

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Marija P. Petrović

**DOBIJANJE NOVIH LIKERA SA
FUNKCIONALNIM SVOJSTVIMA OD
ODABRANOG LEKOVITOG,
AROMATIČNOG I ZAČINSKOG BILJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE

Marija P. Petrović

**OBTAINING NEW LIQUEURS WITH
FUNCTIONAL PROPERTIES FROM
SELECTED MEDICINAL, AROMATIC
AND CULINARY PLANTS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

Mentor:

dr Mališa Antić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Mirjana Milovanović, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Branislav Zlatković, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Predrag Vukosavljević, vanredni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Stanislava Gorjanović, viši naučni saradnik
Institut za opštu i fizičku hemiju

dr Tatjana Šolević - Knudsen, naučni saradnik
Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Mališi Antiću na ukazanoj podršci i smernicama, pruženom poverenju i slobodi u organizaciji izrade ove disertacije.

Kompaniji "Bilje Borča", na čelu sa menadžerom Radovanom Bušićem, zahvaljujem na srdačnosti, doniranim biljkama i biljnim ekstraktima.

Najiskreniju zahvalnost dugujem izuzetnoj ekipi iz Elektrohemijske laboratorije, Instituta za opštu i fizičku hemiju u Beogradu, prof. dr Desanki Sužnjević, dr Ferencu Pastoru i dr Stanislavi Gorjanović, za ogroman doprinos u izradi eksperimentalnog dela disertacije. Posebnu zahvalnost želim da izrazim dr Stanislavi Gorjanović na svesrdnom angažovanju u objavljivanju radova i pisanju same disertacije. Hvala na bezgraničnoj pomoći, idejama, interesovanju, svim dragocenim profesionalnim, ali i prijateljskim, životnim savetima, koje sam dobijala tokom višegodišnje saradnje. U daljoj karijeri, njena profesionalnost biće mi uzor koji treba slediti.

Dr Tatjani Šolević-Knudsen dugujem veliku zahvalnost za doprinos u eksperimentalnom radu i uvek spremnoj saradnji, tokom koje mi je ukazala značajnu pomoć svojim korisnim sugestijama.

Dr Latu Pezu se zahvaljujem na velikom doprinosu u statističkoj obradi rezultata, ali i za pokazanu kolegijalnost i profesionalnost, uvek ažurnim i detaljnim odgovorima na moja pitanja.

Prof. dr Predragu Vukosavljeviću dugujem posebnu zahvalnost na pomoći i smernicama, kao i na prijateljskim savetima i razgovorima punim optimizma, kojima me je hrabrio tokom izrade ove disertacije.

Dragim kolegama i prijateljima sa Katedre za tehnološku mikrobiologiju se najiskrenije zahvaljujem na doniranim mikroorganizmima, prijatnom društvu i pomoći tokom eksperimentalnog izvođenja antimikrobnih analiza. Dr Mileni Savić se od srca zahvaljujem na prijateljskoj pomoći tokom pisanja disertacije.

Katedri za ratarstvo i povrtarstvo, a posebno dr Damiru Beatoviću, koji, na našu ogromnu žalost, od nedavno više nije sa nama, želim da zahvalim na ukazanom poverenju i omogućenom pristupu Laboratoriji za lekovito bilje.

Neuporedivo najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Hvala roditeljima, koji su mi sve ovo omogućili svojom podrškom tokom celog obrazovanja. Od srca hvala sestri i suprugu na bezgraničnom strpljenju i razumevanju tokom svih ovih godina, na volji da bez izuzetka uvek saslušaju, interesuju se i posavetuju, a, iznad svega, im hvala na pružanoj ljubavi, uz koju je ovu disertaciju bilo lakše privesti cilju.

Dobijanje novih likera sa funkcionalnim svojstvima od odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja

Rezime

Likeri na bazi različitog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja potiču od nekadašnjih eliksira, koji su se tradicionalno upotrebljavali za dobrobit opšteg zdravstvenog stanja i jačanje organizma. Iako se nijedno alkoholno piće ne može svrstati u funkcionalnu hranu, zbog prisustva biljnih komponenata, koje ispoljavaju širok spektar bioloških aktivnosti, likeri na bazi lekovitog bilja se, svakako, odlikuju funkcionalnim karakteristikama. Bioaktivne komponente, koje se ekstrahuju iz biljaka tokom procesa proizvodnje, i koje doprinose funkcionalnosti ovakvih pića, mogu pripadati različitim hemijskim grupama jedinjenja, pri čemu treba izdvojiti polifenolna jedinjenja, komponente etarskog ulja, gorka i druga jedinjenja.

U ovom radu, za dobijanje biljnih likera korišćeni su vodeno-etanolni ekstrakti dvanaest odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta, koje se često koriste u industriji alkoholnih pića, a to su: nana (*Mentha piperita*), žalfija (*Salvia officinalis*), lavanda (*Lavandula officinalis*), anis (*Pimpinella anisum*), morač (*Foeniculum vulgare*), korijander (*Coriandrum sativum*), kičica (*Centaurium erythraea*), lincura (*Gentiana lutea*) pelin (*Artemisia absinthium*), iva (*Teucrium montanum*), podubica (*Teucrium chamaedrys*) i podbel (*Tussilago farfara*). Navedene biljne vrste su, u ovom istraživanju, podeljene na grupu biljaka bogatih gorkim materijama i grupu aromatičnih i začinskih biljaka. Senzorno najprihvatljivija kombinacija ekstrakata navedenog bilja u piću izabrana je primenom hedonskog testa, a sastojala se od ekstrakata iz grupe biljaka sa gorkim materijama i iz grupe aromatičnih i začinskih biljnih vrsta u odnosu 1:3, uz dodatak vode, saharoze i ostalih potrebnih aditiva. Dobijeni liker je nazvan "Biljni koktel (BK)".

S obzirom na visoku kaloričnost likera zbog prisustva znatne količine saharoze, ispitana je mogućnost zamene dela saharoze niskokaloričnim zaslađivačem prirodnog porekla, prahom steviol glikozida, koji se dobija iz biljke *Stevia rebaudiana* Bertoni. Metodom rangiranja uzoraka sa različitim udelima praha steviol glikozida, utvrđeno je da zamena 25 % ukupnog sadržaja saharoze ovim zaslađivačem ne utiče značajno na

senzorne karakteristike dobijenog likera. Samim tim, opravdana je upotreba steviol glikozida za dobijanje alkoholnih pića sa smanjenom kaloričnom vrednošću. Dobijeni liker, nazvan “Biljni koktel lajt (BKL)” je, zajedno sa BK, bio predmet daljeg istraživanja.

Kao prvi parametar funkcionalnosti dobijenih likera, ispitana je njihova antioksidativna aktivnost, pomoću četiri najčešće primenjivane spektrofotometrijske (FC, DPPH, FRAP i ABTS) i dve relativno nove polarografske (HPMC i MRAP) metode. Ustanovljeno je da oba likera ispoljavaju antioksidativnu aktivnost, koja je, na osnovu svih primenjenih metoda, bila čak višestruko superiornija u odnosu na slične komercijalne proizvode, od kojih se neki koriste kao medicinski tonici za jačanje organizma. Takođe, BKL je, prema rezultatima svih primenjenih metoda, ispoljio jaču aktivnost u odnosu na BK, na osnovu čega se zaključuje da steviol glikozidi doprinose funkcionalnosti finalnog proizvoda.

Kao drugi parametar funkcionalnosti dobijenih likera, ispitana je njihova antimikrobna aktivnost prema odabranim patogenim mikroorganizmima, mikrodilucionom metodom. Većina ovih mikroorganizama se može naći u gastrointestinalnom traktu čoveka, u koji dospevaju putem kontaminirane hrane. Oba pića su ispoljila kako inhibitorno, tako i mikrobicidno dejstvo u okviru testiranog opsega koncentracija (od 0,39 % do 50 % pića u inokulisanom bujonu). Od svih testiranih mikroorganizama, dobijena pića su ispoljila najjače delovanje na sojeve *Listeria monocytogenes* i *Rhodococcus equi*, delujući pri višestruko nižim koncentracijama u odnosu na komercijalne proizvode odabrane za poređenje. Rast nekih testiranih mikroorganizama, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sojevi, *Proteus mirabilis* i *Candida albicans*, BKL je inhibirao pri upola nižim koncentracijama u odnosu na BK, što potvrđuje pretpostavku o doprinosu glikozida stevije na funkcionalne karakteristike pića.

Posebnim delom istraživanja, primenom gore navedenih spektrofotometrijskih i polarografskih metoda, obuhvaćeno je ispitivanje antioksidativne aktivnosti vodenoo- etanolnih ekstrakata odabranih dvanaest biljnih vrsta, konstituenata dobijenih likera. Klusterskom analizom podataka, dobijenih svim primenjenim metodama, ustanovljeno je da podbel i podubica formiraju grupu biljaka sa najizraženijom antioksidativnom aktivnošću. Žalfija, iva, nana, anis i pelin spadaju u srednje aktivne komponente

dobijenih likera, dok lavanda, kičica, morač, korijander i lincura formiraju klaster sa najmanje aktivnim biljkama.

Mikrodilucionom metodom je ispitana antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata odabranih biljaka prema patogenim mikroorganizmima, čestim kontaminantima hrane, koji mogu izazvati infekcije gastrointestinalnog trakta. Biljke iz grupe aromatičnih i začinskih biljnih vrsta delovale su inhibitorno i letalno pri višestruko nižem koncentracionom opsegu u odnosu na one iz grupe sa gorkim materijama. Pod pretpostavkom da su za jaču aktivnost aromatičnih i začinskih biljaka zaslužni terpeni, koji su zastupljeni u ovim biljkama više nego u gorkim, primenom GC-MS analize, okarakterisana je isparljiva frakcija istih.

Ključne reči: biljni likeri, lekovito bilje, ekstrakti, senzorna analiza, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, isparljiva frakcija.

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Prehrambena tehnologija

UDK: 663.83:582.099(043.3)

Obtaining new liqueurs with functional properties from selected medicinal, aromatic and culinary plants

Abstract

Liqueurs, whose production is mainly based on the use of different medicinal, aromatic and culinary herbs, are the descendants of the former elixirs, traditionally used for the health benefits and body strengthening. Although alcoholic drinks cannot be classified as functional foods, due to the presence of biologically active plant components, herbal liqueurs can be considered to possess functional properties. The bioactive plant components, extracted during the production process, and contributing to the functionality of herbal drinks, belong to different groups of chemical compounds, such as polyphenolic compounds, components of essential oils, bitter compounds and others.

In this study, new herbal liqueurs were obtained using water-ethanol extracts made of twelve medicinal, aromatic and culinary herbs, often used in alcoholic beverage industry, namely: Peppermint (*Mentha piperita*), Sage (*Salvia officinalis*), Lavender (*Lavandula officinalis*), Anise (*Pimpinella anisum*), Fennel (*Foeniculum vulgare*), Coriander (*Coriandrum sativum*), Centaury (*Centaureum erythraea*), Gentian (*Gentiana lutea*), Wormwood (*Artemisia absinthium*), Mountain Germander (*Teucrium montanum*), Wall Germander (*Teucrium chamaedrys*) and Coltsfoot (*Tussilago farfara*). Selected plants were divided into the group of plants with bitter components and the group of aromatic and culinary plant species. The most sensory acceptable combination of the selected plant extracts, was chosen using hedonic test. It consisted of the bitter plants and aromatic and culinary plants in the ratio of 1:3, with addition of water, sucrose and other necessary additives. Chosen combination was named the “Herbal Cocktail (HC)”.

Furthermore, due to the presence of significant quantities of sucrose and generally high caloric value of liqueurs, the possibility of sucrose substitution with a low-calorie sweetener of natural origin, steviol glycoside, derived from the plant *Stevia rebaudiana* Bertoni, was investigated. Results, obtained using ranking method, showed that the introduction of this sweetener, as a substitute for 25 % of a total sucrose

amount, did not significantly affect the sensory properties of the final product. This finding supports the possibility of steviol glycoside powder application in the production of alcoholic beverages with reduced caloric value. Obtained liqueur, named the “Herbal Cocktail Light (HCL)”, was along with HC included in further experimental analysis.

As a first parameter related to product functionality, antioxidant activity of obtained liqueurs, using four most commonly applied spectrophotometric (FC, DPPH, FRAP and ABTS) and two relatively new polarographic (HPMC and MRAP) methods, was evaluated. It was found that both liqueurs exhibit antioxidant activity, even several times higher, as compared with selected commercial products, one of which is used as medicinal tonic for general health benefits and immune system support. According to the results of all the methods applied, HCL showed stronger antioxidant activity in comparison with HC, which lead to the assumption that steviol glycoside contributes to the functionality of the final product.

As a second indicator of the functionality, antimicrobial activity of HC and HCL against some food - borne pathogens, common causes of gastrointestinal infections, was determined using a broth microdilution method. Both beverages showed both inhibitory and microbicidal effect within tested range of concentrations (from 0.39% to 50% of the beverage in the inoculated broth). New liqueurs exhibited the strongest effect on *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*, since inhibitory concentrations were several times lower as compared with selected commercial products. “Herbal Cocktail Light” inhibited the growth of some tested pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* strains, *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*, at a twofold lower concentration than HC. Such result confirms the assumption of the steviol glycosides contribution to the beverage functional properties.

In a special part of the research, using the above mentioned spectrophotometric and polarographic methods, antioxidant activity of the selected plants water-ethanol extracts was evaluated. Cluster analysis of data obtained using all the methods applied, revealed that Coltsfoot and Wall Germander form a group of plants with the highest antioxidant activity. Sage, Mountain Germander, Peppermint, Anise and Wormwood fall into the group of moderately active plants, while Lavender, Centaury, Fennel, Coriander and Gentian form a cluster with the least active plants.

The antimicrobial activity of selected plants ethanol extracts, against common food - borne pathogens, was investigated using a broth microdilution method. Aromatic and culinary plant extracts showed effect in several times lower concentration range, as compared to plants with bitter components. With the assumption that stronger activity of aromatic and culinary plants might be influenced by the volatile terpenes, present in greater amounts in these plants than in bitter ones, GC-MS analysis was performed for characterization of the volatile fractions thereof.

Key words: herbal liqueurs, medicinal plants, extracts, sensory analysis, antioxidant activity, antimicrobial activity, volatile fraction.

Scientific field: Biotechnical Sciences

Specific scientific field: Food Technology

UDK: 663.83:582.099(043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Upotreba lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u ishrani i prehrambenoj industriji.....	3
2.2. Primena lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u proizvodnji alkoholnih pića.....	4
2.2.1. Likeri sa lekovitim, aromatičnim i začinskim biljem i njihova istorija.....	5
2.2.2. Funkcionalna svojstva biljnih likera	8
2.3. Senzorna analiza u ulozi razvoja novih proizvoda	9
2.4. Antioksidansi i njihov značaj za ljudski organizam	12
2.4.1. Lekovite, aromatične i začinske biljke kao izvor prirodnih antioksidanasa	13
2.4.1.1. Fenolna jedinjenja kao nosioci antioksidativne aktivnosti biljaka	14
2.4.1.1.1. Fenolne kiseline	16
2.4.1.1.2. Flavonoidi	17
2.5. Spektrofotometrijske i elektrohemijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti	20
2.6. Lekovite, aromatične i začinske biljke kao izvor antimikrobnih agenasa	22
2.6.1 Antimikrobne komponente biljaka i njihovo dejstvo na ćeliju mikroorganizama.....	23
2.6.1.1. Fenolna jedinjenja	24
2.6.1.2. Terpeni etarskog ulja biljaka	26
2.7. Biljne vrste odabrane za istraživanje	28
2.7.1. Biljke sa gorkim materijama.....	29
2.7.1.1. Kičica (<i>Centaurium erythraea</i> Rafn subsp. <i>erythraea</i>)	29
2.7.1.2. Lincura (<i>Gentiana lutea</i> L. subsp. <i>symphyandra</i> (Murb.) Hayek).....	30
2.7.1.3. Pelin (<i>Artemisia absinthium</i> L.)	31
2.7.1.4. Iva (<i>Teucrium montanum</i> L.)	33
2.7.1.5. Podubica (<i>Teucrium chamaedrys</i> L.)	34

2.7.1.6. Podbel (<i>Tussilago farfara</i> L.).....	35
2.7.2. Aromatične i začinske biljne vrste.....	36
2.7.2.1. Nana (<i>Mentha piperita</i> L.).....	36
2.7.2.2. Žalfija (<i>Salvia officinalis</i> L.).....	37
2.7.2.3. Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i> Mill. subsp. <i>angustifolia</i>).....	38
2.7.2.4. Anis (<i>Pimpinella anisum</i> L.).....	40
2.7.2.5. Morač (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.).....	41
2.7.2.6. Korijander (<i>Coriandrum sativum</i> L).....	43
2.8. Stevija (<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni) kao alternativni zaslađivač u prehrambenoj industriji	44
2.8.1. Steviol glikozidi.....	45
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	48
4. MATERIJAL I METODE	49
4.1. Polazni biljni materijal.....	49
4.2. Priprema ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja za dobijanje likera i određivanje antioksidativne aktivnosti	50
4.3. Priprema likera za analize	50
4.4. Senzorna analiza dobijenih i komercijalnih pića	52
4.4.1. Hedonski test	52
4.4.2. Metod određivanja magnitude	53
4.4.3. Deskriptivna senzorna analiza	54
4.4.4. Metod rangiranja.....	56
4.4.5. Metod bodovanja	56
4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti	57
4.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom Folin–Ciocalteu (FC).....	57
4.5.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	58
4.5.3. Određivanje ukupne redukujuće moći FRAP metodom.....	60
4.5.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala (TEAC metoda).....	61
4.5.5. DC polarografsko merenje antioksidativne aktivnosti	62
4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti.....	63
4.6.1 Priprema uzoraka za određivanje antimikrobne aktivnosti	63
4.6.2 Priprema kultura mikroorganizama	64
4.6.3 Bujon mikrodiluciona metoda	65

4.7. Analiza isparljive frakcije odabranih aromatičnih i začinskih biljaka.....	66
4.7.1. Izolovanje isparljive frakcije biljaka	66
4.7.2. Gasna hromatografija -masena spektrometrija (GC- MS).....	66
4.8. Poređenje i statistička obrada rezultata.....	67
5. REZULTATI I DISKUSIJA.....	68
5.1. Dobijanje likera od odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta...68	
5.1.1. Senzorna ocena dobijenih likera.....	73
5.2. Antioksidativna aktivnost dobijenih likera i poređenje sa komercijalnim pićima	75
5.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih i komercijalnih pića.....	75
5.2.2. Polarografsko određivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih i komercijalnih pića	77
5.2.3. Poređenje rezultata spektrofotometrijskog i polarografskog određivanja antioksidativne aktivnosti pića	81
5.2.3.1. Korelaciona analiza dobijenih podataka	81
5.2.3.2. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti i koeficijent fenolne antioksidativne aktivnosti pića.....	82
5.2.3.3. Klusterska analiza dobijenih podataka	83
5.3. Antimikrobna aktivnost dobijenih likera i poređenje sa komercijalnim pićima	85
5.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta	90
5.4.1. Spektrofotometrijsko i polarografsko određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja	90
5.4.2. Poređenje rezultata spektrofotometrijskog i polarografskog određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata	94
5.4.2.1. Korelaciona analiza dobijenih podataka	94
5.4.2.2. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti i koeficijent antioksidativne aktivnosti fenola ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja.....	95
5.4.2.3. Klusterska analiza dobijenih podataka	97
5.5. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta	98
5.5.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka sa gorkim materijama	98

5.5.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih aromatičnih i začinskih biljaka	102
5.6. Sastav isparljive frakcije odabranih aromatičnih i začinskih biljnih vrsta	107
5.6.1. Nana.....	108
5.6.2. Žalfija.....	109
5.6.3. Lavanda	110
5.6.4. Anis.....	112
5.6.5. Morač.....	113
5.6.6. Korijander.....	114
6. ZAKLJUČCI	115
7. LITERATURA	118

1. UVOD

Iako konzumacija alkoholnih pića obično ima negativnu konotaciju, smatra se da u preporučenim količinama ona treba da bude sastavni deo zdrave ishrane. Neki podaci čak ukazuju na to da se kod odraslih, koji umereno konzumiraju alkohol, javlja niža stopa oboljevanja od srčanih bolesti u poređenju sa onima koji ga ne konzumiraju uopšte (US Department of Health and Human Services i US Department of Agriculture, 2005). Ako piće, uz to, sadrži i bioaktivne komponente, kao npr. antioksidanse, može mu se pripisati efekat koji važi za vina tzv. francuski paradoks. Uprkos vrlo rasprostranjenoj konzumaciji vina među Francuzima, kod ove nacije je primećena znatno manja stopa srčanih bolesti nego kod drugih zapadno - evropskih zemalja.

Jaka alkoholna pića se proizvode destilacijom fermentisane baze koja može biti različitog porekla, dok se u likere dodaju i aromatične komponente kao što su voće, lekovito, aromatično i začinsko bilje, orašasti plodovi itd. Svi likeri sadrže zaslađivač koji je u najvećem broju slučajeva saharoza. Biljke svojim karakterističnim ukusom i aromom doprinose bukeu pića, kao jednom od najvažnijih faktora uživanja pri konzumiranju (Veljković i Stanković, 2003). Elikisiri, koji su se tradicionalno upotrebljavali za dobrobit opšteg zdravstvenog stanja, što se delimično zadržalo i do danas, su preteča ovakvih pića na biljnoj bazi. Zato, iako nijedno alkoholno piće ne možemo svrstati u funkcionalno piće, slobodno se može konstatovati da biljni likeri imaju funkcionalna svojstva. Među najčešće korišćenim lekovitim, aromatičnim i začinskim biljnim vrstama u proizvodnji alkoholnih pića su kičica (*Centaurium erythraea*), lincura (*Gentiana lutea*), pelin (*Artemisia absinthium*), iva (*Teucrium montanum*), podubica (*Teucrium chamaedrys*), podbel (*Tussilago farfara*), nana (*Mentha piperita*), žalfija (*Salvia officinalis*), lavanda (*Lavandula officinalis*), anis (*Pimpinella anisum*), morač (*Foeniculum vulgare*) i korijander (*Coriandrum sativum*), uvršćene u ovo istraživanje.

Funkcionalna svojstva pića na biljnoj bazi potiču od bioaktivnih komponenata, kao npr. fenolnih jedinjenja (polifenola), etarskih ulja, gorkih i drugih jedinjenja, koja se ekstrahuju iz bilja tokom procesa proizvodnje. Bioaktivne komponente su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka. Kao takve, nisu esencijalne za rast i razvoj, već imaju ulogu u odbrani od patogena i drugih spoljašnjih uticaja. Delujući na fiziološke

procesu u organizmu, ove biljne komponente mogu doprineti poboljšanju celokupnog zdravlja čoveka. One ispoljavaju niz bioloških aktivnosti, između ostalog antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost (Aaby et al., 2004; Cai et al., 2004). Delujući protiv štetnog uticaja slobodnih radikala, lekovite biljke imaju značajnu ulogu u prevenciji i borbi protiv kancera, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze, neurodegenerativnih i drugih poremećaja. Primena antimikrobne moći lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja datira još iz perioda kada se nije znalo za postojanje mikroorganizama. Ljudi su upotrebljavali biljke protiv zaraznih bolesti koje su kroz vekove pogadale čovečanstvo, kao, na primer, za vreme epidemija kuge, kolere, tifusa itd. Ova primena ostala je utemeljena i do danas, kao sastavni deo tradicionalnog načina lečenja bolesti (Rios i Recio, 2005). Prepoznato kao riznica prirodnih antioksidanasa i antimikrobnih agenasa, lekovito, aromatično i začinsko bilje dobija sve važniju ulogu u ishrani čoveka, predstavljajući izuzetno aktuelnu temu kako u nauci, tako i u prehrambenoj industriji.

Imajući u vidu globalno sve prisutniji problem gojaznosti i za nju vezane zdravstvene probleme, u prehrambenoj industriji sve češće se plasiraju novi proizvodi u kojima je deo saharoze zamenjen niskokaloričnim zaslađivačem. Pri tome, zbog potreba savremenog potrošača za prirodnom namirnicom, zaslađivači na prirodnoj bazi dobijaju prednost u odnosu na veštačke, tipa aspartama, ciklamata i acesulfama. Jedan od izvora ovakvih, alternativnih zaslađivača je biljka stevija (*Stevia rebaudiana* Bertoni), poznata po svojim slatkim glikozidima. Dodatno, osim slasti ovi glikozidi ispoljavaju i niz bioloških aktivnosti, među kojima su i antioksidativna i antimikrobna. Na tržištu se mogu naći bezalkoholna pića, konditori i drugi prehrambeni proizvodi sa steviol-glikozidom, kao najzastupljenijim slatkim glikozidom izolovanim iz stevije. Pretraživanjem tržišta alkoholnih pića, zaključuje se da je njena primena, ipak, još uvek oskudna. S obzirom da su likeri, zbog značajne količine šećera, pića bogata kalorijama, ispitivanje mogućnosti primene prirodnog zaslađivača, konkretno poreklom iz stevije, je jedan od ciljeva ovog istraživanja. Zamena saharoze niskokaloričnim zaslađivačem predstavlja interesantan izazov i sa aspekta poboljšanja biološke aktivnosti, kao pokazatelja funkcionalnosti, ali i sa aspekta senzorne prihvatljivosti finalnog proizvoda.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Upotreba lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u ishrani i prehrambenoj industriji

Upotreba lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u ljudskoj ishrani datira još iz antičkog doba. Postoje dokazi da su se ove biljke koristile u ishrani u starom Egiptu, Mesopotamiji, Kini, Indiji i antičkoj Grčkoj. Lovci su nekada lovinu umotavali u lišće biljaka da bi joj produžili rok trajanja, i slučajno otkrili da ovaj postupak čini meso ukusnijim. Iako stare civilizacije nisu razlikovale koje se biljke koriste kao začini, a koje u terapeutske svrhe, postoje dokazi da su ljudi i tada bili upoznati sa pozitivnim efektima začinskog bilja na zdravlje. Tako, na primer, iz nekih izvora se saznaje da su radnici gradeći egipatske piramide konzumirali crni i beli luk, u cilju jačanja organizma, dok su se u srednjem veku cimet, origano i crni luk koristili u borbi protiv širenja epidemije kuge. U Evropu su začini u srednjem veku stizali iz Azije. Usled kontrole mediteranskih trgovačkih puteva od strane Venecije, tadašnje dominantne vojne i ekonomske sile, bili su nerazumno skupi. Njihova komercijalna vrednost je bila uporediva sa vrednošću zlata i dragog kamenja, tako da je njihovo korišćenje bila privilegija malog broja, veoma imućnih ljudi (Raghavan, 2006). Vremenom su začini postajali sve dostupniji i u Evropi, a u ishrani su se koristili za intenzivniji, tzv. "začinjen" ukus, ali i kao eliksiri o čijoj se lekovitosti saznavalo iz starih arapskih spisa. Danas se mnoštvo različitih začina i lekovitih biljaka gaji širom sveta. Zahtevi potrošača po pitanju kvaliteta hrane rastu, pri čemu se od procesuirane hrane očekuje da bude što prirodnijeg porekla. Zato krajem prošlog i početkom ovog milenijuma lekovito, aromatično i začinsko bilje više nego ikada dobija na značaju u prehrambenoj industriji, i to u proizvodnji:

1. začina;
2. prehrambenih aditiva, koji su sve aktuelniji kao zamena za veštačke aditive, a zbog bogatstva u antimikrobnim komponentama i pigmentima, najviše se koriste za proizvodnju konzervanasa i boja;
3. funkcionalne hrane;
4. u industriji alkoholnih pića.

2.2. Primena lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u proizvodnji alkoholnih pića

Primena lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja u proizvodnji alkoholnih pića, takođe, potiče iz antičkog doba, sa područja Mediterana, kada se došlo na ideju njihove maceracije u vinu. Veruje se da je Hipokrat, u nameri da iskoristi tonična i digestivna svojstva pelina, bio među prvim tvorcima ovakvog, aromatizovanog vina, preteče današnjeg vermuta. Nekoliko vekova kasnije, etil alkohol je prepoznat kao dobar rastvarač za ekstrakciju isparljivih i drugih jedinjenja iz lekovitih i aromatičnih biljaka. Vremenom, sa menjanjem zahteva potrošača i tržište biljnih alkoholnih pića se širi, uvode se razne novine, pri čemu lekovite biljke igraju važnu ulogu u njihovoj proizvodnji.

Alkoholna pića, u čijoj proizvodnji se koristi lekovito, aromatično i začinsko bilje su: biteri, likeri, aromatizovana vina i rakije, vermut, džin, piva itd. (Veljković i Stanković, 2003; Tonutti i Liddle, 2010). Biljkama se obično podešava miris i ukus, a boja se tonira (Nikićević i Tešević, 2009). Pored senzornih karakteristika, biljke poboljšavaju i funkcionalnost proizvoda.

U pripremanju alkoholnih pića najčešće se koriste osušeni delovi lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta, ali i biljni izolati kao što su etarska ulja i alkoholni ekstrakti, destilati a ređe i infuzije. Tako, na primer, biljke se mogu dodavati u voćne i groždane rakije uglavnom u obliku macerata, destilata ili etarskih ulja. Ovakve obogaćene rakije, kojima je antioksidativna aktivnost unapređena i do nekoliko puta (Pecić et al., 2012), na tržištu su poznate kao travarice. Može se upotrebiti cela biljka ili njeni delovi: nadzemni deo, lišće, cvetovi, plodovi, seme ili koren, češće u osušenom nego u svežem stanju. Često se kombinuje više biljaka ili njihovih delova. Jedna biljka može biti glavni sastojak, dok ostale služe za korekciju mirisa, ukusa, boje ili su nosioci određenih farmakoloških i fitoterapeutskih, ili, jednom rečju, funkcionalnih svojstava pića (Tonutti i Liddle, 2010; Nikićević i Tešević, 2009).

Recepti za proizvodnju ovakvih alkoholnih pića, koji potiču od naših predaka, prenosili su se sa kolena na koleno. Danas su oni adaptirani tako da odgovaraju ukusu savremenih potrošača. Na primer, vermut je nekada bio gorak, da bi, vremenom, sladak i aromatičan karakter zamenio gorčinu.

Lekovito, aromatično i začinsko bilje igra važnu ulogu i u novim trendovima u proizvodnji alkoholnih pića. Tako, na primer, mogućnost dodatka ekstrakata ili delova biljaka, kao funkcionalnih komponenata u pivo, je u velikoj meri izučavano poslednjih godina. Ustanovljeno je da je antioksidativna i antimikrobna aktivnost ovakvih piva znatno poboljšana (Leskošek-Čukalović et al., 2010; Đorđević et al., 2015). Slično, biljni ekstrakti su dodavani u cilju poboljšanja funkcionalnosti vodke i vina (Lin et al., 2004).

2.2.1. Likeri sa lekovitim, aromatičnim i začinskim biljem i njihova istorija

Prema Zakonu o jakim alkoholnim pićima (*"Sl. glasnik RS", br. 92/2015*), liker je jako alkoholno piće koje:

- 1) sadrži najmanju količinu šećera, izraženu kao invertni šećer, i to:
 - a) 70 g/L - za liker od trešnje/višnje kod kojeg etil alkohol potiče isključivo od rakije od trešnje/višnje,
 - b) 80 g/L - za liker od lincure ili slične likere pripremljene od lincure ili sličnog bilja kao jedinom aromatičnom supstancom,
 - c) 100 g/L - za sve ostale likere;
- 2) je proizvedeno aromatizovanjem etil alkohola poljoprivrednog porekla ili destilata poljoprivrednog porekla ili jednog ili više jakih alkoholnih pića ili njihovih mešavina, zaslađeno i sa dodatkom proizvoda poljoprivrednog porekla ili prehrambenih proizvoda poput pavlake, mleka ili drugih mlečnih proizvoda, voća, vina ili aromatizovanog vina, u skladu sa posebnim propisom.

Zakon propisuje minimalnu alkoholnu jačinu likera od 15 % vol.

Likeri na bazi lekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka su, zbog prisustva gorkih biljaka, poznati na tržištu i kao gorki biljni likeri. Tržište je bogato raznim "kreacijama" biljnih likera i bitera, sa 25, 32, 56, pa čak i 130 vrsta biljaka.

Današnji biljni likeri su preteča nekadašnjih tzv. kordijala, alkoholnih ekstrakata lekovitih biljaka, korišćenih isključivo u vidu preparata za poboljšanje opšteg psiho-fizičkog stanja, kao i za lečenje nekih bolesti (Day, 2015). Recepti za ova pića nalaženi su u egipatskim grobnicama i u rukopisima, koji potiču još iz vremena antičke Grčke. Prvi biljni liker u Evropi su proizveli italijanski kaluđeri tokom 13. veka. Oni su

alkoholom ekstrahovali lekovita jedinjenja iz biljaka, koje su gajili u svojim baštama zbog dobro poznatih terapijskih efekata (slika 2.1.).



Slika 2.1. Počeci proizvodnje današnjih biljnih likera

Nekadašnji biljni likeri, za koje se verovalo da mogu lečiti ili sprečiti nastanak bolesti, bili su skoro uvek gorkog ili kiselog, generalno neprijatnog ukusa, i nisu se koristili kao pića za uživanje. Tokom otkrivanja novih delova Sveta i njihove kolonizacije, otkriveni su i mnogi začini i voće, za koje se do tada nije znalo i koji su sada već bili dostupni po nižim cenama. Tokom 18. veka, nakon osnivanja evropskih kolonija u Južnoj Americi, gde se gajila šećerna repa, šećer postaje sve jeftiniji, a njegova upotreba sve rasprostranjenija u svetu. Tada počinje i istorija likera kao pića za uživanje. Likeri su se pravili, još uvek, samo u okviru monaških redova, a primena u medicinske svrhe zadržala se sporadično i tokom 18. veka. Na primer, liker za koji se pretpostavlja da je sadržao muskantni oraščić, karanfilić, koru limuna i pomorandže, šećer i brendi, preporučivao se kao lek za skorbut, bolest uzrokovanu nedostatkom vitamina C. Svetski poznat komercijalni biljni liker, Chartreuse (Šartrez), koji se proizvodi u destilerijama istoimenog manastira, potiče još iz 1605. godine. Prvobitni recept za njegovu pripremu bio je, zapravo, jedan stari rukopis pod imenom “*Eliksir za dug život*”, koji potiče iz manastira Chartreuse, u francuskim Alpima nadomak Pariza, po kome je mnogo kasnije ovaj liker i dobio ime. Veruje se da je rukopis delo jednog alhemičara, iskusnog travara i tvorca savršeno harmonične mešavine 130 biljaka u vidu tonika. Rukopis, međutim, niko nije uspeo da u potpunosti protumači sve do 1737. godine, kada ga je apotekar manastira La Grande Chartreuse, koji se nalazi blizu Grenobla, konačno dešifrovao i otkrio praktičnu formulu za pripremanje *Eliksira*. Prvobitno je *Eliksir* sadržao 69 % alkohola i koristio se kao lek, da bi nekoliko decenija

kasnije sadržaj alkohola smanjen, kako bi se dobilo piće za uživanje, komercijalno poznato kao zeleni (55 %) ili žuti Šartrez (40 %) (Green Chartreuse i Yellow Chartreuse) (Newton, 2013; Smith i Kraig, 2013; Tonutti i Liddle, 2010).



Slika 2.2. Manastir La Grande Chartreuse i destilerija u vlasništvu manastira u kojoj se i danas proizvodi poznati liker - Chartreuse

Pored Chartreuse, na tržištu se mogu naći stotine likera raznih brendova. Iza francuskog likera Benedictine-a, takođe stoji duga i interesantna istorija. Recept za ovaj liker potiče iz 16. veka, kada je monah i alhemičar iz benediktinskih redova - Dom Bernardo Vinčeli (*Dom Bernardo Vincelli*) napravio kombinaciju od 27 lekovitih i začinskih biljaka, u formi eliksira za dug život i zaštitu od malarije. Nekoliko vekova kasnije, 1863. godine, Aleksandar le Grand, trgovac i kolekcionar religijskih umetničkih dela, u svojoj kolekciji otkriva izgubljeni recept za ovaj eliksir. Nakon nekoliko pokušaja, uspeva da preformuliše recept, da bi dobio novo piće za uživanje, liker Benedictine (slika 2.3.), koji, u neobičnoj i elegantnoj boci, doživljava veliki uspeh nakon plasiranja na tržište. Balans između gorkih i aromatičnih biljaka, kao i kod Šartrez likera, postignut je odležavanjem u hrastovim buradima (Tonutti i Liddle, 2010).



Slika 2.3. Svetski poznati biljni likeri

2.2.2. Funkcionalna svojstva biljnih likera

Pored toga što pružaju uživanje pri konzumiranju, biljni likeri poseduju niz bioloških aktivnosti, koje potiču od lekovitih biljaka. Iako je poznato da prekomerno konzumiranje alkoholnih pića dovodi do stvaranja hidroksil radikala, za koje postoje dokazi da mogu izazvati oštećenja jetre kod alkoholičara (Albano et al., 1996), i zbog čega se alkoholna pića ne mogu svrstati u funkcionalnu hranu, ipak, može se reći da likeri na bazi biljaka poseduju određena funkcionalna svojstva. Bioaktivni sastojci biljnih likera obuhvataju različite grupe hemijskih jedinjenja, kao što su polifenoli, isparljivi terpeni i druge biljne komponente. Polifenoli doprinose antioksidativnoj aktivnosti pića, i posebna pažnja im je posvećena u mnogim istraživanjima (Heinonen et al., 1998; Vacca et al., 2003; Alamprese et al., 2005; Lee et al., 2005; Gorjanović et al., 2010c; Li et al., 2011; Komes et al., 2012). Kada bi likeri na biljnoj bazi bili tipični za neku naciju, ili drugu veću socijalnu grupu, kao što su vina pečat francuske tradicije, verovatno bi im se, zahvaljujući prisustvu polifenola, mogao pripisati efekat, sličan onom koji važi za vina, poznat kao francuski paradoks. Ovaj paradoks neki tumače upravo kroz jaku antioksidativnu aktivnost (Xia et al., 1998). Funkcionalnost likera sa lekovitim biljkama ogleda se i kroz ispoljavanje značajne *in vitro* antimikrobne aktivnosti (Karabegović et al., 2012), koja potiče od terpena i drugih biljnih komponenata.

Pored navedenog, gorkim biljkama koje se koriste za pripremanje likera, pripisuje se pozitivna uloga u ljudskom metabolizmu (Veljković i Stanković, 2003; Vukosavljević et al., 2009; Karabegović et al., 2012). Poznato je da gorka pića mogu podstaći apetit i poboljšati varenje ukoliko se konzumiraju pre (kao aperitivi) ili posle jela (kao digestivi). Ovaj običaj potiče još iz doba Rimljana, koji su upotrebljavali vino, macerirano gorkim biljkama, kako bi stimulisali apetit i poboljšali varenje hrane. Istraživanje kompleksnih biljnih bitera počela su početkom prošlog veka, kada je ustanovljeno da njihova oralna upotreba doprinosi pojačanom lučenju pljuvačke i želudačnih sokova tokom jela. Ideja o apetitu podstaknutom konzumiranjem gorkih pića naučno je potkrepljena dokazom da receptori gorkog ukusa postoje i u gastrointestinalnom traktu (GIT), a ne samo u usnoj duplji. Stimulisanje ovih receptora izaziva jedan vid stresa u probavnim organima, koji reaguju lančanim reakcijama

lučenja pljuvačke, produkcije hormona gladi, lučenja enzima i kiselina, podstičući efikasnije varenje hrane (Janssen et al., 2011). Takođe, naučno je dokazano da je posle obroka intenzitet apsorpcije alkohola u organizmu smanjen, a njegova eliminacija iz krvi brža (Ramchandani et al., 2001). Biljne komponente koje piću daju gorčinu mogu poticati iz različitih grupa jedinjenja, kao, na primer, sekoiridoidnih glikozida (npr. genciopikrin i sverciamarin kod rodova *Gentian* i *Centaureum* kojima pripadaju lincura i kičica), alkaloida (npr. berberin i kofein), seskviterpenskih laktona (npr. absintin iz pelina), flavonoida, saponina itd. (Snow i Spelman, 2011).

Aromatične i začinske biljke u sastavu likera, takođe, povoljno utiču na funkcije GIT. U GIT, postoje receptori osetljivi na aromatične supstance, što objašnjava ulogu aromatičnog bilja u tradicionalnom lečenju probavnih poremećaja (Si et al., 2006; Braun et al., 2007; Hawrelak et al., 2009; Snow i Spelman, 2011; Thompson et al., 2013). Aromatične komponente su nisko molekularne, lipofilne supstance, koje, kao takve, lako stižu do olfaktornih receptora u nosu. Kompleksna i heterogena mešavina aromatičnih jedinjenja čini etarsko ulje biljke, sa najzastupljenijim monoterpenima (npr. timol, 1,8-cineol), seskviterpenima (npr. kariofilen, bisabolol) i fenilpropanoidima (npr. eugenol, cinamaldehyd). Ove komponente biljnih likera podstiču probavne funkcije, oslobađajući od nadutosti i drugih neprijatnih stanja i održavajući balans prirodne crevne mikroflore, a što se dalje, povezuje sa antimikrobnim delovanjem na patogene mikroorganizme u GIT. U prilog tome ide i podatak koji govori da se poznato alkoholno piće "Absinth" (Absint), koje sadrži morač (*Foeniculum vulgare* Mill.), pelin (*Artemisia absinthium* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.) a često i matičnjak (*Melissa officinalis* L.), sitan pelin (*Artemisia pontica* L.) i izop (*Hyssopus officinalis* L.), krajem 18. veka koristilo kao lek protiv grčeva, izazvanih iritabilnim sindromom creva i dizenterije, što se, opet, dovodi u vezu sa antimikrobnim delovanjem pića (Thompson et al., 2013).

2.3. Senzorna analiza u ulozi razvoja novih proizvoda

Senzorne karakteristike proizvoda spadaju u najznačajnije parametre kvaliteta prehrambenih proizvoda. Savremeni potrošač očekuje ne samo da proizvod zadovolji njegove nutritivne potrebe, već i da mu priušti uživanje tokom njegovog konzumiranja. Iako danas tehnologija brzo napreduje, omogućavajući čak i elektronsku identifikaciju

ukusa i mirisa, pomoću instrumenata kao što su elektronski “jezik” i elektronski “nos”, najčešće i najpouzdanije se senzorna analiza hrane i pića izvodi uz primenu ljudskih čula. Senzorna analiza je, dakle, nauka o merenju i vrednovanju svojstava namirnica sa jednim ili više ljudskih čula. U zavisnosti od vrste ispitivanja, ocenjivači koji se biraju za senzornu analizu hrane su uglavnom (Grujić, 2015): neiskusni ocenjivači (laici u senzornim ispitivanjima – potrošači koji nisu imali obuku za senzornu analizu), obučeni ocenjivači i eksperti u oblasti senzornih ispitivanja.

Važnija senzorna svojstva prehrambenih proizvoda koja se ocenjuju tokom senzorne analize su:

- vizuelne karakteristike koje se odnose na izgled proizvoda, kao što su: boja, veličina, površinska tekstura, bistrina (Lawless i Heymann, 2010),
- olfaktorne karakteristike podrazumevaju miris, odnosno aromu koje potiču od isparljivih jedinjenja u proizvodu,
- gustativne karakteristike proizvoda se odnose na percepcije koje potiču od rastvorljivih supstanci u ustima. U osnovne ukuse spadaju slatko, gorko, kiselo, slano i umami (koji potiče od nadražaja receptora na jeziku za L-glutamat). Može se ocenjivati i naknadni ukus, koji predstavlja olfaktorni osećaj, koji se javlja posle uklanjanja proizvoda, i koji se razlikuje od osećaja opaženih dok je proizvod u ustima.

Složena kombinacija olfaktornih i gustativnih karakteristika, i hemijskih osećaja čini multisenzornu komponentu - tzv. “flejvor” (*engl.* flavour), što bi se na naš jezik naprikladnije prevelo kao “ukusnost“ proizvoda (Meilgaard et al., 2006). Hemijski osećaji nastaju kao posledica nadražaja trigeminalnih nerava, raspoređenih u sluzokoži usta, nosa i očiju, a ispoljavaju se kao osećaj ljutine, osećaj skupljanja sluzokože u ustima (trpkosti), hlađenja, grejanja itd.

Jedan od najvažnijih primera primene senzorne analize u prehrambenoj industriji, kao i na polju naučnog ispitivanja hrane, je projektovanje i razvoj novih proizvoda. U narednom tekstu, opisane su metode senzorne analize, koje se u ovim prilikama primenjuju.

Kvantitativna deskriptivna analiza služi za identifikaciju i kvantitativno merenje intenziteta senzornih svojstava koja karakterišu proizvod, čime se dobija njegov kompletan senzorni profil. Za sprovođenje deskriptivne senzorne analize, obično se

angažuje 8 do 12 ocjenjivača, a ponekad i više (20 do 30 ocjenjivača, prema ISO 13299:2003) (Grujić, 2015).

Testom prihvatljivosti ocenjuje se stepen u kome se ponuđeni proizvod dopada ispitivanoj grupi potrošača ili ne (Lawless i Heymann, 2010). Ovaj oblik testiranja potrošača može se primenjivati na proizvode pojedinačno, bez međusobnog poređenja proizvoda. Najčešće korišćena skala je devetodelna hedonska skala, koja prikazuje stepen od neprihvatljivog do prihvatljivog, ili od nedopadanja do dopadanja.

Test preferencije služi da potrošači izaberu jedan između dva ili više proizvoda. Kao jedan od testova preferencije, primenjuje se rangiranje uzoraka po opštem utisku ili određenom svojstvu, pri čemu se uzorci poređaju u uređeni niz prema stepenu dopadanja. Svakom od uzoraka dodeljuje se odgovarajuća numerička vrednost (od 1 do n), odnosno rang (Choonhahirun, 2006; Lawless i Heymann, 2010:165; Arrieta-Garay et al., 2014; Tomić, 2015).

Metod bodovanja se zasniva na oceni ukupnog kvaliteta proizvoda, preko pojedinačnih svojstava, na osnovu poređenja sa karakteristikama nekog referentnog proizvoda, izabranog kao idealnog. Po pravilu, nema direktnog poređenja uzoraka, već se ispitivani proizvod upoređuje sa „standardnim“ proizvodom (slika idealnog proizvoda koju ocjenjivač ima u glavi), preko kojeg se definiše ukupan kvalitet ispitivanog proizvoda (Tomić, 2015). Primena je uspešna u onim situacijama kada među panelistima postoji jedinstven zajednički stav o tome šta je dobar kvalitet, tako da metoda iziskuje eksperte za ispitivanu vrstu proizvoda. Pre početka ispitivanja, potrebno je definisati koja su to pojedinačna svojstva preko kojih će se ocenjivati ukupan kvalitet, bodovni opseg u okviru kojeg će se ona bodovati i razliku između njihovog uticaj na ukupni kvalitet (npr. uvođenjem koeficijenta važnosti).

Metod određivanja magnitude se koristi prilikom poređenja intenziteta odabranog svojstva kod više proizvoda, pri čemu se intenzitetu čulnog nadražaja pripisuje brojna vrednost (ISO 11056:1999; Lawless i Heymann, 2010:156).

