sistema.

Simpatička nervna vlakna oslobadjaju noradrenalin i povećavaju srčanu frekvencu, dok je nerv vagus usporava. Nervni impulsi iz viših delova centralnog nervnog sistema stižu do srca pomoću ove dve vrste vegetativnih nervnih vlakana i prilagođavaju njegov rad trenutnom fiziološkom stanju organizma (Guyton 1961).

U kardiologiji, QT interval predstavlja period između početka Q zupca do završetka T talasa i ekvivalent je akcionog potencijala komora, tj. njihove depolarizacije i repolarizacije (Savić i Bukarica-Gojković, 2008). QT interval je zavisan od frekvence rada srca i utoliko je kraći što je srčana frekvencija veća. R-R interval predstavlja vreme koje protekne između dva uzastopna elektrokardiograma (slika 5.42).



Slika 5.42. Izgled QT i R-R intervala u elektrokardiogramu (Guyton 1961)

Analizom dobijenih elektrokardiograma može se uočiti da je QT varijabilnost bila značajno povećana nakon konzumiranja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, nakon čega se vratila u normalu. Pretpostavlja se da je to posledica uticaja adaptacije unutrašnjeg akcionog potencijala i aktivnosti autonomnog nervnog sistema. Daljom analizom utvrđeno je da je struktura QT intervalnih serija bila različita od RR serija u fazi relaksacije, pri čemu je pivo imalo različite efekte na ove dve serije.

Evidentno je da ovo piće ima akutni i odloženi efekat na ceo kardiovaskularni sistem, koji se mogao pratiti kroz promene na krvnom pritisku i broju otkucaja srca.

Rezultati ukazuju i na to da je došlo do smanjenja parasimpatične kontrole srca i izmenjene dinamike QT intervala. Ako se ima u vidu da je dužina QT intervala definisana aktivacijom voltažnih kalijumovih kanala, tj. da se pri blokiranju ovih kanala QT interval skraćuje i obrnuto, pretpostavlja se da je uticaj bioaktivnih sastojaka koji potiču iz *Ganoderma lucidum* delovao na kalijumove kanale, proteine sa značajnom ulogom u regulaciji pasivnog toka jona K^+ kroz ćelijsku membranu. Regulacija protoka vrši se zahvaljujući konformacijskoj promeni proteina, koja omogućava dva njegova različita stanja: otvoreno i zatvoreno. To je dinamičan proces koji se ne može u potpunosti objasniti strukturom kanala. Oni u ćelijama učestvuju u fazi repolarizacije ćelijske membrane ekscitabilnih ćelija (nervnih i mišićnih, ali i srčanih), modulišu sinaptičku transmisiju, utiču na sekreciju hormona iz endokrinih ćelija i regulišu tonus glatkih mišića vaskularnog sistema (Guyton 1961).

Pored važnog udela u kardioprotekciji, K_{ATP} kanali su bitni i za proces vazodilatacije. Njihovim otvaranjem u vaskularnim, glatkim mišićnim ćelijama nastaje hiperpolarizacija ćelijske membrane, i na indirektan način se intracelularno smanjuje raspoloživost jona Ca^{2+} . Kao krajnji efekt nastaje vazodilatacija, do čega je takođe, kako se pretpostavlja, dovelo pivo sa *Ganoderma lucidum*. Međutim, potrebno je nastaviti istraživanja, kako bi se ovakvo delovanje dodatno potvrdilo.

5.6. Mogućnosti plasiranja dobijenih proizvoda i troškovi proizvodnje

Ciljevi savremene prehrambene industrije jesu povećanje obima proizvodnje i jeftinija proizvodnja, ali i zdraviji i kvalitetniji proizvodi. Korišćenje prirodnih sastojaka, poput medicinskih gljiva, može imati veliki uticaj na funkcionalna svojstva proizvoda, što i za proizvođače i potrošače može imati višestruki pozitivni efekat. Uticaj prirodnih proizvoda na zdravlje ljudi koji se uvode u ishranu preko „uobičajene“ hrane pokazao se kao efikasan na dugoročnom planu. Upravo u ovome leže potencijalne mogućnost dobijenog proizvoda, potpuno prirodnog, prijatnog ukusa i sa dodatom vrednošću.

Naravno, njegova cena igra bitnu ulogu, posebno u zemljama sa nižim životnim standardom. U tabeli 5.53 data je procena cene standardnog i bezalkoholnog piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* za velike sisteme i kraft pivare.

Tabela 5.53. Troškovi proizvodnje svetlog piva sa dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum* i bezalkoholnog piva sa dodatkom ekstrakta za bocu od 0,5 l

	Velika industrijska proizvodnja		Kraft pivare	
	PG3	BPG	PG3	BPG
Slad	1,96	1,55	8,24	7,54
Kukuruzni griz	0,55	0,67	-	-
Ekstrakt <i>G. lucidum</i>	0,60	0,60	0,60	0,60
Ekstrakt hmelja	0,07	0,07	0,10	0,10
Aromatični hmelj	0,80	0,80	3,20	3,20
CO ₂	0,09	0,09	0,25	0,25
Enzimi	0,14	0,14	1,24	1,24
Antioksidans	0,01	0,01	0,80	0,80
Sredstva za pranje i dezinfekciju	0,20	0,20	0,60	0,60
Električna energija	0,45	0,94	4,0	4,0
Voda	0,53	0,72	2,99	2,99
Mazut	1,43	2,14	3,58	3,58
Boca	15,00	15,00	15,00	15,00
Ostali troškovi	3,00	3,00	3,00	8,00
Ukupno RSD	24,83	25,93	44,60	47,90

Koncept ovakvog proizvoda moglo bi biti nefiltrirano mutno pivo koje će, pored ekstrakta gljive, sadržati i ćelije kvasaca kao dodatan izvor biokativnih komponenti. Ideja je da dobijeni proizvod bude dostupan široj populaciji po pristupačnim cenama, promovišući zdrav način ishrane, sa manjim akcentom na zaradi. Njegova cena u maloprodajnim objektima mogla bi iznositi oko 90 RSD, što ga svrstava u kategoriju lako dostupnih proizvoda. Osmišljen je i dizajn bezalkoholnog piva na bazi gljive *Ganoderma lucidum* i predstavljen na slici 5.43.



Slika 5.43. Dizajn bezalkoholnog piva na bazi gljive *Ganoderma lucidum*

6. ZAKLJUČAK

Osnovni doprinos ove doktorske disertacije je novi proizvod: specijalno pivo sa povećanim funkcionalnim svojstvima na bazi gljive *Ganoderma lucidum*. U okviru istraživanja izvršena je sveobuhvatna analiza relevantnih faktora, potrebnih za sagledavanje opravdanosti i primenljivosti ovakvog rešenja. Detaljna analiza načina ekstrakcije gljive imala je za cilj utvrđivanje optimalnih uslova za izdvajanja bioaktivnih jedinjenja. Ispitivanje različitih načina proizvodnje piva i uticaj dodavanja gljive i dobijenih ekstrakata na brzinu fermentacije, kao i senzorne karakteristike dobijenih proizvoda, vršeno je radi postizanja što boljih rezultata na polju ekonomičnosti, funkcionalne vrednosti i senzorne prihvatljivosti finalnog proizvoda. Njegova detaljna karakterizacija i senzorna ocena rađene su sa namerom utvrđivanja postignutih efekata obogaćivanja standardnog i bezalkoholnog piva, sa aspekta postignute funkcionalne vrednosti i senzorne prihvatljivosti od strane različitih ciljnih grupa potrošača. U tom smislu, muška i ženska populacija, konzumenti alkoholnih pića i apstinenti, pušači i nepušači, kao i profesionalni senzoričari, dali su finalnu senzornu ocenu dobijenih piva. Potencijalni funkcionalni efekat obogaćenih piva definisan je određivanjem sadržaja bioaktivnih komponenti i *in vivo* i *in vitro* ispitivanjima, na način na koji se ista vrše u medicinskoj praksi. I konačno, urađena je procena troškova proizvodnje ovakvog piva, kako bi se odredila njegova ekonomska isplativost.

Na osnovu spovedenih istraživanja, literarnih navoda i prikazanih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

Sa tehnološkog aspekta, postizanje optimalnih uslova ekstrakcije, dobijanje ekstrakata sa funkcionalnim svojstvima i proizvodnja piva:

- Najveći sadržaj azotnih materija dobijen je u vodenom ekstraktu (G15), kao rezultatu termičkog i ultrazvučnog tretmana (60 kHz), a najniže vrednosti dobijene su prilikom ekstrakcije 40% etanolom, dok je uticaj dezintegracije imao pozitivno dejstvo na sadržaj azotnih materija.
- Upotreba vode kao ekstragensa dala je najmanji sadržaj masti. Primena etanola ima pozitivan uticaj na izdvajanje masti, ali ne postoje razlike između korišćenja 40% i

70% etanola. Upotreba ultrazvučnog i termičkog tretmana nije dala očekivano povećanje sadržaja.

- Najpogodniji tretman za dobijanje povećanog sadržaja ugljenih hidrata je termički tretman vodom u trajanju od 2h, uz upotrebu ultrazvučnog tretmana od 60 kHz. Dezintegracijom se značajno povećao sadržaj u skoro svim uzorcima.
- Sadržaj polifenolnih materija značajno raste sa povećanjem dezintegracije gljive. Kao dobar ekstraktant pokazao se samo etanol, pri čemu je, sa povećanjem koncentracije etanola, porastao i sadržaj polifenolnih materija. Povećanjem frekvencije pri ultrazvučnom tretmanu dolazi do intenziviranja ekstrakcije. Za izdvajanje najvećeg sadržaja polifenolnih materija se, kao najpovoljnija, pokazala upotreba mlevene gljive, 70% etanola i ultrazvučnog tretmana od 60 kHz.
- Najveći prinos dobijen je kod vodenih (6,06–6,36g/100g), a najmanji kod alkoholnih ekstrakata, dobijenih iz sitno usitnjenog plodonosnog tela gljive (2,41–2,96g/100g). Sa ovog aspekta, kao najpogodniji se pokazao vodeni ekstrakt – rezultat primene ultrazvučnog tretmana od 60 kHz (G15).
- Najbolje senzorne ocene imali su alkoholni ekstrakti, dobijeni sitno seckanim plodonosnim telom i ekstrakcijom sa 40% etanolom, bez primene ultrazvučnog tretmana.
- Sadržaj α -glukana u svim ekstraktima bio je nizak. Korišćenjem alkoholne ekstrakcije i primenom ultrazvuka ne dolazi do značajnih promena pri ekstrakciji α -glukana, ali se dobija značajan uticaj na sadržaj ukupnih i β -glukana. Prednost se daje vodenoj ekstrakciji uz primenu termičkog tretmana.
- Najpogodniji tretman za dobijanje ekstrakata sa povećanim sadržajem azotnih materija, ugljenih hidrata, ukupnih i β -glukana jeste dezintegracija gljive, upotreba vode kao ekstragensa, termičkog tretmana i ultrazvuka od 60 kHz, a za dobijanje ekstrakata sa povećanim sadržajem polifenolnih materija upotreba 70% etanola, dezintegracija gljive i ultrazvučni tretman od 60 kHz.
- Rezultati HPLC analize pokazuju da na dobijene vrednosti za vanilinsku, *p*-kumarinsku i siringinsku kiselinu ekstraktant, kao ni ultrazvučni tretman, nije imao bitnijeg uticaja.

- *Ganoderma lucidum*, dodata u obliku usitnjenog plodonosnog tela, ekstrakta ili njihovom kombinacijom, u različitim fazama tehnološkog postupka proizvodnje nije imala značajnih aktivnosti na porast biomase upotrebljenih kvasaca, kao ni efekta na brzinu fermentacije.
- Od svih ispitanih tehnoloških postupaka proizvodnje piva na bazi gljive *Ganoderma lucidum*, kao najpogodniji pokazao se onaj sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* dodatom nakon filtracije, tj. u gotov proizvod.

Sa hemijskog aspekta, analizom dobijenih ekstrakata i piva, utvrđeno je da:

- Uzorak dobijen alkoholnom ekstrakcijom sa 70% etanolom (G5) imao je najveći sadržaj polifenolnih materija (620,83 mg/l GAE) i najveću antioksidativnost. Uzorak dobijen postupkom vodene ekstrakcije, termičkim i ultrazvučnim tretmanom (G15), pored niskog sadržaja ukupnih polifenolnih materija, imao je visoke vrednosti za antioksidativni potencijal. Dokazana je korelacija između svih antioksidativnih metoda. Analizirani ekstrakti mogu biti značajan izvor prirodnih antioksidanata, sa potencijalno povoljnim funkcionalnim efektom.
- Ispitivanjem isparljivih komponenata ekstrakata identifikovano je njih 30. Među najdominantnijim su etil-acetat, heksadekanska kiselina, izobutanol i etil oleat, repektivno. Analizom dobijenih piva utvrđeno je da se aromatski kompleks oba piva nije bitno razlikovao.
- Na bazi HPLC analize, konstantovan je veći sadržaj polifenolnih komponenti kod etanolnih nego kod vodenih ekstrakata. Kod uzorka dobijenog alkoholnom ekstrakcijom sa 70% etanolom (G5), detektovano je devet od šesnaest polifenola, pri čemu je najveći sadržaj bio za naringenin (8,10 µg/l), hesperetin (5,53 µg/l), katehin (4,93 µg/l) i vanilinsku kiselinu (2,06 µg/l). U svim ostalim uzorcima, ustanovljene su znatno niže količine. U vodenim ekstraktima primećen je nedostatak *p*-hidroksibenzoeve kiseline, a u etanolnim kempferola. Prisustvo galne, kofeinske, benzoeve i hlorogenske kiseline, kao i rutina i resveratola, nije detektovano ni u jednom uzorku. HPLC analiza bezalkohalnog piva i piva sa *Ganoderma lucidum* pokazala je sličnu količinu fenolnih jedinjenja, sem kod *p*-

hidroksibenzoeve, benzoeeve, vanilinske kiseline i siringinske kiseline, u kojima je došlo do povećanja za 0,10 mg/l, 0,12 mg/l, 0,27 mg/l, i 0,15 mg/l respektivno.

- Na bazi LC-MS analize konstatovano je da su se, kao najdominantnije komponente kod ekstrakata, izdvojile ganoderinske kiseline A, D i G, dok je sadržaj ganoderinskih kiselina C i B bio nešto niži, a svih detektovanih značajno veći kod ekstrakta dobijenog alkoholnom ekstrakcijom (izuzev u slučaju lucidenskih kiselina LM₁, E i D₂). Količina 12-hidroksi-ganoderinske kiseline nije se bitno razlikovala u uzorcima. Utvrđeno je i prisustvo jako (ganoderinske kiseline A, J i lucidenske kiseline A) i umereno (ganoderinske kiseline B i C₂) gorkih triterpena. Analizom dobijenog piva na bazi gljive *Ganoderma lucidum* detektovane su ganoderinske kiseline A, B, D, G i H, ganoderinske kiseline E, C₆, F, J i lucidinska kiselina LM₁ u tragovima, dok su ganoderinska kiselina C₂, lucidinska kiselina E i ganodermanotriol nedostajali u uzorku.
- Protonskom NMR spektroskopijom uzorka dobijenog alkoholnom ekstrakcijom sa 70% etanolom (G5) potvrđeno je prisustvo terpenskih komponenti (ganoderinske kiseline), amino-kiselina, masnih kiselina, ugljenih hidrata i triterpenskih kiselina, aromatičnih amino-kiselina, nukleozida, aromatičnih alkohola i polifenolnih jedinjenja. Spektralni profili dobijeni NMR analizom polaznog i obogaćenog piva uzorka veoma su slični. Uočene su male promene u svim regionima u relativnoj proporciji pikova. Detektovano je prisustvo fermentabilnih šećera, dekstrina i terpenskih jedinjenja.
- Analiza FT-IR spektara potvrdila je prisustvo karakterističnih apsorpcionih traka koje odgovaraju strukturama tipičnim za prisustvo α - i β -glikozidnih veza, β -glukana, proteina, polisaharida i polifenola u ekstraktu dobijenom alkoholnom ekstrakcijom sa 70% etanolom (G5). Na FT-IR spektru dobijenih piva uočene trake odgovaraju spektralnim trakama, koje potiču od ekstrakta *Ganoderma lucidum*.
- U obogaćenim uzorcima dokazano je slabo povećanje antioksidativnog potencijala.
- U pogledu izgleda i stabilnosti pene proizvedenih piva, postignuti su bolji efekti. Bezalkoholno pivo sa dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum* ima sitnozrnu,

kremastu penu sa znatno produženom stabilnošću. Površina koju zauzima u čaši povećava se za 15-19,2% .

Sa aspekta senzorne ocene primene gljive *Ganoderma lucidum* u proizvodnji piva sa povećanim funkcionalnim svojstvima, utvrđeno je da:

- Ocenjivači ne primećuju razike između dobijenih piva, što znači da korišćenje datih količina plodonosnog tela i ekstrakata u postupku fermentacije daje slične senzorne rezultate.
- Dodavanje ekstrakta u količinama od 0,5 i 1,0 ml/l daje pivo sa približno istim karakteristikama kao polazno pivo, što znači da se bioaktivni sastojci nisu negativno odrazili na kvalitet. Veće količine, od 3,0 i 4,5 ml/l, dovele su do lošijih senzornih karakteristika, posebno u pogledu gorčine i dopadljivosti uzorka.
- Pivu na bazi *Ganoderma lucidum* i muškarci i žene su dali identične ocene kao standardnom u pogledu svežine, ali i bitno drugačije po pitanju punoće ukusa, i naročito arome, ukusa, gorčine i opšteg utiska.
- Između muških i ženskih potrošača postoje razlike u oceni dopadljivosti ispitivanih piva, dok su ostali parametri slično ocenjeni. Prema mišljenju muških ocenjivača, piva se razlikuju značajno u svežini i veoma značajno u svim ostalim senzornim osobinama, dok osobe ženskog pola smatraju da se dobijena piva statistički vrlo značajno razlikuju po svim parametrima.
- Nije bilo razlike u senzornim ocenama pušača i nepušača, po svim ispitivanim parametrima.
- Osobe koje ne konzumiraju pivo drugačije ocenjuju dobijeni proizvod od redovnih konzumenata. Značajna razlika zapaža se kod gorčine i dopadljivosti. Nekonzumenti daju prednost pivu sa manjom gorčinom i, u ovom slučaju, standardnom pivu tipa *pils*.
- Senzorni profil piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* značajno se razlikovao od standardnog. Naknadna gorčina bila je izraženija, dok je hmeljna aroma bila nešto slabija.

- U senzornom profilu bezalkoholnih piva sa dodatkom ekstrakta *Ganoderma lucidum* dobija se piće harmoničnog i zaokruženog ukusa, koje više podseća na standardno pivo. Sladni ukus, medna nota i slatkoća značajno su ublaženi. Opšti utisak svih ocenjivača jeste da ovakvo pivo u veoma maloj meri asocira na osnovu od koje je dobijeno.
- Povećano mikrobistatičko delovanje dobijenog piva uočeno je, u odnosu na kontrolno, prema svim ispitivanim mikroorganizmima.

Sa aspekta mikrobioloških analiza ekstrakta i dobijenih piva, utvrđeno je sledeće:

- Nije bilo značajnih razlika između etanolnih i vodenih ekstrakata na patogene mikroorganizme. Najjači efekat ispoljen je prema *Listeria monocytogenes*>*Yersinia enterocolitica*>*E. coli* O157:H7, pri čemu ekstrakti nisu samo inhibirali rast bakterija, već su imali i značajno baktericidno dejstvo. Najjača inhibitorna aktivnost zapažena je kod uzorka G5 prema *E. coli* O157:H7 i *Listeria monocytogenes*, dok su svi uzorci imali podjednako dejstvo prema *Yersinia enterocolitica* i svim uzročnicima mikrobiološkog kvarenja piva (*Lactobacillus brevis*, *Pectinatus cerevisiiphilus*, *Geobacillus Stearothermophilus*, *Megasphaera cerevisiae*).
- Dobijeno obogaćeno bezalkoholno pivo, u odnosu na kontrolno, ima povećano mikrobistatičko delovanje prema svim ispitivanim mikroorganizmima. Može se pretpostaviti da će piva biti stabilnija u dužem vremenskom periodu i otpornija na dejstvo već pomenutih mikroorganizama.

