

Fizikalno-kemijska karakterizacija macerata imele za proizvodnju rakije biske

Lukin, Priska

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:104443>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Priska Lukin

1234/PI

**FIZIKALNO-KEMIJSKA
KARAKTERIZACIJA MACERATA
IMELE ZA PROIZVODNJU RAKIJE
*BISKE***

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć mag. ing. Karle Hanousek Čiča.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Jasni Mrvčić i asistentici mag. ing. Karli Hanousek Čiča na odličnom mentorstvu, trudu, stručnoj pomoći i korisnim savjetima tijekom cijelog fakultetskog obrazovanja i pisanja diplomskog rada.

Od srca hvala mojim roditeljima koji su bili puni razumijevanja i potpore tijekom studiranja. Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene i dodatno uljepšali studentske dane.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

FIZIKALNO-KEMIJSKA KARAKTERIZACIJA MACERATA IMELE ZA PROIZVODNJU RAKIJE

BISKE

Priska Lukin, 1234/PI

Sažetak: Jaka alkoholna pića aromatizirana ljekovitim i aromatičnim biljem mogu biti izvor polifenola i drugih antioksidativnih spojeva u prehrani. U Hrvatskoj, točnije u Istri, konzumira se *biska*, jako alkoholno piće proizvedeno maceracijom lišća i grančica bijele imele (*Viscum album* L.) čija su ljekovita svojstva poznata od davnina, u rakiji komovici. Cilj ovog rada bio je definirati optimalne parametre maceracije imele za proizvodnju rakije *biske*. U maceratima su određene koncentracije ukupnih fenola i flavonoida i fizikalno-kemijski parametri - koncentracija ukupnih kiselina, pH vrijednost, ukupni suhi ekstrakt, ukupna suha tvar te kromatske karakteristike macerata imele. Koncentracija bilja za maceraciju, polarnost otapala u kojem se imela macerira i vrijeme trajanja maceracije značajno utječu na sve navedene parametre.

Ključne riječi: imela, biska, maceracija, polifenoli, boja

Rad sadrži: 47 stranica, 12 slika, 8 tablica, 103 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr.sc. Jasna Mrvčić*

Pomoć pri izradi: *Karla Hanousek Čiča, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Damir Stanzer*
2. Prof. dr. sc. *Jasna Mrvčić*
3. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
4. Doc. dr. sc. *Tomislava Vukušić-Pavičić* (zamjena)

Datum obrane: 13. srpnja 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

PHYSICO-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF MISTLETOE MACERATES FOR THE PRODUCTION OF *BISKA*

Priska Lukin, 1234/PI

Abstract: Strong alcoholic beverages flavored with medicinal and aromatic herbs can be a source of polyphenols and other antioxidant compounds in the diet. In Croatia, more precisely in Istria, *biska* is consumed, a strong alcoholic beverage produced by macerating leaves and twigs of white mistletoe (*Viscum album* L.) whose medicinal properties have been known since ancient times, in komovica brandy. This study aimed to define optimal parameters of mistletoe maceration for the production of *biska*. In the macerates, concentrations of total phenols and flavonoids and physicochemical parameters were determined - concentration of total acids, pH value, total dry extract, total dry matter, and chromatic characteristics of mistletoe macerates. The concentration of plants for maceration, the polarity of the solvent in which the mistletoe is macerated and the duration of maceration significantly affect all the above parameters.

Keywords: mistletoe, *biska*, maceration, polyphenols, color

Thesis Contains: 47 pages, 12 figures, 8 tables, 103 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Jasna Mrvčić, Full professor*

Technical support and assistance: *Karla Hanousek Čiča, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Damir Stanzer*, Full professor
2. PhD. *Jasna Mrvčić*, Full professor
3. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
4. PhD. *Tomislava Vukušić Pavičić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: June 13th, 2020

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA	3
2.2. TRAVARICA	4
2.2.1. Proizvodnja komovice	4
2.2.2. Proizvodnja travarice	5
2.3. BISKA	6
2.4. EUROPSKA IMELA (<i>Viscum album L.</i>)	7
2.4.1. Fitokemijski sastav imele	7
2.4.1.1. Lektini	8
2.4.1.2. Viskotoksini	8
2.4.1.3. Terpeni	8
2.4.1.4. Fenolni spojevi	9
2.4.1.5. Ugljikohidrati	11
2.5. UČINAK NA ZDRAVLJE	12
2.6. UPOTREBA BILJAKA U INDUSTRIJI JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA	13
2.7. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI	16
2.7.1. Klasične metode	16
2.7.2. Nove ili nekonvencionalne metode	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Biljni materijal – bijela imela	18
3.1.2. Postupak pripreme macerata	18
3.1.3. Kemikalije i oprema	19
3.2. Metode	20
3.2.1. Metode određivanja biološki aktivnih spojeva	20
3.2.1.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)	20
3.2.1.2. Određivanje ukupnih flavonoida	22
3.2.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara kvalitete macerata	23
3.2.2.1. Određivanje pH vrijednosti	23
3.2.2.2. Određivanje ukupnih kiselina	24
3.2.3. Određivanje ukupnog ekstrakta	24
3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari	25
3.2.5. Određivanje kromatskih parametara	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)	27
4.2. Koncentracija flavonoida	31
4.3. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara macerata imele	32
4.4. Kromatske karakteristike	36
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Jaka alkoholna pića dio su svakodnevnog života diljem svijeta od drevnih civilizacija sve do danas. Tradicionalno se koriste u ljudskoj prehrani i često se umjerena konzumacija takvih pića u narodu povezuje s mogućim pozitivnim učinkom na zdravlje. U svakoj državi razlikuju se prvenstveno prema izboru sastojaka za njihovu pripremu. Mediteranske zemlje, pa tako i Hrvatska, imaju povoljnu klimu za rast različitih botaničkih vrsta, a time i samoniklog i uzgojenog ljekovitog i aromatičnog bilja. Zahvaljujući tome, tradicionalno se stoljećima proizvode voćni destilati, biljni likeri i aromatizirana alkoholna pića poput travarica.

Jedna od mnogih biljaka u Hrvatskoj koje se koriste u tu svrhu je bijela imela (*Viscum album* L.), poluparazitni zimzeleni grm koji raste na granama drugih stabala. Imela ima dugu povijest upotrebe i koristi se zbog svojih raznih farmakoloških svojstava u liječenju kardiovaskularnih bolesti, artritisa, epilepsije i hipertenzije (Singh i sur., 2016).

Također ima i antitumorsko, antimutageno, antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje (Nguyen i sur., 2013).

U Istri se od imele tradicionalno proizvodi *biska* - travarica proizvedena maceracijom njenog lišća i grana u rakiji komovici s ili bez dodatka meda. Maceracija je postupak ekstrakcije tvari boje, arome i biološki aktivnih tvari iz bilja, a može trajati 20-45 dana, ovisno o svojstvima otapala za ekstrakciju, veličini i količini dodanog bilja, temperaturi i trajanju ekstrakcije (Zhang i sur., 2018). Biološki aktivne tvari u imeli poput polifenola nemaju nutritivnu funkciju, ali pozitivno utječu na ljudsko zdravlje – imaju jako antioksidacijsko djelovanje te štite organizam od oksidacijskog stresa i time od različitih bolesti poput kardiovaskularnih bolesti i bolesti jetre (Gupta i sur., 2013). Osim polifenola, u vodeno-alkoholnu bazu iz imele prelaze i eterična ulja, tvari arome, polisaharidi, aminokiseline, alkaloidi, terpenoidi, proteini, amini, peptidi i fitosteroli (Hanousek Čiča i sur., 2018).

Umjerena konzumacija definirana je s jednim do dva pića dnevno za muškarce i jedno piće za žene i starije osobe (Dietary Guidelines for Americans, 2010). Umjerenom konzumacijom *biske*, zbog prisutnih polifenolnih spojeva i drugih biološki aktivnih tvari, ostvaruje se mogući blagotvoran učinak na zdravlje.

Ovaj rad pruža trenutna saznanja o imeli, s naglaskom na postupak maceracije i proizvodnju rakije *biske*. Cilj ovog rada je definirati optimalne parametre maceracije imele u vodeno-alkoholnoj bazi na temelju njenih biološki aktivnih tvari, ali i fizikalno-kemijskih i kromatskih karakteristika macerata imele. Pripremljeno je 12 uzoraka macerata imele maceracijom 3

različite masene koncentracije imele i 4 različita volumna udjela etanola u vodeno-etanolnim bazama. Nakon svakog tjedna maceracije, u periodu od četiri tjedna, određena je koncentracija ukupnih fenola u pojedinom uzorku, a nakon završene maceracije određeni su fizikalno-kemijski parametri - koncentracija ukupnih kiselina, ukupnih flavonoida, pH, ukupni ekstrakt, ukupna suha tvar i kromatske karakteristike macerata imele. Trajanje maceracije temeljeno je na ustaljenoj koncentraciji fenola.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009), jaka alkoholna pića su alkoholna pića namijenjena za ljudsku potrošnju, koja imaju posebna senzorska svojstva i minimalno 15 % vol. alkohola.

Mogu se proizvesti izravno:

- destilacijom prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, s ili bez dodatka aroma,
- maceracijom ili sličnom preradom bilja u etilnom alkoholu ili destilatu poljoprivrednog podrijetla,
- dodavanjem aroma, šećera, drugih sladila ili drugih poljoprivrednih ili prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu ili destilatu poljoprivrednog podrijetla.

Osim izravnog dobivanja, jaka alkoholna pića mogu se dobiti miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića, etilnim alkoholom ili destilatom poljoprivrednog podrijetla.

Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića mora biti poljoprivrednog podrijetla, ne smije imati miris i okus drugačiji od onoga koji potječe od upotrijebljenih sirovina i mora imati minimalno 96,0 % vol.(Pravilnik o jakim alkoholnim pićima, NN 61/09).

Nadalje se, prema Pravilniku (NN 61/09), jaka alkoholna pića mogu podijeliti na prirodna (prava) jaka alkoholna pića dobivena destilacijom određene sirovine i miješana jaka alkoholna pića dobivena dodatkom etanola, različitog bilja, aroma i slično u destilat.

Prirodna jaka alkoholna pića proizvode se destilacijom alkoholno-prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, a karakterizira ih specifična primarna aroma sirovine iz koje je dobiven destilat. Najkvalitetniji su proizvodi jakih alkoholnih pića. Nije dozvoljeno dodavati šećer, sirovine na bazi škroba, umjetne boje, arome ili alkohol. Prirodna jaka alkoholna pića mogu se podijeliti na voćne rakije (npr. šljivovica, lozovača), žitne rakije (npr. vodka, whiskey) i šećerne rakije (rum).

Miješana jaka alkoholna pića dobivaju se maceracijom biljne sirovine u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla i destilacijom dobivenog macerata, nakon čega se dobiveni destilat miješa s etilnim alkoholom i aromatskim spojevima. Sadrže karakterističnu aromu sirovine iz

koje su proizvedeni, ali budući da su proizvedeni iz rafiniranog alkohola, ne sadrže patočna ulja ni aldehide.

2.2. TRAVARICA

Travarica spada pod jaka alkoholna pića podrijetlom iz Hrvatske. Tradicionalno je alkoholno piće mediteranskih zemalja poput Hrvatske, Italije ili Grčke. Ne svrstavamo ju u skupinu prirodnih ni umjetnih jakih alkoholnih pića – zajedničko s prirodnim destilatima je da ne sadrži šećer i ima alkoholnu jakost od oko 40 % vol., ali nema fermentacije ni destilacije, već se provodi maceracija odabranog ljekovitog bilja u etilnom alkoholu, komovici ili voćnoj rakiji. U ovom poglavlju bit će opisan tehnološki postupak proizvodnje travarica.

2.2.1. Proizvodnja komovice

Komovica je najčešće upotrebljena alkoholna baza za proizvodnju travarice, a proizvodi se destilacijom fermentirane groždane komine, nusproizvoda vinarstva koji ostaje nakon prešanja masulja. U proizvodnji komovice može se koristiti svježa komina (dobivena u proizvodnji bijelog vina, sadrži određeni udio šećera te potrebno ju je skladištiti s ciljem provođenja alkoholne fermentacije) ili djelomično prevrela komina (dobivena u proizvodnji crnog vina, sadrži određenu količinu alkohola te se može koristiti odmah kao sirovina za proizvodnju).

Za kvalitetnu komovicu, prednost imaju sorte grožđa koje imaju izraženu primarnu aromu grožđa, s visokim sadržajem šećera (5-12 %) i visokom koncentracijom kiselina poput muškatinih sorti ili Traminca (Nikićević i Tešević, 2010).

U slučaju korištenja svježe komine, prije fermentacije potrebno je dokiseliti kominu radi sprječavanja razvoja nepoželjnih bakterija i smanjenja aktivnosti pektolitičkih enzima (pH = 3,0-3,3). Slijedi dodatak selekcioniranih kvasaca zbog provođenja kontrolirane fermentacije i dobivanja finije arome budućeg destilata. Temperatura provođenja fermentacije iznosi između 18 i 24 °C, kako bi se spriječila ubrzana fermentacija i gubitak arome.

Pri završetku fermentacije, potrebno je čim prije preraditi sirovinu i provesti destilaciju. Destilacijom se odjeljuju hlapivi sastojci iz tekuće smjese na temelju njihovih različitih vrelišta, a cilj je koncentriranje alkohola i hlapljivih sastojaka koji pridonose kakvoći rakije te odvajanje sastojaka koji štete kakvoći rakije.