2.4. Antioksidansi i njihov značaj za ljudski organizam

Antioksidansi su supstance koje odlažu, sprečavaju ili uklanjaju oksidativno oštećenje na ciljnom molekulu (Halliwell i Gutteridge, 2007), boreći se protiv slobodnih radikala. Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji u spoljašnjoj orbitali poseduju jedan ili više nesparenih elektrona. Sve slobodne radikale karakteriše izuzetno velika reaktivnost, što je rezultat njihovog nastojanja da popune valentnu orbitalu, spare nesparesni elektron i postignu stabilnu konfiguraciju. U organizmu nastaju u toku procesa disanja, usled mentalnog stresa i iscrpljenosti organizma, infekcija, kancera, dok su egzogeni izvori zagađen vazduh i voda, štetne navike (pušenje, droge i alkoholizam), teški i prelazni metali, lekovi, zračenje, hrana (pesticidi, veterinarski lekovi, aditivi, jedinjenja nastala preradom hrane na visokim temperaturama itd.) (Pham-Huy, 2008). Prekomerno stvaranje slobodnih radikala dovodi do redoks disbalansa u organizmu i oksidativnog stresa. Oksidativno oštećenje dalje uzrokuje promene u strukturi ćelija, tkiva i organa. Ova oštećenja su povezana sa procesom starenja i velikim brojem bolesti, kao što su kardiovaskularne i infektivne bolesti, maligne bolesti, dijabetes, neurološki poremećaji itd. (B. Halliwell i Gutteridge, 2007; Gupta i Verma, 2010). U hrani, slobodni radikali reaguju sa drugim jedinjenjima, kao što su pigmenti, vitamini i proteini, i tako utiču na biološku i nutritivnu vrednost namirnica, ograničavajući njen rok trajanja (Frankel, 1984).

Biohemijski su najznačajniji reaktivni oblici kiseonika (Reactive Oxygen Species – ROS), kojima pripadaju radikali kiseonika tipa superoksid anjon ($O_2^{\bullet-}$), peroksid radikal (RO_2^{\bullet}), hidroksi- radikal (OH^{\bullet}), kao i neutralni molekuli velike reaktivnosti – vodonik peroksid (H_2O_2), hipohloritna kiselina ($HOCl$), singletni kiseonik (1O_2), ozon (O_3). U slobodne radikale se takođe ubrajaju i reaktivni oblici azota (Reactive Nitrogen Species -RNS), kojima pripadaju radikali tipa azot- monoksid (NO^{\bullet}), azot- suboksid (N_2O^{\bullet}), peroksinitrit (NO_2O^{\bullet}), nitrozilni katjon (NO^+) (Gupta i Verma, 2010). Nesparesni elektroni se mogu nalaziti i na C – atomu, kao kod alkil radikala (CH_3^{\bullet} , $CH_3CH_2^{\bullet}$), na S- atomu ($n-C_6H_5S^{\bullet}$), atomu vodonika (H^{\bullet}), halogena (Cl^{\bullet}), alkalnog metala (Na^{\bullet}) i nekim jonima metala (Cu^{2+} , Fe^{3+}) (Piletić et al., 1992).

Antioksidansi u biološkim sistemima deluju na više načina: tako što sprečavaju stvaranje novih slobodnih radikala prekidanjem lančanih reakcija (tzv. *chain breakers*),

uklanjaju (“vezuju”) stvorene slobodne radikale prevodeći ih u stabilniji oblik (tzv. *scavengers*), deluju kao redukciona sredstva i prevode vodonik peroksid u stabilna jedinjenja, eliminišu dejstvo singlet kiseonika, inhibiraju dejstvo prooksidativnih enzima, deluju sinergistički sa ostalim antioksidansima, izoluju jone metala koji učestvuju u reakcijama stvaranja inicijacije oksidacije lipida itd. (Pokorný et al., 2001; Vaya i Aviram, 2001; Pićurić-Jovanović i Milovanović, 2005; Alessio, 2006; Lobo, 2010). Neki enzimski antioksidansi imaju sposobnost “popravke” ili eliminacije biomolekula oštećenih dejstvom slobodnih radikala (Gupta i Verma, 2010). Pored toga, mogu da podstiču biosintezu drugih antioksidanasa ili odbrambenih enzima (Machlin i Bendich, 1987; Gupta i Verma, 2010: 58).

Usled različitih spoljnih agenasa, oslabljenog imunog sistema i patoloških stanja u organizmu, kao što su bolesti, prirodna odbrambena sposobnost organizma da se bori protiv štetnog dejstva slobodnih radikala nije uvek dovoljno efikasna. Zato se preporučuje unos antioksidanasa, kako bi se ili smanjilo ili izbeglo oksidativno oštećenje, izazvana dejstvom reaktivnih radikalskih vrsta (Pietta, 2000; Gupta i Verma, 2010). Pri tome, prirodni antioksidansi dobijaju sve veći značaj u odnosu na sintetičke, koji se čak smatraju kancerogenim (Chandra et al., 2014). Takođe, ističe se i prednost unošenja mešavine antioksidativnih komponenti nad pojedinačnim. Kombinacija prirodnih antioksidanasa u voću, povrću i lekovitim biljkama omogućava njihovo sinergističko dejstvo i pruža efikasnu odbranu od oksidativnog stresa (Gilgun-Sherki et al., 2002; Poljsak, 2011).

2.4.1. Lekovite, aromatične i začinske biljke kao izvor prirodnih antioksidanasa

Antioksidansi u biljkama su nastali tokom evolucije, u cilju zaštite biljne ćelije od oksidativnog stresa. Iako korišćenje lekovitog bilja u ishrani čoveka potiče od davnina, tek sredinom prošlog veka objavljeni su prvi rezultati istraživanja, koji opisuju sposobnost inhibiranja oksidacije ulja i masti od strane 32 začinske biljke, koje se tradicionalno koriste u ishrani čoveka (Chipault et al., 1952). Tada je prvi put dokazan visok antioksidativni potencijal origana, ruzmarina, majčine dušice, žalfije, karanfilića itd. Tek kasnije, opisana je izolacija i identifikacija antioksidativnih jedinjenja iz začina i lekovitog bilja (Loliger et al., 1989). Rezultati jednog istraživanja, u koje je uključeno više od 3000 namirnica i dodataka ishrani, podeljenih u više kategorija, pokazuju da je

kategorija “lekovito i začinsko bilje” na prvom mestu po ukupnom antioksidativnom kapacitetu (Carlsen et al., 2010).

Lekovito, aromatično i začinsko bilje obezbeđuje širok spektar antioksidanasa, kao što su fenolne komponente (fenolne kiseline, flavonoidi, hinoni, kumarini, lignani, stilbeni, tanini itd.), azotna jedinjenja (alkaloidi, amini, betalaini itd.), vitamini, terpenoidi (uključujući karotenoide), sumporna organska jedinjenja (indoli, izotiocijanati) kao i neki endogeni metaboliti (Uttara et al., 2007; Preedy, 2014). Fenolne komponente biljaka privlače veliku pažnju zahvaljujući brojnim biološkim aktivnostima, pri čemu se izdvaja antioksidativna aktivnost. Lekovito, aromatično i začinsko bilje je jedan od najčešće ispitivanih izvora fenolnih jedinjenja u literaturi, što je, ujedno, i jedan od razloga oživljavanja tradicionalne upotrebe biljaka u oblastima moderne fitoterapije, kao i njihovog korišćenja u prehrambenoj industriji (Đilas et al., 2002).

2.4.1.1. Fenolna jedinjenja kao nosioci antioksidativne aktivnosti biljaka

Fenolna jedinjenja ili polifenoli (fenoli) su sekundarni metaboliti, koji se sintetišu u biljkama tokom normalnog razvoja (kao što je izgradnja ćelijskog zida) i tokom sistemske reakcije na stres poput mikroorganizama, oštećenja i UV zračenja. Nastaju u svim delovima biljke od ugljenih hidrata, preko biosintetskog puta šikiminske kiseline. Od šikiminske kiseline, dalje, nastaju aminokiseline fenilalanin i tirozin, kao prekursori različitih klasa polifenola (Robbins, 2003; Charles, 2012). Sadrže jedan ili više aromatičnih prstenova, sa bar jednom hidroksilnom grupom, pri čemu, sa više od 8.000 strukturnih varijacija, predstavljaju vrlo raznoliku grupu bioaktivnih jedinjenja (Brewer, 2011).

Fenolne komponente u biljkama obuhvataju različite podgrupe, kao što su jednostavni fenoli, fenolne kiseline i njihovi analozi, flavonoidi, tanini, stilbeni, kurkuminoidi, kumarini, lignani, hinoni i druge, u zavisnosti od broja fenolnih prstenova i strukturnih elemenata koji ih povezuju (Brewer, 2011).

Najzastupljeniji biljni polifenoli obuhvataju: fenolne kiseline (galna, protokatehinska, kafena, ruzmarinska), flavonoide (kvercetin, katehin), fenolne diterpene (karnozol i karnozinska kiselina) i neke isparljive komponente etarskih ulja

(eugenol, karvakrol, timol) (Brewer, 2011). Polifenoli su zaslužni za senzorna svojstva namirnica biljnog porekla, kao što su ukus, miris, boja, oporost, trpkost itd., ali i za oksidativnu stabilnost proizvoda (Naczki i Shahidi, 2004; Huang et al., 2009).

Polifenoli ispoljavaju niz bioloških aktivnosti, kao što su antiviralne, antibakterijske, antialergijske, antiinflamatorne i mnoge druge. Zato je od velikog značaja unositi biljne polifenole ishranom, jer literaturni podaci sve češće opisuju njihovu ulogu u zaštiti od kancera, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa, osteoporoze i neurodegenerativnih poremećaja (slika 2.4.) (Pandey i Rizvi, 2009).



Slika 2.4. Zaštitna uloga polifenola od različitih bolesti i starenja

Antioksidativna aktivnost fenolnih jedinjenja potiče od njihovih oksido-redukcionih svojstava. Fenoli imaju redukujuća svojstva, mogu donirati H-atom, vezivati ROS i RNS, helirati metalne jone, inhibirati prooksidativne enzime itd. (Đilas et al., 2002; Robbins, 2003; Petti i Scully, 2009; Kratchanova et al., 2010). S obzirom da imaju po više hidroksilnih grupa, koje lako otpuštaju H-atome, lako vezuju i na taj način uklanjaju više slobodnih radikala u isto vreme (Charles, 2012). Tako se formira manje reaktivni fenoksi-radikal, sa delokalizovanim elektronima i više rezonantnih oblika. Ova delokalizacija omogućava dodatne reakcije, koje dovode do terminacije slobodno - radikalskih procesa (Ohshima et al., 1998).

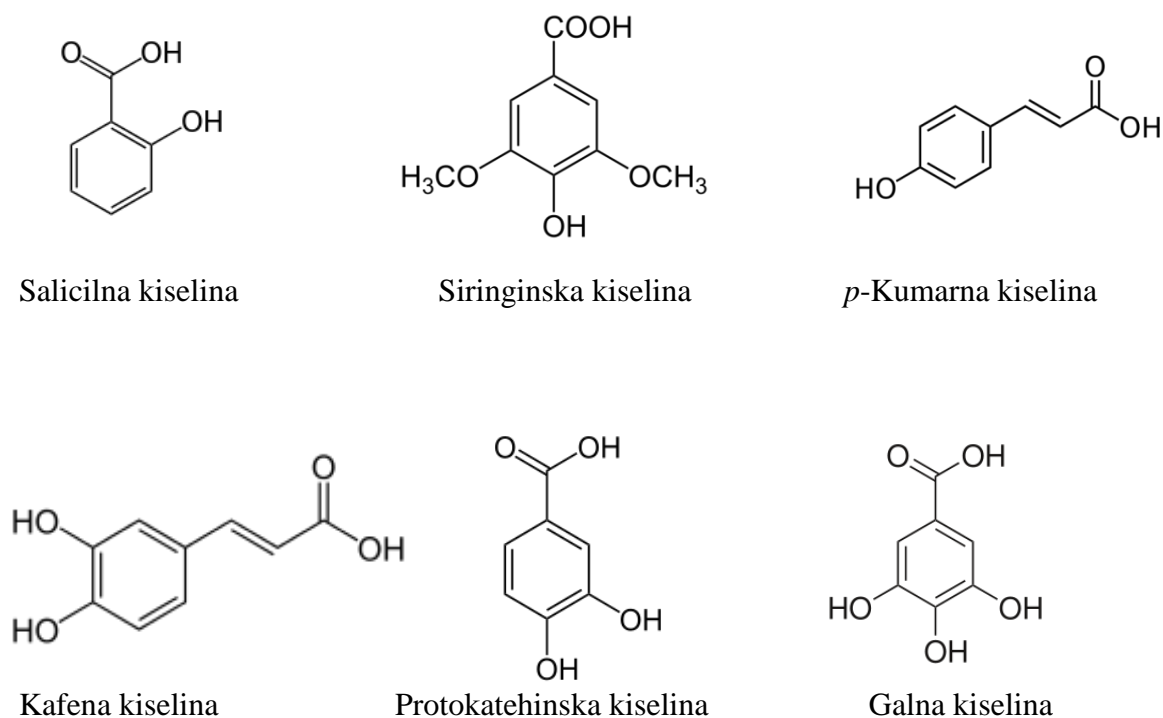
2.4.1.1.1. Fenolne kiseline

Kao najveća grupa fenolnih jedinjenja u biljkama (Charles, 2012), fenolne kiseline predstavljaju hidroksilne derivate benzoeve i cimetine kiseline, koje potiču od fenilalanina, aromatične aminokiseline (Stalikas, 2007). Najzastupljeniji derivati benzoeve kiseline su: p- hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska kiselina itd., prisutne uglavnom u obliku glikozida u biljkama. Najzastupljeniji derivati cimetine kiseline su p-kumarna, kafena, ferulna, sinapinska kiselina, a kao dominantna među njima je hlorogena kiselina, estar cimetine i hininske kiseline. Derivati cimetine i benzoeve kiseline se nalaze u svim biljnim delovima (korenu, listu, semenu, stablu), a rasprostranjene su gotovo u svim biljkama i biljnim namirnicama (Robbins, 2003; Stalikas, 2007). Neke od fenolnih kiselina, kao što je siringinska, derivat benzoeve kiseline, nalaze se pak samo u određenom biljnom materijalu (Stalikas, 2007).

Fenolne kiseline se, jednim manjim delom, nalaze u slobodnom ili konjugovanom obliku, ali većinom su vezane estarskim, etarskim ili acetatnim vezama sa strukturnim komponentama biljke, kao što su celuloza, proteini, lignini, sa većim polifenolima- flavonoidima, sa manjim organskim molekulima tipa glukoze, hinona i nekih organskih kiselina, zatim terpenima itd. (Robbins, 2003).

Uloga fenolnih kiselina u sazrevanju voća, prevenciji od enzimskog tamnjenja i oksidacionih promena, kao i doprinosu senzornim svojstvima hrane, posebno je zanimljiva za prehrambenu industriju (Robbins, 2003).

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina, uglavnom se ispoljava kroz sposobnost uklanjanja slobodnih radikala (Charles, 2012). Supstituenti na aromatičnom prstenu utiču na stabilizaciju molekula, pa različite fenolne kiseline ispoljavaju različitu moć uklanjanja slobodnih radikala (Robbins, 2003). Utvrđeno je da antioksidativna sposobnost fenolnih kiselina raste sa brojem hidroksilnih grupa u aromatičnom prstenu, dok hidroksilne grupe u *orto* i *para* položaju doprinose jačoj antioksidativnoj i antiradikalnoj aktivnosti (Sroka, 2005). Neke poznatije fenolne kiseline, koje se mogu naći u biljkama, prikazane su na slici 2.5.



Slika 2.5. Fenolne kiseline izolovane iz biljaka (Brewer, 2011).

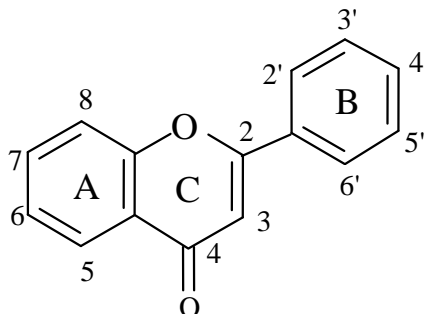
2.4.1.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su velika grupa polifenola, koja broji preko 4000 fenolnih jedinjenja (Huang et al., 2009). Kao i ostali polifenoli, flavonoidi imaju važnu ulogu u fiziologiji biljaka, jer utiču na rast, razvoj i odbranu biljke od patogenih mikroorganizama i drugih spoljašnjih, štetnih faktora. Kao biljni pigmenti, zaduženi su za različite nijanse plave, žute i crvene boje.

Flavonoidima se pripisuju mnoge biološke aktivnosti, od antiinflamatorne, antialergijske, antitumorne itd. Pored toga, dokazano je i inhibitorno delovanje na neke enzime. Međutim, ono po čemu se flavonoidi naročito izdvajaju, je njihova izražena antioksidativna aktivnost. Ona se ogleda kroz njihovu sposobnost da spreče nastanak, ili eliminišu već stvorene slobodne radikale (Pietta et al., 2003). Takođe, imaju sposobnost heliranja prelaznih metala, predajući im H-atome, čime smanjuju njihovo prooksidativno delovanje (Brewer, 2011).

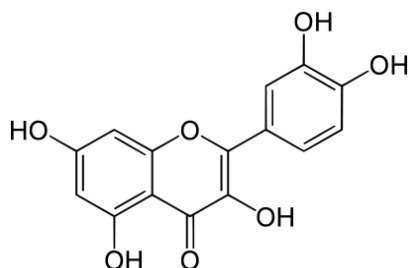
Flavonoidi se u biljkama nalaze uglavnom u obliku glikozida, međusobno povezanih - OH grupama ili C-C vezama, dok se u mrtvim, "drvenim", tkivima nalaze u aglikonskom obliku. Otkriveno je više od 80 ugljenih hidrata koji ulaze u sastav flavonoida (Huang et al., 2009).

Osnovnu strukturu flavonoida čini 15 ugljenikovih atoma, raspoređenih u tri prstena, dva benzenova i jedan prsten γ -pirona, koji se obeležavaju sa A, B i C, kao što je prikazano na slici 2.6. (Huang et al., 2009; Brewer, 2011).

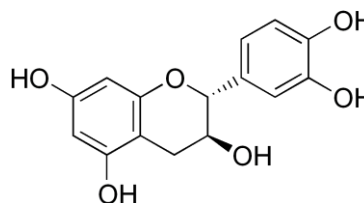


Slika 2.6. Osnovna struktura flavonoida

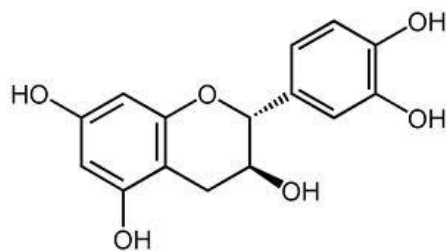
Različite klase flavonoida se razlikuju, prvenstveno, u stepenu oksidacije i načinu supstitucije C prstena. U zavisnosti od stepena oksidacije centralnog pironovog prstena, dele se na flavanole (flavan-3-oli i flavan-3,4-dioli), flavanone (dihidroflavoni), flavanonole (dihidroflavonoli), flavone (osnovna struktura), izoflavone (B prsten je vezan za treći ugljenikov atom C prstena), antocijanine (antocijanidini; C prsten je 1-piran sa nezasićenim 1-2 i 2-3 vezama) i flavonole (sa -OH grupom u položaju 3). Oksidaciono stanje se menja navedenim redosledom, od izrazito redukovanih flavanola, sa katehinom kao predstavnikom, do izrazito oksidovanih flavonola, kojima pripada poznati kvercetin. Molekuli unutar svake grupe flavonoida razlikuju se po položaju i broju, uglavnom hidroksi i metoksi funkcionalnih grupa u benzenovim prstenovima A i B (Wojdyło et al., 2007). U flavonoide spadaju i halkoni, auron, biflavoni i kumarini, koji se pojavljuju mestimično i u manjem broju biljaka (Pietta et al., 2003). Na slici 2.7. su prikazane strukture molekula nekih biljnih flavonoida.



Kvercetin (flavonol)



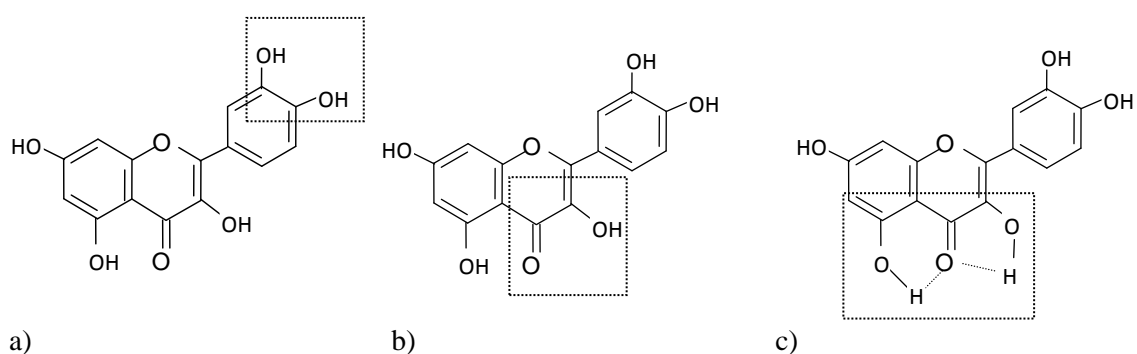
Katehin (flavan-3-ol)



Delfinidin (antocijanin)

Slika 2.7. Poznatiji flavonoidi izolovani iz biljaka

Struktura samih molekula flavonoida uslovljava stepen njihove antioksidativne sposobnost. Usled visoko konjugovane, i elektronima bogate hemijske strukture, flavonoidi su (posebno flavoni i flavonoli) izrazito efikasni donori elektrona i protona. Molekuli sa višestrukim hidroksilnim grupama su efikasniji od onih sa jednom (Brewer, 2011). Smatra se da tri strukturne karakteristike određuju stepen antioksidativne aktivnosti flavonoida, u direktnim reakcijama zahvata slobodnih radikala (Bors i Saran, 1987; Pićurić-Jovanović i Milovanović, 2005): prisustvo orto C3',C4' dihidroksilnih grupa na prstenu B (kateholna struktura) (slika 2.8.a); C2-C3-dvostruka veza konjugovana sa C4-karbonilnom grupom na prstenu C (preko kojih se ostvaruje konjugacija između prstena A i B, što dalje omogućava delokalizaciju elektrona iz B prstena i stabilizaciju radikala efektom rezonancije preko većeg broja aromatičnih jezgara) (slika 2.8.b); prisustvo hidroksilnih grupa na položaju C3 prstena C i položaju C5 prstena A preko kojih postoji mogućnost građenja vodonične veza s karbonilnom grupom (slika 2.8.c).

**Slika 2.8.** Uticaj strukture molekula flavonoida na antioksidativnu aktivnost

Pored važnih fizioloških uloga koje imaju u biljnom svetu, flavonoidi su odgovorni za senzorna svojstva i nutritivnu vrednost hrane. Oni utiču na boju, ukus i stabilnost hrane, štiteći je od oksidativnih promena (Kumar i Pandey, 2013). Namirnice bogate flavonoidima su voće, povrće, crveno vino, čaj itd. Lekovite, aromatične i začinske biljke, kao i proizvodi na bazi istih, su, takođe, značajan izvor flavonoida. One, pored flavonoida, sadrže i druge biološki aktivne sastojke, koji sinergistički učestvuju u ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti. Zato treba imati u vidu da se najbolji efekat flavonoida, ali i drugih antioksidanasa na zdravlje čoveka, postiže se dugoročnom ishranom bogatom raznovrsnim namirnicama biljnog porekla (Pietta et al., 2003).

2.5. Spektrofotometrijske i elektrohemijske metode za određivanje antioksidativne aktivnosti

U kompleksnim uzorcima kao što je hrana, prisutan je širok spektar antioksidanasa. Pouzdaniji uvid u ukupnu antioksidativnu aktivnost kompleksnih uzoraka, postiže se primenom više antioksidativnih metoda (Sužnjević et al., 2011; Charles, 2012). U ovom radu za analizu ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja i finalnog proizvoda, korišćene su spektrofotometrijske i elektrohemijske metode.

Spektrofotometrijske metode su najčešće korišćene za određivanje antioksidativne aktivnosti hrane, pića i drugih kompleksnih uzoraka, kao i individualnih komponenti. One se zasnivaju na spektrofotometrijskom praćenju promene koncentracije nekog od reaktanata, ili produkata reakcije antioksidanasa sa slobodnim radikalima. U najčešće korišćene spektrofotometrijske metode spadaju DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS/TEAC (2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina/Trolox Equivalents Antioxidant Capacity), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) i Folin–Ciocalteu metoda (FC) za određivanje ukupnih fenola, koja se svrstava u antioksidativne metode, jer određuje ukupan redukcionu kapacitet uzorka. Iako još uvek ne postoji standardizovan metod za određivanje antioksidativne aktivnosti, navedeni spektrofotometrijski testovi se mogu svrstati u rutinske zbog učestalosti njihove primene. Za to su najviše zaslužni osetljivost, brzina i jednostavnost ovih metoda (Sikorski i Kolakowska, 2011).

U literaturi se mogu naći različiti primeri primene ovih testova, kada su u pitanju kompleksni uzorci biljnog porekla kao što su čajevi, biljne infuzije, kafe, kakao proizvodi, vina, piva, jestiva ulja i drugi prehrambeni proizvodi. Ekstrakti različitih lekovitih biljaka su takođe testirani na antioksidativnu aktivnost navedenim spektrofotometrijskim testovima. Sadržaj ukupnih fenola uzoraka je uglavnom korelirao sa antioksidativnom aktivnošću dobijenom navedenim metodama (Zheng i Wang, 2001; Katalinic et al., 2006; Surveswaran et al., 2007; Büyükbacı i El, 2008; Li et al., 2008; Gorjanović et al., 2010c).

Zbog brzine i jednostavnosti merenja, elektrohemijske antioksidativne metode su sve zastupljenije kod određivanja antioksidativne aktivnosti različitih tipova uzoraka. Različite elektrohemijske tehnike su do sada korišćene u merenju antioksidativne aktivnosti, najčešće voltometrijske. Polarografija sa jednosmernom strujom (DC-direct current) pokazala se, takođe, kao pogodna za primenu u određivanju antioksidativne aktivnosti.

Polarografska metoda HPMC (*engl.* HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex), zasnovana na smanjenju anodne granične struje kompleksa $[\text{Hg}(\text{O}_2\text{H})(\text{OH})]$, koji nastaje u alkalnom rastvoru peroksida na potencijalu rastvaranja Hg, do kog dolazi po dodatku antioksidansa, je nedavno razvijena (Sužnjević et al., 2011). Metoda je do sada primenjena za merenje aktivnosti alkoholnih pića, kao što su komercijalna i specijalna (biljna) piva (Gorjanović et al., 2010a), crna i bela vina (Gorjanović et al., 2010b), različita jaka alkoholna pića (Gorjanović et al., 2010c), ekstrakti maline (Novaković et al., 2011) i ekstrakti hladno ceđenog bundevinog ulja (Gorjanović et al., 2011) i praćenje promena antioksidativne aktivnosti tokom procesa sladovanja i komljenja, starenja rakije i sušenja maline (Gorjanović et al., 2010a,c; Novaković et al., 2011). Metoda je primenjena i na drugim kompleksnim uzorcima kao što su propolis (Potkonjak et al., 2012) i med (Gorjanović et al., 2013), čajevi, biljne infuzije i kafe, ekstrakti hmelja kao i na različitim čistim jedinjenjima (izolovanim i sintetisanim) (Sužnjević et al., 2011; Gorjanović et al., 2013; Sužnjević et al., 2015).

Za određivanje antioksidativne aktivnosti nedavno je razvijena i metoda MRAP (*engl.* Mercury Reduction Antioxidant Power), koja takođe primenjuje polarografiju sa jednosmernom strujom, a zasniva na redukciji jona žive. Po dodatku antioksidanasa, dolazi do smanjenja katodne struje redukcije živinih jona. Metoda je, za razliku od

široko primenjivane HPMC metode, po prvi put na kompleksnim uzorcima primenjena u ovom radu (Sužnjević et al., 2015a).

2.6. Lekovite, aromatične i začinske biljke kao izvor antimikrobnih agenasa

Antimikrobna svojstva biljaka ljudima su poznata još iz antičkog doba, kada se lekovito, aromatično i začinsko bilje upotrebljavalo za konzervisanje namirnica. Tako se, na primer, meso čuvalo od kvarenja, kako postupcima soljenja i dimljenja, tako i oblaganjem raznim začinima. Tokom prošlog veka su opisane fizičke i hemijske osobine isparljivih sastojaka mnogih aromatičnih biljaka i eksperimentalno je utvrđeno njihovo antibakterijsko dejstvo. Prvi put je 1887. godine ispitana antimikrobna aktivnost etarskog ulja cimeta, origana i karanfilića na spore bacila antraksa (Chamberlain, 1887). Zatim, utvrđena je mogućnost konzervisanja sosa od paradajza vodenim i alkoholnim ekstraktom cimeta (Grove, 1918). Potom je razvijen metod za konzervisanje voća pomoću infuzije mlevenog karanfilića u kombinaciji sa soli (Prasad i Joshi, 1949). U drugoj polovini 19. veka, posvećuje se veća pažnja ispitivanju antimikrobne aktivnosti neisparljivih komponenata biljaka, pa i istraživanja šire obuhvataju, pored aromatičnih, i druge lekovite biljne vrste (Tucakov, 1971).

Zahvaljujući prisustvu biološki aktivnih sekundarnih metabolita, lekovite, aromatične i začinske biljke i njihovi izolati ispoljavaju antimikrobno dejstvo na širok spektar mikroorganizama, pa tako i na patogene iz hrane. Sve veći zahtevi tržišta za minimalno rafinisanom hranom, sa produženim rokom trajanja, doprineli su primeni biljnih izolata sa antimikrobnim svojstvima u prehrambenoj industriji, kao zamena za veštačke konzervanse (Naidu, 2010). I na polju farmacije, krajem devedesetih godina prošlog veka, kada je primećena sve slabija efikasnost konvencionalnih antibiotika, lekovita moć biljnih ekstrakata postaje aktuelna kod lečenja raznih infektivnih bolesti (Cowan, 1999).

Zatim, tradicionalno korišćenje mnogih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka, kao digestivnih sredstava koja podstiču varenje hrane i smanjuju nadutost stomaka, veruje se da proizilazi iz njihovih antimikrobnih sposobnosti. Sinergističkim delovanjem antimikrobnih komponenti, sa još jačim inhibitornim efektom u kombinaciji biljnih ekstrakata, onemogućava se razvijanje rezistentnosti bakterija, koje se mogu naći

u probavnom traktu (Thompson et al., 2013; Soleimanpour et al., 2013; Witkowska et al., 2013; Rivera et al., 2014).

Kao rezultat aktuelnosti ove teme, istraživanja o antimikrobnim svojstvima lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja su mnogobrojna. Na primer, ekstrakti biljke ive su, zbog antimikrobne aktivnosti koju su pokazali u jednoj od studija, predloženi za upotrebu u tradicionalnoj medicini (Djilas et al., 2006). Među različitim ekstraktima 5 biljaka, seme biljke anis delovalo je na *Micrococcus luteus* i *Mycobacterium smegmatis*, dok su svi ekstrakti semena biljke korijander ostali neaktivni u delovanju protiv odabranih sojeva bakterija (Ateş i Turgay, 2003). Ustanovljena je i antimikrobna moć etanolnih ekstrakata 10 biljaka, između ostalog i podbela (Janovska et al., 2003). Rezultati istraživanja inhibitorne aktivnosti etanolnih ekstrakata dve srodne biljke, iz porodice *Lamiaceae*, pitome nane (*Mentha piperita*) i divlje nane (*Mentha spicata*), na *Mycobacterium bovis*, ukazuju na mogućnost njihovog korišćenja kao vida fitoterapije kod tuberkuloze (Maham et al., 2011). Biljke iz porodice *Artemisia*, među kojima je i pelin, su u jednoj od studija ispoljile delovanje protiv Gram (+) bakterija i gljivica i time opravdale upotrebu njihovih ekstrakata u tradicionalnoj medicini protiv infekcija (Poiate et al., 2009). Inhibitorno dejstvo etanolnih ekstrakata žalfije dokazano je na rezistentnim patogenim sojevima, kao što su *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* (Mosafa et al., 2014). Brojni literaturni podaci na temu antimikrobne aktivnosti biljaka ukazuju na veliku različitost među rezultatima, čak iako su istraživanja rađena na istim biljnim vrstama. Kao važnije razloge za to treba navesti geografsko poreklo i klimatske uslove, zatim različit vegetacioni period u kom je biljni materijal sakupljen, starost biljaka itd. (Petrović i Antić, 2015). Pored toga, uslovi eksperimenta, kao što je vrsta korišćenog rastvarača i njegova koncentracija, odabrani sojevi mikroorganizama i primenjena metoda ispitivanja antimikrobne aktivnosti u velikoj meri utiču na ishod istraživanja.

2.6.1. Antimikrobne komponente biljaka i njihovo dejstvo na ćeliju mikroorganizama

Sekundarni metaboliti biljaka, sa dokazanim antimikrobnim delovanjem su: fenolna jedinjenja (jednostavni fenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, hinoni, kumarini), terpeni etarskog ulja, alkaloidi, steroidi, masne kiseline, gume, smole,

voskovi, lecitini i polipeptidi itd. (Cowan, 1999; Kaefer i Milner, 2008; Škrinjar i Nemet, 2009; Saranraj i Sivasakthi, 2014). Postoje i podaci o antimikrobnom delovanju poliamina, izotiocijanata, tiosulfinata, glukozida i poliacetilena. Zabeleženo je čak i delovanje monosaharida fruktoze, iz soka brusnice, na patogena koji najčešće napada urinarni trakt, *E.coli* (Cowan, 1999). Kao važnija i u najvećem obimu proučavana sa aspekta antimikrobne aktivnosti, mogu se izdvojiti fenolna jedinjenja i terpeni etarskog ulja biljaka.

2.6.1.1. Fenolna jedinjenja

Jednostavni fenoli, sa jednim aromatičnim prstenom, kao što su katehol (dve hidroksilne grupe) i pirogalol (tri hidroksilne grupe) ispoljavaju antimikrobnu aktivnost, pri čemu je dokazano da prisustvo više hidroksilnih grupa povećava aktivnost prema mikroorganizmima (Geissman, 1963). Dokazano je da fenolne kiseline, kao što su protokatehinska, kafena, ferulna i kumarna kiselina, inhibiraju rast bakterijskih sojeva *Lactobacillus spp.*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, pri koncentraciji od 0,04 – 3,75 g/L (Sánchez-Maldonado et al., 2011). Zatim, antimikrobno delovanje eugenola, najzastupljenije komponente u etarskom ulju karanfilića, na bakterije i gljivice, je eksperimentalno dokazano (Larhsini et al., 2001; Gayoso et al., 2005).

Među najaktuelnijim flavonoidima kada je u pitanju proučavanje antimikrobnih sposobnosti su katehini, najzastupljeniji u čaju, infuziji biljke *Camelia sinensis*. Dokazana je aktivnost katehina protiv *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* O1, *Streptococcus mutans*, *Shigella* (Sakanaka et al., 1989; Vijaya et al., 1995; Borris, 1996; Hamilton-Miller i Shah, 1999; Friedman et al., 2006). Ostala polifenolna jedinjenja, koja ispoljavaju antimikrobnu aktivnost su tanini, hinoni i kumarini.

Tanini su najzastupljeniji u zelenom čaju i crnom vinu i zaslužni su za hemijski osećaj trpkosti. Smatra se da je jedan od mehanizama delovanja tanina na ćeliju mikroorganizama vezan za njihov afinitet prema proteinima, za koje se vezuju neselektivno vodoničnim vezama ili hidrofobnim silama. Shodno tome, inhibicija ćelije se dešava usled inaktivacije enzima, reakcijom sa proteinima ćelijskog omotača itd. (Cowan, 1999).

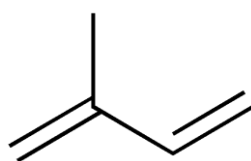
Hinoni su obojena jedinjenja, koja u svojoj stukturi sadrže aromatičan prsten sa dve keto grupe. Zaslužni su za tamnjenje isečenog voća i povrća. Hipericin, koji se nalazi u kanatarionu, poznati prirodni antidepresiv, deluje kao inhibitor rasta nekih bakterija (Yow et al., 2012) i spada u antrahinone. Zatim, jedan od značajnijih hinona je i hidrohionon, koji nastaje iz arbutina, koji je zaslužan za delovanje biljke uve protiv uzročnika infekcija urinarnog trakta (Kosalec et al., 2008).

Kumarini u svojoj strukturi sadrže benzopiron i prepoznaju se po karakterističnom mirisu tek pokošene trave. Poznat derivat kumarina je varfarin, lek protiv zgušavanja krvi. Dokazano je inhibitorno delovanje kumarina na *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypii*, *Enterobacter cloacae* i *Enterobacter earogenes* (Basile et al., 2009), antigljivično delovanje protiv *Candida albicans* (Widodo et al., 2012) kao i antivirusna aktivnost prema *Herpes simplex* virusu (Borges et al., 2005).

Smatra se da mehanizam delovanja fenolnih jedinjenja na ćeliju mikroorganizama uključuje inhibiciju enzima reakcijom sa sumporvodoničnim grupama ili drugim nespecifičnim interakcijama sa proteinskim komponentama (Mason i Wasserman, 1987). Antimikrobna aktivnost flavonoida se, na primer, pripisuje njihovoj sposobnosti da grade komplekse sa ekstracelularnim proteinima, kao i sa komponentama ćelijskog zida bakterija, dok lipofilniji flavonoidi mogu razoriti i ćelijsku membranu mikroorganizma. Proučavana je i povezanost strukture molekula sa antimikrobnim delovanjem, pri čemu je, kao i kod jednostavnih fenola, utvrđena direktna veza između broja hidroksilnih grupa i jačine antimikrobne aktivnosti. Ipak, postoji i suprotno otkriće, da flavonoidi koji nemaju hidroksilnu grupu u B prstenu, pokazuju jaču aktivnost od onih sa -OH grupom, što potvrđuje pretpostavku o delovanju na ćelijsku membranu mikroorganizama (Chabot et al., 1992). Dokazano je da 2,4-dihiroksi- i 2,6-dihiroksi- struktura B prstena, kao i hidroksilne grupe na položajima C-5 i C-7 A prstena flavonona, pojačava antimikrobno delovanje (Tsuchiya et al., 1996). Metoksi grupe kod flavonoida drastično umanjuju aktivnost prema mikroorganizmima (Alcaraz et al., 2000).

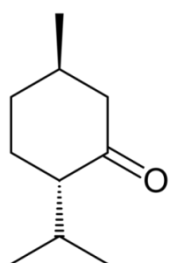
2.6.1.2. Terpeni etarskog ulja biljaka

Etarska ulja su proizvod sekundarnog metabolizma biljaka i predstavljaju isparljivu i aromatičnu frakciju kompleksnog sastava. Bogata su komponentama koja u svojoj strukturi imaju izoprensku osnovu (slika 2.9.), terpenima. Pored toga, u etarskim uljima se, u manjoj meri, nalaze i druga aromatična i alifatična jedinjenja. Terpeni koji sadrže dodatne funkcionalne grupe ili kiseonik u svojoj strukturi nazivaju se terpenoidi. U etarskim uljima su najzastupljeniji monoterpeni i seskviterpeni, sa dve i tri izoprenske jedinice.

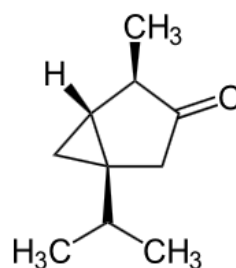


Slika 2.9. Izoprenska osnova terpena

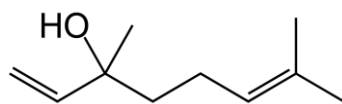
Neki poznati terpeni, komponente etarskog ulja aromatičnih biljaka odabranih za ovo istraživanje, predstavljeni su na slici 2.10.



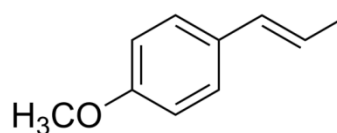
Menton



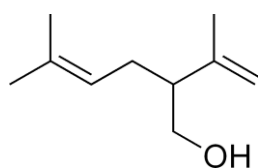
α -Tujon



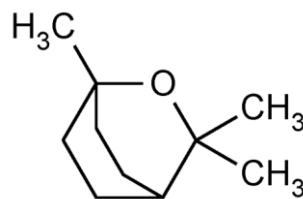
Linalol



Anetol



Lavandulol

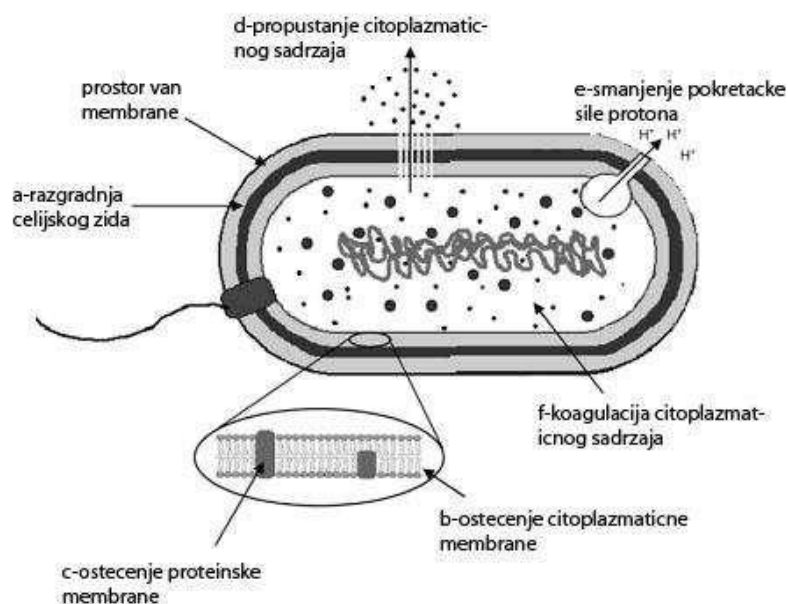


Eukaliptol (1,8- cineol)

Slika 2.10. Terpeni prisutni u isparljivoj frakciji odabranih biljaka

Iako su neki terpeni prisutni u etarskom ulju biljaka u jako maloj količini, oni doprinose ukupnom antimikrobnom potencijalu sinergističkim delovanjem sa ostalim isparljivim komponentama i drugim sekundarnim metabolitima (Dorman i Deans, 2000; Jianu et al., 2013). Mitić-Ćulafić i saradnici (2005) čak tvrde da ne postoji veza između antimikrobnog delovanja etarskog ulja žalfije i njegovih glavnih komponenti, već značaj pridaju upravo pomenutoj sinergiji brojnih komponenata.

Mehanizam delovanja terpena na mikrobnu ćeliju nije u potpunosti proučen, ali se pretpostavlja da je usko vezan za lipofilni karakter ovih komponenti. Najčešći mehanizam delovanja je narušavanje strukture ćelijskog zida. Lipofilni karakter omogućava interakciju sa lipidima ćelijske membrane, što dalje utiče na povećanje njene permeabilnosti. Određene antimikrobne komponente tako lakše difunduju kroz oštećenu membranu i reaguju sa osnovnim ćelijskim komponentama, uključujući i DNK, dok citoplazmatični sadržaj ističe iz ćelije. Takođe, terpeni mogu menjati i strukturu proteina u okviru ćelijske membrane, i to najčešće interakcijom između lipofilnih jedinjenja i hidrofobnih delova proteina (slika 2.11.). Kao posledica narušene strukture ćelijske membrane, dolazi do koagulacije citoplazme, promene u transportu jona, narušavanja energetskog bilansa, inhibicije disanja ćelije mikroorganizma i genetskih mutacija (Paduch et al., 2007; Faleiro, 2011).



Slika 2.11. Potencijalna mesta aktivnosti biljnih antimikrobnih komponenti u bakterijskoj ćeliji

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti biljnih izolata često se koristi bujon-diluciona metoda, pri čemu se uzorak rastvara u inokulisanom tečnom medijumu (bujonu) i prati se minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) uzorka koja inhibira vidljivi rast ispitivane kulture mikroorganizma (Rios et al., 1988). Koncentracija uzorka koja ima mikrobicidno (letalno) dejstvo na ispitivane mikroorganizme, tako da oko 99,5 % ćelija bude uništeno, naziva se minimalna mikrobicidna koncentracija (MBK).

2.7. Biljne vrste odabrane za istraživanje

Biljne vrste odabrane su na osnovu njihove česte primene u proizvodnji alkoholnih pića (Nikićević i Tešević, 2009). U ovom istraživanju, dvanaest odabranih lekovitih biljaka će, prema hemijskom sastavu, biti podeljeno na dve grupe: na grupu biljaka sa gorkim materijama i grupu aromatičnih i začinskih biljaka. Prva grupa obuhvata biljke koje sadrže tzv. gorke principe, koji povoljno deluju na digestivni sistem i ispoljavaju druge fiziološke efekte, dok drugu grupu čine biljke sa značajnom količinom etarskog ulja, kao nosiocem lekovitosti. U narednom tekstu opisane su glavne

karakterisitke pojedinačnih biljnih vrsta, sa akcentom na hemijski sastav, tradicionalnu terapijsku primenu i dokazanu biološku aktivnost.

2.7.1. Biljke sa gorkim materijama

Terapeutski efekat gorkih biljaka potiče upravo od gorkih materija, zbog kojih se iste koriste za podsticanje apetita ili za poboljšanje varenja. Gorčina može poticati od različitih bioaktivnih jedinjenja, karakterističnog gorkog ukusa, tzv. gorkih principa, za koje je dokazano da stimulišu nerve pljuvačnih žlezda u ustima i lučenje želudačne kiseline. Gorčina često potiče od glikozida (heterozida), izuzetno raznovrsne i složene grupe jedinjenja, koja sadrži bar jedan molekul šećera (glikon), vezan etarskom, odnosno glikozidnom vezom za nešećernu komponentu, aglikon. Zatim, određene klase terpenoida su gorke i ovde spadaju iridoidi (monoterpeni često vezani biljkama u formi heterozida), zatim seskviterpenski laktoni, diterpenoidi, saponini itd. Većina alkaloida, ali i polifenola takođe ima gorak ukus (Snow i Spelman, 2011).

2.7.1.1. Kičica (*Centaurium erythraea* Rafn subsp. *erythraea*)

Kičica je dvogodišnja, mala, zeljasta biljka iz familije Gentianaceae, sa sitnim cvetovima ružičaste ili svetlo crvene boje (slika 2.12.). Cveti celog leta. Raste svuda, a najviše po vlažnim brdskim i planinskim livadama. Spada u tipične gorke biljke, jer sadrži gorke glikozide (sverciamarin 75 %, a u manjim količinama genciopikrin, eritaurozid, centapikrin, sverozid, eritrocentaurozid), kao glavne bioaktivne sastojke. Pored toga, sadrži flavonoide, fenolne kiseline, izokumarine, triterpene, ksantonske derivate, steroide, esencijalne amino kiseline, i tragove alkaloida među kojima je glavni gencijanin (Tucakov, 1971: 350-351; Valentão et al., 2002; European Medicines Agency, 2009; Tahraoui et al., 2010).



