

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Katarina Filipan

7193/PT

Fizikalno-kemijska i fitokemijska
karakterizacija *Biske*

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Fizikalno-kemijska i fitokemijska karakterizacija *Biske*

Katarina Filipan, 7193/PT

Sažetak: *Biska* je tradicionalna istarska travarica koja se proizvodi postupkom maceracije grančica i lišća bijele imele u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla, a najčešće u neutralnoj rakiji - lozi ili komovici. Budući da tijekom maceracije dolazi do ekstrakcije aromatskih i biološki aktivnih spojeva prisutnih u bijeloj imeli, ona se (kao i ostale travarice) smatra ljekovitom rakijom. U istraživanjima koja su do sada provedena detektirani su lektini, viskotoksini, terpeni i polifenolni spojevi koji ovoj rakiji daju izrazita antioksidacijska i antitumorska svojstva. Na prikupljenim uzorcima *Biske* provedena je fizikalno-kemijska i fitokemijska analiza, a određeni su sljedeći parametri: ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost pomoću dvije metode - FRAP i DPPH, volumni udio etanola, pH i kromatske karakteristike. U ispitivanim uzorcima zabilježena je velika raznolikost rezultata. Udio ukupnih fenola kreće se u rasponu 0,1 - 80 mg GAE/100 ml pića, a antioksidacijska aktivnost između 0 i 7 mM Trolox (FRAP metoda), odnosno određena pomoću druge metode između 0,3 i 71 % inhibicije DPPH radikala.

Ključne riječi: antioksidacijska aktivnost, *Biska*, imela, kromatski parametri, polifenoli

Rad sadrži: 34 stranica, 14 slika, 5 tablica, 45 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Izv.prof.dr.sc. Jasna Mrvčić

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

Datum obrane: 16. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

Physicochemical and phytochemical characterization of *Biska*

Katarina Filipan, 7193/PT

Abstract: *Biska* is a traditional Istrian spirit drink produced by maceration of white mistletoe twigs and leaves in ethyl alcohol of agricultural origin, but mostly in neutral grape marc brandy. Since various aromatic and biologically active compounds are present in the white mistletoe and during maceration they are extracted from it, *Biska* is (like the other bitters) considered as medicinal brandy. In resarches conducted so far, lectins, viscotoxins, terpenes and polyphenolic compounds have been detected which are responsible for strong antioxidant and anti-tumor properties of this brandy. Physicochemical and phytochemical analysis was performed on the collected samples of biska and the following parameters were determined: total phenol content, antioxidant activity using two methods - FRAP and DPPH, volume percentage of ethanol, pH value and chromatic characteristics. In the investigated samples, a great variety of results was recorded. The total phenol content ranges from 0,1 to 80 mg GAE/100 ml of sample drink and an antioxidant activity between 0 and 7 mM Trolox (FRAP method) or determined by another method between 0,3 and 71 % inhibition of DPPH radical.

Keywords: antioxidative activity, *Biska*, chromatic characteristics, mistletoe, polyphenols

Thesis contains: 34 pages, 14 figures, 5 tables, 45 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Jasna Mrvčić, PhD

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

Defence date: July 16th 2018

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO	2
2.1.	Jaka alkoholna pića	2
2.2.	Travarica	2
2.3.	Biska	4
2.4.	Imela	5
2.4.1.	Bijela imela (<i>Viscum album</i>)	6
2.4.2.	Biološki aktivni spojevi bijele imele	8
2.4.2.1.	Fenolni spojevi	9
2.4.2.2.	Lektini	10
2.4.2.3.	Viskotoksini	11
2.4.2.4.	Terpeni	12
3.	MATERIJALI I METODE	13
3.1.	Materijali	13
3.1.1.	Uzorci biske	13
3.1.2.	Kemikalije	14
3.2.	Metode rada	14
3.2.1.	Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin - Ciocalteu reagensa	14
3.2.2.	Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	15
3.2.3.	Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	17
3.2.4.	Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin - Dietrichu	18
3.2.5.	Određivanje kromatskih karakteristika	18
3.2.6.	Određivanje pH-vrijednosti	19
4.	REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1.	Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin - Ciocalteu reagensa	19
4.2.	Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom	21
4.3.	Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom	22
4.4.	Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin - Dietrichu	24
4.5.	Određivanje kromatskih karakteristika	26
4.6.	Određivanje pH-vrijednosti	27
5.	ZAKLJUČAK	29
6.	LITERATURA	30

1.UVOD

Travarice su jaka alkoholna pića koja se tradicionalno konzumiraju većinom u mediteranskom području. Njihov postupak proizvodnje sličan je proizvodnji biljnih likera, a radi se o maceraciji ljekovitog i aromatičnog bilja u 96 %-tnom etanolu, komovici ili lozi. Zelenkasto su žute do slamnato-žute boje koja potječe od ekstrahiranih pigmenata korištenih dijelova biljke. Za maceraciju se najčešće koristi više vrsta biljaka kao što su npr. anđelika, anis, brđanka, kadulja, kim, kleka, komorač, lavanda, majčina dušica, matičnjak, paprena metvica, pelin, stolisnik i sl. Macerirati se mogu bilo koji dijelovi biljke - plodovi, stabljike, grančice, lišće, cvjetovi; a ovisno o upotrijebljenom dijelu varira, osim pigmenata, sadržaj biološki aktivnih tvari i tvari arome.

Za područje Istre karakteristična je proizvodnja *Biske*. Prva faza proizvodnje ove tradicionalne travarice uključuje pripremu bazne rakije tj. najčešće proizvodnju komovice. Zatim slijedi maceracija lišća i grančica bijele imele, poluparazitske biljke, u prethodno pripremljenoj neutralnoj rakiji. Tijekom postupka maceracije, u bisku se pomoću alkoholne baze, ekstrahiraju važni biološki aktivni spojevi - fenolni spojevi, lektini, viskotoksini i terpeni. Oni *Biski* daju antioksidativna i antitumorska svojstva zbog kojih pozitivno djeluje na ljudski organizam i, zajedno s ostalim travaricama, možemo ju svrstati u skupinu ljekovitih rakija. Cilj ovog rada je odrediti i usporediti fizikalno-kemijski i fitokemijski sastav 18 različitih uzoraka *Biske* te procijeniti njihovu kvalitetu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jaka alkoholna pića

Jaka su alkoholna pića, prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima iz 2009. godine (NN 61/2009), definirana kao alkoholna pića koja imaju posebna senzorska svojstva, sadrže minimalno 15 % vol. alkohola te su namijenjena za ljudsku potrošnju. Mogu biti proizvedena ili izravno destilacijom prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla (sa ili bez dodavanja aroma), i/ili maceracijom (ili sličnom preradom bilja) u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla (i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili jakim alkoholnim pićima), i/ili dodavanjem aroma, šećera ili drugih sladila i/ili drugih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla (i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i/ili jakim alkoholnim pićima). Osim izravno, jaka alkoholna pića mogu se proizvesti miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića, drugih alkoholnih pića, i/ili drugih pića, i/ili miješanjem s etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla. Prema Pravilniku, jaka alkoholna pića dijele se u 46 kategorija. Prvih 14 kategorija predstavljaju pravi ili čisti destilati (npr. rum, whiskey, rakija od meda, komovica, šljivovica...), a ostatak su miješana jaka alkoholna pića koja se dobivaju dodatkom etanola i/ili tvari arome i/ili bojila i sladila u odgovarajuću poljoprivrednu sirovinu (npr. gin, liker, geist, encijan...).

2.2. Travarica

Travarica je tradicionalno jako alkoholno piće mediteranskih država (Italija, Grčka, Hrvatska) koje pripada kategoriji ostalih jakih alkoholnih pića (Grba, 2010). U Pravilniku se nalazi pod listom jakih alkoholnih pića podrijetlom iz Hrvatske, uz lozu, staru i slavonsku šljivovicu, pelinkovac i zadarski maraschino (NN 61/2009). Travarice ne možemo svrstati u skupinu pravih destilata niti u skupinu likera i miješanih jakih alkoholnih pića jer imaju obilježja jednih i drugih. Obilježja koja ih povezuju s pravim destilatima su alkoholna jakost koja iznosi oko 40 % vol. i što ne sadrže šećer. Međutim, proizvodnja travarica ne uključuje fermentaciju ni destilaciju voćne, žitne ili šećerne sirovine, nego se radi o maceraciji odabranog ljekovitog i aromatičnog bilja (npr. komorač, ružmarin, metvica, majčina dušica, kadulja...) u količini i sastavu prema recepturama proizvođača, u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla, neutralnim rakijama od grožđa (komovica, lozi) ili voća što je

slično proizvodnji biljnih i voćnih likera (NN 61/2009). Kao što je propisano Pravilnikom, osnovna sirovina u proizvodnji travarice - vinski destilat, rakija od voćne komine, rakija od voća, lozi ili komovica, mora udovoljavati zahtjevima kvalitete sukladno kategoriji kojoj pripada (NN 61/2009). Osim postupka proizvodnje, travarice sa miješanim jakim alkoholnim pićima povezuje i to što su prirodno obojane (njihova boja potiče od bilja) kao i kod gorkih ili biljnih likera. U Hrvatskoj se travarice tradicionalno proizvode u Istri i Dalmaciji. Tijekom procesa maceracije različitih vrsta ljekovitog i aromatičnog bilja u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici, dolazi do ekstrakcije biološki aktivnih spojeva bilja – eterična ulja, flavonoidi, tanini, sluzi, saponini i gorke tvari – u alkoholnu. Najčešće se kao alkoholna baza koristi rakija komovica, čija kvaliteta uvelike doprinosi i kvaliteti travarice. U Pravilniku, komovicu ćemo naći pod listom jakih alkoholnih pića podrijetlom iz Hrvatske (NN 61/2009). Rakija od groždane komine ili komovica jako je alkoholno piće proizvedeno isključivo iz fermentirane groždane komine (kruti ostatak nakon odvajanja mošta tijekom proizvodnje vina - peteljke, sjemenke i pokožica grožđa), i destilirano neposredno vodenom parom ili nakon dodavanja vode groždanoj komini. Ne smije se aromatizirati, osim kod tradicionalnih metoda proizvodnje, a stavljena na tržište (kao gotov proizvod) treba sadržavati najmanje 37,5 % vol. alkohola. Tijekom proizvodnje, ne smije se dodati alkohol, a od sredstava za prilagodbu boje smije se koristiti jedino karamel (NN 61/2009). Proizvodnja komovice razlikuje se s obzirom na podrijetlo koma - može biti od crnog ili bijelog vina. Tijekom proizvodnje crnog vina, kom i mošt zajedno fermentiraju te je nakon odvajanja mošta kom potrebno jedino (odmah) destilirati. Ukoliko kom potječe od bijelog vina, nakon odvajanja mošta kom je potrebno fermentirati pa destilirati jer tijekom proizvodnje bijelog vina fermentira jedino mošt. Nakon destilacije, sjemenke grožđa koriste se za proizvodnju ulja, a ostatak kao gnojivo, dok se komovica koristi kao temeljna rakija za proizvodnju travarica i domaćih likera (predavanje).

2.3. Biska



Slika 1. Biska (Anonymus 1)

Naziv ove tradicionalne istarske aromatizirane rakije (slika 1.) upućuje na sirovinu koja se koristi za njenu proizvodnju, a to je imela - lat. *Viscum*. Biska se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica imele u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla, lozi ili najčešće komovici. Maceracija traje minimalno 30 dana, ovisno o količini dodanog lišća te je rakiju potrebno svakodnevno miješati. Količinom bilja koje se macerira utječe se na količinu spojeva koji se ekstrahiraju u rakiju, posebno pigmenta pa se tako dužom maceracijom dobiva biska tamnije boje. U rakiju se nakon maceracije može dodati do 50 g/l meda ili 3 % šećera. Homogenizacija svih dodanih sastojaka traje od 40 do 60 dana, nakon čega se rakija filtrira te po potrebi lijeva u boce do 1 l. Treba napomenuti da ne postoji jedinstveni recept za bisku. Receptura biske koja uključuje dužinu vremena maceracije, količinu i vrstu upotrijebljene rakije kao baze za maceraciju te količinu i vrstu dijelova biljke koji se koriste za maceraciju, razlikuje se od proizvođača do proizvođača. U tablici 1. nalazi se jedan od mogućih recepata za proizvodnju rakije od imele. Inače biska je ostavština druidske magije starih Kelta koji su nekada živjeli na ovim prostorima. Bijela imela (*Viscum album*) je bila kulturna biljka starih Kelta. Najpoznatija je humska biska, koja se sprema prema recepturi pokojnog humskog župnika, vrsnog travara, Josipa Vidala (Anonymus 1).