Destilacija prevrele komine temelji se na zagrijavanju složene smjese etanola i vode s drugim različitim hlapivim spojevima do vrelišta, gdje se pare hlapljivih sastojaka zajedno s etanolom

odvode, kondenziraju i prikupljaju kao destilat. Moguće ju je provesti jednostavnim destilacijskim uređajem, pri čemu je potrebno provesti dvostruku destilaciju, ili složenim uređajem s kolonama i deflegmatorom, čime se destilacija provodi jednokratno – na taj način se dobiva destilat visoke alkoholne jakosti.

Postupak destilacije započinje punjenjem kotla do $\frac{3}{4}$ zapremnine s kominom grožđa uz dodatak vode. Kotao se zagrijava čime dolazi do izdvajanja vodeno-alkoholnih para i ostalih sastojaka, poput acetaldehida i etil-acetata koji se izdvajaju prvi, ili viših alkohola koji se izdvajaju posljednji. Tijekom destilacije potrebno je odjeljivanje frakcija (prvijenac, srce i patoka) čime se izdvajaju sastojci koji u većoj količini štete kvaliteti destilata i ljudskom zdravlju. Zato se jedino srednja frakcija destilata (srce) koristi za konzumaciju, ali i za proizvodnju drugih jakih alkoholnih pića.

Pravilnom fermentacijom prevrele komine, njenom destilacijom i dozrijevanjem destilata dobiva se alkoholna baza visoke kvalitete koja pozitivno utječe na aromu i boju tj. kvalitetu konačnog proizvoda.

2.2.2. Proizvodnja travarice

Travarica se proizvodi dodatkom ljekovitog i aromatskog bilja u određenoj količini i sastavu u rakiju komovicu, šljivovicu ili druge rakije (ovisi o recepturi proizvođača). Miješanjem ljekovitog bilja s rakijom dolazi do ekstrakcije biološki aktivnih tvari iz bilja u vodeno-etanolnu bazu. Navedeni postupak naziva se maceracija. Smjesa etanola i vode uzrokuje bubrenje biljke i povećava poroznost staničnih stijenki i na taj način olakšava difuziju tvari (Alamgir, 2017).

Maceracijom se dobiva macerat tj. vodeno-etanolni ekstrakt u kojem je došlo do izdvajanja biološki aktivnih spojeva, nehlapljivih sastojaka i pigmenata poput klorofila, antocijana, karotenoida, tanina i drugih tvari iz sirovine (Lučić, 1986). Provodi se 4 do 12 tjedana te se nakon kontrole kvalitete filtrira i puni u boce. U konačnom proizvodu do izražaja moraju doći aromatske komponente karakteristične za korišteno bilje, a korištenjem svježeg bilja i kvalitetnog destilata dobije se bolja kvaliteta travarice.

2.3. BSKA

Biska je tradicionalno prirodno jako alkoholno piće podrijetlom iz Istre koje spada u travarice, a proizvodi se maceracijom svježih ili sušenih listova i grančica bijele imele (*Viscum album* L.) u rakiji komovici (slika 1). Sadržaj je potrebno svakodnevno miješati, a vrijeme maceracije ovisi o količini dodanog bilja – duljom maceracijom dolazi do ekstrakcije veće količine bioaktivnih spojeva i pigmenata, čime *biska* postaje tamnije obojena. Maceracija većinom traje 30 do 60 dana, nakon čega slijedi filtracija i punjenje u boce. Na aromu konačnog proizvoda utječu mnogi faktori kao što su kvaliteta početne sirovine, vrijeme berbe imele, stablo domaćina, način sušenja, ali i proces proizvodnje (fermentacija, destilacija i dozrijevanje alkoholne baze, maceracija imele) (Hanousek Čiča i sur., 2018).

Budući da je imela poluparazitni grm, može sintetizirati vlastite bioaktivne spojeve, ali uzima i neke hranjive tvari iz stabla domaćina. Veliku ulogu imaju i okolišni čimbenici poput godišnjeg doba, klime i temperature koji mogu značajno utjecati na nakupljanje antioksidansa u biljnom tkivu. Na temelju toga, stablo domaćina ima ključnu ulogu u fenolnom sastavu imele te imela s različitih stabala ima različit kemijski sastav (Vicas i sur., 2012).

Tradicija proizvodnje *biske* u Istri oživljena je zalaganjem humskog župnika u drugoj polovici 20. stoljeća (Anonymous 1, 2019). Alkoholna baza koja se koristi za njenu proizvodnju (najčešće rakija komovica) sadrži 36 do 40 % vol. etanola, najviše 400 g metanola po litri apsolutnog alkohola te 200 do 2100 mg ukupnih kiselina po litri apsolutnog alkohola. Dodatkom bilja u rakiju (dodana količina bilja varira od recepture do recepture), dolazi do ekstrakcije određene količine sastojaka u rakiju čime se ona obogaćuje (Milotić, 2001).



Slika 1. *Biska* (Anonymous 2)

2.4. EUROPSKA IMELA (*Viscum album* L.)

Europska imela (lat. *Viscum album* L.) je poluparazitni, zimzeleni grm koji raste na granama drugih stabala u koje prodire pomoću organa zvanog haustorij. Kao poluparazit, može samostalno provoditi fotosintezu zbog klorofila prisutnog u lišću i stabljikama, međutim ovisi o domaćinu koji joj služi kao izvor vode i mineralnih hranjivih tvari. Sastoji se od žućkasto-zelenih stabljika i listova koji sadrže klorofil te bijelih, sitnih cvjetova. Plod imele sastoji se od sjemenke okružene prozirno-bijelom, ljepljivom pulpom (slika 2) (POWO, 2019). Imela ima dugu povijest uporabe i koristi se kao lijek u narodnoj medicini za liječenje različitih bolesti poput raka, dijabetesa, nesаницe, ateroskleroze, probavnih smetnji, uobičajene groznice i astme (Singh i sur., 2016). Također ima i antitumorsko, antimutageno, antioksidacijsko, antimikrobno i protuupalno djelovanje (Nguyen i sur., 2013). U Europi su utvrđene tri podvrste koje su identificirane na temelju vrsta stabla domaćina na kojima rastu. *V. album* subsp. *album* raste na stablima tvrde građe (na primjer hrast, jabuka, javor), *V. album* subsp. *abietis* koristi jelu kao domaćina i *V. album* subsp. *lactum* raste na borovima i smreci (Singh i sur., 2016).

Općenito je poznato da kemijski sastav imele nije stalan i da ovisi o vrsti biljke domaćina i uvjetima uzgoja, kao što su temperatura okoline, koncentracija CO₂ i godišnje doba (Luczkiewicz i sur., 2001).



Slika 2. Bijela imela (Anonymous 3)

2.4.1. Fitokemijski sastav imele

Imela predstavlja izvor velikog broja biološki aktivnih tvari, kao što su lektini, flavonoidi, polisaharidi, alkaloidi, terpeni, fitosteroli i polifenoli. Njihova koncentracija i sastav uvelike ovise o biljci domaćinu i dijelovima same biljke – npr. prisutnost određenih alkaloida zabilježena je u imeli koja raste na domaćinima koje sintetiziraju navedene spojeve (Cordero i sur., 1993).

2.4.1.1. Lektini

Lektini su glavne komponente izolirane iz imele. Heterogena su skupina glikoproteina koji su visokospecifični za vezanje mono- i oligosaharida i djeluju kao obrambeni proteini protiv štetočina i biljojeda (Peumans i Van Damme, 1995). U imeli su izolirane 3 vrste lektina (Urech i Baumgartner, 2015):

- lektin I specifičan za D – galaktozu (dimer, 115 kDa) ili viskumin,
- lektin II specifičan za galaktozu- i N-acetil-D-galaktozamin (60 kDa),
- lektin III specifičan za N-acetil-D-galaktozamin (60 kDa).

Ova selektivnost omogućava specifično vezanje nekih ugljikohidrata koji se nalaze na tumorskim stanicama, što rezultira antikancerogenim aktivnostima. Sve tri vrste imaju visoku reaktivnost s ljudskim eritrocitima, bez obzira na krvnu grupu (Singh i sur., 2016). Viskumin je najistaknutiji primjer biljnog lektina s potencijalnim aplikacijama protiv raka. U niskim koncentracijama može stimulirati T-stanice pri čemu inducira imunološki sustav za napad stanica raka (Zwierzina i sur., 2011). Udio lektina je najveći u zimskom razdoblju, a u najvišim koncentracijama pojavljuje se u klici i izdanku (Singh i sur., 2016).

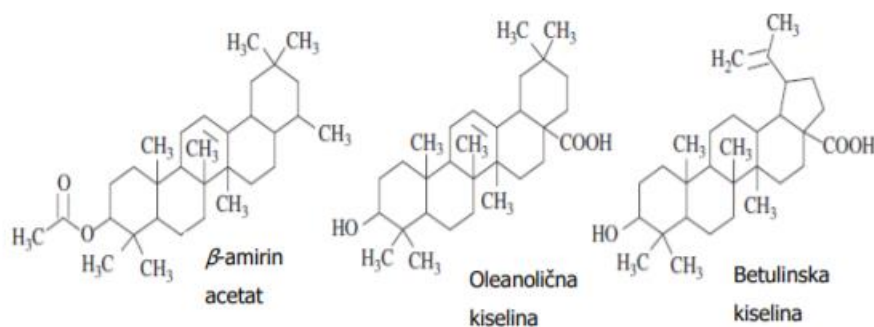
2.4.1.2. Viskotoksini

Viskotoksini su polipeptidi bogati cisteinom koji se sintetiziraju u lišću i stabljikama. Sastoje se od 46 aminokiselinskih ostataka s molekularnom težinom od oko 5 kDa.

Sastav i količina viskotoksina u imeli ovise o biljci domaćinu na kojoj parazitira, a omogućuju joj kompaktnu strukturu i visoku stabilnost tijekom denaturirajućih uvjeta kao što su toplina i djelovanje proteaza. Nađeno je 7 različitih izomera viskotoksina koji ovise o podvrsti same imele - A1, A2, A3, B, B1, C1 i 1PS, međutim uočeno je da najčešće prevladavaju viskotoksini A2 i A3 (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

2.4.1.3. Terpeni

Terpeni su velika skupina hlapivih, lipofilnih, ugljikovodičnih spojeva građeni od izoprenskih jedinica koji se najčešće pojavljuju u prirodi u eteričnim uljima biljaka. Terpeni izolirani iz imele su triterpeni poput β -amirin acetata, oleanolične kiseline, betulinske kiseline (slika 3) i smjese fitosterola (stigmasterol, β -sitosterol) i njihovih glikozida (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Prema Wójciak-Kosior i sur. (2017), najveća koncentracija triterpenskih kiselina bila je u imeli koja je ubrana tijekom ljeta, zbog čega se to razdoblje smatra optimalnim za berbu. Oleanolična kiselina smanjuje krvni tlak i djeluje protuupalno, hepato- i nefroprotektivno, dok betulinska kiselina pokazuje citotoksično i antitumorsko djelovanje.



Slika 3. Strukturne formule triterpena prisutnih u imeli (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

2.4.1.4. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi sekundarni su biljni metaboliti u kojima je hidroksilna skupina direktno vezana na benzenski ili aromatski prsten. Nosioци su karakterističnog okusa, boje i mirisa. Iz imele je izoliran niz fenolnih spojeva - flavonoidi, fenilpropanoidi i fenolne kiseline.

Sadrži li spoj dvije ili više hidroksilnih skupina, a vezane su za aromatski prsten, radi se o polifenolima. Količina i sastav polifenola uvelike se razlikuje po podvrstama imele i biljci domaćinu na kojem parazitira. Od polifenola iz stabljika i lišća imele izolirani su naringenin, kampferol, kvercetin i ružmarinska kiselina (Vicas i sur., 2012).

Fenolni spojevi su nestabilni te može doći do njihovog posmeđivanja. Enzimskim posmeđivanjem polifenola u di- ili polikarbonilne spojeve djelovanjem polifenol-oksidge žuti pigmenti prelaze u smeđe pigmente (Mayer, 2016).

Flavonoidi

Flavonoidi, najvažnija pojedinačna skupina fenolnih spojeva, klasa su prirodnih spojeva prisutni u svim dijelovima biljke – lišću, korijenu, stabljici i plodovima. Prirodno se pojavljuju u biljkama i pripisuju im se antikancerogena, antitumorska, antialergijska i protuupalna svojstva (Kirana, 1996). U biljci služe za rast, razvoj i obranu od patogenih mikroorganizama i drugih štetnih faktora. Također daju obojenje biljci, djeluju antioksidativno i štite stanice i tkiva od oksidativnog stresa nastalog kao posljedica djelovanja slobodnih radikala (Finkel i Holbrook, 2000).

Strukturu flavonoida (slika 4) čini difenilpropanski kostur (C₆- C₃- C₆) kojeg čine dva benzenska prstena (A i B) međusobno povezana piranskim prstenom (C). Flavonoidi se klasificiraju prema

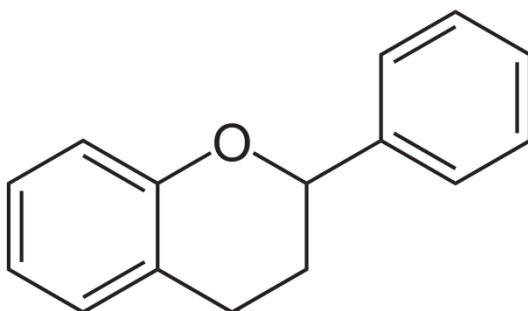
stupnju oksidacije piranskog prstena, stupnju nezasićenosti i prema supstituciji hidroksilnih skupina pričvršćenih na strukturne prstene (Mihelj, 2009).

Najvažnije skupine su:

- antocijanidini
- flavoni (flavoni, flavonoli, izoflavoni)
- flavani (flavanoni, flavani, flavanoli)
- čalkoni

Flavonoli i flavoni često su poznati kao antoksanтини (žuti pigmenti), a antocijanidini, ovisno o broju hidroksilnih skupina, daju različita obojenja biljkama.

