

Antimikrobna svojstva macerata imele

Bingula, Paulina Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:647207>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Paulina Sara Bingula

7413/BT

Antimikrobna svojstva macerata imele

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ANTIMIKROBNA SVOJSTVA MACERATA IMELE

Paulina Sara Bingula, 7413/BT

Sažetak: Imela je biljka koja se već godinama u narodnoj medicini smatra iznimno zdravom te se koristi protiv mnogih zdravstvenih tegoba. Od imele se pravi poznata Istarska rakija Biska koja se od davnina smatra vrlo ljekovitom. Kako bi se utvrdila antimikrobna aktivnost imele, analizirani su uzorci macerata imele u 25 %, 40 %, 55 % i 70 %-tnom etanolu. Ispitivanje je također provedeno na uzorcima čistog alkohola istog postotka kao i macerati te na četiri komercijalna uzorka Biske. Uzorci su ispitivani na Gram pozitivnim i Gram negativnim bakterijama, bakterijama mliječne kiseline te na kvascima. Svakom mikroorganizmu su određene zone inhibicije za svaki uzorak macerata i Biske te za čistu etanolnu bazu. Najveću zonu inhibicije pokazao je macerat imele u 55 %-tnom etanolu prema Gram negativnoj bakteriji *Salmonella thyphimurium*. Uzorci Biske su najveći utjecaj pokazali na Gram pozitivnu bakteriju *Bacillus subtilis*.

Ključne riječi: imela, Biska, etanol, macerat, inhibicija, mikroorganizmi

Rad sadrži: 23 stranice, 7 slika, 4 tablice, 32 literaturna navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Pomoc pri izdradi: Karla Hanousek Čiča, mag. ing.

Datum obrane: 9.9.2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF MISTLETOE MACERATE

Paulina Sara Bingula, 7413/BT

Abstract: Mistletoe is a plant to which many health benefits are traditionally attributed, which is why it has been used for years in folk medicine to combat various diseases. In Croatia, it is the main ingredient of the popular Istrian brandy Biska, which is known for its exceptional healing properties. The aim of this study is to determine the antimicrobial activity of mistletoe by analyzing samples obtained by macerating mistletoe in solutions of 25%, 40%, 55% and 70% ethanol. The analysis also included samples of pure alcohol at the same percentage as the macerates and four commercial Biska samples. All samples were analyzed for Gram positive and Gram negative bacteria, lactic acid bacteria and yeasts. Each microorganism had to be observed according to its zones of inhibition in each of the three types of samples - mistletoe macerates, Biska and pure ethanol. Ultimately, the study showed that the largest zone of inhibition belonged to the 55% ethanol macerate against Gram-negative *Salmonella typhimurium*. In addition, the Biska samples were found to have the most significant effect on Gram positive *Bacillus subtilis*.

Key words: Mistletoe, Biska, ethanol, macerate, inhibition, microorganisms

Thesis contains: 23 pages, 7 figures, 4 tables, 32 references

Original in: Croatian

Mentor: prof. Jasna Mrvčić, PhD

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

Defence date: 9.9.2021

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Imela	2
2.2 Biološki aktivni spojevi imele	3
2.3. Biska.....	5
2.4. Antimikrobna svojstva začina i aromatskog bilja.....	5
2.5. Antimikrobni mehanizmi.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. Materijali	8
3.1.1. Hranjive podloge	8
3.1.2. Test mikroorganizmi	9
3.1.3. Uzorci.....	9
3.1.4. Kemikalije.....	9
3.2. Metode rada	9
3.2.1 Uzgoj mikroorganizama.....	9
3.2.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti macerata imele i uzoraka Biske.....	10
3.2.3. Određivanje broja stanica.....	10
4. REZULTATI I RASPRAVA	11
5. ZAKLJUČAK	19
6. LITERATURA	20

1. UVOD

Imela (*Viscum album* L.) je trajni zimzeleni grm čije se medicinsko korištenje spominje još u doba Hipokrata, kada su on i njegovi učenici koristili imelu kako bi liječili bolest slezene. Od tada pa do danas, imele se smatra ljekovitom u različitim područjima medicine te se u narodnoj medicini koristi protiv kroničnih grčeva, epilepsije, napadaja histerije, pomaže pri regulaciji krvnog tlaka te stimulira metabolizam čime jača prirodna otpornost tijela prema bolestima (Ramm, 2015).

Začini te aromatsko i ljekovito bilje koriste se od davnina u kulinarstvu radi arome i očuvanja hrane, ali i radi svojih ljekovitih značajki. Kemijski sastav bilja je kompleksan, a svako bilje i začim posjeduje neki specifičan i dominantan sastojak koji pridonosi aromi proizvoda, ali može pridonositi i njegovom antimikrobnom i antioksidacijskom djelovanju. Antimikrobno djelovanje začinskog i aromatskog bilja pripisuje se uglavnom njihovim eteričnim uljima i fenolnim spojevima (Tajkarimi i sur., 2010).