Ispitivanja funkcionalnog delovanja dobijenih ekstrakata i piva sa dodatkom vrednošću pokazala su sledeće:

- U pogledu citotoksičnog efekta, uočena je slabija efikasnost vodenih ekstrakata u odnosu na etanolne, i to prema FemX ćelijama melanoma, pri čemu je najnižu IC₅₀ vrednost imao uzorak dobijenom alkoholnom ekstrakcijom sa 70% etanolom (G5), 240,9±4 µg/ml u prvih 24h, odnosno 110,5±3,8µg/ml nakon 48h. Dokazano je i pozitivno delovanje istog ekstrakta na ćelijske linije adenokarcinoma humanog cerviksa, pluća i hibrid humanih somatskih ćelija. Bezalkoholno pivo obogaćeno ispitivanim količinama ekstrakta nije imalo efekta na odabrane

ćelijske linije, ali je zato tri puta veća koncentracija ekstrakta dala efekte nakon 48h. Najjače dejstvo ispoljeno je prema HeLa humanim epitelnim ćelijama cerviksa, a nešto slabije prema FemX humanom melanomu. Ćelije adenokarcinoma pluća (A549) su, nakon 48h, redukovane za 50% usled izazvane apoptoze u koncentraciji od 927 µg/ml.

- Ispitivanjem uticaja alkohola, piva i piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na krvni pritisak i srčanu frekvencu pacova, ustanovljeno je da treća vrsta pića nakon desetog minuta dovodi do konstantnog i ujednačenog pada srčane frekvencije. Najmanji pad pritiska zabeležen je kada su životinje tretirane vodom, dok su tretmani etanolom i standardnim pivom imali identičan efekat. Uočeno je i to da je brzina pada pritiska u jedinici vremena bila najveća kod pacova tretiranih etanolom. Nakon četrdesetog minuta, javila se statistički značajna razlika u padu pritiska pacova tretiranih pivom sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* i ostalih uzoraka, sve do 105-og minuta, nakon čega se ta razlika smanjila. Evidentno je i da etanol nije odgovoran za ovakve rezultate, već određene bioaktivne komponente ekstrakta *Ganoderma lucidum*.
- Istraživanjem uticaja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na krvni pritisak i srčanu frekvencu muškaraca mlađe starosne dobi utvrđeno je da, nakon konzumiranja, kontrole i piva, dolazi do naglog skoka broja otkucaja srca, dijastolnog i sistolnog krvnog pritiska. Posle deset minuta, njihove vrednosti se vraćaju na početni nivo. U pogledu srčane frekvence nije bilo razlike među ispitanicima, dok je nakon dvadesetog minuta došlo do pada sistolnog i dijastolnog pritiska prilikom konzumiranja piva sa *Ganoderma lucidum* (u odnosu na kontrolu). Do šezdesetog minuta, ove razlike su se smanjile, dok one u promenama srčane frekvenije i pritiska nisu uočene ni kod mladića koji redovno konzumiraju alkohol, analizirane u odnosu na apstinente. Međutim, u okviru grupe nekonzumenata zapažene su značajne razlike od dvadesetog do pedesetog minuta za sistolni i daleko uočljivije razlike za dijastolni krvni pritisak. Kod srčane frekvence, nisu zabeležene statistički značajne razlike ni u jednom segmentu.

- Na osnovu ispitivanja uticaja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* na QT i RR interval uočeno je da je QT varijabilnost bila značajno povećana nakon konzumiranja piva sa ekstraktom *Ganoderma lucidum*, nakon čega se vratila u normalu. Struktura QT intervalnih serija bila je različita od RR serija u fazi relaksacije, pri čemu je pivo imalo različita dejstva na ove dve serije. Evidentno je da pivo sa *Ganoderma lucidum* ima akutni i odloženi efekat na ceo kardiovaskularni sistem, koji se mogao pratiti kroz promene krvnog pritiska i broja otkucaja srca. Rezultati ukazuju i na to da je došlo do smanjenja parasimpatičke kontrole srca i izmenjene dinamike QT intervala, što je moguća posledica delovanja bioaktivnih sastojaka (poteklih iz *Ganoderma lucidum*) na kalijumove kanale.

Tehnoekonomska analiza predloženog rešenja ukazuje na činjenicu da:

- Cena proizvodnje jedne flaše od 0,5l, ukoliko se pivo proizvodi u velikim pivarama, iznosi približno 24,83 RSD za standardno svetlo, odnosno 25,93 RSD za bezalkoholno pivo. Ukoliko se, pak, proizvodnja vrši u kraft pivarama, može se računati sa cenom od oko 44,60 RSD za standardno, to jest 47,90 RSD za bezalkoholno pivo. U skladu sa tim, prodajna cena bi mogla iznositi do 90 RSD, što ova piva svrstava u kategoriju proizvoda koji bi mogli da nađu svoje mesto na tržištu i u kategoriji „specijalnih piva“ opravdaju svoju cenu među konkurentnim proizvodima.

Na osnovu svega izloženog, može se zaključiti da je upravo bezalkoholno pivo sa ekstraktom *Ganoderma lucidum* proizvod koji ima najviše potencijala na tržištu. Zbog svojih senzornih svojstava i funkcionalne vrednosti, zahvaljujući sadržaju bioaktivnih supstanci i projektovanoj ceni, mogao bi zauzeti posebnu poziciju kako kod potrošača opredeljenih za pivo bez sadržaja alkohola, tako i onih koji teže proizvodima sa dodatkom vrednošću i superiornim senzornim svojstvima u odnosu na standardne proizvode. Činjenica da ovaj proizvod ne sadrži alkohol (jedini ograničavajući faktor kada je standardno pivo u pitanju, svrstava ga u kategoriju funkcionalnih napitaka čime se mogućnost njegove primene proširuje ne samo na osvežavajuća i funkcionalna svojstva,

već i nadoknađivanje vode u organizmu, što predstavlja prednost samu za sebe. Imajući u vidu činjenicu da njegova proizvodnja ne zahteva posebne uslove, sa industrijskog značaja predstavlja posebnu komparativnu prednost.

7. LITERATURA

(2006) [online], available: <http://www.best-practice-business.de/blog/geschaeftsidee/2006/04/22/karla-biervertrieb-uber-die-apotheke/> [accessed

Action, E. C. (1999) 'Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document', *British Journal of Nutrition*, 81(1).

ADACHI, K., NANBA, H., OTSUKA, M. and KURODA, H. (1988) 'Blood pressure-lowering activity present in the fruit body of grifola frondosa (maitake). I', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36(3), 1000-1006.

Adams, M., Christen, M., Plitzko, I., Zimmermann, S., Brun, R., Kaiser, M. and Hamburger, M. (2010) 'Antiplasmodial lanostanes from the Ganoderma lucidum mushroom', *Journal of natural products*, 73(5), 897-900.

Agius, L. (2007) 'New hepatic targets for glycaemic control in diabetes', *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4), 587-605.

Aizenman, J. and Brooks, E. (2008) 'Globalization and taste convergence: the cases of wine and beer', *Review of International Economics*, 16(2), 217-233.

Ajith, T., Sudheesh, N., Roshny, D., Abishek, G. and Janardhanan, K. (2009) 'Effect of Ganoderma lucidum on the activities of mitochondrial dehydrogenases and complex I and II of electron transport chain in the brain of aged rats', *Experimental gerontology*, 44(3), 219-223.

Akerlof, G. A. (1991) 'Procrastination and obedience', *The American Economic Review*, 81(2), 1-19.

Akerlof, G. A. and Kranton, R. E. (2000) 'Economics and identity', *The Quarterly Journal of Economics*, 115(3), 715-753.

Akerlof, G. A. and Kranton, R. E. (2011) 'Identity economics', *Warum wir ganz*.

Akpinar-Bayizit, A., Yilmaz-Ersan, L. and Ozcan, T. (2010) 'Determination of boza's organic acid composition as it is affected by raw material and fermentation', *International Journal of Food Properties*, 13(3), 648-656.

Alberti, K. G. M., Zimmet, P. and Shaw, J. (2005) 'The metabolic syndrome-a new worldwide definition', *The Lancet*, 366(9491), 1059.

Alexander, N., Rowe, S., Brackett, R. E., Burton-Freeman, B., Hentges, E. J., Kretser, A., Klurfeld, D. M., Meyers, L. D., Mukherjea, R. and Ohlhorst, S. (2015) 'Achieving a transparent, actionable framework for public-private partnerships for food and nutrition research', *The American journal of clinical nutrition*, 101(6), 1359-1363.

Alexopoulou, A. and Papatheodoridis, G. V. (2012) 'Current progress in the treatment of chronic hepatitis C', *World J Gastroenterol*, 18(42), 6060-6069.

Allsopp, P., Possemiers, S., Campbell, D., Gill, C. and Rowland, I. (2013) 'A comparison of the anticancer properties of isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin using in vitro models of colon cancer', *Biofactors*, 39(4), 441-447.

Almand, B., Resser, J. R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J. I., Kwon, E. D., Carbone, D. P. and Gabrilovich, D. I. (2000) 'Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer', *Clinical Cancer Research*, 6(5), 1755-1766.

Analytica, E. (2008) 'EBC Analysis Committee, Fachverlag Hans Carl ', *Nurnberg, Germany*.

Anderson, K. (2004) *The world's wine markets: Globalization at work*, Edward Elgar Publishing.

Anderson, R. A., Polansky, M. M., Bryden, N. A., Roginski, E. E., Mertz, W. and Glinsmann, W. (1983) 'Chromium supplementation of human subjects: effects on glucose, insulin, and lipid variables', *Metabolism*, 32(9), 894-899.

Andlauer, W. and Fürst, P. (2002) 'Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook', *Food Research International*, 35(2), 171-176.

Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L. and Duffy, M. J. (1997) 'The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review', *International Journal of Cancer*, 72(1), 1-22.

Anthony, M. P., Burrows, J. N., Duparc, S., JMoehrle, J. and Wells, T. N. (2012) 'The global pipeline of new medicines for the control and elimination of malaria', *Malaria journal*, 11(1), 316.

Antinori, A., Coenen, T., Costagiola, D., Dedes, N., Ellefson, M., Gatell, J., Girardi, E., Johnson, M., Kirk, O. and Lundgren, J. (2011) 'Late presentation of HIV infection: a consensus definition', *HIV medicine*, 12(1), 61-64.

Ares, G., Gimenez, A. and Gambaro, A. (2008) 'URUGUAYAN CONSUMERS'PERCEPTION OF FUNCTIONAL FOODS', *Journal of Sensory Studies*, 23(5), 614-630.

Ares, G., Giménez, A. and Gámbaro, A. (2008) 'Influence of nutritional knowledge on perceived healthiness and willingness to try functional foods', *Appetite*, 51(3), 663-668.

Arora, A., Bhaskar, A., Minten, B., Vandeplas, A. and Swinnen, J. (2011) 'Opening the Beer Gates: How Liberalization Caused Growth in India's Beer Market', *The Economics of Beer*, 308-332.

Arranz, S., Chiva-Blanch, G., Valderas-Martínez, P., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventós, R. M. and Estruch, R. (2012) 'Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer', *Nutrients*, 4(7), 759-781.

Arts, M., Guides, T. and Work, M. T. (2016) 'What Does Science Say about High-protein Beer? A Gimmick?'

Aspinall, G. O. (1980) 'Chemistry of cell wall polysaccharides', *The Biochemistry of plants: a comprehensive treatise (USA)*.

Augustin, M. A., Riley, M., Stockmann, R., Bennett, L., Kahl, A., Lockett, T., Osmond, M., Sanguansri, P., Stonehouse, W. and Zajac, I. (2016) 'Role of food processing in food and nutrition security', *Trends in Food Science & Technology*, 56, 115-125.

Baby, S., Johnson, A. J. and Govindan, B. (2015) 'Secondary metabolites from Ganoderma', *Phytochemistry*, 114, 66-101.

Back, W. and Bohak, I. (2005) *Ausgewählte kapitel der brauereitechnologie*, Fachverl. Carl.

Badano, J. L. and Katsanis, N. (2002) 'Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission', *Nature Reviews Genetics*, 3(10), 779-789.

- Baik, I. and Shin, C. (2008) 'Prospective study of alcohol consumption and metabolic syndrome', *The American journal of clinical nutrition*, 87(5), 1455-1463.
- Bain, L. K., Myint, P. K., Jennings, A., Lentjes, M. A., Luben, R. N., Khaw, K.-T., Wareham, N. J. and Welch, A. A. (2015) 'The relationship between dietary magnesium intake, stroke and its major risk factors, blood pressure and cholesterol, in the EPIC-Norfolk cohort', *International journal of cardiology*, 196, 108-114.
- Bamforth, C. (2009) *Beer: tap into the art and science of brewing*, Oxford University Press.
- Bamforth, C. W. (2002) 'Nutritional aspects of beer—a review', *Nutrition Research*, 22(1), 227-237.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) 'Dendritic cells and the control of immunity', *Nature*, 392(6673), 245-252.
- Banthorpe, D., Charlwood, B. and Francis, M. (1972) 'Biosynthesis of monoterpenes', *Chemical reviews*, 72(2), 115-155.
- Barrons, R. and Tassone, D. (2008) 'Use of Lactobacillus probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review', *Clinical therapeutics*, 30(3), 453-468.
- Baxevanis, C. N., Perez, S. A. and Papamichail, M. (2009) 'Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy', *Cancer immunology, immunotherapy*, 58(3), 317-324.
- Baxter, E. D. and Hughes, P. S. (2001) *Beer: Quality, safety and nutritional aspects*, Royal Society of Chemistry.
- Bech-Larsen, T. and Scholderer, J. (2007) 'Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects', *Trends in Food Science & Technology*, 18(4), 231-234.
- Becker, G. S. and Murphy, K. M. (1988) 'A theory of rational addiction', *Journal of political Economy*, 96(4), 675-700.
- Beer, L. and Boswell, T. (2001) 'The effects of globalization on inequality: a cross-national analysis', *Halle Institut Occasional Paper*.

Bellisle, F., Diplock, A., Hornstra, G., Koletzko, B., Roberfroid, M., Salminen, S. and Saris, W. (1998) 'British Journal of Nutrition Volume 80 Supplement Number 1 August 1998: Functional Food Science in Europe', *British Journal of Nutrition (United Kingdom)*.

Belščak-Cvitanovića, A., Nedovićb, V., Salević, A., Despotovićb, S., Komes, D., Nikšićb, M., Bugarški, B. and Čukalovićb, I. L. 'MODIFICATION OF FUNCTIONAL QUALITY OF BEER BY USING MICROENCAPSULATED GREEN TEA (CAMELLIA SINENSIS L.) AND GANODERMA MUSHROOM (GANODERMA LUCIDUM L.) BIOACTIVE COMPOUNDS'.

ben Omar, N. and Ampe, F. (2000) 'Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol', *Applied and environmental microbiology*, 66(9), 3664-3673.

Bendsen, N. T., Christensen, R., Bartels, E. M., Kok, F. J., Sierksma, A., Raben, A. and Astrup, A. (2013) 'Is beer consumption related to measures of abdominal and general obesity? A systematic review and meta-analysis', *Nutrition Reviews*, 71(2), 67-87.

Benkouider, C. (2004) 'Functional foods: A global overview', *International Food Ingredients*, 5, 66-68.

Benkouider, C. (2005) 'The world's emerging markets', *Functional foods and nutraceuticals*, 44, 8-11.

Benzie, I. F. and Strain, J. (1996) 'The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay', *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. (1992) 'Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme', *Biochemical medicine and metabolic biology*, 48(2), 91-121.

Bhattacharyya, C., De, S., Basak, A., Banerjee, M., Maitra, S. and Samajpati, N. (2006) 'Antimicrobial activities of some Basidiomycetous fungi', *Journal of Mycopathological Research*, 44(1), 129-135.

Bigliardi, B. and Galati, F. (2013) 'Innovation trends in the food industry: the case of functional foods', *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129.

Bishop, K. S., Kao, C. H., Xu, Y., Glucina, M. P., Paterson, R. R. M. and Ferguson, L. R. (2015) 'From 2000years of Ganoderma lucidum to recent developments in nutraceuticals', *Phytochemistry*, 114, 56-65.

Bisht, P. (2016) '

Beer Market By Type (Strong Beer, Light Beer), Production (Macro, Micro Brewery), Category (Premium, Super premium, Normal) and Packaging (Canned, Bottled, Draught) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2014 - 2020', [online], available: <https://www.alliedmarketresearch.com/beer-market> [accessed

BJCP (2015) 'BJCP Style Guide',

Blanquer-Rosselló, M., Oliver, J., Valle, A. and Roca, P. (2013) 'Effect of xanthohumol and 8-prenylnaringenin on MCF-7 breast cancer cells oxidative stress and mitochondrial complexes expression', *Journal of cellular biochemistry*, 114(12), 2785-2794.

Blumberg, J., Heaney, R. P., Huncharek, M., Scholl, T., Stampfer, M., Vieth, R., Weaver, C. M. and Zeisel, S. H. (2010) 'Evidence-based criteria in the nutritional context', *Nutrition Reviews*, 68(8), 478-484.

Bobak, M., Skodova, Z. and Marmot, M. (2003) 'Beer and obesity: a cross-sectional study', *European journal of clinical nutrition*, 57(10), 1250-1253.

Boh, B. (2013) 'Ganoderma lucidum: a potential for biotechnological production of anti-cancer and immunomodulatory drugs', *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 8(3), 255-287.

Boh, B., Hodzar, D., Dolničar, D., Berovič, M. and Pohleven, F. (2000) 'Isolation and quantification of triterpenoid acids from Ganoderma applanatum of Istrian origin', *Food Technology and Biotechnology*, 38(1), 11-18.

Booyse, F. M., Pan, W., Grenett, H. E., Parks, D. A., Darley-USmar, V. M., Bradley, K. M. and Tabengwa, E. M. (2007) 'Mechanism by which alcohol and wine polyphenols affect coronary heart disease risk', *Annals of epidemiology*, 17(5), S24-S31.

Bornkessel, S., Bröring, S., Omta, S. O. and van Trijp, H. (2014) 'What determines ingredient awareness of consumers? A study on ten functional food ingredients', *Food Quality and Preference*, 32, 330-339.

Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M. (1990) '[36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies', *Methods in enzymology*, 186, 343-355.

Bottorff, T. and Meason, E. (2008) 'All About Beer: Brewing, Pairing, & Enjoying the World's Most Popular Alcoholic Beverage, Exhibit Brochure'.

Boudet, A.-M. (2007) 'Evolution and current status of research in phenolic compounds', *Phytochemistry*, 68(22), 2722-2735.

Boyd, J. H. and Weissman, M. M. (1983) 'Different Definitions of Alcoholism, I: Impact of Seven', *Am J Psychiatry*, 140, 1309-1313.

Bragazzi, N. L., Martini, M., Saporita, T. C., Nucci, D., Gianfredi, V., Maddalo, F., Di Capua, A., Tovani, F. and Marensi, L. (2017) 'Chapter 17 - Nutraceutical and functional food regulations in the European Union A2 - Bagchi, Debasis' in Nair, S., ed. *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, San Diego: Academic Press, 309-322.

Bretschneider, E. (1895) *Botanicum Sinicum*, Kelly & Walsh, Limited.

Brewers, o. E. (2015) *Beer statistics 2015*.

Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P. and Stevens, R. (2004) 'Chemical and physical properties of beer', 662-712.

Briggs, D. E., Hough, J. S., Stevens, R. and Young, T. W. (1982) *Malting and brewing science: hopped wort and beer*, Springer Science & Business Media.

Buiatti, S. (2009) 'Beer composition: an overview', *Beer in health and disease prevention*, 213-226.

Burdock, G. A. and Carabin, I. G. (2004) 'Generally recognized as safe (GRAS): history and description', *Toxicology letters*, 150(1), 3-18.

Burdock, G. A., Carabin, I. G. and Griffiths, J. C. (2006) 'The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries', *Toxicology*, 221(1), 17-27.

Byung-Sun, M., Jiang-Jing, G., Nakamura, N. and Hattori, M. (2000) 'Triterpenes from the spores of *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against meth-A and LLC tumor cells', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(7), 1026-1033.

Campbell, G. and Fogarty, J. (2006) 'The nature of the demand for alcohol: understanding elasticity', *British Food Journal*, 108(4), 316-332.

Cao, L.-Z. and Lin, Z.-B. (2002) 'Regulation on maturation and function of dendritic cells by Ganoderma lucidum polysaccharides', *Immunology letters*, 83(3), 163-169.

Cao, Q.-Z. and Lin, Z.-b. (2004) 'Antitumor and anti-angiogenic activity of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide', *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 833-838.

Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000) 'Angiogenesis in cancer and other diseases', *Nature*, 407(6801), 249-257.

Casson, A., Zheng, Z., Chiasson, D., MacDonald, K., Riddell, D., Guernsey, J., Guernsey, D. and McLaughlin, J. (2003) 'Associations between genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma', *Cancer detection and prevention*, 27(2), 139-146.