Tablica 1. Recept za proizvodnju biske (Keršek, 2008)

RAKIJA OD IMELE
Sastojci: imela (listići) 30 – 40 g rakija 45 % (loza ili komovica) 1 l
Priprema: U rakiju dodajte narezane grančice s listovima imele (30 - 40 g) koje ste prethodno dobro oprali u mlakoj vodi. Staklenku ostavite na hladnom i tamnom mjestu 2 - 3 tjedna prije konzumacije.

2.4. Imela

Imela (lat. *Viscum*) je poluparazitska, višegodišnja zimzelena biljka okruglog oblika (gram) koja raste na mnogobrojnom različitom crnogoričnom i listopadnom drveću, a posebice na boru, topoli, stablu jabuke, hrastu... (Vicas i sur., 2012). Svako drvo koje imeli može pribaviti nužno potrebne hranjive tvari u dovoljnoj količini potencijalno predstavlja njenog domaćina (Zuber, 2004). Rod *Viscum* koji se danas svrstava u porodicu *Viscaceae* (prije je pripadao porodici *Loranthaceae*) uključuje više od 100 vrsta. Najviše ih je nađeno u Africi, nešto manje u južnoj Aziji, a samo po nekoliko vrsta u Europi, središnjoj Aziji i Australiji (Ball, 1993). Neke od njih su *Viscum coloratum*, *V. cruciatum*, *V. apiculatum*, *V. acaciae*, *V. angulatum*, *V. littorum*, *V. malurianum*, *V. nudum*, *V. obovatum*, *V. obscurum*, *V. radula*, *V. rhipsaloides*, *V. orientale*... One se razlikuju u boji zrelih bobica (varira od bijele preko žute i narančaste do crvene) i njihovom obliku (ovalan, okrugao), imaju drugačiju strukturu viskoznih, ljepljivih niti između unutarnjeg i vanjskog sloja, različit položaj, oblik i veličinu listova...(Ochocka i Piotrowski, 2002). Osim navedenih morfoloških karakteristika, razlikuju ih i DNA sekvence (Zuber i Widmer, 2000).

Međutim, za proizvodnju biske koristi se samo jedna vrsta - europska bijela imela (lat. *Viscum album*) koja je danas i najistraživanija vrsta imele. U tablici 2. nalazi se znanstvena klasifikacija ove vrste imele.

Tablica 2. Znanstvena klasifikacija vrste *Viscum album* (Vicas i sur., 2012)

Phylum: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Order: Santalales
Family: Santalaceae(Viscaceae), Opiliaceae, Misodendraceae, Olacaceae, Loranthaceae ↓
Genus: <i>Viscum</i>
Species: <i>Viscum album</i>

2.4.1. Bijela imela (*Viscum album*)



Slika 2. Bijela imela (Anonymus 2)

Unutar vrste *Viscum album* (slika 2.) razlikuju se mnogobrojne podvrste, a tri koje su najviše raširene u Europi su *V. album* subsp. *album*, *V. album* subsp. *abietis* i *V. album* subsp. *austriacum*. One se međusobno razlikuju u domaćinu (drvetu) na kojem parazitiraju- podvrsta *album* raste na listopadnom drveću, dok *austriacum* i *abietis* rastu na crnogorici. Posljednje dvije se razlikuju po tome što podvrsta *austriacum* najviše napada bor, a *abietis* jelu (Barney i sur., 1998). U filogenetskim analizama uočena je slaba genetska različitost ove tri podvrste što se danas interpretira relativno nedavnim formiranjem njihovih različitih stabala domaćina (Zuber i Widmer, 2000).

Podvrsta koja se također spominje u literaturi, a tek je opisana u istraživanju Böhling i sur. (2002), je *V. album* subsp. *creticum*, koja raste na alepskom boru, a zanimljiva je jer se nalazi jedino na Kreti zbog čega ima posebne karakteristike (Zuber, 2004).

Europska bijela imela općenito je smještena na vrhu stabla domaćina i napada njegove relativno mlade izdanke (mladice) (Showler 1974). Od njih (izravno iz ksilema domaćina) crpi vodu, mineralne tvari te otopljene anorganske spojeve. Cvjetovi su joj vrlo sitni, gotovo neprimjetni, žućkasto-zelene boje. Viskozni plod imele je bobica koju čine epikarp bijele ili žute boje, gusti mezokarp koji sadrži sluzavu tvar viscin i jako tanki endokarp koji prijanja uz sjeme (Sallé, 1983). Bobice imele mogu sadržavati jednu do četiri sjemenke koje su čvrsto i duboko uklopljene u ljepljiv sok. Vegetativno razmnožavanje bijele imele vrlo je rijetko. Uglavnom se ono vrši putem ptica kao prenositelja. Sjemenke prolaze kroz njihov probavni sustav neoštećene i ispuštaju se kao feces, te počinju klijati njihovim utrljavanjem na granu pojedinog drveta (Zuber, 2004).

Kao i druge parazitske biljke, *Viscum album* ima veliku brzinu/visoku stopu transpiracije, a malu fotosintezu (Weber, 1993a). Kloroplasti bijele imele imaju male količine klorofila *a* i *b*, te brojne nedostatke u fotosustavima I i II odgovornima za fotosintezu čime se potvrđuje hipoteza da ona od domaćina ne uzima samo vodu i mineralne tvari nego i djelomično ugljik da bi zadovoljila svoje potrebe za hranom (Hudák i Lux, 1986).

Bijela je imela autohtona vrsta u velikom dijelu Europe zahvaljujući velikoj raširenosti njenih domaćina koji definiraju njezino stanište (Wangerin, 1937). Međutim, u sjevernim i istočnim predjelima na njenu slabu zastupljenost presudno djeluje temperatura - imela je prilagođena umjerenom klimi, a ne ekstremima (Luther & Becker 1986). Pretežno raste u brežuljkastom i podplaninskom području, do 1000m nadmorske visine (Wangerin, 1937).

Barney i sur. (1998) sastavili su listu do tada poznatih stabla domaćina vrste *Viscum album*. Za podvrstu *album* zapisane su 384 vrste listopadnog drveća koje raste u Europi, za podvrstu *austriacum* poznato je 16 domaćina, a za podvrstu *abietis* identificirano je samo 10 vrsta drveća.

Budući da, iz navedenog, bijela imela može parazitirati na raznolikom drveću, primjerice na jasenu, jablanu, lipi, topoli, vrbi, javoru, jabuci, bagremu i dr., s obzirom na domaćina pojedine vrste razlikuju se morfološki. Međutim, fitokemijske razlike među njima, iako na prvi pogled manje uočljive od morfoloških, posebno su važne i više im je pažnje posvećeno u smislu različitih znanstvenih istraživanja (Ochocka i Piotrowski, 2002). Ono što je uočeno je

da se koncentracija fenolnih spojeva u imeli razlikuje ovisno o tome na kojoj vrsti drveta ona raste (Tablica 3.).

Tablica 3. Usporedba sadržaja ukupnih fenola u različitim dijelovima imele porasloj na različitom drveću (Ochocka i Piotrowski, 2002)

Vrsta drveta	Ukupni fenoli u listovima (mg GAE/g)	Ukupni fenoli u grančicama (mg GAE/g)
Javor (<i>Acer campestre</i>)	32,16 ± 0,003	23,86 ± 0,013
Jasen (<i>Fraxinus excelsior</i>)	46,85 ± 0,005	36,22 ± 0,014
Jablan (<i>Populus nigra</i>)	45,03 ± 0,02	42,45 ± 0,008
Jabuka (<i>Malus domestica</i>)	31,32 ± 0,008	30,22 ± 0,001
Bagrem (<i>Robinia pseudocacia</i>)	65,30 ± 0,002	27,96 ± 0,002

Time je dokazano da je priroda veze između domaćina i parazita vrlo različita s obzirom na vrstu domaćina te da je utjecaj stabla domaćina iznimno značajan za procjenu imele kao biljne sirovine (Ochocka i Piotrowski, 2002). Također se, iz navedenog, pretpostavlja da pojedine biološki aktivne komponente mogu prijeći s drveta domaćina na parazita - bijelu imelu (Büssing and Schietzel, 1999).

2.4.2. Biološki aktivni spojevi bijele imele

Europska se imela još u staroj Grčkoj i Rimu smatrala ljekovitom biljkom i koristila u medicinske i farmaceutske svrhe. Ekstrakti navedenog poluparazita pokazali su stimulirajuće djelovanje na imunološki sustav i citotoksično djelovanje na stanice tumora zbog čega se koriste za liječenje raznih vrsta raka (Ochocka i Piotrowski, 2002). Imela *Viscum album* predstavlja bogat izvor biološki aktivnih komponenata čiji sadržaj značajno ovisi, prije svega o drvetu domaćinu na kojem ona parazitira, ali i o vremenu njezinog branja te upotrijebljenom proizvodnom procesu (Zuber, 2004). Glavne grupe komponenata pronađene u njoj koje imaju biološku aktivnost i odgovorne su za njezina, prethodno spomenuta,

pozitivna svojstva su lektini, čija je funkcija inaktivacija ribosoma i poticanje apoptoze, te citotoksični tionini-viskotoksini (Ochocka i Piotrowski, 2002).

U istraživanjima koja su proučavala djelovanje cijelih ekstrakata bijele imele, dokazano je da i drugi spojevi (sekundarni metaboliti) nađeni u njoj (različite strukture i aktivnosti) pridonose njezinom biološkom djelovanju, a to su, osim polipeptida lektina i viskotoksina kao najznačajnijih predstavnika, alkaloidi, amini, flavonoidi, različite fenolne kiseline i terpenoidi (Ochocka i Piotrowski, 2002).

Između ostalog, spominje se njihov utjecaj na smanjenje krvnog tlaka i njihovo pozitivno djelovanje na rad srca (Franz, 1985), iako se danas djelovanje imele tj. njezinih komponenata najviše spominje kao terapija za ljude oboljele od raka (Barberaki i Kintzios, 2002). Navedeni pozitivni efekti više su dokazani kao djelotvorni ukoliko se koriste cijeli ekstrakti imele, a ne samo pročišćeni lektini i/ili viskotoksini (Eggenschwiler i sur., 2007).

2.4.2.1. Fenolni spojevi

Kao što je spomenuto u prethodnim poglavljima, drvo na kojem bijela imela parazitira ima velik utjecaj na količinu i sastav biološki aktivnih spojeva ovog parazita, pa tako i fenolnih spojeva. Fenoli su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih na benzenski prsten. Ubrajamo ih u skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji su odgovorni za boju, miris, okus i nutritivnu vrijednost pojedinih biljaka. Međutim, njihovo najvažnije djelovanje je ono kao antioksidansa - sprječavaju pojavu raka, ali i drugih bolesti uzorkovanih oksidativnim stresom ljudskog organizma (Aqil i sur., 2006). Prema kemijskoj strukturi dijele se na fenolne kiseline, flavonoide, tanine i ostale spojeve - lignani i kumarini (predavanje). Dokazano je da svi ispitivani uzorci imele predstavljaju bogat izvor fenolnih kiselina, ali je njihov kvalitativni i kvantitativni sadržaj različit. Najviši udio ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida pokazala je bijela imela koja parazitira na bijelom jasenu (lat. *Fraxinus excelsior*) (Vicas i sur., 2011).