Najveći broj flavonoida izolirani iz alkoholnih ekstrakata imele su iz skupina čalkona (viskolin) i flavanona (sakuranetin, homoeriodiktiol, naringenin). Međutim, identificirani su i flavonoli kvercetin, ramnazin, izoramnetin i kampferol te flavonoidski glikozidi kvercetina poput kvercitrina i izokvercitrina (Kirana, 1996; Urech i Baumgartner, 2015).



Slika 4. Difenilpropanski kostur – struktura flavonoida (Anonymous 4)

Fenolne kiseline

Fenolne kiseline spadaju u skupinu neflavonoida i dijele se na dvije osnovne skupine:

- derivati hidroksicimetne kiseline
- derivati hidroksibenzojeve kiseline

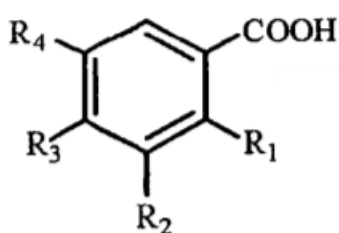
Njihova antioksidacijska aktivnost raste povećanjem broja hidroksilnih skupina. Stoga hidroksicimetne kiseline imaju veću aktivnost od hidroksibenzojevih kiselina.

Predstavnici derivata hidroksicimetnih kiselina su ferulinska, kava, p-kumarinska, sinapinska i klorogenska kiselina, a derivata hidroksibenzojevih kiselina galna, vanilinska, siringična i protokatehinska kiselina. Najčešće se javljaju u obliku glikozida, amida ili estera, rjeđe u slobodnom obliku. Razlike između spojeva fenolnih kiselina nastaju hidroksilacijom i

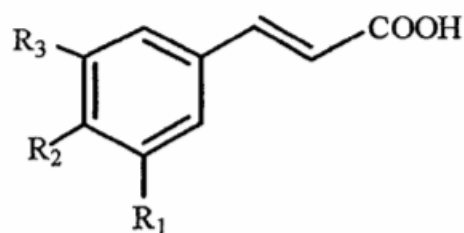
metilacijom aromatskog prstena. Osnovne strukture hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline prikazane su na slici 5.

Luckiewitz i sur. (2001) ispitali su uzorke imele prikupljene s različitih biljaka domaćina te je kod bijele imele određeno je ukupno 12 fenolnih kiselina:

- hidroksicimetne kiseline - trans-cimetna, kava- , ferulinska, p-kumarinska, klorogenska, sinapinska kiselina
- hidroksibenzojeve kiseline - galna, gentizinska, protokatehinska, siriginska, p-OH benzojeva, salicilna kiselina



hidroksibenzojeva kiselina



hidroksicimetna kiselina

Slika 5. Strukture hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline (Monagas i sur., 2005)

2.4.1.5. Ugljikohidrati

Budući da fotosinteza imele nema veliku učinkovitost, imela većinu ugljikohidrata crpi iz stabla domaćina. Analizama sastava i sadržaja ksilema imele, utvrđene su značajne količine glukoze, fruktoze i saharoze pri čemu dominira saharoza (Escher i sur., 2004).

Od kompleksnih ugljikohidrata, u plodu i lišću identificirani su strukturno različiti polisaharidi - visoko metilirani homogalakturonan, pektin, α -1,4-metil ester galakturonske kiseline i arabinogalaktan, dok su plodovi bogati ramnogalakturonanima s bočnim lancima arabinogalaktana, arabinogalaktanima i malim količina ksiloglukana. Sadržaj ugljikohidrata također varira ovisno o biljci domaćinu (Singh i sur., 2016).

2.5. UČINAK NA ZDRAVLJE

Proizvodnja aromatiziranih jakih alkoholnih pića ima dugu tradiciju u svijetu i Hrvatskoj. Alkoholni ekstrakti ljekovitih biljaka preteče su današnjih travarica te su ih u početku alkemičari i apotekari koristili za liječenje određenih bolesti.

Prema WHO/FAO (2003) i Lindberg i Amsterdam (2008), postoji obilje epidemioloških podataka da umjerena konzumacija alkohola (jedno do dva pića dnevno za muškarce, jedno piće dnevno za žene i starije osobe (Dietary Guidelines for Americans, 2010)) smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti.

Primjena ljekovitog i aromatičnog bilja u proizvodnji jakih alkoholnih pića ima veliki značaj zbog prisutnosti bioaktivnih sastojaka - imaju jaku antioksidacijsku aktivnost i omogućuju zaštitu organizma od oksidacijskog stresa. Bioaktivni sastojci obuhvaćaju brojne skupine spojeva poput polifenola, terpena i drugih biljnih komponenti. Postupkom maceracije dolazi do ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz biljaka u vodeno-alkoholnu bazu zbog čega travarice posjeduju određena funkcionalna svojstva.

U prethodnom poglavlju objašnjeni su spojevi prisutni u imeli. Jedni od njih su fenolni spojevi koji su najperspektivniji spojevi za liječenje raka (Buyel, 2018) i povećavaju antioksidacijsku aktivnost travarica. Spojevi poput lektina i viskotoksina, imaju izravno citotoksično djelovanje na stanice raka i uzrokuju njihovu apoptozu (programirana smrt stanica). Osim antitumorske aktivnosti, etanolni ekstrakt imele pokazuje značajno smanjenje krvnog tlaka (Radenković i sur., 2009) te smanjuje razinu glukoze u krvnom serumu – stimulira izlučivanje inzulina iz β -stanica gušterače, a da pri tome nema citotoksični učinak (Shahaboddin i sur., 2011). Time je ekstrakt imele pokazao potencijal za liječenje oboljelih od dijabetesa tipa I (Singh i sur., 2016).

Neki farmakološki učinci imele povezani su i s prisutnošću triterpenskkih kiselina, poput oleanolne i betulinske kiseline, zbog čega je ekstrakt imele učinkovit u akutnoj limfoblastičnoj i mijeloidnoj leukemiji (Delebinski i sur., 2012).

Ekstrakcijom navedenih spojeva u vodeno-etanolnu bazu, dolazi do obogaćivanja pića čime *biska* u umjerenim količinama može imati pozitivan učinak na smanjenje krvnog tlaka, razine šećera u krvi te općenito poboljšanje imunološkog sustava i metabolizma.

2.6. UPOTREBA BILJAKA U INDUSTRIJI JAKIH ALKOHOLNIH PIĆA

Upotreba aromatičnih biljaka i začina za pripremu napitaka datira iz drevne mediteranske povijesti kada je maceracija bilja i začina u vinu bila uobičajena praksa. Nakon određenog vremena, etanol je prepoznat kao dobro otapalo za ekstrakciju različitih tvari iz biljaka čime se one počinju koristiti u proizvodnji jakih alkoholnih pića.

Prema Petrović (2016), jaka alkoholna pića u čijoj se proizvodnji koristi ljekovito, aromatično i začinsko bilje su biteri, likeri, aromatizirana vina i rakije, vermut, gin, pivo itd.

Za ekstrakciju hlapivih sastojaka ili drugih spojeva koriste se svježi ili osušeni dijelovi biljaka poput kore, korijenja, smole, cvjetova, plodova, sjemenki i stabljike (tablica 1).

Tablica 1. Biljke i plodovi u proizvodnji jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj

Ime biljke	Dio biljke koji se koristi	Naziv pića za koji se koristi
Andelika <i>Archangelica officinalis</i>	Korijen, eterično ulje, macerati	Gin, likeri, aromatizirana JAP, rakije
Anis <i>Pimpinella anisum</i>	Korijen, sjeme, eterično ulje, macerati	Gin, JAP aromatiziran anisom, likeri, pastis
Borovica <i>Juniperus communis</i>	Plodovi (bobice), eterično ulje	Rakija, gin
Kadulja <i>Salvia officinalis</i>	Listovi, eterično ulje	Likeri, aromatizirana JAP
Komorač <i>Foeniculum vulgare</i>	Korijen, listovi, eterično ulje	Aromatizirana JAP, gin, rakije
Korijander <i>Coriandrum sativum</i>	Sjeme, eterično ulje	Gin, rakije, likeri
Metvica <i>Mentha piperita</i>	Listovi, eterično ulje	Likeri, aromatizirana JAP

Mirta <i>Myrtus communis</i>	Listovi, eterično ulje	Likeri, aromatizirana JAP
Pelin <i>Artemisia absinthium</i>	Nadzemni dijelovi (najčešće listovi)	Priprema macerata, bittera, likera, aromatiziranih JAP
Rogač <i>Ceratonia siliqua</i>	Plodovi	Rakije, likeri, aromatizirana JAP
Ruta <i>Ruta graveolens</i>	Listovi, eterično ulje	Likeri, aromatizirana JAP
Sladić <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Korijen	Pastis
Smokva <i>Ficus carica L.</i>	Plod, list	Aromatizirana JAP, rakije

Osim biljnog materijala mogu se koristiti i eterična ulja biljaka, alkoholni ekstrakti, infuzije i slično. Takva pića nazivaju se travaricama i pokazuju povećanu antioksidacijsku aktivnost i do nekoliko puta, u odnosu na destilate i druga jaka alkoholna pića (Petrović, 2016).

Tonutti i Liddle (2010) navode 4 kategorije prirodnih izvora aroma za različite vrste aromatiziranih alkoholnih pića:

- gorko (npr. artičoka, korijen encijana)
- gorko i aromatično (maslačak, gorka naranča)
- snažno aromatično (anđelika, kadulja, zvjezdasti anis)
- začini (klinčić, cimet, muškadni oraščić)

Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009), jaka alkoholna pića proizvedena maceracijom bilja (i redestilacijom kod određenih proizvoda) podrijetlom iz Hrvatske su hrvatska travarica, pelinkovac i zadarski maraschino.

Hrvatska travarica je jako alkoholno piće koje se dobiva aromatiziranjem destilata od grožđa ili grožđanog koma aromatskim biljem ili njihovim maceratima.

Za proizvodnju travarice najčešće se u rakiju komovicu macerira mješavina različitog bilja poput komorača, kadulje, rute, borovice, rogača, lišća ili kore citrusa, lovora, ružmarina, pelina, timijana, mačje metvice, mažurana i lavande (Luczaj i sur., 2019).

Hrvatski pelinkovac pripada kategoriji likera i dobiva se aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla maceratima aromatskog bilja pri čemu dominira biljka pelin (*Absinthii herba*). Liker sadrži 27-31 % vol. alkohola i 100-170 g dodanog šećera po litri.

Priprema se maceracijom odabrane smjese aromatskog bilja u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla kroz određeno vrijeme, nakon čega se dio macerata destilira i miješa s preostalim maceratom. Taj pripravak se, nakon određenog vremena koje je potrebno da se homogenizira, upotrebljava za proizvodnju hrvatskog pelinkovca.

Zadarski maraschino pripada kategoriji jakih alkoholnih pića *maraschino*, a dobiva se aromatiziranjem etilnog alkohola poljoprivrednog podrijetla destilatima macerata (min. 33 % ukupne količine alkohola u liker) višnje maraske i/ili njezinih dijelova (kore, grančice, lista, ploda). Sadrži minimalno 32 % vol. alkohola i 300-360 g L⁻¹ šećera.

Za proizvodnju travarica ili drugog aromatiziranog jakog alkoholnog pića, često se jedna biljka koristi kao glavni sastojak, dok ostalo bilje služi za stvaranje kompleksnosti arome, korekciju mirisa, okusa ili boje. Primjerice, u posljednje vrijeme raste konzumacija gina, jakog alkoholnog pića proizvedenog maceracijom bobica borovice. Osim borovice, često se dodaju i druge biljke poput korijandera, anđelike, kore citrusa, kardamoma i dr.

Aromatično i ljekovito bilje prikazano u tablici 1. koriste se kao sastojci u proizvodnji jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj (Luczaj i sur., 2019; Fiket, 2013). Za njih je otkriveno da djeluju stimulirajuće na probavni sustav, protuupalno, antimikrobno, antimutageno i antikarcinogeno (Coldea i Mudura, 2002).

2.7. EKSTRAKCIJSKI POSTUPCI

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese primjenom odgovarajućeg otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima boju topljivost od ostalih sastojaka smjese (Lovrić, 2003).

Cilj ekstrakcije u industriji jakih alkoholnih pića je izolacija spojeva iz biljnog materijala koji doprinose aromi, boji, okusu i mirisu konačnog proizvoda. Za ekstrakciju je važno odabrati pogodno otapalo i uzeti u obzir određene parametre poput selektivnosti, topljivosti, cijene i sigurnosti otapala. Etanol je odlično ekstrakcijsko otapalo za fitokemikalije iz bilja i voća (Zhang i sur., 2018), čime se maceracijom bilja i voća doprinosi konačnoj organoleptici jakog alkoholnog pića.

Važno je uzeti u obzir i prirodu biljnog materijala i samih spojeva u materijalu – na njihovu topivost u određenom otapalu također utječe njihova lipofilnost, osjetljivost na svjetlost, kisik ili toplinu i kemijska struktura.

Učinkovitost ekstrakcije povećava se prethodnim usitnjavanjem biljnog materijala (veća mogućnost difuzije otapala u materijal), povećanjem temperature (povećanje topljivosti) i duljim vremenom trajanja ekstrakcije. Ne postoje univerzalni postupci ekstrakcije za sve fitokemikalije i tvari unutar biljaka, već je metode potrebno odabrati ovisno o željenoj skupini tvari koju je potrebno izolirati.

Ekstrakcijske tehnike podijeljene su na klasične/konvencionalne i nove/nekonvencionalne.

