Fitokemijski profil, funkcionalna svojstva i fizikalno-kemijski parametri tradicionalne istarske travarice biske

Hanousek Čiča, Karla

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:977937

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Karla Hanousek Čiča

FITOKEMIJSKI PROFIL, FUNKCIONALNA SVOJSTVA I FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI TRADICIONALNE ISTARSKE TRAVARICE BISKE

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Karla Hanousek Čiča

FITOKEMIJSKI PROFIL, FUNKCIONALNA SVOJSTVA I FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI TRADICIONALNE ISTARSKE TRAVARICE BISKE

DOKTORSKI RAD

Mentor:

prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Zagreb, 2022



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Karla Hanousek Čiča

PHYTOCHEMICAL PROFILE, FUNCTIONAL PROPERTIES AND PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF TRADITIONAL ISTRIAN HERBAL SPIRIT BISKA

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:

PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

Zagreb, 2022

Doktorski rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić.

Tema doktorskog rada prihvaćena je na 8. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu za akademsku godinu 2019./2020. održanoj 20. svibnja 2020. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti u okviru doktorskog studija na 12. redovitoj sjednici održanoj 15. rujna 2020. godine.

Informacije o mentoru: dr. sc. Jasna Mrvčić, redovita profesorica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

ŽIVOTOPIS

Jasna Mrvčić rođena je 6. lipnja 1972. godine u Bjelovaru gdje je završila osnovnu i srednju školu. Nakon mature upisala je studij Biokemijskog inženjerstva na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu gdje je diplomirala 1996. godine. Odmah potom zaposlila se kao mlađi asistent na istom fakultetu gdje i danas radi u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na radnom mjestu redovitog profesora.

Ak. god. 1996./1997. upisala je poslijediplomski studij na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, smjer Biokemijsko inženjerstvo. Magistarski i doktorski rad izradila je u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca. Magistrirala je 2005., a doktorirala 2008. godine. Njena znanstvena aktivnost bila je povezana s temom magistarskog i doktorskog rada tj. istraživanjima optimalnih uvjeta i procesa ugradnje iona metala u stanice kvasca i bakterija mliječne kiseline te vezanja mikotoksina pomoću mikroorganizama. Nadalje se bavi istraživanjem fermentacijskih procesa u prehrambenoj industriji: alkoholnom fermentacijom, proizvodnjom i primjenom pekarskog i prehrambenog kvasca, sintezom mikrobnih metabolita te primjenom starter kultura u prehrambenoj industriji. U novije vrijeme bavi se tehnologijom proizvodnje i analitike jakih alkoholnih pića. Ukupno je objavila 38 znanstvenih radova, od čega 24 rada iz skupine a1 i 14 radova iz skupine a2. Sudjelovala je na brojnim znanstvenim i stručnim domaćim i međunarodnim konferencijama.

Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić aktivno sudjeluje i u nastavnom procesu na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nositelj je i suradnik nekoliko predmeta vezanih uz proizvodnju alkohola, jakih alkoholnih pića te proizvodnju i primjenu pekarskog i prehrambenog kvasca. Koautor je i sveučilišnog udžbenika Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji te je do sada bila mentor 20 stručnih praksi, 23 završna rada, 12 diplomskih radova te jedne disertacije. Pohađa radionice i programe usavršavanja visokoškolske nastave.

Osim navedenog prof. dr. sc. Jasna Mrvčić objavila je i 6 stručnih radova u području pekarstva i proizvodnje etanola. U području jakih alkoholnih pića sudjeluje kao predavač na eduktivnim radionicama i stručnim skupovima te kao ocjenjivač.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni poslijediplomski studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam
UDK: 542.63:547.56:582.728.22:663.5(043.3)
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

FITOKEMIJSKI PROFIL, FUNKCIONALNA SVOJSTVA I FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI TRADICIONALNE ISTARSKE TRAVARICE BISKE

Karla Hanousek Čiča, mag. ing. biotechn.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Mentor: Prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