Slika 2.12. *Centaurium erythraea* Rafn - kičica

Kičica, zbog svojih gorkih sastojaka, pomaže kod digestivnih poremećaja, stimulira apetit i lučenje želudačnih sokova, stimulira rad jetre, ublažava stomačne grčeve, koristi se kod lečenja astme, ekcema, intestinalnih parazita itd. Upotrebljava se u obliku vodenog ekstrakta, praška, vina i tinkture. Ulazi u sastav gorkih čajeva i gorkih tonika za stomak i poboljšanje krvne slike (European Medicines Agency, 2009; Tahraoui et al., 2010).

Kičica ispoljava niz bioloških aktivnosti, među kojima je i antioksidativna aktivnost, utvrđena kod infuzija i ekstrakata biljke (Valentao et al., 2001; Valentão, et al., 2003; Kumarasamy et al., 2003). Utvrđeno je inhibitorno delovanje gorkih komponenata, izolovanih iz kičice, na rast bakterijskih sojeva *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* *Serratia marcescens* i *Staphylococcus epidermidis* (Kumarasamy et al., 2003).

Gorčina kičice čini ovu biljku pogodnom za dodavanje bezalkoholnom i alkoholnom piću, kao što su gorki liker i specijalne rakije.

2.7.1.2. Lincura (*Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* (Murb.) Hayek)

Lincura je trajna biljka s korenom, iz porodice Gentianaceae. Koren, koji se koristi kao lekoviti deo biljke, je jako dugačak, debeo i razgranat, spolja smeđe do tamnosmeđe boje, a iznutra žute boje (slika 2.13.). Svež koren ima neugodan miris, dok je miris osušenog korena aromatičan, a ukus gorak.

Lincura je tipična gorka biljka sa korteksom korena bogatim gorkim materijama, i to iz grupe sekoiridoidnih glikozida, sa genciopikrinom kao glavnim, i u manjim

količinama, amarogencinom. Povremeno se navode i svertiamarin i svertiozid kao gorki sastojci korena lincure. Žuta boja korena potiče od ksantonskog derivata gentizina. Prisutni su ugljeni hidrati, veoma malo etarskog ulja (0,1 - 0,2 %), sterola i triterpena (European Medicines Agency, 2009).



Slika 2.13. *Gentiana lutea*- lincura

Tradicionalno se koristi kao aperitiv i digestiv, jer gorke materije stimulišu gustatorne nerve u ustima, podstičući lučenje želudačnih sokova, a time i probavu. Povoljno utiče na krvnu sliku, a koristi se i kod lečenja visokog krvnog pritiska. Dodatkom korena lincure u rakiju dobija se piće, koje u narodu važi kao dobar lek za krvotok.

Rezultati ispitivanja antiradikalske aktivnosti korena lincure pokazuju značajnu vrednost u poređenju sa sintetičkim antioksidansom (Kušar et al., 2006). Ekstrakt korena lincure je, takođe, pokazao značajno delovanje protiv lipidne oksidacije (Azman et al., 2014). Genciopikrin, gorko jedinjenje izolovano iz kičice i lincure, se pokazao kao inhibitor rasta nekih sojeva bakterija, dok su i ekstrakti lincure ispoljili značajnu antibakterijsku aktivnost (Weckesser et al., 2007).

Koren lincure se najviše upotrebljava za proizvodnju gorkih alkoholnih pića, kao što su specijalne rakije i likeri, kao i nekih bezalkoholnih pića (američko piće moksi).

2.7.1.3. Pelin (*Artemisia absinthium* L.)

Pelin je trajna, zeljasta biljka, iz familije Asteraceae (Compositae), sa razgranatom stabljikom, polugrmastog oblika, visine do 1,5 metra. Lišće je srebrnkasto

zelene boje, prekriveno sitnim dlačicama (slika 2.14.). Beru se listovi pre cvetanja, za industrijske potrebe i cela biljka za vreme cvetanja, u farmaceutske svrhe.



Slika 2.14. *Artemisia absinthium* - pelin

Bioaktivni sastojci pelina su gorke i aromatične materije, te pripada aromatično-gorkim biljnim vrstama (amarum aromaticum). Pelin je simbol gorčine. Sadrži do 0,4 % gorkih materija, etarsko ulje (0,2 - 0,8 %), flavonoida, kumarina, tanina i dr. Gorke materije pripadaju grupi seskvitirpenskikh laktona (absintin, anabsintin, artesin, artabzin, matricin i dr.). U etarskom ulju, čiji sadržaj varira od geografskog porekla i bioloških karakteristika biljke, ima tujona, izotujona i tujil-alkohola, mircena, α -pinena, kamfora itd. (Ahmad et al., 2010).

Polifenoli pelina, identifikovani u ekstraktu lista UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) metodom, su flavonidi miricetin, kvercetin i kampferol, rutin, hisperedin, resveratol i drugi u manji količinama, kao i kafena, ferulna, *o*-kumarna, galna, protokatehinska, vanilinska i salicilna kiselina (Lee et al., 2013).

Kao jedna od najlekovitijih biljaka svih vremena, pelin se tradicionalno koristi kao gorke tonik sa karminativnim, diuretičnim i digestivnim i aperitivnim efektom, kao sedativ, za lečenje bronhitisa, tuberkuloze, dijabetesa, ali tu su i mnoge druge primene ove dragocene biljke (Ahmad et al., 2010). Literaturni podaci ukazuju na antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost pelina (Erdogru, 2002; Canadanovic-Brunet et al., 2005; Erel et al., 2012; Craciunescu et al., 2012).

Pelin je glavni sastojak alkoholnog pića absinta, a koristi se i za aromatizovanje verumta i pelinkovca i drugih bitera, likera, rakija i vina. Nekada se u Engleskoj koristio umesto hmelja, kao nosilac gorčine piva.

2.7.1.4. Iva (*Teucrium montanum* L.)

Iva je višegodišnja polugranasta biljka iz familije Lamiaceae, visine 10 do 30 cm. Listovi su bez peteljke, zelene i sivobeličaste boje. Cvetovi se nalaze na vrhovima grančica. Latice su svetložute, gotovo bele boje (slika 2.15.). Veoma je gorkog i oporog ukusa, s prepoznatljivim aromatičnim mirisom. Raste po suvim, toplim i krševitim mestima, uglavnom na nadmorskim visinama oko 800 m i više. Sakuplja se nadzemni deo biljke, za vreme cvetanja. Iva je aromatično- gorka biljka koja sadrži gorke diterpenoide neo-klerodanskog tipa (montanin), etarsko ulje, flavonoide (rutin) i fenolne kiseline (hlorogena, galna, protokatehinska, gentisinska, kafena kiselina itd.) (Papanov i Malakov, 1983; Tumbas et al., 2004; Djilas et al., 2006).



Slika 2.15. *Teucrium montanum* -iva trava

U nekim našim krajevima ljudi imaju neograničeno poverenje u lekovitost ive. Koristi se kao diuretik, analgetik, spazmolitik, digestiv, tonik za jačanje organizma, kod tegoba sa želucem itd. (Tumbas et al., 2004; Djilas et al., 2006; Čanadanović-Brunet et al., 2006; Vukovic et al., 2007). Utvrđena je sntioksidativna aktivnost različitih ekstrakata ive (Djilas et al., 2006; Čanadanović-Brunet et al., 2006; Stankovic et al., 2011a,b), kao i antimikrobno delovanje etarskog ulja i ekstrakata (Djilas et al., 2006; Vukovic et al., 2007). Iva je zbog svoje gorčine pogodna za aromatizovanje specijalnih rakija i likera.

2.7.1.5. Podubica (*Teucrium chamaedrys* L.)

Podubica je trajna, zeljasta biljka iz porodice Lamiaceae, visoka 10-30 cm, sa razgranatim dlakavim stabljikama. Listovi su ovalni, sa lica sjajni a cvetovi su ljubičasti ili ružičasti, a ređe i beli (slika 2.16.). Upotrebljava se nadzemni deo biljke, u vreme cvetanja (od maja do septembra). Raste u južnoj Evropi, Maloj Aziji, Kavkazu i severnoj Africi, na sušnim i osunčanim mestima, u hrastovim i borovim šumama na pretežno krečnjačkoj podlozi. Biljka je slabo aromatična, opora i gorka. Sadrži jako malo etarskog ulja (oko 0,06 %), tanina, holina, diterpenoida (kao što su gorki teukrin A, B,C i D) i saponozida marubina (Tucakov, 1971: 518-520; Popa i Reinbol'd, 1972).



Slika 2.16. *Teucrium chamaedrys* -podubica

Alkoholni ekstrakt podubice je gorkog ukusa, pa se vekovima upotrebljava za pripremanje gorkog tonika protiv slabosti i malokrvnosti, kao adstrigent, digestiv koji stimuliše crevni sistem, spazmolitik i antiinflamatorno sredstvo. Etanolni ekstrakt podubice se u komparativnoj studiji sa nekoliko lekovitih biljaka pokazao kao najmoćniji antioksidans, što je povezano sa visokim sadržajem polifenola među kojima su glavni hlorogena i *p*-kumarna kiselina, gentisinska kiselina, luteolin i flavonoid glikozidi izokvercitrin, rutin i kvercitrin. U istoj studiji utvrđeno je intenzivno antimikrobno delovanje podubice protiv *S. aureus* i *C. albicans* (Vlase et al., 2014). Podubica je, zbog karakterističnog gorko-aromatičnog ukusa, pogodna za proizvodnju specijalnih aromatizovanih vina, bitera i gorkih likera, a ponekad i za aromatizovanje bezalkoholnih pića.

2.7.1.6. Podbel (*Tussilago farfara* L.)

Podbel je mala zeljasta i dugovečna biljka iz familije Asteraceae (Compositae), sa vodoravnim rizomom. Listovi podbela se razvijaju tek kad biljka procveta, krajem zime i u rano proleće. Cvetovi su žuti, jezičasti i prijatnog mirisa, a listovi, koji su lekoviti deo biljke, su na naličju beli od mnoštva dugačkih vunastih dlaka (slika 2.17.). List je gorkog ukusa, bez mirisa, bogat sluzastim materijama. Podbel raste svuda po Evropi, a najviše na novoj vlažnoj ilovači, pored puteva, potoka, kanala i na vlažnim njivama. U listu ima dosta sluzi, gorkih glikozida, karotenoida, tanina, inulin, organskih i fenolnih kiselina, flavonoida, a od ostalih komponenata fitosterola, voskova i etarskog ulja (Tucakov, 1971: 516-518; Didry et al., 1980).



Slika 2.17. *Tussilago farfara* -podbel

Listovi podbela se tradicionalno koriste u vidu infuzija, prvenstveno za lečenje respiratornih bolesti, kao što su astma i bronhitis, jer poseduje ekspektorantno dejstvo, što znači da podstiče izbacivanje sluzi iz pluća, zahvaljujuću kiselim polisaharidima. Pored toga, poboljšava varenje, leči dijareju, a zabeležena je i njegoova upotreba kao analgetika (Shikov et al., 2014). List podbela se nekada osušen pušio, jer je primećeno da ublažava tegobe kod astme. Rezultati istraživanja ukazuju i na biološku aktivnost ove biljke, u vidu antioksidativnog, antimikrobnog i antiinflamatornog delovanja (Deliorman et al., 2002; Turker i Usta, 2008; Ravipati et al., 2012; Chang-Tian et al., 2012; Dobravalskytė et al., 2013). Analiza ekstrakta podbela HPLC (High Performance Liquid Chromatography) metodom ukazuje na prisustvo kafene, hlorogene, galne kiseline kao i kampferola, rutina, kvercetina i drugih polifenola u manjim količinama, seskviterpena tusilagona itd. (Chang-Tian et al., 2012).

Podbel nema široku primenu u prehrambenoj industriji. U Engleskoj se, po tajnom receptu, proizvodi konditorski proizvod na bazi ekstrakta podbela (“Coltsfoot Rock”), a kod nas se može naći u sastavu komercijalnog Bitera 54 (Vukosavljević et al., 2009; Karabegović et al., 2012).

2.7.2. Aromatične i začinske biljne vrste

Aromatične i začinske biljne vrste sadrže značajne količine etarskog ulja, zbog čega se koriste u proizvodnji parfema i kozmetičkih proizvoda, kao začini u prehrambenoj industriji itd. Komponente etarskog ulja su zaslužne za primarni ukus i aromu pića i drugih prehrambenih proizvoda na bazi ovih biljaka.

2.7.2.1. Nana (*Mentha piperita* L.)

Nana ili menta je trajna zeljasta biljka iz porodice usnatica. Lekoviti deo je ceo nadzemni deo biljke. Stabljika je četvrtasta, granata i dlakava sa dlakavim duguljasto - ovalnim, na vrhu zašiljenim listovima. Sa lica listovi su tamnozeleni, a sa naličja svetliji (slika 2.18.). Lišće nane ima jak i karakterističan miris, a ukus je oštar, aromatičan i hladeći.



Slika 2.18. *Mentha piperita*-nana

Nana se tradicionalno koristi za lečenje digestivnih tegoba, bola u želucu, grčeva, zastoja u varenju i nadutosti. Poznato je i njeno pozitivno dejstvo na respiratorne organe. Etarsko ulje nane ima spazmolitički efekat na želudac i creva, što znači da deluje opuštajuće na mišiće, čime, smanjuje mučninu i reguliše varenje. Utvrđena je antifungalna (Choi et al., 2003; Guynot et al., 2003), antibakterijska

(Giamperi et al., 2002; Mimica-Dukic et al., 2003), antiviralna (Schuhmacher et al., 2003), antioksidativna (Zheng i Wang, 2001; Mimica-Dukic et al., 2003), antialergijska (Inoue et al., 2002) i antitumorna aktivnost biljke (Ohara i Matsuhisa, 2002; McKay i Blumberg, 2006).

U listu nane ima oko 0,5 – 4 % etarskog ulja. Ova aromatična biljka je intenzivno proučavana u pogledu svog hemijskog sastava. Prema literaturnim podacima, najzastupljenija isparljiva jedinjenja nane su mentol i njegovi stereoizomeri, zatim monoterpeni menton, mentil acetat, mentofuran, 1-8 cineol (eukaliptol), limonen, seskviterpen b-kariofilen a u manjim količinama prisutni su pinen, terpinen, mircen i drugi (Aflatuni et al., 2000; Stojanova et al., 2000; Iscan et al., 2002; Shah i Mello, 2004; Zeković et al., 2009; Soković et al., 2009; Derwich et al., 2011; Riachi i De Maria, 2015). Od polifenola u većim količinama prisutni su flavononi (eriocitrin, hisperidin), flavoni (luteolin-7-O-rutinozid), ruzmarinska i kafena kiselina dok su drugi flavonoidi i fenolne kiseline kao što su apigenin, pebrelin, gardenin B, katehin, epigalokatehin galat, rutin, kvercetin, hlorogena i salvianolna kiselina prisutni u malim količinama (Riachi i De Maria, 2015).

Nana igra važnu ulogu u farmaceutskoj i industriji parfema i kozmetičkih proizvoda, a u prehrambenoj industriji se koristi kod proizvodnje raznih vrsta konditora, sladoleda, žvakaćih guma, alkoholnih i funkcionalnih bezalkoholnih pića. U kulinarstvu se koristi kao začim a čaj od nane je jedan od omiljenih i u svetu najčešće korišćenih čajeva.

2.7.2.2. Žalfija (*Salvia officinalis* L.)

Žalfija je višegodišnja, razgranata biljka, iz familije usnatica. Raste divlje, po kamenitim i neplodnim mestima, a uzgaja se i u vrtovima. Lekoviti deo biljke su listovi, koji su srebrnkasto zelene boje, prekriveni sitnim dlačicama (slika 2.19.). Cela biljka je svojstvenog i aromatičnog mirisa. Naziv ove biljke upućuje na njenu lekovitost, jer *officinalis* na latinskom znači lekovit. Pripisuju joj se antibakterijska, antifungalna, antioksidativna, anti-inflamatorna, digestivna i antikancerogena svojstva (Bozin et al., 2007; Sertel et al., 2011; Abu-Darwish et al., 2013). Usled prisustva tanina ispoljava jako adstrigentno delovanje (steže površinu kože i slizokože), pa se koristi za zarastanje rana. Komponente etarskog ulja žalfije pokazale su jaku antibakterijsku aktivnost protiv

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* (Nascimento et al., 2000), kao i i antivirusno delovanje na herpes simpleks 1 (Tada et al., 1994).



Slika 2.19. *Salvia officinalis* - žalfija

U listu ima 1,5 - 2,5 % etarskog ulja, tanina, gorkih jedinjenja diterpenskog tipa (karnozol i karnozinska kiselina), flavonoida, triterpena i voskova (Tucakov, 1971: 291-295; Glisic et al., 2010). U etarskom ulju utvrđeno je prisustvo tujona, zatim, kamfora, kamfen, bornil-acetata, cineola, limonena, pinena i drugih jedinjenja (Radulescu et al., 2004). Komponente žalfije, koje najvećim delom utiču na njena izražena antioksidativna svojstva, su monoterpeni fenoli (eugenol, timol), fenolne kiseline (kafena, ruzmarinska, galna) i flavonoidi (luteolin, apigenin) (Lu i Foo, 2001; Voravuthikunchai i Ifesan, 2011; Martins et al., 2015). Žalfija je korisna sirovina u industriji parfema i farmaceutskoj industriji, a u prehrambenoj industriji se koristi kao začim, u proizvodnji likera i specijalnih rakija (Nikićević i Tešević, 2009).

2.7.2.3. Lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill. subsp. *angustifolia*)

Lavanda je polugrm, koji raste do 60 cm iz familije Lamiaceae. Raste na suvim, toplim i krševitim padinama Mediterana. Cveta u julu i avgustu, a za lekovite potrebe beru se listovi i cvetovi, pre nego što se otvore. Vrhovi grana su obrasli sitnim cvetovima, udruženim u cvasti, slične klasju (slika 2.20.). Osušeni cvetovi su jakog, prijatnog mirisa i malo gorkog ukusa.



Slika 2.20. *Lavandula angustifolia*- lavanda

U cvetovima lavande ima etarskog ulja (1 – 3 %), tanina, kumarinskih derivata, flavonoida, triterpena, i dr (Tucakov, 1971: 388-389; Basch et al., 2004).

Na osnovu literaturnih podataka dobijenih ispitivanjem isparljive frakcije lavande, različitog geografskog porekla, iz Australije, Irana, Indije itd., aromatični sastojci najzastupljeniji u etarskom ulju lavande su: linalil-acetat, linalol, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, borneol, kamfor, geraniol, lavandulil acetat (Cavanagh i Wilkinson, 2002; Shellie et al., 2002; Basch et al., 2004; Afsharypuor i Azarbayejany, 2006; Verma et al., 2010; Hassanpour-Aghdam et al., 2011). Takođe, pregledom literature, kao npr. kod lavande iz Rumunije, može se sresti i podatak koji ukazuje na najveći procenat kariofilena, β – felandrena i 1,8-cineola (Jianu et al., 2013). Standard ISO 3515 propisuje sledeći sastav etarskog ulja lavande: 1,8-cineol, 0 – 15 %; limonen, 0 – 0,5 %; trans- β -ocimen, 2 – 6 %; cis- β -ocimen, 4 – 10 %; 3-oktanon, 0 – 2 %; kamfor, 0 – 0,5 %; linalol, 25 – 38 %; linalil acetat, 25 – 45 %; terpinen-4-ol, 2 – 6 %; lavandulol minimum, 0,3 %; lavandulil acetat minimum, 2,0 %; α -terpineol, 0 – 1 % (ISO 3515, 2002).

Lavanda je relativno bogata polifenolima, koji joj daju antioksidativne sposobnosti. Glavni pigmenti u cvetu su antocijani delphinidin i malvidin, zaslužni za njegovu ljubičastu boju. U listu i cvetu lavande se nalaze i drugi polifenoli, kao što su apigenin, luteolin, ladanein, salvigenin, herniarin, kumarin, ruzmarinska, hlorogena kiselina i ostali (Areias et al., 2000; Lis-Balchin, 2003: 86- 100; Wu et al., 2007). U komparativnim studijama utvrđena je značajna antioksidativna aktivnost infuzija i ekstrakata lavande (Miliauskas et al., 2004; Bouayed et al., 2007). Tradicionalna upotreba lavande se zasniva na njenim karminativnim, spazmolitičkim, antidepresivnim,

antireumatskim, relaksirajućim, antiinflamatornim i mnogim drugim efektima koje ova biljka ispoljava (Hassanpour-Aghdam et al., 2011). Iako su psihološki efekti lavande tek od skoro postali tema naučnih istraživanja, njena upotreba za ublažavanje anksioznosti i stresa je stara narodna tradicija (Lis-Balchin, 2003:155-171). Istraživanja ukazuju i na antimikrobnu aktivnost lavandinog etarskog ulja prema *Mycobacterium* sojevima, *Staphylococcus aureus*, enterokokama rezistentnim na neke antibiotike, kao i prema *Shigella flexneri*, *E. coli* itd. (Gabbrielli et al., 1988; Jianu et al., 2013). Na osnovu rezultata Dorman i Deans-a (2000), antimikrobna aktivnost ove biljke mogla bi se pripisati, između ostalog, i njenim isparljivim komponentama, terpenoidima.

Najčešće se koristi za pripremu čajeva, biljnih kapi, etarskog ulja, kupki ili inhalacija. U prehrambenoj industriji lavanda se može koristiti za aromatizovanje pečenih proizvoda, mlečnih proizvoda, pudinga, konditora, sirupa sa lavandom, bezalkoholnih i alkoholnih pića kao što su specijalne rakije i likeri (Lis-Balchin, 2003: 202; Nikićević i Tešević, 2009).

2.7.2.4. Anis (*Pimpinella anisum* L.)

Anis, iz familije usnatica (Lamiaceae), je poreklom sa istočnog Sredozemlja, ali uspeva i kod nas na peskovito-ilovastom zemljištu, toplom i vlažnom podneblju. Kao lekoviti deo biljke se upotrebljava plod, odnosno zrelo seme (slika 2.21.).



Slika 2.21. *Pimpinella anisum* - anis

Plod je kruškastog oblika, a sa strane malo spljošten, dugacak 3 do 6 mm. Boja ploda je sivo zelenkasta. Prijatnog je i jakog mirisa na anetol, a ukusa slatkog, aromatičnog i naljutog, tzv. “likorisnog” ukusa i mirisa. Plod anisa sadrži 1,5 – 5 %

etarskog ulja, masti, belančevine, šećere i kumarine. ISO standard propisuje 87 – 94 % trans-anetola u etarskom ulju anisa koji je nosilac karakterističnog slatkastog mirisa i ukusa, zatim 1 – 5 % γ -himakalena i 0,5 – 3 % estragola (ISO 3475, 2002). Evropska farmakopeja propisuje limit od 6 % za estragol (European Pharmacopoeia, 2000), a njegov sadržaj se, prema podacima iz literature, može kretati i do 14,5 % (Tepe et al., 2006). Iako se često u hemijskom sastavu etarskog ulja anisa, u malim količinama, mogu naći i anisaldehyd i anis keton, neka istraživanja ukazuju i na njihovo odsustvo (Ullah et al., 2013).

Neispraljiva frakcija se sastoji od flavonoida, fenolnih kiselina, kumarina, sterola i glikozida (Tucakov, 1971: 166-169; Leela i Vipin, 2008). Različite vrste ekstrakata i etarsko ulje anisa ispoljavaju niz bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna (Mohammad Allsmail i Aburjai, 2004), antibakterijska (Ateş i Turgay, 2003), antifungalna (Kosalec et al., 2005), antiviralna (Shukla et al., 1989) itd. Anisu se pripisuju terapijska svojstva kod lečenja neuroloških, digestivnih, ginekoloških i respiratornih poremećaja.

U prehrambenoj industriji koristi se kao začim za ribu, u proizvodnji sladoleda, slatkiša i alkoholnih pića. Likeri i specijalne rakije, aromatizovani anisom, se proizvode širom sveta, pri čemu su poznati francuski perno, turski specijalitet raki, grčki uzo i makedonska mastika (Tucakov, 1971: 166-169; Nikićević i Tešević, 2009; Shojaii i Abdollahi Fard, 2012).

2.7.2.5. Morač (*Foeniculum vulgare* Mill.)

Morač je dvogodišnja ili višegodišnja zeljasta biljka iz familije Apiaceae. Raste divlje ili poludivlje, u podnebljima oko Sredozemnog mora. Cvetovi su žuti, udruženi u guste i velike štitove na vrhu stabla i ogranaka (slika 2.22.). Kod nas se najviše gaji u Vojvodini. Ukusa je vrlo prijatnog, slatkog i aromatičnog, a mirisa je takode prijatnog, svojstvenog i aromatičnog. Plod morača ima stotinak semenki, bogatih eteričnim uljima. Semenke su male i aromatične, pa se koriste kao začim.



Slika 2.22. *Foeniculum vulgare*- morač

Plod morača sadrži i do 7 % etarskog ulja, zatim lipida, ugljenih hidrata, organske kiseline i flavonoide, minerale (Tucakov, 1971:450-454). Kvantitativni sastav ispraljive frakcije (etarskog ulja) se dosta razlikuje u literaturi, u zavisnosti od ekoloških, genetskih i drugih faktora. Na osnovu brojnih literaturnih podataka, najzastupljenija aromatična jedinjenja ploda morača su *trans*-anetol, fenkon, anisaldehyd, estragol, d-limonen i mnoge druge (Miraldi, 1999; Mimica-Dukić et al., 2003; Anwar et al., 2009; Aprotosoae et al., 2010; Roby et al., 2013; Badgular et al., 2014). Od polifenola zastupljenih u moraču navode se fenolne kiseline: hlorogena, neohlorogena, galna, *p*-kumarna, ferulna, cimetna, ruzmarinska kiselina; kao i flavonoidi: kvercetin, apigenin, kampferol, naringenin, eriocitrin, rutin i drugi (Rather et al., 2012; Badgular et al., 2014).

Morač ispoljava niz bioloških aktivnosti, zbog kojih se smatra veoma vrednom i lekovitom biljkom. U literaturi se navodi njegova antibakterijska, antifungalna, antioksidativna (Roby et al., 2013), antiinflamatorna (Choi i Hwang, 2004), estrogena (Albert-Puleo, 1980) i mnoge druge biološke aktivnosti. Morač je dobar karminativ, diuretik (pospešuje izbacivanje tečnosti iz organizma), digestiv i laktagog (pospešuje stvaranje i izlučivanje mleka), a tradicionalno se koristi za podsticanje rada mlečnih žlezda kod dojilja, stomaćnih bolova, dijareje, groznice, gastritisa, kao i kod mnogih drugih bolesti i poremećaja (Rather et al., 2012; Badgular et al., 2014).

Najviše morača troši se za proizvodnju etarskog ulja, koje se koristi za proizvodnju likera, bombona i drugih konditora i sredstava za uživanje. Od morača se u Makedoniji i Grčkoj prave tipična nacionalna žestoka alkoholna pića, a i u našim se

krajevima često dodaje u travaricu. Mastika ili rakija anisonka (u Grčkoj »uzo«) pravi se od slatkog morača. Kao jako aromatična biljka dosta se koristi i u kulinarstvu kao začin.

2.7.2.6. Korijander (*Coriandrum sativum* L)

Korijander je jednogodišnja, zeljasta biljka iz familije Apiaceae, visoka 50—80 cm. Cvetovi su bele boje, a plod je okruglast (sastavljen od dva simetrična ploda, dva perikarpa čvrsto spojena; slika 2.23.). Cveti početkom leta. Osušeni plodovi su prijatnog i aromatičnog mirisa, naljutog i sladunjavog ukusa (Tucakov, 1971: 368-369).

Seme korijandera sadrži oko 1 % etarskog ulja, lipida, belančevina i dr. Sastav etarskog ulja zavisi od bioloških i geografskih karakteristika, pa prema literaturnim podacima dosta varira. U studijama, u kojima je ispitan hemijski sastav etarskog ulja semena korijandera, iz Bangladeša i Pakistana, linalol, geranil acetat i γ -terpinen su navedeni kao glavne komponente (Bhuiyan et al., 2009; Anwar et al., 2011). Zawiślak (2011), od 40 komponenata etarskog ulja, izdvaja linalol, kamfor, α -pinene, geraniol i γ -terpinen kao najzastupljenije. Prema Singh i saradnicima (2006), linalol, geranil acetat, α -pinene su bili glavne monoterpeneske komponente korijandera iz Indije.



Slika 2.23. *Coriandrum sativum* - korijander

Korijander se tradicionalno koristi za buđenje apetita, kod gastro-intestinalnih tegoba, dijareje, bronhitisa, reumatizma. Pripisuju mu se karminativni (delovanje kod stanja nadutosti), spazmolitički, analgetički (ublažavanje bolova) i ekspektorantni efekti (olakšavanje iskašljavanja sluzi iz pluća) (Warrier, 1996; Duke, 2002; Sahib et al., 2013). Od bioloških aktivnosti koje ova biljka ispoljava mogu se izdvojiti antimikrobna (Matasyoh et al., 2009; Begnami et al., 2010), antioksidativna (Hashim et

al., 2005; Nickavar i Abolhasani, 2009), antidijabetesna (Eidi et al., 2009), antiinflamatorna (Reuter et al., 2008) i mnoge druge. Od polifenola, koji utiču na antioksidativna svojstva ploda korijandera, su prisutne pre svega fenolne kiseline, i to hlorogena, kafena, *p*-kumarna, ferulna, elaginska kiselina, kao i flavonoidi kvercetin, kampferol, rutin i kumarini (Msaada et al., 2009; Barros et al., 2012; Dua et al., 2014; Laribi et al., 2015).

Najviše korijandera troši se u industriji likera, peciva, slatkiša i piva. Koristi se i za aromatizovanje specijalnih rakija i drugih žestokih alkoholnih pića.

2.8. Stevija (*Stevia rebaudiana* Bertoni) kao alternativni zaslađivač u prehrambenoj industriji

Stevija, “biljka slatkog lista”, je višegodišnja žbunasta biljka, iz porodice glavočika (Asteraceae), koja doseže visinu i do 1 m. Potiče iz zemalja Južne Amerike (Paragvaj, Brazil), gde se njeni listovi stotinama godina koriste u ljudskoj ishrani, kao prirodni zaslađivač, kao lek protiv šećerne bolesti i visokog krvnog pritiska, za brže zarastanje rana itd. Danas se gaji širom sveta.

Listovi stevije su nazubljeni, eliptičnog oblika, dugi oko 5 cm, a široki oko 2 cm (slika 2.24.). Suvi listovi su slađi od saharoze oko 40 puta, a beru se u kasnu jesen, pre nego što biljka procveta. Pored slatkih komponenata, po kojima je stevija poznata, ova biljka je bogata mineralima, proteinima sa esencijalnim amino kiselinama, vlaknima, flavonoidima, fenolnim i organskim kiselinama, masnim kiselinama, vitaminima, a sadrži i malo etarskog ulja (0,12-0,43 %) (Lemus-Mondaca et al., 2012).

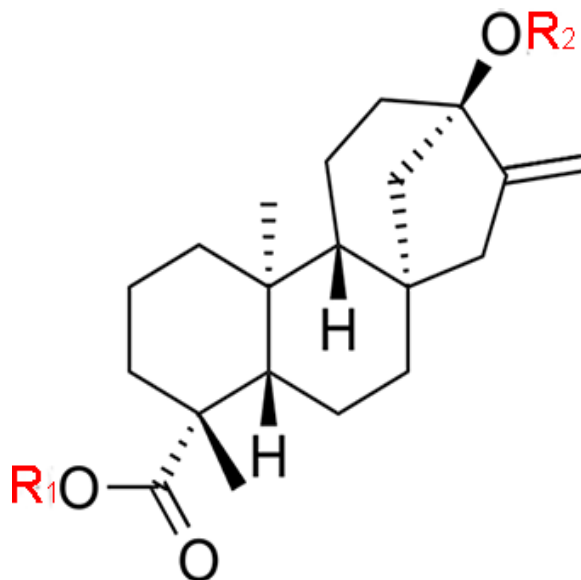


Slika 2.24. *Stevia rebaudiana* - stevija

2.8.1. Steviol glikozidi

Slatka komponenta stevije je prvi put izolovana 1909. godine. Tek 1931. godine je ekstrakt stevije prečišćen do slatkog steviozida, da bi 1952. godine bila utvrđena i njegova hemijska formula, kao diterpenskog glikozida. Steviozid je najzastupljeniji steviol glikozid (4 – 13 %) u lišću stevije. Kasnije su otkriveni i ostali glikozidi stevije, tako da se danas zna za njih deset, od kojih su poznatiji rebaudiozid A (2 – 4 %), rebaudiozid C (1 – 2 %) i dulkozid A (do 1 %). Steviol glikozidi se sastoje od aglikonskog diterpena steviola, i za njega vezane preko C13 i C19 dve šećerne komponente, uglavnom glukoze i ređe ksiloze i ramnoze (R_1 i R_2 na slici 2.25. su šećerne komponente).

Stevija i njeni glikozidi se koriste kao zamena za šećer, za lečenje šećerne bolesti, gojaznosti, hipertenzije i za prevenciju karijesa. Mnoge studije svedoče o terapeutskim efektima steviozida i drugih steviol glikozida, kao npr. antiinflamatornom, antitumornom i diuretičnom efektu (Lemus-Mondaca et al., 2012). Pored toga, izolati različitih delova stevije, kao i njeni slatki glikozidi, pokazali su u mnogim studijama antimikrobnu (Muanda et al., 2011; Ramya et al., 2014; Siddique et al., 2014) i antioksidativnu aktivnost (Shukla et al., 2009; Geuns et al., 2012; Rao et al., 2012; Shevchenko et al., 2013; Ruiz-Ruiz et al., 2015; Carbonell-Capella et al., 2015).



Slika 2.25. Strukturna formula steviol glikozida

Slast mešavine steviol glikozida u različitim odnosima je od 100 do 300 puta jača od saharoze (Nabors, 2011). Kalorijska vrednost suvog lišća stevije iznosi

2,7 kcal/g. To znači da se kao zaslađivač može svrstati u one nisko - kalorične, u koje spadaju i aspartam (4 kcal/g), acesulfam K (bez kalorija), saharin (bez kalorija), sukraloza (bez kalorija) itd. Ipak, ono što steviol glikozide razlikuje od pomenutih zaslađivača je prirodno poreklo i netoksičnost. Istraživanja ukazuju na nepostojanje alergijskih reakcija, mutagenih ili kancerogenih efekata steviol glikozida. Čak ni duža upotreba u ljudskoj ishrani nije dovela do toksičnih efekata (Geuns, 2002; Gawel-Beben et al., 2015). S obzirom da je glikemijski indeks stevije nizak, pogodna je za dijabetičare. Kao alternativa saharozi, steviol glikozidi mogu odigrati veliku ulogu u prevenciji i lečenju gojaznosti.

Za ekstrakciju glikozida iz biljke koriste se razni rastvarači kao što su etanol, metanol, voda, glicerol, propilen glikol, sorbitol itd. Ipak, najčešće se koristi vrela voda, s obzirom da se tako bolje izdvaja polarniji rebaudiozid A, koji je boljeg ukusa od steviozida. Izdvajanje glikozida iz lišća počinje vodenom ekstrakcijom, nakon čega sledi selektivna ekstrakcija polarnim organskim rastvaračem, dekolorizacija, uklanjanje nečistoća filtracijom ili flokulacijom, jonska izmena i konačno kristalizacija (O'Donnell i Kearsley, 2012).

Steviozid i rebaudiozid A su stabilni molekuli koji neznatno ili uopšte ne podležu degradaciji na visokim temperaturama, u kiselj sredini, kao ni pri izlaganju svetlosti, što ih čini prikladnim za primenu u prehrambenoj industriji (O'Donnell i Kearsley, 2012; Lemus-Mondaca et al., 2012).

Steviol glikozidi stevije se proizvode kao komercijalni zaslađivači u Japanu, još od sedamdesetih godina prošlog veka. Međutim, zbog gorkog ukusa steviozida, kao i zbog nedovoljnih naučnih dokaza o netoksičnosti, potencijal stevije bio je dugo zapostavljen u drugim delovima sveta. Rezultati brojnih istraživanja koji ukazuju na zdravstvenu bezbednost upotrebe steviol glikozida, doprineli su da se steviol glikozidi nađu na listi aditiva sa statusom GRAS (*Generally Recognised as Safe*), kao i komercijalizaciji ovih zaslađivača i u Tajvanu, Koreji, Kini, Brazilu, SAD-u, Kanadi, Evropi. Danas se na svetskom tržištu mogu naći prehrambeni proizvodi kojima je biološka aktivnost poboljšana, a kalorijska vrednost smanjena zamenom saharoze stevijom. Tako se glikozidi stevije koriste u proizvodnji žvakaćih guma, sokova i drugih napitaka, stonih zaslađivača, sladoleda i drugih konditorskih proizvoda, kafe, dečje hrane, sosova, pekarskih proizvoda, cerealija, mlečnih proizvoda itd. U Japanu se

glikozidi stevije čak koriste i za poboljšanje senzornih svojstava nekih slanih proizvoda, kao što su riba, meso i morski plodovi.

Zamena šećera stevijom i njenim izolatima u okviru grupe alkoholnih pića još uvek nije aktuelna, ni u nauci ni na tržištu. Za sada se na evropskom tržištu može sresti nisko - alkoholno, fermentisano piće, sa ukusom brusnice, koje je 2011. godine lansirala finska kompanija Hartwall, kao prvo alkoholno piće sa dodatkom steviol glikozida i 30 % manjom energetsom vrednošću (slika 2.26.).



Slika 2.26. Komercijalno alkoholno piće sa dodatkom stevije

Likeri su, zbog prisustva znatne količine šećera, sami po sebi, pića sa visokom kalorijskom vrednošću. Na primer, u jednom popularnom liker, po “šotu” pića (42,62 mL) ima 150 kalorija i 16,4 grama šećera, što je čitavih 38,5 % šećera od “šota” (slika 2.27.). Zato je interesantno ispitati mogućnost zamene dela saharoze niskokaloričnim zaslađivačem. Prirodno poreklo zaslađivača, u tom slučaju, je dodatni razlog za afirmaciju jedne takve inovacije.



Slika 2.27. Količina šećera u jednoj dozi likera

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Osnovni cilj istraživanja bio je dobijanje novih likera sa senzorno najprihvatljivijom kombinacijom odabranih dvanaest lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta, primenom odgovarajućih metoda senzorne analize. S obzirom na bogatstvo u sadržaju biaktivnih jedinjenja, očekuje se da odabrane biljke finalnom proizvodu daju funkcionalna svojstva. Dodatni ciljevi rada su obuhvatali:

- ispitivanje mogućnosti zamene dela saharoze u dobijenom liker u niskokaloričnim zaslađivačem prirodnog porekla, steviol glikozidom, koji se dobija iz biljke stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni),
- utvrđivanje postignutih funkcionalnih svojstava dobijenih likera analizom njihove antioksidativne i antimikrobne aktivnosti, uz poređenje sa popularnim komercijalnim pićima, koji spadaju u istu ili sličnu grupu proizvoda kao dobijeni likeri,
- komparativna analiza antioksidativne i antimikrobne aktivnosti odabranih dvanaest lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta
- statističko poređenje rezultata svih primenjenih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti, u cilju ispitivanja pouzdanosti primene dve relativno nove polarografske metode, HPMC i MRAP, na kompleksnim uzorcima kao što su uzorci pića i etanolni biljni ekstrakti,
- analiza isparljive frakcije odabranog aromatičnog i začinskog bilja.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Polazni biljni materijal

Biljni materijal je prikupljan tokom 2012. godine sa polja u vlasništvu firme "Bilje Borča" (Beograd – Srbija) koja se nalaze u različitim delovima Srbije, dok su neke biljne vrste uvezene. Za istraživanje su odabrane sledeće biljne vrste:

- *Centaureum erythraea* Rafn subsp. *erythraea* (sinonim: *Centaureum umbellatum* Gilib.), Gentianaceae familija, kičica, čiji je nadzemni deo uvezen iz Albanije a prikupljen tokom cvetanja biljke u septembru 2012. godine;
- *Gentiana lutea* L. subsp. *symphyandra* (Murb.) Hayek, Gentianaceae familija, lincura, čiji je koren prikupljen na planini Kopaonik u aprilu 2012. godine u fazi mirovanja biljke;
- *Artemisia absinthium* L., Asteraceae (Compositae) familija, pelin, čiji je nadzemni deo prikupljen na planini Jastrebac u središnjoj Srbiji, u julu 2012. godine, u fazi cvetanja biljke;
- *Teucrium montanum* L., Lamiaceae (Labiatae) familija, iva, čiji je nadzemni prikupljen u Soko banji u junu 2012. godine tokom cvetanja;
- *Teucrium chamaedrys* L., Lamiaceae (Labiatae) familija, podubica, čiji je nadzemni deo prikupljen u Južnoj Srbiji, u blizini Niša, u junu 2012. godine u fazi cvetanja biljke;
- *Tussilago farfara* L., Asteraceae (Compositae) familija, podbel, čiji su listovi koji su dostigli dužinu veću od 10 cm prikupljeni u Južnoj Srbiji, u blizini Niša, u maju 2012. godine;
- *Mentha piperita* L., Lamiaceae (Labiatae) familija, nana, čiji su listovi prikupljeni u Vojvodini, Severnobanatski okrug, u naselju Padej u junu 2012. godine u fazi pred cvetanje;
- *Salvia officinalis* L., Lamiaceae (Labiatae) familija, žalfija, čiji su listovi uvezeni iz Crne Gore a prikupljeni su krajem maja 2012. godine u fazi cvetanja;
- *Lavandula angustifolia* Mill. subsp. *angustifolia* (sinonim: *Lavandula officinalis* Chaix), Lamiaceae familija, lavanda, čiji su cvetovi uvezeni iz Hrvatske a prikupljeni su tokom u junu 2012. godine pre punog cvetanja;
- *Pimpinella anisum* L., Lamiaceae (Labiatae) familija, anis, čiji su uvezeni iz Egipta, a prikupljeni su u junu 2012. godine u fazi pune zrelosti ploda;

- *Foeniculum vulgare* Mill., Apiaceae (Umbelliferae) familija, morač, čiji su plodovi uvezeni iz Egipta a prikupljeni su u fazi pune zrelosti krajem jula 2012. godine, i
- *Coriandrum sativum* L., Apiaceae familija, korijander, čiji su plodovi prikupljeni u punoj zrelosti tokom jula 2012. godine, u naselju Rusko Selo u Vojvodini, Severnobanatski okrug.

Vaučer primerci odabranih biljaka su identifikovani i deponovani na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na Katedri za agrobotaniku.

4.2. Priprema ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja za dobijanje likera i određivanje antioksidativne aktivnosti

Biljke su sušene u prostorijama fabrike "Bilje Borča" u Beogradu na vazduhu prirodnim putem u tankim slojevima na sobnoj temperaturi (20°C). U laboratoriji iste fabrike, osušen i usitnjen biljni materijal je ekstrahovan u perkolatoru kontinualnom maceracijom pomoću 65 %, vodeno-etanolnog rastvora (napravljenog od 96 % etanola Ada vrenje, Srbija, Beograd) u trajanju od 48h, na sobnoj temperaturi (20°C). Biljni materijal je zatim uklonjen filtracijom i mehanički isceden. Količina dobijenog ekstrakta u odnosu na početnu količinu biljnog materijala iznosila je 5:1. Dobijeni ekstrakti korišćeni su za pripremu likera kao i za određivanje antioksidativne aktivnosti.

4.3. Priprema likera za analize

Likeri za senzornu, antioksidativnu i antimikrobnu analizu su pripremani od 65% vodeno - etanolnih ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, na Katedri za tehnologiju konzervisanja i vrenja, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Za odabir senzorno najprihvatljivije kompozicije biljnih ekstrakata napravljene su tri mešavine (baze) pojedinačnih ekstrakata odabranih dvanaest biljnih vrsta, tako da je količina od 384,6 mL finalne mešavine sadržala ekstrakte iz grupe biljaka sa gorkim materijama (grupa gorkih biljaka) i iz grupe aromatičnih i začinskih biljaka, u odnosu 1:1, 1:2 i 1:3, kao u tabeli 4.1. Nana je činila polovinu sadržaja aromatičnih biljaka, zbog svoje karakteristične, osvežavajuće i univerzalno dopadljive arome.

Tabela 4.1. Biljni sastav u uzorcima likera korišćenim za odabir najprihvatljivije kombinacije biljnih ekstrakata u piću

		Odnos gorkih i aromatičnih ekstrakata		
		1:1	1:2	1:3
Ekstrakti iz grupe gorkih biljaka	Količina biljnih ekstrakata u piću (mL)			
	Iva	32,05	21,35	16,02
	Kičica	32,05	21,35	16,02
	Podbel	32,05	21,35	16,02
	Podubica	32,05	21,35	16,02
	Pelin	32,05	21,35	16,02
	Lincura	32,05	21,35	16,02
	Ukupno	192,30	128,10	96,15
Ekstrakti iz grupe aromatičnih i začinskih biljaka	Količina biljnih ekstrakata u piću (mL)			
	Nana	96,15	128,10	144,22
	Anis	19,23	25,62	28,85
	Lavanda	19,23	25,62	28,85
	Morač	19,23	25,62	28,85
	Korijander	19,23	25,62	28,85
	Žalfija	19,23	25,62	28,85
	Ukupno	192,30	256,20	288,45

Dobijene mešavine su razblažene do jačine etanola od 25 % (v/v), dodavanjem 615,40 mL česmenske vode (Gradski vodovod Beograd). Na kraju je dodato:

- 85 g saharoze, kao sredstva za zaslađivanje,
- 2 mL glicerola, kao punioca ukusa,
- 2 mL karamela E150d, kao poboljšivača boje.

Za poređenje odabrana komercijalna pića, koja pripadaju grupi aperitiva i digestiva, Anderberg (Underberg), Jegermajster ili Jeger (Jägermeister) i Gorki list, , kupljena su u lokalnoj prodavnici pića u Beogradu, Srbija. Biter 55 (Bitter 55) i Biter 54 (Bitter 54) su poklonjeni do strane Katedre za tehnologiju konzervisanja i vrenja, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Gorki tonik iz grupe farmaceutskih proizvoda, Pervivo, kupljen je u lokalnoj apoteci. Sastav odabranih komercijalnih proizvoda prikazan je u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Sastav odabranih komercijalnih i pića dobijenih u ovom istraživanju

Komercijalna pića	Sastav pića
Anderberg	44 % (v/v) alkohola i 4,8 % šećera, nepoznat broj biljaka
Biter 54	35 % (v/v) alkohola, 46 vrsta lekovitog i aromatičnog bilja, 8 vrsta voća, 88,22 g/L suvog ekstrakta, 75 g/L šećera, aditiv E160d (karamel) za mrku boju
Biter 55	Biter 54 sa dodatkom 10 g/L plodonosnog tela gljive <i>Ganoderma lucidum</i> maceriranom u trajanju od 30 dana
Jeger	35 % (v/v) alkohola, 56 vrsta lekovitog i aromatičnog bilja i voća
Gorki list	28 % (v/v) alkohola, 27 lekovitih i aromatičnih biljaka sa dominantnim pelinom
Pervivo	40 % (v/v) alkohola, 25 vrsta biljnih vrsta

4.4. Senzorna analiza dobijenih i komercijalnih pića

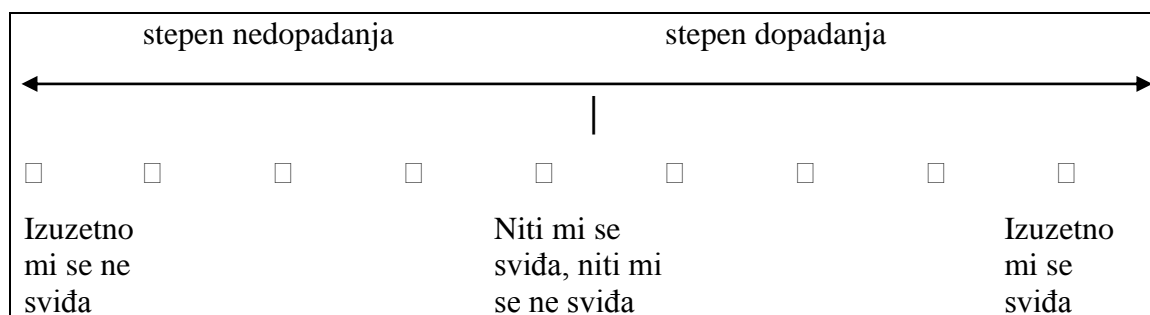
Uzorci su za senzornu analizu čuvani u staklenim flašama i servirani na sobnoj temperaturi ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Za metodu bodovanja uzorci su servirani u čašama od bezbojnog tankog stakla, a za sve ostale metode u plastičnim čašama obeleženim trocifrenim šiframa. Uzorci su nasumično poređani, tako da ocenjivač ne zna redosled uzoraka koji su ispred njega. Česmenska voda je korišćena za neutralisanje čula između uzoraka.