2.7.1. Klasične metode

Klasične metode za proizvodnju ekstrakta u proizvodnji jakih alkoholnih pića uključuju maceraciju, perkolaciju, infuziju i destilaciju i temelje se na zagrijavanju i/ili miješanju te na sposobnosti ekstrakcije različitim otapalima koji se koriste. Navedene metode imaju određene nedostatke poput dužeg vremena ekstrakcije, zahtjeva za otapalom visoke čistoće, isparavanja velike količine otapala, male selektivnosti ekstrakcije i termičke razgradnje termobilnih spojeva (Luque de Castro i Garcia-Ayuso, 1998).

Maceracija je najstarija i najčešće korištena metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva u industriji alkoholnih pića. Bilje se stavlja u spremnik zajedno s vodom-alkoholnom otopinom pri čemu je potrebno povremeno miješanje kako se poboljšala ekstrakcija i kako bi bilje bilo konstantno u kontaktu s otopinom. Postupak se često provodi u spremnicima s mješalicama i može trajati do nekoliko tjedana, osobito ako se macerira korijenje ili drugi drvenasti dijelovi biljke.

Infuzija je tradicionalna metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva pomoću vruće vode. Vrijeme maceracije za infuzije je kraće od metode maceracije, a nastale infuzije su otopine lako topivih sastojaka biljnog materijala. Nije uobičajeno koristiti ovu tehniku u industriji alkoholnih pića, već se infuzija koristi primjerice kod proizvodnje čaja.

Destilacija je postupak ekstrakcije pri kojem se bilje dodaje u destilacijski kotao uz dodatak vode i/ili alkohola. Postupak započinje zagrijavanjem pri čemu se hlapivi spojevi izdvajaju i prikupljaju u zasebnom spremniku pomoću kondenzatora. Dobiveni destilati sastoje se samo od hlapivih spojeva i imaju ograničenu stabilnost (Tonutti i Liddle, 2010).

Perkolacija je postupak ekstrakcije biljnog materijala temeljeno na difuziji i osmozi. Bilje se postavlja u vertikalni spremnik pri čemu se vodeno-alkoholna otopina dodaje s vrha. Pomoću uređaja perkolatora, otapalo se reciklira s dna ponovno na vrh, što rezultira bržom ekstrakcijom u usporedbi s maceracijom. Najčešće se koristi za ekstrakciju bioaktivnih tvari prilikom pripreme tinkture ili ekstrakta pri čemu se koristi perkolator (Handa, 2008).

2.7.2. Nove ili nekonvencionalne metode

Nove ili nekonvencionalne metode poput ekstrakcije pomoću superkritičnih tekućina ili mikrovalne vakuum hidrodestilacije također se primjenjuju u industriji jakih alkoholnih pića, a nude neke prednosti kao što je manja potrošnja organskih otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i veća selektivnost (Zhang i sur., 2018).

Vakuum mikrovalna hidrodestilacija je proces gdje se ekstrakcija provodi pod smanjenim tlakom pri čemu se istovremeno bilje zagrijava pomoću mikrovalova. Njihov kombinirani učinak omogućuje lakšu ekstrakciju sadržaja iz biljnih stanica. Također se zbog snižene temperature ne uništavaju termolabilni spojevi. Kao i kod destilacije, ekstrakcijom se dobivaju samo hlapivi spojevi.

Ekstrakcija superkritičnim tekućinama je jedna od najnovijih tehnologija ekstrakcije. Superkritične tekućine nastaju zagrijavanjem plinova iznad njihove kritične temperature ili tlačenjem tekućina iznad njihovog kritičnog tlaka, a najkorištenija u industriji je CO₂. Omogućuje proizvodnju „lakših“ ekstrakata sličnim eteričnim uljima (Tonutti i Liddle, 2010).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Biljni materijal – bijela imela

Kao biljni materijal koristile su se sušene i usitnjene grančice i listovi bijele imele (*Viscum album* L.) proizvođača „Travar MB“ iz Bjelovara.

3.1.2. Postupak pripreme macerata

Maceracija biljnog materijala provedena je tako da je odvagana određena masa imele prelivena s 0,5 L vodeno-etanolne baze u bocama s čepom (slika 6). Pri tome su u obzir uzeti sljedeći parametri maceracije: masena koncentracija imele od 20, 40 i 80 g L⁻¹ i volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi od 25 %, 40 %, 55 % i 70% (prikazano u tablici 2). Postupak maceracije provodio se pri sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu te uz povremeno miješanje. Na tjednoj bazi uzorcima određena je koncentracija ukupnih fenolnih spojeva te je kraj maceracije određen na temelju ustaljene koncentracije ovih spojeva. Nakon završetka maceracije biljni materijal je odstranjen filtracijom kroz filter papir, a dobiveni macerati spremljeni su na +4 °C do analiza.



Slika 6. Uzorci macerata imele (vlastita fotografija)

Tablica 2. Parametri maceracije

Uzorak	Koncentracija imele (g L⁻¹)	Udio etanola (vol. %)	Trajanje maceracije (dan)
1	20	25	21
2	40		21
3	80		21
4	20	40	21
5	40		21
6	80		28
7	20	55	21
8	40		28
9	80		28
10	20	70	28
11	40		28
12	80		28

3.1.3. Kemikalije i oprema

- Folin-Ciocalteu reagens – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev hidroksid – Kemika (Zagreb, Hrvatska)
- natrijev karbonat bezvodni – Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda
- etanol 96 vol. % - Kefo (Ljubljana, Slovenija)
- fenoltalein - Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- aluminijev klorid, 10 %-tni - Kemika (Zagreb, Croatia)
- natrijev acetat bezvodni – Gram mol (Zagreb, Hrvatska)
- rutin - Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- galna kiselina - Sigma-Aldrich (Steinheim, Njemačka)
- spektrofotometar (Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer, Thermo Electron Corporation)
- pH metar Schott CG 842 (Mainz, Njemačka)
- refraktometar - Atago, Tokyo, Japan
- laboratorijski sušionik (ST-01/02, INSTRUMENTARIA)
- analitička vaga (OHAUS Adventurer AX224)
- eksikator

3.2. Metode

U dobivenim maceratima imele određeni su sljedeći parametri: od biološki aktivnih spojeva određena je koncentracija ukupnih fenola i flavonoida, a od fizikalno-kemijskih parametara određeni su koncentracija ukupnih kiselina, pH, ukupni ekstrakt, ukupna topiva suha tvar te kromatske karakteristike.

3.2.1. Metode određivanja biološki aktivnih spojeva

3.2.1.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Princip metode

Ukupni sadržaj fenola (TPC) određeni su kolorimetrijskom metodom pomoću Folin - Ciocalteu reagensa tj. smjese fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline (Singleton i Rossi, 1965). U reakciji s fenolnim tvarima dolazi do redukcije fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline u wolframov oksid i molibdenov oksid, pri čemu fenolne tvari oksidiraju i dolazi do pojave plavog obojenja (slika 7). Nakon toga se spektrofotometrijski određuje intenzitet nastalog plavog obojenja na 760 nm.

Uporabom standardnih otopina galne kiseline izrađen je baždarni pravac, iz kojeg se pomoću dobivene jednadžbe izračunala koncentracija ukupnih fenola u svakom uzorku. Rezultat se izražava kao mg L^{-1} ekvivalenta galne kiseline (GAE).



Slika 7. Pojava plavog obojenja kao posljedica oksidacije fenolnih tvari (vlastita fotografija)

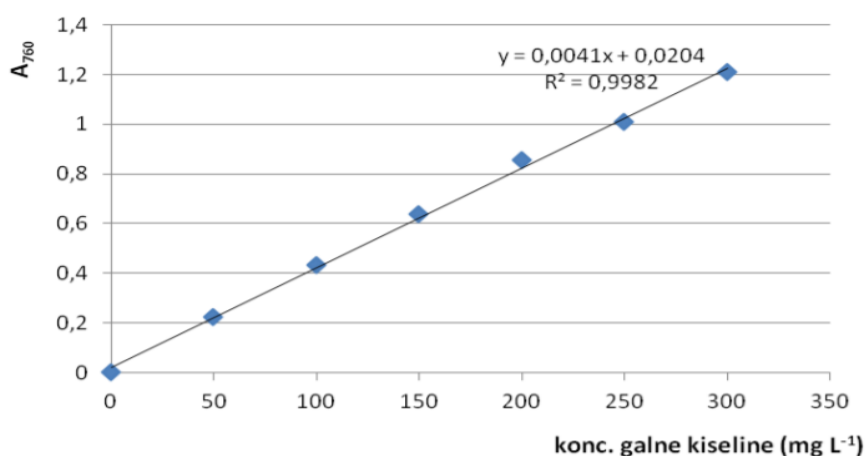
Postupak rada

Uzorci s koncentracijom bilja od 40 g L^{-1} i 80 g L^{-1} razrijeđeni su 5 puta.

U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se $300 \mu\text{L}$ uzorka, $500 \mu\text{L}$ Folin - Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci u tikvici se promiješaju i nakon 5 minuta dodaje se 1,5 mL natrijevog karbonata, nakon čega se tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se stavi na tamno mjesto pri sobnoj temperaturi. Nakon 2 sata spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija na 760 nm na spektrofotometru Helios Gamma UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Electron Corporation). Slijepa proba priprema se na jednak način kao i uzorak, ali se umjesto uzorka stavlja $300 \mu\text{L}$ destilirane vode. Svaki uzorak mjereno je u 3 paralele.

Izrada baždarnog pravca

U odmjernu tikvicu od 50 mL izvaže se 0,5 g galne kiseline i napuni se do oznake destiliranom vodom. Od dobivene otopine rade se standardne otopine od 100, 150, 200, 250 i 300 mg L^{-1} galne kiseline u odmjernim tikvicama od 50 mL. U odmjernu tikvicu od 10 mL od svake pojedinačne koncentracije odpipetirano je po $300 \mu\text{L}$ te $500 \mu\text{L}$ Folin - Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sastojci se promiješaju i nakon 5 minuta se doda 1,5 mL natrijevog karbonata nakon čega se tikvica nadopuni do oznake destiliranom vodom. Odmjerna tikvica se stavi na tamno mjesto, na sobnoj temperaturi te se nakon 2 sata spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 760 nm. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, ali se umjesto uzorka stavlja $300 \mu\text{L}$ destilirane vode.



Slika 8. Baždarni pravac za određivanje ukupnih fenolnih spojeva

Račun

Iz pravca ovisnosti apsorbancije standardnih otopina galne kiseline o njihovoj koncentraciji, dobiven je baždarni pravac (slika 8). Iz baždarne krivulje dobivena je jednadžba pravca pomoću koje se izračunava koncentracija ukupnih fenola u uzorku:

$$y = 0,0041x + 0,0204$$

pri čemu je y apsorbancija pri 760 nm, a x je masena koncentracija ukupnih fenola izraženih u mg L^{-1} . Dobiveni rezultati uzoraka s masenom koncentracijom od 40 i 80 g L^{-1} pomnoženi su s 5 budući da su uzorci razrijeđeni 5 puta.

3.2.1.2. Određivanje ukupnih flavonoida

Princip metode

Ukupni flavonoidi u uzorcima određeni su kolorimetrijskom metodom pomoću aluminijevog klorida (Pečkal i Pyrzyńska, 2014). U prisustvu aluminijevog klorida dolazi do stvaranja kiselih kompleksa s C-4 keto skupinom ili C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavonola (Kalita i sur., 2013). Također je uporabom standardnih otopina rutina izrađen baždarni pravac iz kojeg se, pomoću dobivene jednadžbe, izračunala koncentracija ukupnih flavonoida u svakom uzorku. Rezultat se izražava kao $\mu\text{g mL}^{-1}$ rutina.

Postupak rada

Svi uzorci razrijeđeni su 5 puta. U odmjernu tikvicu od 5 mL odpipetirano je 500 μL razrijeđenog uzorka, 100 μL 10 % aluminijevog klorida, 100 μL natrijevog acetata koncentracije 1 M i 1,5 mL 80 % etanola. Otopina se ostavi 30 minuta u tami nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri 415 nm. Slijepa proba priprema se na jednak način kao i uzorak, ali se umjesto uzorka dodaje 500 μL 20 % etanola.

Izrada baždarnog pravca

U odmjernu tikvicu od 10 mL izvaže se 0,0121 g rutina i napuni se do oznake metanolom. Od navedene otopine pripremljene su standardne otopine rutina od 5, 10, 20, 50 i 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Standardi su pripremljeni na način da se u odmjernu tikvicu odpipetira 500 μL standardne otopine određene koncentracije, 100 μL 10% aluminijevog klorida, 100 μL natrijevog acetata

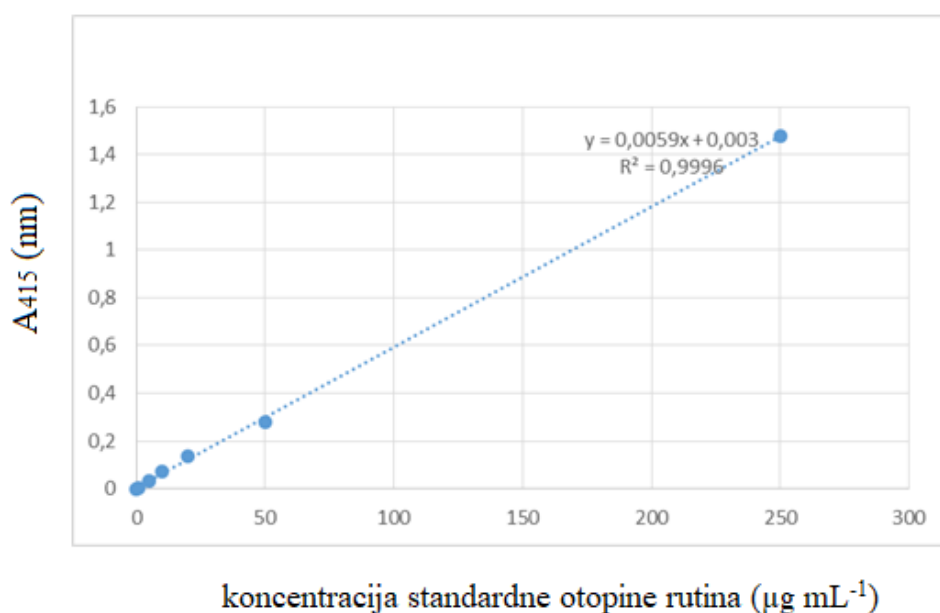
koncentracije 1 M i 1,5 mL 80 % etanola. Otopina se ostavi 30 minuta u tami nakon čega slijedi mjerenje apsorbancije pri 415 nm.