CFR Ferreira, I., A Vaz, J., Vasconcelos, M. H. and Martins, A. (2010) 'Compounds from wild mushrooms with antitumor potential', *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 10(5), 424-436.

Chadwick, J. (1996) *Lexicographica Graeca: contributions to the lexicography of Ancient Greek*, Oxford University Press.

Challis, G. and Stam, H. (1990) 'The spontaneous regression of cancer: a review of cases from 1900 to 1987', *Acta oncologica*, 29(5), 545-550.

Chang, R. (1996) 'Functional properties of edible mushrooms', *Nutrition Reviews*, 54(11), S91.

Chang, S. (2004) 'Ganoderma lucidum—a leader of edible and medicinal mushrooms', *Int Agri Trade*, 90, 22-24.

Chen, Y., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Li, C. and Wang, Y.-X. (2008) 'Purification, composition analysis and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of Ganoderma atrum', *Food Chemistry*, 107(1), 231-241.

Cheung, P. C. (2008) *Mushrooms as functional foods*, John Wiley & Sons.

Cheung, W. M., Hui, W. S., Chu, P. W., Chiu, S. W. and Ip, N. Y. (2000) 'Ganoderma extract activates MAP kinases and induces the neuronal differentiation of rat pheochromocytoma PC12 cells', *FEBS letters*, 486(3), 291-296.

Chien, C. M., Cheng, J.-L., Chang, W.-T., Tien, M.-H., Tsao, C.-M., Chang, Y.-H., Chang, H.-Y., Hsieh, J.-F., Wong, C.-H. and Chen, S.-T. (2004) 'Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance CD56+ NK-cell cytotoxicity in cord blood', *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(21), 5603-5609.

Childs, N. M. (1997) 'Foods that help prevent disease: consumer attitudes and public policy implications', *Journal of Consumer Marketing*, 14(6), 433-447.

Childs, N. M. (1999) 'Marketing functional foods: what have we learned? An examination of the metamucil, benefit, and heartwise introductions as cholesterol-reducing ready-to-eat cereals', *Journal of medicinal food*, 2(1), 11-19.

Childs, N. M. and Poryzees, G. H. (1998) 'Foods that help prevent disease: consumer attitudes and public policy implications', *British Food Journal*, 100(9), 419-426.

Chiva-Blanch, G., Condines, X., Magraner, E., Roth, I., Valderas-Martínez, P., Arranz, S., Casas, R., Martínez-Huélamo, M., Vallverdú-Queralt, A. and Quifer-Rada, P. (2014) 'The non-alcoholic fraction of beer increases stromal cell derived factor 1 and the number of circulating endothelial progenitor cells in high cardiovascular risk subjects: A randomized clinical trial', *Atherosclerosis*, 233(2), 518-524.

Chiva-Blanch, G., Magraner, E., Condines, X., Valderas-Martínez, P., Roth, I., Arranz, S., Casas, R., Navarro, M., Hervas, A. and Sisó, A. (2015) 'Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: a randomized feeding trial', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(1), 36-45.

Choi, H. K., Atkinson, K., Karlson, E. W., Willett, W. and Curhan, G. (2004) 'Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study', *The Lancet*, 363(9417), 1277-1281.

Christopher, H. (1995) 'An Exploration of Tradition, Healing and Culture', *Medicinal Mushrooms*.

Chu, T. T., Benzie, I. F., Lam, C. W., Fok, B. S., Lee, K. K. and Tomlinson, B. (2012) 'Study of potential cardioprotective effects of *Ganoderma lucidum* (Lingzhi): results of a controlled human intervention trial', *British Journal of Nutrition*, 107(07), 1017-1027.

Chung, W. T., Lee, S. H., Dai Kim, J., Park, Y. S., Hwang, B., Lee, S. Y. and Lee, H. Y. (2001) 'Effect of mycelial culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines', *Journal of bioscience and bioengineering*, 92(6), 550-555.

- Clews, C. and Schallamach, A. (1946) 'Structure of isoprene', *Nature*, 157, 160-161.
- Clydesdale, F. (1999) 'ILSI North America food component reports', *Crit Rev Food Sci Nutr*, 39(3), 203-316.
- Codoñer-Franch, P., Hernández-Aguilar, M. T., Navarro-Ruiz, A., López-Jaén, A. B., Borja-Herrero, C. and Valls-Bellés, V. (2013) 'Diet supplementation during early lactation with non-alcoholic beer increases the antioxidant properties of breastmilk and decreases the oxidative damage in breastfeeding mothers', *Breastfeeding Medicine*, 8(2), 164-169.
- Cohen, O. J. and Fauci, A. S. (2000) 'Current strategies in the treatment of HIV infection', *Advances in internal medicine*, 46, 207-246.
- Colgrave, M. L., Goswami, H., Howitt, C. A. and Tanner, G. J. (2011) 'What is in a beer? Proteomic characterization and relative quantification of hordein (gluten) in beer', *Journal of proteome research*, 11(1), 386-396.
- Combs, A. P. (2009) 'Recent advances in the discovery of competitive protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors for the treatment of diabetes, obesity, and cancer', *Journal of medicinal chemistry*, 53(6), 2333-2344.
- Connell, B. J., Saleh, M., Khan, B. V. and Saleh, T. M. (2011) 'Lipoic acid protects against reperfusion injury in the early stages of cerebral ischemia', *Brain research*, 1375, 128-136.
- Cook, N. and Samman, S. (1996) 'Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources', *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), 66-76.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P. and Sinigaglia, M. (2014) 'Functional beverages: The emerging side of functional foods', *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13(6), 1192-1206.
- Cornell, M. (2011) 'Michael Jackson and beer styles', *Brewery History*, 139, 12-24.
- Cosman, F., De Beur, S., LeBoff, M., Lewiecki, E., Tanner, B., Randall, S. and Lindsay, R. (2014) 'Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis', *Osteoporosis International*, 25(10), 2359-2381.
- Craig, W. J. (1999) 'Health-promoting properties of common herbs', *The American journal of clinical nutrition*, 70(3), 491s-499s.

Cramer, G., Ford, R. and Hall, R. (1976) 'Estimation of toxic hazard—a decision tree approach', *Food and cosmetics toxicology*, 16(3), 255-276.

Crozier, A., Clifford, M. N. and Ashihara, H. (2008) *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*, John Wiley & Sons.

Curtis, W. (1781) *Flora Londinensis: or plates and descriptions of such plants as grow wild in the environs of London.*, London: Curtis, William.

Cutler, D. and Glaeser, E. (2005) *What explains differences in smoking, drinking and other health-related behaviors*, National Bureau of Economic Research.

Cutler, D. M. and Glaeser, E. L. (2009) 'Why do Europeans smoke more than Americans?' in *Developments in the Economics of Aging*, University of Chicago Press, 255-282.

Cutler, D. M. and Lleras-Muney, A. (2010) 'Understanding differences in health behaviors by education', *Journal of health economics*, 29(1), 1-28.

Cutten, A., Hasnain, S., Segedin, B., Bai, T. and McKay, E. (1988) 'The basidiomycete ganoderma and asthma: collection, quantitation and immunogenicity of the spores', *The New Zealand Medical Journal*, 101(847 Pt 1), 361-363.

Cuvelier, M.-E., Richard, H. and Berset, C. (1992) 'Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 56(2), 324-325.

Cymanow, P. (2004) 'Lojalność konsumentów produktów piwowskich względem nabywanych marek piwa i produktów pochodnych', *Prace Naukowe. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego. Wydział Ekonomiczno-Rolniczy. Katedra Polityki Agrarnej i Marketingu*, (33).

Czerucka, D., Piche, T. and Rampal, P. (2007) 'Review article: yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*', *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 26(6), 767-778.

Damerow, P. (2012) 'Sumerian beer: The origins of brewing technology in Ancient Mesopotamia', *Cuneiform Digital Library Journal*, 2, 1-20.

Daniel, D., dos Santos, V. B., Vidal, D. T. R. and do Lago, C. L. (2015) 'Determination of biogenic amines in beer and wine by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 1416, 121-128.

Daniels, R. (1998) *Designing great beers: The ultimate guide to brewing classic beer styles*, Brewers Publications.

Daou, C. and Zhang, H. (2012) 'Oat Beta-Glucan: Its Role in Health Promotion and Prevention of Diseases', *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 11(4), 355-365.

Dass, K., Ahmad, A., Azmi, A. S., Sarkar, S. H. and Sarkar, F. H. (2008) 'Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers', *Cancer treatment reviews*, 34(2), 122-136.

Davì, G., Santilli, F. and Patrono, C. (2010) 'Nutraceuticals in diabetes and metabolic syndrome', *Cardiovascular Therapeutics*, 28(4), 216-226.

De Baaij, J. H., Hoenderop, J. G. and Bindels, R. J. (2015) 'Magnesium in man: implications for health and disease', *Physiological reviews*, 95(1), 1-46.

De Bree, A., Verschuren, W. M., Blom, H. J. and Kromhout, D. (2001) 'Lifestyle factors and plasma homocysteine concentrations in a general population sample', *American Journal of Epidemiology*, 154(2), 150-154.

De Groot, J. J. M. (1964) 'The religious system of China'.

De Jong, M. D., Thanh, T. T., Khanh, T. H., Hien, V. M., Smith, G. J., Chau, N. V., Cam, B. V., Qui, P. T., Ha, D. Q. and Guan, Y. (2005) 'Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection', *New england journal of medicine*, 353(25), 2667-2672.

De Keukeleire, D. (2000) 'Fundamentals of beer and hop chemistry', *Quimica nova*, 23(1), 108-112.

de Luis, D. A., Fernandez, N., Aller, R., De Luis, J., Arranz, M. and Izaola, O. (2003) 'Relation between total homocysteine levels and beer intake in patients with diabetes mellitus type 2', *Annals of nutrition and metabolism*, 47(3-4), 119-123.

Deconinck, K. and Swinnen, J. (2015) 'Peer effects and the rise of beer in Russia', *Food Policy*, 51, 83-96.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. and Paredes-López, O. (2000) 'Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability', *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(3), 173-289.

Despotovic, S., Leskosek-Cukalovic, I., Anita, K., Nedovic, V., Nikicevic, N. and Niksic, M. (2007) *Effects of Ganoderma lucidum extracts on beer flavour*, translated by 370-375.

Dhiman, A., Walia, V. and Nanda, A. (2014) 'Introduction to the Functional Foods', *Introduction to Functional Food Science: Textbook*.

Di Castelnuovo, A., Costanzo, S., Bagnardi, V., Donati, M. B., Iacoviello, L. and De Gaetano, G. (2006) 'Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies', *Archives of internal medicine*, 166(22), 2437-2445.

Di Lorenzo, C., Ceschi, A., Kupferschmidt, H., Lüde, S., De Souza Nascimento, E., Dos Santos, A., Colombo, F., Frigerio, G., Nørby, K. and Plumb, J. (2015) 'Adverse effects of plant food supplements and botanical preparations: a systematic review with critical evaluation of causality', *British journal of clinical pharmacology*, 79(4), 578-592.

DIAZ-RUBIO, M. and Saura-Calixto, F. (2009) 'Dietary fiber complex in beer', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67(1), 38-43.

Diaz, L., Montero, A., Gonzalez-Gross, M. and Vallejo, A. (2002) 'Influence of alcohol consumption on immunological status: a review', *European journal of clinical nutrition*, 56(S3), S50.

Didier, M. and Bénédicte, B. (2009) 'Soluble proteins of beer', *Beer in health and disease prevention*, 265-271.

Dieterich, W., Ehnis, T., Bauer, M., Donner, P., Volta, U., Riecken, E. O. and Schuppan, D. (1997) 'Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease', *Nature medicine*, 3(7), 797-801.

Dikici, S., Saritas, A., Kilinc, S., Guneyesu, S. and Gunes, H. (2015) 'Does an energy drink cause a transient ischemic attack?', *The American journal of emergency medicine*, 33(1), 129. e5-6.

Dillard, C. J. and German, J. B. (2000) 'Phytochemicals: nutraceuticals and human health', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744-1756.

DIPLOCK, A., AGGETT, P., ASHWELL, M., BORNET, F., FERN, E. and ROBERFROID, M. (1999) 'Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document', *British Journal of Nutrition*, 81, i-S27.

Dredge, M. (2014) *Craft Beer World: A guide to over 350 of the finest beers known to man*, Ryland Peters & Small.

Duncan, M. J. and Hankey, J. (2013) 'The effect of a caffeinated energy drink on various psychological measures during submaximal cycling', *Physiology & behavior*, 116, 60-65.

DW (2004) [online], available: <http://www.dw.com/en/brewery-unveils-anti-aging-beer/a-1089802> [accessed

Dyckner, T. and Wester, P. (1983) 'Effect of magnesium on blood pressure', *Br Med J (Clin Res Ed)*, 286(6381), 1847-1849.

Đelić, N. (2000) 'Epigenetički mehanizmi kancerogeneze', *Acta Medica Medianae*, 1(39), 31-42.

Đorđević, S., Popović, D., Despotović, S., Veljović, M., Atanacković, M., Cvejić, J., Nedović, V. and Leskošek-Čukalović, I. (2016) 'Extracts of medicinal plants-as functional beer additives', *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, (00), 44-44.

Echols, M. A. (1998) 'Food safety regulation in the European Union and the United States: different cultures, different laws', *Colum. J. Eur. L.*, 4, 525.

Edrada, R. A., Wray, V., Witte, L., Ofwegen, L. v. and Proksch, P. (2000) 'Bioactive terpenes from the soft coral *Heteroxenia* sp. from Mindoro, Philippines', *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 82-86.

Eisenreich, W., Bacher, A., Arigoni, D. and Rohdich, F. (2004) 'Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway', *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(12), 1401-1426.

El-Mekawy, S., Meselhy, M. R., Nakamura, N., Tezuka, Y., Hattori, M., Kakiuchi, N., Shimotohno, K., Kawahata, T. and Otake, T. (1998) 'Anti-HIV-1 and anti-HIV-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*', *Phytochemistry*, 49(6), 1651-1657.

Ellis, W. (1783) *An Authentic Narrative of a Voyage Performed by Captain Cook and Captain Clerke: In His Majesty's Ships Resolution and Discovery, During the Years 1776, 1777, 1778, 1779 and 1780; in Search of a North-West Passage Between the Continents of Asia and America. Including a Faithful Account of All Their Discoveries, and the Unfortunate Death of Captain Cook*, G. Robinson, J. Sewell and J. Debrett.

Ellwood, K. C., Trumbo, P. R. and Kavanaugh, C. J. (2010) 'How the US Food and Drug Administration evaluates the scientific evidence for health claims', *Nutrition Reviews*, 68(2), 114-121.

Eo, S.-K., Kim, Y.-S., Lee, C.-K. and Han, S.-S. (1999) 'Antiviral activities of various water and methanol soluble substances isolated from *Ganoderma lucidum*', *Journal of ethnopharmacology*, 68(1), 129-136.

Eo, S.-K., Kim, Y.-S., Lee, C.-K. and Han, S.-S. (2000) 'Possible mode of antiviral activity of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* on herpes simplex viruses', *Journal of ethnopharmacology*, 72(3), 475-481.

Fang, Y.-Z., Yang, S. and Wu, G. (2002) 'Free radicals, antioxidants, and nutrition', *Nutrition*, 18(10), 872-879.

Farkas, G. and Kiraaly, Z. (1962) 'Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance', *Journal of Phytopathology*, 44(2), 105-150.

Fatmawati, S., Kondo, R. and Shimizu, K. (2013) 'Structure–activity relationships of lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma lingzhi* as α -glucosidase inhibitors', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(21), 5900-5903.

Fatmawati, S., Kurashiki, K., Takeno, S., Kim, Y. u., Shimizu, K., Sato, M., Imaizumi, K., Takahashi, K., Kamiya, S. and Kaneko, S. (2009) 'The inhibitory effect on aldose reductase by an extract of *Ganoderma lucidum*', *Phytotherapy Research*, 23(1), 28-32.

Fatmawati, S., Shimizu, K. and Kondo, R. (2010a) 'Ganoderic acid Df, a new triterpenoid with aldose reductase inhibitory activity from the fruiting body of *Ganoderma lucidum*', *Fitoterapia*, 81(8), 1033-1036.

Fatmawati, S., Shimizu, K. and Kondo, R. (2010b) 'Inhibition of aldose reductase in vitro by constituents of *Ganoderma lucidum*', *Planta medica*, 76(15), 1691-1693.

Fatmawati, S., Shimizu, K. and Kondo, R. (2011) 'Structure–activity relationships of ganoderma acids from *Ganoderma lucidum* as aldose reductase inhibitors', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(24), 7295-7297.

Feldhammer, M., Uetani, N., Miranda-Saavedra, D. and Tremblay, M. L. (2013) 'PTP1B: a simple enzyme for a complex world', *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(5), 430-445.

Ferreira, I. (2009) 'Beer carbohydrates', *Beer in health and disease prevention*, 291-299.

Ferreira, I. C., Heleno, S. A., Reis, F. S., Stojkovic, D., Queiroz, M. J. R., Vasconcelos, M. H. and Sokovic, M. (2015) 'Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities', *Phytochemistry*, 114, 38-55.

Fieldhouse, P. (2013) *Food and nutrition: customs and culture*, Springer.

Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P. and Daufin, G. (2006) 'Water, wastewater and waste management in brewing industries', *Journal of cleaner production*, 14(5), 463-471.

Fogarty, J. (2010) 'The demand for beer, wine and spirits: a survey of the literature', *Journal of Economic Surveys*, 24(3), 428-478.

Folkman, J. (1971) 'Tumor angiogenesis: therapeutic implications', *New england journal of medicine*, 285(21), 1182-1186.

Folkman, J. (1995) 'Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease', *Nature medicine*, 1(1), 27-30.

Fontana, M. and Buiatti, S. (2009) 'Amino acids in beer', *Beer in health and disease prevention*, 273-283.

Food, U. and Administration, D. (2009) 'Guidance for industry: Evidence-based review system for the scientific evaluation of health claims-final', *Retrieved from: Date Published: January*.

Foster, T. (1992) 'Porter, Classic Beer Style Series',

Frewer, L., Scholderer, J. and Lambert, N. (2003) 'Consumer acceptance of functional foods: issues for the future', *British Food Journal*, 105(10), 714-731.

Frías, J., Martínez-Villaluenga, C. and Peñas, E. (2016) *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Academic Press.

Friedman, M. and Rosenman, R. H. (1959) 'Association of specific overt behavior pattern with blood and cardiovascular findings: blood cholesterol level, blood clotting time, incidence of arcus senilis, and clinical coronary artery disease', *Journal of the American Medical Association*, 169(12), 1286-1296.

Fuller, R. (1992) 'History and development of probiotics' in *Probiotics*, Springer, 1-8.

Gabbay, K. H. (1975) 'Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus', *Annual review of medicine*, 26(1), 521-536.

Gabrielyan, G., McCluskey, J. J., Marsh, T. L. and Ross, C. F. (2014) 'Willingness to pay for sensory attributes in beer', *Agricultural and Resource Economics Review*, 43(1), 125-39.

Gallagher, E. (2009) *Gluten-free food science and technology*, John Wiley & Sons.

Gallet, C. A. and Eastman, H. S. (2007) 'The impact of smoking bans on alcohol demand', *The Social Science Journal*, 44(4), 664-676.

Gallus, S., Lugo, A., Murisic, B., Bosetti, C., Boffetta, P. and La Vecchia, C. (2015) 'Overweight and obesity in 16 European countries', *European journal of nutrition*, 54(5), 679-689.

Gamo, F.-J., Sanz, L. M., Vidal, J., de Cozar, C., Alvarez, E., Lavandera, J.-L., Vanderwall, D. E., Green, D. V., Kumar, V. and Hasan, S. (2010) 'Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification', *Nature*, 465(7296), 305-310.

Gao, J.-J., Min, B.-S., Ahn, E.-M., Nakamura, N., Lee, H.-K. and Hattori, M. (2002) 'New triterpene aldehydes, lucialdehydes A—C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(6), 837-840.

Gao, Y., Chan, E. and Zhou, S. (2004) 'Immunomodulating activities of *Ganoderma*, a mushroom with medicinal properties', *Food Reviews International*, 20(2), 123-161.

Gao, Y., Zhou, S., Jiang, W., Huang, M. and Dai, X. (2003) 'Effects of Ganopoly®(A ganoderma lucidum polysaccharide extract) on the immune functions in Advanced-Stage cancer patients', *Immunological investigations*, 32(3), 201-215.

Gardner, A. M., Xu, F.-h., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y. and Lichtenstein, A. (1997) 'Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide', *Free radical biology and medicine*, 22(1), 73-83.