4.4.1. Hedonski test

Testiranje mišljenja potrošača obavljeno je, prvenstveno, u cilju odabira najprihvatljivije kombinacije biljaka u pićima sa različitim udelima gorkih i aromatičnih biljaka. Ukupno je testirano 30 potrošača, i to ljubitelja biljnih likera i sličnih proizvoda. Od ispitanika je traženo da ocene stepen prihvatljivosti odabranih senzornih svojstava i ukupnu prihvatljivost proizvoda (kao celine), primenom hedonske skale od 9 podeoka (slika 4.1.). Centralna vrednost hedonske skale se odnosi na indiferentan stav potrošača prema proizvodu (“*niti mi se dopada niti mi se ne dopada*”), od koje na desnu stranu raste stepen dopadanja, a na levu stepen nedopadanja (Meilgaard, Civille i Carr, 1999; Lawless i Heymann, 2010). Podeoci se označavaju na sledeći način:

- izuzetno mi se dopada,
- veoma mi se dopada,

- umereno mi se dopada,
- pomalo mi se dopada,
- niti mi se dopada, niti ne dopada,
- pomalo mi se ne dopada,
- umereno mi se ne dopada,
- veoma mi se ne dopada i
- izuzetno mi se ne dopada.



Slika 4.1. Hedonska skala korišćena za ispitivanje stepena prihvatljivosti odabranih senzornih svojstava

4.4.2. Metod određivanja magnitude

Metod određivanja magnitude korišćen je za izračunavanje relativne slasti steviol glikozida, koji će u različitim udelima zameniti saharozu u piću. Od dodatno napravljenih količina nezaslađenog pića, a na osnovu literaturnih podataka, napravljeni su rastvori sa različitim koncentracijama saharoze i steviol glikozida (95 %-na čistoća, sa 60 % rebaudiozidom A, MedHerbs, Nemačka), kao u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Koncentracije zaslađivača i saharoze u piću korišćene za određivanje relativne slasti steviol glikozida

Zaslađivač	Koncentracije za određivanje relativne slasti steviol glikozida u odnosu na 8,5 % (m/v) saharoze				
Saharoza	3,32	5,31	8,50	13,60	21,76
Steviol glikozid	0,01	0,02	0,03	0,05	0,07

Petnaest, prethodno obučanih laika, određivalo je intenzitet slasti navedenih pića, upoređivanjem sa referentnim uzorkom, koji je sadržao 8,5% (m/v) saharoze, i kome je zato dodeljena brojčana vrednost 1. Šifrovani uzorci pića, obeleženi trocifrenim

bojevima, su nasumično servirani ocenjivačima, a pre svakog je serviran i referentni uzorak. Za percepciju slasti, dvostruko jaču od referentnog uzorka, dodeljivana je vrednost 2, za upola slabiji intenzitet - 0,5, bez mogućnosti korišćenja nule (ISO 11056:1999; Cardello et al., 1999; Lawless i Heymann, 2010:156; Cadena i Bolini, 2012; Dutra i Bolini, 2014). Konstruisana je kriva zavisnosti logaritma koncentracije saharoze ili steviol glikozida i intenziteta slasti zaslađivača (prikazano u poglavlju 4.1.), koja predstavlja funkciju (Stone i Sidel, 2004):

$$S=aC^n$$

u kojoj je:

S- intenzitet slasti,

C - koncentracija zaslađivača,

a - antilogaritam odsečka na y -osi,

n - nagib krive.

Na osnovu izračunate relativne slasti steviol glikozida metodom magnitude, napravljena su pića u kojima je zamenjeno 25 %, 50 %, 75 % i 100 % saharoze odgovarajućom količinom praha istog. To znači da je u piće, umesto dela saharoze dodato 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,3 g/L i 0,4 g/L praha steviol glikozida, odnosno: 63,5 g saharoze i 0,1 g steviol glikozida; 42,5 g saharoze i 0,2 g steviol glikozida; 21,25 g saharoze i 0,3 g steviol glikozida; 0 g saharoze i 0,4 g steviol glikozida.

4.4.3. Deskriptivna senzorna analiza

Deskriptivna senzorna analiza korišćena je za dobijanje senzornog profila pića sa različitim udelima steviol glikozida i saharoze, a u cilju ispitivanja uticaja steviol glikozida na važnije senzorne atribute (Meilgaard, Civille i Carr, 1999; Lawless i Heymann, 2010).

Senzorni panel se sastojao od 8 osoba, eksperata sa iskustvom u senzornom ispitivanju, proverenih u pogledu funkcionisanja i osetljivosti čula u skladu sa standardom ISO 8586-1:1993. Ocenjivački list se sastojao od senzornih svojstava i njihovih definicija, koje su prikazane u tabeli 4.4. Za ispitivanje intenziteta senzornih svojstava korišćena je intervalna skala od 15 podeoka (slika 4.2.). Levi kraj skale označava najslabiji intenzitet određenog svojstva, dok desni kraj linije označava najjači intenzitet. Ocenjivači su koristili skale po slobodnom izboru, ispitujući

intenzitet pojedinih svojstava međusobnim upoređivanjem uzoraka. Pri tome, prvo je servirano kontrolno piće (sa saharozom, bez steviol glikozida), a ocenjivači su upućeni tako da intenzitet opisnih parametra kod istog boduju upoređivanjem u odnosu na druga pića iz grupe aperitiva i digestiva, biljnih likera i bitera gorkog ukusa. Senzorni profil ostalih uzoraka, u kojima je deo saharoze zamenjen prahom steviol glikozida, upoređen je sa kontrolnim uzorkom.

Tabela 4.4. Spisak ispitivanih senzornih svojstava sa definicijama.

Senzorno svojstvo	Definicija
Osnovni ukusi	
Slatko	Ukus koji proizvode vodeni rastvori saharoze i drugih šećera
Gorko	Ukus koji proizvode vodeni rastvori kinina
Ukusnost	
Mentol	Ukus koji potiče od mentola iz nane
Anis	Ukus koji potiče od anetola iz anisa
Alkohol	Ukus koji potiče od etanola
Veštačka slast	Ukus koji podseća na veštačke zaslađivače (npr. aspartam u žvakama)
Karamel	Ukus koji podseća na karamelu
Hemijski osećaj	
Punoća	Utisak bogatog i intenzivnog ukusa i glatkog klizenja tečnosti preko sluzokože u ustima
Trpkost	Osećaj skupljanja sluzokože u ustima, kao npr. usled konzumiranja crnog vina bogatog taninima
Hladeći osećaj	Osećaj koji najčešće potiče od proizvoda na bazi mentola
Astrigencija	Osećaj sušenja u ustima koji podseća na jače napravljeni zeleni čaj
Naknadni ukus	
Gorko	Gorak ukus koji se zadržava u ustima do 1minut nakon gutanja uzorka
Slatko	Sladak ukus koji se zadržava u ustima do 1minut nakon gutanja uzorka
Metalni ton	Ukus koji se zadržava u ustima do 1minut nakon gutanja uzorka, a podseća na metal

□ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □ □

Slabo izraženo

Jako izraženo

Slika 4.2. Izgled skale za ispitivanje intenziteta odabranih senzornih svojstava

4.4.4. Metod rangiranja

Metod rangiranja korišćen je za odabir optimalne koncentracije steviol glikozida u piću, kao zamene 25 %, 50 %, 75 % i 100 % za saharozu. Učestvovalo je 30 ocenjivača, ljubitelja gorkih biljnih likera i bitera, koji su rangirali 5 uzoraka sa različitim udelima steviozida i saharoze od 1 do 5, u smislu sveukupne dopadljivosti. Prvo mesto dodeljivano je uzorku koji se panelistima najviše dopao, peto mesto najmanje dopadljivom uzorku, dok su ostali bili između. Analizirana je dobijena suma rangova za svaki uzorak, pri čemu je najmanju sumu imao najdopadljiviji uzorak (Choonhahirun et al., 2006).

4.4.5. Metod bodovanja

Metod bodovanja korišćen je za poređenje senzornog kvaliteta dobijenih likera sa sličnim komercijalnim proizvodima sa tržišta, koji pripadaju grupi aperitiva i digestiva. U ocenjivačkom panelu učestvovalo je 5 ocenjivača, eksperata u oblasti senzorne analize alkoholnih pića. Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1 do 5, uz korišćenja decimalnih brojeva (sa bodovnim opsegom od 0,10 jedinica; npr. 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5 itd.). Kvalitet određenog senzornog svojstva je, na sledeći način, određen ocenama:

- 1-2,5: nedovoljan;
- 2,5 – 3,5: dovoljan;
- 3,5 – 4,0: dobar;
- 4,0 – 4,5: vrlo dobar;
- 4,5 – 5: odličan.

S obzirom da pojedinačna svojstva kvaliteta nemaju jednak uticaj na ukupni kvalitet, za svako odabrano svojstvo određen je koeficijent važnosti (KV), pomoću kojeg je data ocena korigovana (množenjem sa KV). Ukupan senzorni kvalitet odabranih pića je definisan i ocenjen preko sledećih pet parametara kvaliteta, sa određenim koeficijentima važnosti: boja - 0,2; bistrina - 0,2; tipičnost - 0,4; miris - 1,2 i ukus - 2. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na ukupan kvalitet, a izbalansirani tako da njihov zbir iznosi 20. Na osnovu izračunatih prosečnih ocena za svako svojstvo, kao i prosečnih ocena ukupnog kvaliteta, kvalitet proizvoda podeljen je u sledećih 6 kategorija:

- veoma loš kvalitet (diskvalifikacija), ocena ispod 10,00– znatni nedostaci izraženi u toj meri da se proizvod ne može upotrebljavati prema prvobitnoj nameni;
- nezadovoljavajući kvalitet (NM – nema medalje), ocena od 10,01 do 14,00- nedostaci koji su ispod minimalnog zahteva kvaliteta, ali bi proizvod uz odgovarajuću doradu mogao da se koristi prema prvobitnoj nameni;
- dobar kvalitet (BM – bronzana medalja), ocena od 14,01 do 16,00- uočljivi nedostaci, koji nisu ispod minimalnih zahteva kvaliteta;
- vrlo dobar kvalitet (SM – srebrna medalja), ocena od 16,01 do 18,00- manji nedostaci;
- odličan kvalitet (ZM – zlatna medalja), ocena od 18,01 do 18,50- pozitivna svojstva, bez nedostataka;
- vrhunski kvalitet (VZM – velika zlatna medalja), ocena od 18,50 do 20,00- izražena pozitivna svojstva, bez nedostataka.

4.5. Određivanje antioksidativne aktivnosti

4.5.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola metodom Folin–Ciocalteu (FC)

Hemijski sastav Folin-Ciocalteu reagensa nije sa sigurnošću poznat, ali je prihvaćeno da sadrži fosfomolibdensku i fosfovolframovu kiselinu. Reakcija se zasniva na prelazu elektrona sa antioksidansa na molibden, u alkalnoj sredini. Fenoksid jon iz uzorka se oksiduje, a FC reagens redukuje, uz formiranje plavog oksida volframa i molibdena. Intenzitet nastalog plavog obojenja meri se pri 750 nm-765 nm. Do reakcije između antioksidansa i FC reagensa dolazi samo ako je ispunjen uslov alkalnosti (pH ~ 10; Karadag, Ozcelik et al., 2009).



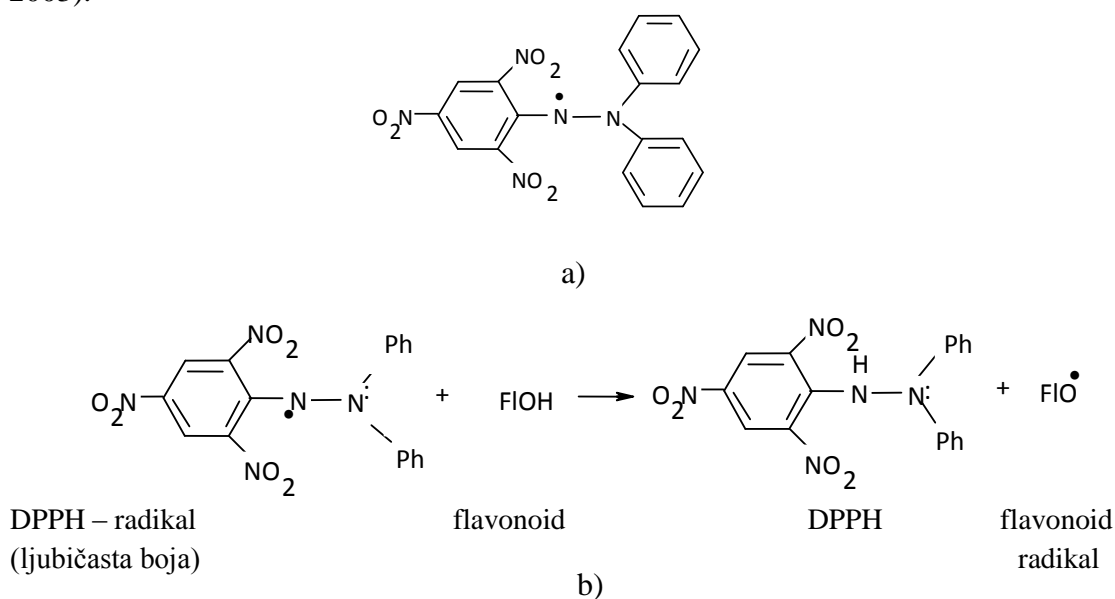
Postupak

Sadržaj ukupnih fenola, odnosno ukupna redukujuća moć u biljnim ekstraktima, je određena pomoću FC metode, po modifikovanoj metodi po Singleton-u (1999). U rastvor biljnih ekstrakata (200 µL) je dodato 1000 µL FC reagensa (Merck, Darmstadt, Nemačka) rastvorenog destilovanom vodom (1:10). Posle 6 min stajanja na tamnom mestu, dodato je 800 µL rastvora natrijum karbonata (7,5 %), u cilju zadovoljenja uslova alkalnosti. Rastvor je promešan i ostavljen 2 h na tamnom mestu. Izmerena je apsorbanca na 740 nm, A_{740} . Kao slepa proba korišćena je destilovana voda. Sva

merjenja su rađena u tri ponavljanja. Isti postupak ponovljen je za 4 razblaženja ekstrakta, a rezultat je predstavljao njihovu srednju vrednost. Eksperimentalno je utvrđeno da odgovarajuća vrednost razblaženja svakog ekstrakta (1:10 do 1:5) daje apsorbancu od 0,2 do 0,7 na 740 nm. Od apsorbance svakog uzorka oduzeta je srednja vrednost slepe probe. Isti postupak urađen je za sve 4 koncentracije galne kiseline kao standarda (10, 25, 50, i 100 µg/mL), a zatim je konstruisana kalibraciona kriva standarda galne kiseline. Iz jednačine krive izračunat je sadržaj ukupnih fenola u uzorku. Rezultati su izraženi preko ekvivalenta galne kiseline (µg GAE /mL) koji odgovara apsorbanci razblaženja ekstrakta na 740 nm. Za sva spektrofotometrijska merjenja korišćen je spektrofotometar Helios γ (ThermoSpectronic, Velika Britanija).

4.5.2. Određivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Ovo je jedan od najkomercijalnijih spektrofotometrijskih testova za određivanje antioksidativne aktivnosti. Slobodni DPPH• radikal (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; slika 4.3.a) je dobro poznati “hvatač” drugih slobodnih radikala i koristi se za određivanje antioksidativne sposobnosti, najčešće prirodnih, sekundarnih metabolita da mu predaju labilan vodonikov atom. Ovaj mehanizam predstavlja najčešći i najjednostavniji mehanizam antioksidativne zaštite ($\text{DPPH}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{DPPH-H} + \text{A}\cdot$) (Goupy et al., 2003).



Slika 4.3. Strukturna formula DPPH•(a) i šematski prikaz reakcije DPPH• sa molekulom flavonoida FIOH (b)

Apsorpciona traka DPPH radikala se nalazi na oko 520 nm, što rastvoru ovog molekula daje intenzivnu ljubičastu boju. Redukcijom u prisustvu elektron-donorskih molekula, koji imaju sposobnost “davanja” svojih labilnih H atoma molekulu DPPH, dolazi do promene strukture molekula i pomeranja apsorpcionog maksimuma u oblast oko 350 nm, što rastvoru redukovano oblika daje žutu boju (slika 4.3. b). Ovakve promene omogućavaju i vizuelno praćenje reakcije redukcije DPPH radikala. U slučaju gde su strukture elektron-donorskih vrsta nepoznate (npr. biljni ekstrakti) navedeni metod daje podatke o redukcionom potencijalu uzorka. To je značajno za poređenje redukcionih potencijala poznatih materijala.

Postupak

Korišćena je metoda po Blois-u (1958) sa malim modifikacijama. Praćena je promena apsorpcije na 525 nm preostalog DPPH ljubičaste boje posle reakcije sa antioksidansima uzorka. Radni rastvor se sastojao od $1,86 \times 10^{-4}$ mol/L DPPH (Fluka, Buchs, Switzerland), u etanolu i 0,1 M acetatnog pufera (pH 4,3) u odnosu 2:1 (v/v). Razblaženja biljnih ekstrakata (200 μ L) su pomešana sa 2800 μ L radnog rastvora DPPH. Nakon stajanja navedenog rastvora na tamnom mestu 30 min, izmerena je A_{525} . Isti postupak ponovljen je za slepu probu (etanol ili destilovana voda). Merenje se izvodi na sobnoj temperaturi. Kao standard korišćen je rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8- tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka). Aktivnost je izražena u % inhibicije izračunatih po jednačini:

$$I (\%) = \frac{A_{SP} - A_{UZ}}{A_{SP}} \times 100$$

gde je:

I – procenat inhibicije DPPH radikala,

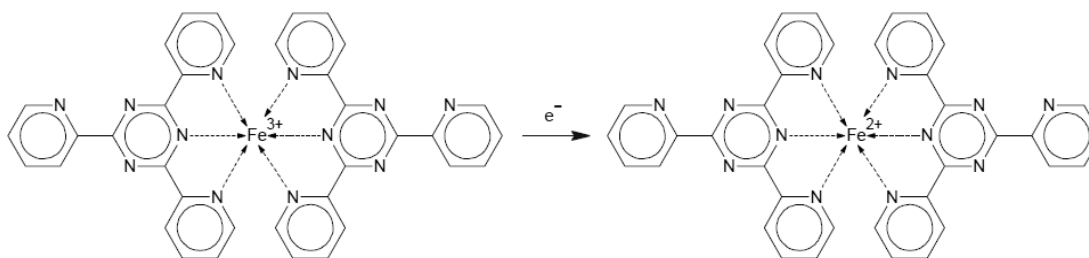
A_{SP} - aktivnost slepe probe,

A_{UZ} -aktivnost antioksidansa.

Iz jednačine krive, koja predstavlja zavisnost % inhibicije DPPH radikala od koncentracije Trolox-a, izračunata je antiradikalska aktivnost. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja \pm standardna devijacija, i izraženi su kao mM Trolox-a ekvivalenata (mM TE).

4.5.3. Određivanje ukupne redukujuće moći FRAP metodom

Ovo je jedna od najbržih metoda i veoma pogodna za rutinske analize. Zasniva se na redukciji žutog feri-tripiridiltriazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ), pri niskoj pH (3,6) i pod uticajem elektron-donirajućih antioksidanasa, u intenzivno plavo obojeni fero kompleks (Fe(II)-TPTZ), sa apsorpcionim maksimumom na 593 nm (slika 4.4.). Vrednost apsorbance je linearno proporcionalna koncentraciji antioksidanasa u rastvoru, a za konstrukciju standardne krive najčešće se upotrebljavaju rastvori askorbinske kiseline, Trolox-a i FeSO₄. Jedna FRAP jedinica je definisana kao količina antioksidansa koja je potrebna za redukciju 1 mol Fe(III) u Fe(II). FRAP vrednost za askorbinsku kiselinu i Trolox iznosi 2,0.



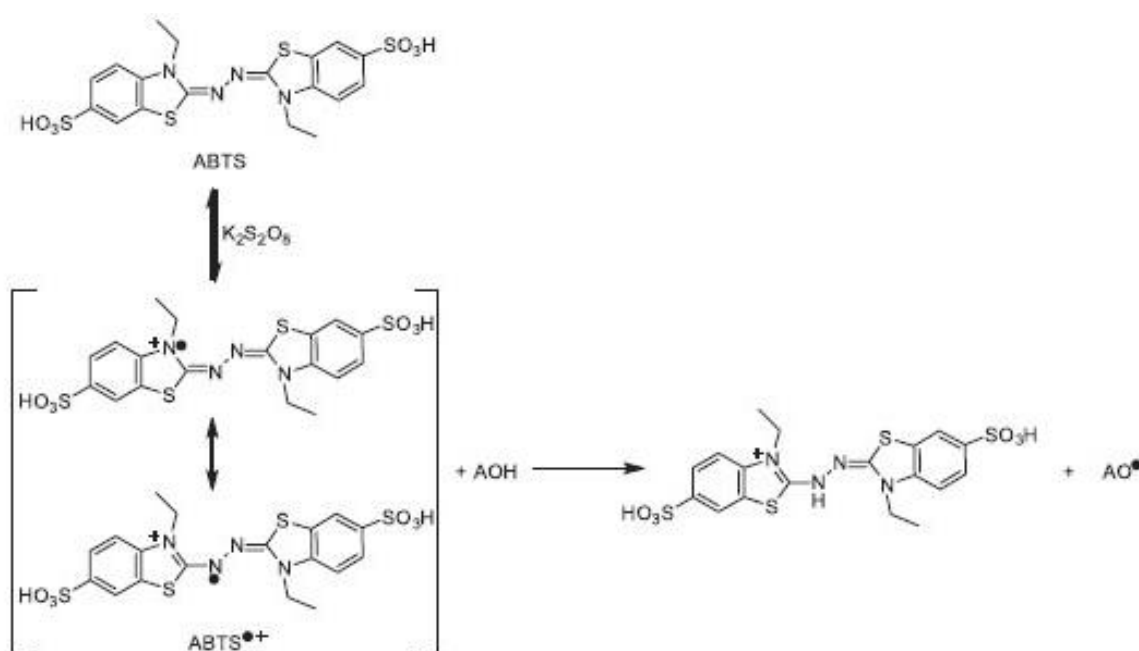
Slika 4.4. Reakcija redukcije Fe³⁺-TPTZ kompleksa (Lesjak, 2011)

Postupak

Metoda je izvedena po modifikovanom postupku Benzie i Strain-a, (1996). Rastvor FRAP reagensa je napravljen mešanjem acetatnog pufera (pH 3,6), TPTZ (10 mM TPTZ rastvora u 40 mM HCl; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka) i FeCl₃ × 6H₂O u zapreminskom odnosu 10:1:1, po navedenom redosledu. Svi uzorci, standardi i reagensi, su prethodno inkubirani na 37 °C. Alikvoti od 0,1 mL svakog razblaženja ekstrakta su pomešani sa destilovanom vodom (0,3 mL) i FRAP reagensom (3 mL). Nakon 40 min na 37 °C, izmerena je apsorbanca A₅₉₃. Kalibraciona kriva je konstruisana pomoću rastvora Trolox-a. Slepa proba bila je destilovana voda umesto uzorka i standarda. Iz razlike apsorbanacije uzorka i slepe probe dobijena je apsorbanacija za svaki ekstrakt. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja ± standardna devijacija, i izraženi su kao mM Trolox-a ekvivalenata (mM TE).

4.5.4. Određivanje sposobnosti neutralizacije ABTS radikala (TEAC metoda)

Metoda TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) je zasnovana na sposobnosti molekula antioksidanasa da redukuju stabilni ABTS^{*+} [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)] radikal. Plavo-zeleni katjonski ABTS^{*+} radikal se dobija reakcijom između ABTS i kalijum-persulfata (K₂S₂O₈) i pokazuje apsorpcione maksimume na 645 nm, 734 nm i 815 nm. Dodatkom antioksidanasa, radikal se redukuje, pri čemu dolazi do dekolorizacije, koja je proporcionalna koncentraciji antioksidanasa i trajanju reakcije (slika 4.5.).



Slika 4.5. Reakcija između ABTS i kalijum-persulfata (K₂S₂O₈) i dobijenog katjonskog ABTS^{*+} radikala sa antioksidansom (AOH) (Oliveira et al., 2014)

Postupak

Metoda je izvedena po modifikovanom postupku Re-a i saradnika (1999). Iste zapremine od 14 mM rastvora ABTS (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nemačka) i 4,9 mM kalijum persulfata u fosfatnom puferu (pH 7,4), su pomešane u cilju dobijanja stabilnog ABTS⁺ osnovnog rastvora. Stajanjem na tamnom mestu 12 – 16 h na sobnoj temperaturi osnovni rastvor poprima tamnu plavo-zelenu boju. Radni rastvor ABTS⁺ pripremljen je razblaživanjem osnovnog rastvora (oko 80 puta) sa fosfatnim puferom, dok nije postignuta apsorbanca od A₇₃₄ 0,7 ± 0,02 na λ=734 nm. Šest minuta nakon dodatka biljnih ekstrakata (30 μL), odnosno Trolox standarda (2,5; 1,25; 0,63; 0,31; i

0,16 mM Troloksa u fosfatnim puferom) radnom rastvoru izmerena je apsorbanca. Za svaki uzorak i standardni Trolox rastvor konstruisana je kriva zavisnosti inhibicije $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radikala (procenat pada apsorbanacije) u funkciji koncentracije. Slepa proba bila je destilovana voda, umesto uzorka i standarda. Iz razlike apsorbanacije uzorka i slepe probe dobijena je apsorbanacija za svaki ekstrakt. Antioksidativna aktivnost, dobijena je iz odnosa nagiba krive uzorka i nagiba krive Troloks-a. Sva merenja su rađena u tri ponavljanja, a dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri merenja \pm standardna devijacija, i izraženi su kao mM Trolox-a ekvivalenata (mM TE).

4.5.5. DC polarografsko merenje antioksidativne aktivnosti

Za određivanje antioksidativne aktivnosti primenjene su dve polarografske metode, zasnovane na klasičnoj polarografiji sa kapajućom Hg-elektrodom (KŽE): HPMC (HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex) metoda i MRAP (Mercury Reduction Antioxidant Power) metoda, nedavno razvijene u Elektrohemijskoj laboratoriji Instituta za opštu i fizičku hemiju (Sužnjević et al., 2011, 2015).

Polarografska merenja u ovom radu obavljena su polarografskim uređajem PAR (Princeton Applied Research) 174A sa priključenim X-Y pisačem (Houston Instruments, Omnigraph 2000), za automatsko beleženje polarografskih i-E krivih. Kapacitivna komponenta struje i-E signala suzbijana je filterom instrumenta na poziciji 3 s. Zasićena kalomelova elektroda (Saturated Calomel Electrode- SCE), je korišćena kao referentna, a kao pomoćna platinska elektroda. Početni potencijali kod HPMC i MRAP metoda su 0,10 i 0,20 V vs SCE, po navedenom redosledu. Brzina promene polarizujućeg napona iznosila je 10 mV/s. ClarkLubs (CL) pufer od pH 9,8, pripremljen je mešanjem 25 mL 0,4 M H_3BO_3 , 25 mL 0,4 M KCl i 40,8 mL 0,2 M NaOH (Merck, Darmstadt, Nemačka).

Osnovni rastvor za HPMC metodu pripremljen je dodatkom 0,100 mL 1,00 M rastvora H_2O_2 (Belinka - Slovenija) u 19,9 mL CL pufera. Jednake količine od po 20 μL razblaženog (1:2) i nerazblaženog uzorka su postepeno dodavane, kako bi se dobio linearan pad anodne granične struje i_l .

Osnovni rastvor za MRAP metodu je pripremljen dodatkom 2 mL 0,01 M HgCl_2 u 18 mL CL pufer. Jednake količine nerazblaženog uzorka (100, 50 ili 25 μL) su postepeno dodavane, kako bi se dobio linearan pad katodne granične struje.

Pre svakog snimanja i-E krive (kako za osnovni rastvor, tako i nakon svakog dodatka ispitivanog uzorka), rastvor je deaerisan i pomešan sa čistim gasom azota, dok je struja istog propuštana iznad rastvora za vreme svakog snimanja.

Rezultati polarografskih metoda su izraženi kao nagib linearnog dela krive zavisnosti procenta smanjenja anodne struje kompleksa, odnosno katodne struje, od zapremine ili količine dodatog uzorka.

4.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti

4.6.1. Priprema uzoraka za određivanje antimikrobne aktivnosti

S obzirom da je većina identifikovanih jedinjenja, koja poseduju antimikrobne sposobnosti, organske prirode, aromatične ili zasićene hemijske strukture, ekstrakcija etanolom obično predstavlja najbolje rešenje za dobijanje ekstrakata za analizu antimikrobne aktivnosti. Većina ovih jedinjenja nije hidrosolubilna, pa se voda ne preporučuje za ekstrakciju antimikrobnih jedinjenja (Cowan, 1999; Wendakoon et al., 2012; Parekh et al., 2006). U prilog tome ide podatak da je vodeni ekstrakt lista biljke *Acalypha wilkesiana* u jednoj studiji pokazao bakteriostatički efekat, dok je etanolni ekstrakt imao baktericidno dejstvo na sve ispitivane mikroorganizme (Alade i Irobi, 1993). I u drugim istraživanjima etanolni ekstrakti su ispoljili jaču antimikrobnu aktivnost od vodenih (Rojas et al., 2006; Nair i Chanda, 2007). Ponekad se tanini i terpenoidi mogu naći u vodenoj fazi, ali, generalno, se bolje rastvaraju u manje polarnim rastvaračima kao što je etanol. Ovakva superiornost etanola, kao rastvarača antimikrobnih jedinjenja, verovatno je doprinela i sugestiji da je ekstrakcija čistim etanolom poželjnija od primene vodeno-etanolnih rastvora kao sredstva za ekstrakciju (Cowan, 1999).

Zato je, pre određivanja antimikrobne aktivnosti, osušen i do praha usitnjen materijal odabranih biljnih vrsta ekstrahovan maceracijom u 96 % (v/v) etanolu, u trajanju od 24 h na sobnoj temperaturi. Odnos rastvarača i biljnog materijala bio je 4:1. Biljni materijal je, zatim, uklonjen filtracijom i mehanički isceden. Dobijeni tečni ekstrakti su upareni do suva, na temperaturi od 50 °C, u rotacionom vakuum uparivaču (BUCHI, Švajcarska). Suvi ekstrakti su do mikrobioloških analiza čuvani u zatvorenim staklenim vijalama, na temperaturi od +4 °C.

Uzorci pića su dealkoholizovani na temperaturi od 40 °C, u rotacionom vakuum uparivaču (BUCHI, Švajcarska) i čuvani u zatvorenim staklenim vijalama, na temperaturi od +4 °C.

4.6.2. Priprema kultura mikroorganizama

Antimikrobna aktivnost odabranih biljnih vrsta je ispitana na mikroorganizmima koji pripadaju standardnim sojevima iz kolekcije ATCC (American Type of Culture Collection), iz Laboratorije za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu, u kojoj su i antimikrobna ispitivanja rađena. Korišćeni su sojevi

gram – pozitivnih bakterija:

Listeria monocytogenes ATCC 19111,
Rhodococcus equi ATCC 6939,
Staphylococcus aureus ATCC 25923,
Staphylococcus epidermidis ATCC 12228,
Enterococcus faecalis ATCC 29212,
Bacillus subtilis subsp. *spizizenii* ATCC 6633,
Bacillus cereus ATCC 11778,

gram - negativnih bakterija:

Escherichia coli O157:H7 ATCC 35150,
Proteus mirabilis ATCC 12453,
Shigella sonnei ATCC 29930,
Yersinia enterocolitica ATCC 27729,
Salmonella Enteritidis ATCC 13076,
Salmonella Typhimurium ATCC 14028

i kvasac

Candida albicans ATCC 10259.

Ispitivani mikroorganizami su zasejani na odgovarajućem agaru i ostavljeni tokom 24 h na 35 °C. Sa čvrste hranljive podloge pomoću eze, izdvojena je jedna kolonija i prebačena u 5mL odgovarajućeg bujona. Za bakterije *Listeria monocytogenes* i *Escherichia coli* O157:H7 korišćen je tripton soja bujon (Torlak, Srbija), za ostale bakterije Miler Hinton bujon (Torlak, Srbija), dok je za kvasac korišćen sladni bujon (Biolab, Madjarska), kao hranljivi medijum. Bujoni zasejani bakterijama su dalje inkubirani 18 – 24 h na 37 °C, a oni sa kvascem na 30 °C. Krajnja koncentracija mikroorganizama u hranljivom medijumu je iznosila 10⁵ cfu/mL (Klačnik et al., 2010).

Ova bakterijska tj. kvaščeva suspenzija je dalje korišćena za inokulaciju mikrotitarskih pločica.

4.6.3. Bujon mikrodiluciona metoda

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) ispitivanih biljnih ekstrakata i pića određena je bujon mikrodilucionom metodom, korišćenjem mikrotitarskih pločica sa 96 mesta (bunarića; Sarstedt, Nemačka) (Klačnik et al., 2010). Upareni etanolni ekstrakti su rastvoreni u 5 % DMSO (dimetil sulfoksid). Testirane su koncentracije uparenih i rastvorenih ekstrakata u opsegu 7,50 – 0,12 mg/mL, dobijene dvostrukim razređenjima. Koncentracije uparenih, dealkoholizovanih i neuparenih pića, sa etanolom, su testirane u opsegu koncentracija 50 - 0,05 % (v/v), dobijenim serijskim razređenjima. Kao indikator vijabilnosti mikroorganizama korišćena je boja TTC (2,3,5-trifenil-tetrazolium hlorid; Sigma Chemical Co., St.Louis, Missouri, USA). Svaki bunarić je na kraju sadržao zapreminu od 100 µL, dobijenu dodavanjem bakterijske odnosno kvaščeve suspenzije testiranim uzorcima, u različitim koncentracijama. Poslednje dve kolone bunarića su sadržale pozitivnu i negativnu kontrolu. Pozitivna kontrola bio je bujon inokulisan bakterijskom odnosno kvaščevom suspenzijom, dok je negativna kontrola bio samo bujon, bez mikroorganizama. Inokulisane mikrotitarske pločice su zatvorene i inkubirane u trajanju od 24 h na 37 °C. Kao MIK uzeta je ona koncentracija etanolnih ekstrakata, odnosno pića kod koje nije bilo vidljive promene boje.

Sadržaj bunarića, kod kojih nije bilo vidljive promene boje, sterilnom ezom je presejan na Petri ploče sa odgovarajućom čvrstom podlogom. Petri ploče sa zasejanim bakterijama su inkubirane na 37 °C, 18 h – 24 h a one sa kvascem na 30 °C, 24 – 48 h. Najmanja mikrobicidna koncentracija, koja je bila potrebna da u potpunosti uništi mikroorganizme (izostanak rasta na agaru) uzeta je kao minimalna baktericidna koncentracija (MBK) (Petrović et al., 2015b). Postupak određivanja MIK i MBK urađen je u tri ponavljanja (Zomorodian et al., 2015).

4.7. Analiza isparljive frakcije odabranih aromatičnih i začinskih biljaka

4.7.1. Izolovanje isparljive frakcije biljaka

Osušen, i do praha usitnjen biljni materijal je podvrgnut dvočasovnoj hidrodestilaciji, korišćenjem aparature po Klevendžeru. Ostaci vlage u dobijenom etarskom ulju su eliminisani pomoću anhidrovanog natrijum sulfata. Ulje je do gasno hromatografske analize čuvano u zatvorenim staklenim vijalama, na temperaturi od +4°C.

4.7.2. Gasna hromatografija -masena spektrometrija (GC- MS)

Isparljiva frakcija (etarska ulja) ispitivanih aromatičnih biljaka analizirana je GC-MS (*engl.* gas chromatography – mass spectrometry) tehnikom. Korišćen je gasni - hromatograf Agilent 7890N sa HP5-MS kapilarnom kolonom (temperaturni opseg: 60 °C tokom 0 minuta, zatim 3 °C min⁻¹ do 280 °C.) i helijomom, kao nosećim gasom (protok 1,5 cm³/min). Uzorci zapremine 1 µl su ručno injektovani i analizirani u “*splitless*” režimu. Temperatura injektora je iznosila 250 °C. Gasni hromatograf je bio spojen sa masenim spektrometrom Hewlett-Packard 5972 (energija jonizujućih elektrona 70 eV u opsegu skeniranja 45 - 550). Temperatura izvora je bila 230 °C, a kvadrupola 150 °C. Analize ispitivanih uzoraka su rađene u “*full scan*” režimu. Komponente koje su formirale najizraženije pikove su identifikovane poređenjem njihovih retencionih indeksa sa literaturnim podacima, kao i poređenjem masenih spektara sa bazom podataka masenih spektara (Adams, 2005; NIST2000 biblioteka masenih spektara; Wiley/NBS registar podataka, 7. elektronska verzija). Retencioni indeksi (Kovačevi indeksi - RI) su izračunati u odnosu na homologe niz *n*-alkana (C₇–C₂₉) pod istim eksperimentalnim uslovima (Van den Dool i Kratz, 1963).

4.8. Poređenje i statistička obrada rezultata

Deskriptivna statistička analiza, u smislu izračunavanja srednjih vrednosti i standardnih grešaka za srednje vrednosti, izvedena je pomoću Microsoft Excel 2007 softvera. Dobijeni rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna devijacija (SD). Kod polarografije jednosmerne struje, SD je dobijena linearnom regresijom iz krive zavisnosti intenziteta struje od koncentracije uzorka. Jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) i F-test su primenjeni za poređenje dobijenih rezultata. Značajnost razlika između uzoraka je određena post-hoc Tukey-jevim HSD testom sa intervalom poverenja od 95 %, koristeći softver StatSoft Statistica 10. Klaster analiza (CA) podataka, dobijenih svim primenjenim antioksidativnim testovima, urađena je koristeći softver SPSS 8.0.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Dobijanje likera od odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta

Komercijalni biljni likeri su, uglavnom, mešavina većeg broja biljnih vrsta (preko 20 pa i do 56; Vukosavljević et al., 2009). U ovom radu, ekstrakti dvanaest odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta, često korišćenih u industriji alkohonih pića, su korišćeni za dobijanje novog biljnog likera.

Ova faza istraživanja, koja je bila fokusirana na dobijanje oodgovarajuće kombinacije ekstrakata odabranih biljnih vrsta, kao i uvođenje zaslađivača steviol glikozida umesto dela saharoze, izvedena je u 5 serija senzorne analize:

- testiranje mišljenja potrošača u cilju odabira senzorno najprihvatljivije kombinacije biljaka,
- određivanje relativne slasti steviol glikozida,
- uvođenje steviol glikozida kao zamene za deo saharoze i formiranje senzornog profila dobijenih uzoraka, u cilju ispitivanja uticaja ovog zaslađivača na senzorne karaktersitike likera,
- testiranje mišljenja potrošača metodom rangiranja, u cilju odabira pića sa najprihvatljivijim odnosom saharoze i steviol glikozida i
- ekspertsko testiranje kvaliteta odabranih likera metodom rangiranja.

U cilju dobijanja dobro ukomponovane kombinacije biljnih ekstrakata, tako da gorčina bude izbalansirana sa slašću pića, napravljene su tri probe pića, nazvanog "Biljni koktel (BK)", prema recepturi detaljno opisanoj u odeljku 4.3. poglavlja Materijal i metode, sa udelom gorkih i aromatičnih biljaka u odnosu 1:1, 1:2 i 1:3 [BK(1:1), BK(1:2) i BK(1:3)]. Tri navedena uzorka pića su testirana korišćenjem hedonske skale, a rezultati su prikazani u tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Rezultati ispitivanja stepena prihvatljivosti odabranih senzornih svojstava upotrebom hedonske skale (1-9)*

	Parametri ocenjivanja			
	Ukusnost	Boja	Miris	Ukupna prihvatljivost
BK(1:1)	3,4 ± 1,1 ^a	5,4 ± 1,5 ^a	3,9 ± 1,7 ^a	3,3 ± 1,1 ^a
BK(1:2)	4,2 ± 1,1 ^b	5,5 ± 1,5 ^a	4,2 ± 1,5 ^a	4,2 ± 1,1 ^b
BK(1:3)	6,1 ± 1,0 ^c	5,7 ± 1,5 ^a	4,6 ± 1,4 ^b	6,2 ± 1,2 ^c

*Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SD; Različita slova u istoj koloni ukazuju da postoji statistički značajna razlika srednjih vrednosti posmatranih uzoraka ($p < 0,05$), prema post hoc Tukey-evom HSD testu; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost bodova koje je dalo 30 ispitanika ± standardna devijacija (SD).

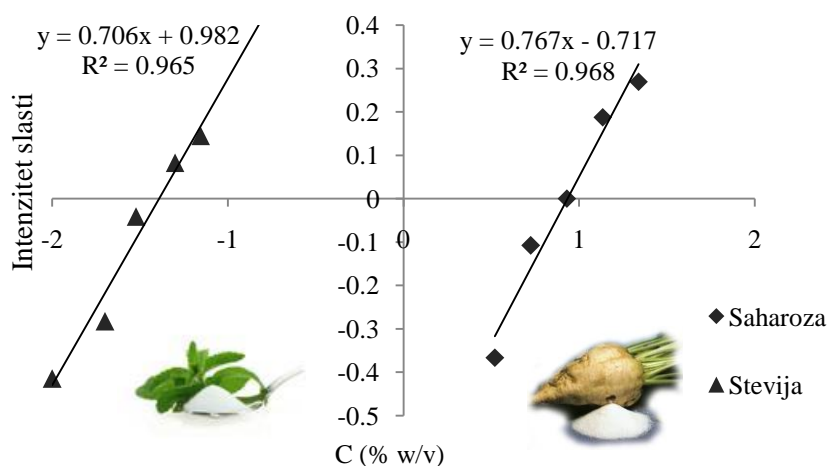
Piće sa najvećim udelom aromatičnih i začinskih biljaka je dobilo najveći broj bodova, za sve parametre ocenjivanja. Statistički značajne razlike između ocena dobijene su za miris, ukusnost i ukupnu prihvatljivost, dok između ocena za boju nije bilo statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Niža prihvatljivost BK(1:1) i BK(1:2) verovatno potiče od visokog sadržaja gorkih biljaka, odnosno nedovoljno izbalansirane gorčine i slasti pića. Sa smanjenjem udela gorkih biljaka, povećava se i prihvatljivost svih parametara kvaliteta. Piće sa najvećom ocenom, u narednom tekstu “Biljni koktel” (BK), izabrano je za kontrolno piće u narednim etapama senzorne analize, i za ostale analize u daljem istraživanju.

U drugoj seriji senzorne analize, ispitana je mogućnost zamene šećera dijetalnim zaslađivačem. U uzorak, koji se hedonskim testom pokazao kao najbolji, uveden je zaslađivač, koji je u različitim odnosima zamenio saharozu. U tom cilju, korišćen je beli prah steviol glikozida, 100 do 300 puta slađi od saharoze (Nabors, 2011), koji se dobija ekstrakcijom iz lišća južnoameričke biljke *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Zaslađivači dobijeni od stevije su poslednjih godina sve aktuelniji na tržištu pića i hrane. Jedna od prednosti korišćenja ovih zaslađivača u prehrambenoj industriji je niska kaloričnost, prirodno poreklo, kojim se ostali niskokalorični zaslađivači, tipa aspartama, saharina i ostalih, ne odlikuju. Osim toga, sama biljka i njeni izolati su u literaturi opisani kao bogat izvor polifenola, koji ispoljavaju značajnu antioksidativnu aktivnost (Shukla et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2015).

Da bi se saharoza uspešno zamenila zaslađivačem, bitno je da se njegovim dodavanjem u proizvod postigne isti intenzitet slasti kao sa saharozom, što je zapravo tzv. relativna slast. Zato treba preliminarno odrediti koncentraciju zaslađivača, po slasti

ekvivalentnu željenoj koncentraciji saharoze u proizvodu. Ova koncentracija zaslađivača obično zavisi od vrste uzorka (Dutra i Bolini, 2014).

Relativna slast zaslađivača određena je metodom magnitude, u odnosu na 85 g/L (8,5 % m/v) saharoze u uzorku (Cardello et al., 1999). Zadatak ocenjivača bio je da uporede intenzitet slasti nepoznatih uzoraka sa različitim koncentracijama saharoze ili steviol glikozida, u odnosu na referentni uzorak. Kriva zavisnosti logaritma koncentracije zaslađivača i intenziteta slasti zaslađivača, dodeljenih od strane ocenjivača, predstavljena je na slici 5.1.



Slika 5.1. Krive zavisnosti intenziteta slasti od koncentracije saharoze ili steviol glikozida, u odnosu na 8,5 % (m/v) saharoze u piću

Parametri, dobijeni iz funkcije zavisnosti intenziteta slasti i koncentracije saharoze ili steviol glikozida u uzorku, na osnovu kojih je izračunava relativna slast alternativnog zaslađivača, u odnosu na 8,5 % (m/v) saharoze, prikazani su u tabeli 5.2.