Račun

Iz pravca ovisnosti apsorbancije standardnih otopina rutina o njihovoj koncentraciji, dobiven je baždarni pravac (slika 9). Iz baždarnog pravca dobivena je jednadžba pravca pomoću koje se izračunava koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku:

$$y = 0,0059x + 0,003$$

y označava apsorbanciju pri 415 nm, a x je masena koncentracija ukupnih flavonoida izraženih u $\mu\text{g mL}^{-1}$. Budući da su uzorci razrjeđeni 5 puta, dobiveni rezultat potrebno je pomnožiti s 5.



Slika 9. Baždarni pravac za određivanje ukupnih flavonoida

3.2.2. Metode određivanja fizikalno-kemijskih parametara kvalitete macerata

3.2.2.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednosti uzoraka macerata *biske* mjereni su pomoću pH metra Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) uranjanjem elektrode u uzorak. Prije početka provedbe analize, elektroda pH metra kalibrirana je amonijačnim puferom pH=4. Izmjerene su i vrijednosti vodeno-etanolnih otopina

koje su korištene kao baza za maceraciju, budući da i stopostotni etanol sadrži određenu količinu kiselina ($1,5 \text{ g hL}^{-1}$ apsolutnog alkohola) (EC 110/2008).

3.2.2.2. *Određivanje ukupnih kiselina*

Princip metode

Ukupne kiseline određene su titracijskom metodom pomoću natrijevog hidroksida, pri čemu se sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove soli neutraliziraju. Njihovom neutralizacijom dolazi do promjene boje što se očituje dodatkom indikatora fenolftaleina.

Postupak rada

U 5 mL uzorka dodano je 3-4 kapi indikatora fenolftaleina nakon čega je uzorak titriran s natrijevim hidroksidom koncentracije 0,1 M do promjene boje u ružičasto.

Utrošena količina lužine potrebna je za izračun ukupne koncentracije kiselina:

$$\text{ukupne kiseline (mg CH}_3\text{ COOH L}^{-1}\text{ pića)} = f \cdot 6 \cdot V \cdot 100 \cdot V_{\text{uzorka}}^{-1}$$

f – faktor razrjeđenja

V – volumen NaOH utrošen za titraciju (mL)

V_{uzorka} – volumen uzorka korištenog za titraciju (mL)

3.2.3. **Određivanje ukupnog ekstrakta**

Ukupni ekstrakt jakog alkoholnog pića čini ukupna količina tvari koja ne isparava pri određenim uvjetima. Sadržaj ekstrakta čine minerali i organska tvar, a isparavanjem se gube voda i hlapive tvari. Određen je pomoću metode uparavanja. U prethodno ohlađenu i izvaganu posudicu dodano je 5 mL termostatiranog macerata imele, koji se zatim suši u sušioniku pri $105 \text{ }^\circ\text{C}$ do konstantne mase. Nakon završenog sušenja uzorak se prenese u eksikator, a nakon hlađenja slijedi vaganje posude (Lučić, 1987). Ukupni ekstrakt računa se pomoću sljedeće formule:

$$\text{ukupni ekstrakt (g L}^{-1}\text{)} = (M_1 - M_0) \cdot 1000 \cdot V_{\text{uzorka}}^{-1}$$

M_1 – masa posudice nakon sušenja (g)

M_0 – masa posudice prije sušenja (g)

3.2.4. Određivanje topljive suhe tvari

Princip metode

Topljivu suhu tvar biljke čine jednostavni šećeri, organske kiseline, soli i aminokiseline. Sadržaj ukupne topljive suhe tvari određen je pomoću digitalnog refraktometra (Atago, Tokyo, Japan). Princip određivanja odvija se postupkom refraktometrije temeljen na fizikalnom zakonu loma svjetlosti. Svjetlosna zraka se, prilikom prijelaza iz jednog medija u drugi, lomi pod određenim kutem. Taj kut koji mjeri refraktometar, naziva se indeks loma i izražava se u °Brix. Dobivena vrijednost na refraktometru je kut pod kojim se svjetlost lomi i uspoređuje se sa vrijednošću saharoze (100 °Brix). 1 stupanj Brix-a odgovara 1 gramu šećera na 100 grama otopine (Zavadlav, 2015).

Postupak rada

Refraktometar je potrebno izbaždriti pomoću destilirane vode na 20 °C, pri čemu očitana vrijednost destilirane vode mora iznositi 0,0 °Brix. Nakon baždarenja nanoseni su uzorci macerata imele gdje se vrijednost očitava direktno s uređaja. Izmjerene su i vrijednosti vodenotanolnih otopina koje su korištene kao baza za maceraciju, budući da etanol također zakreće kut svjetlosti.

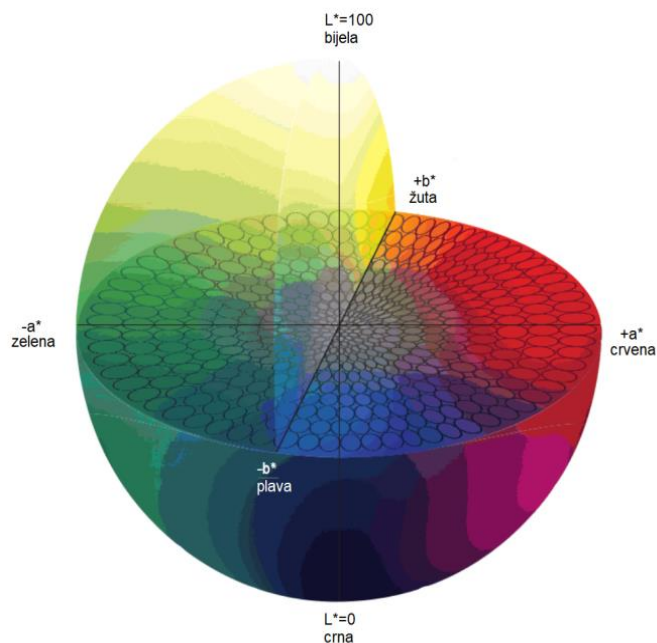
3.2.5. Određivanje kromatskih parametara

Princip metode

Kromatski parametri dobivenih macerata određeni su spektrofotometrijskom metodom pomoću CIElab sustava. Boja vina ili drugog pića može se opisati pomoću 3 specifičnih faktora: tonalitet, svjetlina i kromatičnost (slika 10).

Tonalitet tj. sama boja je najkarakterističnija osobina: crvena, žuta, zelena ili plava. Svjetlina je faktor kojim se čini se da je vino ili drugo piće više ili manje blistavo, a kromatičnost ili razina obojenja povezana je s većim ili manjim intenzitetom boje.

Kombinacija ove tri osobine nam omogućava definiranje višestrukih nijansi boje koje vina ili druga pića predstavljaju (OIV, 2006).



Slika 10. CIE Lab prostora boja (Anonymus 5)

Postupak rada

Kromatski parametri dobivenih macerata mjereni su pomoću spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Germany) sa izvorom svjetlosti D65. Mjerene su vrijednosti transmitancije tj. propusnosti svakih 10 nm na području valnih duljina od 380 do 780 nm. U tablici 3 prikazani su kromatski parametri koji su određeni na temelju dobivenih vrijednosti i njihovo značenje. Parametri *C* i *h* određuju ton boje (OIV, 2006).

Tablica 3. Kromatski parametri i prikaz rezultata na temelju dobivenih vrijednosti

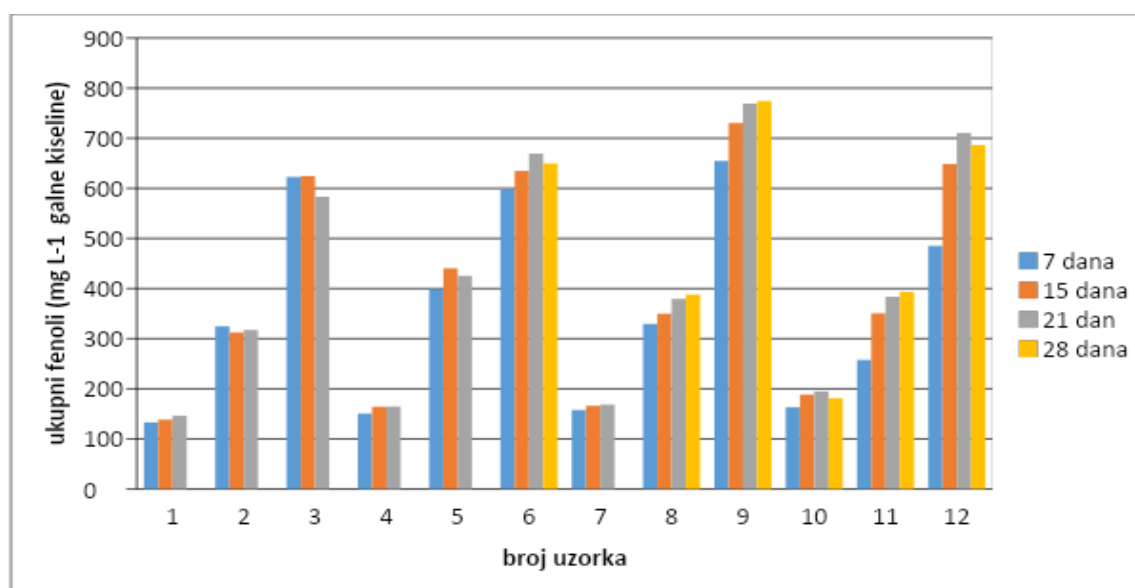
Naziv kromatskog parametra	Oznaka	Interval i značenje
Svjetlina	<i>L</i>	0 – 100; 0 – crno, 100 – prozirno
Komponenta crvene/zelene boje	<i>a</i>	Nema intervala >0 crvena boja, <0 zelena boja
Komponenta žute/plave boje	<i>b</i>	Nema intervala >0 žuta boja, <0 plava boja
Zasićenje boje	<i>C</i>	
Kut boje	<i>h</i>	0 – 360°

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu istraženi su optimalni parametri maceracije imele u vodeno-etanolnoj otopini s ciljem proizvodnje *biske*. Za istraživanje je pripremljeno 12 uzoraka macerata imele, pri čemu se uzorci razlikuju na temelju različitog volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi (25, 40, 55 i 70 % vol. etanola) i koncentracije imele (20, 40 i 80 g L⁻¹). Dobivenim maceratima određeni su ukupni fenolni spojevi i flavonoidi, pH vrijednost, ukupne kiseline, ukupna topljiva suha tvar, ukupni ekstrakt i kromatske karakteristike.

4.1. Određivanje ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva određen je kolorimetrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa. U tablici 4 vidljiv je prikaz dobivenih uzoraka macerata imele. Prosječne vrijednosti koncentracija ukupnih fenola i njihova razlika tijekom 4 tjedna maceracije prikazani su na slici 11.



Slika 11. Koncentracija ukupnih fenola u uzorcima tijekom 4 tjedna maceracije

Tablica 4. Parametri maceracije uzoraka

Uzorak	Koncentracija imele (g L ⁻¹)	Udio etanola (vol. %)
1	20	25
2	40	
3	80	
4	20	40
5	40	
6	80	
7	20	55
8	40	
9	80	
10	20	70
11	40	
12	80	

Dobiveni rezultati potvrđuju da tijekom maceracije dolazi do ekstrakcije polifenola iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu pritom ju obogaćujući (Mrvčić i sur., 2012). Koncentracije ukupnih fenola značajno se razlikuju u uzorcima i kreću se u rasponu od 133,15 i 774,31 mg L⁻¹ GAE. Prema Vicas i sur. (2012), identificirano je 12 fenolnih kiselina u imeli - galna, kava-, kumarinska, salicilna, klorogenska, ferulinska, trans-cimetna, siriginska, protokatehinska, klorogena i sinapinska kiselina.

Na koncentraciju fenola utječu koncentracija bilja, vrijeme maceracije i koncentracija etanola u vodeno-alkoholnoj bazi.

Količina dodanog bilja utječe na količinu sastojaka koji se ekstrahiraju u vodeno-alkoholnu bazu, zbog čega uzorci s 20 g L⁻¹ imele (1, 4, 7 i 10) pokazuju niže, a uzorci s 80 g L⁻¹ više koncentracije ukupnih fenola – rastom koncentracije bilja u vodeno-alkoholnoj bazi raste i koncentracija ukupnih fenola.

Vrijeme maceracije također utječe na koncentraciju fenola. Kod uzoraka s niskom koncentracijom bilja (20 g L⁻¹), koncentracija fenola ustaljuje se već nakon prvog tjedna maceracije. Kod uzoraka s većom koncentracijom bilja i većim udjelom etanola u vodeno-alkoholnoj otopini (40, 55 i 70 % vol.) vrijeme maceracije je dulje te je uočen značajan i

konstantan porast koncentracije fenola tijekom prva dva tjedna maceracije. Nakon trećeg tjedna kod većine uzoraka dolazi do ustaljenja ili čak pada ukupne koncentracije fenola (uzorci 3 i 5). Uzorci kod kojih je nakon trećeg tjedna zamijećen daljnji konstantan porast, macerirani su tjedan dana dulje, međutim i kod njih je došlo do ustaljenja ili do pada koncentracije fenola.