Gerhäuser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N. and Bartsch, H. (2002) 'Cancer Chemopreventive Activity of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hop 1 Support for this work has been provided by Verein zur Förderung der Krebsforschung in Deutschland eV and by Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft eV These data were presented, in part, at the 92nd annual meeting of the American Association of Cancer Research, March 24–28, 2001 in New Orleans, LA (64). 1', *Molecular cancer therapeutics*, 1(11), 959-969.

Gerhäuser, C., Zhang, W.-D., Ho-Chong-Line, N. and Fourasté, I. (2000) 'New Lanostanoids from Ganoderma lucidum that Induce NAD (P) H: Qui-none Oxidoreductase in Cultured Hepalcl7 Murine Hepatoma Cells', *Planta medica*, 66(07), 681-684.

Geronikaki, A. A. and Gavalas, A. M. (2006) 'Antioxidants and inflammatory disease: synthetic and natural antioxidants with anti-inflammatory activity', *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 9(6), 425-442.

Ghasemzadeh, A. and Ghasemzadeh, N. (2011) 'Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human', *Journal of medicinal plants research*, 5(31), 6697-6703.

Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P. and Scaccini, C. (2000) 'Beer increases plasma antioxidant capacity in humans', *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(2), 76-80.

Giavasis, I. (2014a) 'Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals', *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 162-173.

GIaVaSIS, I. (2014b) 'Polysaccharides from Medicinal Mushrooms for Potential use as Nutraceuticals', *Polysaccharides: Natural Fibers in Food and Nutrition*, 1, 171-206.

Gifhorn, R. (1901) *Praktischer Rathgeber für den Betrieb der Bierbrauerei und Malzfabrikation: ein Taschenbuch für den Brauer und Mälzer*, JL Stich.

Gill, S. K. and Rieder, M. J. (2008) 'Toxicity of a traditional Chinese medicine, *Ganoderma lucidum*, in children with cancer', *Can J Clin Pharmacol*, 15(2), 275-85.

Goheen, M. (2015) 'Old beer: looking at the ability to produce ancient beer for a modern audience'.

Goktepe, I., Juneja, V. K. and Ahmedna, M. (2005) *Probiotics in food safety and human health*, CRC Press.

Goldberg, I. (2012) *Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals*, Springer Science & Business Media.

Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. (1992) 'Probiotics for humans' in *Probiotics*, Springer, 355-376.

Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) 'Regulation of the mevalonate pathway', *Nature*, 343(6257), 425.

Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. and García-Romero, E. (2007) 'Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples', *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(3), 608-613.

Goñi, I., Díaz-Rubio, M. and Saura-Calixto, F. (2009) 'Dietary fiber in beer: Content, composition, colonic fermentability, and contribution to the diet', *Beer in health and disease prevention*, 299-308.

Gordon, D. J., Probstfield, J. L., Garrison, R. J., Neaton, J. D., Castelli, W. P., Knoke, J. D., Jacobs, D. R., Bangdiwala, S. and Tyroler, H. A. (1989) 'High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies', *circulation*, 79(1), 8-15.

Gorelick, P. B. (1987) 'Alcohol and stroke', *Stroke*, 18(1), 268-271.

Graham, J. H., Hodge, N. C. and Morton, J. B. (1995) 'Fatty Acid methyl ester profiles for characterization of glomalean fungi and their endomycorrhizae', *Applied and environmental microbiology*, 61(1), 58-64.

Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G. and Faria, J. A. (2010) 'Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products', *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 292-302.

Granato, D., Nunes, D. S. and Barba, F. J. (2017) 'An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal', *Trends in Food Science & Technology*.

Green, C. A., Freeborn, D. K. and Polen, M. R. (2001) 'Gender and alcohol use: The roles of social support, chronic illness, and psychological well-being', *Journal of behavioral medicine*, 24(4), 383-399.

Green, P. H. and Cellier, C. (2007) 'Celiac disease', *New england journal of medicine*, 357(17), 1731-1743.

Grunert, K. G. (2005) 'Food quality and safety: consumer perception and demand', *European Review of Agricultural Economics*, 32(3), 369-391.

Guallar-Castillón, P., Rodríguez-Artalejo, F., Gañán, L. D., Banegas, J. B., Urduñigo, P. L. and Cabrera, R. H. (2001) 'Consumption of alcoholic beverages and subjective health in Spain', *Journal of Epidemiology and Community Health*, 55(9), 648-652.

Guan, C.-f. (2005) 'Research on Treatment of AIDS in Chinese Medicine', *Chinese Medicine à Modern Practice*, 1, 143.

Gunja, N. and Brown, J. A. (2012) 'Energy drinks: health risks and toxicity', *Med J Aust*, 196(1), 46-49.

Gürakan, G. C., Cebeci, A. and Özer, B. (2009) 'Probiotic dairy beverages: microbiology and technology', *Development and manufacture of yogurt and other functional dairy products*, 165-197.

Guyton, A. C. (1961) 'Textbook of medical physiology', *Academic Medicine*, 36(5), 556.

Hager, A.-S., Taylor, J. P., Waters, D. M. and Arendt, E. K. (2014) 'Gluten free beer—A review', *Trends in Food Science & Technology*, 36(1), 44-54.

Hailu, G., Boecker, A., Henson, S. and Cranfield, J. (2009) 'Consumer valuation of functional foods and nutraceuticals in Canada. A conjoint study using probiotics', *Appetite*, 52(2), 257-265.

Haksworth, D., Kirk, P., Sutton, B. and Pegler, D. (1995) 'Ainsworth and Bisby's dictionary of fungi',

Halonen, J. I., Kivimäki, M., Pentti, J., Virtanen, M., Subramanian, S., Kawachi, I. and Vahtera, J. (2014) 'Association of the Availability of Beer, Wine, and Liquor Outlets with Beverage-Specific Alcohol Consumption: A Cohort Study', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(4), 1086-1093.

Halpern, G. M. (2007) *Healing mushrooms*, Square One Publishers, Inc.

Harborne, J. B. (2013) *The flavonoids: advances in research since 1980*, Springer.

Hardy, G. (2000) 'Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning', *Nutrition*, 16(7), 688-689.

Hasegawa, S., Bennett, R. D., Herman, Z., Fong, C. H. and Ou, P. (1989) 'Limonoid glucosides in citrus', *Phytochemistry*, 28(6), 1717-1720.

Hasegawa, S. and Miyake, M. (1996) 'Biochemistry and biological functions of citrus limonoids', *Food Reviews International*, 12(4), 413-435.

Hasler, C. M. (2000) 'The changing face of functional foods', *Journal of the American College of Nutrition*, 19(sup5), 499S-506S.

Hasler, C. M. (2002) 'Functional foods: benefits, concerns and challenges—a position paper from the American Council on Science and Health', *The Journal of nutrition*, 132(12), 3772-3781.

Hasler, C. M. and Brown, A. C. (2009) 'Position of the American Dietetic Association: functional foods', *Journal of the American Dietetic Association*, 109(4), 735-746.

Hasnat, M. A., Pervin, M., Cha, K. M., Kim, S. K. and Lim, B. O. (2015) 'Anti inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF- κ B pathways', *Phytochemistry*, 114(125), e36.

Hawksworth, D. L. (2001) 'Mushrooms: the extent of the unexplored potential', *International journal of medicinal mushrooms*, 3(4).

Hayat, S., Ali, B. and Ahmad, A. (2007) 'Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants' in *Salicylic acid: A plant hormone*, Springer, 1-14.

He, Z., Naruse, K. and King, G. L. (2005) 'Effects of diabetes and insulin resistance on endothelial functions' in *Diabetes and cardiovascular disease*, Springer, 25-46.

Heckman, M., Sherry, K., Mejia, D. and Gonzalez, E. (2010) 'Energy drinks: an assessment of their market size, consumer demographics, ingredient profile, functionality, and regulations in the United States', *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 9(3), 303-317.

Heleno, S. A., Ferreira, I. C., Esteves, A. P., Ćirić, A., Glamočlija, J., Martins, A., Soković, M. and Queiroz, M. J. R. (2013) 'Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters', *Food and chemical toxicology*, 58, 95-100.

Hemmerlin, A., Harwood, J. L. and Bach, T. J. (2012) 'A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis?', *Progress in lipid research*, 51(2), 95-148.

Hernlund, E., Svedbom, A., Ivergård, M., Compston, J., Cooper, C., Stenmark, J., McCloskey, E., Jönsson, B. and Kanis, J. (2013) 'Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden', *Archives of osteoporosis*, 8(1-2), 136.

Herrero-Urbe, L. (2011) 'Viruses, definitions and reality', *Revista de biologia tropical*, 59(3), 993-998.

Higdon, J. V. and Frei, B. (2003) 'Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions'.

Higuchi, T. (1963) 'Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices', *Journal of pharmaceutical sciences*, 52(12), 1145-1149.

Hijikata, Y. and Yamada, S. (1998) 'Effect of *Ganoderma lucidum* on postherpetic neuralgia', *The American journal of Chinese medicine*, 26(03n04), 375-381.

Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, C. (1989) 'Mechanisms of Hypoglycemic Activity of Ganoderan B: A Glycan of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies1', *Planta medica*, 55(05), 423-428.

Hikino, H., Konno, C., Mirin, Y. and Hayashi, T. (1985) 'Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies', *Planta medica*, 51(04), 339-340.

Hill, R. A. and Connolly, J. D. (2012) 'Triterpenoids', *Natural product reports*, 29(7), 780-818.

Hill, R. A. and Connolly, J. D. (2013) 'Triterpenoids', *Natural product reports*, 30(7), 1028-1065.

Hilliam, M. (1996) 'Functional foods: the Western consumer viewpoint', *Nutrition Reviews*, 54(11), S189.

Hilliam, M. (2000) 'Functional Food—How big is the market', *The World of Food Ingredients*, 12(50-52).

Hirotsani, M., Ino, C. and Furuya, T. (1993) 'Comparative study on the strain-specific triterpenoid components of *Ganoderma lucidum*', *Phytochemistry*, 33(2), 379-382.

Ho, C.-T. and Zheng, Q. Y. (2002) *Quality management of nutraceuticals*, American Chemical Society; Royal Society of Chemistry.

Hokanson, J. E. and Austin, M. A. (1996) 'Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a metaanalysis of population-based prospective studies', *Journal of cardiovascular risk*, 3(2), 213-219.

Holdt, S. L. and Kraan, S. (2011) 'Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation', *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 543-597.

Hollman, P. C. and Katan, M. B. (1999) 'Health effects and bioavailability of dietary flavonols', *Free Radical Research*, 31(sup1), 75-80.

Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1999) 'Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability', *Food and chemical toxicology*, 37(9), 937-942.

Holzgreve, H. (2014) 'Regardless if it's liquor, wine or beer—all alcoholic beverages induce gout attacks',

Hornsey, I. S. (2003) *A history of beer and brewing*, Royal Society of Chemistry.

Hossain, S., Hashimoto, M., Choudhury, E. K., Alam, N., Hussain, S., Hasan, M., Choudhury, S. K. and Mahmud, I. (2003) 'Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 30(7), 470-475.

Howard, P. H. (2014) 'Too big to ale? Globalization and consolidation in the beer industry' in *The Geography of Beer*, Springer, 155-165.

Hrazdina, G. and Wagner, G. J. (1985) 'Compartmentation of plant phenolic compounds; sites of synthesis and accumulation', *Biochemistry of plant phenolics*.

Hsu, H.-Y., Kuan, Y.-C., Lin, T.-Y., Tsao, S.-M., Hsu, J., Ma, L.-J. and Sheu, F. (2013) 'Reishi protein LZ-8 induces FOXP3', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

<http://www.karmi.pl/> (2017) [online], available: [accessed

Hu, H., Ahn, N. S., Yang, X., Lee, Y. S. and Kang, K. S. (2002) 'Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell', *International Journal of Cancer*, 102(3), 250-253.

Huang, H., Li, B., Liu, Z., Mu, X., Nie, R. and Zeng, M. (2014) 'Effectiveness of Carp Egg Phosphopeptide on Inhibiting the Formation of Insoluble Ca Salts in vitro and Enhancing Ca Bioavailability in vivo', *Food Science and Technology Research*, 20(2), 385-392.

Hughes, P. (2016) *The problem of defining beer styles*, translated by Ghent, Belgium 30.

Hui, Y. H. and Evranuz, E. Ö. (2012) *Handbook of Plant-based fermented food and beverage technology*, CRC Press.

Hunter, W. N. (2007) 'The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis', *Journal of Biological Chemistry*, 282(30), 21573-21577.

Hurt, A. C., Butler, J., Kelso, A. and Barr, I. G. (2012) 'Influenza antivirals and resistance: the next 10 years?', *Expert review of anti-infective therapy*, 10(11), 1221-1223.

Imhof, A., Woodward, M., Doering, A., Helbecque, N., Loewel, H., Amouyel, P., Lowe, G. and Koenig, W. (2004) 'Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille)', *European Heart Journal*, 25(23), 2092-2100.

Iqbal, M., Sharma, S. D., Okazaki, Y., Fujisawa, M. and Okada, S. (2003) 'Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing enzymes in ddY male mice: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity', *Pharmacology & toxicology*, 92(1), 33-38.

Isaka, M., Chinthanom, P., Kongthong, S., Srichomthong, K. and Choeyklin, R. (2013) 'Lanostane triterpenes from cultures of the Basidiomycete *Ganoderma orbiforme* BCC 22324', *Phytochemistry*, 87, 133-139.

Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsén, B., Lahti, K., Nissén, M., Taskinen, M.-R. and Groop, L. (2001) 'Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome', *Diabetes care*, 24(4), 683-689.

Ison, M. G. (2013) 'Clinical use of approved influenza antivirals: therapy and prophylaxis', *Influenza and other respiratory viruses*, 7(s1), 7-13.

Izzo, A. A. and Ernst, E. (2001) 'Interactions between herbal medicines and prescribed drugs', *Drugs*, 61(15), 2163-2175.

Izzo, A. A. and Ernst, E. (2009) 'Interactions between herbal medicines and prescribed drugs', *Drugs*, 69(13), 1777-1798.

Jackson, M. (1977) 'The world guide to beer. The brewing styles, the brands, the countries'.

James, W. P. T. (1988) *Healthy nutrition. Preventing nutrition-related diseases in Europe*, WHO Regional Office for Europe.

Janeš, D., Kreft, S., Jurc, M., Seme, K. and Štrukelj, B. (2007) 'Antibacterial activity in higher fungi (mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia', *Pharmaceutical Biology*, 45(9), 700-706.

Jargin, S. V. (2009) 'Kvass: a possible contributor to chronic alcoholism in the former Soviet Union—alcohol content should be indicated on labels and in advertising', *Alcohol and alcoholism*, 44(5), 529-529.

Jargin, S. V. (2013) 'El modelo cambiante del consumo de alcohol en Rusia Changing pattern of alcohol consumption in Russia', *Adicciones*, 25(4), 356-357.

Jelinek, B. (1946) 'Top and bottom fermentation systems and their respective beer characteristics', *Journal of the Institute of Brewing*, 52(4), 174-181.

Jerkovic, V. and Collin, S. (2007) 'Occurrence of resveratrol and piceid in American and European hop cones', *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(21), 8754-8758.

Jia, J., Zhang, X., Hu, Y.-S., Wu, Y., Wang, Q.-Z., Li, N.-N., Guo, Q.-C. and Dong, X.-C. (2009) 'Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats', *Food Chemistry*, 115(1), 32-36.

Jiang, J., Slivova, V., Valachovicova, T., Harvey, K. and Sliva, D. (2004) '*Ganoderma lucidum* inhibits proliferation and induces apoptosis in human prostate cancer cells PC-3', *International journal of oncology*, 24(5), 1093-1100.

Jianhua, G. (2000) 'Research on Cultivation of *Spirulina platensis* in Brewery Effluent [J]', *Food Science*, 4, 007.

Jin, H.-m., Zhang, G.-p., Cao, X., Zhang, M., Long, J., Luo, B., Chen, H., Qian, S., Mori, M. and Wang, Z. (1996) 'Treatment of hypertension by ling zhi combined with hypotensor and its effects on arterial, arteriolar and capillary pressure and microcirculation', *Microcirculatory Approach to Asian Traditional Medicine*. New York: Elsevier Science, 131(8).

Johnston, B. C., Goldenberg, J. Z. and Parkin, P. C. (2016) 'Probiotics and the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Infants and Children', *Jama*, 316(14), 1484-1485.

Jung, M., Liermann, J. C., Opatz, T. and Erkel, G. (2011) '*Ganodermycin*, a novel inhibitor of CXCL10 expression from *Ganoderma applanatum*', *The Journal of antibiotics*, 64(10), 683-686.

Kalra, E. K. (2003) 'Nutraceutical-definition and introduction', *Aaps Pharmsci*, 5(3), 27-28.

Kalušević, A., Uzelac, G., Veljović, M., Despotović, S., Milutinović, M., Leskošek-Čukalović, I. and Nedović, V. (2011) 'The antioxidant properties of honey beer', *Food Process Engineering a Changing World*.

Kamali, A. and Holodniy, M. (2013) 'Influenza treatment and prophylaxis with neuraminidase inhibitors: a review', *Infect Drug Resist*, 6, 187-198.

Kan, Y., Chen, T., Wu, Y. and Wu, J. (2015) 'Antioxidant activity of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* using response surface methodology', *International journal of biological macromolecules*, 72, 151-157.

KANEDA, H., KANO, Y., OSAWA, T., RAMARATHNAM, N., KAWAKISHI, S. and KAMADA, K. (1988) 'Detection of free radicals in beer oxidation', *Journal of Food Science*, 53(3), 885-888.

Kaneko, K., Yamanobe, T. and Fujimori, S. (2009) 'Determination of purine contents of alcoholic beverages using high performance liquid chromatography', *Biomedical Chromatography*, 23(8), 858-864.

Kanis, J. A., Melton, L. J., Christiansen, C., Johnston, C. C. and Khaltsev, N. (1994) 'The diagnosis of osteoporosis', *Journal of bone and mineral research*, 9(8), 1137-1141.

Kanmatsuse, K., Kajiwara, N., Hayashi, K., Shimogaichi, S., Fukinbara, I., Ishikawa, H. and Tamura, T. (1985) 'Studies on *Ganoderma lucidum*. I. Efficacy against hypertension and side effects', *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 105(10), 942.

Kao, C., Jesuthasan, A. C., Bishop, K. S., Glucina, M. P. and Ferguson, L. R. (2013) 'Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways', *Functional Foods in Health and Disease*, 3(2), 48-65.

Kao, P.-F., Wang, S.-H., Hung, W.-T., Liao, Y.-H., Lin, C.-M. and Yang, W.-B. (2011) 'Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights beta-1, 3-glucan from the residue of extracted *Ganoderma lucidum* fruiting bodies', *BioMed Research International*, 2012.

Kaplan, N. M., Palmer, B. F. and Denke, M. A. (2000) 'Nutritional and health benefits of beer', *The American journal of the medical sciences*, 320(5), 320-326.

Kaur, J. (2014) 'A comprehensive review on metabolic syndrome', *Cardiology research and practice*, 2014.

Kenfield, S. A., Van Blarigan, E. L., DuPre, N., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L. and Chan, J. M. (2015) 'Selenium supplementation and prostate cancer mortality', *Journal of the National Cancer Institute*, 107(1), dju360.

Kerner, W. and Brückel, J. (2014) 'Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus', *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 122(07), 384-386.

Kerr, W. C., Greenfield, T. K., Tujague, J. and Brown, S. E. (2005) 'A drink is a drink? Variation in the amount of alcohol contained in beer, wine and spirits drinks in a US methodological sample', *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 29(11), 2015-2021.

Keypour, S., Riahi, H., Moradali, M.-F. and Rafati, H. (2008) 'Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllophoromycetideae), from Iran', *International journal of medicinal mushrooms*, 10(4).

Khanduja, K. and Bhardwaj, A. (2003) 'Stable free radical scavenging and antiperoxidative properties of resveratrol compared in vitro with some other bioflavonoids'.

Kharb, S. and Singh, V. (2004) 'Nutriceuticals in health and disease prevention', *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 19(1), 50-53.

Khatun, S., Islam, A., Cakilcioglu, U. and Chatterje, N. C. (2012) 'Research on mushroom as a potential source of nutraceuticals: A review on Indian perspective', *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(1), 47.

Kiessling, R., Wasserman, K., Horiguchi, S., Kono, K., Sjöberg, J., Pisa, P. and Petersson, M. (1999) 'Tumor-induced immune dysfunction', *Cancer immunology, immunotherapy*, 48(7), 353-362.

Kim, H. W. and Kim, B. K. (1999) 'Biomedical triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.(Aphyllophoromycetideae)', *International journal of medicinal mushrooms*, 1(2).