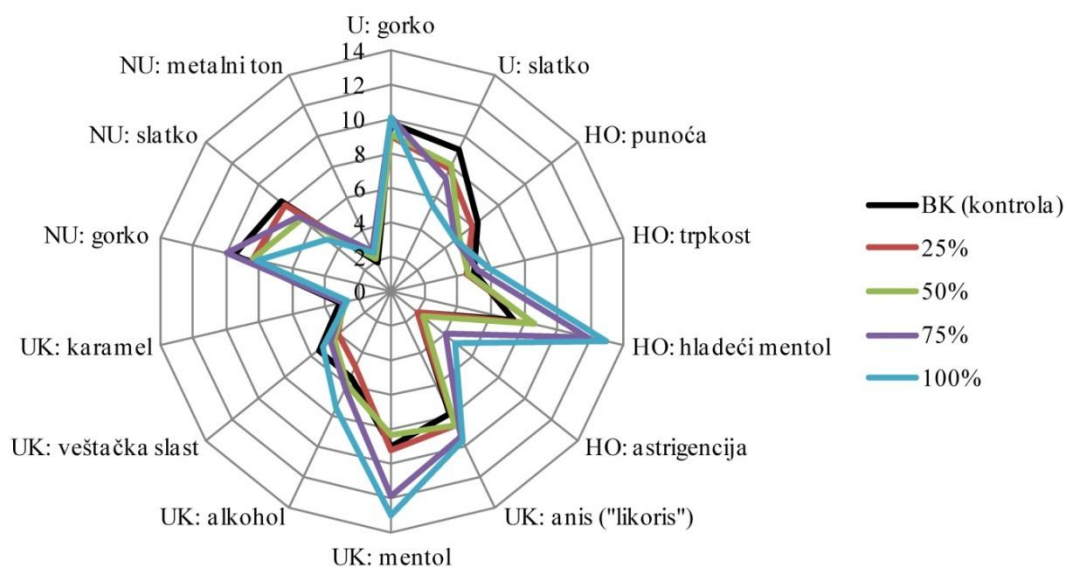
Tabela 5.2. Parametri za određivanje relativne slasti i relativna slast stevije u odnosu na 8,5 % (m/v) saharoze u piću

Zaslađivač	Nagib krive	Odsečak na y- osi	Koeficijent korelacije (R^2)	Funkcija intenziteta slasti	Relativna slast (% m/v)	Jačina steviol glikozida*
Stevija	0,706	0,982	0,965	$S=9,52 C^{0,706}$	0,04	212
Saharoza	0,767	-0,717	0,968	$S=0,192 C^{0,767}$	/	/

*Jačina zaslađivača je broj koji ukazuje na to koliko je puta zaslađivač sladi od saharoze

Relativna slast steviol glikozida, tj koncentracija steviol glikozida potrebna da zameni slast 8,5 % (m/v) saharoze u uzorku, iznosi 0,04 % m/v. U skladu sa tim, u BK, kao kontrolnom uzorku zamenjeno je 25 %, 50 %, 75 % i 100 % saharoze sa odgovarajućom količinom praha steviol glikozida (0,1 g/L; 0,2 g/L; 0,3 g/L i 0,4 g/L).

Sledeća serija senzorne analize urađena je u cilju dobijanja senzornog profila navedenih 5 uzoraka pića. Na osnovu literaturnih podataka, koji opisuju deskriptivnu senzornu analizu različitih vrsta pića, kako alkoholnih tako i bezalkoholnih, izabrano je nekoliko opisnih parametara (atributa), čiji je intenzitet izraženosti u navedenim uzorcima sa steviol glikozidom i sa saharozom bodovan na skali od 1 do 15 (Lawless i Heymann, 2010). Senzorni profil uzoraka, dobijen kvantitativnom deskriptivnom analizom, prikazan je na slici 5.2.



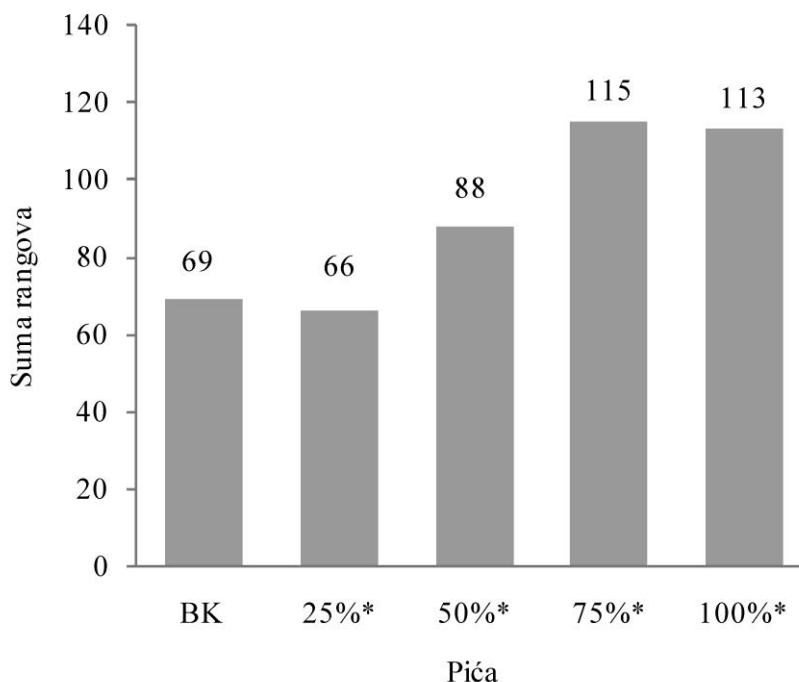
U- osnovni ukus; HO-hemijski osećaj; UK-ukusnost; NU-naknadni ukus

Slika 5.2. Senzorni profil likera sa saharozom i steviol glikozidom

U senzornom profilu pića i napitaka, kod kojih je korišćena stevija i njeni izolati kao zaslađivači, primećeni su neki nepoželjni senzorni atributi u jačem intenzitetu, i to pri višim koncentracijama stevije, kao npr veštačka slast, metalni naknadni ukus i naknadna gorčina (Cardoso i Bolini, 2007; Majchrzak et al., 2014). U ovom istraživanju, porast koncentracije steviol glikozida ne utiče na porast intenziteta pomenutih atributa. Sa porastom udela steviol glikozida u piću primećuje se rast intenziteta hlađećeg hemijskog osećaja, anisa i mentola kao komponenata ukusnosti

koje potiču od terpena anetola i mentola iz biljaka anisa i nane. Izraženost alkohola takođe raste sa povećanjem udela steviol glikozida (slika 5.2.). Očigledno je da saharoza, u određenoj meri, maskira senzornu percepciju isparljivih aromatičnih jedinjenja. Ipak, punoća ukusa je izraženija kod pića u kome je saharoza jedini zaslađivač kao i kod pića sa 25 % saharoze zamenjene steviol glikozidom (slika 5.2.). Pored toga što ima ulogu zaslađivača poznato je da saharoza doprinosi i punoći ukusa.

U cilju odabira pića sa najprihvatljivijim odnosom saharoze i steviol glikozida, uzorci su, u sledećoj seriji senzorne analize, upoređeni prema dopadljivosti, testom rangiranja. Učestvovalo je 30 laika, ljubitelja biljnih i gorkih alkoholnih pića. Sa slike 5.3. se vidi da je uzorak, u kome je 25 % saharoze zamenjeno steviol glikozidom, imao najmanju sumu rangova, odnosno, da je najdopadljiviji. Ovo ukazuje na mogućnost uspešne primene niskokaloričnog, dijetalnog zaslađivača, steviol glikozida, u biljnim likerima. Zato je piće, u kome je 25 % saharoze zamenjeno steviol glikozidom, pored kontrole, odabrano za dalje analize u ovom istraživanju i u daljem tekstu navodiće se kao "Biljni koktel lajt (BKL)".



Slika 5.3. Rangiranje uzoraka sa saharozom i steviol glikozidom
*Procenti saharoze zamenjeni steviol glikozidom

5.1.2. Senzorna ocena dobijenih likera

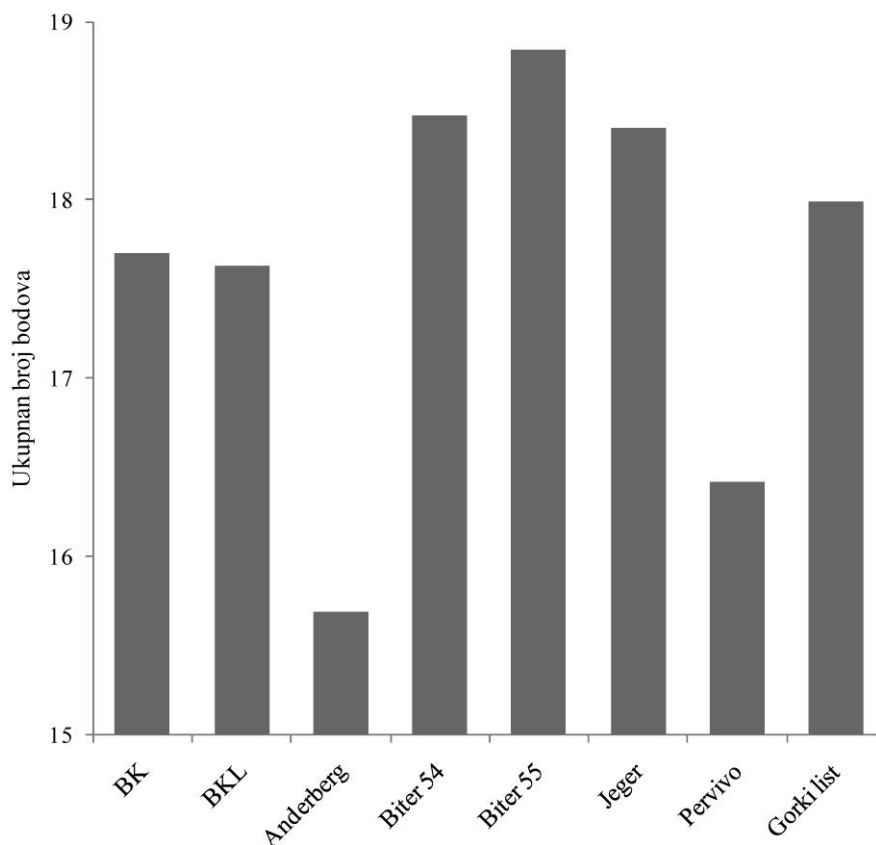
Najvažnije senzorne karakteristike finalnih proizvoda ovog istraživanja, BK i BKL, su, od strane eksperata, upoređene sa aperitivima i digestivima popularnim na našem tržištu. Za poređenje su odabrani Jeger, Gorki list, Anderberg, Bitter 54, Bitter 55 i medicinski gorki tonik iz grupe farmaceutskih proizvoda-Pervivo. Zajedničko svim ispitivanim proizvodima je prisustvo lekovitog bilja u njihovom sastavu i gorak ukus, koji potiče od gorkih biljaka, koje im daju svojstva aperitiva i digestiva. Senzorna analiza je sprovedena korišćenjem modifikovanog metoda bodovanja, sa maksimumom od 20 bodova, uzimajući u obzir sve parametre koji se ocenjuju u okviru senzornih svojstava alkoholnih pića (boja, bistrina, tipičnost, miris i ukus).

Rezultati poređenja senzornih svojstava gorkih likera dobijenih u ovom istraživanju sa sličnim komercijalnim popularnim proizvodima prikazani su u tabeli 5.3. i na slici 5.4. Kvalitet BK i BKL, ocenjen od strane eksperata, se međusobno ne razlikuje značajno ($p < 0,05$). Kvalitet ova dva likera se pokazao kao statistički značajno bolji ($p < 0,05$) u odnosu na neka komercijalna pića kao npr. Anderberg i Pervivo. Na osnovu dobijenih ocena za odabrane parametre, pića BK i BKL zadovoljavaju kvalitet koji se na sajamskim ocenjivanjima nagrađuje srebrnom medaljom (16,01 do 18,00 bodova), što se odnosi na vrlo dobar kvalitet.

Tabela 5.3. Senzorna analiza BK i BKL u poređenju sa komercijalnim aperitivima i digestivima*

Parametri kvaliteta	KV	BK	BKL	Anderberg	Biter 54	Biter 55	Jeger	Pervivo	Gorki list
Boja	0,2	0,98 ± 0,03	0,99 ± 0,02	0,82 ± 0,16	0,98 ± 0,02	0,97 ± 0,02	0,96 ± 0,04	0,88 ± 0,10	0,96 ± 0,05
Bistrina	0,2	0,94 ± 0,04	0,90 ± 0,06	0,79 ± 0,15	0,91 ± 0,07	0,92 ± 0,07	0,95 ± 0,03	0,96 ± 0,04	0,96 ± 0,04
Tipičnost	0,4	1,94 ± 0,06	1,92 ± 0,09	1,83 ± 0,08	1,96 ± 0,07	1,93 ± 0,08	1,91 ± 0,07	1,78 ± 0,14	1,94 ± 0,07
Miris	1,2	5,33 ± 0,22	5,21 ± 0,20	4,99 ± 0,31	5,42 ± 0,23	5,46 ± 0,31	5,33 ± 0,22	5,16 ± 0,34	5,30 ± 0,36
Ukus	2	8,52 ± 0,27	8,62 ± 0,29	8,00 ± 0,42	9,20 ± 0,14	9,38 ± 0,20	9,22 ± 0,04	7,96 ± 0,64	9,02 ± 0,35
Ukupna ocena		17,70 ± 0,42 ^b	17,63 ± 0,38 ^b	15,69 ± 0,29 ^a	18,48 ± 0,32 ^d	18,84 ± 0,20 ^d	18,40 ± 0,19 ^c	16,42 ± 1,01 ^a	17,99 ± 0,47 ^c

*Prikazane ocene za svaki parametar dobijene su množenjem bodova 1-5 koeficijentima važnosti (KV) da bi se dobio maksimalan broj od 20 bodova; vrednosti sa istim slovima u redu ne razlikuju se statistički značajno na nivou $p < 0.05$; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost ocena datih od strane 5 eksperata ± standardna devijacija (SD).



Slika 5.4. Poređenje senzornog kvaliteta BK i BKL sa komercijalnim proizvodima

5.2. Antioksidativna aktivnost dobijenih likera i poređenje sa komercijalnim pićima

Dva likera (BK i BKL), dobijena od odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, testirana su na antioksidativnu aktivnost i upoređeni sa sličnim, komercijalnim pićima, koji takođe spadaju u grupu aperitiva i digestiva. Pored toga, cilj je bio i da se, statističkim poređenjem rezultata primenjenih metoda, ispita pouzdanost primene dve polarografske metode na određivanje antioksidativne aktivnosti uzoraka pića.

5.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih i komercijalnih pića

Antioksidativna aktivnost dobijenih i komercijalnih pića određena je primenom četiri spektrofotometrijske metode, koje se najčešće koriste za određivanje antioksidativne aktivnosti različitih vrsta uzoraka hrane i pića. Primenom veštačkih

slobodnih radikala DPPH i ABTS, ispitana je antiradikalska aktivnost pića. Ukupna redukujuća moć je merena FRAP metodom. Sadržaj ukupnih fenola (TPC- Total Phenolic Content) je meren FC metodom. Ova metoda se, po nekim autorima, svrstava u antioksidativne metode, jer meri ukupnu redukujuću moć uzorka.

U tabeli 5.4. prikazana je antiradikalska aktivnost i ukupna redukujuća moć pića, izražene u ekvivalentima Troloksa (mM TE), i sadržaj ukupnih fenola, izražen u ekvivalentima galne kiseline (mg GA/L).

Tabela 5.4. Antioksidativna aktivnost dobijenih i komercijalnih pića određena spektrofotometrijskim metodama*

	TPC (mg GAE/L)	DPPH (mM TE)	FRAP (mM TE)	ABTS (mM TE)
BKL	1760,11 ± 53,74 ^g	8,84 ± 0,39 ^e	8,98 ± 0,24 ^g	8,24 ± 0,19 ^f
BK	1700,15 ± 68,80 ^g	8,03 ± 0,56 ^e	8,16 ± 0,30 ^f	7,75 ± 0,32 ^e
Anderberg	1246,11 ± 12,51 ^f	3,85 ± 0,23 ^d	7,79 ± 0,37 ^e	7,75 ± 0,22 ^e
Biter 54	703,70 ± 7,29 ^d	1,13 ± 0,08 ^c	2,76 ± 0,09 ^c	3,63 ± 0,03 ^d
Biter 55	821,11 ± 17,00 ^e	1,08 ± 0,17 ^c	3,01 ± 0,06 ^d	2,99 ± 0,01 ^c
Jeger	598,89 ± 35,64 ^c	0,84 ± 0,07 ^b	1,26 ± 0,10 ^b	2,32 ± 0,10 ^b
Pervivo	458,15 ± 22,07 ^b	1,13 ± 0,02 ^c	1,12 ± 0,07 ^b	1,78 ± 0,02 ^a
Gorki list	384,82 ± 4,49 ^a	0,58 ± 0,08 ^a	0,66 ± 0,01 ^a	1,58 ± 0,09 ^a
Koeficijent varijacije (%)	5,60	10,68	8,29	6,44

*Različita slova u istoj koloni ukazuju da postoji statistički značajna razlika srednjih vrednosti posmatranih uzoraka ($p < 0,05$), prema post hoc Tukey-evom HSD testu; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja ± standardna devijacija (SD).

Superiornost dobijenih likera, u odnosu na odabrane komercijalne proizvode, u sadržaju ukupnih fenola i antioksidativnoj aktivnosti, je očigledna. Osim u slučaju Bitera 54 i Bitera 55, antioksidativna aktivnost većine uzoraka je bila u skladu sa sadržajem ukupnih fenola, što kasnije potvrđuju i visoki koeficijenti korelacije između FC, DPPH, FRAP i ABTS metode (tabela 5.6.). Bliske vrednosti za BKL i BK dobijene su svim primenjenim metodama. Anderberg se takođe istakao po sadržaju ukupnih fenola, jačini antiradikalske i redukujuće aktivnosti. Ostala komercijalna pića su

pokazala višestruko manju aktivnost i sadržaj ukupnih fenola, u odnosu na dobijene likere.

Sličan sadržaj fenola za Anderberg (1205,7 mg GAE /L i 1200 mg CAE (katehin ekvivalenata/L) dobili su i drugi autori (Gorjanović et al., 2010; Imark et al., 2001), dok su Biter 54 i Biter 55 u prethodnim studijama imali znatno niži sadržaj fenola (oko 400 mg GAE/L (Gorjanović et al., 2010; Karabegović et al., 2012) u odnosu na prikazani rezultat iz tabele 5.4. Pomenuta razlika se može objasniti različitim hemijskim sastavom lekovitog bilja, koje ulazi u sastav Bitera. U zavisnosti od šarže, aktivnost može varirati.

Sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost različitih komercijalnih alkoholnih pića biljnog karaktera, kao što su biteri, likeri i medicinski tonici, je upoređena sa crvenim vinom (Imark et al., 2001). Najveću aktivnost merenu DPPH metodom, blisku crvenom vinu pokazao je Anderberg. Sadržaj ukupnih fenola biljnih pića kretao se od 100 mg CAE /L do 1200 mg CAE /L, pri čemu je Anderberg imao najveću vrednost. Crveno vino, kao referentno piće, je sadržalo 1400 mg CAE /L. Pića dobijena u ovom istraživanju, BK i BKL, evidentno nadmašuju crna vina, po sadržaju ukupnih fenola.

Vukosavljević i saradnici (2009) su, primenom DPPH metode, dobili sledeći opadajući redosled antioksidativne aktivnosti likera: Biter 54, Biter 55, Pervivo, Jeger, što je u skladu sa rezultatom prikazanim u tabeli 5.4.

5.2.2. Polarografsko određivanje antioksidativne aktivnosti dobijenih i komercijalnih pića

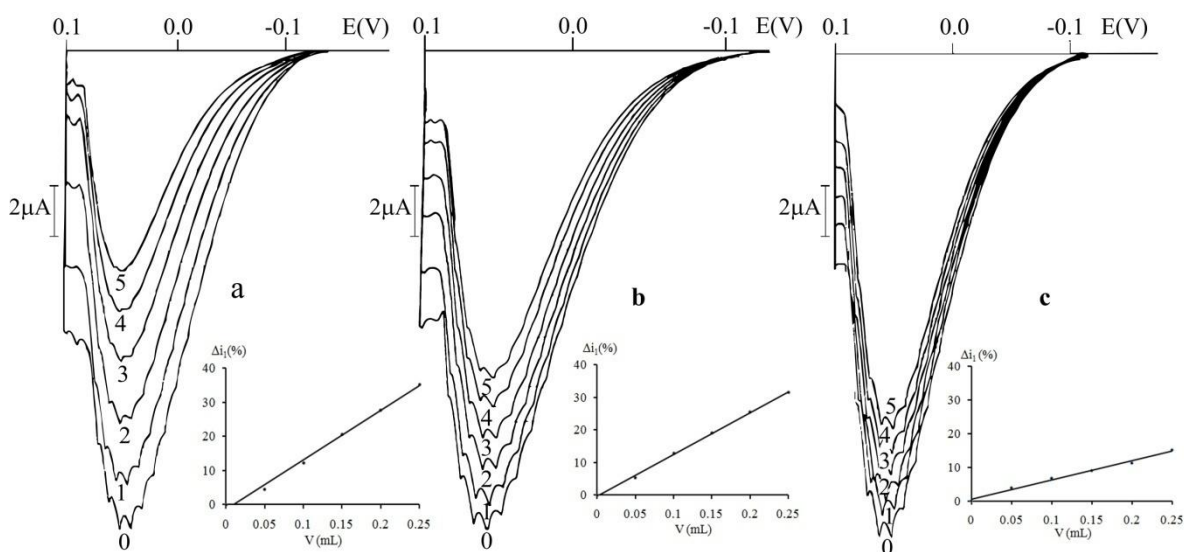
Pored standardnih spektrofotometrijskih testova, antioksidativna aktivnost dobijenih i komercijalnih pića merena je klasičnom polarografijom, sa kapajućom Hg-elektrodom (KŽE). Dve primenjene polarografske metode, HPMC (HydroxoPerhydroxoMercury(II) Complex) metoda i MRAP (Mercury Reduction Antioxidant Power) metoda, nedavno su razvijene u Elektrohemijskoj laboratoriji Instituta za opštu i fizičku hemiju (Sužnjević et al., 2011; Sužnjević et al, 2015a).

Metoda HPMC zasnovana je na smanjenju anodne struje kompleksa žive i vodonik peroksida, koji nastaje u baznoj sredini na potencijalu rastvaranja žive. Kao rezultat građenja kompleksa u alkalnom osnovnom elektrolitu (CL pufer, pH 9,8), umesto karakterističnog polarografskog talasa, javlja se strujni pik. Visina strujnog pika

se smanjuje po dodatku pojedinačnih fenolnih jedinjenja, ili kompleksnih uzoraka sa antioksidativnom aktivnošću. Smanjenje visine ove anodne struje je proporcionalno aktivnosti odabranih uzoraka (Sužnjević et al, 2011).

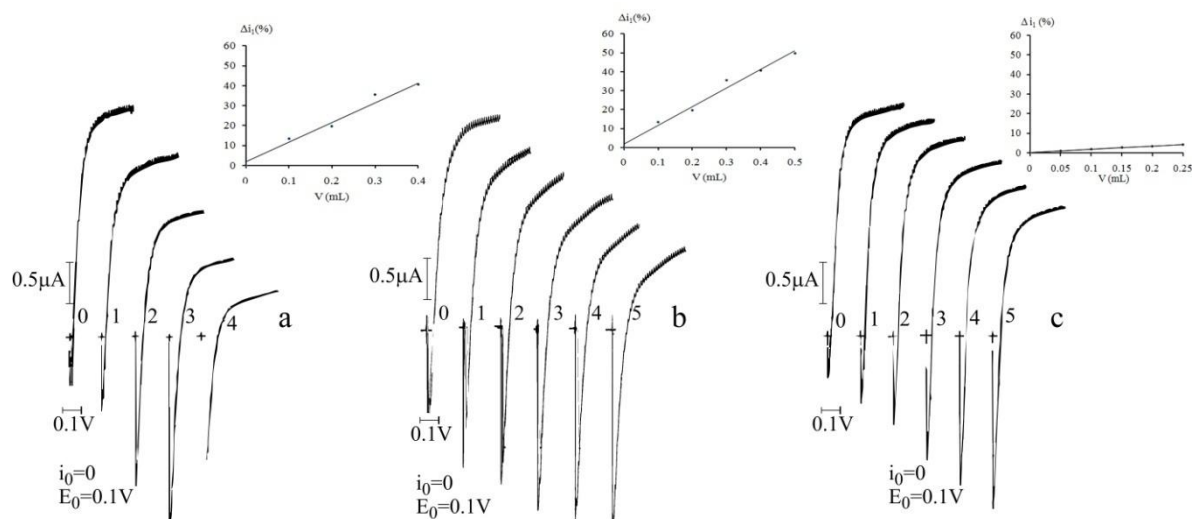
Metoda MRAP je zasnovana na redukciji jona žive. Po dodatku antioksidanasa, dolazi do smanjenja katodne struje redukcije živinih jona. Rezultati polarografskih metoda su izraženi kao nagib linearnog dela krive zavisnosti procenta smanjenja anodne struje kompleksa, odnosno, katodne struje od zapremine ili količine dodatog uzorka. Metoda MRAP je, u ovom radu, po prvi put primenjena na kompleksnim uzorcima (Sužnjević et al., 2015b).

Uticaj BKL, BK i Jegera, na početnu anodnu struju kompleksa, prikazan je na slici 5.5. Smanjenje anodne struje kompleksa HPMC je izraženije po dodatku BKL nego BK, dok je uticaj Jegera znatno slabiji. Nagibi zavisnosti anodne struje kompleksa od zapremine dodatih biljnih ekstrakata, prikazani su u uglu svakog polarograma.



Slika 5.5. Polarografske krive pre (0) i po dodatku alikvota od po 50 μL (1,2,3,4,5) BKL (a), BK (b) i Jegera (c) u radni rastvor pufera. Na dopunskim graficima je data zavisnost procenta smanjenja anodne struje kompleksa HPMC od zapremine dodatog uzorka

Na slici 5.6. je prikazan uticaj tri pomenuta pića na katodnu struju redukcije jona žive. Nagibi linearnog dela zavisnosti procenta smanjenja katodne struje redukcije živinih jona, od zapremine dodatih uzoraka pića, prikazani su u gornjem desnom uglu svakog polarograma.



Slika 5.6. Polarografske krive pre (0) i po dodatku alikvota od po 50 μL odnosno 100 μL (1,2,3,4,5) BKL (a), BK (b) i Jegera (c) u radni rastvor pufera. Na dopunskim graficima je data zavisnost procenta smanjenja katodne struje redukcije jona žive od zapremine dodatog uzorka

Rezultati polarografskog ispitivanja antioksidativne aktivnosti dobijenih i komercijalnih pića prikazani su u tabeli 5.5.

Tabela 5.5. Antioksidativna aktivnost dobijenih i komercijalnih pića određena polarografskim metodama *

	HPMC (%/mL)	MRAP (%/mL)
BKL	141,00 \pm 2,31 ^g	103,70 \pm 6,02 ^h
BK	128,41 \pm 1,33 ^f	99,71 \pm 6,42 ^g
Anderberg	108,45 \pm 3,42 ^e	67,73 \pm 4,70 ^e
Biter 54	105,13 \pm 2,94 ^e	95,04 \pm 5,45 ^f
Biter 55	72,22 \pm 1,02 ^d	44,92 \pm 3,04 ^d
Jeger	57,42 \pm 2,20 ^c	16,44 \pm 2,63 ^a
Pervivo	32,01 \pm 0,70 ^b	25,72 \pm 1,81 ^c
Gorki list	19,61 \pm 0,40 ^a	19,31 \pm 0,70 ^b
Koeficijent varijacije (%)	5,43	6,27

*Različita slova u istoj koloni ukazuju da postoji statistički značajna razlika srednjih vrednosti posmatranih uzoraka ($p < 0,05$), prema post hoc Tukey-evom HSD testu; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja \pm standardna devijacija (SD).

Kao i kod spektrofotometrijskih metoda, dobijeni likereri su bili u velikoj prednosti u odnosu na komercijalne proizvode. Izmerene antioksidativne aktivnosti za BKL i BK, HPMC metodom, iznosile su 141,00 %/mL i 128,41 %/mL, a MRAP metodom 103,70 %/mL i 99,71 %/mL, po navedenom redosledu. Na osnovu rezultata dobijenih pomoću obe metode, Anderberg i Biter 54 su najbliži po aktivnostima dobijenim likerima.

Sumarno, na osnovu četiri spektrofotometrijske i dve polarografske metode, BKL je imao veću aktivnost i sadržaj ukupnih fenola od BK. Ovakav rezultat bi se mogao pripisati steviol glikozidu koji se nalazi u sastavu BKL, i koji verovatno doprinosi ukupnoj aktivnosti pića. Polarografskim metodama, HPMC i MRAP, izmerena je aktivnost 0,1 % vodenog rastvora steviol glikozida, korišćenog za zamenu dela saharoze, i rastvora saharoze (8,5 % m/v). Rastvor steviol glikozida ispoljio je aktivnost od $17,0 \pm 1,1$ %/mL i $5,8 \pm 1,4$ %/mL, respektivno, dok rastvor saharoze nije pokazao aktivnost, što potvrđuje gore navedenu pretpostavku.

Sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost različitih izolata stevije, kao što su vodeni, alkoholni i drugi organski ekstrakti, dokazana je u mnogim studijama. Tako je etanolni ekstrakt lista stevije ispoljio jaku aktivnost, u poređenju sa askorbinskom kiselinom, što je dovedeno u vezu sa visokim sadržajem ukupnih fenola (Shukla et al., 2009). Antiradikalska aktivnost vodenog rastvora lista stevije rasla je srazmerno sa porastom koncentracije stevije u uzorku. U istoj studiji, antioksidativna aktivnost hleba je pojačana, a time i funkcionalna svojstva poboljšana, tako što je 50 % saharoze zamenjeno ekstraktom stevije (Ruiz-Ruiz et al., 2015). Zatim, bezalkoholno piće, na bazi voća i žitarica, je imalo rastući sadržaj polifenola i antioksidativnu aktivnost, sa dodatkom infuzije stevije u koncentraciji 1,25 % i 2,5 % (Carbonell-Capella et al., 2015). Takođe, ustanovljeno je da dodatak listova stevije zelenom čaju (*Camellia sinensis*) ima uticaj na povećanje njegove antioksidativne aktivnosti (Shevchenko et al., 2013). Slatka jedinjenja, steviol glikozidi, iz biljke stevije, ispoljavaju antioksidativnu aktivnost i kao izolovani (Geuns et al., 2012). U jednoj studiji pokazano je da vodeni rastvor lista biljke inhibira 50 % DPPH radikala u koncentraciji od $135 \pm 2,5$ mg/g, komercijalni prah steviol glikozida u koncentraciji od $24 \pm 2,2$ µg /mL, dok je BHA (butilhidroksi anizol) kao kontrola delovao pri $47 \pm 3,5$ µg /mL (Rao et al., 2012). U prilog tome da i steviol glikozidi ispoljavaju

antioksidativnu aktivnost ide i podatak da su Carbonell-Capella i saradnici (2015) dobili statistički značajne pozitivne korelacije ($p < 0,05$) između ukupne antioksidativne aktivnosti i sadržaja steviol glikozida, u bezalkoholnom piću sa vodenim rastvorom lista stevije.

5.2.3. Poređenje rezultata spektrofotometrijskog i polarografskog određivanja antioksidativne aktivnosti pića

5.2.3.1. Korelaciona analiza dobijenih podataka

Rezultati spektrofotometrijskih metoda međusobno dobro koreliraju, sa statistički značajnim, pozitivnim koeficijentima korelacije, preko 0,9 ($p < 0,05$) (tabela 5.6.). Visoka, statistički značajna, korelacija dobijena je i između polarografskih metoda (0,934) ($p < 0,01$). Metoda HPMC dobro korelira sa FC, FRAP i ABTS (0,912, 0,904 i 0,910, po navedenom redosledu), i nešto slabije sa DPPH metodom (0,826). Slabije korelacije dobijene su između metode MRAP i metoda FC, DPPH, FRAP i ABTS (0,814, 0,762, 0,807 i 0,813, po navedenom redosledu). Imajući u vidu kompleksnost sastava i veliku različitost polifenolnog profila među uzorcima pića, dobijeni koeficijenti korelacije potvrđuju valjanost nove MRAP metode, kao i opravdanost primene obe polarografske metode na uzorcima alkoholnih pića.

Tabela 5.6. Koeficijenti korelacije između FC, DPPH, FRAP, ABTS, HPMC i MRAP metoda

	DPPH	FRAP	ABTS	HPMC	MRAP
FC	0,962 ⁺	0,975 ⁺	0,961 ⁺	0,912 ⁺	0,814 [*]
DPPH		0,919 ⁺	0,903 ⁺	0,826 [*]	0,762 [*]
FRAP			0,995 ⁺	0,904 ⁺	0,807 [*]
ABTS				0,910 ⁺	0,813 [*]
HPMC					0,934 ⁺
MRAP					

⁺Koeficijenti korelacije su statistički značajni na nivou $p < 0,01$;

^{*}Koeficijenti korelacije su statistički značajni na nivou $p < 0,05$.

5.2.3.2. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti i koeficijent fenolne antioksidativne aktivnosti pića

U cilju pouzdanijeg poređenja rezultata, dobijenih različitim metodama, kao i poređenja samih metoda, uveden je indeks relativne antioksidativne aktivnosti (*Relative Antioxidant Capacity Index* – RACI), kao i koeficijent antioksidativne aktivnosti fenola (*Phenolic Antioxidant Coefficients*-PAC).

Vrednost RACI dobija se tako što se, jednačinom 1, vrednosti antioksidativne aktivnosti uzorka, dobijene različitim metodama, transformišu u bezdimenzionalnu veličinu, tzv. “standardne ocene”:

$$\text{“standardna ocena”} = (x - \mu)/\sigma \quad [1]$$

gde je:

x - vrednost dobijena određenom metodom,

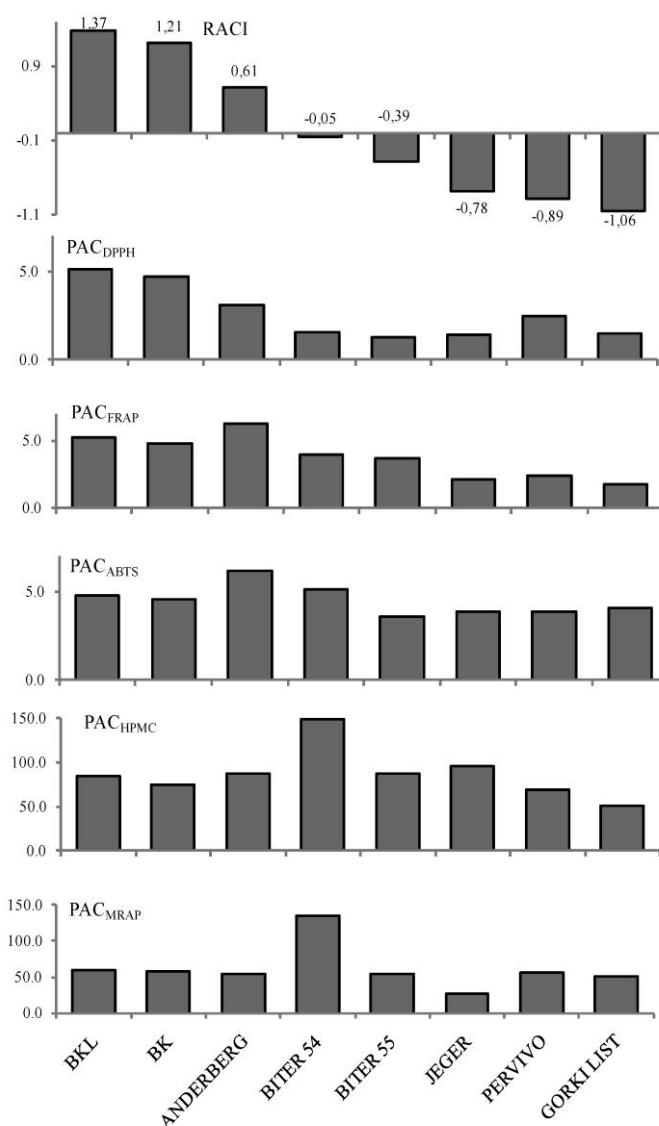
μ - srednja vrednost,

σ – standardna devijacija.

Zatim, srednja vrednost “standardnih ocena”, za jedan određeni uzorak i izmerene vrednosti antioksidativne aktivnosti različitim metodama, daju numeričku vrednost bez jedinice – RACI.

Koeficijent antioksidativne aktivnosti fenola (PAC) se dobija izračunavanjem odnosa izmerene antioksidativne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola u uzorku, a omogućava uvid u aktivnost po jedinici fenola prisutnih u uzorku (Katalinic et al., 2006).

Na slici 5.7. su prikazane RACI i PAC vrednosti dobijenih i komercijalnih pića. Na osnovu RACI vrednosti, testirani proizvodi rangirani su na sledeći način: BKL > BK > Anderberg > Biter 54 > Biter 55 > Jeger > Pervivo > Gorki list. Visoke PAC vrednosti za BKL i BK, naročito PAC_{DPPH}, zajedno sa visokim RACI vrednostima, potvrđuju prisustvo aktivnih fenola u uzorcima. Kod polarografskih metoda, fenoli Bitera 54 ispoljavaju ubedljivo najveću aktivnost. Primećuju se znatno veće razlike u aktivnostima fenola pića kod DPPH i FRAP metoda, u odnosu na razlike kod polarografskih testova. Kod ABTS metode, ove razlike su zanemarljive.

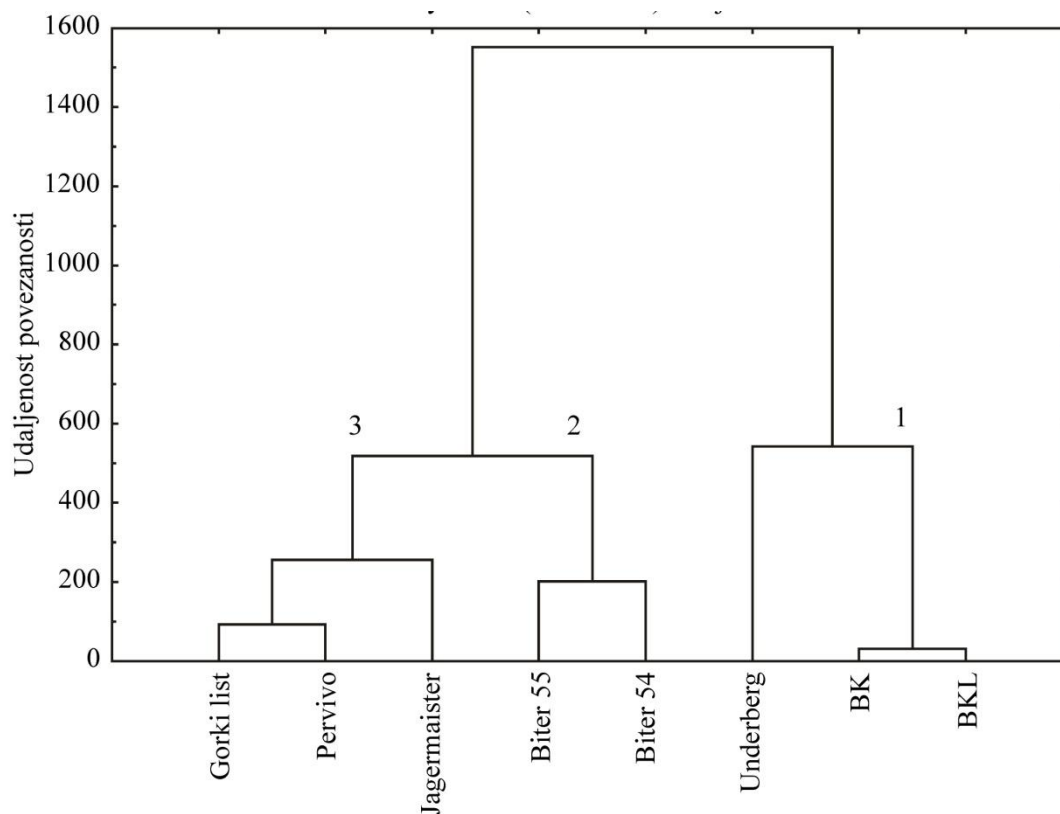


Slika 5.7. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti (RACI) i koeficijent antioksidativne aktivnosti fenola za svaku od primenjenih metoda (PAC_{DPPH} , PAC_{FRAP} , PAC_{ABTS} , PAC_{HPMC} , PAC_{MRAP}) dobijenih i komercijalnih pića

5.2.3.3. Klusterska analiza dobijenih podataka

Klusterska analiza podataka, dobijenih primenom spektrofotometrijskih i polarografskih metoda, omogućila je grupisanje uzoraka komercijalnih i dobijenih pića prema jaćini antioksidativne aktivnosti (slika 5.8.). Na dendrogramu se primećuju tri odvojena klastera: desni klaster 1, koji obuhvata BKL, BK i Anderberg (sa najvećom antioksidativnom aktivnošću), drugi, koji obuhvata Biter 54 i Biter 55 (sa nešto manjom

aktivnošću), zatim klaster 3, koji obuhvata Jegermajster, Pervivo i Gorki list (sa najmanjom aktivnošću, na osnovu svih primenjenih metoda). Znatna udaljenost između klastera 1 i 2-3 (skoro 1000), kao i nešto manja (oko 250) udaljenost između klastera 2 i 3, ukazuju na veliku različitost u antioksidativnoj aktivnosti između grupa proizvoda.



Slika 5.8. Dendrogram sa grupama pića prema antioksidativnoj aktivnosti, dobijen na osnovu klaster analize podataka svih primenjenih metoda

5.3. Antimikrobna aktivnost dobijenih likera i poređenje sa komercijalnim pićima

Kao što je u teorijskom delu objašnjeno, antimikrobna aktivnost lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, kao i pića na bazi biljaka, doprinosi njihovom blagotvornom delovanju na digestivne funkcije u organizmu. Smatra se da biljne komponente, delujući na patogene mikroorganizme, koji se mogu naći u GIT, i onemogućavajući razvijanje njihove rezistentnosti, zapravo, održavaju balans prirodne mikroflore, čime podstiču probavne funkcije. Kombinacija biljnih ekstrakata, kao u biljnim likerima i sličnim alkoholnim pićima, usled sinergističkog delovanja antimikrobnih biljnih komponenti, može doprineti izraženijem efektu u odnosu na pojedinačne ekstrakte.

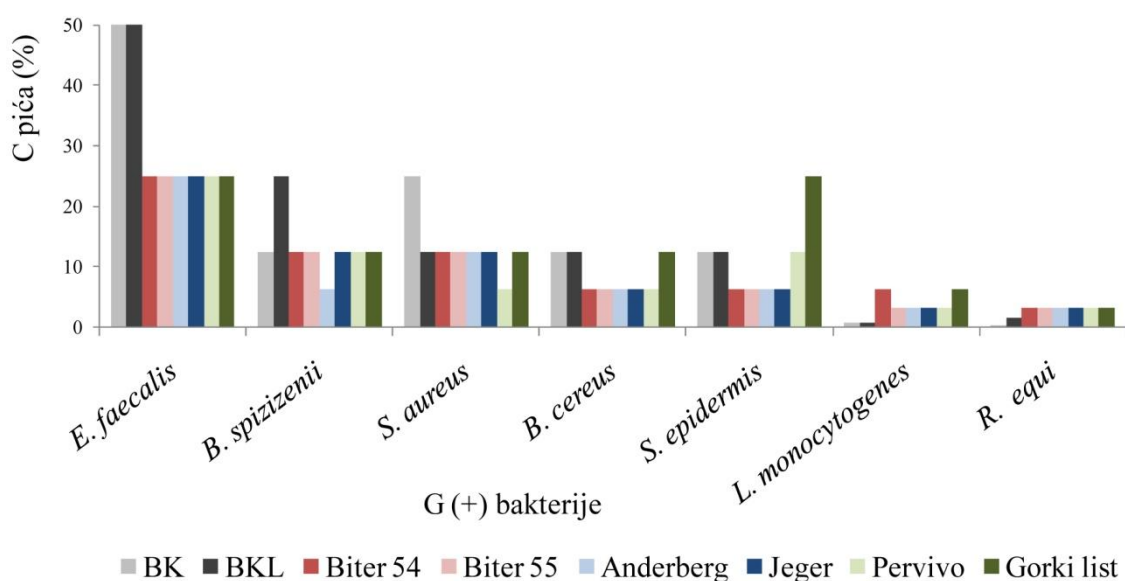
Antimikrobna aktivnost dobijenih likera (Biljni koktel -BK i Biljni koktel lajt -BKL), ispitana je na odabranim, patogenim sojevima mikroorganizama, najčešćih kontaminanata hrane i uzroka trovanja, od kojih većina izaziva infekcije GIT. Antimikrobna aktivnost BK i BKL je upoređena sa komercijalnim alkoholnim pićima, koja spadaju u grupu aperitiva i digestiva. Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) primenjena je mikrodiluciona metoda, sa mikrotitarskim pločicama. Opseg testiranih koncentracija pića, dobijen serijskim razređenjima, kretao se od 50 % do 0,05 % (v/v) pića. Najniža koncentracija koja je inhibirala rast mikroorganizama uzeta je za MIK vrednost. Presejavanjem sadržaja bunarića, koji su sadržali MIK na Petri ploče sa hranljivom podlogom, određena je minimalna mikrobicidna koncentracija (MBK).

Iako je sadržaj etanola kod najviših koncentracija pića, zbog serijskih razređenja bio upola manji (≤ 22 %) nego u originalnom piću, da bi se sa sigurnošću eliminisao uticaj etanola na mikroorganizme, urađena je preliminarna provera ove pretpostavke. U tom cilju, upoređene su MIK vrednosti uparenih, dealkoholizovanih uzoraka pića, i originalnih uzoraka, sa etanolom, za jednu G (+) bakteriju (*B.cereus*), jednu G (-) bakteriju (*S. Typhimurium*) i kvasac *C. albicans*. Dobijeni rezultat nije ukazao na značajnu razliku u MIK vrednostima između originalnih i dealkoholizovanih uzoraka. Zato je uticaj etanola u daljem istraživanju zanemaren. Od alkoholnih pića, najčešće je proučavana antimikrobna aktivnost vina, pri čemu se ista pripisuje pre sinergističkom

delovanju etanola, fenolnih jedinjenja i niskog pH, nego uticaju samog etanola (Boban et al., 2010a; Jana et al., 2014; Marimón et al., 1998).

Minimalne inhibitorne i mikrobicidne koncentracije dobijenih i sličnih komercijalnih pića kretale su se u opsegu od 0,39 % do $\geq 50,00$ %. Koncentracije pića koje su sprečile vidljivi rast mikroorganizama (MIK), uglavnom su delovale i mikrobicidno (tabela 5.7.).

Koncentracije, pri kojima su pića delovala na G (+) bakterije, prikazane su u tabeli 5.7. i na slici 5.9. Opseg inhibitornih koncentracija kretao se od 0,39 % do 50 % pića, a opseg mikrobicidnih koncentracija od 0,78 % do 50 % pića. Bakterija *E. faecalis* bila je najrezistentnija na delovanje odabranih pića, na koju su najslabiji efekat pokazala pića dobijena u ovom istraživanju, BK i BKL. Od svih pića, BKL je najslabije delovao protiv *B.spizizenii*, a BK protiv *S. aureus*. Najosetljivije među G (+) bakterijama bile su *L. monocytogenes* i *R. equi*, pri čemu su BK i BKL imali izraženiju antimikrobnu aktivnost u odnosu na komercijalna pića, sa mikrobicidnim koncentracijama već pri 0,78 - 3,13 %.