Polifenoli se iz biljnog materijala, kao i svi ostali spojevi, brže ekstrahiraju na početku maceracije zbog velike razlike u koncentraciji polifenola u biljnom materijalu u odnosu na onu u vodeno-alkoholnoj bazi. Difuzijom polifenola iz biljnog materijala u vodeno-alkoholnu bazu, njihova koncentracija se u otopini s vremenom povećava, čime raste i viskoznost ekstrakcijskog medija što uzrokuje smanjenje brzine difuzije (Jovanović i sur., 2017). Nakon određenog vremena maceracije dolazi do postizanja ravnoteže u koncentraciji polifenola unutar i izvan biljnog materijala čime ekstrakcija prestaje (Zhang i sur., 2018). Nadalje, Rodríguez-Solana i sur. (2016b) proveli su istraživanje optimizacije parametara maceracije cvijeta kamilice (*Matricaria recutita* L.), sjemenki korijandera (*Coriandrum sativum* L.), korijena sladića (*Glycyrrhiza Glabra* L.) i listova eukaliptusa (*Eucalyptus globulus* Labill) u vodeno-etanolnoj bazi sa 70 % vol. etanola i 40 g L⁻¹ bilja. Ispitane su kromatske karakteristike, koncentracija glavnih hlapivih spojeva za pojedini macerat i ocjene potrošača. Senica i Mikulic-Petkovsek (2019) provele su slično istraživanje gdje je cilj bio ekstrahirati maksimalnu moguću količinu ukupnih fenola iz 8 različitih biljaka maceracijom u 40 % vol. etanola. Koristili su se listovi pelina, limuna, paprene metvice, rute i kadulje, vrhovi cvijeta kičice, žuto-zeleni cvjetovi komorača i sjeme kumina. Uzorci su uzimani nakon svakog tjedna. Oba istraživanja pokazala su da su vrijednosti svih navedenih parametara najveće završetkom trećeg tjedna maceracije, zbog čega smatraju da je tri tjedna maceracije optimum za navedene biljke u vodeno-etanolnoj otopini. Ključnu ulogu u ekstrakciji fenolnih tvari ima polarnost otapala – do najbolje ekstrakcije fenolnih spojeva doći će u otapalima koja su manje polarna nego voda (Haminiuk i sur., 2012). Zanimljivo je da je u uzorcima s 40 g L⁻¹ imele najveća koncentracija fenola izmjerena pri 40 % vol. etanola (uzorak 5). Kod macerata s jednakom koncentracijom bilja i većom koncentracijom etanola došlo je bolje ekstrakcije fenola. Navedeno se može objasniti boljom topivosti fenolnih spojeva u etanolu nego u vodi.

Međutim, najveće koncentracije fenola među svim uzorcima izmjerene su pri 55 % vol. etanola i količini bilja od 80 g L⁻¹, u periodu od četiri tjedna. Takav rezultat može se objasniti maceracijom velike količine bilja (80 g L⁻¹), ali i činjenicom da je omjer koncentracije etanola i vode u omjeru 1:1 najučinkovitiji za ekstrakciju fenolnih spojeva prisutnih u imeli.

Jednak omjer vode i etanola poboljšava ekstrakciju tvari koji imaju manju polarnost od vode, a veću od etanola – upravo su fenolni spojevi iz imele takve polarnosti zbog čega se najbolje

ekstrahiraju vodeno-alkoholnu bazu pri 55 % vol. etanola. Stanciu i sur. (2019) proveli su maceraciju 5 grama lavande (*Lavandula angustifolia* L.) u dvije različite hidro-alkoholne baze – prva baza bila je 60 mL metanola, a druga 60 mL vode i metanola u omjeru 1:1.

U maceratima su bile prisutne visoke koncentracije ukupnih fenola, pri čemu je primijećeno da je hidro-metanolni macerat (50 % metanola) bio bogatiji fenolnim spojevima poput galne, elaginske, klorogene i cimetine kiseline od metanolne baze. Hanousek Čiča i sur. (2020) istražili su utjecaj parametara maceracije na fizikalno-kemijske i kromatske karakteristike macerata rogača (*Ceratonia siliqua* L.) – rogač je maceriran u vodeno-alkoholnim bazama s 30, 50 i 70 % vol. etanola, pri sobnoj temperaturi, na suncu i tami, s različitim koncentracijama bilja (omjer rogača i vodeno-etanolne baze 1:5 i 1:10). Maceracija rogača u tami pri 50 % vol. etanola pokazala je najveće koncentracije ukupnih fenola u maceratima. Oba istraživanja potvrđuju da je vodeno-alkoholna baza s 50 % vol. etanola najučinkovitija za ekstrakciju fenolnih spojeva iz različitog bilja, a prema dobivenim rezultatima navedeno vrijedi i za imelu pri 55 % vol. etanola.

4.2. Koncentracija flavonoida

Ukupna koncentracija flavonoida određena je kolorimetrijskom metodom pomoću aluminijevog klorida (Pečkal i Pyrzynska, 2014). Tijekom istraživanja izrađena je baždarna krivulja pomoću standardnih otopina rutina, a iz baždarne krivulje dobivena je jednadžba pravca pomoću koje je izračunata koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku. Koncentracija ukupnih flavonoida određena je u dobivenim konačnim maceratima.

Na temelju izračunate pozitivne korelacije između ukupne koncentracije fenola (TPC) i ukupne koncentracije flavonoida (TFC) koja iznosi 0,8981 može se uočiti da su flavonoidi dominantna fenolna skupina u imeli. Na slične rezultate ukazuju i Do i sur. (2014) za macerat biljke *Limnophila aromatica*.

Tablica 5. Koncentracija flavonoida u uzorcima macerata imele

Uzorak	Koncentracija flavonoida ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	3,59 \pm 5,93
2	90,96 \pm 3,42
3	201,13 \pm 3,42
4	54,52 \pm 3,53
5	156,50 \pm 3,21
6	253,11 \pm 2,98
7	75,42 \pm 0,85
8	155,93 \pm 1,47
9	332,49 \pm 1,76
10	136,44 \pm 1,47
11	217,23 \pm 4,35
12	425,99 \pm 10,60

Rezultati u tablici 5 pokazuju da koncentracije flavonoida u maceratima variraju između 35,59 i 425,98 $\mu\text{g rutina mL}^{-1}$. Najniža koncentracija flavonoida izmjerena je u uzorku 1, a najviša u uzorku 12 – jednako kao i kod fenola, koncentracija flavonoida raste povećanjem koncentracije bilja.

Također, porastom koncentracije etanola u vodeno-alkoholnoj bazi dolazi do rasta ukupnih flavonoida u maceratu. Prema Sun i sur. (2015), pri nižim koncentracijama etanola poput 25 % vol., dolazi do ekstrakcije polarnih tvari iz bilja zbog povećanog udjela vode, a povećanjem koncentracije etanola smanjuje se polarnost otapala čime se pospješuje ekstrakcija manje

polarnih tvari. Većina flavonoida iz imele poput kampferola, kvercetina, rutina, sakuranetina, homoeriodiktiola, naringenina, viskolina, ramnazina i izoramnetina (Urech i Baumgartner, 2015) slabo su polarni i slabo su topljivi u vodi. Povećanjem koncentracije etanola u otopini poboljšava se njihova ekstrakcija zbog čega raste koncentracija ukupnih flavonoida, zbog čega uzorci sa 70 vol. % etanola imaju najveće vrijednosti. Takve rezultate potvrđuju i Cosmulescu i sur. (2014), gdje najveću koncentraciju ukupnih flavonoida u orahovom likeriu imaju macerati sa 70 % vol. etanola. Isti autori navode da se koncentracija flavonoida može dodatno povećati dodatkom šećera i meda u macerate. U većini receptura za pripremu *biske* dodaje se med, čime se ona dodatno obogaćuje flavonoidima i poboljšavaju joj se funkcionalna svojstva (Rupert, 2017).

Količina i sastav polifenola u imeli se uvelike razlikuje po podvrstama imele i biljci domaćinu na kojem parazitira i o vremenu berbe. Prema Vicas i sur. (2011), kvantitativnom HPLC analizom etanolnih (50 % vol.) i vodenih ekstrakata listova i stabljike imele s 5 različitih stabala (javor klen, jabuka, bijeli jasen, crna topola i akacija) izolirana su 4 polifenola: naringenin, kamferol, kvercetin i ružmarinska kiselina. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara macerata imele pokazuju da je u svim ekstraktima koncentracija biološki aktivnih komponenata veća u listovima nego u stabljici imele.

4.3. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara macerata imele

pH vrijednost

pH vrijednosti macerata imele mjerene su pomoću pH metra uranjanjem pH elektrode u uzorak. Izmjerene su i vrijednosti vodeno-etanolnih otopina koje su korištene kao baza za maceraciju kako bi se mogao provjeriti utjecaj ekstrahiranih spojeva imele na pH dobivenih macerata (tablica 7).

Rezultati pokazuju da pH vrijednost macerata imele varira između 5,5 do 6,25 (tablica 6), pri čemu je najmanja pH vrijednost izmjerena u uzorku 1, a najveća u uzorku 11. Može se uočiti da povećanje koncentracije imele utječe na promjenu pH macerata.

Međutim, pH vodeno-alkoholnih otopina znatno se razlikuje u odnosu na macerate, pri čemu veći udio etanola vodi prema neutralnom, a veći udio vode prema kiselom mediju – sastav vodeno-alkoholne baze znatno više utječe na razlike u pH vrijednosti macerata u odnosu na koncentraciju bilja.

Zanimljivo je da dodatak bilja u vodeno-alkoholne baze nižih koncentracija etanola (25 % i 40 % vol.) povećava pH vrijednost dok se dodatkom bilja u vodeno-alkoholne baze viših koncentracija etanola (55 % i 70 %) pH smanjuje. Navedeno ukazuje na činjenicu da medij za maceraciju znatno utječe na vrstu i količinu spojeva koji će se ekstrahirati. Jovanović i sur. (2017) smatraju da je najprikladnije otapalo za ekstrakciju fenola mješavina otapala različitih polarnosti, jer se pospješuje ekstrakcija spojeva različitih polarnosti u biljnom materijalu. Vodeni ekstrakti imaju veće količine polarnih spojeva, dok organska otapala imaju veći udio manje polarnih spojeva – vrijedi pravilo da se „slično otapa u sličnome“. Dobiveni rezultati pokazuju da imela sadrži različite spojeve (i bazne i kisele) koji se tijekom maceracije ekstrahiraju u vodeno-alkoholne baze pa se isto tako mogu očekivati različite funkcionalne i fizikalno-kemijske karakteristike dobivenih macerata.

Tablica 6. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara macerata imele

Uzorak	pH	Ukupna kiselost (mg L ⁻¹)	Topljiva suha tvar (°Brix)	Ukupni suhi ekstrakt (g L ⁻¹)
1	5,50	600 ± 12,00	10,40±0,00	4,64
2	5,57	840± 12,00	10,63±0,06	9,68
3	5,57	1800±0,00	11,93±0,06	19,16
4	5,80	480±24,00	15,30±0,00	4,68
5	5,85	1200±24,00	15,73±0,06	11,88
6	5,92	1920±18,33	16,37±0,06	18,80
7	6,02	720±0,00	18,63±0,06	4,54
8	6,05	1200±24,00	18,80±0,00	8,88
9	5,98	2160±12,00	19,80±0,00	17,98
10	6,24	960±12,00	20,50±0,00	5,26
11	6,25	1440±12,00	20,87±0,06	9,04
12	6,20	2880±68,39	21,60±0,00	15,68

Tablica 7. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara vodeno-etanolnih otopina korištenih kao baza maceracije

Koncentracija etanola	pH	Topljiva suha tvar (°Brix)
25 %	4,93±0,01	7,90±0,01
40 %	5,60±0,01	11,80±0,01
55 %	6,55±0,01	17,20±0,01
70 %	7,34±0,01	19,60±0,01

Ukupne kiseline

Ukupne kiseline uzoraka određene su metodom neutralizacije titracijom s natrijevim hidroksidom uz dodatak indikatora fenolftaleina.

Koncentracije kiselina u uzorcima nalaze se u rasponu između 480 i 2880 mg L⁻¹ (tablica 6), pri čemu uzorak 4 pokazuje najnižu, a uzorak 12 najvišu vrijednost. Povećanjem količine bilja povećava se i ukupna kiselost macerata.

Porast ukupne kiselosti macerata dodatkom bilja pokazuje ekstrakciju kiselina iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu. Pri nižim koncentracijama etanola (25 % vol.) dolazi do ekstrakcije polarnih spojeva zbog prevladavajućeg polarnog karaktera vode. Međutim, povećanjem koncentracije etanola u maceratima, mijenja se polarnost otapala i omogućuje se ekstrakcija manje polarnih spojeva koje povećavaju koncentraciju ukupnih kiselina (Senica i Mikulic-Petkovsek, 2019).

Imela u listovima i stabljici sadrži triterpenske kiseline poput oleanolinske, betulinske i ursolne kiseline (Soursouri i sur., 2019) te je vrlo bogata zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama – od zasićenih kiselina sadrži palmitinsku, arahidonsku, lignoceričnu, behensku i cerotsku kiselinu, a od nezasićenih već navedenu oleinsku, linolnu i linolensku (Singh i sur., 2016).

Ekstrakcijom navedenih kiselina iz imele u vodeno-alkoholnu bazu, dolazi do njihove reakcije s etanolom čime nastaju etilni esteri srednjih i dugolančanih masnih kiselina - glavni spojevi nosioci arome *biske*. Odgovorni su za voćnu i cvijetnu aromu rakije biske i pozitivno utječu na konačnu aromu proizvoda (Hanousek Čiča i sur., 2018).