Vicas i suradnici u ispitivanim uzorcima bijele imele identificirali su 12 fenolnih kiselina - galna, protokatehinska, gentizinska, klorogenska, *p*-hidroskibenzojeva, kava kiselina, siringinska, ferulinska, *p*-kumarinska, sinapinska i trans-cimetna kiselina. Također, u analiziranim uzorcima pronađena su i četiri polifenolna spoja - flavonoidi: flavanon naringenin, flavonoli kamferol i kvercetin te ester fenilmliječne i kava kiseline - ružmarinska

kiselina. Provedena HPLC analiza pokazala je da se veći udio biološki aktivnih komponenata *V. album* nalazi u listovima u odnosu na stabljike ove biljke.

2.4.2.2. Lektini

U bijeloj imeli nađena su i izolirana tri lektina označena kao ML I, ML II i ML III (mistletoe lectins). To su ribosom-inaktivirajući glikoproteini koji se sastoje od dva peptidna lanca (lanci A i B) međusobno povezana hidrofobnim interakcijama i disulfidnim mostovima (Stirpe i sur., 1992), od kojih jedan sadrži tri različite domene, a drugi dvije domene slične konfiguracije. Lektin ML I malo se razlikuje od druga dva - sastoji se od dvije identične podjedinice koje su međusobno povezane nekovalentnim vezama tj. od četiri peptidna lanca, a ne od dva (Franz i sur., 1981). Glavnu razliku između prethodno navedena tri lektina predstavlja molekula koja je povezana s jednom domenom peptidnog lanca B. Kod lektina ML I (poznatog kao aglutinin *V. album* ili viskumin) to je D-galaktoza, kod ML III ta molekula je N-acetil-D-galaktozamin, dok kod lektina ML II ona može biti ili D-galaktoza ili N-acetil-D-galaktozamin (Franz, 1985). Podvrsta bijele imele *album* sadrži najviše lektina ML I, dok *abietis* i *austriacum* u najvećoj koncentraciji posjeduju lektin ML III. Gledano iz perspektive ukupnih proteina u imeli, količina navedenih lektina nije manja od 2% (Peumans i sur., 1996). Budući da je dokazano da lektin ML I najizraženije djeluje u modifikaciji imunološkog odgovora i funkciji imunološkog sustava te da pokazuje najbolje protutumorsko djelovanje, od spomenutih lektina, on se najviše koristi u te svrhe (Hajto i sur., 1989). Također, dokazano je da je zapravo veza između lanca B i molekule galaktoze u lektinu ML I odgovorna za njegovo poticanje aktivnosti stanica ubojica u živim organizmima, dok je lanac A potpuno inaktivan zbog nemogućnosti stvaranja veze s ugljikohidratima prisutnim u stanicama (Hajto i sur., 1989). U istraživanju Büssing i sur. (1996) dokazano je da najveći utjecaj na poticanje apoptoze uzgojenih ljudskih limfocita ima lektin ML III tj. dokazan je kao najmoćniji u inhibiciji leukemije Molt4 stanica (Dietrich i sur., 1992).

Iako najznačajniji po biološkom djelovanju, lektini bijele imele imaju i važnu fiziološku ulogu. Lektini ML I i ML III odgovorni su za krioprotekciju biljke - u interakciji s lipidnim membranama služe kao zaštita biljke (njenih stanica, tkiva i organa) od štete uzrokovane hladnoćom (stabiliziraju staničnu membranu). Količina lektina čija je svrha kriozastita biljke, varira tijekom godine - kako i logika nalaže, najviše su koncentracije nađene u lišću zimi, a najniže ljeti (Hincha i sur., 1997). Iz ovoga je vidljiv i jedan od razloga dokazane različite biološke aktivnosti preparata/ekstrakata bijele imele porasle na istom drvetu domaćinu, ali pobranoj u različitim godišnjim dobima (Ochocka i Piotrowski, 2002).

2.4.2.3. Viskotoksini

Viskotoksini su amfipatski polipeptidi koji se sastoje od 46 aminokiselinskih ostataka (Pfüller, 2004) te sadrže tri disulfidna mosta odnosno šest cisteinskih ostataka. Strukturno su vrlo slični biljnim α - i β -tioninima (Orrù i sur., 1997). Sintetiziraju se kao velike proteinske molekule - preproteini, tj. kao prekursori proteina koje će konvertaza pocijepati na manje proteine ili biološki aktivne polipeptide (Schrader-Fisher i Apel, 1993). S obzirom na sekvence aminokiselina, postoje šest izomera. Tri najznačajnija su viskotoksini A2, A3 i B (Pfüller, 2004). Ostala tri manje zastupljena, ali ne i manje važna su A1, 1-PS i U-PS. Sastav viskotoksina ovisi o drvetu-domaćinu kojeg bijela imela napada, dijelu godine tijekom kojeg se ona bere i o podvrsti europske imele. *V. album ssp. album* u najvećoj koncentraciji sadrži viskotoksine A2 i A3, dok uopće ne posjeduje viskotoksine 1-PS i U-PS. Kod podvrste *austriacum* uočena je obrnuta situacija - 1-PS i U-PS su dominantni, A2 i A3 se nalaze u vrlo malim koncentracijama, dok viskotoksin A1 nije prisutan. Podvrsta *abietis* sadrži u najvećoj količini viskotoksin A3, a u svom sastavu posjeduje sve izomere viskotoksina osim A2 (Schaller i sur., 1998).

Za viskotoksine je dokazano da imaju citotoksično djelovanje i s obzirom na to ponekad se samostalno medicinski primjenjuju (Ochocka i Piotrowski, 2002). Kao što je vidljivo iz tablice 4, viskotoksini se kvantitativno i kvalitativno razlikuju s obzirom na podvrstu bijele imele, pa se s obzirom na to, i citotoksična aktivnost pojedinih ekstrakata bijele imele razlikuje (Schaller i sur., 1998).

U istraživanju Park i suradnika (1999) dokazano je da je citotoksični efekt viskotoksina smanjen nakon tretiranja biljke visokom temperaturom. Zbog toga se ekstrakti bijele imele, koji se koriste za proizvodnju biske ili u neke druge svrhe, skladište na hladnom da ne bi došlo do degradacije njezinih komponenata i da ne izgubi svoja biološka svojstva. Budući da disulfidni mostovi određuju 3D strukturu ovih proteina i njihovu sposobnost vezanja na lipidne membrane, oni predstavljaju vrlo važan faktor za razvijanje njihove citotoksičnosti. Dokazano je da pucanjem disulfidnih mostova viskotoksini u potpunosti gube svoju biološku aktivnost.

Tablica 4. Sastav i ukupna količina viskotoksina za tri podvrste europske imele, različite vrste drveta i vrijeme berbe (Schaller i sur., 1998) (nd=nije detektirano; ns=nije specificirano; *=uzorke su mjerili Schaller i sur. (1998.))

	Drvo-domaćin	Vrijeme berbe	Sastav viskotoksina (% od ukupnog)					Ukupni viskotoksini (mg/g)
			A1	A2	A3	B	PS-V (1-PS+U-PS)	
<i>V. album</i> subsp. <i>album</i>	Jabuka (<i>Malus</i>)	lipanj	15,9	39,0	36,4	8,7	nd	2,6
		prosinac	15,6	32,0	42,5	9,9	nd	3,3
	Hrast (<i>Quercus</i>)	lipanj	15,7	32,6	45,8	5,9	nd	4,0
		prosinac	12,4	32,3	46,8	9,6	nd	4,1
	Brijest (<i>Ulmus</i>)	lipanj	15,7	36,3	35,6	12,4	nd	3,7
		prosinac	16,2	31,7	36,5	15,6	nd	4,8
	Bagrem (<i>Robinia</i>)	ns	12,4	36,1	37,9	13,7	nd	5,7
	Topola (<i>Populus</i>)	ns	17,9	39,8	37,0	5,3	nd	5,6
Breza (<i>Betula</i>)	ns	14,7	37,7	34,3	13,3	nd	2,2	
listopadno drveće	*	15,1	35,2	39,8	9,9	nd	3,9	
<i>V. album</i> subsp. <i>austriacum</i>	Bor (<i>Pinus</i>)	lipanj	nd	1,7	4,2	11,3	85,1	1,4
		prosinac	nd	0,6	8,0	17,2	69,2	1,7
		*	nd	0,9	4,1	14,1	80,7	1,5
<i>V. album</i> subsp. <i>abietis</i>	Jela (<i>Abies</i>)	lipanj	5,6	nd	72,5	6,5	15,1	3,2
		prosinac	6,7	nd	76,5	4,4	12,5	4,8
		*	5,6	nd	75,3	5,1	13,6	3,9

Büssing i suradnici (1998b) pokazali su različitost u aktivnosti pojedinih viskotoksina na ljudske limfocite. Viskotoksini A1, A2, A3 i 1-PS uzrokovali su ubranu smrt stanica, promjenu propusnosti stanične membrane i nakupljanje reaktivnih oblika kisika, dok su isti efekti djelovanja viskotoksina B bili puno slabije izraženi (Ochocka i Piotrowski, 2002).

Fiziološka funkcija viskotoksina, kao i ostalih tiona, nije u potpunosti jasna, iako se smatra da štite biljku od mikrobiološke kontaminacije (pogotovo endosperm tijekom klijanja) zbog dokazane toksičnosti prema stanicama drugih organizama-uništavaju strukturu staničnih membrana mikroorganizama (Carrasco i sur., 1981).

2.4.2.4. Terpeni

Terpeni čine veliku i raznoliku skupinu ugljikovodičnih spojeva nađenih u esencijalnim uljima (Baser i Demirci, 2011). To su hlapljivi spojevi koji daju miris biljkama i cvijeću, a građeni su od izoprenskih jedinica. Izoprenska jedinica sastoji se od pet ugljikovih atoma i

dvije dvostuke veze tj. radi se o 2-metilbuta-1,3-dien-u. Najjednostavniji terpeni su monoterpeni koji se sastoje od dvije izoprenske jedinice odnosno 10 C-atoma. Dalje slijede seskviterpeni s tri izoprenske jedinice, diterpeni s četiri izoprenske jedinice, triterpeni sa šest i tetraterpeni s osam izoprenskih jedinica. Strukturno mogu biti aciklički tj. linearni ili ciklički (Buckle, 2015).

Za terpene je dokazano da imaju pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje. Imaju različita biološka djelovanja - antibakterijsko, antifungalno, antiviralno, antiparazitsko, protuupalno, antialergeno, antitumorsko i imunomodulativno (Wagner and Elmadfa, 2003).

Triterpeni su vrlo važni sastojci bijele imele. Oni imaju citotoksično djelovanje slično viskotoksinima, kao i djelovanje slično lektinima - potiču apoptozu. Slabo su topljivi u vodi tako da se ekstrahiraju različitim otapalima npr. natrijevim fosfatom. Kao predstavnici skupine triterpena, iz imele su izolirani β -amirin acetat, oleanolinska kiselina i betuliska kiselina (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci *Biske*

Uzorci *Biske* koji su analizirani u ovome radu prikupljeni su sa 17. Smotre domaćih rakija održane 29.10.2017. u Humu, Istri (slika 3). Sve do analize skladišteni su u zamrzivaču na -18°C.

Osim ukupnih fenola, u spomenutim uzorcima određena je antioksidacijska aktivnost pomoću dviju metoda (DPPH i FRAP), volumni udio alkohola te pH i kromatske karakteristike. Ispitivani uzorci *Biske* označeni su brojevima. Od 18 uzoraka, 5 je industrijski proizvedeno (uzorci broj 2, 6, 8, 10 i 12), dok je ostalih 13 uzoraka (broj 1, 3-5, 7, 9, 11 te 13-18) iz domaće radinosti.