Slika 5.9. Minimalne inhibitorne koncentracije pića pri delovanju na G (+) bakterije

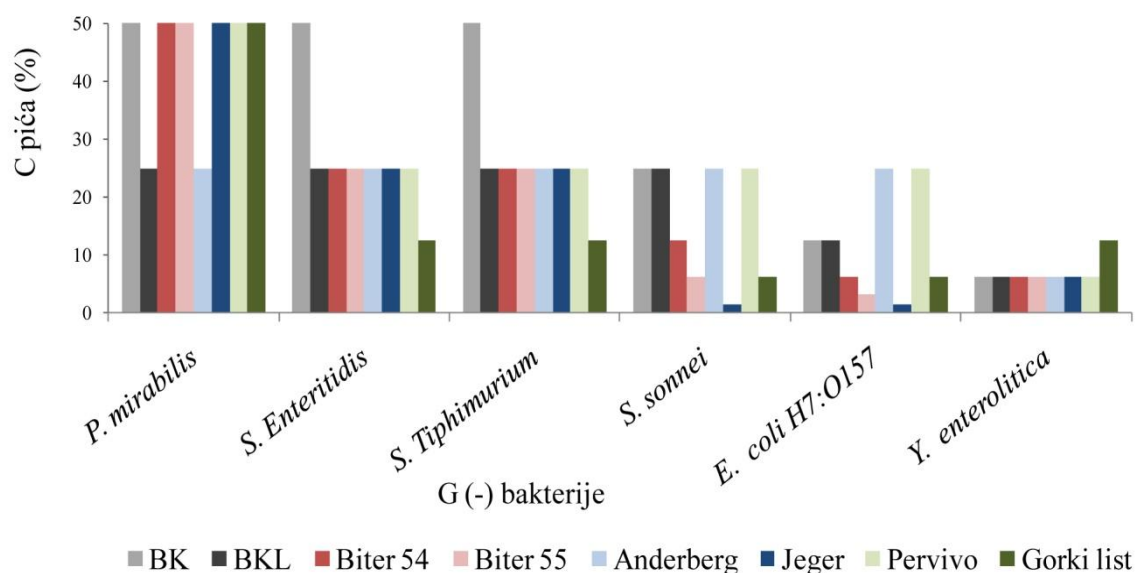
Tabela 5.7. Minimalne inhibitorne i mikrobicidne koncentracije BK, BKL i komercijalnih pića*

Mikroorganizmi	BK		BKL		Anderberg		Biter 54		Biter 55		Jeger		Pervivo		Gorki list	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
G (+)																
<i>E. faecalis</i>	50,00	50,00	50,00	50,00	25,00	50,00	25,00	50,00	25,00	50,00	25,00	n.d.	25,00	50,00	25,00	n.d.
<i>B. cereus</i>	12,50	12,50	12,50	12,50	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	12,50	6,25	12,50	12,50	25,00
<i>B.spizizenii</i>	12,50	12,50	25,00	25,00	6,25	6,25	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50	12,50
<i>S.aureus</i>	25,00	25,00	12,50	12,50	12,50	25,00	12,50	25,00	12,50	25,00	12,50	50,00	6,25	12,50	12,50	25,00
<i>S.epidermidis</i>	12,50	12,50	12,50	12,50	6,25	12,50	6,25	6,25	6,25	12,50	6,25	12,50	12,50	12,50	25,00	25,00
<i>L.monocytogenes</i>	0,78	3,13	0,78	0,78	3,13	12,50	6,25	6,25	3,13	6,25	3,13	3,13	3,13	3,13	6,25	6,25
<i>R. equi</i>	0,39	1,56	1,56	3,13	3,13	6,25	3,13	6,25	3,13	6,25	3,13	12,50	3,13	6,25	3,13	12,50
G (-)																
<i>P. mirabilis</i>	50,00	50,00	25,00	25,00	25,00	25,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	n.d.
<i>S. sonnei</i>	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	12,50	25,00	6,25	25,00	1,56	50,00	25,00	25,00	6,25	50,00
<i>Y. enterocolitica</i>	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	12,50	6,25	12,50	6,25	12,50	6,25	25,00	6,25	25,00	12,50	n.d.
<i>S.Enteritidis</i>	50,00	50,00	25,00	50,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	50,00	25,00	50,00	25,00	50,00	12,50	50,00
<i>S. Typhimurium</i>	50,00	50,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00	50,00	25,00	25,00	12,50	n.d.
<i>E. coli</i> O157:H7	12,50	n.d.	12,50	12,50	25,00	50,00	6,25	50,00	3,13	25,00	1,56	50,00	25,00	50,00	6,25	n.d.
Kvasac																
<i>C. albicans</i>	25,00	50,00	12,50	50,00	3,13	6,25	3,13	25,00	6,25	25,00	6,25	50,00	6,25	25,00	25,00	50,00

*n.d. –nijedna od ispitivanih koncentracija nije delovala ; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija izražena u procentima pića u inokulisanom bujonu predstavljena kao srednja vrednost tri merenja; MBK – minimalna mikrobicidna koncentracija izražena u procentima pića u inokulisanom bujonu predstavljena kao srednja vrednost tri merenja.

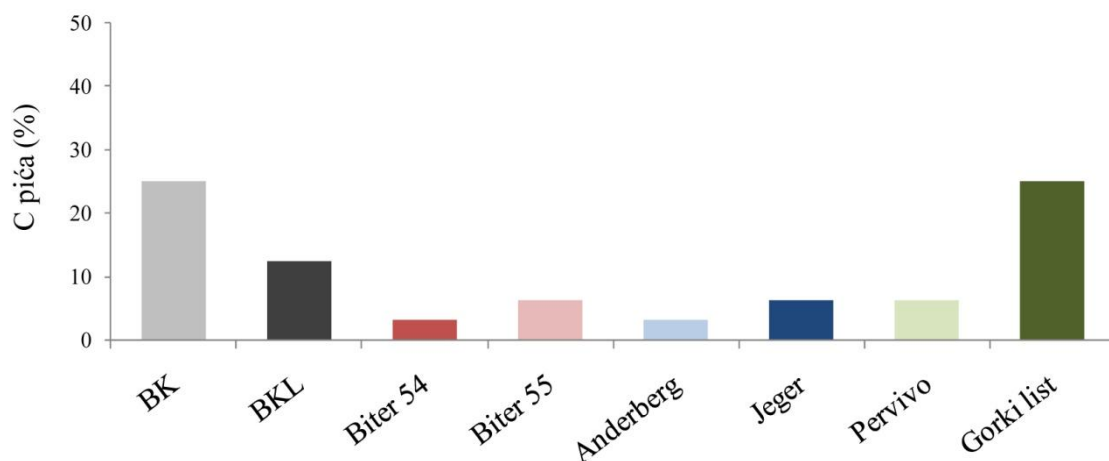
Koncentracije pri kojima su pića delovala na G (-) bakterije prikazane su u tabeli 5.7. i na slici 5.10. Opseg inhibitornih koncentracija kretao se od 1,56 % do 50 % pića, a opseg mikrobicidnih koncentracija od 6,25 % do ≥ 50 % pića. Sva pića su, uglavnom, imala letalni efekat na većinu bakterija, pa tako i oba likera dobijena u ovom istraživanju, BK i BKL (sa MBK od 6,25 % do 50 %). Kod BK izostao je letalni efekat na bakteriju *E.coli* O157:H7.

Na slici 5.10. može se uočiti najveća otpornost bakterije *P. mirabilis* na delovanje pića (MIK i MBK od 25 % do ≥ 50 %). Duplo jači efekat na ovu bakteriju, u odnosu na druga testirana pića, ispoljili su BKL i Anderberg. BK je na oba *Salmonella* soja delovao tek pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Bakterija *Y. enterolitica* je najosetljivija na delovanje pića (sa MBK od 6,25 % do 25 %).



Slika 5.10. Minimalne inhibitorne koncentracije pića pri delovanju na G (-) bakterije

Sva pića su ispoljila inhibitorni i letalni efekat na kvasac *C. albicans* (tabela 5.7., slika 5.11), koji, generalno, pokazuje veliku rezistentnost prema antimikrobnim agensima, između ostalog i prema alkoholnim pićima (Holetz, 2002; Janovska et al., 2003; Weckesser et al., 2007; Adedayo i Ajiboye, 2011; Milošević-Ifantis, 2013). U tom smislu, najbolje su delovali Anderberg i Biter 54 (sa MIK 3,13 %), a najslabije dejstvo su ispoljili BK i Gorki list (MIK = 25 %).



Slika 5.11. Minimalne inhibitorne koncentracije pića pri delovanju na kvasac *C.albicans*

Sumarno, BKL je, u odnosu na BK, delovao pri upola nižim koncentracijama na *S. aureus*, *Salmonella* sojeve, *P. mirabilis*, i *C. albicans*, dok je samo na *B. spizizenii* i *R. equi* BK ispoljio jače dejstvo. Jače antimikrobno dejstvo BKL na neke testirane patogene, u odnosu na BK, se može pripisati prisustvu steviol glikozida koji zamenjuje 25 % saharoze kod BKL. Manji sadržaj saharoze u BKL, koja za neke mikroorganizme predstavlja izvor hrane, može biti razlog nižih MIK-a ovog pića (Ruiz-Ruiz et al., 2015). Različiti izolati stevije, kao što su ekstrakti i etarsko ulje, kao i slatke komponente, iz klase glikozida, su u mnogim studijama pokazali antimikrobnu aktivnost (Muanda et al., 2011; Ramya et al., 2014; Siddique et al., 2014). Takođe, dodatak nekog od izolata stevije, kao niskokaloričnog zaslađivača, prehrambenom proizvodu, doprinosi izraženijoj antimikrobnoj aktivnosti istog. Tako je mlečno-voćno bezalkoholno piće, sa infuzijom lista stevije, imalo bolju aktivnost protiv *L. monocytogenes*, u odnosu na piće bez stevije (Rivas et al., 2016). Zatim, zamena 75 % saharoze prahom steviol glikozida, u komercijalnom čokoladnom proizvodu, dostupnom na Egipatskom tržištu, doprinela je smanjenju broja enterobakterija, koliforma, kvasaca, plesni, *S. aureus* i *Samonella sp.* U istoj studiji je dokazano da kombinacija ekstrakta lista stevije sa sintetičkim prehrambenim konzervansima, kao što su Na- metabisulfat, K- sorbat i Na- benzoat, ispoljava bolju antimikrobnu aktivnost, verovatno zbog sinergističkog efekta (Abdel-Rahman et al., 2015). Ruiz-Ruiz i saradnici (2015) su ustanovili mogućnost zamene 50 % saharoze ekstraktom stevije u hlebu. Autori su utvrdili da je broj aerobnih bakterija, kvasaca, plesni i koliformnih bakterija u ovakvom,

funkcionalnom hlebu, posle 1, 3 i 6 dana na sobnoj temperaturi, manji nego u kontrolnom hlebu, bez stevije.

Antimikrobna aktivnost alkoholnih pića, uopšte, izučavana je u ranijim istraživanjima. U tom smislu najaktuelnija su crna i bela vina, pri čemu je pažnja posvećena različitim parametrima uticaja na antimikrobno delovanje, kao što su pH, sadržaj etanola, polifenolna itd. (Medina et al., 2007; Daglia et al., 2007; Boban et al., 2010a,b). Posebno su zanimljivi podaci koji ukazuju na značajnu antimikrobnu aktivnost vina i vodke, obogaćenih suvim voćnim komponentama, listovima nane, zelenog čaja i kore cimeta, protiv bakterije *Helicobacter pylori*. Najveću inhibitornu aktivnost, u odnosu na kontrolu (neobogaćeno piće), pokazalo je vino sa listovima nane (Lin et al., 2005).

Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti biljnih likera su oskudni. Karabegović i saradnici (2012) su proučavali antibakterijsku i antifungalnu aktivnost Bitera 54, tokom skladištenja u različitim uslovima. Slično rezultatima dobijenim u ovom istraživanju, najveća aktivnost Bitera 54 je ispoljena na sojeve *E. coli* O157:H7 i *S. Typhimurium*.

5.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta

Naredni deo istraživanja biće posvećen analizi odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta, odnosno njihovih ekstrakata, kao konstituenata dobijenih likera. U tom smislu, kao i kod pića, prvo će biti određena njihova antioksidativna aktivnost, a, zatim će se pristupiti analizi antimikrobne aktivnosti. Pored toga, statističkim poređenjem rezultata primenjenih metoda, ispitaće se opravdanost primene polarografskih metoda, HPMC i MRAP, na kompleksnim uzorcima kao što su etanolni biljni ekstrakti.

5.4.1. Spektrofotometrijsko i polarografsko određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja

Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata je određena spektrofotometrijskim (FC, DPPH, FRAP i ABTS) i polarografskim metodama (HPMC, MRAP), primenjenim i u analizi pića. Obe polarografske metode su prvi put primenjene u ispitivanju aktivnosti

ekstrakata lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja (Sužnjević et al., 2015). U tabeli 5.8. prikazane su antiradikalska aktivnost i ukupna redukujuća moć, izražene u ekvivalentima Troloksa (mM TE), i sadržaj ukupnih fenola, izražen u ekvivalentima galne kiseline (mg GA/L). Redosled antioksidativnih aktivnosti (podbel > podubica > žalfija > iva > nana > anis > pelin > kičica > lavanda > morač > lincura > korijander) je u dobroj saglasnosti sa sadržajem ukupnih fenola (TPC).

Tabela 5.8. Sadržaj ukupnih fenola (TPC) i antioksidativna aktivnost ekstrakata lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja određena DPPH, FRAP i ABTS metodom*

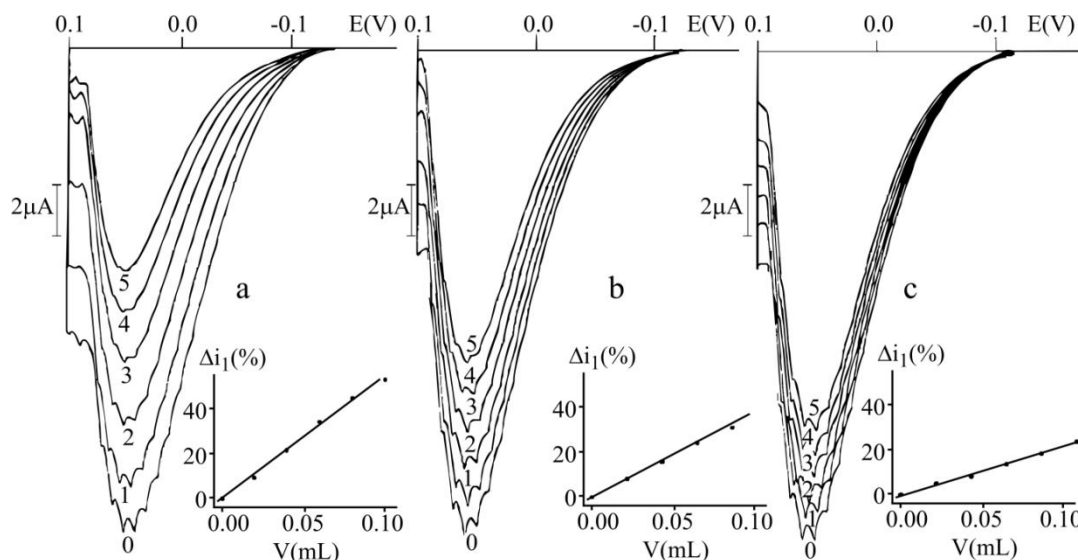
Trivijalno ime biljke	TPC (mg GAE/L)	DPPH (mM TE)	FRAP (mM TE)	ABTS (mM TE)
1 Podbel	9593,33 ± 232 ^j	20,56 ± 0,18 ^j	72,15 ± 0,14 ^m	44,21 ± 0,10 ^m
2 Podubica	7953 ± 163 ⁱ	18,05 ± 0,14 ⁱ	58,62 ± 0,09 ^l	38,44 ± 0,13 ^l
3 Žalfija	6627 ± 103 ^h	14,35 ± 0,18 ^h	53,98 ± 0,09 ^k	35,42 ± 0,12 ^k
4 Iva	6607 ± 76 ^h	14,01 ± 0,06 ^h	51,24 ± 0,22 ^j	34,62 ± 0,11 ^j
5 Nana	6287 ± 145 ^g	12,75 ± 0,06 ^g	47,29 ± 0,05 ⁱ	31,99 ± 0,10 ⁱ
6 Anis	4460 ± 20 ^f	9,15 ± 0,05 ^f	37,14 ± 0,13 ^h	24,12 ± 0,10 ^h
7 Pelin	3953 ± 140 ^e	8,32 ± 0,15 ^e	29,35 ± 0,09 ^g	19,11 ± 0,07 ^g
8 Kičica	2062 ± 6 ^d	4,35 ± 0,32 ^d	16,98 ± 0,10 ^f	11,52 ± 0,04 ^f
9 Lavanda	2008 ± 20 ^d	4,35 ± 0,12 ^d	15,53 ± 0,07 ^e	10,53 ± 0,06 ^e
10 Morač	969 ± 69 ^{bc}	2,84 ± 0,09 ^b	7,78 ± 0,09 ^c	6,21 ± 0,06 ^c
11 Lincura	758 ± 7 ^{ab}	1,99 ± 0,11 ^a	6,27 ± 0,09 ^b	4,51 ± 0,11 ^b
12 Korijander	645 ± 43 ^a	2,15 ± 0,15 ^a	4,52 ± 0,21 ^a	3,23 ± 0,03 ^a
Koeficijent varijacije (%)	7,15	7,25	4,60	2,35

*Različita slova u istoj koloni ukazuju da postoji statistički značajna razlika srednjih vrednosti posmatranih uzoraka ($p < 0,05$), prema post hoc Tukey-evom HSD testu; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja ± standardna devijacija (SD).

Korelacije između sadržaja fenola i antioksidativnih aktivnosti su visoke (tabela 5.10.). Direktna zavisnost sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti je primećena i u velikom broju prethodnih studija (Zheng i Wang, 2001; Katalinic et al., 2006; Büyükbacı i El, 2008; Li et al., 2008; Gorjanović et al., 2010c), dok su autori koji je poriču retki (Hinneburg et al., 2006; Cosio et al., 2006).

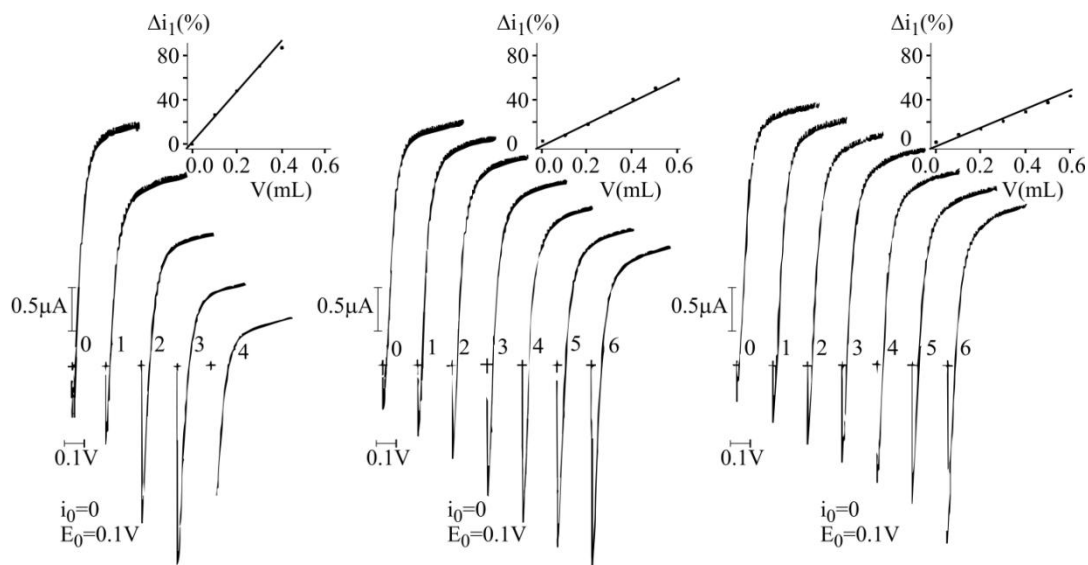
Uticaj ekstrakata anisa, kičice i korijandera na početnu anodnu struju kompleksa prikazan je na slici 5.12. Smanjenje anodne struje kompleksa HPMC je daleko

izraženije po dodatku anisa nego kičice, dok je uticaj korijandera znatno slabiji. Nagibi linearnog dela zavisnosti anodne struje kompleksa od zapremine dodatih biljnih ekstrakata, prikazani su u donjem desnom uglu svakog polarograma.



Slika 5.12. Polarografske krive pre (0) i po dodatku alikvota od po 20 μL (1, 2, 3, 4, 5) ekstrakta anisa (a), kičice (b) i korijandera (c) u radni rastvor pufera

Na slici 5.13. je prikazan uticaj pomenuta tri ekstrakta na katodnu struju redukcije jona žive. Nagibi linearnog dela zavisnosti procenta smanjenja katodne struje redukcije živinih jona od zapremine dodatih biljnih ekstrakata, prikazani su u gornjem desnom uglu svakog polarograma.



Slika 5.13. Polarografske krive pre (0) i po dodatku alikvota od po 20 μL (1, 2, 3, 4, 5) ekstrakta anisa (a), kičice (b) i korijandera (c) u radni rastvor pufera

U tabeli 5.9. su prikazane polarografski izmerene antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranog bilja. Aktivnost je izražena u procentima smanjenja anodne (HPMC) i katodne (MRAP) struje po mililitru ekstrakta (%/mL). Prikazani koeficijenti varijacije ukazuju na visok stepen pouzdanosti obe metode.

Rezultati dobijeni spektrofotometrijskim i polarografskim merenjima su saglasni, ali se ne poklapaju u potpunosti. Ekstrakti sa najvećom aktivnošću, izmerenom spektrofotometrijskim metodama, su pokazali i jaku antioksidativnu aktivnost dobijenu polarografskim metodama. Ekstrakt podubice je imao najveću antioksidativnu aktivnost merenu polarografskim metodama (698 %/mL i 321 %/mL). Sledeći je bio ekstrakt podbela (666 %/mL i 294 %/mL), koji je pokazao najveću antiradikalnu aktivnost, ukupnu redukujuću moć, i sadržaj fenola. Na osnovu HPMC i svih primenjenih spektrofotometrijskih metoda, žalfija ima veću aktivnost od nane. Redosled antioksidativne aktivnosti nane i ive, zatim lavande i kičice, kao i korijandera i lincure, bio je obrnut kod dve primenjene grupe metoda (tabela 5.8. i tabela 5.9.).

Tabela 5.9. Antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja određena HPMC i MRAP metodom*

	Trivijalno ime biljke	HPMC (%/mL)	MRAP (%/mL)
1	Podubica	698 ± 54 ^l	321 ± 16 ^l
2	Podbel	666 ± 24 ^k	294 ± 1 ^k
3	Žalfija	621 ± 4 ⁱ	227 ± 6 ⁱ
4	Nana	608 ± 24 ⁱ	250 ± 8 ^j
5	Iva	600 ± 10 ^h	219 ± 12 ^h
6	Anis	581 ± 32 ^g	219 ± 9 ^h
7	Pelin	573 ± 27 ^f	180 ± 10 ^g
8	Lavanda	373 ± 19 ^e	121 ± 4 ^e
9	Kičica	369 ± 8 ^e	130 ± 4 ^f
10	Morač	278 ± 11 ^d	102 ± 3 ^d
11	Korijander	209 ± 4 ^b	67 ± 4 ^b
12	Lincura	184 ± 5 ^a	52 ± 1 ^a
	Koeficijent varijacije(%)	7,7	5,3

*Različita slova u istoj koloni ukazuju da postoji statistički značajna razlika srednjih vrednosti posmatranih uzoraka ($p < 0,05$), prema post hoc Tukey-evom HSD testu; podaci u tabeli predstavljaju srednju vrednost tri uzastopna merenja ± standardna devijacija (SD).

5.4.2. Poređenje rezultata spektrofotometrijskog i polarografskog određivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata

5.4.2.1. Korelaciona analiza dobijenih podataka

U cilju poređenja rezultata, dobijenih polarografskim i spektrofotometrijskim metodama (DPPH, FRAP, ABTS i FC), kao i potvrde validnosti nove MRAP metode, urađena je korelaciona analiza dobijenih podataka. Korelacije između svih primenjenih metoda prikazane su u tabeli 5.10.

Statistički značajna pozitivna korelacija (na nivou $p < 0,001$), dobijena je između FC i polarografskih metoda, HPMC i MRAP (0,936 i 0,964, navedenim redosledom). Iz tabele se vidi da MRAP bolje korelira sa FC, DPPH, FRAP i ABTS od HPMC metode. Visoke korelacije između primenjenih polarografskih i standardnih spektrofotometrijskih metoda (preko 0,9) potvrđuju pouzdanost i opravdanost primene prvih na ekstraktima biljaka. Polarografske metode, MRAP i HPMC, su u dobroj međusobnoj korelaciji. Sve četiri spektrofotometrijske metode takođe međusobno dobro koreliraju (statistički značajna korelacija na nivou $p < 0,001$).

Primećeno je da polarografske metode bolje koreliraju sa spektrofotometrijskim kod uzoraka ekstrakata bilja (tabela 5.10.) nego kod alkoholnih pića (tabela 5.6.), što je i očekivano ako se uzme u obzir kompleksniji polifenolni sastav pića u odnosu na ekstrakte pojedinačnih biljaka.

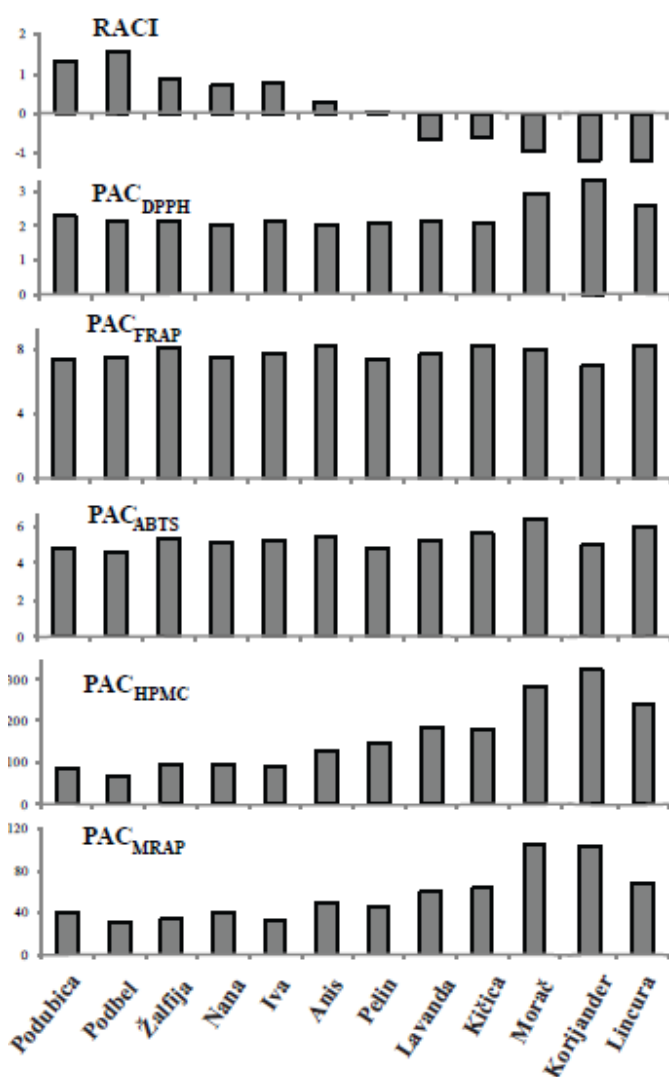
Tabela 5.10. Koeficijenti korelacije između FC, DPPH, FRAP, ABTS, HPMC i MRAP metoda.*

	MRAP	HPMC	ABTS	FRAP	DPPH
FC	0,964	0,936	0,995	0,998	0,997
DPPH	0,960	0,920	0,990	0,993	
FRAP	0,960	0,939	0,998		
ABTS	0,963	0,944			
HPMC	0,968				

*Svi koeficijenti korelacije su statistički značajni na nivou $p < 0,001$.

5.4.2.2. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti i koeficijent antioksidativne aktivnosti fenola ekstraktata odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja

Najveće RACI vrednosti (slika 5.14.) imali su ekstrakt podubice i podbela (1,33 i 1,57), praćene ekstraktom žalfije (0,85), nane (0,73) i ive (0,77). Niže pozitivne vrednosti su dobijene za ekstrakte anisa i pelina (0,20 i 0,05), dok negativne imaju lavanda (-0,64), kičica (-0,60), morač (-0,97), korijander (-1,18) i lincura (-1,20). Varijacije između PAC vrednosti za polarografske metode su veće u odnosu na one kod pića.



Slika 4.14. Indeks relativne antioksidativne aktivnosti (RACI) ekstraktata odabranog lekovitog i aromatičnog bilja, i koeficijenti antioksidativne aktivnosti fenola za svaku od primenjenih metoda (PAC_{DPPH}, PAC_{FRAP}, PAC_{ABTS}, PAC_{HPMC}, PAC_{MRAP})

Razlike između dobijenih vrednosti za PAC kod spektrofotometrijskih testova su zanemarljive, dok se značajne razlike uočljive kod PAC_{HPMC} i PAC_{MRAP}. U istraživanju Gorjanović i saradnika (2013) su, takođe, primećene znatne razlike u doprinosu različitih fenolnih komponenata ukupnoj antioksidativnoj aktivnosti uzorka, izmerenoj elektrohemijским (HPMC) i spektrofotometrijskim metodama (DPPH, FRAP i ABTS). Razlike u aktivnostima čistih supstanci, konkretno, u aktivnostima nekih fenolnih kiselina i flavonoida, određenih polarografskim metodama, su, takođe, bile veće od razlika dobijenih spektrofotometrijskim metodama (Petrović et al.,

2015a). Spektrofotometrijske metode su, očigledno, specifičnije za fenolna jedinjenja od polarografskih. U prilog tome ide i podatak da je polarografskim testovima izmerena aktivnost fiziološki aktivnih supstanci, koje ne spadaju u polifenole, i koje ne poseduju antiradikalnu ili redukujuću sposobnost (Gorjanovic et al, 2012).

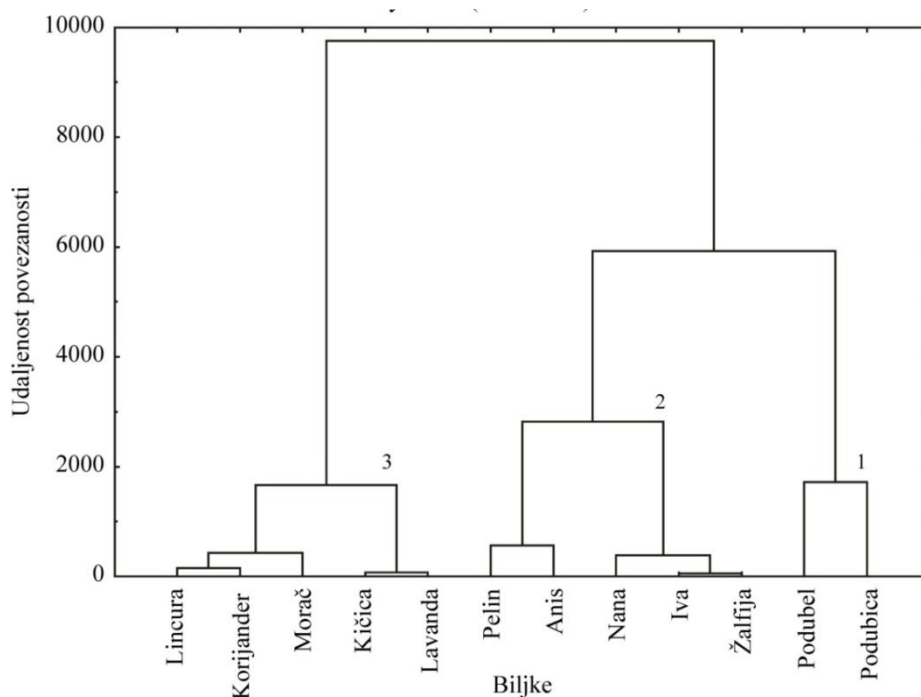
Zanimljivo je da je dobijena negativna korelacija između PAC vrednosti za DPPH, FRAP, ABTS, HPMC i MRAP metode i RACI vrednosti (-0,91, -0,85, -0,69, -0,29 i -0,67, navedenim redosledom). Najniže vrednosti za PAC_{HPMC} i PAC_{MRAP} mogu se uočiti kod uzoraka sa pozitivnim vrednostima RACI, odnosno najvećim antioksidativnim aktivnostima, dok najveće PAC vrednosti pripadaju ekstraktima sa negativnim RACI vrednostima. Visok PAC, očigledno, ne podrazumeva uvek i visoku antioksidativnu aktivnost uzorka, već je samo indikator prisustva aktivnih fenola u uzorku. Međutim, ukoliko su obe ove vrednosti visoke, to može biti pouzdan znak da je uzorak bogat polifenolima sa visokom antioksidativnom aktivnošću (Katalinic et al., 2006; Gorjanović et al., 2012).

Polazeći od dobijenih RACI vrednosti, relativnim poređenjem sa rezultatima drugih autora, nezavisno od primenjene metode, sličan redosled antioksidativne aktivnosti se može sresti i u drugim studijama sa odabranim biljnim vrstama. Vlase i saradnici (2014) su poredili antioksidativne aktivnosti ekstrakata bosiljka (*Ocimum basilicum*), izopa (*Hyssopus officinalis*) i podubice (*Teucrium chamaedrys*), i istakli ubedljivo najveću aktivnost ekstrakta podubice. Zatim, aktivnost ekstrakta podubice je bila bliska vrednosti dobijenoj za BHT (butil hidroksi toluen), kao pozitivne kontrole (Gursoy i Tepe, 2009). Stanković i saradnici (2012) navode biljke iz porodice *Teucrium* kao značajan izvor polifenola, među kojima je podubica najbogatiji. Usporedni pregled antioksidativne aktivnosti etanolnih ekstrakata plodova iz porodice *Umbelliferae* pokazao je sledeći opadajući redosled aktivnosti: anis < morač < korijander (Nickavar i Abolhasani, 2009). Cikličnom voltametrijom, FC i DPPH metodom, određena je antioksidativna aktivnost biljaka iz porodice *Labiatae* (Cosio et al., 2006). Žalfija je, pri tome, imala veću aktivnost od nane, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. S druge strane, u studiji, u kojoj je određena antioksidativna aktivnost i sadržaj ukupnih fenola ekstrakata 27 začinskih i 12 lekovitih biljaka, ekstrakt lavande je pokazao jaču aktivnost od ekstrakata nane, žalfije i morača, sa navedenim opadajućim redosledom aktivnosti (Zheng i Wang, 2001). Takođe, pri poređenju antioksidativne aktivnosti biljnih čajeva i

infuzija, RACI vrednost dobijena za infuziju nane bila je veća od one za infuziju žalfije (Gorjanovic et al, 2012). Ove i druge razlike u rezultatima različitih studija mogu se pripisati geografskom poreklu, klimatskim uslovima, fazi vegetacije u kojoj je biljni materijal sakupljen, starosti biljaka, genetskim faktorima, kao i različitim metodama ekstrakcije, odnosno izolacije aktivnih biljnih komponenata, i primenjenoj metodi određivanja antioksidativne aktivnosti (Gorjanovic et al, 2012; Dobravalskyte et al., 2013).

5.4.2.3. Klasterska analiza dobijenih podataka

Klusterskom analizom (Cluster Analysis - CA) podataka, dobijenih svim primenjenim metodama, odabrani biljni ekstrakti se, na osnovu antioksidativnih aktivnosti, mogu svrstati u nekoliko grupa. Na slici 5.15. je prikazan dendrogram, dobijen klaster analizom, na kome se vidi da podubica i podbel obrazuju grupu (klaster 1) sa najvećom antioksidativnom aktivnošću. Žalfija, iva, nana, anis i pelin formiraju klaster 2 srednje aktivne grupe biljaka, dok lavanda, kičica, morač, korijander i lincura spadaju u grupu slabije aktivnih biljaka. Uočena znatna udaljenost između klastera 1 i 2 je skoro 2500. Razlika između klastera 1 - 2 u odnosu na klaster 3 je oko 4000, što ukazuje na veliku različitost između grupa biljaka.



Slika 5.15. Dendrogram sa grupama biljaka prema antioksidativnoj aktivnosti, dobijen na osnovu klaster analize podataka svih primenjenih metoda

5.5. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih lekovitih, aromatičnih i začinskih biljnih vrsta

Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranog bilja, protiv odabranih G (-) i G (+) sojeva bakterija i jednog kvasca, je testirana mikrodilucionom metodom. Rezultati su predstavljeni kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK), odnosno koncentracija ekstrakta koja je delovala inhibitorno, i kao minimalna mikrobicidna koncentracija (MBK), koja je ispoljila mikrobicidno dejstvo. S obzirom na razliku u delotvornom opsegu koncentracija ekstrakata iz grupe biljaka sa gorkim materijama i grupe aromatičnih i začinskih biljaka, rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti su, kao i biljke, podeljeni u ove dve grupe. Dobijeni rezultati omogućavaju i uvid u doporinos pojedinačnih biljnih vrsta u ukupnoj antimikrobnoj aktivnosti dobijenih likera.

5.5.1. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka sa gorkim materijama

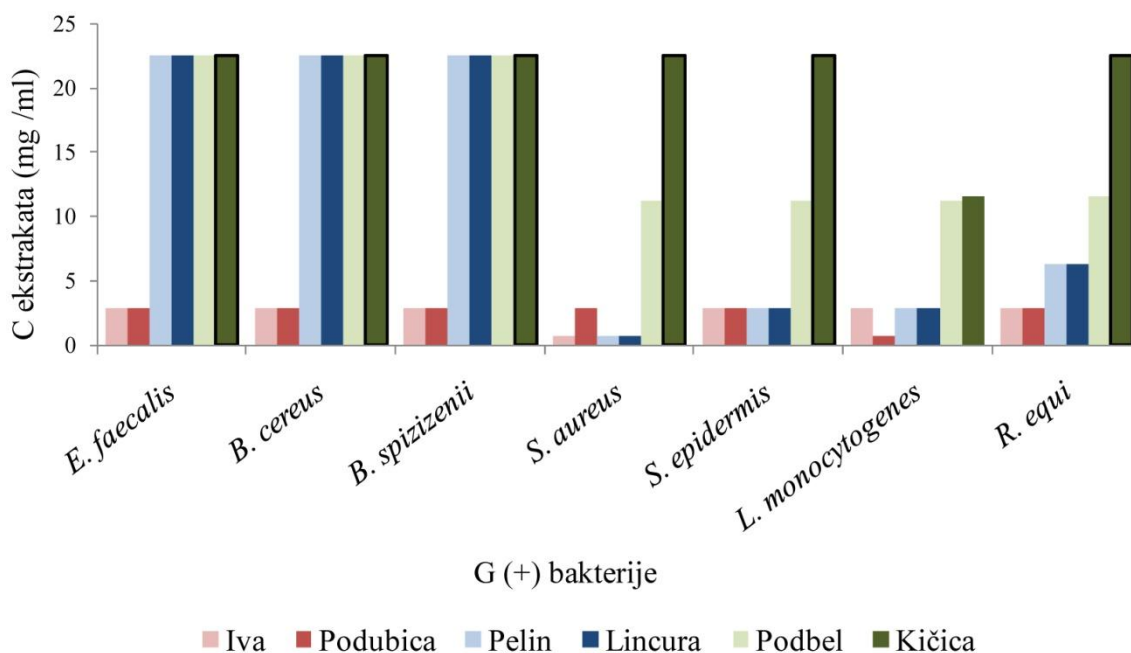
Rezultati određivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih biljaka sa gorkim materijama prikazani su u tabeli 5.11. Rezultati ukazuju na veću osetljivost G (+) u odnosu na G (-) sojeve pri delovanju većine biljnih ekstrakata. Opseg inhibitornih i mikrobicidnih koncentracija kretao se od 0,70 mg/mL do $\geq 22,50$ mg/mL za G (+), i od 2,81 mg/mL do $\geq 22,50$ mg/mL za G (-) sojeve.

Iz tabele 5.11. i slike 5.16. vidi se da je ekstrakt kičice ispoljio najslabije dejstvo na testirane G (+) sojeve, delujući samo na soj *L. monocytogenes*, u koncentraciji od 11,50 mg/mL. Ekstrakt podbela nije delovao mikrobicidno ni na jedan testiran mikroorganizam, a inhibitorno je delovao samo pri dve najviše koncentracije (22,50 mg/mL i 11,25 mg/mL). Pelin i lincura ispoljavaju jače dejstvo na G (+) bakterije, u opsegu koncentracija od 0,70 mg/mL do 22,50 mg/mL. Iva i podubica, obe iz porodice *Teucrium*, pokazuju evidentno najjaču inhibitornu aktivnost na G (+) bakterije, i to u opsegu koncentracija od 0,70 mg/mL do 2,81 mg/mL. Najosetljivija među G (+) bakterijama je bila *S. aureus*, jer je polovina testiranih biljaka delovala inhibitorno već pri 0,70 mg/mL.

Tabela 5.11. Minimalne inhibitorne i mikrobicidne koncentracije ekstrakata ispitivanog bilja sa gorkim materijama *

Mikroorganizmi	Podubica		Podbel		Iva		Pelin		Kičica		Lincura	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
G (+)												
<i>E. faecalis</i>	2,81	5,63	22,50	n.d.	2,81	5,63	22,50	n.d.	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>B.cereus</i>	2,81	5,63	22,50	n.d.	2,81	2,81	22,50	22,50	n.d.	n.d.	11,25	n.d.
<i>B. spizizenii</i>	2,81	2,81	22,50	n.d.	2,81	2,81	22,50	22,50	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>S.aureus</i>	2,81	2,81	11,25	n.d.	0,70	5,63	0,70	0,70	n.d.	n.d.	0,70	5,63
<i>S.epidermidis</i>	2,81	2,81	11,25	n.d.	2,81	5,63	2,81	2,81	n.d.	n.d.	2,81	11,50
<i>L.monocytogenes</i>	0,70	n.d.	11,25	n.d.	2,81	22,50	2,81	n.d.	11,25	n.d.	2,81	n.d.
<i>R. equi</i>	2,81	2,81	11,25	n.d.	2,81	2,81	6,25	6,25	n.d.	n.d.	6,25	n.d.
G (-)												
<i>P. mirabilis</i>	2,81	5,63	22,50	n.d.	2,81	2,81	22,50	22,50	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>S. sonnei</i>	2,81	2,81	11,25	n.d.	2,81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,25	n.d.
<i>Y. enterocolitica</i>	2,81	2,81	22,50	n.d.	2,81	2,81	22,50	22,50	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>S.Enteritidis</i>	5,63	5,63	11,25	n.d.	5,63	5,63	22,50	22,50	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>S. Typhimurium</i>	5,63	5,63	22,50	n.d.	5,63	11,25	22,50	n.d.	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
<i>E. coli</i> O157:H7	n.d.	n.d.	22,50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	22,50	n.d.
Kvasac												
<i>Candida albicans</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

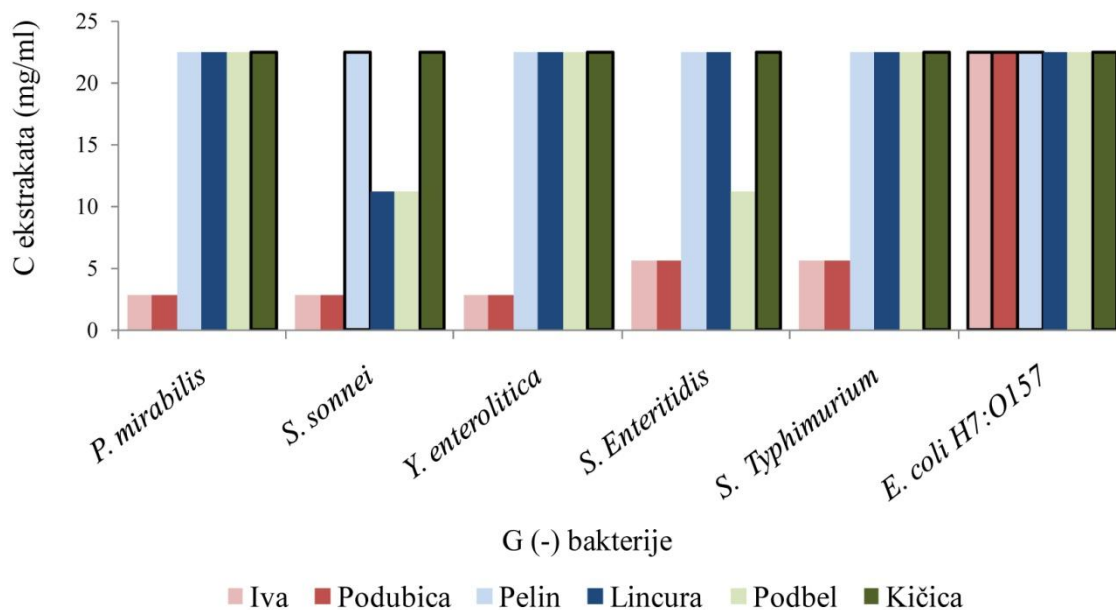
* n.d. – nijedna od ispitivanih koncentracija nije delovala; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija izražena u miligramima suvog ekstrakta po mililitru rastvora (mg/mL) predstavljena kao srednja vrednost tri merenja; MBK – minimalna mikrobicidna koncentracija izražena u miligramima suvog ekstrakta po mililitru rastvora (mg/mL) predstavljena kao srednja vrednost tri merenja.



Slika 5.16. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanih biljaka sa gorkim materijama pri delovanju na G (+) bakterije; Oivičeni barovi označavaju ekstrakte koji nisu delovali na određeni mikroorganizam u ispitivanom opsegu koncentracija

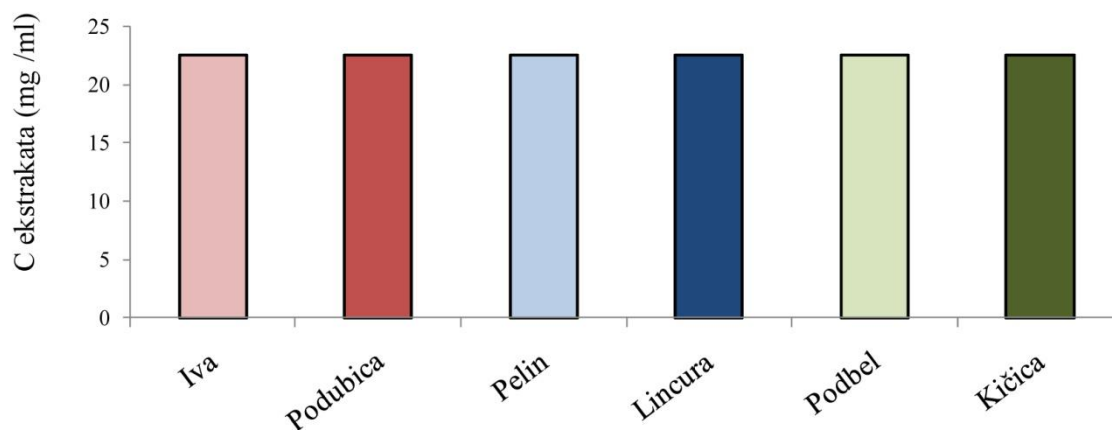
Kao i kod G (+) bakterija, ekstrakt kičice se pokazao kao najslabiji antimikrobni agens pri delovanju na G (-) sojeve, sa izostankom letalnog dejstva u svim testiranim koncentracijama (slika 5.17.). Ekstrakt pelina je delovao inhibitorno i mikrobicidno na G (-) bakterije samo u najvišoj testiranoj koncentraciji, ili nije uopšte delovao u testiranom opsegu koncentracija. Lincura i podbel su ispoljili nezatno jače dejstvo, u dvema najvišim koncentracijama. Iva i podubica, kao i kod G (+) sojeva, su imale najjače delovanje, sa inhibitornim i mikrobicidnim koncentracijama već od 2,81 mg/mL. Iva ne deluje mikrobicidno na soj *S. sonnei*, a oba ekstrakta su ostala neaktivna prema *E. coli* O157:H7 u testiranom opsegu koncentracija.