Ukupna topljiva suha tvar

Sadržaj ukupne topljive suhe tvari određen je pomoću digitalnog refraktometra (Atago, Tokyo, Japan). Topljivu suhu tvar biljke čine jednostavni šećeri poput monosaharida, disaharida i oligosaharida, organske kiseline, soli i aminokiseline (Zavadlav, 2015).

Vrijednosti topljive suhe tvari macerata variraju od 10,4 do 21,6 °Brix (tablica 6).

Porast ukupne topljive suhe tvari upućuje na difuziju jednostavnih šećera, organskih kiselina i aminokiselina iz imele u vodeno-alkoholnu bazu. Što je veći udio dodanog bilja, veća je i ukupna topljiva suha tvar macerata.

Međutim, vodeno-alkoholna baza, zbog prisutnog etanola, pridonosi očitanim vrijednostima suhe tvari (tablica 6). Stoga je za ispravno tumačenje rezultata potrebno izračunati razliku izmjerene suhe tvari za uzorak i pripadajuću bazu. Sastav vodeno-alkoholnih baza ima značajniji utjecaj na razlike u vrijednostima topljive suhe tvari nego količina dodanog bilja. Prema Nowakowska

(1939), mjerenjem indeksa loma vodeno-alkoholnih otopina uočeno je povećanje indeksa loma otopine povećanjem koncentracije etanola (do 80 % vol. etanola).

Nadalje, uočeno je da je pri nižim koncentracijama etanola (25 i 40 % vol.) značajnija razlika između vrijednosti macerata i vodeno-etanolnih otopina u odnosu na vrijednosti pri višim koncentracijama etanola. Takvi rezultati dokazuju da se jednostavni šećeri poput glukoze, fruktoze i saharoze prisutne u imeli bolje ekstrahiraju pri nižim koncentracijama etanola nego pri višima.

Ukupni ekstrakt

Sadržaj ukupnog ekstrakta predstavljaju šećeri, minerali i druga organska tvar dobivena isparavanjem vode i hlapivih tvari, koristeći vodenu kupelj i sušenje, a izražava se u g L⁻¹ otopine. Jednako kao i za druge parametre, povećanjem količine bilja povećava se količina ekstrahiranih tvari u maceratu, uključujući i šećere, minerale i druge organske tvari, zbog čega macerati s većom količinom bilja imaju i veću količinu ukupnog ekstrakta. Prema rezultatima u tablici 6 vidljivo je da je najveća količina ukupnog ekstrakta dobivena za macerat s 25 % vol. etanola, a povećanjem koncentracije etanola količina ukupnog ekstrakta se smanjuje. Jednake rezultate potvrđuju i Pham i sur. (2015), gdje su različita otapala korištena za dobivanje ukupnog ekstrakta pri čemu je voda bila najprikladnije otapalo, a ekstrakcija etanolnim otopinama ispostavila se manje efektivnom. Prema Snoussi i sur. (2012), najveće vrijednosti ukupnog ekstrakta izmjerene su u maceratima s nižom koncentracijom etanola.

Imela sadrži značajne količine glukoze, fruktoze i saharoze pri čemu dominira saharoza. Od polisaharida sadrži pektin, visoko metilirani homogalakturonan, arabinogalaktan i α -1,4-metil ester galakturonske kiseline (Escher i sur., 2004, Singh i sur., 2016).

Pad ukupnog ekstrakta povećanjem etanola može se objasniti smanjenjem topljivosti glukoze, fruktoze i saharoze u otopini s povećanjem koncentracije etanola (Alves i sur., 2007; Crestani i sur., 2013; Galvao i sur., 2013) – šećeri s pet odnosno šest hidroksilnih skupina stvaraju veći broj vodikovih veza s vodom nego s etanolom. Povećanjem udjela etanola smanjuje se broj vodikovih veza u otapalu čime se smanjuje topljivost.

4.4. Kromatske karakteristike

Kromatske karakteristike dobivenih macerata imele mjerene su spektrofotometrijski. Parametri koji su određeni su:

- svjetlina (L) koja ima interval od 0 (crno) do 100 (prozirno)
- kromatske koordinate a i b gdje vrijednosti variraju od $-a$ (zelena boja) do $+a$ (crvena boja), odnosno od $-b$ (plava boja) do $+b$ (žuta boja)
- parametar C koji označava ton boje
- kut nagiba (h) koji definira crveno-ljubičastu (0°), žutu (90°), plavo-zelenu (180°) i plavu boju (270°)

Dobivene vrijednosti transmitancije macerata imele prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Kromatski parametri dobivenih macerat imele

uzorak	L	a	B	C	h
1	81,95±0,01	9,31±0,01	66,33±0,02	66,98±0,02	82,01±0,01
2	66,05±0,01	25,72±0,01	85,77±0,05	89,54±0,05	73,30±0,01
3	42,70±0,05	37,88±0,05	72,12±0,16	81,46±0,16	62,29±0,05
4	82,01±0,00	6,54±0,02	67,15±0,01	67,47±0,01	84,44±0,01
5	60,10±0,01	29,50±0,02	88,51±0,08	93,30±0,08	71,56±0,01
6	45,00±0,01	37,86±0,01	76,00±0,01	84,90±0,01	63,52±0,01
7	77,21±0,00	2,58±0,00	65,63±0,02	65,68±0,02	87,75±0,00
8	63,94±0,01	14,43±0,02	78,65±0,01	79,97±0,01	79,60±0,02
9	48,81±0,01	25,03±0,01	78,87±0,08	82,75±0,07	72,39±0,02
10	67,52±0,01	1,48±0,01	60,28±0,03	60,30±0,03	88,60±0,00
11	56,08±0,01	8,86±0,02	66,99±0,02	67,58±0,02	82,47±0,02
12	36,86±0,06	13,90±0,06	58,80±0,13	60,42±0,11	76,70±0,08

Svi dobiveni macerati su obojeni, međutim razlikuju se prema kromatskim karakteristikama i obojenosti (slika 12).

Vrijednosti parametra L (svjetlina) nalaze se u rasponu između 36,86 i 82,01. Uzorci pripremljeni s manjom koncentracijom bilja (1, 4, 7 i 10) i manjom koncentracijom etanola pokazuju najveću svjetlinu. Povećanjem koncentracije etanola i količine bilja u maceratima, vrijednosti svjetline opadaju.

Pri manjim količinama bilja dolazi do ekstrakcije manje količine tvari koje mogu utjecati na obojenje i svjetlinu. Porastom količine bilja i udjela etanola u vodeno-alkoholnoj bazi pospješuje se ekstrakcija različitih pigmenata i tvari poput fenola, minerala i kiselina iz bilja u vodeno-

alkoholnu bazu, čime vrijednosti svjetline padaju i macerati postaju tamniji i zamućeniji (Gironés-Vilaplana i sur., 2015).

Nadalje, svi macerati imele imaju pozitivne a i b vrijednosti, što znači da su uzorci crvenih i žutih nijansi. Vrijednosti navedenih kromatskih komponenti nalaze se u širokom rasponu - komponenta a ima raspon od 1,47 do 37,88, dok komponenta b ima raspon od 58,80 do 88,51.

Vrijednosti za komponentu a najveće su u uzorcima s velikom koncentracijom bilja (80 g L^{-1}) i niskom alkoholnom jakosti. Komponenta b ima najveće vrijednosti u uzorcima s koncentracijom bilja od 40 g L^{-1} , pri čemu je najveća vrijednost među njima ona pri alkoholnoj jakosti od 40 % vol. Vrijednosti b komponente puno su veće u odnosu na komponentu a , što znači da žute nijanse prevladavaju u uzorcima. Vrlo slične rezultate pokazuju i Hanousek Čiča i sur. (2018) za macerate rogača, gdje većina uzoraka pokazuje prevladavanje žutih nijansi u odnosu na crvene.



Slika 12. Različita obojenja konačnih macerata ime

Vrijednosti parametra C (ton boje, zasićenost) slične su onima za parametar b , između 60,30 do 93,30. Jednako kao i za parametar b , najveće vrijednosti imaju uzorci s koncentracijom bilja od 40 g L^{-1} , gdje najveću vrijednost među njima pokazuje uzorak s 40 % vol. etanola. Povećanjem vrijednosti parametra C udio čistoće u boji vizualno je veći.

Nadalje, kut nagiba (h) ima vrijednosti između 62,29 i 88,60. Uzorci s najmanjom koncentracijom bilja imaju najveće vrijednosti te su one najbliže 90° , zbog čega imaju boju macerata žutih nijansi različitih svjetlina (slika 12). Povećanjem udjela etanola u vodeno-alkoholnoj bazi raste i kut nagiba, zbog čega uzorak 12 ima najveću vrijednost za parametar h .

Povećanjem koncentracije bilja u maceratu, parametar h se smanjuje čime se boje macerata približavaju crveno-ljubičastom spektru, iako sadrže i nijanse žute boje. Svi uzorci sadrže vrijednosti ispod 90° , što označava da se nalaze na crveno-ljubičastom i žutom spektru boja.

Na sve navedene parametre utječu koncentracija bilja i alkoholna jakost vodeno-alkoholne baze (Hanousek Čiča i sur., 2020). Također na njih utječe i vrijeme maceracije budući da se tim načinom utječe na količinu sastojaka koji ulaze u sastav macerata, a osobito na pigmente (Mujić, 2010).

Mjerenje kromatskih karakteristika macerata, tj. jakog alkoholnog pića važna je jer ima psihološki utjecaj na potrošačev um pri čemu je cilj privući kupca. Također je i indikator kvalitete. Faktori poput metode sušenja, vremena maceracije, koncentracije etanola u vodeno-etanolnoj bazi (ili rakiji), enzimatskog i neenzimatskog posmeđivanja utječu na konačno obojenje macerata, pa tako i proizvoda. Ukoliko se bilje suši na suncu, listovi i ostali dijelovi biljke poprimaju smeđu boju. Produljenjem vremena maceracije dolaze do veće ekstrakcije pigmentata (npr. klorofila) iz biljke u vodeno-alkoholnu bazu. Degradacijom navedenih pigmentata dolazi do neenzimskog posmeđivanja i promjene boje macerata. Također, tamnija boja macerata može biti objašnjena prisutnošću enzima polifenol-oksidaza u biljci, koji uzrokuje tvorbu melanina i benzokvinona iz fenola što rezultira smeđim obojenjem.

5. ZAKLJUČCI

1. Izmjerene koncentracije ukupnih fenola u maceratima imele značajno se razlikuju u uzorcima. Najveća koncentracija fenola izmjerena je pri 55 % vol. etanola i količini bilja od 80 g L⁻¹, što dokazuje da je za ekstrakciju fenolnih spojeva iz imele najučinkovitija vodeno-alkoholna baza s 55 % vol. etanola. Veliku ulogu za ekstrakciju fenolnih tvari također ima vrijeme maceracije. Ovisno o koncentraciji bilja u vodeno-alkoholnoj bazi, maksimalna koncentracija fenola pri nižim koncentracijama bilja (20 g L⁻¹) postignuta je nakon tjedan dana, dok je pri višim koncentracijama bilja potrebno tri tjedna za dobivanje maksimalne koncentracije fenolnih spojeva.
2. Najniža koncentracija flavonoida izmjerena je u uzorku 1 (35,59 μg rutina mL⁻¹), a najviša u uzorku 12 (425,98 μg rutina mL⁻¹). Većina flavonoida iz imele slabo su polarni i slabo su topljivi u vodi zbog čega se njihova ekstrakcija pospješuje povećanjem etanola u vodeno-alkoholnoj bazi. Korelacija od 0,8981 između ukupnih fenola i ukupnih flavonoida dokazuje da su flavonoidi dominantna fenolna skupina u imeli.
3. Mjerenjem pH vrijednosti uočeno je da medij za maceraciju znatno utječe na vrstu i količinu spojeva koji će se ekstrahirati iz određene biljke. pH vrijednost macerata imele varira između 5,5 do 6,25. Osim samo imele razlikama u pH vrijednosti macerata pridonose i razlike u pH vrijednosti samog medija za maceraciju.
4. Koncentracije kiselina u uzorcima nalaze se u rasponu između 480 i 2880 mg L⁻¹, pri čemu uzorak 4 pokazuje najnižu, a uzorak 12 najvišu vrijednost. Povećanjem količine bilja i udjela etanola u vodeno-alkoholnoj bazi povećava se i ukupna kiselost macerata.
5. Rezultati mjerenja ukupnog ekstrakta dokazuju da se jednostavni šećeri poput glukoze, fruktoze i saharoze prisutne u imeli bolje ekstrahiraju pri nižim koncentracijama etanola (25 i 40 %) nego pri višim koncentracijama.
6. Vrlo je važno mjeriti kromatske karakteristike macerata tj. jakog alkoholnog pića jer su indikator kvalitete proizvoda i imaju jaki psihološki utjecaj na potrošača. Svi uzorci nalaze se na crvenom i žutom spektru boja, pri čemu se povećanjem koncentracije bilja u maceratu, macerati približavaju crvenim nijansama boje.

6. LITERATURA

Agbor, G. A., Vinson, J. A., Donnelly, P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J Food Sci Nutr* **8**, str. 147 – 156

Alamgir, A. N. M. (2017) *Therapeutic Use of Medicinal Plants and Their Extracts, Volume 1: Pharmacognosy*, 73. izd., Springer, Cham. str. 453–495. doi:10.1007/978-3-319-63862-1_10

Alves, L. A., Almeida e Silva, J. B., Giuliatti, M. (2007) Solubility Of d-Glucose In Water and Ethanol/Water Mixtures. *J. Chem Eng Data* **52** (6), str. 2166–2170. doi:10.1021/je700177n

Anonymous 1, <<https://www.istrapedia.hr/hr/natuknice/3926/biska#>> Pristupljeno 19. veljače 2020.