Slika 3. Uzorci *Biske*

3.1.2. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su sljedeće kemikalije:

- destilirana voda
- 96 % vol. etanol i natrijev tiosulfat (Kefo, Ljubljana)
- Folin - Ciocalteu reagens, željezo (III) klorid heksahidrat, kalijev bikromat, topljivi škrob i natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb)
- galna kiselina i Trolox (Sigma - Aldrich, Steinheim)
- bezvodni natrijev karbonat i bezvodni natrijev acetat (Gram - mol, Zagreb)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) i 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-tirazin (TPTZ) (Fluka, Buchs)
- kalijev jodid (T.T.T.)
- klorovodična kiselina (Fisher Scientific, Loughborough) i
- sumporna kiselina

3.2. Metode rada

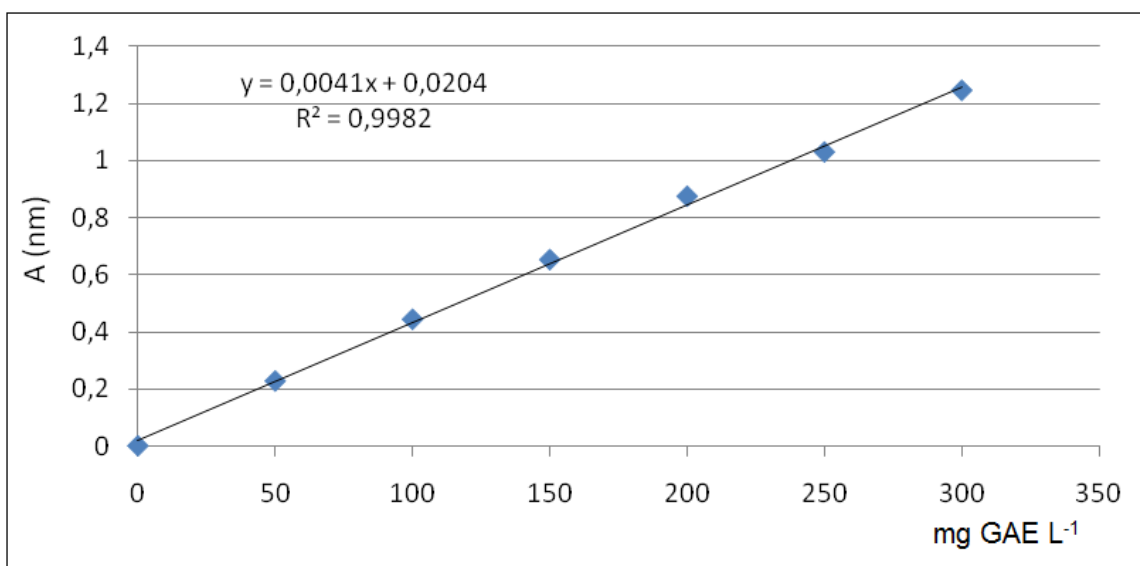
3.2.1. Određivanja ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin - Ciocalteu reagensa

Princip metode

Folin - Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline. Pri oksidaciji fenolnih tvari, ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid, koji su plavo obojeni. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin - Ciocalteu reagensom. Nakon toga, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 760 nm, pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Kao standard se koristi galna kiselina.

Postupak rada

Kako bi odredili ukupne fenole u našim uzorcima jakog alkoholnog pića, u odmjernu tikvicu od 10 ml odpipetira se 300 μ L uzorka, 500 μ L Folin - Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Dodani sastojci u odmjernoj tikvici 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 2h spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 760 nm. Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, ali se umjesto 300 μ L uzorka doda toliko destilirane vode.

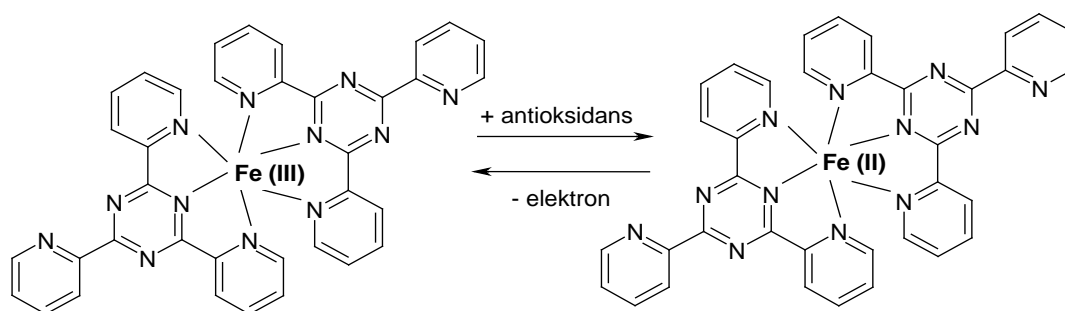


Slika 4. Baždarni pravac za određivanje fenolnih spojeva spektrofotometrijski s pomoću Folin - Ciocalteu reagensa

3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip metode

FRAP metoda se bazira na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt.



Slika 5. Reakcija redukcije željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina

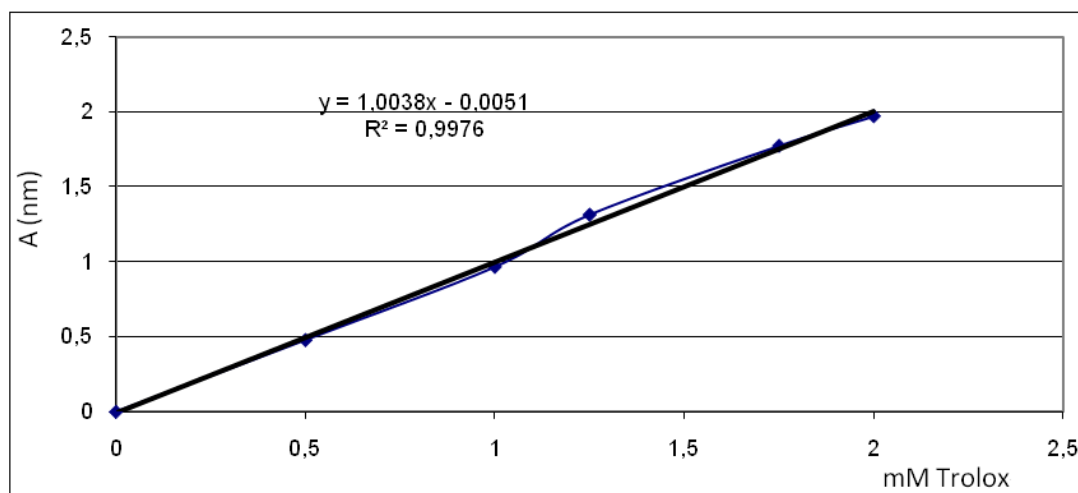
Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH = 3,6 kako bi se zadržala dobra topljivost željeza. Pri nižim pH vrijednostima smanjuje se ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno će se povećati redoks potencijal, koji će dodatno omogućiti pomak reakcije u smjeru transfera elektrona. Redoks potencijal redukcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V

i svi spojevi sa nižim redoks potencijalom ulazit će u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta (slika 5). Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} ione u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Rezultati su izraženi kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ ekvivalenta (FE)/ml uzorka.

Postupak rada

Kako bi se dokazala antioksidacijska aktivnost jakih alkoholnih pića potrebno je prirediti FRAP reagens. FRAP reagens se dobiva miješanjem 50 mL 0,3 M acetatnog pufera, 5 mL 10mM otopine TPTZ reagensa i 5 mL 20 mM otopine željezovog (III)-klorida. Da bi se dobio 10 mM TPTZ reagens potrebno je odvagati 0,0312 grama TPTZ-a u tikvicu od 10 mL i nadopuniti do oznake s 40 mM HCl. Otopina željezovog (III)-klorida priprema se vaganjem 0,0541 grama željezovog (III)-klorida u odmjernu tikvicu od 10 mL i do oznake se nadopuni sa destiliranom vodom. Acetatni pufer dobije se otapanjem 0,93 grama bezvodnog (0,186 g/100 mL) natrijevog acetata u 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL. Nakon otapanja tikvica se do oznake nadopuni s destiliranom vodom.

U odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 240 μL destilirane vode, 80 μL uzorka i 2080 μL pripremljenog FRAP reagensa. Sadržaj tikvice se dobro promiješa i nakon 5 minuta termostatanja u termostatu na 37 °C mjeri se apsorbancija na 595 nm. U slijepu probu umjesto uzorka dodaje se 80 μL etanola.

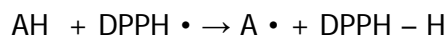


Slika 6. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

3.2.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip metode

DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) u metanolnoj otopini, koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm) (Kazazić, 2004). U prisutnosti elektron donora - AH (antioksidans koji gasi slobodne radikale) dolazi do sparivanja elektronskog para DPPH radikala te do promjene ljubičaste boje u žutu, što se prati mjerenjem apsorbanije u opadanju (Brand-Williams i sur., 1995).



Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računa se prema jednadžbi:

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$$

A_0 – apsorbancija otopine DPPH radikala

A_t – apsorbancija reakcione smjese

Priprema reagensa

DPPH reagens dobije se otapanjem 0,03943 grama DPPH s 96 % etanolom u tikvici od 10 mL. Od ove se otopine svaki dan tokom rada pripremi svježa 0,1 mM otopina DPPH reagensa tako da se uzme 0,5 mL originalne otopine i nadopuni do oznake sa 96 % etanolom u tikvici od 50 mL.

Postupak rada

U kivetu se otpipetira 2 mL 96 %-tnog etanola, zatim se doda 200 μ L ispitivanog uzorka (prema potrebi razrijeđenog) te se na kraju doda 2 mL prethodno pripremljene otopine DPPH. Slijepa proba pripremi se na isti način, ali se umjesto 200 μ L uzorka, dodaje 200 μ L etanola. Sadržaj kivete se promiješa te se one stave na tamno mjesto. Nakon 30 minuta spektrofotometrijski se odredi antioksidacijska aktivnost mjerenjem apsorbanije na 517 nm.

3.2.4. Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin - Dietrichu

Metoda se temelji na oksidaciji alkohola u prisutnosti sulfatne kiseline sa kalijevim bikromatom u octenu kiselinu. Oksidacija obično ne ide dalje jer je octena kiselina u tim uvjetima stabilna. Preostali kalijev bikromat uz dodatak kalijeva jodida izlučuje elementarni jod. Elementarni jod se titrira natrijevim tiosulfatom, uz škrob kao indikator.

Postupak:

Alkalnoj vodi (10 mL) doda se 1 mL uzorka (razrijediti ga prema potrebi) u kojem se određuje alkohol. Spoji se aparatura tako da je "most" uronjen u otopinu kalijeva bikromata (20 mL). Destilacija traje do promjene boje uzorka u zelenkasto - smeđu te se nakon toga mjeri vrijeme od 1 minute kada se prekida destilacija. Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorku se dodaje kalijev jodid na vrhu špatule i 1 mL otopine škroba, te se otopina retitrira natrijevim tiosulfatom do pojave plavozelene boje uzorka. Volumni udio alkohola izračunava se prema formuli:

$$\text{EtOH (\%)} = \frac{(V1 - V2) * f}{V_{uzorka}} * r$$

V1- utrošak natrijevog tiosulfata za slijepu probu

V2- utrošak natrijevog tiosulfata za uzorak

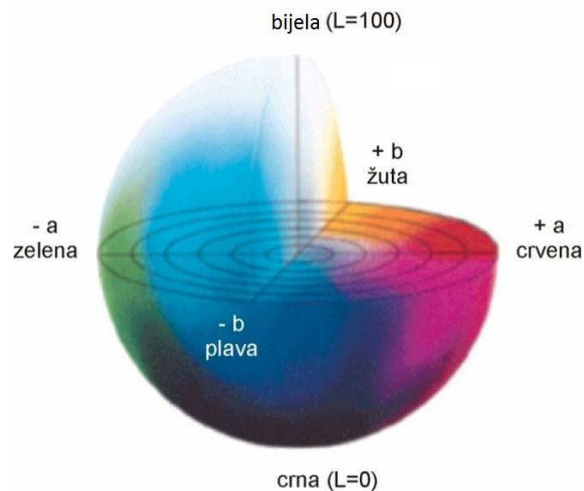
f- faktor (0,146)

r- razrjeđenje

3.2.5. Određivanje kromatskih karakteristika

Kromatske karakteristike u originalnim uzorcima *Biske* određene su spektrofotometrijski prema CIElab sustavu (International Commission on Illumination) (OIV, 2014). Za određivanje kromatskih parametara korišten je spektrofotometar Specord 50 Plus (Analytik Jena, Jena, Germany) sa izvorom svjetlosti D65. Transmitancija uzoraka mjerena je svakih 10 nm u području valnih duljina od 380 do 780 nm. Na temelju dobivenih vrijednosti propusnosti tj. transmitancije određeni su sljedeći parametri: svjetlina (L) čije se vrijednosti kreću u rasponu od 0 (crna boja) do 100 (bijela boja); kromatske koordinate (a i b) koje nemaju brojčana ograničenja, ukoliko je a pozitivan određuje crvenu boju, a ako je negativan određuje zelenu boju uzoraka; ukoliko je b pozitivan definira žutu boju, a ako je

negativan plavu boju uzorka (slika 7) (OIV, 2014). Parametri C koji označava zasićenje i h (kut) definiraju ton boje.