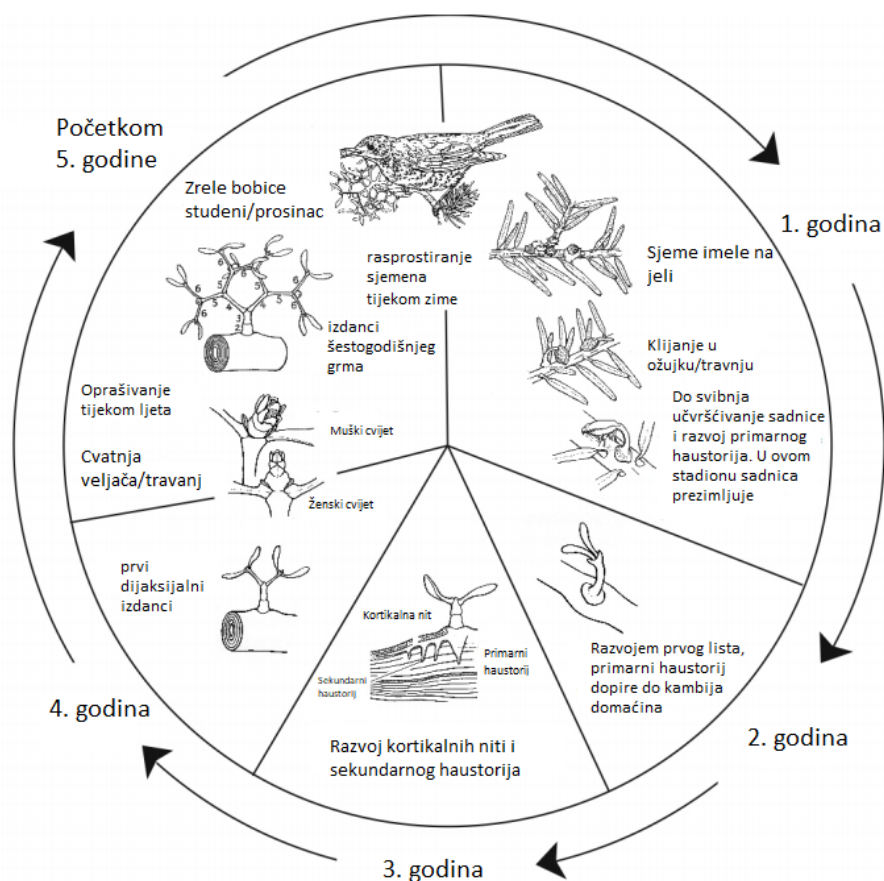
Biska je autentično Istarsko jako alkoholno piće koje se proizvodi maceracijom lišća i grančica imele u alkoholnoj bazi sa ili bez dodatka meda. Kao alkoholna baza najčešće se koristi komovica koja se dobiva destilacijom groždanog tropa (Hanousek Čiča i sur., 2018). Imela je izvor brojnih farmakološki aktivnih spojeva koji se koriste za liječenje nekih nezaraznih bolesti (Luczkiewicz et al., 2001). Tijekom maceracije ti spojevi prelaze u alkoholnu bazu i na taj način ju obogaćuju. Cilj ovog rada je ispitati antimikrobni učinak imele na različite mikroorganizme i time pridonijeti većem shvaćanju njezinog ljekovitog djelovanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Imela

Imela (*Viscum album L.*) je trajni zimzeleni grm koji raste kao poluparazit najčešće na krošnjama bjelogoričnih stabala kao što su breza, topola, hrast, jablan i kruška, te na zimzelenom stablu, jeli. Grm imele može narasti do 150 cm, listovi su duguljasti i kožasti, a boja im varira između maslinastozelene do žutozelene. Plodovi imele su bijele bobice koje sadrže ljepljivi sok što im omogućava da se zalijepe za koru drveta i prokljaju, a plodovi dozrijevaju u zimi. Od ljepljivog soka moguće je napraviti domaće kućno ljepilo i sok, ali njegova konzumacija u većoj količini može biti otrovna (Vrbetić, 2020). Spolno razmnožavanje obično počinje kada biljka dostigne starost od četiri do pet godina. Imele je strogo dvodomna biljka, pa samooplodnja nije moguća, a morfološko razlikovanje muških od ženskih biljaka nije moguće dok ne procvjeta (Slika 1.) (Zuber, 2004). Cvjetovi su sitni i jednospolni, stoje po tri do pet u pazušcima listova u uglovima grana, a tučak nema vrat već je njuška sjedeća. Prilikom klijanja sjemena najprije se razvije organ za pričvršćivanje na granu domaćina, a kasnije nastaje sisaljka koja izlučuje enzime koji razgrađuju stanice kore. Sisaljka (haustrorij) prodire do parenhima kore te crpi vodu sa otopljenim mineralima, a proces fotosinteze se odvija u listovima imele, pa je ona pravi primjer poluparazita. Ako se na domaćinu nalazi prevelik broj grmića, imela postaje opasna te se s vremenom to odražava na zdravstveno stanje domaćina. Najviše je rasprostranjena na području Azije i Europe (Šilić, 1990).

U Francuskoj imela se koristila za živčane poremećaje i epilepsiju, dok se u drugim krajevima koristila za vrtoglavice, moždane udare, krvarenja, za poticanje rada žlijezda te kao pomoć za bolesti srca i slezene. Imela je emenagog, tvar koja pospješuje menstruaciju, pa se ne smije koristiti tijekom trudnoće. Smatralo se da parazitska biljka može utjecati na parazitske bolesti kao što je rak (American botanical council, 2009). Do sada su na tu temu prevedena brojna istraživanja, a većina njih ukazuje na pozitivne učinke korištenja ekstrakta imele kod onkoloških pacijenata te na veću stopu preživljavanja (Ostermann i sur., 2009).

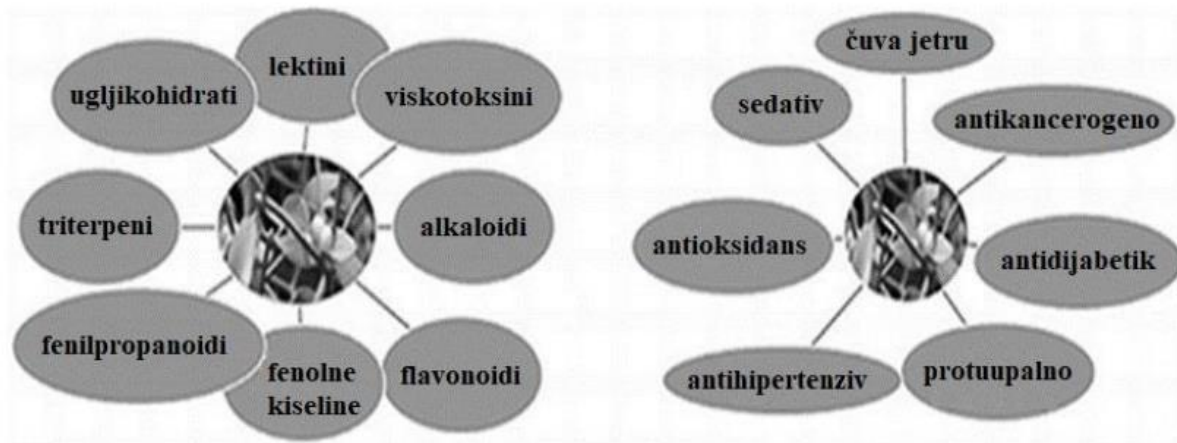


Slika 1. Životni ciklus *Viscum album* L. na jeli (prema Nierhaus-Wunderwald 1997.)