Anonymous 2, <<https://wein-aus-kroatien.at/en/webshop-detail/aura-biska>>, Pristupljeno 15. lipnja 2020.

Anonymous 3, <<https://www.telegraph.co.uk/gardening/how-to-grow/in-pictures-the-history-of-mistletoe/>> Pristupljeno 25. ožujka 2020.

Anonymous 4, <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoid_basis.svg> Pristupljeno 23. ožujka 2020.

Anonymous 5, <<https://www.xrite.com/blog/tolerancing-part-3>> Pristupljeno 26. ožujka 2020.

Buyel, J. F. (2018) Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv* **36** (2), str.506–520. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.02.002

Coldea, T.E., Mudura, E. (2002) Valorisation of Aromatic Plants in Beverage Industry: A Review. *Hop and Medicinal Plants* **1** (2). ISSN 2360 – 0179

Cordero, M.C., Gil Serrano, A.M., Ayuso Gonzalez, M.J. (1993) Transfer of bipiperidyl and quinolizidine alkaloids to *Viscum cruciatum* Sieber (Loranthaceae) hemiparasitic on *Retama Sphaerocarpa* Boissier (Leguminosae). *Chem Ecol* **19**, str. 2389–2393. doi:10.1007/BF00979672.

Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M., Tutulescu, F. (2014) Phenolics Content, Antioxidant Activity and Color of Green Walnut Extracts for Preparing Walnut Liquor. *Not Bot Horti Agrobo* **42** (2), str. 551-555. doi:10.15835/nbha4229649

Crestani, C. E., Bernardo, A., Costa, C. B. B., Giulietti, M. (2013) Fructose Solubility in Mixed (Ethanol + Water) Solvent: Experimental Data and Comparison among Different Thermodynamic Models. *J Chem Eng Data* **58** (11), 3039–3045. doi:10.1021/je400471m

Delebinski, C. I., Jaeger, S., Kemnitz-Hassanin, K., Henze, G., Lode, H. N., Seifert, G. J. (2012) A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif* **45**(2), str.176–187. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00801.x

Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.-H. (2014) Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Ana.* **22** (3), str. 296–302. doi:10.1016/j.jfda.2013.11.001

Escher, P., Eiblmeier, M., Hetzger, I., Rennenberg, H. (2004) Seasonal and spatial variation of carbohydrate in mistletoes (*Viscum album*) and the xylems apofits hosts (*Populus x euamericana* and *Abiesalba*). *Physiol Plant* **120**(2), str. 212–219. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0230.x

Fiket, M. (2013) Aromatično i ljekovito bilje u proizvodnji jakih alkoholnih pića (završni rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Finkel, T., Holbrook, N. J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, str. 239-247. doi: 10.1038/35041687

Galvão, A. C., Robazza, W. S., Sarturi, G. N., Goulart, F. C., Conte, D. (2016) Sucrose Solubility in Binary Liquid Mixtures Formed by Water–Methanol, Water–Ethanol, and Methanol–Ethanol at 303 and 313. K. *J Chem Eng Data* **61** (9), 2997–3002. doi:10.1021/acs.jced.5b01102

Gironés-Vilaplana, A., Calín-Sánchez, Á., Moreno, D. A., Carbonell Barrachina, Á. A., García-Viguera, C. (2015) Novel maqui liquor using traditional pacharán processing. *Food Chem* **173**, str. 1228– 1235. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.062>

Grba, S., Stehlik-Tomas, V. (2010) *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, Plejada d.o.o., Zagreb, str. 229-264

Gupta, A., Ellis, M.E., Oduse, K.A. (2013) The roles of phytochemicals in red wine as a protective agent against alcohol damage. *Int Food Res J* **20** (3), str. 1191-1197 .

Haminiuk, C. W. I., Plata-Oviedo, M. S. V., de Mattos, G., Carpes, S. T., Branco, I. G. (2012) Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* in different solvents. *J Food Sci Technol* **51** (10), str. 2862–2866. doi:10.1007/s13197-012-0759-z

Handa, S.S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. (Handa, S.S., Khanuja S.P.S., Longo, G., Rakesh D.D., ured.). International Centre for Science and High Technology, Trieste, str. 22-23. https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf. Pristupljeno 19. veljače 2020.

Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Srećec, S., Filipan, K., Blažić, M., Stanzer, D. (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Sci Nutr* **8**(2), 942-954. doi:10.1002/fsn3.1374

Hanousek Čiča, K., Rupert, M., Koczoń, P., Derewiaka, D., Gajdoš-Kljusurić, J., Petravić-Tominac, V., Mrvčić, J., Stanzer, D. (2018) Characterisation of Flavour Compounds in Biska - a Herbal Spirit Produced with Mistletoe. *J Inst Brew.* **125**, str. 143–154. doi:10.1002/jib.526.

Jakopić, J., Colarić, M., Veberić, R., Hudina, M., Solar, A., Štampar, F. (2007). How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chem* **104**, str. 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.008>

- Jovanović, A., Petrović, Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources, *Lekovite sirovine* **37**, str. 45-49.
- Kalita, P., Barman T.K., Pal Tapas K., Kalita R. (2013) Estimation Of Total Flavonoids Content (TFC) And Anti Oxidant Activities Of Methanolic Whole Plant Extract Of *Biophytum Sensitivum* L. *J Drug Deliv* **3**, str. 33-37. doi:10.22270/jddt.v3i4.546.
- Kirana, C. (1996) Bio-active compounds isolated from mistletoe (diplomski rad), Waite Agricultural Institute, University of Adelaide, Adelaide.
- Lindberg, M. L., Amsterdam, E. A. (2008) Alcohol, Wine, and Cardiovascular Health. *Clinical Cardiol* **31** (8), str. 347–351. doi:10.1002/clc.20263
- Lovrić T. (2003) *Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva* Zagreb, HINUS Miramarska 13b, str. 299-300.
- Łuczaj, Ł., Jug-Dujaković, M., Dolina, K., Vitasović-Kosić, I. (2019) Plants in alcoholic beverages on the Croatian islands, with special reference to rakija travarica. *J Ethnobiol Ethnomedicine* **15** (1).doi:10.1186/s13002-019-0332-1
- Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R., Piotrowski, A. (2001) Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Polonia Pharm Drug Res* **58**, str. 373-379.
- Lučić, R. (1987) *Proizvodnja jakih alkoholnih pića*, Nolit, Beograd, str. 423-424.
- Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta* **369** (1–2), str. 1–10.
- Mayer A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* **67**, str. 2318–2331.
- Milotić, A. (2001) Zaštita istarskih rakija kao tipičnih proizvoda. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Završna izvješća odobrenih VIP projekata, 2001.

Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cardovés C. (2005) Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine, *Crit Rev Food Sci Nutr* **45**, str. 85–118.

Mrvčić, J., Posavec, S., Kazazic S., Stanzer, D., Peša, A., Stehlik-Tomas V. (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat J Food Sc. Techno.* **4** (2), str. 102-111.

Mujic I. (2010) *Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića*, AGRO-HIT PZ, Bjelovar.

Nazaruk J., Orlikowski P. (2016) Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. *Nat Prod Res* **30**, str. 373-385. doi: 10.1080/14786419.2015.1022776

Nguyen, N.X., Kiem, P.V., Minh, C.V., Kim, N., Park, S., Lee, H.Y., Kim, S. H. (2013) Diaryl heptanoids and Flavonoids from *Viscum album* Inhibit LPS-Stimulated Production of Pro-inflammatory Cytokines in Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *J Nat Prod* **76** (4), str. 495–502. doi:10.1021/np300490v

Nikićević, N., Tešević, V. (2010) *Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta*, Nik-Press, Beograd, str. 214-216.

Nowakowska, J. (1939). *The Refractive Indices of Ethyl Alcohol and Water Mixtures* (diplomski rad), Loyola University, Chicago.

OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin (2014) Determination of chromatic characteristics (OIV-MA-BS-27). OIV - International Organisation of Vine and Wine, Pariz.

Pękal, A., Pyrzynska, K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods* **7** (9), str. 1776–1782. doi:10.1007/s12161-014-9814-x

Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1995). The role of lectins in plant defence. *Histochem.* **27** (4), str. 253–271. doi:10.1007/bf00398968

POWO (2019). *Viscum album* L. POWO – Plants of the World online, Royal Botanic Gardens, Kew. <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:300881-2>>, pristupljeno 19. veljače 2020.

Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (2009) *Narodne novine* **61**, Zagreb.

Radenković, M., Ivetić, V., Popović, M., Branković, S., Gvozdenović, L. (2009) Effects of Mistletoe (*Viscum Album* L., Loranthaceae) Extracts on Arterial Blood Pressure in Rats Treated with Atropine Sulfate and Hexocycline. *Clin Exp Hypertens* **31** (1), str. 11–19. doi:10.1080/10641960802409820

Regulation of the European parliament and of the council (2008) On the definition, description, presentation, labelling and the protection of geographical indications of spirit drinks and repealing Council Regulation (EEC) No 1576/89. Official Journal of the European Union. No 110/2008

Rodríguez-Solana R., Salgado J.M., Domínguez J.M., Cortés Diéguez S.(2016a) Phenolic compounds and aroma-impact odorants in herb liqueurs elaborated by maceration of aromatic and medicinal plants in grape marc distillates. *J. Instit. Brew.* **122**, str.653-660. doi: 10.1002/jib.377

Rodríguez-Solana, R., Vázquez-Araújo, L., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2016b) Optimization of the process of aromatic and medicinal plant maceration in grape marc distillates to obtain herbal liqueurs and spirits. *J. Sci. of Food Agric.* **96** (14), str. 4760–4771. doi:10.1002/jsfa.7822

Rupert, M. (2017) Characterization and quality evaluation of mistletoe spirits (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Senica, M., Mikulic-Petkovsek, M. (2019) Changes in beneficial bioactive compounds in eight traditional herbal liqueurs during a one-month maceration process. *J. Sci. Food Agric.* **100**, str. 343–353. doi:10.1002/jsfa.10044

Singh, B. N., Saha, C., Galun, D., Upreti, D. K., Bayry, J., Kaveri, S. V. (2016) European *Viscum album*: a potent phytotherapeutic agent with multifarious phytochemicals,

pharmacological properties and clinical evidence. *RSC Advances* **6** (28),str. 23837–23857.
doi:10.1039/c5ra27381a

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. of Enol Vitic* **16**, str. 144 – 158.

Snoussi, A., Hayet, B. H. K., Essaidi, I., Zgoulli, S., Moncef, C. M., Thonart, P., Bouzouita, N. (2012) Improvement of the Composition of Tunisian Myrtle Berries (*Myrtus communis* L.) Alcohol Extracts.*J Agric Food Chem* **60** (2), str. 608–614.doi:10.1021/jf202883s

Soursouri, A., Hosseini, S. M., Fattahi, F. (2019) Biochemical analysis of European mistletoe (*Viscum album* L.) foliage and fruit settled on Persian ironwood (*Parrotia persica* C. A. Mey.) and hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Biocatal Agric Biotechnol* **22**. doi:10.1016/j.bcab.2019.101360

Stanciu, G., Aonofriesei, F., Lupsor, S., Popescu, A., Sirbu, R. (2019) Study of Phenolic Compounds and Antimicrobial Activity of *Lavandula angustifolia* L. Flowers Macerates. *Rev Chim-Bucharest* **70** (5), str.1800-1804. doi: 10.37358/RC.19.5.7218

Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., Zhang, H. (2015).Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complementary Altern Med* **2015**, str. 1–9. doi:10.1155/2015/595393

Tonutti, I., and Liddle, P. (2010) Aromatic plants in alcoholic beverages. A review, *Flavour Fragr J* **25** (5), str. 341–350. doi: 10.1002/ffj.2001

U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7 th Edition, Washington, DC: U.S. Government Printing Office, December 2010.

Urech, K., Baumgartner, S. (2015) Chemical Constituents Of *Viscum album* L.: Implications for the Pharmaceutical Preparation of Mistletoe. U: *Mistletoe: From Mythology to Evidence-Based Medicine*, 4 izd. (Zänker, K.S.,Kaveri, S.V., ured.), Karger Publishing, Basel, str. 11-23. doi:10.1159/000375422

Vicas S., Rugina Socaciu C. (2012) Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*).U: *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* (Venketeshwer, R., ured.), InTech, Rijeka. str. 115 – 130. doi: 10.5772/26845

Vicas, S. I., Rugina, O. D., Leopold, L., Pinte, A., Socaciu, C. (2011) HPLC Fingerprint of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Viscum album* from Different Host Trees. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* **39**(1), str. 48-57. doi:10.15835/nbha3913455

Wójciak-Kosior M., Sowa I., Pucek K., Szymczak G., Kocjan R., Luchowski P. (2017) Evaluation of seasonal changes of triterpenic acid contents in *Viscum album* from different host trees, *Pharm Biol* **55** (1), str. 1-4. doi: 10.1080/13880209.2016.1225773

Zavadlav, S. (2015) Priručnik za vježbe iz kolegija „Tehnologija bezalkoholnih pića“ , Veleučilište u Karlovcu, str. 15-16. ISBN: 978-953-7343-84-2

Zhang, Q., Lin, L. Ye, W. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med J* **13**, str. 20. doi: 10.1186/s13020-018-0177-x

Zwierzina, H., Bergmann, L., Fiebig, H., Aamdal, S., Schoffski, P., Witthohn, K., Lentzen, H. (2011) The preclinical and clinical activity of a viscumine: a potential anti cancer drug. *Eur. J. Cancer* **47** (10), str. 1450–1457. doi: 10.1016/j.ejca.2011.02.022

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Priska Lukin

Ime i prezime studenta