E. coli O157:H7, na koju su samo ekstrakti podbela i lincure delovali inhibitorno, i to u najvišoj koncentraciji, je najrezistentija testirana bakterija pri delovanju ekstrakata biljaka sa gorkim materijama. Međusobne razlike u otpornosti ostalih G (-) bakterija nisu izražene.



Slika 5.17. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanih biljaka sa gorkim materijama pri delovanju na G (-) bakterije; Oivičeni barovi označavaju ekstrakte koji nisu delovali na određeni mikroorganizam u ispitivanom opsegu koncentracija

Nijedna od ispitivanih koncentracija ekstrakata gorkog lekovitog bilja nije delovala na kvasac *C. albicans* (slika 5.18.).



Slika 5.18. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanih biljaka sa gorkim materijama pri delovanju na kvasac *C. albicans*; Oivičeni barovi označavaju ekstrakte koji nisu delovali na određeni mikroorganizam u ispitivanom opsegu koncentracija

Relativnim poređenjem dobijenih rezultata antimikrobne aktivnosti za testirane biljke, sa rezultatima drugih autora, nezavisno od primenjene metode, nailazi se na određene sličnosti. Tako je kičica, u skladu sa našim rezultatom, ispoljila najslabije delovanje na ispitivane mikroorganizme disk-difuzionom metodom (Kirbağ et al.,

2009). Takođe, MIK ekstrakta kičice bio je najveći među ispitivanim ekstraktima lekovitih biljaka iz Brazila (Pereira et al., 2011). Izraženu antimikrobnu aktivnost podubice opisuju i druge studije. u istraživanju Vlase i saradnika (2014) Aktivnost ekstrakta podubice protiv *S. aureus* je čak bila jača od referentnog antibiotika. Ekstrakti 7 biljaka iz roda *Teucrium*, sa područja Srbije, među kojima su i podubica i iva, pokazale su se kao dobri prirodni antimikrobni agensi (Stanković et al., 2012). U istraživanju Poiată i saradnika (2008) je zapažena slaba aktivnost ekstrakata biljaka iz roda *Artemisia*, kojem pripada i pelin, prema G (-) bakterijama, što je u skladu sa dobijenim rezultatom.

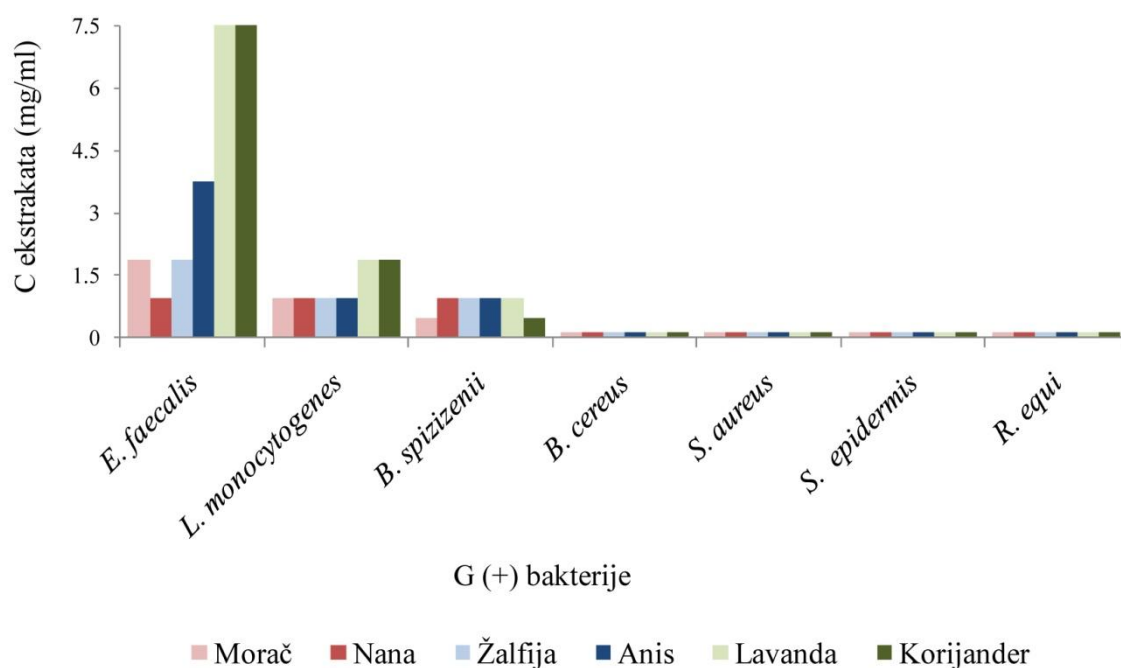
Sa aspekta testiranih mikroorganizama, u mnogim studijama je dokumentovana velika osetljivost soja *S. aureus* prema ekstraktima i drugim biljnim izolatima, što je u skladu sa dobijenim rezultatima (Lino i Deogracious, 2006; Ghasemi et al., 2010; Ceyhan et al., 2012). Saglasno sa našim rezultatom, *B.cereus*, kao i *E. coli*, često pokazuju veliku rezistentnost na delovanje ekstrakata lekovitog bilja (Ghasemi et al., 2010; Ceyhan et al., 2012; Stanković et al., 2012; Nazzaro et al., 2013; Vlase et al., 2014). Takođe, rezistentnost kvasca *C. albicans* na ekstrakte ispitivanih i drugih biljnih vrsta, kao i na izolovane biljne komponente, primećena je i u ranijim istraživanjima (Holetz, 2002; Janovska et al., 2003; Weckesser et al., 2007; Milošević-Ifantis, 2013).

5.5.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata odabranih aromatičnih i začinskih biljaka

U tabeli 5.12. su predstavljene MIK i MBK vrednosti ekstrakata odabranog aromatičnog i začinskog bilja. Koncentracije ekstrakata, koje su delovale inhibitorno i mikrobicidno na testirane mikroorganizme, kretale su se u opsegu od 0,12 mg/mL do 7,50 mg/mL.

Kada su u pitanju G (+) bakterije, inhibitorne i mikrobicidne koncentracije kretale su se u istom opsegu, i to od 0,12 mg/mL do 7,50 mg/mL. Sa slike 5.19. se vidi da su ekstrakti nane, morača i žalfije ispoljili najjače delovanje na ispitivane G (+) sojeve. Posle njih sledi ekstrakt anisa, a najslabiju antimikrobnu aktivnost ispoljili su ekstrakti korijandera i lavande. Najosetljivije su bile bakterije *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* i *R. equi*, na koje su svi ekstrakti već pri koncentraciji od 0,12 mg/mL delovali kako inhibitorno tako i mikrobicidno. *B. spizizenii* i *L. monocytogenes* bile su

nešto otpornije, sa MIK i MBK ekstrakata od 0,47 mg/mL i od 0,94 mg/mL, po navedenom redosledu. Najrezistentnija od svih G (+) sojeva je bila *E. faecalis*, što je i očekivano, s obzirom da ovaj soj inače pokazuje rezistentnost na delovanje antimikrobnih agenasa (Bayoub et al., 2010; Zomorodian et al., 2015; Tolulope et al., 2015). Ekstrakt nane je delovao na ovu bakteriju pri najnižoj koncentraciji (MIK 0,94 mg/mL, MBK 1,87mg/mL).



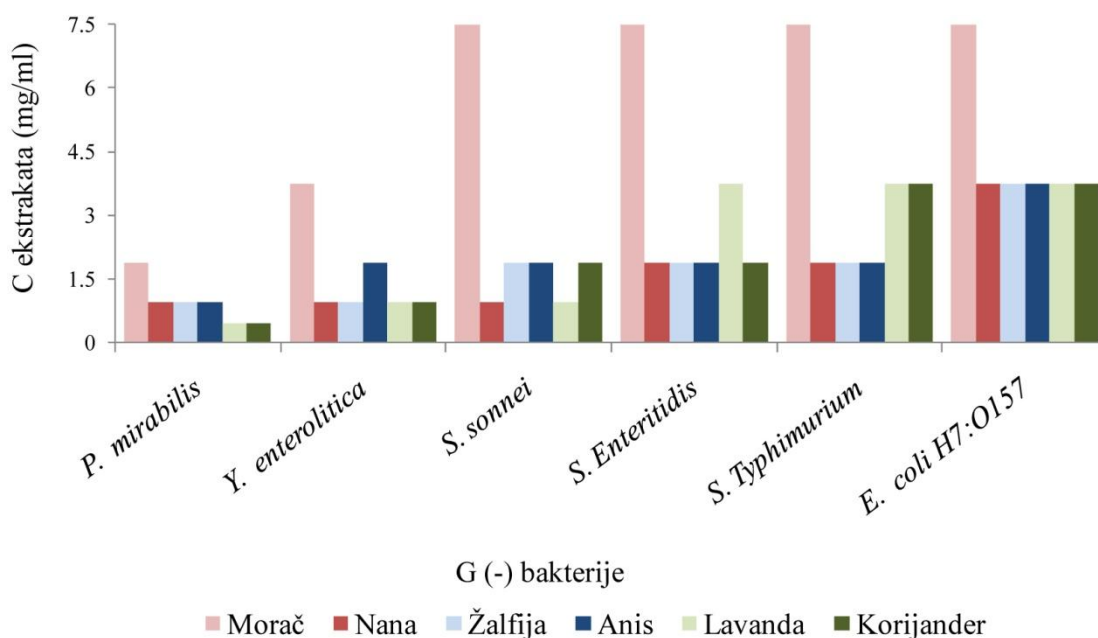
Slika 5.19. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanog aromatičnog i začinskog bilja pri delovanju na G (+) bakterije

Tabela 5.12. MIK i MBK vrednosti ekstrakata odabranog aromatičnog i začinskog bilja *

Mikroorganizmi	Morač		Lavanda		Nana		Žalfija		Anis		Korijander	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
G (+)												
<i>E.faecalis</i>	1,87	1,87	7,50	7,50	0,94	1,87	1,87	1,87	3,75	3,75	7,50	7,50
<i>B.cereus</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>B.spizizenii</i>	0,47	0,47	0,94	0,94	0,94	1,87	0,94	0,94	0,94	0,94	0,47	0,47
<i>S. aureus</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>S.epidermidis</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
<i>L.monocytogenes</i>	0,94	0,94	1,87	3,75	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	1,87	1,87
<i>Rhodococcus equi</i>	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
G (-)												
<i>P.mirabilis</i>	1,87	1,87	0,47	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,47	0,47
<i>S.sonnei</i>	7,50	7,50	0,94	1,87	0,94	0,94	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87
<i>Y. enterolitica</i>	3,75	7,50	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	1,87	1,87	0,94	0,94
<i>S.Enteritidis</i>	7,50	7,50	3,75	3,75	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	3,75
<i>S. Typhimurium</i>	7,50	7,50	3,75	3,75	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	1,87	3,75	3,75
<i>E. coli</i> O157:H7	7,50	n.d.	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75	3,75
Kvasac												
<i>C.albicans</i>	1,87	3,75	1,87	3,75	3,75	7,50	7,50	n.d.	0,47	0,94	3,75	7,50

* n.d. – nijedna od ispitivanih koncentracija nije delovala; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija izražena u miligramima suvog ekstrakta po mililitru rastvora (mg/mL) predstavljena kao srednja vrednost tri merenja; MBK – minimalna mikrobicidna koncentracija izražena u miligramima suvog ekstrakta po mililitru rastvora (mg/mL) predstavljena kao srednja vrednost tri merenja

Minimalne inhibitorne i mikrobicidne koncentracije ispitivanog aromatičnog i začinskog bilja na G (-) bakterije kretale su se od 0,47 mg/mL do $\geq 7,50$ mg/mL. U većini slučajeva MIK ekstrakata je delovala ujedno i mikrobicidno. Sa slike 5.20. se jasno vidi da je ekstrakt morača imao ubedljivo najslabiju aktivnost prema ispitivanim G (-) bakterijama, dok razlike u jačini delovanja ostalih biljaka nisu izražene. Najosetljiviji među G (-) bakterijama bio je soj *P.mirabilis*, sa opsegom delovanja ekstrakata od 0,47 mg/mL do 1,87 mg/mL. Osetljivost ove bakterije primećena je i ranije (Omar et al., 2013). Najotpornija bakterija je, kao i u slučaju gorkog bilja, *E. coli* O157:H7. Ekstrakt morača nije delovao ni u jednoj testiranoj koncentraciji na pomenuti soj.

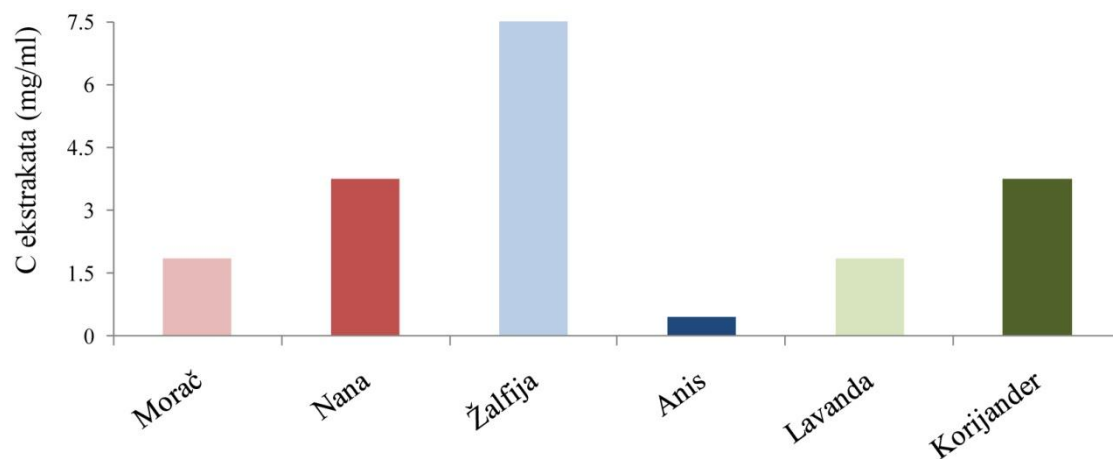


Slika 5.20. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanog aromatičnog i začinskog bilja pri delovanju na G (-) bakterije

Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima. Ekstrakt nane je i u drugim studijama domaćih autora ispoljio značajnu antimikrobnu aktivnost, bolju od drugih biljaka sa područja naše zemlje (Šarić et al, 2009). Ekstrakti morača i žalfije su takođe svrstani među najjače inhibitore bakterija, koje mogu izazvati infekcije gastrointestinalnog trakta (Cwikla et al, 2010). Prilikom poređenja antimikrobne aktivnosti ekstrakata nekoliko začina prema *E. coli*, ekstrakt korijandera nije pokazao inhibitornu aktivnost (Pokhrel, 2012).

Može se zaključiti da su, kao i u slučaju gorkih, aromatične biljne vrste ispoljile bolju antimikrobnu aktivnost prema G (+) u odnosu na G (-) bakterije. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim istraživanjima (Ojala et al., 2000; Alzoreky i Nakahara, 2003; Shan et al., 2005; Lesjak, 2011). Gram (-) bakterije su kompleksnije građe ćelijskog zida, pri čemu prisustvo spoljašnje membrane verovatno predstavlja zaštitnu barijeru pri delovanju antimikrobnih agenasa, dok enzimi u periplazmatskom prostoru razgrađuju supstance koje dolaze spolja u ćeliju (Gao et al., 1999). Gram (+) bakterije nemaju spoljašnju membranu pa antimikrobni agensi lako prolaze kroz ćelijski zid i citoplazmatičnu membranu dovodeći do isticanja citoplazme iz ćelije i njene koagulacije (Nikaido, 1994; Shan et al., 2005).

Ekstrakti su delovali inhibitorno i mirkobicidno na kvasac *C.albicans* u opsegu koncentracija od 0,47 mg/mL do $\geq 7,50$ mg/mL. Najjaču aktivnost prema kvascu pokazao je ekstrakt anisa (slika 5.21.), sa inhibitornim dejstvom pri koncentraciji od 0,47 mg/mL i fungicidnim, odnosno letalnim dejstvom, pri 0,94 mg/mL. Najslabiju aktivnost prema kvascu pokazao je ekstrakt žalfije (MIK 7,50 mg/mL, MBK $\geq 7,50$ mg/mL). Slaba aktivnost vodeno - etanolnog rastvora žalfije prema ovom kvascu primećena je i u drugim studijama (Garcia et al., 2013).



Slika 5.21. Minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata ispitivanog aromatičnog i začinskog bilja pri delovanju na kvasac *C. albicans*

Iz priloženih rezultata određivanja antimikrobne aktivnosti biljaka, kao glavnih konstituenata dobijenih likera (tabela 5.11. i tabela 5.12.), vidi se da je najmanja inhibitorna (i mirkobicidna) koncentracija ekstrakata biljaka sa gorkim materijama i do višestruko veća u odnosu na najmanju inhibitornu koncentraciju ekstrakata aromatičnog

i začinskog bilja. Aromatične i začinske biljke su bogatije u isparljivim komponentama, terpenima, koje ulaze u sastav etarskog ulja, tako da se i ustanovljena antimikrobna aktivnost pića BK i BKL može najviše pripisati upravo terpenima. Antimikrobna aktivnost terpena je dokazana u mnogim studijama. Na primer, dokazano je inhibitorno delovanje najzastupljenijih terpena nane, pri čemu je mentol delovao na 24, menton na 4, izomenton na dve ispitivane bakterije dok eukaliptol (1,8-cineol) nije ispoljio dejstvo ni na jedan testiran soj (Kotan et al., 2007). I druge studije ukazuju na izraženu antimikrobnu aktivnost mentola (Trombetta et al., 2005; Gupta i Saxena, 2010).

Tujon i kamfor, glavne komponente etarskog ulja žalfije, ispoljavaju antimikrobnu aktivnost na bakteriju *L. monocytogenes* (Laciar et al., 2009). Pored tujona, još neki terpenoidi, takođe nađeni u etarskom ulju žalfije, timol, α -terpineol, terpinen-4-ol i linalol, su zabeleženi u literaturi kao komponente sa širokim spektrom antimikrobnog delovanja, dok 1,8-cineol, borneol, bornil acetat i β -pinen, takođe, često prisutni u žalfiji, inhibiraju ali slabije i manji broj ispitivanih bakterija (Dorman i Deans, 2000). U studiji Kotan i saradnika (2007) ukazano je na značajno antimikrobno delovanje linalola i terpinen-4-ola na širok spektar mikroorganizama. Utvrđen je i antifungalni efekat monoterpena, kao što su terpinen-4-ol, α -pinen, β -pinen, 1,8-cineol, linalol i α -terpineol protiv *C. albicans*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (Kêdzia et al., 2000; Hammer et al., 2003).

U detaljnoj studiji Dorman i Deans-a (2000) je analizirana antimikrobna aktivnost 21 individualnog terpenoida, prema 25 sojeva bakterija, agar- difuzionom metodom. Neke komponente, koje su prisutne u ispitivanom etarskom ulju lavande, su pokazale značajnu antimikrobnu aktivnost prema većini bakterija, kao na primer α -terpineol, terpinen-4-ol, linalol, geranil acetat i nerol. Inhibitorno delovanje anetola, najzastupljenije komponente etarskog ulja anisa i morača, na plesni, kvasce i bakterije je primećeno u nekoliko istraživanja (Curtis et al., 1996; Huang et al., 2010; Orhan et al., 2012).

5.6. Sastav isparljive frakcije odabranih aromatičnih i začinskih biljnih vrsta

U cilju utvrđivanja sastava isparljive frakcije, kao nosioca antimikrobne aktivnosti odabranih biljaka, a samim tim, i dobijenih likera, urađena je GC-MS analiza

njihovih etarskih ulja. Prvobitnim planom, za analizu isparljive frakcije, bile su odabrane sve biljke uvršćene u ovo istraživanje. S obzirom na mali udeo aromatičnih, isparljivih jedinjenja u biljakama, u kojima dominiraju gorki sastojci, izolovanje njihovog etarskog ulja, primenom vodene destilacije Clevenger uređajem, nije bilo moguće. Zato je ovo poglavlje posvećeno analizi isparljive frakcije odabranih aromatičnih i začinskih biljaka.

5.6.1. Nana

Od ukupno identifikovanih 85,52 % komponenti etarskog ulja nane, najzastupljenije su oksidovani monoterpeni i to: L-menton, mentol, izomenton i mentil acetat i eukaliptol, navedenim redosledom (tabela 5.13.). Sličan kvalitativan i kvantitativan hemijski sastav etarskog ulja nane dobili su i drugi autori (Aflatuni et al., 2000; Stojanova et al., 2000; Iscan et al., 2002; Soković et al., 2009; Zeković et al., 2009; Derwich et al., 2011).

Tabela 5.13. Hemijski sastav etarskog ulja nane (*Mentha piperita*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	α -pinen	0,07
2.	β -felandren	0,03
3.	β -pinen	0,32
4.	β -mircen	0,13
5.	3-oktanol	0,18
6.	D-limonen	0,09
7.	eukaliptol (1,8-cineol)	4,02
8.	trans- β -ocimen	0,33
9.	γ -terpinen	0,20
10.	trans- β -terpineol	0,88
11.	β -linalol	0,56
12.	L-menton	30,51
13.	izomenton	10,44
14.	mentol (L)	26,29
15.	4-terpineol	0,60
16.	izomentol	0,43
17.	α -terpineol	0,33
18.	citronelol	0,09
19.	pulegon	0,02
20.	karvon	1,27
21.	piperiton	1,95
22.	neomentil acetat	0,49

23.	trans-anetol	0,55
24.	mentil acetat	5,23
25.	β -burbonen	0,52
Σ	Ukupno identifikovano	85,52

5.6.2. Žalfija

Od ukupno 95,19 % identifikovanih komponenti ulja, najzastupljenije pripadaju klasi monoterpena, diterpena i seskviterpena, a to su: tujon (α i β), kamfor, 1,8-cineol, ledol, kamfen, borneol, bornil acetat, α -humulen, α -pinen i manol, po navedenom redosledu. Ulje sadrži i manji udeo (ali i dalje iznad 1 %) β -pinena, kariofilena i humulen oksida II (tabela 5.14.). Etarsko ulje žalfije je često proučavano, pri čemu je sličan hemijski sastav dobijen u studijama drugih autora (Radulescu et al., 2004; Mitić-Ćulafić et al., 2005; Bozin et al., 2007; Boszormenyi et al., 2009; Glisic et al., 2010; Sertel et al., 2011; Porte et al., 2013). Dobijeni rezultati su, takođe, u velikoj meri, u skladu sa standardom ISO 9909 (ISO 9909, 1997). Ipak, limonen nije pronađen u ispitivanom uzorku, što je u, ipak, skladu sa rezultatima Radulescu i saradnika (2004). U nekim studijama su, u značajnom procentu, dokumentovana i druga jedinjenja koja nisu nađena u ovom istraživanju, kao npr veridiflorol (11,71 %) i 1-okten 8-ol (8,5 %) (Radulescu et al., 2004; Abu-Darwish et al., 2013). Ove i druge razlike u hemijskom sastavu isparljive frakcije ispitivanih biljaka, u odnosu na rezultate drugih autora, se mogu pripisati različitim ekološkim faktorima, kao što su geografsko poreklo i klimatski uslovi, zatim različitom vegetacionom periodu u kom je biljni materijal sakupljen, starosti biljaka, genetskim faktorima, kao i različitim metodama izolacije etarskih ulja.

Tabela 5.14. Hemijski sastav etarskog ulja žalfije (*Salvia officinalis*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	α -tujen	0,08
2.	α -pinen	2,80
3.	kamfen	5,18
4.	β -pinen	1,19
5.	β -mircen	0,89
6.	α -felandren	0,09
7.	α -terpinen	0,27
8.	<i>p</i> -cimen	0,91

9.	1,8-cineol	9,71
10.	cis-ocimen	0,05
11.	benzeneacetaldehid	0,01
12.	β -ocimen	0,01
13.	γ -terpinen	0,33
14.	ment-2-en-1-ol (cis-para)	0,05
15.	linalol oksid (cis-)	0,04
16.	terpinolen	0,44
17.	linalol	0,05
18.	α - tujon (cis-)	22,28
19.	1-oktenil acetat	0,03
20.	β - tujon (trans-)	3,56
21.	α -kamfoleal	0,07
22.	kamfor	21,72
23.	l-menton	0,07
24.	izoborneol	0,06
25.	trans- 3 pinanon	0,04
26.	borneol	4,37
27.	mentol (L)	0,07
28.	terpinen-4-ol	0,70
29.	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,12
30.	α -terpineol	0,28
31.	mirtenol	0,14
32.	piperitol (trans)	0,04
33.	karveol trans	0,07
34.	karveol cis	0,03
35.	geraniol	0,08
36.	bornil acetat	3,57
37.	timol	0,11
38.	kariofilen	1,49
39.	α -humulen	3,52
40.	alo-aromadendren	0,10
41.	ledol	6,73
42.	humulen oksid ii	1,08
43.	manol	2,75
Σ	Ukupno identifikovano	95,19

5.6.3. Lavanda

Od ukupno 90,40 % identifikovanih komponenti etarskog ulja lavande, najzastupljenije su monoterpeni i seskviterpeni, i to: linalol, linalil acetat, lavandulol, lavandulil acetat, α -terpineol, kariofilen, kariofilen oksid, po navedenom redosledu. U manjoj količini, ali preko 1 %, idetifikovani su: terpinen-4-ol, geranil acetat, neril acetat, 1,8-cineol, cis-linalol oksid, trans-linalol oksid, cis- β -ocimen, trans- β -ocimen, β -

mircen i nerol (tabela 5.15.). Dobijeni sastav ispraljive frakcije lavande je, u velikoj meri, u skladu sa rezultatima opisanim u literaturi (Shellie et al., 2002; Afsharypuor i Azarbajevany, 2006; Verma et al., 2010; Hassanpour-Aghdam et al., 2011), dok su Jianu i saradnici (2013) dobili drugačiji sastav etarskog ulja lavande iz Rumunije.

Sve komponente, propisane standardom ISO 3515, prisutne su u ispitivanoj biljci, sa određenim odstupanjem u udelu nekih komponenti (ISO 3515, 2002). Linalil acetat je prisutan u znatno manjoj količini, a α -terpineol u većoj količini od one propisane standardom.

Tabela 5.15. Hemijski sastav etarskog ulja lavande (*Lavandula officinalis*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	α -tujen	0,06
2.	α -pinene	0,15
3.	kamfen	0,25
4.	3-oktanon	0,47
5.	β -mircen	1,20
6.	heksil etanoat	0,50
7.	α -felandren	0,06
8.	α -terpinen	0,16
9.	<i>o</i> -cimen	0,06
10.	<i>p</i> -cimen	0,39
11.	D-limonen	0,47
12.	1,8-cineol	1,44
13.	cis- β -ocimen	1,26
14.	trans- β -ocimen	1,24
15.	γ -terpinen	0,25
16.	cis-linalol oksid	1,36
17.	trans-linalol oksid	1,35
18.	linalol	26,88
19.	1-okten-3-il-acetat	0,97
20.	trans-pinokarveol	0,21
21.	kamfor	0,75
22.	L-menton	0,48
23.	izoborneol	0,30
24.	lavandulol	5,74
25.	L-mentol	0,46
26.	terpinen-4-ol	2,52
27.	kripton	0,49
28.	α -terpineol	5,25
29.	mirtenol	0,06
30.	karveol cis	0,08
31.	nerol	1,04
32.	<i>p</i> -kumik aldehid	0,35

33.	D-karvon	0,11
34.	piperiton	0,09
35.	linalol acetat	12,50
36.	anetol	0,86
37.	lavandulol acetat	5,27
38.	neril acetat	1,46
39.	geranil acetat	2,70
40.	kariofilen	5,06
41.	trans- α -bergamoten	0,16
42.	cis- β -farnezen	0,21
43.	trans- β -farnezen	0,29
44.	D-germakren	0,42
45.	γ -murolen	0,70
46.	γ -kadinen	0,23
47.	kariofilen oksid	3,52
48.	kadalen	0,49
Σ	Ukupno identifikovano	90,40

5.6.4. Anis

Ukupno je identifikovano 77,82 % komponenti ulja anisa, od kojih je najzastupljenija trans-anetol, sa čak 61,02 %, koji anisu daje karakterističan slatkast ukus. U značajnoj količini prisutni su γ -himakalen, estragol, cis-anetol i α -himakalen, navedenim redosledom (tabela 5.16.).

Tabela 5.16. Hemijski sastav etarskog ulja anisa (*Pimpinella anisum*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	<i>p</i> -cimen	0,11
2.	limonen	0,28
3.	linalol	0,17
4.	estragol	3,33
5.	cis-anetol	2,55
6.	trans-anetol	61,02
7.	α -himakalen	1,29
8.	γ -himakalen	9,08
Σ	Ukupno identifikovano	77,82

Dobijeni sadržaj trans-anetola spada u niže u odnosu na podatke iz literature i ISO standard (ISO 3475, 2002). S druge strane, γ -himakalen prisutan je u većoj količini, u poređenju sa literaturnim podacima i ISO standardom, koji propisuje (do 5 %) (ISO 3475, 2002; Rodrigues et al., 2003; Özcan i Chalchat, 2006). Estragol u ispitivanom

ulju ne prelazi limit od 6 %, propisan Evropskom farmakopejom (European Pharmacopoeia, 2000). U ispitivanom uzorku nije pronađen anisaldehyd, što je u skladu sa rezultatom Ullah i saradnika (2013).

5.6.5. Morač

Od ukupno 94,66 % identifikovanih komponenti, više od polovine sastava ulja čini aromatični trans-anetol i malo manje od četvrtine monoterpen limonen. Fenkon je prisutan u značajnoj količini (5,81 %), dok su ostale prisutne komponente: estragol, α -pinen, β -ocimen, β -pinen, β -mircen i α -felandren, navedenim redosledom (tabela 5.17.).

Prikazani rezultati su u skladu sa dostupnim podacima iz literature, bar kada je u pitanju kvalitativni sadržaj najzastupljenijih komponenti (Mimica-Dukić et al., 2003; Anwar et al., 2009; Aprotosoae et al., 2010; Roby et al., 2013; Badgular et al., 2014). Kvantitativni sadržaj se očekivano razlikuje od rezultata drugih autora, s obzirom na već pomenute razlike u karakteristikama ispitivanih biljaka (ekološke, genetske i druge). Tako, na primer, ispitivano ulje morača karakteriše znatno veći sadržaj limonena (22,65 %), u odnosu na druga istraživanja. Ovako visok sadržaj limonena je, pak, u skladu sa rezultatom analize etarskog ulja morača iz Toskane, Italija, koje je imalo 22,4 % limonena, ali i znatno više estragola (67,1 %), a manje trans-anetola (2,5 %), u odnosu na naš rezultat (Miraldi, 1999).

Tabela 5.17. Hemijski sastav etarskog ulja morača (*Foeniculum vulgare*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	α -pinen	3,07
2.	β -pinen	1,00
3.	β -mircen	0,74
4.	α -felandren	0,26
5.	limonen	22,65
6.	β -ocimen	1,44
7.	fenkon	5,81
8.	trans-anetol	56,64
9.	estragol	3,05
Σ	Ukupno identifikovano	94,66

5.6.6. Korijander

Ukupno je identifikovano 96,65 % komponenti ulja korijandera, pri čemu čak polovinu sadržaja (50,75 %) čini oksidovani monoterpen β -linalol, prijatne cvetne arome, koja podseća na cvet lavande ili lovora. U velikoj meri, u sastavu učestvuju monoterpeni α -pinen i γ -terpinen (11,53 % i 9,59 %). Ostale prisutne komponente, koje su pojedinačno prisutne u značajnom procentu (preko 1 %) su: kamfor, D- limonen, geranil acetat, *p*-cimen, geraniol, kamfen, β -pinen, borneol i β -mircen, navedenim redosledom (tabela 5.18.). Sličan kvalitativni sadržaj isparljive frakcije korijandera opisan je i od strane drugih autora (Singh et al., 2006; Bhuiyan et al., 2009; Anwar et al., 2011; Zawiślak, 2011).

Tabela 5.18. Hemijski sastav etarskog ulja korijandera (*Coriandrum sativum*)

№	Naziv	Sadržaj u etarskom ulju (%)
1.	α -pinen	11,53
2.	kamfen	1,46
3.	β -pinen	1,27
4.	β -mircen	1,18
5.	<i>p</i> -cimen	3,17
6.	D-limonen	3,50
7.	γ -terpinen	9,59
8.	(+)-4-karen	0,80
9.	linalol	50,75
10.	kamfor	5,85
11.	D-menton	0,22
12.	borneol	1,19
13.	geraniol	2,97
14.	geranil acetat	3,19
Σ	Ukupno identifikovano	96,65

6. ZAKLJUČCI

1. Na bazi vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih dvanaest vrsta lekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka (nana, žalfija, lavanda, anis, morač, korijander, kičica, lincura, pelin, iva, podubica, podbel) dobijen je biljni liker, "Biljni koktel (BK)". Senzorno najprihvatljivija kombinacija navedenih biljnih ekstrakata je izabrana hedonskim testom, a sadržala je biljke sa gorkim materijama i aromatične i začinske biljne vrste u odnosu 1:3.

2. Kaloričnost dobijenog likera je smanjena zamenom dela saharoze niskokaloričnim zaslađivačem steviol glikozidom, slatkom komponentom južnoameričke biljke stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni).

3. Metodom rangiranja uzoraka sa različitim udelima saharoze i steviol glikozida, utvrđeno je da je uzorak u kome je zamenjeno 25 % saharoze prahom steviol glikozida, imao najmanju sumu rangova, odnosno najbolju ocenu po pitanju dopadljivosti. Time je opravdana primena ovog dijetalnog zaslađivača u dobijanju likera sa nižom kalorijskom vrednošću. Dobijeni liker, nazvan, "Biljni koktel lajt (BKL)", je, zajedno sa BK, odabran za dalja ispitivanja.

4. Funkcionalna svojstva dobijenih pića, ispitana su kroz njihovu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost. Ustanovljena je znatna antioksidativna aktivnost i visok sadržaj ukupnih fenola dobijenih pića, BK i BKL, izmerena pomoću četiri najčešće primenjivane spektrofotometrijske (DPPH, FRAP i ABTS i FC,) i dve polarografske (HPMC i MRAP) metode. Dobijene vrednosti za sve analizirane parametre bile su i do višestruko superiornije u odnosu na popularna komercijalna alkoholna pića, koja se mogu naći na našem tržištu, a od kojih se neka čak koriste kao medicinski tonici za jačanje organizma.

5. Klusterskom analizom podataka dobijenih svim metodama za određivanje antioksidativne aktivnosti, komercijalna i dobijena pića su, po jačini antioksidativne aktivnosti, podeljena u nekoliko grupa, pri čemu BK i BKL spadaju u grupu najaktivnijih, sa klasterom znatno udaljenim od ostalih klastera.

6. Liker sa steviol glikozidom je, kod svih primenjenih metoda, ispoljio jaču antioksidativnu aktivnost, u odnosu na liker u kome je saharoza bila jedini zaslađivač, što ukazuje na poboljšanje funkcionalnosti likera dodatkom slatkih izolata iz biljke stevije.

7. Mikrodilucionom metodom, sa mikrotitarskim pločicama, utvrđena je antimikrobna aktivnost dobijenih likera, BK i BKL, prema odabranim sojevima patogenih mikroorganizama, najčešćih kontaminanata iz hrane. Inhibitorna aktivnost BK i BKL prema G (+) bakterijama kretala se u opsegu koncentracija od 0,39 % do 50 %, a letalna od 0,78 % do 50 % pića u inokulisanom bujonu. Slabija aktivnost ustanovljena je prema G (-) bakterijama, sa inhibitornim koncentracijama u opsegu od 1,56 % do ≥ 50 %, i letalnim od 6,25 % do ≥ 50 % pića u inokulisanom bujonu.

8. Od G (+) bakterija, dobijena pića su ispoljila najjače delovanje na *L. monocytogenes* i *R. equi*, pri čemu su se, sa najmanjim inhibitornim i mikrobicidnim koncentracijama, istakla u odnosu na odabrane komercijalne proizvode. Od G (-) bakterija, najjače delovanje BK i BKL su ispoljili na soj *Y. enterocolitica*.

9. Liker BKL je na neke mikroorganizme (*S. aureus*, *Salmonella* sojeve, *P. mirabilis* i *C. albicans*) delovao pri upola nižim koncentracijama u odnosu na BK, što se može pripisati uticaju steviol glikozida, koji, očigledno, doprinosi poboljšanju funkcionalnosti pića.

10. U okviru posebnog cilja istraživanja, primenom svih gore navedenih metoda, analizirana je antioksidativna i antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnih ekstrakata odabranih biljnih vrsta kao konstituenata dobijenih likera.

11. Klusterskom analizom rezultata svih primenjenih metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti utvrđeno je da podbel i podubica formiraju grupu biljaka sa najizraženijim antioksidativnim kapacitetom, pa se može zaključiti da ove biljke imaju značajan doprinos u antioksidativnoj aktivnosti likera BK i BKL. Žalfija, iva, nana, anis i pelin spadaju u srednje aktivne komponente dobijenih likera, dok lavanda, kičica, morač, korijander i lincura formiraju klaster sa najmanje aktivnim biljkama.

12. Metoda HPMC je, u ovom radu, po prvi put primenjena na uzorcima kao što su vodeno-etanolni ekstrakti biljaka, dok je metoda MRAP, po prvi put primenjena na kompleksnim uzorcima. Visoki koeficijenti korelacije obe polarografske metode sa ostalim primenjenim, spektrofotometrijskim metodama, potvrdili su opravdanost primene obe metode na alkoholnim pićima i biljnim vodeno-etanolnim ekstraktima.

13. Na osnovu rezultata ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata odabranih biljnih vrsta, utvrđeno je da grupa aromatičnih i začinskih biljnih vrsta ima višestruko jači inhibitorni i letalni efekat, odnosno da deluje u višestruko nižim koncentracijama u odnosu na gorke. Na osnovu toga je zaključeno da najveći doprinos u antimikrobnoj

aktivnosti aromatičnih i začinskih biljaka (žalfija, nana, anis, korijander, morač i lavanda) imaju terpeni, koji se nalaze u isparljivoj frakciji ovih biljaka, a u većem udelu u odnosu na gorke biljne vrste.

14. GC-MS analizom etarskih ulja aromatičnih i začinskih biljaka, utvrđeno je da su najzastupljenije isparljive komponente nane: L-menton, mentol, izomenton i mentil acetat i eukaliptol; žalfije: tujon (α i β), kamfor, 1,8-cineol, ledol, kamfen, borneol, bornil acetat, α -humulen, α -pinen i manol; lavande: linalol, linalil acetat, lavandulol, lavandulil acetat, α -terpineol, kariofilen, kariofilen oksid; anisa: trans-anetol, γ -himakalen, estragol, cis-anetol i α -himakalen; korijandera: β -linalol, α -pinen i γ -terpinen; morača: trans-anetol, limonen i fenkon. Navedenim terpenima se može pripisati značajna uloga u doprinosu antimikrobnoj aktivnosti likera dobijenih u ovom istraživanju, BK i BKL.

7. LITERATURA

- Aaby, K., Hvattum, E., Skrede, G. (2004). Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4595-4603.
- Abdel-Rahman, T. M. A., Abdelwahed, M. A., El-Ela Elsaid, M. A., El-Beih, A. A. (2015). Free calorie sweetness and antimicrobial properties in stevia rebaudiana. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(5), 669-679.
- Abu-Darwish, M. S., Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., ... Salgueiro, L. (2013). Essential oil of common sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International*, 538940.
- Adams, R. P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (No. Ed. 4). Allured Publishing Corporation.
- Adedayo M. R., Ajiboye A. E. (2011). Antimicrobial property of palm wine, *International Research Journal of Microbiology*, 2(8), 265-269.
- Aflatuni, A., Heikkinen, K., Tomperi, P., Jalonen, J., Laine, K. (2000). Variation in the extract composition of mints of different origin cultivated in Finland. *Journal of Essential Oil Research*, 12(4), 462-466.
- Afsharypuor, S., Azarbajeny, N. (2006). Chemical constituents of the flower essential oil of *Lavandula officinalis* Chaix. from Isfahan (Iran). *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 169-172.
- Ahmad, W., Hasan, A., Abdullah, A., Tarannum, T. (2010). Medicinal importance of *Artemisia absinthium* Linn (Afsanteen) in Unani medicine: A review. *Hippocratic Journal of Unani medicine*, 5(4), 117-125.
- Alade, P. I., Irobi, O. N. (1993). Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 171-174.
- Alamprese, C., Pompei, C., Scaramuzzi, F. (2005). Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. *Food Chemistry*, 90(4), 495-502.

- Albano, E., Clot, P., Morimoto, M., Tomasi, A., Ingelman-Sundberg, M., French, S. W. (1996). Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology*, 23(1), 155-163.
- Albert-Puleo, M. (1980). Fennel and anise as estrogenic agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 2(4), 337-344.
- Alcaraz, L. E., Blanco, S. E., Puig, O. N., Tomas, F., Ferretti, F. H. (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*, 205(2), 231-240.
- Alessio, H. M., Hagerman, A. E. (Eds.). (2006). *Oxidative Stress, Exercise and Aging*. London, GBR: Imperial College Press.
- Alzoreky, N. S., Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 223-230.
- Anwar, F., Ali, M., Hussain, A. I., Shahid, M. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*foeniculum vulgare mill.*) seeds from pakistan. *Flavour and Fragrance Journal*, 24(4), 170-176.
- Anwar, F., Sulman, M., Hussain, A. I., Saari, N., Iqbal, S., Rashid, U. (2011). Physicochemical composition of hydro-distilled essential oil from coriander (*Coriandrum sativum L.*) seeds cultivated in Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 3537-3544.
- Aprotosoiaie, A. C., Şpac, A., Hăncianu, M., Miron, A., Tănăsescu, V. F., Dorneanu, V., Stănescu, U. (2010). The chemical profile of essential oils obtained from fennel fruits (*foeniculum vulgare mill.*). *Farmacia*, 58(1), 46-53.
- Areias, F. M., Valentão, P., Andrade, P. B., Moreira, M. M., Amaral, J., Seabra, R. M. (2000). HPLC/DAD analysis of phenolic compounds from lavender and its application to quality control. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, 23 (16), 2563-2572.
- Arrieta-Garay, Y., Blanco, P., López-Vázquez, C., Rodríguez-Bencomo, J. J., Pérez-Correa, J. R., Lopez, F., Orriols, I. (2014). Effects of Distillation System and Yeast Strain on the Aroma Profile of Albariño (*Vitis vinifera L.*) Grape Pomace Spirits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(43), 10552-10560.

- Ateş, D. A., Turgay, Ö. (2003). Antimicrobial activities of various medicinal and commercial plant extracts. *Turkish Journal of Biology*, 27(3), 157-162.
- Azman, N. A. M., Segovia, F., Martínez-Farré, X., Gil, E., Almajano, M. P. (2014). Screening of antioxidant activity of Gentian Lutea root and its application in Oil-in-Water Emulsions. *Antioxidants*, 3(2), 455-471.
- Badgajar, S. B., Patel, V. V., Bandivdekar, A. H. (2014). *Foeniculum vulgare* Mill: A Review of Its Botany, Phytochemistry, Pharmacology, Contemporary Application, and Toxicology. *BioMed Research International*, 1-32.
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. (2012). Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, 132(2), 841-848.
- Basch, E., Foppa, I., Liebowitz, R., Nelson, J., Smith, M., Sollars, D., Ulbricht, C. (2004). Lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 4(2), 63-78.
- Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N., Rosselli, S. (2009). Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*, 14(3), 939-952.
- Bayoub, K., Baibai, T., Mountassif, D., Retmane, A., Soukri, A. (2010). Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. *African Journal of Biotechnology*, 9(27), 4251-4258.
- Begnami, A. F., Duarte, M. C. T., Furletti, V., Rehder, V. L. G. (2010). Antimicrobial potential of *Coriandrum sativum* L. against different *Candida* species in vitro. *Food Chemistry*, 118(1), 74-77.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Bhuiyan, M. N. I., Begum, J., Sultana, M. (2009). Chemical composition of leaf and seed essential oil of *Coriandrum sativum* L. from Bangladesh. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 4(2), 150-153.
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.

- Boban, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-Polic, V., Boban, M. (2010a). Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. *Journal of Food Science*, 75(5), M322-M326.
- Boban, N., Tonkic, M., Modun, D., Budimir, D., Mudnic, I., Sutlovic, D., ... Boban, M. (2010b). Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control*, 21(8), 1161-1165.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., Uriarte, E. (2005). Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12(8), 887-916.
- Borris, R. P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51(1), 29-38.
- Bors, W., Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Research*, 2(4-6), 289-294.
- Boszormenyi, A., Hethelyi, E., Farkas, A., Horvath, G., Papp, N., Lemberkovics, E., Szoke, E. (2009). Chemical and genetic relationships among sage (*Salvia officinalis* L.) cultivars and Judean sage (*Salvia judaica* Boiss.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4663-4667.
- Bouayed, J., Piri, K., Rammal, H., Dicko, A., Desor, F., Younos, C., Soulimani, R. (2007). Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry*, 104(1), 364-368.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(19), 7879-7885.
- Braun, T., Volland, P., Kunz, L., Prinz, C., Gratzl, M. (2007). Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. *Gastroenterology*, 132(5), 1890-1901.
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(4), 221-247.

- Büyükbalci, A., El, S. N. (2008). Determination of in vitro antidiabetic effects, antioxidant activities and phenol contents of some herbal teas. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(1), 27-33.
- Cadena, R. S., Bolini, H. M. A. (2012). Ideal and relative sweetness of high intensity sweeteners in mango nectar. *International Journal of Food Science Technology*, 47(5), 991-996.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157-2184.
- Canadanovic-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Cetkovic, G. S., Tumbas, V. T. (2005). Free-radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(2), 265-272.
- Čanadanović-Brunet, J. M., Djilas, S. M., Četković, G. S., Tumbas, V. T., Mandić, A. I., Čanadanović, V. M. (2006). Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *International Journal of Food Science Technology*, 41(6), 667-673.
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Esteve, M. J., Frígola, A. (2015). Effect of *Stevia rebaudiana* addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*, 184, 122-130.
- Cardello, H. M. A. B., Da Silva, M. A. P. A., Damasio, M. H. (1999). Measurement of the relative sweetness of stevia extract, aspartame and cyclamate/saccharin blend as compared to sucrose at different concentrations. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54(2), 119-129.
- Cardoso, J. M. P., Bolini, H. M. A. (2007). Different sweeteners in peach nectar: Ideal and equivalent sweetness. *Food Research International*, 40(10), 1249-1253.
- Carlsen, M. H., Halvorsen, B. L., Holte, K., Bohn, S. K., Dragland, S., Sampson, L., ... Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9(3), 1-11.
- Cavanagh, H. M. A., Wilkinson, J. M. (2002). Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy Research*, 16(4), 301-308.