Kim, K. C., Kim, J. S., Son, J. K. and Kim, I. G. (2007) 'Enhanced induction of mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells by the *Ganoderma lucidum* and *Duchesnea chrysantha* extracts', *Cancer letters*, 246(1), 210-217.

Kim, Y.-S., Eo, S.-K., Oh, K.-W., Lee, C.-k. and Han, S.-S. (2000) 'Antiherpetic activities of acidic protein bound polysacchride isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons', *Journal of ethnopharmacology*, 72(3), 451-458.

Kimura, Y., Taniguchi, M. and Baba, K. (2001) 'Antitumor and antimetastatic effects on liver of triterpenoid fractions of *Ganoderma lucidum*: mechanism of action and isolation of an active substance', *Anticancer research*, 22(6A), 3309-3318.

Kino, K., Mizumoto, K., Sone, T., Yamaji, T., Watanabe, J., Yamashita, A., Yamaoka, K., Shimizu, K., Ko, K. and Tsunoo, H. (1990) 'An immunomodulating protein, Ling Zhi-8 (LZ-8) prevents insulinitis in non-obese diabetic mice', *Diabetologia*, 33(12), 713-718.

Kino, K., Yamashita, A., Yamaoka, K., Watanabe, J., Tanaka, S., Ko, K., Shimizu, K. and Tsunoo, H. (1989) 'Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*', *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 472-478.

Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. and Stalpers, J. (2008) 'Dictionary of the Fungi'.

Kitabatake, N., Gimbi, D. M. and Oi, Y. (2003) 'Traditional non-alcoholic beverage, Togwa, in East Africa, produced from maize flour and germinated finger millet', *International journal of food sciences and nutrition*, 54(6), 447-455.

Kiyoko, K. (1998) 'Japan redefines functional foods', *Prepared Foods*, 167(5), 129.

Klaus, A., Kozarski, M., Vunduk, J., Todorovic, N., Jakovljevic, D., Zizak, Z., Pavlovic, V., Levic, S., Niksic, M. and Van Griensven, L. J. (2015) 'Biological potential of extracts of the wild edible Basidiomycete mushroom *Grifola frondosa*', *Food Research International*, 67, 272-283.

Klaus, A. and Nikšić, M. (2007) 'Influence of the extracts isolated from *Ganoderma lucidum* mushroom on some microorganisms', *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, (113), 219-226.

Knorr, D. (1998) 'Functional food science in Europe', *Trends in Food Sci Technol*, 9, 295-340.

Koes, R. E., Quattrocchio, F. and Mol, J. N. (1994) 'The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution', *BioEssays*, 16(2), 123-132.

Kolberg, L. W. and Wiemer, K. L. (2009) 'Method and system for providing indicia for structure function claims',

Kotilainen, L., Rajalahti, R., Ragasa, C. and Pehu, E. (2006) 'Health enhancing foods', *World Bank*.

Kozarski, M., Klaus, A., Niksic, M., Jakovljevic, D., Helsper, J. P. and Van Griensven, L. J. (2011) 'Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the

medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*', *Food Chemistry*, 129(4), 1667-1675.

Kozarski, M., Klaus, A., Nikšić, M., Vrvic, M. M., Todorović, N., Jakovljević, D. and Van Griensven, L. J. (2012) 'Antioxidative activities and chemical characterization of polysaccharide extracts from the widely used mushrooms *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* and *Trametes versicolor*', *Journal of food composition and analysis*, 26(1), 144-153.

Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. and Committee, N. (2002) 'Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease', *circulation*, 106(21), 2747-2757.

Kristal, A. R., Darke, A. K., Morris, J. S., Tangen, C. M., Goodman, P. J., Thompson, I. M., Meyskens, F. L., Goodman, G. E., Minasian, L. M. and Parnes, H. L. (2014) 'Baseline selenium status and effects of selenium and vitamin E supplementation on prostate cancer risk', *Journal of the National Cancer Institute*, 106(3), djt456.

Kuhajda, F. P. (2006) 'Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway', *Cancer research*, 66(12), 5977-5980.

Kulangara, C., Luedin, S., Dietz, O., Rusch, S., Frank, G., Mueller, D., Moser, M., Kajava, A. V., Corradin, G. and Beck, H.-P. (2012) 'Cell biological characterization of the malaria vaccine candidate trophozoite exported protein 1', *PLoS one*, 7(10), e46112.

Kunze, W., Wainwright, T. and Mieth, H. (2004) *Technology brewing and malting*, Vlb Berlin.

Kuo, C.-F., See, L.-C., Luo, S.-F., Ko, Y.-S., Lin, Y.-S., Hwang, J.-S., Lin, C.-M., Chen, H.-W. and Yu, K.-H. (2009) 'Gout: an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality', *Rheumatology*, kep364.

Kupper, C. (2005) 'Dietary guidelines and implementation for celiac disease', *Gastroenterology*, 128(4), S121-S127.

Kwaan, H. C. and McMahon, B. (2009) 'The role of plasminogen-plasmin system in cancer' in *Coagulation in Cancer*, Springer, 43-66.

Kwak, N.-S. and Jukes, D. J. (2001) 'Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept', *Food Control*, 12(2), 99-107.

Lähteenmäki, L. (2013) 'Claiming health in food products', *Food Quality and Preference*, 27(2), 196-201.

Lai, C. S.-W., Yu, M.-S., Yuen, W.-H., So, K.-F., Zee, S.-Y. and Chang, R. C.-C. (2008) 'Antagonizing β -amyloid peptide neurotoxicity of the anti-aging fungus *Ganoderma lucidum*', *Brain research*, 1190, 215-224.

Lai, T., Gao, Y. and Zhou, S. (2004) 'Global marketing of medicinal Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae) products and safety concerns', *International journal of medicinal mushrooms*, 6(2).

Lakdawalla, D., Philipson, T. and Bhattacharya, J. (2005) 'Welfare-enhancing technological change and the growth of obesity', *The American Economic Review*, 95(2), 253-257.

Lammers, K. M., Vasagar, B. and Fasano, A. (2014) 'Definition of celiac disease and gluten sensitivity' in *Celiac Disease*, Springer, 13-25.

Lanier, L., Phillips, J., Hackett, J., Tutt, M. and Kumar, V. (1986) 'Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function', *The Journal of Immunology*, 137(9), 2735-2739.

Lappalainen, R., Kearney, J. and Gibney, M. (1998) 'A pan EU survey of consumer attitudes to food, nutrition and health: an overview', *Food Quality and Preference*, 9(6), 467-478.

Ledford, R. M., Patel, N. R., Demenczuk, T. M., Watanyar, A., Herbertz, T., Collett, M. S. and Pevear, D. C. (2004) 'VP1 sequencing of all human rhinovirus serotypes: insights into genus phylogeny and susceptibility to antiviral capsid-binding compounds', *Journal of virology*, 78(7), 3663-3674.

Lee, B. and Tremblay, V. J. (1992) 'Advertising and the US market demand for beer', *Applied Economics*, 24(1), 69-76.

Lee, C. H., Yang, L., Xu, J. Z., Yeung, S. Y. V., Huang, Y. and Chen, Z.-Y. (2005) 'Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides', *Food Chemistry*, 90(4), 735-741.

Lee, I.-S., Lim, J., Gal, J., Kang, J. C., Kim, H. J., Kang, B. Y. and Choi, H. J. (2011) 'Anti-inflammatory activity of xanthohumol involves heme oxygenase-1 induction via NRF2-ARE signaling in microglial BV2 cells', *Neurochemistry international*, 58(2), 153-160.

Lee, I., Seo, J., Kim, J., Kim, H., Youn, U., Lee, J., Jung, H., Na, M., Hattori, M. and Min, B. (2009) 'Lanostane triterpenes from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum* and their inhibitory effects on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells', *Journal of natural products*, 73(2), 172-176.

Lee, S. Y. and Hee, M. (1990) 'Cardiovascular Effects of Mycelium Extract of *Ganoderma lucidum*: Inhibition of Sympathetic Outflow', *Chem. Pharm. Bull*, 38(5), 1359-1364.

Leskosek-Čukalović, I., Despotović, S., Lakić, N., Nikšić, M., Nedović, V. and Tesević, V. (2010) '*Ganoderma lucidum*—medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties', *Food Research International*, 43(9), 2262-2269.

Leskošek-Čukalović, I. (2002) *Tehnologija piva I deo Slad i nesladovane sirovine*, Beograd: Poljoprivredni fakultet Beograd.

Leskošek-Čukalović, I. (2009) 'Beer as a source of biologically important minerals: mineral balanced

food?' in Gašperlin L, Ž. B., ed. *Role of minerals in food technology and nutrition*, Biotechnology Faculty, Ljubljana, 131-141.

Leskošek-Čukalović, I., Despotović, S., Nedović, V., Lakić, N. and Nikšić, M. (2010) 'New Type of Beer—beer with improved functionality and defined pharmacodynamic properties', *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 384-391.

Leskošek-Čukalović, I. J. (2016) 'Beer as an Integral Part of Healthy Diets: Current Knowledge and Perspective' in *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, Springer, 111-144.

Leskošek-Čukalović, I., Jelačić, S., Nedović, V., Ristić, M. and Dordević, S. (2007) *Functional drinks and phytopharmaceuticals based on beer and medicinal herbs*, translated by 1-13.

Li, H., Liu, F., Hao, J. and Liu, C. (2015) 'Determination of purines in beer by HPLC using a simple and rapid sample pretreatment', *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 73(2), 137-142.

Li, P. and Zhang, K. (2000) 'Isolation, purification and bioactivities of exopoly saccharides from fermented broth of *Ganoderma lucidum*', *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 40(2), 217-220.

Li, W.-J., Nie, S.-P., Peng, X.-P., Liu, X.-Z., Li, C., Chen, Y., Li, J.-E., Song, W.-R. and Xie, M.-Y. (2012) 'Ganoderma atrum polysaccharide improves age-related oxidative stress and immune impairment in mice', *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(6), 1413-1418.

Li, W.-J., Nie, S.-P., Xie, M.-Y., Yu, Q., Chen, Y. and He, M. (2011) 'Ganoderma atrum polysaccharide attenuates oxidative stress induced by D-galactose in mouse brain', *Life sciences*, 88(15), 713-718.

Li, W.-j., Nie, S.-p., Yan, Y., Zhu, S.-b. and Xie, M.-y. (2009) 'The protective effect of Ganoderma atrum polysaccharide against anoxia/reoxygenation injury in neonatal rat cardiomyocytes', *Life sciences*, 85(17), 634-641.

Li, W., Nie, S., Chen, Y., Wang, Y., Li, C. and Xie, M. (2011) 'Enhancement of cyclophosphamide-induced antitumor effect by a novel polysaccharide from Ganoderma atrum in sarcoma 180-bearing mice', *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(8), 3707-3716.

Li, W. J., Nie, S. P., Chen, Y., Xie, M. Y., He, M., Yu, Q. and Yan, Y. (2010) 'Ganoderma atrum polysaccharide protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation-induced oxidative stress by mitochondrial pathway', *Journal of cellular biochemistry*, 110(1), 191-200.

Li, X., Zhou, A. and Li, X. (2007) 'Inhibition of Lycium barbarum polysaccharides and Ganoderma lucidum polysaccharides against oxidative injury induced by γ -irradiation in rat liver mitochondria', *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 172-178.

Li, Y.-Q. and Wang, S.-F. (2006) 'Anti-hepatitis B activities of ganoderic acid from Ganoderma lucidum', *Biotechnology letters*, 28(11), 837-841.

Liang, S., Liu, X., Chen, F. and Chen, Z. (2004) 'Current microalgal health food R & D activities in China' in *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges*, Springer, 45-48.

Liao, P., Hemmerlin, A., Bach, T. J. and Chye, M.-L. (2016) 'The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production', *Biotechnology advances*.

Liese, A. D., Schulz, M., Fang, F., Wolever, T. M., D'Agostino, R. B., Sparks, K. C. and Mayer-Davis, E. J. (2005) 'Dietary glycemic index and glycemic load, carbohydrate and fiber intake, and measures of insulin sensitivity, secretion, and adiposity in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study', *Diabetes care*, 28(12), 2832-2838.

- Lin, L.-J., Shiao, M.-S. and Yeh, S.-F. (1988a) 'Seven new triterpenes from *Ganoderma lucidum*', *Journal of natural products*, 51(5), 918-924.
- Lin, L.-J., Shiao, M.-S. and Yeh, S.-F. (1988b) 'Triterpenes from *Ganoderma lucidum*', *Phytochemistry*, 27(7), 2269-2271.
- Lin, S.-B., Li, C.-H., Lee, S.-S. and Kan, L.-S. (2003) 'Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest', *Life sciences*, 72(21), 2381-2390.
- Lin, Z.-b. and Zhang, H.-n. (2004) 'Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms', *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 1387-1395.
- Lindequist, U., Niedermeyer, T. H. and Jülich, W.-D. (2005) 'The pharmacological potential of mushrooms', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(3), 285-299.
- Linehan, D. C., Bowne, W. B. and Lewis, J. J. (1999) *Immunotherapeutic approaches to sarcoma*, translated by Wiley Online Library, 72-77.
- Linster, C. L. and Van Schaftingen, E. (2007) 'Vitamin C', *Febs Journal*, 274(1), 1-22.
- Lipkin, W. I. (2008) 'Pathogen discovery', *PLoS Pathog*, 4(4), e1000002.
- Liu, G.-T., Chang, S., Buswell, J. and Chiu, S. (1993) *Pharmacology and clinical uses of Ganoderma*, translated by 267-271.
- Liu, J. and Chen, J.-p. (2008) 'Determination of Germanium and Selenium in *Ganoderma lucidum* Spore Powder by Using ICP-MS with Microwave Digestion [J]', *Food Science*, 12, 123.
- Liu, J., Shimizu, K., Konishi, F., Noda, K., Kumamoto, S., Kurashiki, K. and Kondo, R. (2007) 'Anti-androgenic activities of the triterpenoids fraction of *Ganoderma lucidum*', *Food Chemistry*, 100(4), 1691-1696.
- Liu, J., Willför, S. and Xu, C. (2015) 'A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications', *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 31-61.

Liu, W., Wang, H., Pang, X., Yao, W. and Gao, X. (2010) 'Characterization and antioxidant activity of two low-molecular-weight polysaccharides purified from the fruiting bodies of *Ganoderma lucidum*', *International journal of biological macromolecules*, 46(4), 451-457.

Lo, H.-C. and Wasser, S. P. (2011) 'Medicinal mushrooms for glycemic control in diabetes mellitus: History, current status, future perspectives, and unsolved problems (review)', *International journal of medicinal mushrooms*, 13(5).

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A. and Chandra, N. (2010) 'Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health', *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.

Loose, D. and Van de Wiele, C. (2009) 'The immune system and cancer', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 24(3), 369-376.

Lopez-Huertas, E. (2010) 'Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies', *Pharmacological Research*, 61(3), 200-207.

Lorenzen, K. and Anke, T. (1998) 'Basidiomycetes as a source for new bioactive natural products', *Curr org chem*, 2(4), 329-364.

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R. and Ahn, S. Y. (2013) 'Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010', *The Lancet*, 380(9859), 2095-2128.

Ma, C.-w., Feng, M., Zhai, X., Hu, M., You, L., Luo, W. and Zhao, M. (2013) 'Optimization for the extraction of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and their antioxidant and antiproliferative activities', *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(6), 886-894.

Ma, H.-T., Hsieh, J.-F. and Chen, S.-T. (2015) 'Anti-diabetic effects of *Ganoderma lucidum*', *Phytochemistry*, 114, 109-113.

Ma, X., Yu, J. and Kennedy, J. F. (2005) 'Studies on the properties of natural fibers-reinforced thermoplastic starch composites', *Carbohydrate Polymers*, 62(1), 19-24.

Mabry, T., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (2012) *The systematic identification of flavonoids*, Springer Science & Business Media.

MACLEOD, R., HANCOCK, M., PAPAZIAN, C. and PFISTERER, E. (1997) 'Russia's other drink. Discussion: Emerging beer markets around the world', *Technical quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, 34(3), 193-195.

Maeda, H., Sawa, T. and Konno, T. (2001) 'Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS', *Journal of controlled release*, 74(1), 47-61.

Mahato, S. B. and Kundu, A. P. (1994) '¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids—a compilation and some salient features', *Phytochemistry*, 37(6), 1517-1575.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Rémésy, C. (2005) 'Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies', *The American journal of clinical nutrition*, 81(1), 230S-242S.

Mandel, S., Packer, L., Youdim, M. B. and Weinreb, O. (2005) 'Proceedings from the “Third International Conference on mechanism of Action of Nutraceuticals”', *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(9), 513-520.

Manson, M. M., Ball, H., Barrett, M. C., Clark, H. L., Judah, D. J., Williamson, G. and Neal, G. E. (1997) 'Mechanism of action of dietary chemoprotective agents in rat liver: induction of phase I and II drug metabolizing enzymes and aflatoxin B1 metabolism', *Carcinogenesis*, 18(9), 1729-1738.

Marangoni, A. G., Acevedo, N., Maleky, F., Peyronel, F., Mazzanti, G., Quinn, B. and Pink, D. (2012) 'Structure and functionality of edible fats', *Soft Matter*, 8(5), 1275-1300.

Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P. and Cotter, P. D. (2014) 'Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives', *Trends in Food Science & Technology*, 38(2), 113-124.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W. and Dong, C. (2009) 'T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity', *Immunity*, 31(5), 787-798.

Martirosyan, D. M. and Singh, J. (2015) 'A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique?', *Functional Foods in Health and Disease*, 5(6), 209 of 223.

Mathers, C. D. and Loncar, D. (2006) 'Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030', *Plos med*, 3(11), e442.

Matos, C., Ribeiro, M. and Guerra, A. (2015) 'Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk', *Journal of Applied Biomedicine*, 13(3), 169-180.

Mattila, P., Suonpää, K. and Piironen, V. (2000) 'Functional properties of edible mushrooms', *Nutrition*, 16(7), 694-696.

Mau, J.-L., Lin, H.-C. and Chen, C.-C. (2001) 'Non-volatile components of several medicinal mushrooms', *Food Research International*, 34(6), 521-526.

Mayell, M. (2001) 'Maitake extracts and their therapeutic potential-a review', *Alternative Medicine Review*, 6(1), 48-60.

Mazar, A. P. (2001) 'The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer', *Anti-cancer drugs*, 12(5), 387-400.

McClements, D. J., Li, F. and Xiao, H. (2015) 'The nutraceutical bioavailability classification scheme: classifying nutraceuticals according to factors limiting their oral bioavailability', *Annual review of food science and technology*, 6, 299-327.

McCormack, J. G., Westergaard, N., Kristiansen, M., Brand, C. L. and Lau, J. (2001) 'Pharmacological approaches to inhibit endogenous glucose production as a means of anti-diabetic therapy', *Current pharmaceutical design*, 7(14), 1451-1474.

McDonald, S. T. (2017) 'Chapter 13 - Concepts of flavor creation in novel nutraceuticals and functional food formulations A2 - Bagchi, Debasis' in Nair, S., ed. *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, San Diego: Academic Press, 231-247.

MEBAK (2011) *Brautechnische Analysenmethoden: Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysenkommission (MEBAK)*, MEBAK.

Meena, D., Das, P., Kumar, S., Mandal, S., Prusty, A., Singh, S., Akhtar, M., Behera, B., Kumar, K. and Pal, A. (2013) 'Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review)', *Fish physiology and biochemistry*, 39(3), 431-457.

Mehta, S. (2014) 'Studies on genetic variability and bioactive molecules production by *Ganoderma* species'.

Melagraki, G., Afantitis, A., Igglessi-Markopoulou, O., Detsi, A., Koufaki, M., Kontogiorgis, C. and Hadjipavlou-Litina, D. J. (2009) 'Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-

inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts', *European journal of medicinal chemistry*, 44(7), 3020-3026.

Meloni, G. and Swinnen, J. (2013) 'The political economy of European wine regulations', *Journal of Wine Economics*, 8(03), 244-284.

Mendis, C., Jacobsen, J., Gamage-Mendis, A., Bule, E., Dgedge, M., Thompson, R., Cuamba, N., Barreto, J., Begtrup, K. and Sinden, R. (2000) 'Anopheles arabiensis and An. funestus are equally important vectors of malaria in Matola coastal suburb of Maputo, southern Mozambique', *Medical and veterinary entomology*, 14(2), 171-180.

Mente, A., O'Donnell, M. J., Rangarajan, S., McQueen, M. J., Poirier, P., Wielgosz, A., Morrison, H., Li, W., Wang, X. and Di, C. (2014) 'Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure', *New england journal of medicine*, 371(7), 601-611.

Milligan, S., Kalita, J., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L. and De Keukeleire, D. (1999) 'Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(6), 2249-2249.

Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Heyerick, A., De Cooman, L., Rong, H. and De Keukeleire, D. (2002) 'Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin', *Reproduction*, 123(2), 235-242.

Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Van De Kauter, V., Stevens, J., Deinzer, M., Rong, H. and De Keukeleire, D. (2000) 'The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(12), 4912-4915.

Milner, J. A. (2000) 'Functional foods: the US perspective', *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1654s-1659s.

Ming, L.-G., Lv, X., Ma, X.-N., Ge, B.-F., Zhen, P., Song, P., Zhou, J., Ma, H.-P., Xian, C. J. and Chen, K.-M. (2013) 'The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenylnaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro', *Endocrinology*, 154(3), 1202-1214.

Miranda, C. L., Stevens, J. F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. (2000) 'Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenyated chalcones and flavanones in vitro', *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(9), 3876-3884.

Mishra, K., Pal, R., Arunkumar, R., Chandrashekara, C., Jain, S. and Bhatt, J. (2013) 'Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casing materials', *Food Chemistry*, 138(2), 1557-1563.

MiuRA, T., Yuan, L., Sun, B., FUJII, H., YOSHIDA, M., WAKAME, K. and KOSUNA, K.-i. (2002) 'Isoflavone aglycon produced by culture of soybean extracts with basidiomycetes and its anti-angiogenic activity', *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(12), 2626-2631.

Miura, Y., Hosono, M., Oyamada, C., Odai, H., Oikawa, S. and Kondo, K. (2005) 'Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPAR α activations in C57BL/6 mice', *British Journal of Nutrition*, 93(04), 559-567.

Miyazaki, T. and Nishijima, M. (1981) 'Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*', *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(12), 3611-3616.

Mizuno, T. (1995) 'Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushroom fungi', *Food Reviews International*, 11(1), 5-21.

Mizuno, T., Wang, G., Zhang, J., Kawagishi, H., Nishitoba, T. and Li, J. (1995) 'Reishi, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma tsugae*: bioactive substances and medicinal effects', *Food Reviews International*, 11(1), 151-166.

Mohan, K., Padmanaban, M. and Uthayakumar, V. (2015) '*Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes)', *American Journal of Biology and Life Sciences*, 3(5), 168-175.

Molla, E., Esteban, R. and Valiente, C. (1994) '[Contents of dietary fiber in by-products from manufacturing of beer and from the citric industry].[Spanish]', *Alimentaria*.

Montanari, L., Marconi, O., Mayer, H. and Fantozzi, P. (2009) 'Production of alcohol-free beer', *Beer in health and disease prevention*, 61-75.

Monteiro, R., Calhau, C., Pinheiro-Silva, S., Guerreiro, S., Gärtner, F., Azevedo, I. and Soares, R. (2008) 'Xanthohumol inhibits inflammatory factor production and angiogenesis in breast cancer xenografts', *Journal of cellular biochemistry*, 104(5), 1699-1707.

Moradali, M.-F., Mostafavi, H., Ghods, S. and Hedjaroude, G.-A. (2007) 'Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)', *International Immunopharmacology*, 7(6), 701-724.

Mordike, B. and Ebert, T. (2001) 'Magnesium: properties—applications—potential', *Materials Science and Engineering: A*, 302(1), 37-45.

Mordovsky, E., Soloviev, A. and Sannikov, A. (2014) 'Alcohol anamnesis and a death place factor: Role in mortality rates due to leading cardiovascular diseases', *Terapevticheskii arkhiv*, 87(9), 26-33.

Morse, S. S. (1996) *Emerging viruses*, Oxford University Press on Demand.

Mosher, R. (2004) *Radical Brewing: Recipes, Tales and World-Altering Meditations in a Glass*, Brewers Publications.

Mozaffarian, D. and Wu, J. H. (2011) 'Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events', *Journal of the American College of Cardiology*, 58(20), 2047-2067.

Mugochi, T., Mutukumira, T. and Zvauya, R. (2001) 'Comparison of sensory characteristics of traditional Zimbabwean non-alcoholic cereal beverages, masvusvu and mangisi with mahewu, a commercial cereal product', *Ecology of food and nutrition*, 40(4), 299-309.

Mukamal, K. J., Chen, C. M., Rao, S. R. and Breslow, R. A. (2010) 'Alcohol consumption and cardiovascular mortality among US adults, 1987 to 2002', *Journal of the American College of Cardiology*, 55(13), 1328-1335.

Muthuri, S. G., Zhang, W., Maciewicz, R. A., Muir, K. and Doherty, M. (2015) 'Beer and wine consumption and risk of knee or hip osteoarthritis: a case control study', *Arthritis research & therapy*, 17(1), 23.

Muyanja, C., Narvhus, J., Treimo, J. and Langsrud, T. (2003) 'Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage', *International journal of food microbiology*, 80(3), 201-210.

Nagashima, A. I., Pansiera, P. E., Baracat, M. M. and Gómez, R. J. H. C. (2013) 'Development of effervescent products, in powder and tablet form, supplemented with probiotics *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces boulardii*', *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), 605-611.

Nance, M. R. and Setzer, W. N. (2011) 'Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus* L.) commonly used in beer brewing', *Journal of Brewing and Distilling*, 2(2), 16-22.

Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C. and Ghiselli, A. (2006) 'Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans', *The Journal of nutritional biochemistry*, 17(1), 14-22.

Narziss, L., Miedaner, H. and Krottenthaler, M. (1995) 'DEVELOPMENT OF A SELECTION METHOD SUITABLE FOR SERIAL APPLICATION FOR IMPROVING THE QUALITY OF THE BEER AND THE QUALITY PARAMETERS OF BARLEY WHICH INFLUENCE THE TASTE OF BEER. 3', *MONATSSCHRIFT FÜR BRAUWISSENSCHAFT*, 48(3-4), 108-111.

Nautiyal, C. S., Govindarajan, R., Lavania, M. and Pushpangadan, P. (2008) 'Novel mechanism of modulating natural antioxidants in functional foods: involvement of plant growth promoting rhizobacteria NRRL B-30488', *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4474-4481.

Nayak, R. N., Dixitraj, P., Nayak, A. and Bhat, K. (2015) 'Evaluation of anti-microbial activity of spore powder of *Ganoderma lucidum* on clinical isolates of *Prevotella intermedia*: A pilot study', *Contemporary clinical dentistry*, 6(Suppl 1), S248.

Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S. M. and Gabrilovich, D. I. (2005) 'Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway', *Cancer research*, 65(20), 9525-9535.

Negrao, R., Costa, R., Duarte, D., Gomes, T. T., Coelho, P., Guimaraes, J. T., Guardão, L., Azevedo, I. and Soares, R. (2012) 'Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes', *Journal of cellular biochemistry*, 113(1), 100-109.

Neish, A. (1964) 'Major pathways of biosynthesis of phenols', *Biochemistry of phenolic compounds*, 295-359.

Nelson, J. P. (2003) 'Advertising bans, monopoly, and alcohol demand: testing for substitution effects using state panel data', *Review of Industrial Organization*, 22(1), 1-25.

Nelson, M. (2005) *The barbarian's beverage: A history of beer in ancient Europe*, Routledge.

Neogi, T., Jansen, T. L. T. A., Dalbeth, N., Fransen, J., Schumacher, H. R., Berendsen, D., Brown, M., Choi, H., Edwards, N. L. and Janssens, H. J. (2015) '2015 gout classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative', *Arthritis & Rheumatology*, 67(10), 2557-2568.

Newman, M. (2016) 'The magnificent multitude of beer', [online], available: <https://www.popchartlab.com/products/the-magnificent-multitude-of-beer> [accessed

Nicholls, J. M., Moss, R. B. and Haslam, S. M. (2013) 'The use of sialidase therapy for respiratory viral infections', *Antiviral research*, 98(3), 401-409.

Nicholson, R. L. and Hammerschmidt, R. (1992) 'Phenolic compounds and their role in disease resistance', *Annual review of phytopathology*, 30(1), 369-389.

Nie, S.-P. and Xie, M.-Y. (2011) 'A review on the isolation and structure of tea polysaccharides and their bioactivities', *Food Hydrocolloids*, 25(2), 144-149.

Nie, S., Zhang, H., Li, W. and Xie, M. (2013) 'Current development of polysaccharides from Ganoderma: Isolation, structure and bioactivities', *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 1(1), 10-20.

Nielsen, S. (2014) *Food analysis*, Springer Science & Business Media.

Nieves, J. (2013) 'Skeletal effects of nutrients and nutraceuticals, beyond calcium and vitamin D', *Osteoporosis International*, 24(3), 771-786.

Nishitoba, T., Sato, S. and Sakamura, S. (1985) 'New terpenoids from Ganoderma lucidum and their bitterness', *Agricultural and biological chemistry*, 49(5), 1547-1549.

Noguchi, M., Kakuma, T., Tomiyasu, K., Kurita, Y., Kukihara, H., Konishi, F., Kumamoto, S., Shimizu, K., Kondo, R. and Matsuoka, K. (2008a) 'Effect of an extract of Ganoderma lucidum in men with lower urinary tract symptoms: a double-blind, placebo-controlled randomized and dose-ranging study', *Asian journal of andrology*, 10(4), 651-658.

Noguchi, M., Kakuma, T., Tomiyasu, K., Yamada, A., Itoh, K., Konishi, F., Kumamoto, S., Shimizu, K., Kondo, R. and Matsuoka, K. (2008b) 'Randomized clinical trial of an ethanol extract of Ganoderma lucidum in men with lower urinary tract symptoms', *Asian journal of andrology*, 10(5), 777-785.

Nord, L. I., Vaag, P. and Duus, J. Ø. (2004) 'Quantification of organic and amino acids in beer by ¹H NMR spectroscopy', *Analytical chemistry*, 76(16), 4790-4798.

Odekon, L. E., Sato, Y. and Rifkin, D. B. (1992) 'Urokinase-type plasminogen activator mediates basic fibroblast growth factor-induced bovine endothelial cell migration independent of its proteolytic activity', *Journal of cellular physiology*, 150(2), 258-263.

Okrent, D. (2010) *Last call: The rise and fall of prohibition*, Simon and Schuster.

Old, L. (1996) 'Immunotherapy of cancer', *Scientific American*, 275, 136-143.

Onakpoya, I., Posadzki, P. and Ernst, E. (2013) 'Chromium supplementation in overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials', *Obesity Reviews*, 14(6), 496-507.

Opie, L. H., Gevers, W., Nayler, W. G. and Zak, R. (1984) *The heart: Physiology, metabolism, pharmacology, and therapy*, Grune & Stratton Orlando, Florida.

Organization, W. H. (2014) *Global status report on alcohol and health 2014*, World Health Organization.

Othman, R. A., Moghadasian, M. H. and Jones, P. J. (2011) 'Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan', *Nutrition Reviews*, 69(6), 299-309.

Ozaki, Y., Fong, C. H., Herman, Z., Maeda, H., Miyake, M., Ifuku, Y. and Hasegawa, S. (1991) 'Limonoid glucosides in citrus seeds', *Agricultural and biological chemistry*, 55(1), 137-141.

Özer, B. H. and Kirmaci, H. A. (2010) 'Functional milks and dairy beverages', *International Journal of Dairy Technology*, 63(1), 1-15.

Packer, L., Wachtel-Galor, S., Ong, C. N. and Halliwell, B. (2004) *Herbal and traditional medicine: biomolecular and clinical aspects*, CRC Press.

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A. and Dutta, S. K. (2003) 'Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention', *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18-35.

Pan, K., Jiang, Q., Liu, G., Miao, X. and Zhong, D. (2013) 'Optimization extraction of Ganoderma lucidum polysaccharides and its immunity and antioxidant activities', *International journal of biological macromolecules*, 55, 301-306.

Papazian, C. (2006) 'Beer styles: their origins and classification', *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 157, 39.

Pariza, M. W., Park, Y. and Cook, M. E. (2001) 'The biologically active isomers of conjugated linoleic acid', *Progress in lipid research*, 40(4), 283-298.

Park, P.-J., Wang, T. T., Kim, E.-K. and Zhong-Ji, Q. (2016) 'Nutraceuticals: Recent Advances of Bioactive Food Components', *Journal of Chemistry*, 2016.

Parks, D. A. and Booyse, F. M. (2002) 'Cardiovascular protection by alcohol and polyphenols', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957(1), 115-121.

Patel, Z. and Soni, M. (2014) 'Ganoderma lucidum: A midas touch to human health', *Indian Journal of Health and Wellbeing*, 5(1), 71.

Paterson, R. R. M. (2006) 'Ganoderma—a therapeutic fungal biofactory', *Phytochemistry*, 67(18), 1985-2001.

Paulionis, L. (2008) 'The changing face of food and nutrition in Canada and the United States: opportunities and challenges for older adults', *Journal of Nutrition for the Elderly*, 27(3-4), 277-295.

Paydary, K., Khaghani, P., Emamzadeh-Fard, S., Alinaghi, S. A. S. and Baesi, K. (2013) 'The emergence of drug resistant HIV variants and novel anti-retroviral therapy', *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 3(7), 515-522.

Peacock, V. E. and Deinzer, M. L. (1981) 'Chemistry of hop aroma in beer', *J. Am. Soc. Brew. Chem*, 39(136), 1981.

Pecić, S., Nikićević, N., Veljović, M., Jardanin, M., Tešević, V., Belović, M. and Nikšić, M. (2016) 'The influence of extraction parameters on physicochemical properties of special grain brandies with Ganoderma lucidum', *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, (00), 33-33.

Pedreza-Zamorano, J. D., Lavado-Garcia, J. M., Roncero-Martin, R., Calderon-Garcia, J. F., Rodriguez-Dominguez, T. and Canal-Macias, M. L. (2009) 'Effect of beer drinking on ultrasound bone mass in women', *Nutrition*, 25(10), 1057-1063.

Pepper, M. S., Hazel, S. J., Hümpel, M. and Schleuning, W. D. (2004) '8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo', *Journal of cellular physiology*, 199(1), 98-107.

Perez, V. and Chang, E. T. (2014) 'Sodium-to-potassium ratio and blood pressure, hypertension, and related factors', *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, 5(6), 712-741.

Perpète, P., Santos, G., Bodart, E. and Collin, S. (2005) 'Uptake of amino acids during beer production: the concept of a critical time value', *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63(1), 23-27.

Perrucci, S., Macchioni, G., Cioni, P. L., Flamini, G. and Morelli, I. (1995) 'Structure/activity relationship of some natural monoterpenes as acaricides against *Psoroptes cuniculi*', *Journal of natural products*, 58(8), 1261-1264.

Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A., Gazzaniga, P. P. and Violi, F. (2000) 'The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide', *The American journal of clinical nutrition*, 72(5), 1150-1155.

Platiša, M. M., Gal, V., Nestorović, Z. and Gojković-Bukarica, L. (2014) 'Quantification of the acute effect of a low dose of red wine by nonlinear measures of RR and QT interval series in healthy subjects', *Computers in biology and medicine*, 53, 291-296.

Platiša, M. M., Gal, V., Nestorović, Z., Leskošek-Čukalović, I., Despotović, S., Veljović, M., Petrović, A., Rajković, J., Đokić, V. and Novaković, R. (2016) 'Changes in linear and nonlinear measures of RR and QT interval series after beer intake', *Vojnosanitetski preglad*, (00), 316-316.

Poelman, M. P., Steenhuis, I. H., de Vet, E. and Seidell, J. C. (2013) 'The development and evaluation of an internet-based intervention to increase awareness about food portion sizes: a randomized, controlled trial', *Journal of nutrition education and behavior*, 45(6), 701-707.

Poelmans, E. and Swinnen, J. F. (2011) 'From monasteries to multinationals (and back): A historical review of the beer economy', *Journal of Wine Economics*, 6(02), 196-216.

Poli, A., Marangoni, F., Avogaro, A., Barba, G., Bellentani, S., Bucci, M., Cambieri, R., Catapano, A. L., Costanzo, S. and Cricelli, C. (2013) 'Moderate alcohol use and health: a consensus document', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(6), 487-504.

Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A. and Soccol, C. R. (2008) 'Trends in non-dairy probiotic beverages', *Food Research International*, 41(2), 111-123.

Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti dijetetskih proizvoda, (2015) Službeni glasnik Republike Srbije.

Preedy, V. R. (2011) *Beer in health and disease prevention*, Academic Press.

Pregadio, F. (2013) *The Encyclopedia of Taoism: 2-volume set*, Routledge.

Purves, D., Cabeza, R., Huettel, S. A., LaBar, K. S., Platt, M. L., Woldorff, M. G. and Brannon, E. M. (2008) *Cognitive Neuroscience*, Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Pyörälä, E. (1990) 'Trends in alcohol consumption in Spain, Portugal, France and Italy from the 1950s until the 1980s', *Addiction*, 85(4), 469-477.

Qin, W. (2016) 'Recent Developments in Using Advanced Sequencing Technologies for the Genomic Studies of Lignin and Cellulose Degrading Microorganisms', *International journal of biological sciences*, 12(2), 156.

Quereshi, S., Pandey, A. and Sandhu, S. (2010) 'Evaluation of antibacterial activity of different ganoderma lucidum extracts'.

Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R. and Lamuela-Raventós, R. (2015) 'A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS)', *Food Chemistry*, 169, 336-343.

Rajasekaran, M. and Kalaimagal, C. (2012) 'Cardioprotective effect of a medicinal mushroom, Ganoderma lucidum against adriamycin induced toxicity', *International Journal of Pharmacology*, 8(4), 252-258.

Raninen, K., Lappi, J., Mykkänen, H. and Poutanen, K. (2011) 'Dietary fiber type reflects physiological functionality: comparison of grain fiber, inulin, and polydextrose', *Nutrition Reviews*, 69(1), 9-21.

Räsänen, M. (1975) *Vom Halm zum Fass: die volkstümlichen alkoholarmen Getreidegetränke in Finnland*, Weilin och Gööb.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. (1999) 'Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay', *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.

Real, A., Comino, I., de Lourdes Moreno, M., López-Casado, M. Á., Lorite, P., Torres, M. I., Cebolla, Á. and Sousa, C. (2014) 'Identification and in vitro reactivity of celiac immunoreactive peptides in an apparent gluten-free beer', *PloS one*, 9(6), e100917.

Redruello, B., Ladero, V., Del Rio, B., Fernández, M., Martín, M. and Alvarez, M. A. (2017) 'A UHPLC method for the simultaneous analysis of biogenic amines, amino acids and ammonium ions in beer', *Food Chemistry*, 217, 117-124.

Rees, F. and Doherty, M. (2014) 'Patients with gout can be cured in primary care', *The Practitioner*, 258(1777), 15-9, 2.

Reffitt, D., Ogston, N., Jugdaohsingh, R., Cheung, H., Evans, B. A. J., Thompson, R., Powell, J. and Hampson, G. (2003) 'Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro', *Bone*, 32(2), 127-135.

Reid, L. M., O'donnell, C. P. and Downey, G. (2006) 'Recent technological advances for the determination of food authenticity', *Trends in Food Science & Technology*, 17(7), 344-353.

Rhodes, C. P. (2014) *The Encyclopedia of Beer: The Beer Lover's Bible - A Complete Reference To Beer Styles and Brewing*, Henry Holt & Co.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. and Paganga, G. (1996) 'Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids', *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.

Riley, P. (1994) 'Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation', *International journal of radiation biology*, 65(1), 27-33.

Ríos, J.-L., Andújar, I., Recio, M.-C. and Giner, R.-M. (2012) 'Lanostanoids from fungi: a group of potential anticancer compounds', *Journal of natural products*, 75(11), 2016-2044.

Risau, W. (1997) 'Mechanisms of angiogenesis', *Nature*, 386(6626), 671.

Rivero, D., Pérez-Magariño, S., González-Sanjosé, M. L., Valls-Belles, V., Codoñer, P. and Muñiz, P. (2005) 'Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: Correlation with the content of polyphenols and melanoidins', *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(9), 3637-3642.

Roberfroid, M. (2000) 'Defining functional foods', *Functional foods*, 9.

Roberfroid, M. B. (2000) 'Concepts and strategy of functional food science: the European perspective', *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1660s-1664s.

Roberfroid, M. B. (2002) 'Functional foods: concepts and application to inulin and oligofructose', *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S139-S143.

Robles, R., Palomino, N. and Robles, A. (2001) 'Oxidative stress in the neonate', *Early human development*, 65, S75-S81.

Rodrigo, S., Santamaria, O., Chen, Y., McGrath, S. P. and Poblaciones, M. J. (2014) 'Selenium speciation in malt, wort, and beer made from selenium-biofortified two-rowed barley grain', *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(25), 5948-5953.