Slika 7. CIE Lab prostor boja

3.2.6. Određivanje pH-vrijednosti

pH-vrijednosti uzoraka *Biske* izmjerene su pomoću Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) laboratorijskog pH-metra. Kalibracija sustava postignuta je uranjanjem pH-elektrode u amonijačni pufer pH = 4.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Na prikupljenim uzorcima *Biske* provedena je fizikalno - kemijska i fitokemijska analiza, a određeni su slijedeći parametri: ukupni fenoli, antioksidacijska aktivnost pomoću dvije metode - FRAP i DPPH, volumni udio etanola, pH i kromatske karakteristike. Cilj rada usporediti je 18 različitih uzoraka *Biske* te procijeniti njihovu kvalitetu.

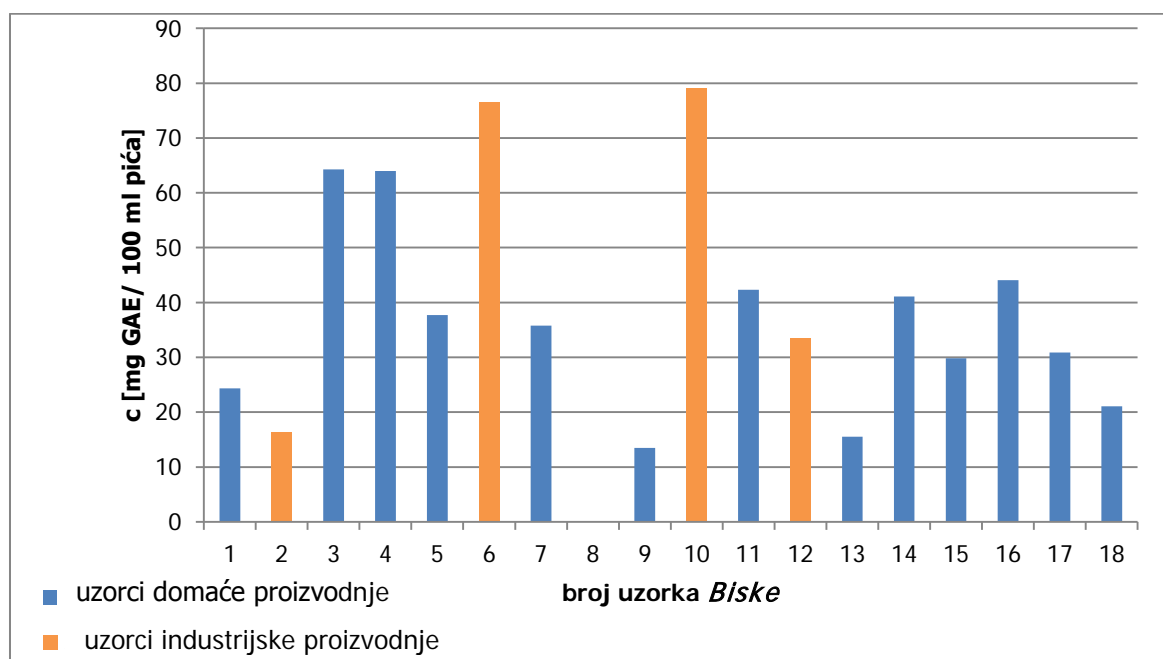
4.1. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa

Kao što je spomenuto nekoliko puta u teorijskom dijelu, sastav i količina ukupnih fenolnih spojeva ovisi značajno o drvetu koje je domaćin bijeloj imeli, ali i o vremenu njenog

branja kao i o proizvodnom procesu. Ukoliko se maceracija imele provodi duže, više će se fenolnih spojeva ekstrahirati u baznu rakiju (komovica/loza) ili etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla.

Tijekom spektrofotometrijskog mjerenja intenziteta nastalog plavog obojenja na 760 nm dobiju se apsorbancije iz kojih se pomoću jednadžbe baždarnog pravca (slika 4) izračuna koncentracija, a konačni rezultati iskazani su kao ekvivalenti galne kiseline (mg/100 ml pića) koja predstavlja standard za mjerenje ukupnih fenola. Najveća koncentracija ukupnih fenola zamijećena je u uzorku *Biske* broj 10 (79,10 mg GAE/100 ml pića), nešto manja u *Biski* broj 6 (76,48 mg GAE/100 ml pića) te u *Biski* broj 3 i 4 (64,28 i 63,98 mg GAE/100 ml pića) (slika 8). Udio ukupnih fenola u uzorku broj 3 može se usporediti s rezultatom analize koju su proveli Mrvčić i suradnici (2012), tijekom koje su u uzorku istarske *Biske* odredili koncentraciju ukupnih fenola od 640 mg GAE/l odnosno 64 mg GAE/100 ml.

Ostale vrijednosti ukupnih fenola su dosta manje i kreću se u rasponu od 15,50 do 44,10 mg/100 ml pića. Od ovih vrijednosti jedino odstupa uzorak *Biske* broj 8 s koncentracijom ukupnih fenola od 0,10 mg/100 ml pića. Kako je koncentracija ukupnih fenola jedan od pokazatelja proizvodnog procesa (maceracija) tj. načina na koji je piće (u ovom slučaju *Biska*) proizvedeno, na temelju toga može se zaključiti da biska broj 8 nije proizvedena maceracijom lišća i grančica imele nego samo dodatkom boje i arome ove rakije u 96 % vol. etanol te bi se to piće trebalo svrstati u kategoriju umjetnih jakih alkoholnih pića i s obzirom na to imati određenu cijenu na tržištu.

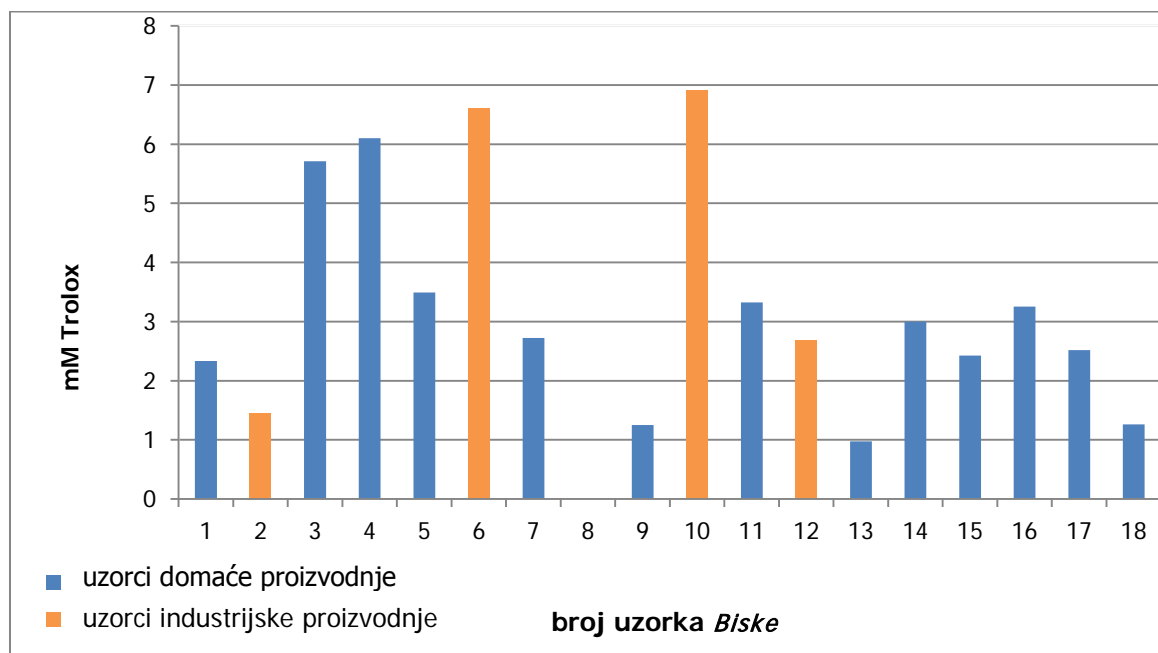


Slika 8. Koncentracija ukupnih fenola (mg GAE/100 ml pića) u analiziranim uzorcima *Biske*

4.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Nakon dodatka FRAP reagensa u analizirane uzorke *Biske*, prisutni antioksidansi reduciraju žuto obojeni TPTZ reagens u plavo obojeni produkt. Tamnije obojenje znači da je u *Biski* prisutna veća količina spojeva koji imaju antioksidacijsko djelovanje te je veća koncentracija TPTZ reagensa reducirana. Antioksidacijska aktivnost uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta nastalog plavog obojenja pri 595 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije pomoću jednadžbe baždarnog pravca (slika 6) pretvore se u koncentracije izražene kao mM Trolox-a koji predstavlja standard za mjerenje antioksidativne aktivnosti.

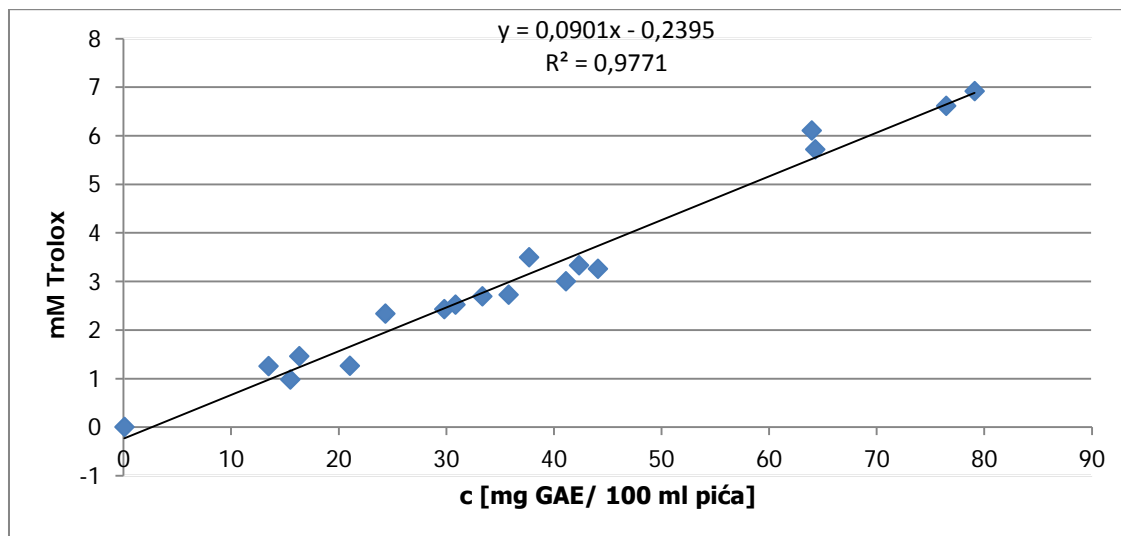
Rezultati (slika 9) pokazuju da najveću antioksidacijsku aktivnost ima *Biska* broj 10 (6,91 mM Trolox), slijedi ju uzorak *Biske* broj 6 s koncentracijom Trolox-a od 6,61 mM te *Biska* broj 4 i 3 (6,10 i 5,71 mM Trolox), dok u *Biski* broj 8 uopće nije zamijećena antioksidacijska aktivnost. U istraživanju Mrvčić i suradnika (2012) određeno je da *biska* ima antioksidacijsku aktivnost koja odgovara 4 mM Trolox-a, što je nešto viša vrijednost od prosječne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka koja iznosi 3,11 mM Trolox-a.