- Ceyhan, N., Keskin, D., Uğur, A. (2012). Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture Environment*, 10(1), 193-197.
- Chabot, S., Bel-Rhliid, R., Chenevert, R., Piché, Y. (1992). Hyphal growth promotion in vitro of the VA mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker Hall, by the activity of structurally specific flavonoid compounds under CO₂-enriched conditions. *New Phytologist*, 122(3), 461-467.
- Chamberlain, M. (1887). Les essences au point de vue de leurs proprietes antiseptiques. *Ann. Inst. Pasteur* 1, pp. 153-164.
- Chandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M. H., Elsohly, M. A., Khan, I. A. (2014). Assessment of total phenolic and flavonoid content, antioxidant properties, and yield of aeroponically and conventionally grown leafy vegetables and fruit crops: a comparative study. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 1-9.
- Chang-Tian, L. I., Yan-Peng, L. I. U., Feng-Cheng, H. E., Yu, L. I. (2012). In vitro antioxidant activities of *Tussilago farfara*, a new record species to Changbai Mountain. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10(4), 260-262.
- Charles, D. J. (2012). Antioxidant properties of spices, herbs and other sources. Springer Science Business Media.
- Chipault, J. H., Mizuno, G. R., Hawkins, J. M., Lundberg, W. O. (1952). The antioxidant properties of natural spices. *Journal of Food Science*, 17(1-6), 46-55.
- Choi, E.M., Hwang, J.K. (2004). Anti-inflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75 (2004), 557–565.
- Choi, W. I., Lee, E. H., Choi, B. R., Park, H. M., Ahn, Y. J. (2003). Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(5), 1479-1484.
- Choonhahirun, A. (2006). Quality of Low-calorie Mixed Herb Drink Containing Aspartame and Acesulfame-K. *Assumption University Journal of Technology*, 10 (2), 86-90.
- Cosio, M. S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from the labiatae family. *Food Chemistry*, 97(4), 725-731.

- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Craciunescu, O., Constantin, D., Gaspar, A., Toma, L., Utoiu, E., Moldovan, L. (2012). Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Arnica montana* L. and *Artemisia absinthium* L. ethanolic extracts. *Chemistry Central Journal*, 6(1), 97.
- Curtis, O. F., Shetty, K., Cassagnol, G., Peleg, M. (1996). Comparison of the inhibitory and lethal effects of synthetic versions of plant metabolites (anethole, carvacrol, eugenol, and thymol) on a food spoilage yeast (*debaromyces hansenii*). *Food Biotechnology*, 10(1), 55-73.
- Cwikla, C., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K. M., Lehmann, R., Tiralongo, E. (2010). Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytotherapy Research*, 24(5), 649-656.
- Daglia, M., Papetti, A., Grisoli, P., Aceti, C., Dacarro, C., Gazzani, G. (2007). Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5038-5042.
- Day, Ivan, "Cordial Waters". <http://www.historicfood.com/rosolio.htm>. (9.12.1015.)
- Deliorman Orhan, D., Yalinay Çirak, M. Y., Külah, C., Ergun, F. (2002). Antimicrobial activity screening of some turkish medicinal plants. *Gazi Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi*, 19(2), 105-111.
- Derwich, E., Benziane, Z., Chabir, R., Taouil, R. (2011). In Vitro antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oil extract of leaves of *Rosmarinus officinalis* grown in Morocco. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(3), 89-95.
- Didry, N., Pinkas, M., Torck, M. (1980). Phenolic components from *Tussilago farfara*. *Annales Pharmaceutiques Francaises*. 38 (3), 237-241.
- Đilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S. (2002). Antioksidanti u hrani. *Hemijaska industrija*, 56(3), 105-112.
- Djilas, S. M., Markov, S. L., Cvetković, D. D., Čanadanović-Brunet, J. M., Četković, G. S., Tumbas, V. T. (2006). Antimicrobial and free radical scavenging activities of *Teucrium montanum*. *Fitoterapia*, 77(5), 401-403.

- Dobravalskytė, D., Venskutonis, P. R., Thierry, T., Zebib, B., Merah, O., Ragažinskienė, O. (2013). Antioxidant properties and composition of deodorized extracts of *Tussilago farfara* L. *Records of Natural Products*, 7(3), 201-209.
- Dorđević, S., Popović, D., Despotović, S., Veljović, M., Atanacković, M. (2015). Extracts of medicinal plants-as functional beer additives. *Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly*, (00), 44-44.
- Dorman, H. J. D., Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308-316.
- Dua, A., Garg, G., Kumar, D., Mahajan, R. (2014). Polyphenolic composition and antimicrobial potential of methanolic coriander (*Coriandrum sativum*) seed extract. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Research*, 5(6): 2302-2308.
- Duke, J. A. (2002). *Handbook of medicinal herbs*. CRC press, p. 222.
- Dutra, M. B. L., Bolini, H. M. A. (2014). Acerola nectar sweetened with different sweeteners: ideal and equivalent sweetness. *CyTA-Journal of Food*, 12(3), 277-281.
- Eidi M, Eidi A, Saeidi A, et al. (2009). Effect of coriander seed (*Coriandrum sativum* L.) ethanol extract on insulin release from pancreatic beta cells in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research* 23: 404–406.
- Erdogrul, Ö. T. (2002). Antibacterial activities of some plant extracts used in folk medicine. *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 269-273.
- Erel, Ş. B., Reznicek, G., Şenol, S. G., Yavaşoğlu, N. Ü. K., Konyalıoğlu, S., Zeybek, A. U. (2012). Antimicrobial and antioxidant properties of *Artemisia* L. species from western Anatolia. *Turkish Journal of Biology*, 36(1), 75-84.
- European Medicines Agency (2009). Assessment report on *Centaurea erythraea* Rafn. S.L. including *C. Majus* Zeltner and *C. Suffruticosum*, herba, for the development of a community herbal monograph. Committee on herbal medicinal products. London, UK.
- European Medicines Agency, (2009). Assessment Report on *Gentiana lutea* L., Radix. Committee on herbal medicinal products. London, UK.
- European Pharmacopoeia (2000). 3rd ed. *Dritter Nachtrag*, Council of Europe, Strasbourg. pp.499-500.

- Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1143-1156.
- Frankel, E. N. (1984). Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61(12), 1908-1917.
- Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E., Kozukue, N. (2006). Antimicrobial activities of tea catechins and theaflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *Journal of Food Protection*, 69(2), 354-361.
- Gabbrielli, G., Loggini, F., Cioni, P. L., Giannaccini, B., Mancuso, E. (1988). Activity of lavender essential oil against non-tubercular opportunistic rapid grown mycobacteria. *Pharmacological Research Communications*, 20, 37-40.
- Gao, Y., Van Belkum, M. J., Stiles, M. E. (1999). The outer membrane of Gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4329-4333.
- Garcia, C. S. C., Ely, M. R., Wasum, R. A., Zoppa, B. C. D. A., Wolhheim, C., Neves, G. Â., ... Souza, K. C. B. D. (2013). Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33(4), 509-514.
- Gaweł-Bęben, K., Bujak, T., Nizioł-Łukaszewska, Z., Antosiewicz, B., Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska, K. (2015). *Stevia Rebaudiana* Bert. Leaf Extracts as a Multifunctional Source of Natural Antioxidants. *Molecules*, 20(4), 5468-5486.
- Gayoso, C. W., Lima, E. O., Oliveira, V. T., Pereira, F. O., Souza, E. L., Lima, I. O., Navarro, D. F. (2005). Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia cariophyllata* essential oil and eugenol. *Fitoterapia*, 76(2), 247-249.
- Geissman, T. A. (1963). Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, In M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), *Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y., p. 265.
- Geuns, J. M. (2002). Safety evaluation of *Stevia* and stevioside. *Studies in Natural Products Chemistry*, 27, 299-319.
- Geuns, J. M. C., Hajihashemi, S., Claes, A. (2012). Radical-scavenging by steviol glycosides and crude *Stevia* extracts. In J.M.C. Geuns (Ed.), *Stevia: Months*

- beyond authorization. Proceedings of the 6th EUSTAS Stevia symposium. Haverlee, Belgium: Euprint, 157–180.
- Ghasemi, P. A., Jahanbazi, P., Enteshari, S., Malekpoor, F., Hamed, B. (2010). Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 633-641.
- Giamperi, L., Fraternali, D., Ricci, D. (2002). The in vitro action of essential oils on different organisms. *Journal of Essential Oil Research*, 14(4), 312-318.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., Offen, D. (2002). Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacological Reviews*, 54(2), 271-284.
- Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D. (2010). Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO₂: kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52(1), 62-70.
- Gorjanović, S. Ž., Alvarez-Suarez, J. M., Novaković, M. M., Pastor, F. T., Pezo, L., Battino, M., Sužnjević, D. Ž. (2013). Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. *Journal of Food Composition and Analysis*, 30(1), 13-18.
- Gorjanović, S. Z., Novaković, M. M., Potkonjak, N. I., Sužnjević, D. Z. (2010b). Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4626-4631.
- Gorjanović, S. Z., Novakovic, M. M., Potkonjak, N. I., Leskošek-Čukalović, I., Sužnjevic, D. Z. (2010a). Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 744-751.
- Gorjanović, S. Z., Novaković, M. M., Vukosavljevic, P. V., Pastor, F. T., Tešević, V. V., Sužnjević, D. Z. (2010c). Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8400-8406.
- Gorjanović, S. Ž., Rabrenović, B. B., Novaković, M. M., Dimić, E. B., Basić, Z. N., Sužnjević, D. Ž. (2011). Cold-pressed pumpkin seed oil antioxidant activity as

- determined by a DC polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(12), 1875-1882.
- Gorjanović, S. Z., Novaković, M. M., Vukosavljević, P. V., Pastor, F. T., Tešević, V. V., Sužnjević, D. Z. (2010). Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8400-8406.
- Gorjanović, S., Komes, D., Pastor, F. T., Belščak-Cvitanović, A., Pezo, L., Hečimović, I., Sužnjević, D. (2012). Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(38), 9573-9580.
- Gorjanović, S., Pastor, F. T., Vasić, R., Novaković, M., Simonović, M., Milić, S., Sužnjević, D. (2013). Electrochemical versus spectrophotometric assessment of antioxidant activity of hop (*Humulus lupulus* L.) products and individual compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 9089-9096.
- Goupy, P., Dufour, C., Loonis, M., Dangles, O. (2003). Quantitative kinetic analysis of hydrogen transfer reactions from dietary polyphenols to the DPPH radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 615-622.
- Grove, O. (1918). The preservative action of various spices and essential oils. Annual Report -. Agricultural and Horticultural Research Station. Long Ashton, Bristol, England, pp. 29-33..
- Grujić, S. (2015): Senzorna ocjena kvaliteta i prihvatljivosti prehrambenih proizvoda. Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka.
- Gupta, N., Saxena, G. (2010). Antimicrobial activity of constituents identified in essential oils from *Mentha* and *Cinnamomum* through GC/MS. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1, 715-720.
- Gupta, V.K., Verma, Anil K. (2010). *Comprehensive Bioactive Natural Products, Volume 4 : Antioxidants and Nutraceuticals*, Texas, USA: Global Media, pp. 1-37.
- Gursoy, N., Tepe, B. (2009). Determination of the antimicrobial and antioxidative properties and total phenolics of two "endemic" Lamiaceae species from Turkey: *Ballota rotundifolia* L. and *Teucrium chamaedrys* C. Koch. *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(2), 135-140.

- Guynot, M. E., Ramos, A. J., Seto, L., Purroy, P., Sanchis, V., Marin, S. (2003). Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. *Journal of Applied Microbiology*, 94(5), 893-899.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Fourth edition. Clarendon Press, Oxford, UK.
- Hamilton-Miller, J. M. T., Shah, S. (1999). Disorganization of cell division of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a component of tea (*Camellia sinensis*): a study by electron microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 176(2), 463-469.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V. (2003). Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 853-860.
- Hashim, M. S., Lincy, S., Remya, V., Teena, M., Anila, L. (2005). Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chemistry*, 92(4), 653-660.
- Hassanpour-Aghdam, M. B., Hassani, A., Vojodi, L., Hajisamadi, B., Rostami, A. (2011). Essential oil constituents of *Lavandula officinalis* Chaix from Northwest Iran. *Chemija*, 22(3), 167-171.
- Hawrelak, J. A., Cattley, T., Myers, S. R. (2009). Essential oils in the treatment of intestinal dysbiosis: A preliminary in vitro study. *Alternative Medicine Review*, 14(4), 380-384.
- Heinonen, I. M., Lehtonen, P. J., Hopia, A. I. (1998). Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 25-31.
- Hinneburg, I., Dorman, H. D., Hiltunen, R. (2006). Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, 97(1), 122-129.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031.

- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 62(1), 1-20.
- Huang, Y., Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Gong, Y., Chen, X., ... Jiang, W. (2010). Antifungal activity of the essential oil of *Illicium verum* fruit and its main component trans-anethole. *Molecules*, 15(11), 7558-7569.
- Imark, C., Kneubühl, M., Bodmer, S. (2000). Occurrence and activity of natural antioxidants in herbal spirits. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 1(4), 239-243.
- Inoue, T., Sugimoto, Y., Masuda, H., Kamei, C. (2001). Effects of peppermint (*Mentha piperita* L.) extracts on experimental allergic rhinitis in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 24(1), 92-95.
- Iscan, G., Kirimer, N. E. S. E., Kürkcüoğlu, M., Baser, H. C., Demirci, F. (2002). Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943-3946.
- ISO 3475:200. Oil of aniseed (*Pimpinella anisum* L.).
- ISO 3515:2002. Oil of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.).
- ISO 8586-1:1993. Sensory analysis -General guidance for the selection, training and monitoring of assessors.
- ISO 9909:1997. Oil of Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.).
- ISO 11056:1999. Sensory analysis - Methodology - Magnitude estimation method.
- Jana, D., Ghorai, S. K., Jana, S., Dey, P. P. (2014). Determination of antimicrobial activity of rice based fermented beverage-Haria/Handia. *International Journal of Current Research and Academic Review*, 2 (5), 85-91.
- Janovska, D., Kubikova, K., Kokoska, L. (2003). Screening for antimicrobial activity of some medicinal plants species of traditional Chinese medicine. *Czech Journal of Food Sciences*, 21(3), 107-110.
- Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P. J., Thijs, T., Tack, J., Depoortere, I. (2011). Bitter taste receptors and α -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), 2094-2099.
- Jianu, C., Pop, G., Gruia, A. T., Horhat, F. G. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of lavender (*Lavandula angustifolia*) and

- lavandin (*Lavandula intermedia*) grown in western Romania. *International Journal of Agriculture and Biology*, 15(4), 772-776.
- Kaefer, C. M., Milner, J. A. (2008). The role of herbs and spices in cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(6), 347-361.
- Karabegović, I. T., Vukosavljević, P. V., Novaković, M. M., Gorjanović, S. Ž., Džamić, A. M., Lazić, M. L. (2012). Influence of the storage on bioactive compounds and sensory attributes of herbal liqueur. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(4), 1587-1598.
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, 94(4), 550-557.
- Kêdzia B., Alkiewicz J., Han S. (2000). The significance of tea tree oil in phytotherapy. *Postępy Fitoterapii*, 2, 36-40.
- Kirbağ, S., Zengin, F., Kursat, M. (2009). Antimicrobial activities of extracts of some plants. *Pakistan Journal of Botany*, 41(4), 2067-2070.
- Klačnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121-126.
- Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Drmić, H., Škrabal, S., Miličević, B. (2012). Bioactive and sensory properties of herbal spirit enriched with cocoa (*Theobroma cacao* L.) polyphenolics. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2908-2920.
- Kosalec, I., Pepeljnjak, S., Kustrak, D. (2005). Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). *Acta Pharmaceutica-Zagreb*, 55(4), 377.
- Kosalec, I., Zovko, M., Poljanšek, I., Pepeljnjak, S., Kalodera, Z., Šešok, T., Matica, B. (2008). Antimicrobial activity of bearberry leaf (*uva ursi folium*) on clinical isolates of urogenital pathogens. *Farmaceutski Glasnik*, 64(7-8), 357-364.
- Kotan, R., Kordali, S., Cakir, A. (2007). Screening of antibacterial activities of twenty-one oxygenated monoterpenes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(7-8), 507-513.

- Kratchanova, M., Denev, P., Ciz, M., Lojek, A., Mihailov, A. (2010). Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems. *Acta Biochimica Polonica*, 57(2), 229-234.
- Kumar, S., Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 1-16.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Sarker, S. D. (2003). Bioactivity of gentiopicoside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*, 74(1), 151-154.
- Kušar, A., Zupančič, A., Šentjerc, M., Baričević, D. (2006). Free radical scavenging activities of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) measured by electron spin resonance. *Human Experimental Toxicology*, 25(10), 599-604.
- Laciar, A., Ruiz, M. L., Flores, R. C., Saad, J. R. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia echegarayi* Hieron.(Asteraceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 41(4), 226-231.
- Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H. B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K., Jana, M. (2001). Antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. *Phytotherapy Research*, 15(3), 250-252.
- Laribi, B., Kouki, K., M'Hamdi, M., Bettaieb, T. (2015). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) and its bioactive constituents. *Fitoterapia*, 103, 9–26.
- Lawless, H. T., Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: principles and practices*. Springer Science Business Media,
- Lee, H. K., Choi, Y. M., Noh, D. O., Suh, H. J. (2005). Antioxidant effect of Korean traditional lotus liquor (Yunyupju). *International Journal of Food Science Technology*, 40(7), 709-715.
- Lee, Y. J., Thiruvengadam, M., Chung, I. M., Nagella, P. (2013). Polyphenol composition and antioxidant activity from the vegetable plant *Artemisia absinthium* L. *AJCS*, 7(12), 1921-1926.
- Leela, N. K., Vipin, T.M. (2008). Aniseed, In: Parthasarathy, VA, B. Chempakam, TJ Aachariah (eds.). *Chemistry of Spices*. CABI, Wallingford, UK. pp. 331-341.
- Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K. (2012). *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chemistry*, 132(3), 1121-1132.

- Lesjak, M. (2011). Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. Cupressaceae), Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Leskošek-Čukalović, I., Despotović, S., Nedović, V., Lakić, N., Nikšić, M. (2010). New Type of Beer–beer with improved functionality and defined pharmacodynamic properties. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3), 384-391.
- Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., Chen, F. (2008). Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 385-390.
- Li, W., Beta, T. (2011). Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. *Food Chemistry*, 127(3), 968-975.
- Lin, Y. T., Vatter, D., Labbe, R. G., Shetty, K. (2005). Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*, 40(6), 2059-2065.
- Lino, A., Deogracious, O. (2006). The in-vitro antibacterial activity of *Annona senegalensis*, *Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea*-Ugandan medicinal plants. *African Health Sciences*, 6(1), 31-35.
- Lis-Balchin, M. (Ed.). (2003). *Lavender: the genus Lavandula*. CRC press.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8),118-126.
- Loliger J. (1989). In *Rancidity in Food*, AllenJ, HamiltinR (eds). Elsevier Science: New York, p. 105.
- Lu, Y., Foo, L. Y. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75(2), 197-202.
- Machlin, L. J., Bendich, A. (1987). Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The FASEB Journal*, 1(6), 441-445.
- Maham, S., Fallah, F., Eslami, G., Shamsafar, S., Radmanesh, R., Pourkaveh, B. (2011). The antimycobacterium activity of mentha piperita and mentha spicata ethanolic extract against mycobacterium bovis in comparison with isoniazid. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases*, 6(2), 78-81.
- Majchrzak, D., Ipsen, A., Koenig, J. (2014). Sucrose-replacement by rebaudioside a in a model beverage. *Journal of Food Science and Technology*, 52(9), 6031-3036.

- Marimón, J. M., Bujanda, L., Gutierrez-Stampa, M. A., Cosme, A., Arenas, J. I. (1998). Antibacterial activity of wine against *Salmonella enteritidis* pH or alcohol?. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 27(2), 179-180.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378-385.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378-385.
- Mason, T. L., Wasserman B. P. (1987). Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry*, 26, 2197–2202.
- Matasyoh, J. C., Maiyo, Z. C., Ngure, R. M., Chepkorir, R. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*, 113(2), 526-529.
- McKay, D. L., Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 20(8), 619-633.
- Medina, E., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1194-1199.
- Meilgaard, M. C., Carr, B. T., Civille, G. V. (2006). *Sensory evaluation techniques*. CRC press, p. 276.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231-237.
- Milošević-Ifantis T. (2013) Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost nekih sekundarnih metabolite biljaka *Centaurea pannonica* (Heuffel) Simonkai (Asteraceae) i *Origanum scabrum* Boiss. Heldr. (Lamiaceae). Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac.
- Mimica-Dukić, N., Bozin, B., Soković, M., Mihajlović, B., Matavulj, M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. *Planta Medica*, 69(5), 413-419.

- Mimica-Dukić, N., Kujundžić, S., Soković, M., Couladis, M. (2003). Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytotherapy Research*, 17(4), 368-371.
- Miraldi, E. (1999). Comparison of the essential oils from ten *Foeniculum vulgare* Miller samples of fruits of different origin. *Flavour and Fragrance Journal*, 14(6), 379-382.
- Mitić-Ćulafić, D., Vuković-Gačić, B. S., Knežević-Vukčević, J. B., Stanković, S., Simić, D. M. (2005). Comparative study on the antibacterial activity of volatiles from sage (*Salvia officinalis* L.). *Archives of Biological Sciences*, 57(3), 173-178.
- Mohammad Al-Ismail, K., Aburjai, T. (2004). Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(2), 173-178.
- Mosafa, E., Yahyaabadi, S., Doudi, M. (2014). In-Vitro Antibacterial Properties of Sage (*Salvia officinalis*) Ethanol Extract against Multidrug Resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(10), 42-46.
- Msaada, K., Hosni, K., Taarit, M. B., Hammami, M., Marzouk, B. (2009). Effects of growing region and maturity stages on oil yield and fatty acid composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit. *Scientia Horticulturae*, 120(4), 525-531.
- Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B., Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *stevia rebaudiana bertonii* leaves. *LWT - Food Science and Technology*, 44(9), 1865-1872.
- Naczek, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1), 95-111.
- Nabors L.B. (2011). *Alternative Sweeteners*. 4th ed. Marcel Dekker; New York, NY, USA, pp. 159–180.
- Naidu, A. S. (Ed.). (2010). *Natural food antimicrobial systems*. CRC press, p. 266.
- Nair, R., Chanda, S. (2007). Antibacterial activities of some medicinal plants of the western region of India. *Turkish Journal of Biology*, 31(4), 231-236.

- Nascimento, G. G., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247-256.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Granese, T., Cozzolino, A., Maione, M., Ombra, M. N., Coppola, R. (2013). Antimicrobial property of the hydro-alcoholic extract from purple basil (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*). *Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogens*, 68.
- Newton, D. (2013). *Trademarked: A History of Well-Known Brands, from Airtex to Wright's Coal Tar*. The History Press.
- Nickavar, B., Abolhasani, F. A. (2009). Screening of antioxidant properties of seven Umbelliferae fruits from Iran. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 30-35.
- Nikaido, H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets—permeability barriers and active efflux. *Science* 264, 382–388.
- Nikićević N., Tešević V. (2009). Jaka alkoholna pića. *Poljo-knjiga*, Beograd, pp. 227-265.
- Novaković, M. M., Stevanović, S. M., Gorjanović, S. Ž., Jovanović, P. M., Tešević, V. V., Janković, M. A., Sužnjević, D. Ž. (2011). Changes of Hydrogen Peroxide and Radical-Scavenging Activity of Raspberry during Osmotic, Convective, and Freeze-Drying. *Journal of Food Science*, 76(4), C663-C668.
- O'Donnell, K., Kearsley, M. (Eds.). (2012). *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. John Wiley Sons, p. 193.
- Ohara, A., Matsuhisa, T. (2002). Anti-Tumor Promoting Activities of Edible Plants against Okadaic Acid. *Food Science and Technology Research*, 8(2), 158-161.
- Ohshima, H., Yoshie, Y., Auriol, S., Gilibert, I. (1998). Antioxidant and pro-oxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxynitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(9), 1057-1065.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1), 299-305.
- Oliveira, S. D., Souza, G. A. D., Eckert, C. R., Silva, T. A., Sobral, E. S., Fávero, O. A., ... Baader, W. J. (2014). Evaluation of antiradical assays used in determining the

- antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Química Nova*, 37(3), 497-503.
- Omar, G., Abdallah, L. A., Ismail, S., Almasri, M. Y. (2013). Screening of Selected Medicinal Wild Plant Extracts Antibacterial Effect as Natural Alternatives. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*, 46 (2), 1299-1304.
- Orhan, I. E., Ozcelik, B., Kartal, M., Kan, Y. (2012). Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turkish Journal Of Biology*, 36(3), 239-246.
- Özcan, M. M., Chalchat, J. C. (2006). Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. *Annals of Microbiology*, 56(4), 353-358.
- Paduch, R., Kandefler-Szerszeń, M., Trytek, M., Fiedurek, J. (2007). Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 55(5), 315-327.
- Pandey, K. B., Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Papanov, G. Y., Malakov, P. Y. (1983). Clerodane diterpenoids from *Teucrium montanum* subsp. *skorpilii*. *Phytochemistry*, 22(12), 2787-2789.
- Parekh, J., Jadeja, D., Chanda, S. (2006). Efficacy of aqueous and methanol extracts of some medicinal plants for potential antibacterial activity. *Turkish Journal of Biology*, 29(4), 203-210.
- Pecić, S. P. (2015). Uticaj plodonosnog tela gljive *Ganoderma lucidum* na hemijski sastav i senzorne karakteristike specijalnih rakija, Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu..
- Pecić, S., Veljović, M., Despotović, S., Leskošec-Čukalović, I., Nikšić, M., Vukosavljević, P., Nikićević, N. (2012). Antioxidant capacity and sensory characteristics of special herb brandy. *Proceedings of 6th Central European Congress on Food*, Novi Sad, Serbia, 23-26 May, 2012.
- Pereira, E. M., Gomes, R. T., Freire, N. R., Aguiar, E. G., Brandão, M. D. G. L., Santos, V. R. (2011). In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. *Planta Medica-Natural Products and Medicinal Plant Research*, 77(4), 401-404.

- Petrović M., Antić M. (2015). Uticaj klimatskih promena na sekundarne metabolite lekovitih i aromatičnih biljaka. Međunarodni naučni skup “Životna sredina i adaptacija privrede na klimatske promene”, 22-24. april 2015., Zbornik apstrakata, 90-91.
- Petrović M., Matijašević D., Pantić M., Antić M., Pavelkić V. (2015b). Antimicrobial properties of Marrubium vulgare essential oil and ethanolic extract, The Second International Symposium on Agricultural Engineering-ISAIE, 9th-10th October, Belgrade–Zemun, Serbia, 21- 31 – IV.
- Petrović, M., Sužnjević, D., Pastor, F., Veljović, M., Pezo, L., Antić, M., Gorjanović, S. (2015a). Antioxidant capacity determination of complex samples and individual phenolics-Multilateral approach, Combinatorial Chemistry High Throughput Screening, 19(1) , 58-65.
- Petti, S., Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. Journal of Dentistry, 37(6), 413-423.
- Pham-Huy, L. A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science, 4(2), 89-96.
- Pićurić-Jovanović K., Milovanović M. (2005). Autooksidacija lipida i prirodni antioskidanti flore Srbije, Poljoprivredni fakultet, Beograd
- Pietta P., Gardana C., Pietta A. (2003). Flavonoids in herbs. In: Rice-Evans C, Packer L (eds) Flavonoids in health and disease, 2nd edn. Marcel Dekker, pp. 37-63.
- Pietta, P. (2000). Flavonoids as antioxidants. Journal of Natural Products, 63(7), 1035-1042.
- Piletic, M., Milic, B., Djilas, S., (1992). Organska hemija I deo, Izdavaci: Univerzitet u Novom Sadu i Prometej, Novi sad.
- Poiată, A., Tuchiluş, C., Ivănescu, B., Ionescu, A., Lazăr, M. I. (2008). Antibacterial activity of some Artemisia species extract. Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici si Naturalisti din Iasi, 113(3), 911-914.
- Pokhrel, S., Singh, R., Gautam, P., Dixit, V. K., Das, A. J. (2012). Comparison of antimicrobial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against five strains of diarrhoea causing Escherichia coli. International Journal of Pharmacy Life Sciences, 3(4), 1624-1627.
- Pokorný, J., Yanishlieva, N., Gordon, M. (Eds.). (2001). Antioxidants in food: practical applications. Elsevier.

- Poljsak, B. (2011). Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-15.
- Popa, D. P., Reinbol'd, A. M. (1972). Bitter substances from *Teucrium chamaedrys*. *Chemistry of Natural Compounds*, 8(1), 60-62.
- Porte, A., Godoy, R. L. O., Maia-Porte, L. H. (2013). Chemical composition of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil from the Rio de Janeiro State (Brazil). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15(3), 438-441.
- Potkonjak, N. I., Veselinović, D. S., Novaković, M. M., Gorjanović, S. Ž., Pezo, L. L., Sužnjević, D. Ž. (2012). Antioxidant activity of propolis extracts from Serbia: A polarographic approach. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3614-3618.
- Prasad, H. H., Joshi, N. V. (1949). The preservative value of spices used in pickling raw fruit in India. *Agricultural Journal of India*, 34, 402.
- Preedy, V. R. (Ed.). (2014). *Cancer: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Elsevier Science Inc.
- Radulescu, V., Chiliment, S., Oprea, E. (2004). Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. *Journal of Chromatography A*, 1027(1), 121-126.
- Raghavan, S. (2006). *Handbook of spices, seasonings, and flavorings*. CRC Press, pp. 1-11.
- Ramchandani, V. A., Kwo, P. Y., Li, T. K. (2001). Effect of food and food composition on alcohol elimination rates in healthy men and women. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 41(12), 1345-1350.
- Ramya, M., Manogaran, S., Joey, K., keong, T. W., Katherasan, S. (2014). Studies on biochemical and medicinal properties of *stevia rebaudiana* grown in vitro. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 5(2), 169-174.
- Rao, A. B., Reddy, G. R., Ernala, P., Sridhar, S., Ravikumar, Y. V. (2012). An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and its biological activity. *International Journal of Food Science Technology*, 47(12), 2554-2560.
- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., Qurishi, M. A. (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. *Arabian Journal of Chemistry*, 1-10.

- Ravipati, A. S., Zhang, L., Koyyalamudi, S. R., Jeong, S. C., Reddy, N., Bartlett, J., ... Vysetti, B. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1-14.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Reuter J, Huyke C, Casetti F, Theek C, Frank U, Augustin M, Schenipp C. (2008). Anti-inflammatory potential of a lipolotion containing coriander oil in the ultraviolet test. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6(10), 847-851.
- Riachi, L. G., De Maria, C. A. B. (2015). Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*, 176, 72-81.
- Rios, J. L., Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 80-84.
- Rios, J. L., Recio, M. C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(2), 127-149.
- Rivas, A., Sansano, S., Pérez, M. P., Martínez, A., Rodrigo, D. (2016). Antimicrobial Effect of *Stevia Rebaudiana* Bertoni against *Listeria Monocytogenes* in a Beverage Processed by Pulsed Electric Fields (PEFs): Combined Effectiveness. In 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food Environmental Technologies. Springer Singapore, 43-46.
- Rivera, S. E. V., Escobar-Saucedo, M. A., Morales, D., Aguilar, C. N., Rodríguez-Herrera, R. (2014). Synergistic effects of ethanolic plant extract mixtures against food-borne pathogen bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 13(5), 699-704.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A. H., Khalel, K. I. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). *Industrial Crops and Products*, 44, 437-445.

- Rodrigues, V. M., Rosa, P. T., Marques, M. O., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A. (2003). Supercritical extraction of essential oil from aniseed (*Pimpinella anisum* L) using CO₂: solubility, kinetics, and composition data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(6), 1518-1523.
- Rojas, J. J., Ochoa, V. J., Ocampo, S. A., Muñoz, J. F. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(1), 1-6.
- Ruiz-Ruiz, J. C., Moguel-Ordoñez, Y. B., Matus-Basto, A. J., Segura-Campos, M. R. (2015). Antidiabetic and antioxidant activity of *Stevia rebaudiana* extracts (Var. Morita) and their incorporation into a potential functional bread. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7894-7903.
- Sahib, N. G., Anwar, F., Gilani, A. H., Hamid, A. A., Saari, N., Alkharfy, K. M. (2013). Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A Potential Source of High-Value Components for Functional Foods and Nutraceuticals-A Review. *Phytotherapy Research*, 27(10), 1439-1456.
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., Yamamoto, T. (1989). Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutans*, a cariogenic bacterium. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(9), 2307-2311.
- Sánchez-Maldonado, A. F., Schieber, A., Gänzle, M. G. (2011). Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1176-1184.
- Saranraj, P, Sivasakthi, S. (2014). Medicinal Plants and its Antimicrobial Properties: A Review. *Global Journal of Pharmacology*, 8(3), 316-327.
- Šarić, L., Cabarkapa, I., Šarić, B., Plavšić, D., Levic, J., Pavkov, S., Kokic, B. (2014). Composition and antimicrobial activity of some essential oils from Serbia. *Agro Food Industry Hi Tech*, 25(1), 40-43.
- Schuhmacher, A., Reichling, J., Schnitzler, P. (2003). Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Phytomedicine*, 10(6), 504-510.
- Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, P. K., Efferth, T. (2011). Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil against HNSCC cell line (UMSCC1). *HNO*, 59(12), 1203-1208.

- Shah, P. P., Mello, P. M. D. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperita*. *Natural Product Radiance*, 3(4), 214-221.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Shellie, R., Mondello, L., Marriott, P., Dugo, G. (2002). Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography–mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 970(1), 225-234.
- Shevchenko, Y., Hemmerich, I., Helfert, J., Smetanska, I. (2013). Influence of stevia-additives on antioxidant properties of different green teas. *Agro Food Industry Hi Tech*, 24(1), 22-26.
- Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Makarov, V. G., Wagner, H., Verpoorte, R., Heinrich, M. (2014). Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia; their history and applications. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 481-536.
- Shojaii, A., Abdollahi Fard, M. (2012). Review of pharmacological properties and chemical constituents of *Pimpinella anisum*. *ISRN pharmaceutics*.
- Shukla, H. S., Dubey, P., Chaturvedi, R. V. (1989). Antiviral properties of essential oils of *Foeniculum vulgare* and *Pimpinella anisum* L. *Agronomie*, 9(3), 277-279.
- Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V. K., Shukla, S. (2009). In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2338-2343.
- Si, W., Gong, J., Tsao, R., Zhou, T., Yu, H., Poppe, C., ... Du, Z. (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 296-305.
- Siddique, A. B., Rahman, S. M. M., Hossain, M. A., Rashid, M. A. (2014). Phytochemical screening and comparative antimicrobial potential of different extracts of *stevia rebaudiana bertonii* leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(4), 275-280.
- Sikorski, Z. Z., Kolakowska, A. (Eds.). (2011). Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. CRC Press. p. 202.

- Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M. P., Catalan, C. A. (2006). Studies on essential oils, Part 41. Chemical composition, antifungal, antioxidant and sprout suppressant activities of coriander (*Coriandrum sativum*) essential oil and its oleoresin. *Flavour and Fragrance Journal*, 21(3), 472-479.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Škrinjar, M. M., Nemet, N. T. (2009). Antimicrobial effects of spices and herbs essential oils. *Acta Periodica Technologica*, 40, 195-209.
- Smith, A., Kraig, B. (Eds.). (2013). *The Oxford Encyclopedia of Food and Drink in America* (Vol. 1). Oxford University Press, p. 550.
- Snow, J., Spelman, K. (2011). *The Influence of Bitter, Aromatic, and Pungent Medicinal Plants on Gut Function. Gastrointestinal and Liver Disease Nutrition Desk Reference*, p. 237.
- Soković, M. D., Vukojević, J., Marin, P. D., Brkić, D. D., Vajs, V., Van Griensven, L. J. (2009). Chemical Composition of Essential Oilsof *Thymus* and *Mentha* Speciesand Their Antifungal Activities. *Molecules*, 14(1), 238-249.
- Soleimanpour, S., Sedighinia, F. S., Afshar, A. S., Zarif, R., Asili, J., Ghazvini, K. (2013). Synergistic Antibacterial Activity of *Capsella bursa-pastoris* and *Glycyrrhiza glabra* Against Oral Pathogens. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(8), 1-6.
- Sroka, Z. (2005). Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics. *Zeitschrift fur Naturforschung C-Journal of Biosciences*, 60(11-12), 833-843.
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.
- Stankovic, M. S., Curcic, M. G., Zizic, J. B., Topuzovic, M. D., Solujic, S. R., Markovic, S. D. (2011b). *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4190-4205.
- Stankovic, M. S., Niciforovic, N., Topuzovic, M., Solujic, S. (2011a). Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology Biotechnological Equipment*, 25(1), 2222-2227.

- Stanković, M. S., Stefanović, O., Čomić, L., Topuzović, M., Radojević, I., Solujić, S. (2012). Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Central European Journal of Biology*, 7(4), 664-671.
- Stojanova, A., Paraskevova, P., Anastassov, C. H. (2000). A comparative investigation on the essential oil composition of two Bulgarian cultivars of *Mentha piperita* L. *Journal of Essential Oil Research*, 12(4), 438-440.
- Stone H. and Sidel J. L. (2004). *Sensory Evaluation Practices -Third Edition*. Elsevier Academic Press Inc, p. 17.
- Surveswaran, S., Cai, Y. Z., Corke, H., Sun, M. (2007). Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, 102(3), 938-953.
- Sužnjević, D. Ž., Pastor, F. T., Gorjanović, S. Ž. (2011). Polarographic study of hydrogen peroxide anodic current and its application to antioxidant activity determination. *Talanta*, 85(3), 1398-1403.
- Sužnjević, D. Ž., Pastor, F. T., Gorjanović, S. Ž. (2015a). DC polarographic examination of Hg 2+ reduction applicability to antioxidant activity determination. *Electrochimica Acta*, 168, 240-245.
- Sužnjević, D., Petrović, M., Pastor, F. T., Veljović, M., Zlatanović, S., Antić, M., Gorjanović, S. (2015b). Reduction of Hg²⁺ by Individual Phenolics and Complex Samples and Its Application in Polarographic Antioxidant Assay. *Journal of The Electrochemical Society*, 162(7), H428-H433.
- Tada, M., Okuno, K., Chiba, K., Ohnishi, E., Yoshii, T. (1994). Antiviral diterpenes from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 35(2), 539-541.
- Tahraoui, A., Israili, Z. H., Lyoussi, B. (2010). Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaurium erythraea* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 48-55.
- Tepe, B., Akpulat, H. A., Sokmen, M., Daferera, D., Yumrutas, O., Aydin, E., ... Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidative and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anisetum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. *Food Chemistry*, 97(4), 719-724.
- Thompson, A., Meah, D., Ahmed, N., Conniff-Jenkins, R., Chileshe, E., Phillips, C. O., ... Row, P. E. (2013). Comparison of the antibacterial activity of essential oils

- and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 338.
- Tolulope, R. A., Adeyemi, A. I., Erute, M. A., Abiodun, T. S. (2015). Isolation and screening of endophytic fungi from three plants used in traditional medicine in Nigeria for antimicrobial activity. *International Journal of Green Pharmacy*, 9(1), 58-62.
- Tomic, N. Materijal sa predavanja iz predmeta Metode senzorne analize hrane koji se slusa na master studijama na Odseku za prehrambenu tehnologiju, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Tonutti, I., Liddle, P. (2010). Aromatic plants in alcoholic beverages. A review. *Flavour and fragrance journal*, 25(5), 341-350.
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., ... Bisignano, G. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2474-2478.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., ... Iinuma, M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 50(1), 27-34.
- Tucakov, J. (1971) Lečenje biljem - fitoterapija. Beograd, itd: Kultura, pp.67-74; 166-169.
- Tumbas, V. T., Mandić, A. I., Ćetković, G. S., Đilas, S. M., Čanadanović-Brunet, J. M. (2004). HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum* L) extracts. *Acta Periodica Technologica*, (35), 265-273.
- Turker, A. U., Usta, C. (2008). Biological screening of some turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Natural Product Research*, 22(2), 136-146.
- Ullah, H., Mahmood, A., Ijaz, M., Tadesse, B., Honermeier, B. (2013). Evaluation of anise (*Pimpinella anisum* L.) accessions with regard to morphological characteristics, fruit yield, oil contents and composition. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(29), 2177-2186.

- US Department of Health and Human Services US Department of Agriculture (2005). Dietary Guidelines for Americans 2005. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/> . (10.02.2016.).
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, 7(1), 65-74.
- Vacca, V., Piga, A., Del Caro, A., Fenu, P. A., Agabbio, M. (2003). Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage. *Food/Nahrung*, 47(6), 442-447.
- Valentão, P., Andrade, P. B., Silva, E., Vicente, A., Santos, H., Bastos, M. L., Seabra, R. M. (2002). Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaureum erythraea*) flowering tops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 460-463.
- Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2001). Antioxidant activity of *Centaureum erythraea* infusion evidenced by its superoxide radical scavenging and xanthine oxidase inhibitory activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3476-3479.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L. (2003). Hydroxyl radical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaureum erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Phytomedicine*, 10(6), 517-522.
- Van den Dool, H., Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A*, 11, 463-471.
- Vaya, J., Aviram, M. (2001). Nutritional antioxidants mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine Metabolic Agents*, 1(1), 99-117.
- Veljković, V. B., Stanković, M. Z. (2003). Herbs used in alcoholic drinks. In B. Caballero (Ed.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*, Burlington: Academic, pp. 3098–3107.
- Verma, R. S. (2010). Chemical investigation of decanted and hydrophilic fractions of *Salvia sclarea* essential oil. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 5, 102-108.

- Verma, R. S., Rahman, L. U., Chanotiya, C. S., Verma, R. K., Chauhan, A., Yadav, A., ... Yadav, A. K. (2010). Essential oil composition of *Lavandula angustifolia* Mill. cultivated in the mid hills of Uttarakhand, India. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 75(3), 343-348.
- Vijaya, K., Ananthan, S., Nalini, R. (1995). Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.—a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2), 115-118.
- Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., ... Tilea, I. (2014). Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, 19(5), 5490-5507.
- Voravuthikunchai, S. P., Ifesan, O. T. (2011). *Applications of natural products in food*. Nova Science Publishers, Inc, pp.1-164.
- Vukosavljević, P., Novaković, M., Bukvić, B., Niksić, M., Stanisavljević, I., Klaus, A. (2009). Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 54(1), 45-62.
- Vukovic, N., Milosevic, T., Sukdolak, S., Solujic, S. (2007). Antimicrobial activities of essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4(S1), 17-20.
- Warrier, P. K., Nambiar, V. P. K., Ramankutty, C. (1996). *Indian medicinal plants: a compendium of 500 species*. Orient Longman Ltd, pp. 416–417.
- Weckesser S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C. M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* 14, 508 – 516.
- Wendakoon, C., Calderon, P., Gagnon, D. (2012). Evaluation of selected medicinal plants extracted in different ethanol concentrations for antibacterial activity against human pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants*, 1(2), 59-68.
- Widodo, G. P., Sukandar, E. Y., Adnyana, I. K., Sukrasno, S. (2012). Mechanism of Action of Coumarin against *Candida albicans* by SEM/TEM Analysis. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 44(2), 145-151.

- Witkowska, A. M., Hickey, D. K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2013). Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research*, 2(4), 37-54.
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105(3), 940–949.
- Wu, X., Liu, J., Yu, Z. B., Ye, Y. H., Zhou, Y. W. (2007). Studies on flavones in of *Lavandula augustifolia*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 32(9), 821-823.
- Xia, J., Allenbrand, B., Sun, G. Y. (1998). Dietary supplementation of grape polyphenols and chronic ethanol administration on LDL oxidation and platelet function in rats. *Life Sciences*, 63(5), 383-390.
- Yow, C., Tang, H. M., Chu, E. S., Huang, Z. (2012). Hypericin-mediated Photodynamic Antimicrobial Effect on Clinically Isolated Pathogens. *Photochemistry and Photobiology*, 88(3), 626-632.
- Zakon o jakim alkoholnim pićima, Sl. glasnik RS, br.92/2015.
- Zawiślak, G. (2011). The chemical composition of essential oil from the fruit of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska, Sectio DDD: Pharmacia*, 24(2), 169-175.
- Zeković, Z., Lepojević, Ž., Milić, S., Adamović, D., Mujić, I. (2009). Supercritical CO₂ extraction of mentha (*Mentha piperita* L.) at different solvent densities. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(4), 417-425.
- Zheng, W., Wang, S. Y. (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5165-5170.
- Zomorodian, K., Ghadiri, P., Saharkhiz, M. J., Moein, M. R., Mehriar, P., Bahrani, F., ... Fani, M. M. (2015). Antimicrobial Activity of Seven Essential Oils From Iranian Aromatic Plants Against Common Causes of Oral Infections. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), e17766.
- Zomorodian, K., Moein, M., Lori, Z. G., Ghasemi, Y., Rahimi, M. J., Bandegani, A., ... Abbasi, N. (2013). Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Myrtus communis* leaves. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16(1), 76-84.

BIOGRAFIJA AUTORA

Kandidat Marija P. Petrović, rođena je 25. 07. 1983. godine u Beogradu, Srbija. Osnovnu školu i srednju školu (Desetu gimnaziju „Mihajlo Pupin“) završila je u Beogradu. Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu upisala je 2002. godine, a diplomirala je 2009. godine na Odseku za prehrambenu tehnologiju biljnih proizvoda sa ocenom 10 (deset) na diplomskom radu i prosečnom ocenom tokom studija 8,33. Doktorske studije na istom fakultetu, na odseku za Prehrambenu tehnologiju, upisala je školske 2010/11. godine.

Od 2010. do 2016. godine bila je zaposlena u Institutu „Kirilo Savić“ u Beogradu, sa zvanjem istraživač - saradnik. U istom periodu bila je angažovana kao učesnik projekta TR31055 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom „Osmotska dehidracija hrane – sa energetskog i ekološkog aspekta održiva proizvodnja“.

Publikovala je:

- 1 rad u vrhunskom međunarodnom časopisu M21,
- 1 rad u istaknutom međunarodnom časopisu M22,
- 1 rad u časopisu međunarodnog značaja M23,
- 1 saopštenje sa nacionalnog skupa štampano u celini M63,
- 1 saopštenje na nacionalnom skupu štampano u izvodu M64,
- 1 rad u časopisu nacionalnog značaja M52,
- 5 saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u celini M33 i
- 3 saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u izvodu M34.

Od 2015. godine, uključena je kao pomoćno osoblje u nastavi iz predmeta Tehnologija konzervisanja i prerade voća i povrća i Tehnologija voćnih sokova i osvežavajućih bezalkoholnih pića.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a: _____ Petrović Marija _____

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije: _____ 10/33 _____

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

DOBIJANJE NOVIH LIKERA SA FUNKCIONALNIM SVOJSTVIMA OD
ODABRANOG LEKOVITOG, AROMATIČNOG I ZAČINSKOG BILJA

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2016.

Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske
verzije doktorske disertacije**

Ime i prezime autora: Petrović Marija

Broj indeksa ili prijave doktorske disertacije: 10/33

Studijski program: Prehrambena tehnologija

Naslov doktorske disertacije: Dobijanje novih likera sa funkcionalnim
svojstvima od odabranog lekovitog, aromatičnog i začinskog bilja

Mentor: Prof. dr Mališa Antić

Potpisani/a Petrović Marija

Izjavljujem da je štampana verzija moje doktorske disertacije istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2016.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

DOBIJANJE NOVIH LIKERA SA FUNKCIONALNIM SVOJSTVIMA OD ODABRANOG LEKOVITOG, AROMATIČNOG I ZAČINSKOG BILJA

koja je moje autorsko delo.

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

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

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 02.10.2016.

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