Imela sintetizira većinu svojih komponenata, ali može i apsorbirati određene nutrijente iz biljke domaćina. Biološki aktivne komponente koje možemo dobiti iz imele ovise o načinu proizvodnje, vrsti domaćina i vremenu berbe (Büssing i Schietzel, 1999). Neki od značajnijih do sada identificiranih biološki aktivnih spojeva imele su polifenoli, lektini, viskotoksini, terpeni, fitosteroli, oligosaharidi i polisaharidi (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Imela kao izvor brojnih fitokemikalija je zanimljiv predmet istraživanja, koja pokazuju da ima antitumorske, antidijabetičke, vazodilacijske, protuupalne, antiepileptičke, antipsihotičke i mnoge druge učinke. Njeni se ekstrakti nerijetko koriste u kombinaciji s kemoterapijom (Brito i sur., 2015).

2.2 Biološki aktivni spojevi imele

Tijekom brojnih istraživanja, iz imele je izolirana velika količina različitih kemijskih spojeva, među kojima su najznačajniji polifenoli, lektini, viskotoksini, terpeni, fitosteroli, oligosaharidi i polisaharidi (Slika 2).



Slika 2. Biološki aktivne komponente *Viscum album* L. i njihov utjecaj na čovjeka (prema Nazaruk i Orlikowski, 2016)

Lektini su glavna skupina kemikalija izoliranih iz imele. Poznato je da imaju važnu ulogu u imunološkom sustavu te pomažu u obrani od mikroorganizama. Pripadaju tipu II ribosom-inaktivirajućim proteinima te imaju sposobnost vezanja na ugljikohidrate i na proteine koji sadrže ugljikohidrate (Peumans i sur., 1996; Maverakis i sur. 2015.)

Viskotoksini su amfipatski bazični peptidi koji se sastoje od 46 aminokiselinskih ostataka te sadrže 3 ili 4 disulfidna mosta. Lektini i viskotoksini posjeduju apoptotični i citotoksični utjecaj na stanicu pa ih je moguće koristiti u liječenju tumora (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Citotoksični efekt viskotoksina smanjuje se nakon tretiranja biljke visokom temperaturom. Zbog toga se ekstrakti bijele imele skladište na hladnom kako ne bi došlo do degradacije njezinih komponenata i gubitka bioloških svojstava. Disulfidni mostovi određuju 3D strukturu viskotoksina i njihovu sposobnost vezanja na lipidne membrane pa time predstavljaju vrlo važan faktor za razvijanje njihove citotoksičnosti. Dokazano je da pucanjem disulfidnih mostova viskotoksini u potpunosti gube svoju biološku aktivnost (Park i sur., 1999)

Polifenoli su kemijski spojevi koji biljci primarno služe u obrani od UV zračenja, obrani od patogenih mikroorganizama te pri rastu i razmnožavanju (Manach i sur., 2004). Polifenoli imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost. Antioksidansi se prema načinu djelovanja dijele na

primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni sprečavaju nastajanje novih slobodnih radikala, sekundarni 'hvataju' slobodne radikale i na taj način prekidaju reakcije oksidacije, a tercijarni obnavljaju i uklanjaju oštećene biomolekule koje nastaju u stanju oksidativnog stresa (Shan i sur., 2005; Wojdylo i sur., 2007).

Terpeni su hlapljivi spojevi građeni od izoprenskih jedinica, a jedna izoprenska jedinica se sastoji od pet ugljikovih atoma i dvije dvostruke veze (Buckle, 2015). Triterpeni su vrlo važni sastojci bijele imele jer imaju citotoksično djelovanje slično viskotoksinima, kao i djelovanje slično lektinima što znači da potiču apoptozu. Od skupine triterpena, iz imele je izolirano njih troje: β -amirin acetat, oleanolinska kiselina i betuliska kiselina (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

2.3. Biska

Biska je domaće jako alkoholno piće koje se priprema od domaće komovice, bijele imele i četiri vrste trava. Izvorni recept za pripremu Biske star je otprilike dvije tisuće godina. Recept Biske drevno je nasljeđe starih Kelta koji su živjeli na prostorima Istre. Bijela imela je bila kulturna biljka starih Kelta. Najpoznatija je humska Biska, koja se sprema prema recepturi pokojnog humskog župnika, vrsnog travara Josipa Vidala (TZ Buzet).

Biska se proizvodi maceracijom lišća i grančica imele u alkoholnoj bazi sa ili bez dodatka meda. Kao alkoholna baza najčešće se koristi komovica koja se dobiva destilacijom groždanog tropa. Maceracija je postupak izdvajanja biološki aktivnih tvari iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu (*Hrvatska enciklopedija*). Postupak maceracije traje minimalno trideset dana i ovisi o količini dodanog lišća. Količina bilja koje se macerira utječe na količinu spojeva koji se ekstrahiraju u rakiju. Količina bilja posebno utječe na pigment pa se dužom maceracijom dobiva Biska tamnije boje. Također, rakiju je potrebno svakodnevno miješati, a nakon maceracije može se dodati med ili šećer. Homogenizacija svih dodanih sastojaka traje od 40 do 60 dana. Ako se lišće sušilo u hladu, boja gotovog proizvoda je zelenkasta, a ako se sušilo na suncu boja proizvoda je smeđa (Levak, M., 2019). Biska sadrži komponente arome dobivene iz imele i iz alkoholne baze. Međutim, neki proizvođači koriste rafinirani alkohol kao alkoholnu bazu pa spojevi arome dolaze samo iz imele (Hanousek Čiča i sur., 2018).

2.4. Antimikrobna svojstva začina i aromatskog bilja

Začinsko i aromatsko bilje uzgaja se već tisućama godina u svrhu očuvanja hrane, poboljšanja senzorskih karakteristika hrane te radi njihovih ljekovitih svojstva. Antimikrobno i

antioksidativno djelovanje začina je različito i ovisi o koncentraciji i vrsti aktivnih komponenti, koje su različite kod svakog začina (Tajkarimi i sur., 2010; Charles, 2013). Aktivne komponente začinskog bilja koje pokazuju antioksidativno djelovanje su fenolne kiseline, flavonoidi, prirodni pigmenti i terpeni. Antimikrobno djelovanje pripisuje se uglavnom eteričnim uljima te nekim fenolnim spojevima. Najznačajniji sastojci eteričnih ulja pripadaju grupi cikličkih i ravnolančanih terpenskih ugljikovodika, monoterpenskih alkohola te monoterpenskih aldehida. U biljnim ekstraktima i eteričnim uljima prisutan je velik broj različitih reaktivnih skupina, a svaka ima različit mehanizam djelovanja. Tako se antimikrobna aktivnost ne pripisuje samo jednom specifičnom mehanizmu, već njihovom skupnom djelovanju (Skandamis i sur., 2006).