Slika 9. Antioksidacijska aktivnost analiziranih uzoraka *Biske* određena FRAP metodom (mM Troloxa)

Kao što je vidljivo iz slike 10, koncentracija ukupnih fenola i antioksidacijska aktivnost uzoraka *Biske* određena FRAP metodom su u izvrsnoj korelaciji (R^2 iznosi 0,9771). Time je

potvrđena tvrdnja da što je više fenola prisutno u uzorku *Biske*, to će on imati veću antioksidacijsku aktivnost i obrnuto, što je s jedne strane i logično budući da je za fenolne spojeve dokazano da posjeduju značajnu antioksidacijsku aktivnost. Iz prethodno napisanog proizlazi da je FRAP metoda izrazito selektivna metoda za određivanje fenolnih spojeva.



Slika 10. Antioksidacijska aktivnost uzoraka *Biske* određena FRAP metodom u ovisnosti o koncentraciji ukupnih fenola

4.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

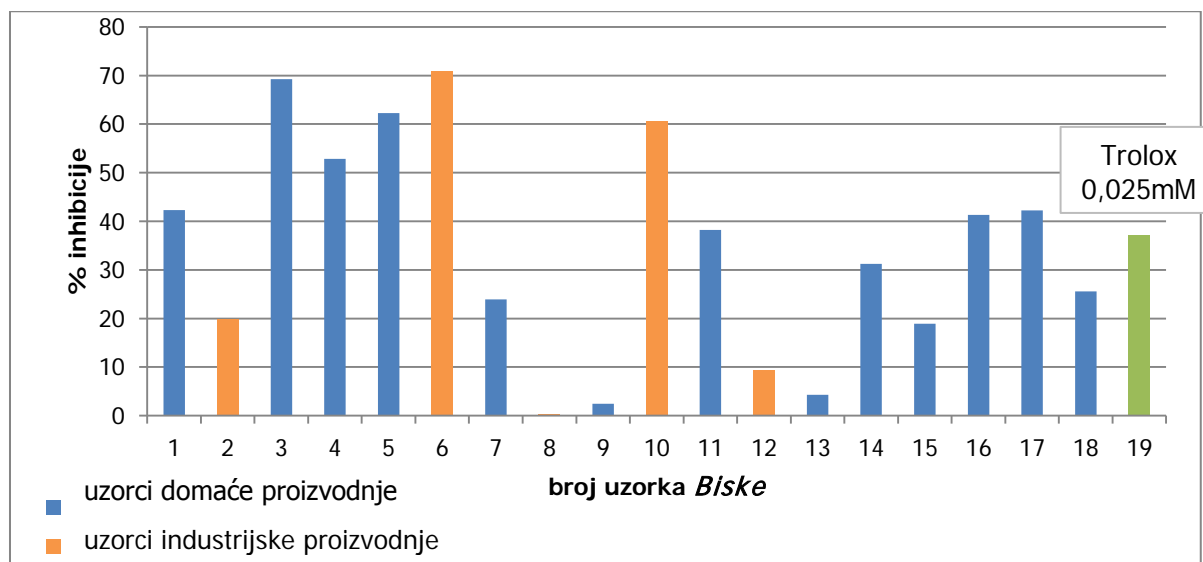
Antioksidacijska aktivnost uzoraka *Biske* određena je spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta ružičastog obojenja, nastalog redukcijom DPPH radikala u prisutnosti antioksidansa, pri valnoj duljini od 517 nm. Kao što je vidljivo i iz prethodne dvije metode, u analiziranim uzorcima *Biske* značajno varira udio fenola odnosno antioksidacijska aktivnost. Zbog toga se kod DPPH metode, iako se probalo koristiti različita razrjeđenja uzoraka i različita razrjeđenja DPPH, nisu mogli dobiti približno jednaki rezultati - takvi da svi uzorci poprime ružičastu boju tj. da svi fenoli oksidiraju i da ostane mala količina nereduciranog DPPH. Najbolji rezultati dobili su se koristeći razrjeđenja uzoraka 10 puta i razrjeđenje DPPH 100 puta (koncentracija 0,1 mM). Međutim, i tada su se neki od uzoraka obojali žuto jer je u njima prisutna prevelika količina fenola (i ostalih antioksidansa) s obzirom na korištenu koncentraciju DPPH, dok je drugih nekoliko uzoraka ostalo svijetlo-ljubičaste boje.

Spektrofotometrijski dobivene apsorbancije preračunate su pomoću formule u postotak inhibicije DPPH radikala kao konačni rezultat. Što je spomenuta inhibicija veća, to je u uzorku

prisutno više antioksidansa. Rezultati su uspoređeni s prethodno spomenutim standardom Trolox-om, koncentracije 0,025 mM od kojeg otprilike polovica ispitanih uzoraka ima višu, a polovica nižu vrijednost inhibicije DPPH radikala (inhibicija za standard iznosi 37,26 %).

Iz slike 11 vidljivo je da je najveći postotak inhibicije DPPH radikala postignut u uzorku broj 6 (70,99 %), zatim slijede *Biska* broj 3, 5 i 10 u kojima inhibicija DPPH iznosi 69,28; 62,29 i 60,68 %, dok je minimalna inhibicija zamijećena u uzorku broj 8 - 0,31 %. Analizom metanolnih ekstrakata bijele imele Ōnay-Uçar i suradnici (2006) odredili su % inhibicije DPPH radikala. Tijekom analize koristili su istu koncentraciju DPPH - 0,1 mM. Za imelu koja parazitira na javoru dobili su rezultat od $59,52 \pm 4,51$ % koji se može usporediti s uzorkom broj 10 (60,68 %), dok su za imelu koja raste na običnom bagremu dobili $73,44 \pm 2,89$ % inhibicije što je usporedivo s uzorkom broj 6 u kojem je postignuta inhibicija od 70,99 %.

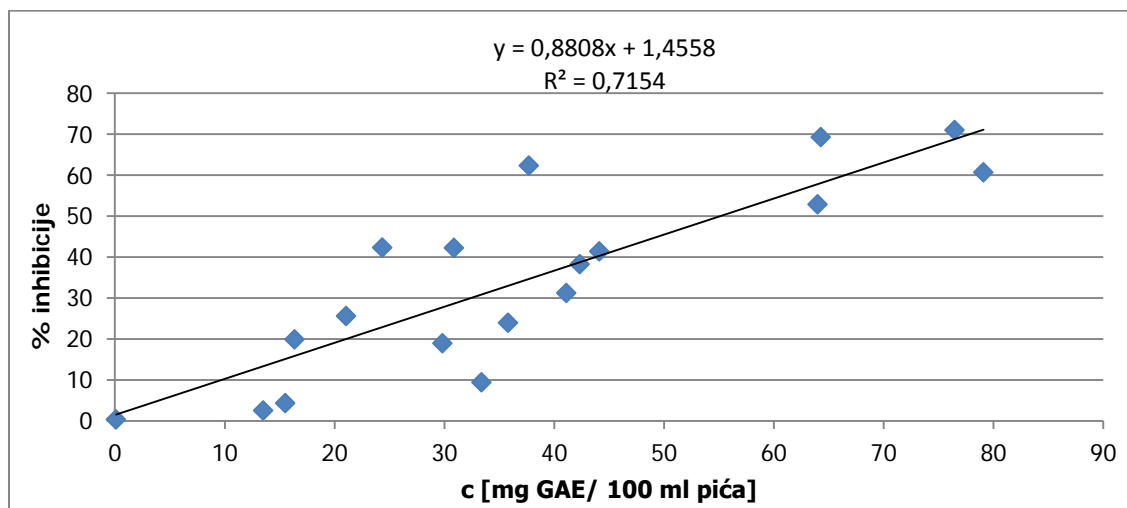
Vicas i suradnici (2012) su, kao rezultate analize etanolnog ekstrakta imele porasle na šest različitih vrsta drveća, dobili vrijednosti inhibicije DPPH radikala u rasponu od 50,47 do 77,19 % što bi odgovaralo samo analiziranim uzorcima 3-6 i 10 (sve ostale vrijednosti su niže od 45 %). Oni su tijekom analize koristili malo manju koncentraciju DPPH - 0,08 mM. Također, tijekom analize zamijetili su da je % inhibicije DPPH radikala u ekstraktima stabljika bijele imele niži nego u ekstraktima lišća.



Slika 11. Antioksidacijska aktivnost uzoraka *Biske* određena DPPH metodom (% inhibicije)

Kao što i prikazuje slika 12, DPPH metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti ne korelira najbolje s udjelom ukupnih fenola u uzorcima *Biske* (koeficijent korelacije iznosi 0,7154). Radi se o tome da, antioksidativna aktivnost uzoraka *Biske* ne ovisi samo o količini

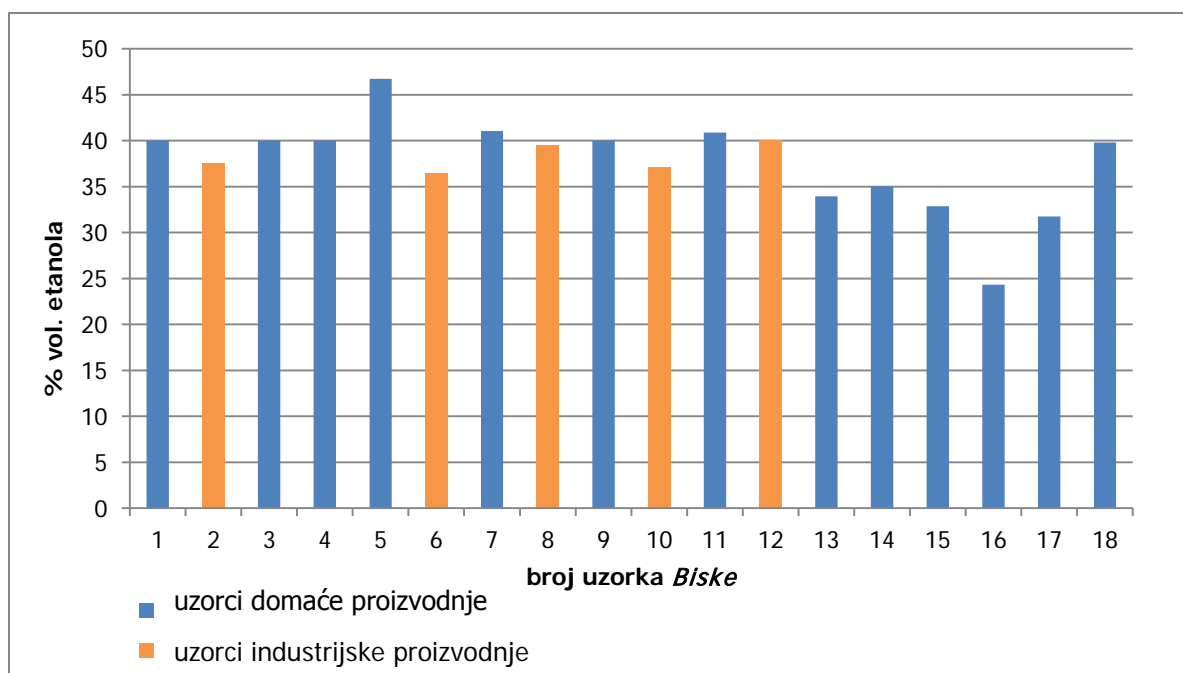
ukupnih fenola, već i o drugim prisutnim biološki aktivnim spojevima, koji u ovom slučaju mogu reducirati DPPH radikal. Zbog toga i uzorak 10 koji prema analizi ima najveći udio ukupnih fenola i najveću antioksidacijsku aktivnost (prema FRAP metodi), ovdje je tek četvrti po redu jer ostale biološki aktivne spojeve ne sadrži u tolikoj koncentraciji kao ostali uzorci.