Rodrigo, S., Young, S., Cook, D., Wilkinson, S., Clegg, S., Bailey, E., Mathers, A. and Broadley, M. (2015) 'Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer', *Food Chemistry*, 182, 9-13.

Rojas, J., Ciro, Y. and Correa, L. (2014) 'Functionality of chitin as a direct compression excipient: An acetaminophen comparative study', *Carbohydrate Polymers*, 103, 134-139.

Romeo, J., González-Gross, M., Wärnberg, J., Díaz, L. E. and Marcos, A. (2008) 'Effects of moderate beer consumption on blood lipid profile in healthy Spanish adults', *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 18(5), 365-372.

Romeo, J., Wärnberg, J., Nova, E., Díaz, L. E., Gómez-Martinez, S. and Marcos, A. (2007) 'Moderate alcohol consumption and the immune system: a review', *British Journal of Nutrition*, 98(S1), S111-S115.

Rossi, D., Guerrini, A., Bruni, R., Brognara, E., Borgatti, M., Gambari, R., Maietti, S. and Sacchetti, G. (2012) 'trans-Resveratrol in nutraceuticals: issues in retail quality and effectiveness', *Molecules*, 17(10), 12393-12405.

Rufino-Palomares, E. E., Perez-Jimenez, A., J Reyes-Zurita, F., Garcia-Salguero, L., Mokhtari, K., Herrera-Merchán, A., P Medina, P., Peragón, J. and A Lupianez, J. (2015) 'Anti-cancer and anti-angiogenic properties of various natural pentacyclic tri-terpenoids and some of their chemical derivatives', *Current Organic Chemistry*, 19(10), 919-947.

Ryan, C. and Crowther, S. (2013) *The Direct and Contributory Role of Alcohol to Mortality Rates*, translated by NATURE PUBLISHING GROUP 75 VARICK ST, 9TH FLR, NEW YORK, NY 10013-1917 USA, 7A-7A.

Saarela, M. (2011) *Functional foods: Concept to product*, Elsevier.

Sakagami, H., Kushida, T., Oizumi, T., Nakashima, H. and Makino, T. (2010) 'Distribution of lignin-carbohydrate complex in plant kingdom and its functionality as alternative medicine', *Pharmacology & therapeutics*, 128(1), 91-105.

Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. and Ono, M. (2008) 'Regulatory T cells and immune tolerance', *Cell*, 133(5), 775-787.

Sánchez-Martínez, M., da Silva, E. G. P., Pérez-Corona, T., Cámara, C., Ferreira, S. L. and Madrid, Y. (2012) 'Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC-ICP-MS', *Talanta*, 88, 272-276.

Sanders, M. and Klaenhammer, T. (2001) 'Invited review: the scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic', *Journal of dairy science*, 84(2), 319-331.

Sanodiya, B. S., Thakur, G. S., Baghel, R. K., Prasad, G. and Bisen, P. (2009) 'Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus', *Current pharmaceutical biotechnology*, 10(8), 717-742.

Savić, A., Filipović, L., Arandelović, S., Dojčinović, B., Radulović, S., Sabo, T. J. and Grgurić-Šipka, S. (2014) 'Synthesis, characterization and cytotoxic activity of novel platinum (II) iodido complexes', *European journal of medicinal chemistry*, 82, 372-384.

Scalbert, A. and Williamson, G. (2000) 'Dietary intake and bioavailability of polyphenols', *The Journal of nutrition*, 130(8), 2073S-2085S.

Scanlon, M. L. and Vreeman, R. C. (2013) 'Current strategies for improving access and adherence to antiretroviral therapies in resource-limited settings'.

Schemmel, K. E., Padiyara, R. S. and D'Souza, J. J. (2010) 'Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review', *Journal of Diabetes and its Complications*, 24(5), 354-360.

Schuster, M., Nechansky, A. and Kircheis, R. (2006) 'Cancer immunotherapy', *Biotechnology journal*, 1(2), 138-147.

Selvanathan, S. and Selvanathan, E. (2005) 'Empirical regularities in cross-country alcohol consumption'.

Selvanathan, S. and Selvanathan, E. A. (2007) 'Another look at the identical tastes hypothesis on the analysis of cross-country alcohol data', *Empirical Economics*, 32(1), 185-215.

Seow, S. L.-S., Naidu, M., David, P., Wong, K.-H. and Sabaratnam, V. (2013) 'Potentiation of neuritogenic activity of medicinal mushrooms in rat pheochromocytoma cells', *BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 157.

Seto, S., Lam, T., Tam, H., Au, A., Chan, S., Wu, J., Yu, P., Leung, G., Ngai, S. and Yeung, J. (2009) 'Novel hypoglycemic effects of Ganoderma lucidum water-extract in obese/diabetic (+ db/+ db) mice', *Phytomedicine*, 16(5), 426-436.

Séverin, S. and Wenshui, X. (2005) 'Milk biologically active components as nutraceuticals: review', *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(7-8), 645-656.

Shahidi, F. (2004) 'Functional foods: their role in health promotion and disease prevention', *Journal of Food Science*, 69(5), R146-R149.

Shahidi, F. and Naczki, M. (2003) *Phenolics in food and nutraceuticals*, CRC press.

Shao, A. (2017) 'Chapter 15 - Global market entry regulations for nutraceuticals, functional foods, dietary/food/health supplements A2 - Bagchi, Debasis' in Nair, S., ed. *Developing New Functional Food and Nutraceutical Products*, San Diego: Academic Press, 279-290.

Sharkey, T. D. (1996) 'Isoprene synthesis by plants and animals', *Endeavour*, 20(2), 74-78.

Shaw, D., Leon, C., Kolev, S. and Murray, V. (1997) 'Traditional remedies and food supplements', *Drug safety*, 17(5), 342-356.

Shi, L., Ren, A., Mu, D. and Zhao, M. (2010) 'Current progress in the study on biosynthesis and regulation of ganoderic acids', *Applied microbiology and biotechnology*, 88(6), 1243-1251.

Shi, M., Zhang, Z. and Yang, Y. (2013) 'Antioxidant and immunoregulatory activity of Ganoderma lucidum polysaccharide (GLP)', *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 200-206.

Shimizu, T. (2003) 'Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison', *Nutrition research reviews*, 16(02), 241-252.

Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H. H., Woodward, W., Baldauf-Wagner, S., Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D. and Silbert, L. (2014) 'A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease', *Journal of Alzheimer's Disease*, 38(1), 111-120.

Shiozawa, A., Szabo, S. M., Bolzani, A., Cheung, A. and Choi, H. K. (2017) 'Serum Uric Acid and the Risk of Incident and Recurrent Gout: A Systematic Review', *The Journal of Rheumatology*, jrheum. 160452.

Shulman, S., Sharma, S., Cracchiolo, B., Shubhangi, K. and Sifonios, A. (2014) 'Intraoperative Bleeding Associated with Preoperative Use of Ganoderma lucidum Supplements', *Open Journal of Anesthesiology*, 2014.

Simon, J. E., Wu, Q. and Kaushik-Basu, N. (2016) 'Identification of natural plant extracts harboring anti-hepatitis c virus ns5b polymerase activity',

Simpson, M. J., Macintosh, D. F., Cloughley, J. B. and Stuart, A. E. (1996) 'Past, present and future utilisation of Myrica gale (Myricaceae)', *Economic botany*, 50(1), 122.

Singh, A., Gupta, S., Pereira, B. and Prakash, D. (1995) 'Sensitization to Ganoderma lucidum in patients with respiratory allergy in India', *Clinical & Experimental Allergy*, 25(5), 440-447.

Singh, J. and Sinha, S. (2012) 'Classification, regulatory acts and applications of nutraceuticals for health', *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 177-187.

Singh, N. and Rajini, P. (2004) 'Free radical scavenging activity of an aqueous extract of potato peel', *Food Chemistry*, 85(4), 611-616.

Singh, N., Sharma, R. and Balapure, A. K. (2007) 'pH regulated scavenging activity of beer antioxidants through modified DPPH assay', *Toxicology and industrial health*, 23(2), 75-81.

Singleton, V. and Rossi, J. A. (1965) 'Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents', *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. and Lugasi, A. (2008) 'Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review', *Appetite*, 51(3), 456-467.

Skalicka-Wozniak, K., Szypowski, J., Los, R., Siwulski, M., Sobieralski, K., Glowniak, K. and Malm, A. (2012) 'Evaluation of polysaccharides content in fruit bodies and their antimicrobial activity of four *Ganoderma lucidum* (W Curt.: Fr.) P. Karst. strains cultivated on different wood type substrates', *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81(1).

Skene, K. R., Sprent, J. I., Raven, J. A. and Herdman, L. (2000) 'Myrica gale L', *Journal of Ecology*, 88(6), 1079-1094.

Skypeck, C. (2016) *United States Craft Brewing – Insights and Analysis*, translated by Ghent, Belgium 25.

Sliva, D. (2003) 'Ganoderma lucidum (Reishi) in cancer treatment', *Integrative cancer therapies*, 2(4), 358-364.

Sliva, D., Labarrere, C., Slivova, V., Sedlak, M., Lloyd, F. P. and Ho, N. W. (2002) 'Ganoderma lucidum suppresses motility of highly invasive breast and prostate cancer cells', *Biochemical and biophysical research communications*, 298(4), 603-612.

Slivova, V., Valachovicova, T., Jiang, J. and Sliva, D. (2004) 'Ganoderma lucidum inhibits invasiveness of breast cancer cells', *J Cancer Integr Med*, 2, 25-30.

Sloan, A. E. (2000) 'The top ten functional food trends', *Food Technology*, 54(4), 33-62.

Sloan, A. E. (2002) 'The top 10 functional food trends: the next generation', *Food Technology*, 56(4), 32-57.

Sloan, E. and Adams Hutt, C. (2012) 'Beverage trends in 2012 and beyond', *Agro FOOD Industry Hi Tech*, 23(4), 8.

Smania, E., Delle Monache, F., Smania, A., Yunes, R. and Cuneo, R. (2003) 'Antifungal activity of sterols and triterpenes isolated from *Ganoderma annulare*', *Fitoterapia*, 74(4), 375-377.

Smina, T., Mathew, J., Janardhanan, K. and Devasagayam, T. (2011) 'Antioxidant activity and toxicity profile of total triterpenes isolated from *Ganoderma lucidum* (Fr.) P. Karst occurring in South India', *Environmental toxicology and pharmacology*, 32(3), 438-446.

Smith, J. and Charter, E. (2011) *Functional food product development*, John Wiley & Sons.

Smith, J. E., Rowan, N. and Sullivan, R. (2002) *Medicinal mushrooms: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*, Cancer Research UK London.

Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. and Yagita, H. (2003) 'Nature's TRAIL—on a path to cancer immunotherapy', *Immunity*, 18(1), 1-6.

Snyder, C. I. (1893) 'Porter or beer tap',

Soccol, C. R., Lindner, J. D. D., Yamaguishi, C. T., Spier, M. R., Vandenberghe, L. d. S. and Thomaz-Soccol, V. (2012) 'Probiotic nondairy beverages', *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*, 707-728.

Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. and Rezaei, K. (2012) 'Health-related aspects of beer: a review', *International Journal of Food Properties*, 15(2), 350-373.

Sone, Y., Okuda, R., Wada, N., Kishida, E. and Misaki, A. (1985) 'Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of *Ganoderma lucidum*', *Agricultural and biological chemistry*, 49(9), 2641-2653.

Song, Y. S., Kim, S.-H., Sa, J.-H., Jin, C., Lim, C.-J. and Park, E.-H. (2004) 'Anti-angiogenic and inhibitory activity on inducible nitric oxide production of the mushroom *Ganoderma lucidum*', *Journal of ethnopharmacology*, 90(1), 17-20.

Sorenson, D., Bogue, J. and Paquin, P. (2009) 'Consumer-oriented development of functional beverages', *Functional and speciality beverage technology*, 200, 421-450.

Sridhar, S., Sivaprakasam, E., Balakumar, R. and Kavitha, D. (2011) 'Evaluation of antibacterial and antifungal activity of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst fruit bodies extracts', *World Journal of Science and Technology*, 1(6), 08-11.

Sripanyakorn, S., Jugdaohsingh, R., Elliott, H., Walker, C., Mehta, P., Shoukru, S., Thompson, R. P. and Powell, J. J. (2004) 'The silicon content of beer and its bioavailability in healthy volunteers', *British Journal of Nutrition*, 91(03), 403-409.

Stahre, M. (2014) 'Contribution of excessive alcohol consumption to deaths and years of potential life lost in the United States', *Preventing chronic disease*, 11.

Stamets, P. (2000) *Growing gourmet and medicinal mushrooms*, Ten Speed Press Berkeley.

Stamets, P. (2005) *Mycelium running: how mushrooms can help save the world*, Random House Digital, Inc.

Stanberry, L. R., Cunningham, A. L., Mindel, A., Scott, L. L., Spruance, S. L., Aoki, F. Y. and Lacey, C. J. (2000) 'Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization', *Clinical Infectious Diseases*, 30(3), 549-566.

Statista (2016a).

Statista (2016b) 'Market size of fortified/functional foods worldwide in 2014 and 2020', [online], available: <https://www.statista.com/statistics/252803/global-functional-food-sales/> [accessed

Stengler, M. (2005) *Health Benefits of Medicinal Mushrooms*, Basic Health Publications, Inc.

Stevens, J. F. and Page, J. E. (2004) 'Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!', *Phytochemistry*, 65(10), 1317-1330.

Stigler, G. J. and Becker, G. S. (1977) 'De gustibus non est disputandum', *The American Economic Review*, 67(2), 76-90.

Stika, H.-P. (1996) 'Traces of a possible Celtic brewery in Eberdingen-Hochdorf, Kreis Ludwigsburg, southwest Germany', *Vegetation History and Archaeobotany*, 5(1-2), 81-88.

Stika, H. P. (2011) 'Beer in prehistoric Europe', *Liquid bread: beer and brewing in cross-cultural perspective*. Berghahn Books, New York and Oxford, 55-62.

Stojanović, Ž. and Barjolle, D. (2012) 'Socio-economic and demographic profile of traditional and functional food consumers in Serbia', *Marketing*, 43(1), 41-48.

Stojanović, Ž., Filipović, J. and Stojković, D. (2014) 'TRŽIŠTA HRANE SA NUTRITIVNOM I ZDRAVSTVENOM IZJAVOM: PERSPEKTIVE PROIZVOĐAČA I MALOPRODAVACA', *Ekonomski horizonti*, 16(1), 63-75.

Stubbs, B. J. (2003) 'Captain Cook's beer: the antiscorbutic use of malt and beer in late 18th century sea voyages', *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 12(2), 129.

Suarez-Arroyo, I. J., Rosario-Acevedo, R., Aguilar-Perez, A., Clemente, P. L., Cubano, L. A., Serrano, J., Schneider, R. J. and Martínez-Montemayor, M. M. (2013) 'Anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* (reishi) in inflammatory breast cancer in in vivo and in vitro models', *PloS one*, 8(2), e57431.

Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Angeles Cabello, M., Teresa Díez, M., García, J. B., González del Val, A., Gorrochategui, J. and Hernández, P. (2000) 'Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities', *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(2), 129-140.

Sultan, J., Griffin, S., Di Franco, F., Kirby, J., Shenton, B., Seal, C., Davis, P., Viswanath, Y., Preston, S. and Hayes, N. (2012) 'Randomized clinical trial of omega-3 fatty acid-supplemented enteral nutrition versus standard enteral nutrition in patients undergoing oesophagogastric cancer surgery', *British Journal of Surgery*, 99(3), 346-355.

Sun, J., He, H. and Xie, B. J. (2004) 'Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*', *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(21), 6646-6652.

Supino, R. (1995) 'MTT assays', *In vitro toxicity testing protocols*, 137-149.

Sut, S., Baldan, V., Faggian, M., Peron, G. and Dall'Acqua, S. (2016) 'Nutraceuticals, A New Challenge for Medicinal Chemistry', *Current Medicinal Chemistry*, 23(28), 3198-3223.

Swinnen, J. F. (2011) *The economics of beer*, OUP Oxford.

Talmadge, J. E., Meyers, K. M., Prieur, D. J. and Starkey, J. R. (1980) 'Role of NK cells in tumour growth and metastasis in beige mice'.

Tanaka, S., Ko, K., Kino, K., Tsuchiya, K., Yamashita, A., Murasugi, A., Sakuma, S. and Tsunoo, H. (1989) 'Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions', *Journal of Biological Chemistry*, 264(28), 16372-16377.

- Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. (2008) 'Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids', *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- Tang, W., Gao, Y., Chen, G., Gao, H., Dai, X., Ye, J., Chan, E., Huang, M. and Zhou, S. (2005) 'A randomized, double-blind and placebo-controlled study of a Ganoderma lucidum polysaccharide extract in neurasthenia', *Journal of medicinal food*, 8(1), 53-58.
- Tapas, A. R., Sakarkar, D. and Kakde, R. (2008) 'Flavonoids as nutraceuticals: a review', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
- Tarlo, S., Bell, B., Srinivasan, J., Dolovich, J. and Hargreave, F. (1979) 'Human sensitization to Ganoderma antigen', *Journal of allergy and Clinical Immunology*, 64(1), 43-49.
- Teng, B.-S., Wang, C.-D., Yang, H.-J., Wu, J.-S., Zhang, D., Zheng, M., Fan, Z.-H., Pan, D. and Zhou, P. (2011) 'A protein tyrosine phosphatase 1B activity inhibitor from the fruiting bodies of Ganoderma lucidum (Fr.) Karst and its hypoglycemic potency on streptozotocin-induced type 2 diabetic mice', *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(12), 6492-6500.
- Tepedelen, D. A. (2013) *Brewtal Truth Guide to Extreme Beers: An All-Excess Pass to Brewing's Outer Limits*, Rowman & Littlefield.
- Teschke, R., Larrey, D., Melchart, D. and Danan, G. (2016) 'Traditional Chinese Medicine (TCM) and herbal hepatotoxicity: RUCAM and the role of novel diagnostic biomarkers such as MicroRNAs', *Medicines*, 3(3), 18.
- Thacker, K. (2016) 'Beverage Trend Forecast: Beer Trends for 2017', <https://www.beerdrinking.com/beer-trends-2017/>.
- Tomás-Barberán, F. A. and Espin, J. C. (2001) 'Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876.
- Towns, V. (1992) 'Countryside of Celtic Europe', *London: Batsford*.
- Tremblay, V. J. and Tremblay, C. H. (2005) *The US brewing industry: data and economic analysis*, MIT Press.
- Treutter, D. (2001) 'Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple', *Plant Growth Regulation*, 34(1), 71-89.

Trimarco, V., Cimmino, C. S., Santoro, M., Pagnano, G., Manzi, M. V., Piglia, A., Giudice, C. A., De Luca, N. and Izzo, R. (2012) 'Nutraceuticals for blood pressure control in patients with high-normal or grade 1 hypertension', *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*, 19(3), 117-122.

Trinchieri, G. (1989) 'Biology of natural killer cells', *Advances in immunology*, 47, 187-376.

Tronina, T., Bartmańska, A., Milczarek, M., Wietrzyk, J., Popłoński, J., Rój, E. and Huszcza, E. (2013) 'Antioxidant and antiproliferative activity of glycosides obtained by biotransformation of xanthohumol', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(7), 1957-1960.

Tsiapali, E., Whaley, S., Kalbfleisch, J., Ensley, H. E., Browder, I. W. and Williams, D. L. (2001) 'Glucans exhibit weak antioxidant activity, but stimulate macrophage free radical activity', *Free radical biology and medicine*, 30(4), 393-402.

Tucker, K. L., Jugdaohsingh, R., Powell, J. J., Qiao, N., Hannan, M. T., Sripanyakorn, S., Cupples, L. A. and Kiel, D. P. (2009) 'Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women', *The American journal of clinical nutrition*, 89(4), 1188-1196.

Ulbricht, C. (2014) 'An Evidence-Based Systematic Review of Beta-Glucan by the Natural Standard Research Collaboration', *Journal of dietary supplements*, 11(4), 361-475.

Ulbricht, C., Isaac, R., Milkin, T., A Poole, E., Rusie, E., M Grimes Serrano, J., Weissner, W., C Windsor, R. and Woods, J. (2010) 'An evidence-based systematic review of stevia by the Natural Standard Research Collaboration', *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, 8(2), 113-127.

Unger, R. W. (2004) *Beer in the Middle Ages and the Renaissance*, University of Pennsylvania Press.

Urala, N., Arvola, A. and Lähteenmäki, L. (2003) 'Strength of health-related claims and their perceived advantage', *International journal of food science & technology*, 38(7), 815-826.

Urala, N. and Lähteenmäki, L. (2004) 'Attitudes behind consumers' willingness to use functional foods', *Food Quality and Preference*, 15(7), 793-803.