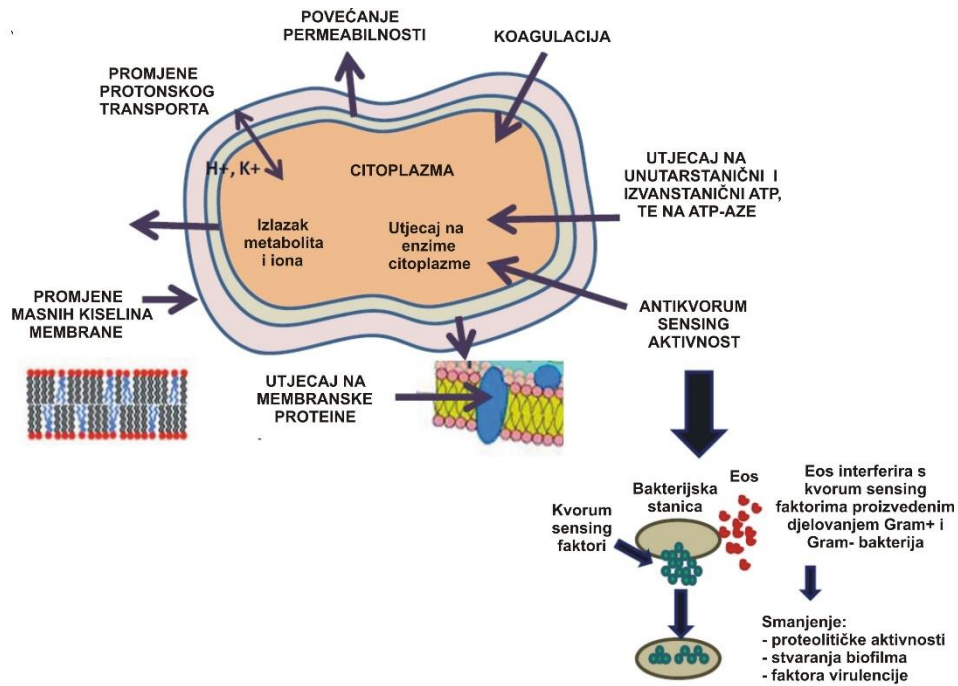
2.5. Antimikrobni mehanizmi

Antimikrobne komponente u vegetativnim bakterijskim stanicama mogu djelovati na staničnu stijenku, citoplazmu ili staničnu membranu (slika 3). Ciklički ugljikovodici djeluju na dva principa:

1. Lipofilne molekule eteričnih ulja se nakupljaju u lipidnom dvosloju i uzrokuju poremećaj interakcije lipid-protein.
2. Dolazi do izravne interakcije lipofilnih molekula s hidrofobnim dijelovima proteina (Sikkema i sur., 1994; Gill i Holley, 2006).

Eterična ulja pojedinih začina djeluju i na stanične proteine koji se nalaze u ili na citoplazmatskoj membrani okruženi lipidnim molekulama (Knobloch i sur., 1989). Pri tome se oštećenja stanice mogu iskazati na više načina. Na primjer: poremećaj replikacije, gubitak integriteta membrane (što uzrokuje istjecanje esencijalnih unutarstaničnih sastojaka), liza stanice ili koagulacijom unutarstaničnog sadržaja (Denyer i Stewart, 1998).

Gram pozitivne bakterije osjetljivije su na antimikrobno djelovanje eteričnih ulja od Gram negativnih bakterija. Gram pozitivne bakterije posjeduju tanju staničnu stijenku, koja je građena od više slojeva peptidoglikana unutar kojeg su teihonske kiseline. Stjenka Gram negativnih bakterija je višeslojna te posjeduje hidrofilnu vanjsku membranu bogatu molekulama lipopolisaharida koja služi kao penetracijska prepreka makromolekulama (Witkowska i sur., 2013).



Slika 3. Mehanizam djelovanja bioaktivnih komponenti na stanicu mikroorganizma (Skandamis i sur., 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Hranjive podloge

Za uzgoj bakterija *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* i *B. subtilis* korišten je hranjivi bujon dok je za ispitivanje antimikrobne aktivnosti pomoću disk-difuzijske metode i određivanje početnog broja bakterija korišten hranjivi agar. Agar je po sastavu jednak hranjivom bujonu, a dodaje se u koncentraciji od 20 g/L kako bi se dobile krute hranjive podloge. Za uzgoj bakterija mliječne kiseline *L. brevis* i *L. kimchii* korištena je MRS (Man-Rogosa-Sharpe) tekuća podloga. MRS čvrsta podloga korištena je za antimikrobnu aktivnost i određivanje početnog broja stanica. Za uzgoj kvasaca korišten je sladni bujon (gotova dehidrirana hranjiva podloga proizvođača Biolife, Italija), a za antimikrobnu aktivnost i određivanje početnog broja sladni agar (Biolife, Italija). Sastavi svih hranjivih podloga prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Sastav hranjivih podloga

MRS	g/L	SLADNI BUJON	g/L
Maltoza	20	Ekstrakt slada	17
Mesni ekstrakt	10	Mikološki pepton	3
Kazein hidrolizat	10		
Kvašćev ekstrakt	10	HRANJIVI BUJON	
K ₂ HPO ₄	5	Mesni ekstrakt	3
NH ₄ -citrat	2	Pepton	5
Na-acetat	2	pH=7	
MnSO ₄ x 4H ₂ O	0,05		
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,10		
Tween 80	1		
Agar (fakultativno)	20		

3.1.2. Test mikroorganizmi

Antimikrobna aktivnost macerata imele i komercijalnih uzoraka Biske određena je disk-difuzijskom metodom mjerenjem zona inhibicije test mikroorganizama: bakterije mliječne kiseline (BMK); *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kimchii*; Gram pozitivne bakterije; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; Gram negativne bakterije; *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* te kvasaca *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia stipitis*, *Candida albicans* uzetih iz zbirke mikroorganizama Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasaca Prehrambeno - biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

3.1.3. Uzorci

Za istraživanje su korištena četiri macerata imele, masene koncentracije biljnog materijala 80 g/L, a volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi 25, 40, 55 i 70 %. Korištena su i četiri komercijalna uzorka Biske u kojima je udio etanola 40%. Također su pripremljene otopine etanola u jednakim postocima kao i kod macerata (25, 40, 55 i 70%). Macerati su pripremljeni u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasaca Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Svi uzorci macerata i Biske koncentrirani su prije provođenja istraživanja 10 puta.