Slika 12. Antioksidacijska aktivnost uzoraka *Biske* određena DPPH metodom u ovisnosti o koncentraciji ukupnih fenola

3.2.4. Određivanje volumnog udjela etanola metodom po Martin-Dietrichu

Volumni udio etanola u analiziranim uzorcima *Biske* određen je na temelju njegove oksidacije u octenu kiselinu s kalijevim bikromatom u prisutnosti sumporne kiseline. Preostalom kalijevom bikromatu doda se kalijev jodid te se izlučeni elementarni jod, uz indikator škrob, titrira natrijevim tiosulfatom. Izračunom prema formuli u navedenoj metodi, kao rezultate analize dobivamo volumne postotke etanola u uzorcima (Kretschmar, 1955) (slika 13).



Slika 13. Volumni udio etanola u uzorcima *Biske* određen metodom po Martin-Dietrichu

Biska se, s obzirom na način proizvodnje, prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, ubraja u skupinu jakih alkoholnih pića podrijetlom iz Hrvatske – travarice (NN 61/2009). Za travarice, kao gotove proizvode na tržištu, Pravilnikom nije definirana niti minimalna niti maksimalna koncentracija etanola, ali ona u praksi najčešće iznosi oko 40 % vol. (kao i kod čistih destilata). Prema rezultatima analize, najveći volumni udio etanola zabilježen je u uzorku *Biske* broj 5 (46,72 % vol.), a najmanji u uzorku *Biske* broj 16 (24,33 % vol.) čemu je dokaz stvaranje kristala leda tijekom skladištenja u zamrzivaču zajedno s ostalim uzorcima, u kojima zbog prisutnosti većeg udjela etanola, ta pojava nije zamijećena. Vrijednosti volumnog udjela etanola za ostatak uzoraka kreću se u rasponu od 31,76 do 41,06 % vol. Neki proizvođači koji tijekom proizvodnje *Biske* dodaju u svoj proizvod šećer ili med, nazivaju ga biljnim likerom. Za likere je Pravilnikom (NN 61/2009) propisano da moraju sadržavati minimalno 100 g/l šećera te alkoholna jakost proizvoda stavljenih na tržište pod tim nazivom mora biti najmanje 15 % vol., što je niža vrijednost u odnosu na uobičajenu alkoholnu jakost travarica. Budući da za analizirane uzorke *Biske* nije poznata koncentracija šećera (ne zna se je li ona iznosi min. 100 g/l) niti je ona tijekom ove analize izmjerena, ne može se sa sigurnošću tvrditi da se uzorci *Biske*, koji imaju nižu vrijednost volumnog udjela etanola, zapravo mogu svrstati u skupinu (biljnih) likera. Pitanje je li *Biska* travarica ili liker, u pogledu dodatka šećera (ili meda) tijekom njezine proizvodnje, dio je koji se tiče deklariranja i važan je samo za industrijski proizvedene uzorke, dok za uzorke iz domaće radinosti to nije bitno jer oni svoje proizvode ne deklariraju.

3.2.5. Određivanje kromatskih karakteristika

Kromatske karakteristike u uzorcima *Biske* određene su spektrofotometrijski. Prema metodi (OIV, 2014), svjetlina (jasnoća) definirana je vrijednostima L koje variraju između potpuno neprozirne (0%) i potpuno prozirne (100%). C vrijednost odgovara čistoći ili zasićenosti boje. Vrijednosti kromatskih koordinata a i b variraju između -a (zelene) i +a (crvene) odnosno između -b (plavo) i +b (žuto). Kut nagiba (parametar h) na CIE Lab dijagramu definira crveno-ljubičastu (0°), žutu (90°), plavo-zelenu (180°) i plavu boju (270°), a zajedno s parametrom C definira ton boje. Na temelju izmjerenih transmitancija analiziranih uzoraka dobivene su kromatske karakteristike koje prikazuje tablica 5.

Tablica 5. Kromatske karakteristike uzoraka *Biske*

uzorak <i>Biske</i>	L	C	a	b	h
1	85,01	57,41	0,73	57,41	1,56
2	89,34	51,88	-2,66	51,81	-1,52
3	76,16	81,00	7,48	80,66	1,48
4	85,08	61,89	-7,52	61,44	-1,45
5	83,44	59,98	-2,63	59,92	-1,53
6	67,55	97,04	22,44	94,41	1,34
7	84,81	48,44	-0,66	48,44	-1,56
8	89,17	34,11	0,07	34,11	1,57
9	92,37	32,38	-4,42	32,08	-1,43
10	77,07	86,63	9,16	86,14	1,47
11	82,22	70,53	2,09	70,49	1,54
12	84,71	48,73	-1,00	48,72	-1,55
13	94,41	19,72	-3,14	19,46	-1,41
14	84,41	58,46	-0,53	58,46	-1,56
15	74,12	76,68	7,56	76,30	1,47
16	55,93	67,74	14,82	66,10	1,35
17	88,64	54,54	-2,52	54,48	-1,53
18	81,34	63,37	1,92	63,34	1,54

Iako su svi uzorci obojani, oni se međusobno vizualno, ali i po izmjerenim kromatskim karakteristikama dosta razikuju. Vrijednosti parametra b u svim uzorcima su pozitivne što znači da imaju žutu nijansu, a nalaze se u širokom rasponu, od 19,46 do 94,41 (najizraženija je u uzorku 6, a najmanje izražena u uzorku 13). U uzorcima 2, 4, 5, 7, 9, 12-14 i 17 vrijednosti za parametar a su negativne tako da u njima, uz žutu, prevladava zelena nijansa (vrijednosti se kreću od -7,52 do -0,66). Za preostalih 9 uzoraka, a-vrijednosti su pozitivne (0,07 do 22,44) i oni su crvenkasto-žute boje. Vrijednosti zasićenja C kreću se, slično kao i za parametar b, u velikom rasponu - od 19,72 do 97,04. Što je vrijednost ovog parametra veća, boja uzorka je čišća tj. udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju je veći. Ispitivani uzorci *Biske* imaju vrlo visoke vrijednosti parametra L (55,93-94,41) zbog čega su jako

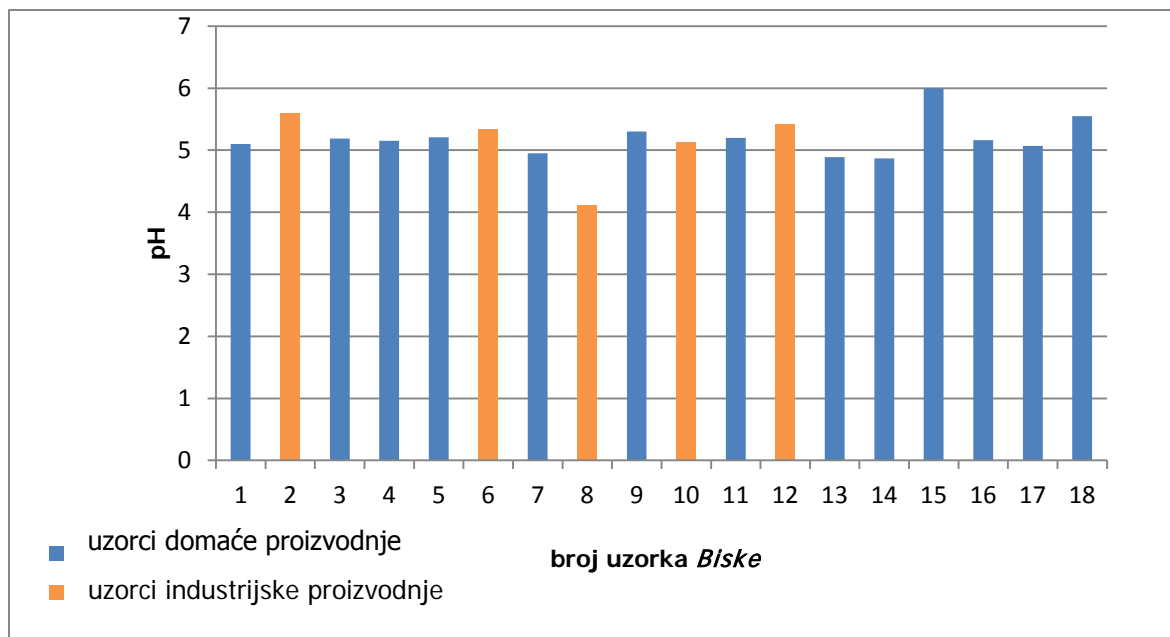
svijetli. Iz rezultata se može primijetiti da za većinu uzoraka vrijedi da su parametri L i C obrnuto proporcionalni tj. ako uzorak ima veći parametar L, imat će manji parametar C i obrnuto (npr. uzorak 13). Kut tona boje (h) definira dominantnu valnu duljinu. Svi uzorci *Biske* imaju nizak kut boje (između $-1,56$ i $1,57^\circ$), što odgovara zeleno-žutom i žuto-narančastom području spektra.

Boja alkoholnih pića važan je pokazatelj njihove kvalitete, što igra ključnu ulogu među potrošačima (Rodriguez-Solana i sur., 2014). Karakteristična boja biljnih likera i rakija, pa tako i *Biske*, varira od slamnato žute do zelenkasto žute boje, a govoreći o rakijama, rezultat je postupka maceracije. Količina suhog ili svježeg lišća i trajanje maceracije utječu na količinu sastojaka koji ulaze u sastav *Biske*, a osobito na pigmente (Mujić, 2010). Ukoliko se lišće suši u hladu, boja gotovog proizvoda je zelenkasta, a ako se suši na suncu, boja lišća, kao i krajnjeg proizvoda, je smeđa. Dužom maceracijom ekstrakcija pigmenata iz lišća i grančica imele je veća, a kao posljedica toga *Biska* poprima tamniju boju. Sličan je slučaj kod proizvodnje crnog vina, tijekom koje se macerira i pokožica grožđa bogata antocijanima čijom ekstrakcijom vino poprima tamniju boju. Isto tako, ako se macerira veća količina lišća i grančica imele, *Biska* će poprimiti tamniju boju.

Uzorci tamnije boje i žućkasto - smeđeg tona imaju niže L vrijednosti i veće vrijednosti a i b, što može biti posljedica dodatka karamela ili prethodno spomenutog dužeg provođenja postupka maceracije. Također, tamnu boju *Biske* može uzrokovati oksidacija polifenola djelovanjem polifenol-oksidadze (i drugih enzima) koji stvaraju melanine i benzokinone iz prirodnih fenola, što rezultira smeđom bojom (Mayer, 2016). S obzirom na spomenuto, na boju *Biske* utječe i udio polifenola - što ih je više oksidirano, boja *Biske* je tamnija. Isto tako, uzrok tamnijoj boji *Biske* može biti neenzimsko posmeđivanje povezano s degradacijom pigmenata za vrijeme maceracije (npr. klorofila) (Heaton i Marangoni, 1996). Općenito, svjetlija boja *Biske* ukazuje na maceraciju svježih imele, a tamnija upućuje da se radi o maceraciji njenih grančica i lišća.

3.2.6. Određivanje pH-vrijednosti

Rezultati analize (slika 14) pokazuju da najveću pH-vrijednost ima *Biska* iz domaće radinosti broj 15 (pH = 6), a najmanju *Biska* broj 8 industrijske proizvodnje (pH = 4,12). Vidljivo je da se pH-vrijednost *Biski* uglavnom kreće oko 5 i da nema veće razlike između uzoraka industrijske i domaće proizvodnje, osim prethodno navedenog maksimuma i minimuma vrijednosti.