Vaillant, G. E. (2009) *The natural history of alcoholism revisited*, Harvard University Press.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007) 'Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease', *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.

Vallverdú-Queralt, A., Odriozola-Serrano, I., Oms-Oliu, G., Lamuela-Raventós, R. M., Elez-Martínez, P. and Martín-Belloso, O. (2012) 'Changes in the polyphenol profile of tomato juices processed by pulsed electric fields', *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), 9667-9672.

Van der Gaag, M., Van den Berg, R., Van den Berg, H., Schaafsma, G. and Hendriks, H. (2000) 'Moderate consumption of beer, red wine and spirits has counteracting effects on plasma antioxidants in middle-aged men', *European journal of clinical nutrition*, 54(7), 586.

Van Kleef, E., van Trijp, H. C. and Luning, P. (2005) 'Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation', *Appetite*, 44(3), 299-308.

Vanormelingen, S., Persyn, D. and Swinnen, J. (2011) 'Belgian Beers: Where History Meets Globalization'.

Veljovic, M., Despotovic, S., Djordjevic, R., Pecic, S., Kalusevic, A., Leskosek-Cukalovic, I. and Nedovic, V. (2011) *Sensory and antioxidant properties of beer with Juniperus communis L*, translated by.

Veljovic, M., Djordjevic, R., Leskosek-Cukalovic, I., Lakic, N., Despotovic, S., Pecic, S. and Nedovic, V. (2010) 'The Possibility of Producing a Special Type of Beer Made from Wort with the Addition of Grape Must', *Journal of the Institute of Brewing*, 116(4), 440-444.

Verbeke, W. (2005) 'Consumer acceptance of functional foods: socio-demographic, cognitive and attitudinal determinants', *Food Quality and Preference*, 16(1), 45-57.

Viklund, K. (2011) 'Beer Brewing in Medieval Sweden—archaeobotanical and documentary evidence', *Processing, storage, distribution of food. Food in the medieval rural environment. Rurality VIII, Brepols*, 57-75.

Vilahur, G., Casani, L., Guerra, J. M. and Badimon, L. (2012) 'Intake of fermented beverages protect against acute myocardial injury: target organ cardiac effects and vasculoprotective effects', *Basic research in cardiology*, 107(5), 291.

Vilahur, G., Casani, L., Mendieta, G., Lamuela-Raventos, R. M., Estruch, R. and Badimon, L. (2014) 'Beer elicits vasculoprotective effects through Akt/eNOS activation', *European journal of clinical investigation*, 44(12), 1177-1188.

Viljevac, M., Dugalić, K., Jurković, V., Mihaljević, I., Tomaš, V., Puškar, B., Lepeduš, H., Sudar, R. and Jurković, Z. (2012) 'Relation between polyphenols content and skin colour in sour cherry fruits', *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 57(2), 57-67.

Vinson, J. A., Mandarano, M., Hirst, M., Trevithick, J. R. and Bose, P. (2003) 'Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis', *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(18), 5528-5533.

Visioli, F., Bogani, P., Grande, S., Detopoulou, V., Manios, Y. and Galli, C. (2006) 'Local food and cardioprotection: the role of phytochemicals' in *Local mediterranean food plants and nutraceuticals*, Karger Publishers, 116-129.

Vreeswijk, G. (1995) *IACAS: an implementation of Chisholm's principles of knowledge*, translated by 225-234.

Wachtel-Galor, S., Szeto, Y.-t., Tomlinson, B. and Benzie, I. F. (2004a) 'Ganoderma lucidum ('Lingzhi'); acute and short-term biomarker response to supplementation', *International journal of food sciences and nutrition*, 55(1), 75-83.

Wachtel-Galor, S., Tomlinson, B. and Benzie, I. F. (2004b) 'Ganoderma lucidum ('Lingzhi'), a Chinese medicinal mushroom: biomarker responses in a controlled human supplementation study', *British Journal of Nutrition*, 91(02), 263-269.

Wainwright, T. (1980) *Effect of barley and malt lipids on beer properties*, translated by VERLAG HANS CARL ANDERNACHER STR 33 A, D-90411 NURNBERG, GERMANY, 311-311.

Walker, C. J., Lence, C. and Biendl, M. (2003) 'Untersuchung zum hohen Xanthohumol-Gehalt in Bieren vom Typ Stout/Porter', *Brauwelt*, 143(50), 1709-1712.

Walsh, D. (2016) *Beer style guidelines*, translated by Ghent, Belgium: 30.

Walton, S. and Glover, B. (1998) *The Ultimate Encyclopedia of Wine, Beer, Spirits, & Liqueurs*, Hermes House (UK).

Wang, C.-L., Pi, C.-C., Kuo, C.-W., Zhuang, Y.-J., Khoo, K.-H., Liu, W.-H. and Chen, C.-J. (2011) 'Polysaccharides purified from the submerged culture of *Ganoderma formosanum* stimulate macrophage activation and protect mice against *Listeria monocytogenes* infection', *Biotechnology letters*, 33(11), 2271.

Wang, G. and Dixon, R. A. (2009) 'Heterodimeric geranyl (geranyl) diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9914-9919.

Wang, G., Zhao, J., Liu, J., Huang, Y., Zhong, J.-J. and Tang, W. (2007) 'Enhancement of IL-2 and IFN- γ expression and NK cells activity involved in the anti-tumor effect of ganoderic acid Me in vivo', *International Immunopharmacology*, 7(6), 864-870.

Wang, H. and Ng, T. (2006) 'Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*', *Peptides*, 27(1), 27-30.

Wang, H. and Ng, T. (2006) 'A laccase from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*', *Applied microbiology and biotechnology*, 72(3), 508-513.

Wang, J. and Zhang, L. (2009) 'Structure and chain conformation of five water-soluble derivatives of a β -D-glucan isolated from *Ganoderma lucidum*', *Carbohydrate Research*, 344(1), 105-112.

Wang, Q., Ding, Z.-H., Liu, J.-K. and Zheng, Y.-T. (2004) 'Xanthohumol, a novel anti-HIV-1 agent purified from Hops *Humulus lupulus*', *Antiviral research*, 64(3), 189-194.

Wang, S. Y., Hsu, M. L., Hsu, H. C., Lee, S. S., Shiao, M. S. and 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(6), 699-705.

Wang, Y.-Y., Khoo, K.-H., Chen, S.-T., Lin, C.-C., Wong, C.-H. and Lin, C.-H. (2002) 'Studies on the immuno-modulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose-containing glycoprotein fraction responsible for the activities', *Bioorganic & medicinal chemistry*, 10(4), 1057-1062.

Wang, Z. Q., Zuberi, A. R., Zhang, X. H., Macgowan, J., Qin, J., Ye, X., Son, L., Wu, Q., Lian, K. and Cefalu, W. T. (2007) 'Effects of dietary fibers on weight gain, carbohydrate metabolism, and gastric ghrelin gene expression in mice fed a high-fat diet', *Metabolism*, 56(12), 1635-1642.

Wanmuang, H., Leopairut, J., Kositchaiwat, C., Wananukul, W. and Bunyaratvej, S. (2007) 'Fatal fulminant hepatitis associated with Ganoderma lucidum (Lingzhi) mushroom powder', *Journal-Medical Association of Thailand*, 90(1), 179.

Wasser, S. (2002) 'Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides', *Applied microbiology and biotechnology*, 60(3), 258-274.

Wasser, S. P. (2005) 'Reishi or Ling zhi (Ganoderma lucidum)', *Encyclopedia of Dietary Supplements*, 1, 603-622.

Wasser, S. P. (2011) 'Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms', *Applied microbiology and biotechnology*, 89(5), 1323-1332.

Waters, T. M. and Sloan, F. A. (1995) 'Why do people drink? Tests of the rational addiction model', *Applied Economics*, 27(8), 727-736.

Weber, D., Stuetz, W., Bernhard, W., Franz, A., Raith, M., Grune, T. and Breusing, N. (2014) 'Oxidative stress markers and micronutrients in maternal and cord blood in relation to neonatal outcome', *European journal of clinical nutrition*, 68(2), 215-222.

Weitzman, S., Gilad, Y. and Gross, J. (1985) *How Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) Patients Knowledge Related to Diabetes Control: The Beer Sheva Diabetes Study*, Ben Gurion University, Epidemiology and Health Services Evaluation Unit.

Wells, T. N., Alonso, P. L. and Gutteridge, W. E. (2009) 'New medicines to improve control and contribute to the eradication of malaria', *Nature reviews Drug discovery*, 8(11), 879-891.

Weng, C.-J., Chau, C.-F., Yen, G.-C., Liao, J.-W., Chen, D.-H. and Chen, K.-D. (2009) 'Inhibitory effects of Ganoderma lucidum on tumorigenesis and metastasis of human hepatoma cells in cells and animal models', *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 5049-5057.

Werb, Z. (1997) 'ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology', *Cell*, 91(4), 439-442.

Wheeler, G. L., Jones, M. A. and Smirnoff, N. (1998) 'The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants', *Nature*, 393(6683), 365-369.

Whittle, N., Eldridge, H., Bartley, J. and Organ, G. (1999) 'Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection', *Journal of the Institute of Brewing*, 105(2), 89-99.

Wildman and Robert, E. (2001) *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods CRC Series in Modern Nutrition*, CRC Press.

William, A., Alain, B. and Maarten, V. G. (2011) *The world wheat book: a history of wheat breeding*, Lavoisier.

Winkel-Shirley, B. (2001) 'Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology', *Plant Physiology*, 126(2), 485-493.

Winkel-Shirley, B. (2002) 'Biosynthesis of flavonoids and effects of stress', *Current opinion in plant biology*, 5(3), 218-223.

Wu, T.-S., Shi, L.-S. and Kuo, S.-C. (2001) 'Cytotoxicity of Ganoderma lucidum triterpenes', *Journal of natural products*, 64(8), 1121-1122.

Wu, Z., Rou, K. and Cui, H. (2004) 'The HIV/AIDS epidemic in China: history, current strategies and future challenges', *AIDS Education and Prevention*, 16(Supplement A), 7-17.

www.pks.rs (2016) [online], available: [accessed

Xiao, C., Wu, Q.-P., Cai, W., Tan, J.-B., Yang, X.-B. and Zhang, J.-M. (2012) 'Hypoglycemic effects of Ganoderma lucidum polysaccharides in type 2 diabetic mice', *Archives of pharmacal research*, 35(10), 1793-1801.

XiaoPing, C., Yan, C., ShuiBing, L., YouGuo, C., JianYun, L. and LanPing, L. (2009) 'Free radical scavenging of Ganoderma lucidum polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats', *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 389-393.

Xu, C., Li, C. Y.-T. and Kong, A.-N. T. (2005) 'Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics', *Archives of pharmacal research*, 28(3), 249.

Y KABIR, S KIMURA and TAMURA, T. (1988) 'Dietary effect of Ganoderma lucidum mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR)', *Journal of nutritional science and vitaminology*, 34(4), 433-438.

Yamamoto, S., Nakashima, Y., Yoshikawa, J., Wada, N. and Matsugo, S. (2011) 'Radical scavenging activity of the Japanese traditional food, amazake', *Food Science and Technology Research*, 17(3), 209-218.

Yang, Q., Wang, S., Xie, Y., Sun, J. and Wang, J. (2010) 'HPLC analysis of Ganoderma lucidum polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl-2 expression', *International journal of biological macromolecules*, 46(2), 167-172.

Yao, L. H., Jiang, Y., SHI, J., Tomas-Barberan, F., Datta, N., Singanusong, R. and Chen, S. (2004) 'Flavonoids in food and their health benefits', *Plant foods for human nutrition*, 59(3), 113-122.

Ye, L., Li, J., Zhang, J. and Pan, Y. (2010) 'NMR characterization for polysaccharide moiety of a glycopeptide', *Fitoterapia*, 81(2), 93-96.

Yeo, H. Q. and Liu, S. Q. (2014) 'An overview of selected specialty beers: developments, challenges and prospects', *International journal of food science & technology*, 49(7), 1607-1618.

Yoon, S. Y., Eo, S. K., Kim, Y. S., Lee, C. K. and Han, S. S. (1994) 'Antimicrobial activity of Ganoderma lucidum extract alone and in combination with some antibiotics', *Archives of pharmacal research*, 17(6), 438-442.

You, B.-J., Lee, M.-H., Tien, N., Lee, M.-S., Hsieh, H.-C., Tseng, L.-H., Chung, Y.-L. and Lee, H.-Z. (2013) 'A novel approach to enhancing ganoderic acid production by Ganoderma lucidum using apoptosis induction', *PloS one*, 8(1), e53616.

You, Y.-H. and Lin, Z.-B. (2002) 'Protective effects of Ganoderma lucidum polysaccharides peptide on injury of macrophages induced by reactive oxygen species', *Acta Pharmacologica Sinica*, 23(9), 787-791.

YouGuo, C., ZongJi, S. and XiaoPing, C. (2009) 'Modulatory effect of Ganoderma lucidum polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats', *Carbohydrate Polymers*, 78(2), 258-262.

Young, J. (2000) 'Functional foods and the European consumer', *SPECIAL PUBLICATION-ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY*, 248, 75-81.

Yuan, J.-F., Zhang, Z.-Q., Fan, Z.-C. and Yang, J.-X. (2008) 'Antioxidant effects and cytotoxicity of three purified polysaccharides from *Ligusticum chuanxiong* Hort', *Carbohydrate Polymers*, 74(4), 822-827.

Yuen, J. W. and Gohel, M. D. I. (2005) 'Anticancer effects of *Ganoderma lucidum*: a review of scientific evidence', *Nutrition and cancer*, 53(1), 11-17.

Zakhari, S. (1997) 'Alcohol and the cardiovascular system: molecular mechanisms for beneficial and harmful action', *Alcohol Research and Health*, 21(1), 21.

'Zakon o oglašavanju', (2016)

'Zakon o zaštiti potrošača', (2016) 6(

Zhang, H.-N., He, J.-H., Yuan, L. and Lin, Z.-B. (2003) 'In vitro and in vivo protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage', *Life sciences*, 73(18), 2307-2319.

Zhang, J., Tang, Q., Zimmerman-Kordmann, M., Reutter, W. and Fan, H. (2002) 'Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*', *Life sciences*, 71(6), 623-638.

Zhang, M., Cui, S., Cheung, P. and Wang, Q. (2007) 'Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity', *Trends in Food Science & Technology*, 18(1), 4-19.

Zhang, Q.-H. and Lin, Z.-B. (1999) 'The antitumor activity of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst.(Ling Zhi)(Aphyllophoromycetidae) polysaccharides is related to tumor necrosis factor- α and interferon- γ ', *International journal of medicinal mushrooms*, 1(3).

Zhang, Q. and Lin, Z. (1998) 'Effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides B on TNF α and IFN γ production and their mRNA expression', *Journal of Beijing Medical University*, 31(2), 179-183.

Zhang, W., Tao, J., Yang, X., Yang, Z., Zhang, L., Liu, H., Wu, K. and Wu, J. (2014) 'Antiviral effects of two *Ganoderma lucidum* triterpenoids against enterovirus 71 infection', *Biochemical and biophysical research communications*, 449(3), 307-312.

Zhang, X.-Q., Ip, F. C., Zhang, D.-M., Chen, L.-X., Zhang, W., Li, Y.-L., Ip, N. Y. and Ye, W.-C. (2011) 'Triterpenoids with neurotrophic activity from *Ganoderma lucidum*', *Natural product research*, 25(17), 1607-1613.

Zhao, H.-B., Lin, S.-Q., Liu, J.-H. and Lin, Z.-B. (2004) 'Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury', *Journal of pharmacological sciences*, 95(2), 294-298.

Zhao, J. (2007) 'Nutraceuticals, nutritional therapy, phytonutrients, and phytotherapy for improvement of human health: a perspective on plant biotechnology application', *Recent patents on biotechnology*, 1(1), 75-97.

Zhao, L., Dong, Y., Chen, G. and Hu, Q. (2010) 'Extraction, purification, characterization and antitumor activity of polysaccharides from *Ganoderma lucidum*', *Carbohydrate Polymers*, 80(3), 783-789.

Zhao, S., Ye, G., Fu, G., CHEnG, J.-X., Yang, B. B. and PEnG, C. (2011) '*Ganoderma lucidum* exerts anti-tumor effects on ovarian cancer cells and enhances their sensitivity to cisplatin', *International journal of oncology*, 38(5), 1319.

Zhao, W., Jiang, X., Deng, W., Lai, Y., Wu, M. and Zhang, Z. (2012) 'Antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and their role on DNA damage in mice induced by cobalt-60 gamma-irradiation', *Food and chemical toxicology*, 50(2), 303-309.

Zhou, L.-W., Cao, Y., Wu, S.-H., Vlasák, J., Li, D.-W., Li, M.-J. and Dai, Y.-C. (2015) 'Global diversity of the *Ganoderma lucidum* complex (*Ganodermataceae*, *Polyporales*) inferred from morphology and multilocus phylogeny', *Phytochemistry*, 114, 7-15.

Zhou, Y., Qu, Z.-q., Zeng, Y.-s., Lin, Y.-k., Li, Y., Chung, P., Wong, R. and Hägg, U. (2012) 'Neuroprotective effect of preadministration with *Ganoderma lucidum* spore on rat hippocampus', *Experimental and toxicologic pathology*, 64(7), 673-680.

Zhou, Z.-Y., Tang, Y.-P., Xiang, J., Wua, P., Jin, H.-M., Wang, Z., Mori, M. and Cai, D.-F. (2010) 'Neuroprotective effects of water-soluble *Ganoderma lucidum* polysaccharides on cerebral ischemic injury in rats', *Journal of ethnopharmacology*, 131(1), 154-164.

Zhu, H.-S., Yang, X.-L., Wang, L.-B., Zhao, D.-X. and Chen, L. (2000) 'Effects of extracts from sporoderm-broken spores of *Ganoderma lucidum* on HeLa cells', *Cell biology and toxicology*, 16(3), 201-206.

Zhu, M., Chang, Q., Wong, L. K., Chong, F. S. and Li, R. C. (1999) 'Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*', *Phytotherapy Research*, 13(6), 529-531.

Zweytick, G. and Berghofer, E. (2009) '10 Production of Gluten-Free Beer', *Gluten-Free Food Science and Technology*, 181.

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Dipl. inž. **Saša Despotović** rođen je 25.02.1980. u Lucernu republika Švajcarska. Diplomirao je 2007. godine na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, odsek za Prehrambenu tehnologiju i biohemiju, sa prosečnom ocenom tokom studiranja 8,94 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Upisao je doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu u Zemunu.

Od 2008. godine je zaposlen na Katedri za Tehnologiju konzervisanja i vrenja kao saradnik u nastavi na predmetu Tehnologija piva i slada, a od 2010. godine izabran je u zvanje i na radno mesto asistenta na predmetima Tehnologija slada i piva, uža naučna oblast Nauka o vrenju. Od 2008. godine bio je angažovan na projektu „Razvoj novih prehrambenih i dijetetskih proizvoda sa medicinskim gljivama i lekovitim biljem“, a od 2010 godine na projektima III 46001 „Razvoj i primena novih tradicionalnih tehnologija u proizvodnji konkurentnih prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću za evropsko i svetsko tržište” i TR 31020 „Razvoj tehnologije proizvodnje crvenog vina i dijetetskih proizvoda iz vina bogatih biološki aktivnim polifenolima sa kardioprotektivnim dejstvima”, kao i FP7 REGPOT projekta „Advancing research in agricultural and food sciences at Faculty of Agriculture, University of Belgrade”. Član je Udruženja mikrobiologa Srbije, Društva za ishranu Srbije, „ASBC-American Society of Brewing Chemists“ i „MBAA-Master Brewers Association of the Americas“. Jedan od osnivača i blagajnik Evropske grupe za higijenski inženjering i dizajn (EHEDG)-Srbija i suosnivač i sekretar Udruženja prehrambenih tehnologa Srbije. Objavio je preko 40 naučnih radova.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Despotović Saša

Broj indeksa TH 13/63

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

„Biohemijska i funkcionalna svojstva piva sa dodatkom

gljive *Ganoderma lucidum*“

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

Potpis autora

U Beogradu, 2017. godine

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Despotović Saša

Broj indeksa: TH 13/63

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov rada: „Biohemijska i funkcionalna svojstva piva sa dodatkom

gljive *Ganoderma lucidum*“

Mentor: Prof. dr Ida Leskošek-Čukalović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjena u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis autora

U Beogradu, 2017. godine

Izjava o korišćenju

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

„Biohemijska i funkcionalna svojstva piva sa dodatkom

gljive *Ganoderma lucidum*“

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

Potpis autora

U Beogradu, 2017. godine

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 prerada.** 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 prerada.** 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.