3.1.4. Kemikalije

1. 96% Etanol- proizvođač DR. EHRENSTORFER.

3.2. Metode rada

3.2.1 Uzgoj mikroorganizama

Kulture mikroorganizama koje su korištene u ovom istraživanju čuvane su u epruветama na kosom agaru te su precijepljene u tekuće hranjive podloge za uzgoj prekonoćne kulture. Uzgoj je proveden tako da je pomoću eze uzet dio mikrobne biomase s kosog agara te je nacijepljen u epruветu s 10 mL sterilne hranjive podloge. Epruвете sa tekućom hranjivom podlogom prethodno su sterilizirane u Autoklavu Sutjeska prema uputama proizvođača. Tako dobivene prekonoćne kulture korištene su dalje za provjeru antimikrobne aktivnosti.

3.2.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti macerata imele i uzoraka Biske

Antimikrobna aktivnost uzoraka određivana je mikrobiološkom metodom disk-difuzije, mjerenjem zona inhibicije rasta test mikroorganizama. Na pripremljene hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama naciepljeno je 100 μL prekonodne suspenzije mikrobnih kultura. Suspenzije su razmazane po hranjivim podlogama pomoću štapića po Drigalskom. Broj stanica u prekonodnoj kulturi prikazano je u tablici 4. Na svaku hranjivu podlogu postavljena su četiri disk papirića (promjera 6 mm), te je na svaki disk stavljeno 5 μL uzorka. Dodavanje uzorka ponovljeno je četiri puta pa je na svaki disk ukupno stavljeno 20 μL uzorka. Mjerenje zona inhibicije za bakterije provelo se nakon 24 h, a za kvasce nakon 48 h. Očitavanje rezultata pokusa obuhvaćalo je zamjećivanje zona inhibicije te mjerenje njihovog promjera pomoću ravnala.

3.2.3. Određivanje broja stanica

Određivanje broja stanica u pojedinoj suspenziji provedena je metodom razrjeđenja u mikro kapljicama. Kako bi se provela ova metoda potrebno je pripremiti decimalna razrjeđenja svake suspenzije. U epruvetu je stavljeno 900 μL sterilne vode i 100 μL suspenzije mikrobne kulture i na taj način je pripremljeno prvo decimalno razrjeđenje. Zatim je epruveta s prvim decimalnim razrjeđenjem vorteksirana te je iz nje uzeto 100 μL i preneseno u novu epruvetu sa sterilnom vodom i time je pripremljeno drugo decimalno razrjeđenje. Takvim postupkom pripremljeno je prvih šest decimalnih razrjeđenja. Na poleđini Petrijevih zdjelica nacrtane su tri paralelne crte i na svaku crtu su u jednakim razmacima označe tri točke (slika 3). Po 10 μL 4., 5., i 6. razrjeđenja jedne mikrobne kulture nanoseno je na pojedinu crtu u tri paralele (razrjeđenja su stavljena na svaku nacrtanu točku). Nakon 24 h porasle stanice su prebrojane te je izračunat broj stanica u početnoj suspenziji za svaku mikrobnu kulturu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada bio je ispitati antimikrobna svojstva macerata imele i komercijalnih uzoraka Biske. Kako bi se ekstrahirali eventualni antimikrobni spojevi iz imele te kako bi se odredila najbolja alkoholna baza za ekstrakciju antimikrobnih spojeva, pripremljeni su macerati imele u otopinama etanola različitih sastava. Etanol također ima antimikrobno djelovanje pa je ispitan i njegov utjecaj na test mikroorganizme. U istraživanju su korišteni i komercijalni uzorci Biske. Antimikrobna aktivnost uzoraka određivana je mikrobiološkom metodom disk-difuzije mjerenjem zona inhibicije rasta test mikroorganizama, na način kako je opisano u metodama rada. Rezultati su prikazani u tablicama 2 i 3 te na slikama 4-7.

Tablica 2. Promjer (mm) zona inhibicije rasta test mikroorganizama antimikrobnom aktivnošću uzoraka macerata imele

TEST MIKRO- ORGANIZAM	MACERATI (vol % EtOH)				ETANOL (vol %)			
	3 (25)	6 (40)	9 (55)	12 (70)	25	40	55	70
GRAM+ bakterije								
<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	nd	6,5	8	nd	nd	nd	8
<i>Bacillus subtilis</i>	nd	7	7,5	7	nd	nd	6,5	7
GRAM- bakterije								
<i>Escherichia coli</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	9
<i>Salmonella thyphimurium</i>	nd	nd	9	9	nd	nd	nd	9

Tablica 2 (nastavak). Promjer (mm) zona inhibicije rasta test mikroorganizama antimikrobnom aktivnošću uzoraka macerata imele

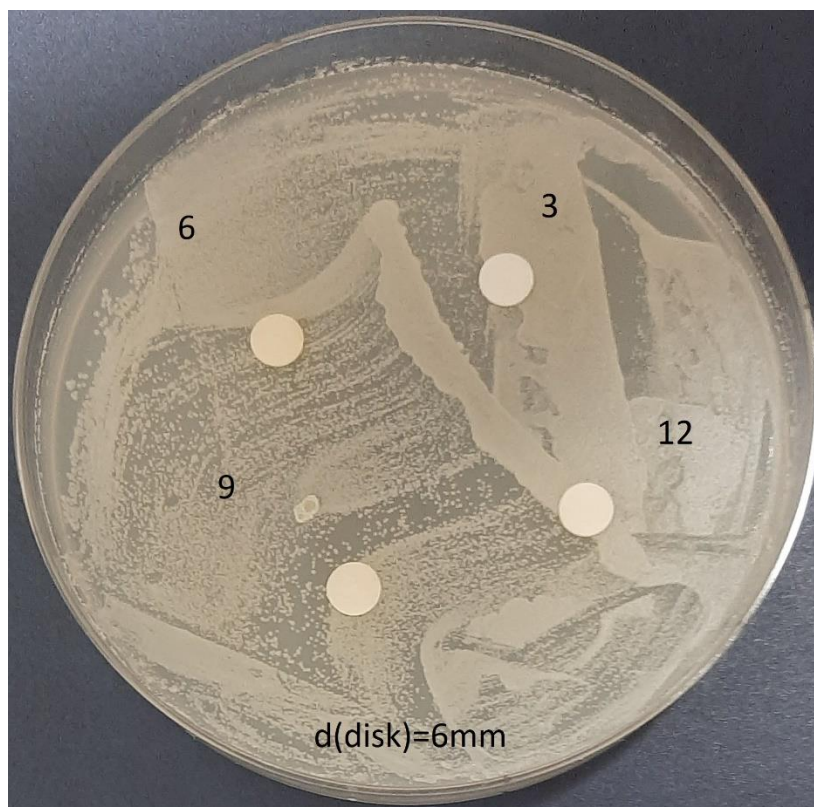
TEST MIKRO- ORGANIZAM	MACERATI (vol % EtOH)				ETANOL (vol %)			
	3 (25)	6 (40)	9 (55)	12 (70)	25	40	55	70
BMK								
<i>Lactobacillus brevis (62)</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8
<i>Lactobacillus kimchii (K12)</i>	nd	nd	7,5	7,5	nd	nd	9	10
KVASCI	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7	8
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>								
<i>Pichia stipitis</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8
<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	8