Slika 14. pH vrijednosti uzoraka *Biske*

pH-vrijednost je vrlo važno fizikalno-kemijsko svojstvo jer ukazuje na proces proizvodnje rakije, u ovom slučaju *Biske*. Ukoliko je pH niži radi se o maceraciji imele u rakiji jer tijekom proizvodnje rakije (fermentacije) nastaju kiseline koje snižuju pH. S druge strane, viši pH indicira da je imela macerirana u etanolu poljoprivrednog podrijetla (96 % vol.), budući da njegov pH iznosi oko 6. Iz navedenog se može zaključiti da je jedino uzorak broj 15 proizveden maceracijom imele u etanolu, dok su ostali proizvedeni maceracijom imele u rakiji.

Dosta niska pH-vrijednost, kao što je u uzorku 8, dokaz je prisustva kiselina u višim koncentracijama. Razlog je najvjerojatnije loše proveden postupak fermentacije, ili odgođen postupak destilacije nakon procesa fermentacije pri čemu starenjem koma dolazi do oksidacije etanola u octenu kiselinu. Takva rakija poprima loša senzorska svojstva i definira se kao rakija loše kvalitete. Ostali rezultati analiza, pokazali su da uzorak 8 ima vrlo mali udio ukupnih fenola, kao i jedva primjetnu antioksidacijsku aktivnost. Dakle, ova rakija *Biska* proizvedena je dodatkom boje i arome u neku neutralnu rakiju (komovica ili loza) te bi se trebala svrstati u kategoriju umjetnih jakih alkoholnih pića, a proizvođač ju nikako ne bi smio deklarirati kao rakija *Biska*, budući da ne sadrži macerat imele.

5. ZAKLJUČAK

1. Analizirani uzorci *Biske* vrlo su različiti prema fitokemijskim svojstvima. U njima značajno varira udio polifenola odnosno antioksidacijska aktivnost.

2. Najveće koncentracije ukupnih fenola zabilježene su u uzorcima *Biske* industrijske proizvodnje broj 10 i 6 (79,10 i 76,48 mg GAE/100 ml pića), najmanja je izmjerena u uzorku broj 8 (0,10 mg GAE/100 ml pića), dok je prosječna vrijednost ukupnih fenola dosta niska i iznosi 37,21 mg GAE/100 ml pića.

3. Najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene pomoću FRAP metode imaju *Biska* broj 10 (6,92 mM Trolox) i *Biska* broj 6 (6,61 mM Trolox), dok u *Biski* broj 8 uopće nije zamijećena antioksidacijska aktivnost. Time je pokazano da ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost (određena FRAP metodom) izvrsno koreliraju.

4. Pomoću DPPH metode najveće antioksidacijske aktivnosti pokazali su uzorci broj 6 i 3 u kojima inhibicija DPPH radikala iznosi 70,99 odnosno 69,28 %. Usporedbom rezultata za ukupne fenole i za navedenu metodu, vidljivo je da korelacija između njih nije toliko dobra kao s FRAP metodom, a razlog tome je što DPPH metoda ne obuhvaća samo fenolne spojeve nego i druge biološki aktivne komponente *Biske*.

5. *Biska*, prilikom stavljanja na tržište, kao i ostale rakije dobivene maceracijom ljekovitog bilja u komovici, lozi ili etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla (travarice), prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, nema definiranu minimalnu niti maksimalnu alkoholnu jakost. Međutim, ona se najčešće u praksi kreće oko 40 % vol. Rezultati analize pokazuju da je najveći volumni udio etanola izmjerjen u uzorku *Biske* broj 5 te iznosi 46,72 % vol., dok je najmanji izmjerjen u uzorku *Biske* broj 16 i iznosi 24,33 % vol.

6. Svi uzorci su žute boje s obzirom na pozitivne vrijednosti parametra b, a razlikuju se u parametru a koji u 9 uzoraka (2 industrijska i 7 domaće proizvodnje) ima negativnu vrijednost pa su oni žuto-zelene boje, odnosno kod ostalih 9 uzoraka ima pozitivne vrijednosti i oni su crvenkasto-žute boje. Svi uzorci imaju visoke L vrijednosti tako da su vrlo svijetli.

7. pH-vrijednost ukazuje na proces proizvodnje rakije. Uzorak broj 15 koji ima najveću vrijednost (pH = 6) proizveden je maceracijom imele u etanolu, dok su ostali, čije se vrijednosti kreću oko pH = 5, proizvedeni maceracijom imele u rakiji.

6. LITERATURA

1. Aldred E.M. (2009) *Pharmacology: A Handbook for Complementary Healthcare Professionals*, Churchill Livingstone. str. 167.
2. Anonymus 1, <<https://www.tz-buzet.hr/hr/gastronomija/biska>> Pristupljeno 2. srpnja 2018.
3. Anonymus 2, <<https://www.plantea.com/wpcontent/uploads/2015/11/imela-11-200x200.jpg>> Pristupljeno 13. travnja 2018.
4. Aqil F., Ahmad I., Mehmood Z. (2006) Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. *Turkish Journal of Biology* **30**: 177-183.
5. Ball, P. W. (1993): *Viscum L. U: Tutin T. G., Burges N. A., Chater A. O., Edmondson J. R., Heywood V. H., Moore D. M., Valentine D. H., Walters S. M., Webb D. A., ur., Flora Europaea, vol. 1, Psilotaceae to Platanaceae, Cambridge Univ. Press, Inc. str. 86*
6. Barberaki M., Kintzios S. (2002) Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. *Scientia Horticulturae* **95**: 133–150.
7. Barney C. W.; Hawksworth F. G., Geils B. W. (1998) Hosts of *Viscum album*. *European Journal of Plant Pathology* **28**: 187–208.
8. Buckle J. (2015) *Clinical Aromatherapy Essential Oils in Healthcare*, 3.izd., Churchill Livingstone. str. 37-72.
9. Büssing A., Schietzel M. (1999) Apoptosis-inducing properties of *Viscum album* L. extracts from different host trees, correlate with their content of toxic mistletoe lectins. *Anticancer Research* **19**: 23-28.

10. Carrasco L., Vázquez D., Hernández-Lucas C., Carbonero P., García-Olmedo F. (1981) Thionins: plant peptides that modify membrane permeability in cultured mammalian cells. *European Journal of Biochemistry* **116**: 185–189.
11. Dietrich J. B., Ribéreau-Gayon G., Jung M. L., Franz H., Beck J. P., Anton R. (1992) Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single chain ribosome-inhibiting proteins. *Anti-cancer Drugs* **3**: 507–511.
12. Eggenschwiler J., Balthazar L., Stritt B., Pruntsch D., Ramos M., Urech K., Rist L., Simões-Wüst Viviani A. (2007) Mistletoe lectins is not the only cytotoxic component in fermented preparations of *Viscum album* from white fir (*Abies pectinata*), *BMC Complementary and Alternative Medicine* **14**: 1-7.
13. Franz H., Ziska P., Kindt A. (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochemical Journal* **195**: 481–484.
14. Franz H. (1985) Inhaltsstoffe der Mistel (*Viscum album* L.) als potentielle Arzneimittel. *Die Pharmazie* **40**: 97–104.
15. Grba S. (2010) Kvasci u biotehnoškoj proizvodnji, 1. izd., Plejada. str. 250 - 251.
16. Hajtó T., Hostanska K., Gabius H. J. (1989) Modulatory potency of the β -galactosidespecific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Research* **49**: 4803-4808.
17. Heaton J. W., Marangoni A. G. (1996) Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. *Trends in Food Science & Technology* **7**: 8–15.
18. Hermosa R., Cardoza E. R., BelénRubio M., Gutiérrez S., Monte E. (2014) Biotechnology and Biology of Trichoderma, Elsevier. str. 125-137.

19. Hinch D. K., Pfüller U., Schmitt J. M. (1997): The concentration of cryoprotective lectins in mistletoe (*Viscum album* L.) leaves is correlated with leaf frost hardiness. *Planta* **203**: 140–144.
20. Hudák J., Lux A. (1986) Chloroplast ultrastructure of semiparasitic *Viscum album* L. *Photosynthetica* **20**: 223–224.
21. Keršek E. (2008) Ljekovite biljne i voćne rakije: rakijska biljaruša, V.B.Z., Zagreb str. 79 - 80.
22. Kretschmar H. (1955) Hefe und alcohol, Springer-Verlag. str. 579-600.
23. Mayer A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry* **67**: 2318–2331.
24. Mrvčić J., Posavec S., Kazazić S., Stanzer D., Peša A., Stehlik-Tomas V. (2012) Spirit Drinks: A Source of Dietary Polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **4**: 102 –111.
25. Mujic I. (2010) Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića, AGRO-HIT PZ, Bjelovar
26. Nazaruk J., Orlikowski P. (2016) Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. *Natural Product Research* **30**: 373-385.
27. Ochocka J. R., Piotrowski A. (2002) Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.) *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**: 21–28.
28. OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivincultural Origin (2014). Determination of chromatic characteristics (OIV-MA-BS-27). Paris, France: International Organisation of Vine and Wine.
29. Önay-Uçar E., Karagöz A., Arda N. (2006) Antioxidant Activity of *Viscum album* ssp. *Album*. *Fitoterapia* **77**: 556 – 560.

30. Orrù S., Scaloni A., Giannattasio M., Urech K., Pucci P., Schaller G. (1997) Amino acid sequence, S-S bridge arrangement and distribution in plant tissues of thionins from *Viscum album*. *Chemistry and Biology* **378**: 989–996.
31. Park J. H., Hyun C. K., Shin, H. K. (1999) Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters* **139**: 207–213.
32. Peumans W. J., Verhaert P., Pfüller U., Van Damme E. J. (1996) Isolation and partial characterization of a small chitinbinding lectin from mistletoe (*Viscum album* L.). *The Federation of European Biochemical Societies* **396**: 261–265.
33. Pfüller U. (2004) Chemical constituents of European mistletoe (*Viscum album* L.) isolation and characterization of the main relevant ingredients: lectins, viscotoxins, oligo-/polysaccharides, flavonoides, alkaloids. Mistletoe. The genus *Viscum*. Amsterdam, Taylor & Francis e-Library. str. 101–122.
34. Pravilnik o jakim alkoholnim pićima (2009) Narodne novine **61** (NN 61/2009).
35. Rodríguez-Solana R., Salgado J. M., Domínguez J. M., Cortés-Diéguez S. (2014) First Approach to the Analytical Characterization of Barrel-Aged Grape Marc Distillates Using Phenolic Compounds and Colour Parameters. *Food Technology and Biotechnology* **52** (4): 91-402.
36. Sallé G. (1983) Germination and establishment of *Viscum album* L. The biology of mistletoes, Acad. Pr. str. 145–159.
37. Schaller G., Urech K., Grazi G., Giannattasio M. (1998) Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Medica* **64**: 677–678.
38. Schrader-Fischer G., Apel K. (1993) The anticyclic timing of leaf senescence in the parasitic plant *Viscum album* is closely correlated with the selective degradation of sulfur-rich viscotoxins. *Plant Physiology* **101**: 745–749.
39. Showler K. (1974) Raising mistletoe (*Viscum album*) from seed. *Journal of the Royal Horticultural Society of London* **99**: 30–37.

40. Stirpe F., Barbieri L., Battelli M. G., Soria M., Lappi D. A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Bio/Technology* **10**: 405–412.
41. Vicas S., Rugina Socaciu C. (2012) Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*). *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* **7**: 115 – 130.
42. Wangerin W. (1937) Loranthaceae Lebensgeschichte der Blütenpflanzen Mitteleuropas, vol. II/1. Ulmer. str. 953–1146.
43. Weber H. C. (1993a) Parasitismus von Blütenpflanzen. Wissensch. Buchgesellschaft.
44. Zuber D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora* **199**: 181–203.
45. Zuber D., Widmer A. (2000) Genetic evidence for host specificity in the hemi-parasitic *Viscum album* L. (Viscaceae) *Molecular Ecology* **9**: 1069–1073.

Izjava o izvornosti

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

Katarina Filipan

ime i prezime studenta