Tablica 3. Promjer (mm) zona inhibicije rasta test mikroorganizama antimikrobnom aktivnošću komercijalnih uzoraka

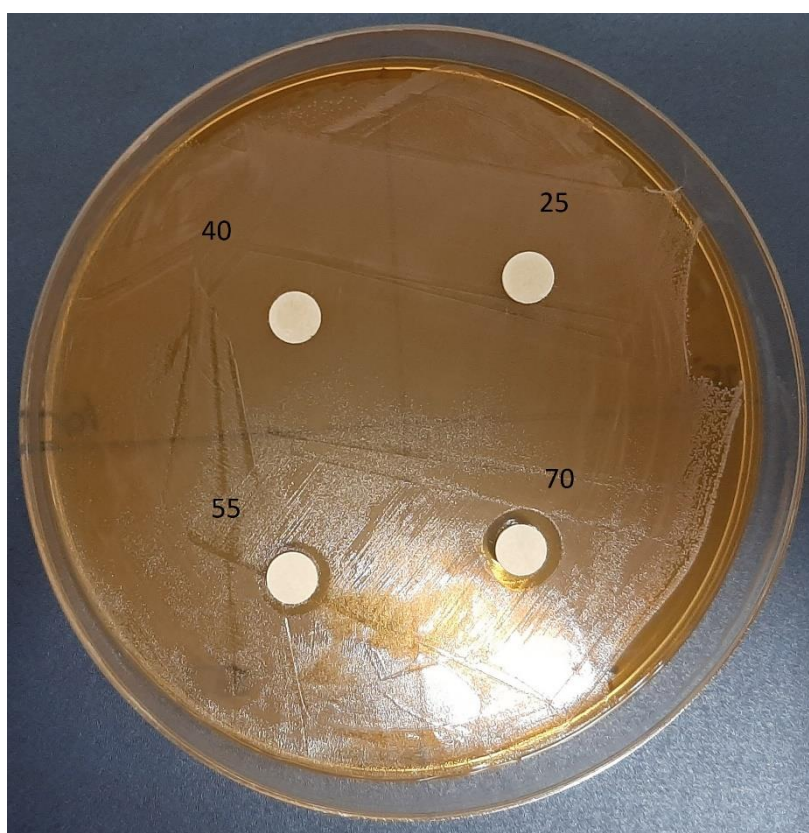
TEST MIKRO-ORGANIZAM	KOMERCIJALNI UZORCI (vol % EtOH)				ETANOL (vol%)
	14,4 (40)	20,4 (40)	177 (40)	830 (40)	40
GRAM + bakterije					
<i>Staphylococcus aureus</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Bacillus subtilis</i>	8	8	nd	7	nd
GRAM - bakterije					
<i>Escherichia coli</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Salmonella thyphimurium</i>	nd	nd	nd	nd	nd
BMK					
<i>Lactobacillus brevis (62)</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Lactobacillus kimchii (K12)</i>	nd	nd	nd	nd	nd
KVASCI					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Pichia stipitis</i>	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	nd	nd

Tablica 4. Broj živih stanica u izvornoj suspenziji

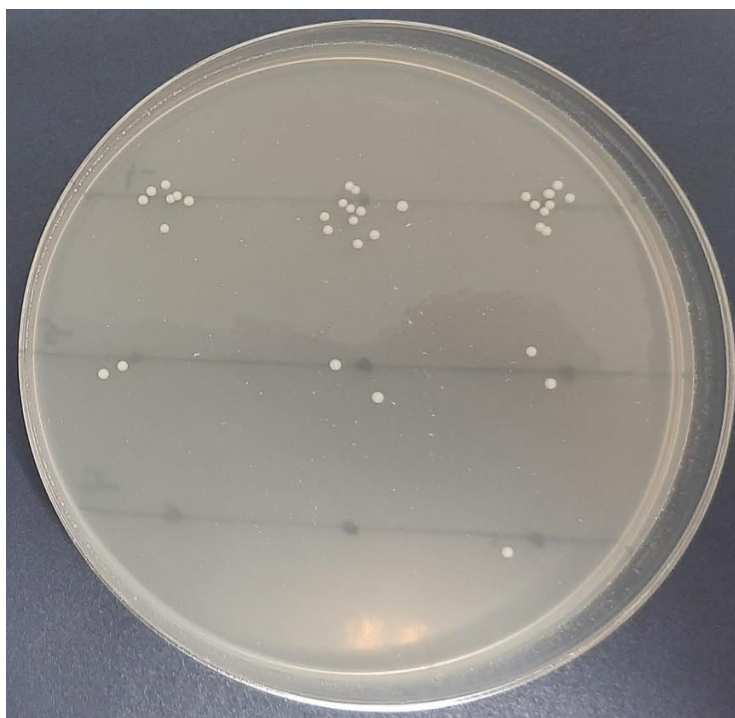
Mikroorganizam	Broj živih stanica (st/mL)
<i>Staphylococcus aureus</i>	$8 \cdot 10^8$
<i>Bacillus subtilis</i>	$23,3 \cdot 10^8$
<i>Escherichia coli</i>	$50 \cdot 10^8$
<i>Salmonella thyphimurium</i>	$20 \cdot 10^8$
<i>Lactobacillus brevis (62)</i>	$0,53 \cdot 10^8$
<i>Lactobacillus kimchii (K12)</i>	$3,67 \cdot 10^8$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2 \cdot 10^7$
<i>Pichia stipitis</i>	$2 \cdot 10^7$
<i>Candida albicans</i>	$13,3 \cdot 10^7$



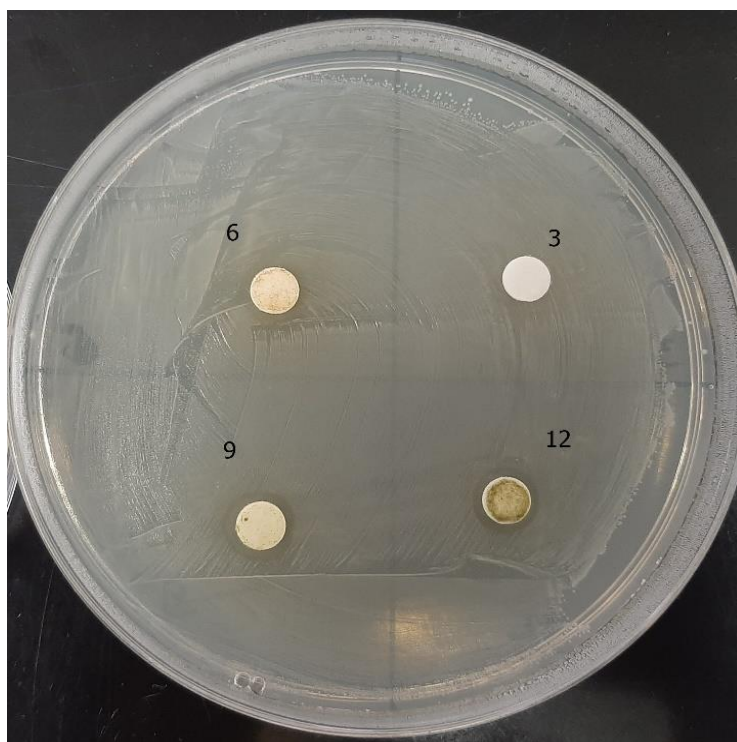
Slika 4. Antimikrobna aktivnost macerata na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*



Slika 5. Antimikrobna aktivnost uzoraka etanola na bakteriju *Lactobacillus kimchii*



Slika 6. Brojanje živih stanica u izvornoj suspenziji metodom razrjeđenja u mikro kapljicama



Slika 7. Zone inhibicije rasta bakterije *Salmonella typhimurium* primjenom macerata imele

Rezultati u tablici pokazuju da macerati nisu pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost. Kako bi potvrdili da uzorci macerata imele i komercijalni uzorci Biske imaju antimikrobni utjecaj (tablice 2 i 3), zona inhibicije koju oni uzrokuju mora biti veća od zone inhibicije koju uzrokuju uzorci etanola u istom postotku. U tablici 4 prikazan je broj živih stanica u izvornoj suspenziji koja je nacijepljena na krute hranjive podloge za provjeru antimikrobne aktivnosti. Gram pozitivna bakterija *Bacillus subtilis* pokazala se kao najosjetljiviji mikroorganizam u ovom ispitivanju te je uočena inhibicija rasta već pri korištenju macerata koji se macerirao u bazi sa 40 % etanola (promjer inhibicije 7 mm, tablica 2). Također, komercijalni uzorci 14.4, 20.4 i 830 uzrokovali su inhibiciju rasta bakterije *Bacillus subtilis* (tablica 3). Najveća zona inhibicije (9 mm, tablica 3, slika 7) uočena je kod Gram negativne bakterije *Salmonella thyphimurium* pri korištenju macerata u bazi s 55% etanola (slika 7). Kod ostalih test mikroorganizama nije uočena inhibicija rasta.

Hussain i sur. (2011) proveli su istraživanje o antimikrobnim svojstvima macerata imele u različitim otapalima; aceton, etil acetat, kloroform, petroleter, etanol, metanol i voda. Od test mikroorganizama koristili su Gram pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, Gram negativne bakterije *Escherichia coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas syringae*, kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i plijesan *Aspergillus flavus*. Rezultati istraživanja pokazuju antimikrobnu aktivnost macerata imele, a najveće djelovanje pokazali su ekstrakti imele macerirani u etil acetatu. Hussain i sur. (2011) su dobili značajniju antimikrobnu aktivnost macerata u etanolu od antimikrobne aktivnosti dobivene u ovom radu. Može se pretpostaviti da je njihovim rezultatima doprinijelo korištenje macerata s većom količinom bilja kao i vrsti domaćina na kojem je imele rasla.

Prema istraživanju (Osadebe i Ukwueze, 2004) uočeno je da imele koje su rasle na različitim domaćinima se ne razlikuju u vrsti kemijskih spojeva, već u njihovoj količini. Kemijski spojevi kao što su alkaloidi, tanini, glikozidi i flavonoidi pronađeni su u svih šest ekstrakata imela koje su rasle na različitim domaćinima. U istraživanju je također zaključeno da zbog različitih količina kemijskih spojeva koje sadrže, imele koje rastu na različitim domaćinima mogu pokazivati različita antimikrobna svojstva.

Nacsá-Farkas i sur. (2014) proveli su ispitivanje u kojem je cilj bio provjeriti antifungalno djelovanje različitog Europskog ljekovitog bilja na *Candida albicans*. Od odabranog bilja, među kojima je bila i *Viscum album*, pripremili su ekstrakte u bazi sa 30 % (v/v) etanola. Njihovi rezultati su pokazali da ekstrakt imele nema nikakvu antifungalnu aktivnost prema *C. albicans*.

Hussain i sur. (2011) dobili su iste rezultate u svojem istraživanju, gdje su kao test mikroorganizme koristili kvasce *S. cerevisiae* i *A. flavus*, na koje ekstrakti imele također nisu pokazali nikakav utjecaj. Navedeni rezultati se slažu s rezultatima dobivenim u ovom radu, gdje također nije dobivena nikakva antifungalna aktivnost prema *C. albicans*, kao ni prema kvascima *S. cerevisiae* i *P. stipitis*. Prema svemu navedenom, može se pretpostaviti da ekstrakti imele nemaju potencijalno antifungalno djelovanje.

5. ZAKLJUČAK

1. Ekstrakti imele (*Viscum album* L.) macerirani u etanolu nisu pokazali značajnu antimikrobnu aktivnost. Najveće antimikrobno djelovanje pokazali su macerati imele macerirani u vodeno etanolnoj bazi s 55 % etanola prema Gram negativnoj bakteriji *Salmonella thyphimurium*.
2. Macerati imele nisu pokazali nikakvo antimikrobno djelovanje na kvasce koji su korišteni u ovom radu.
3. Komercijalni uzorci Biske (14.4, 20.4 i 830) pokazali su slabo antimikrobno djelovanja samo prema Gram pozitivnoj bakteriji *Bacillus subtilis*, dok uzorak 177 nije pokazao nikakvo antimikrobno djelovanje.

6. LITERATURA

American Botanical Council (2009): *Mistletoe – The Mystical and the Medicinal*. <<https://www.herbalgram.org/resources/herbclip/herbclip-news/2009/mistletoe-the-mystical-and-the-medicinal/>> Pristupljeno: 10. lipnja 2021

Buckle J. (2015) *Clinical Aromatherapy Essential Oils in Healthcare*, 3.izd., Churchill Livingstone. str. 37-72

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 (1), 23-28

Brito, A.F., Ribeiro, M., Abrantes, A.M., Pires, A.S., Teixeira, R.J., Tralhão, J.G., Botelho, M.F. (2015) Quercetin in cancer treatment, alone or in combination with conventional therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 22 (26), 3025-3039

Charles, D.J. (2013): *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*, Springer, New York, USA

Denyer, S.P., Stewart, G.S.A.B. (1998): Mechanisms of action of disinfectants, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 261-268. doi: 10.1016/S0964-8305(98)00023-7

Gill, A.O., Holley, R.A. (2006): Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics, *International Journal of Food Microbiology*, 108 (1), 1-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009

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. *Journal of the Institute of Brewing*, 125 (1), 143-154

Hussain, M. A., Khan, M. Q., Hussain, N., Habib, T. (2011) *Antibacterial and antifungal potential of leaves and twigs of *Viscum album* L.* Department of Botany, University of Azad Jammu and Kashmir Muzaffarabad, 5 (23), 5545-5549

Knobloch, K., Pauli, A., Iberl, B., Weigand, H., Weis, N. (1989): Antibacterial and antifungal properties of essential oil components, *Journal of Essential Oil Research*, 1, 119-128. doi: 10.1080/10412905.1989.9697767

Istrapedia. URL: < <https://www.istrapedia.hr/en/natuknice/3926/Biska> > Pristupljeno: 26. kolovoza 2021.

Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R., Piotrowski, A. (2001) Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 58, 373-379

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=37829>> Pristupljeno 25. kolovoza 2021

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 79 (5), 727–747. doi:10.1093/ajcn/79.5.727

Maverakis, E., Kim, K., Shimoda, M., Gershwin, M. E., Patel, F., Wilken, R., ... Lebrilla, C. B. (2015). Glycans in the immune system and The Altered Glycan Theory of Autoimmunity: A critical review. *Journal of Autoimmunity*, 57, 1–13. doi:10.1016/j.jaut.2014.12.002

Nacsá-Farkas, E., Kerekes, E., Kerekes, E. B., Krisch, J., Roxana, P., Vlad, D. C., Ivan, P., Vágvölgyi, C. (2014) Antifungal effect of selected European herbs against *Candida albicans* and emerging pathogenic non-*albicans* *Candida* species. *Acta Biologica Szegediensis*, 58 (1), 61-64

Nazaruk, J., Orlikowski, P. (2016) Phytochemical profile and therapeutic potential of *Viscum album* L. *Natural Product Research*, 30 (4), 373–385. doi:10.1080/14786419.2015.1022776

Osadebe, P., & Ukwueze, S. (2004). A Comparative Study Of The Phytochemical And Anti-Microbial Properties Of The Eastern Nigerian Specie Of African Mistletoe (*Loranthus micranthus*) Sourced From Different Host Trees. *Journal of Biological Research and Biotechnology*, 2 (1), 18-23. doi:10.4314/br.v2i1.28537

Ostermann, T., Raak, C., Büssing, A. (2009) Survival of cancer patients treated with mistletoe extract (Iscador): a systematic literature review. *BMC Cancer* 9, 45. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-451ž>

Park J.H., Hyun C.K., Shin H.K. (1999) Cytotoxic effects of the components in heat-treated mistletoe (*Viscum album*). *Cancer Letters*, 139 (2), 207–213. doi:10.1016/S0304-3835(99)00043-9

Peumans, W.J., Verhaert, P., Pfüller, U., Van Damme, E. J. M. (1996) Isolation and partial characterization of a small chitin-binding lectin from mistletoe (*Viscum album*). *FEBS Journal*, 396 (2-3), 261–265. doi:10.1016/0014-5793(96)01108-8

Ramm, H. (2015) Mistletoe through Cultural and Medical History: The All-Healing Plant Proves to Be a Cancer-Specific Remedy. U: Zänker K.S., Kaveri S.V. (ed.) *Mistletoe: From Mythology to Evidence-Based Medicine*. Arlesheim: Hiscia Institute; Karger, str. 1-10

Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. (2005): Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759. doi: 10.1021/jf051513y

Sikkema, J., Bont, J.A.M. (1994): Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes, *The Journal of Biological Chemistry*, 269, 8022-8028

Skandamis, P., Koutsoumanis, K., Fasseas, K., Nychas, G.J.E. (2006): Inhibition of oregano essential oil and EDTA on *Escherichia coli* O157:H7, *Italian Journal of Food Science*, 13, 65-75

Šilić, Č. (1990) *Atlas drveća i grmlja*. 4. izd. Sarajevo: Svjetlost.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A., Cliver, D.O. (2010): Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control* 21, 1199-1218. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003

Turistička zajednica Buzet. URL: <<https://www.tz-buzet.hr/hr/gastronomija/Biska>>
Pristupljeno: 25. kolovoza 2021.

Vrbetić, G. (2020) Imela- moćna biljka za zdravlje. *Gospodarski list* [online], <<https://gospodarski.hr/rubrike/ljekovito-bilje-rubrike/imela-mocna-biljka-za-zdravlje/>>

Pristupljeno: 25. kolovoza 2021

Witkowska, A.M., Hickey, D.K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M. (2013): Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria, *Journal of Food Research*, 2, 37-54. doi: 10.5539/jfr.v2n4p37

Wojdylo, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs, *Food Chemistry*, 105, 940-949. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.04.038

Zuber, D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. Flora - Morphology, Distribution, *Functional Ecology of Plants*, 199 (3), 181–203. doi:10.1078/0367-2530-00147