Kratki sažetak: Biska je tradicionalna istarska travarica koja se proizvodi postupkom maceracije lišća i grančica imele (*Viscum album*) u vodeno-etanolnoj bazi, najčešće komovici. Cilj ovog rada je definirati optimalne parametre procesa maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi s obzirom na volumni udio etanola, koncentraciju biljnog materijala i trajanje samog postupka, identificirati i kvantificirati biološki aktivne spojeve u pripremljenim maceratima imele i komercijalnim uzorcima biske, ispitati njihova funkcionalna svojstva (antioksidacijska, antimikrobna i antiproliferacijska), ispitati stabilnost biološki aktivnih spojeva tijekom *in vitro* gastrointestinalne probave te odrediti fizikalno-kemijske parametre uzoraka (pH vrijednost, sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta, kromatske parametre te profil aroma spojeva). Dobiveni rezultati i izvedeni zaključci potvrđuju hipotezu istraživanja da tradicionalna istarska travarica biska sadrži biološki aktivne spojeve imele (fenolne kiseline, flavonoide i kumarine) odgovorne za funkcionalna svojstva biske. Udio fenolnih spojeva u uzorcima ovisi o ispitivanim parametrima maceracije pri čemu statistički značajan utjecaj imaju masena koncentracija biljnog materijala i vrijeme maceracije. Od ispitanih funkcionalnih svojstava, uzorci su pokazali značajnu antioksidacijsku i antiproliferacijsku aktivnost, dok je antimikrobna aktivnost prema odabranim test-mikroorganizmima zanemariva. Fizikalno-kemijski parametri uzoraka rezultat su proizvodnog postupka: kvalitete i količine biljnog materijala, kvalitete vodeno-alkoholne baze te procesnih parametara maceracije. Primjenom određenih optimalnih parametara maceracije pri kojima se postiže najveći sadržaj biološki aktivnih spojeva (80 g L^{-1} imele, 55 % v/v vodeno-etanolna baza te trajanje maceracije 3 tjedna), moguće je unaprijediti proizvodni postupak u cilju proizvodnje biske boljih funkcionalnih svojstava što će doprinijeti dodatnoj valorizaciji biske kao tradicionalnog, autohtonog proizvoda.

Broj stranica: 168
Broj slika: 42
Broj tablica: 17
Broj literaturnih navoda: 252
Jezik izvornika: hrvatski
Ključne riječi: biska, imela, maceracija, fenolni spojevi, funkcionalna svojstva, fizikalno-kemijski parametri
Datum obrane: 6. prosinac 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:
1. Izv. prof. dr. sc. Kristina Radošević
2. Prof. dr. sc. Damir Stanzer
3. Izv. prof. dr. sc. Marin Mihaljević Žulj
4. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac (zamjena)

Rad je pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, Kačićeva 23, Zagreb, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb i na Sveučilištu u Zagrebu, Trg Republike Hrvatske 14, Zagreb.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Ph.D. thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate study in Biotechnology and Bioprocess Engineering, Food Technology and Nutrition
UDK: 542.63:547.56:582.728.22:663.5(043.3)
Scientific Area: Biotechnical Sciences
Scientific Field: Biotechnology

PHYTOCHEMICAL PROFILE, FUNCTIONAL PROPERTIES AND PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF TRADITIONAL ISTRIAN HERBAL SPIRIT BISKA

Karla Hanousek Čiča, mag. ing. biotechn.

Thesis performed at Laboratory for Fermentation and Yeast Technology, Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb
Supervisor: PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

Short abstract: Biska is a traditional Istrian herbal spirit produced by maceration of the mistletoe (*Viscum album*) leaves and twigs in a hydro-ethanolic base, mostly grape marc brandy. The aim of this research is to define optimal maceration parameters of the mistletoe in hydro-ethanolic base with respect to ethanol content, concentration of plant material and duration of the process, to identify and quantify biologically active compounds in prepared mistletoe macerates and biska samples, to examine their functional properties (antioxidant, antimicrobial and antiproliferative), to investigate the stability of biologically active compounds during *in vitro* gastrointestinal digestion and to determine the physico-chemical parameters of the samples (pH value, content of total acids and total extract, chromatic parameters and aroma compounds profile). The obtained results and derived conclusions confirmed the research hypothesis that the traditional Istrian herbal spirit biska contains biologically active compounds of mistletoe (phenolic acids, flavonoids and coumarins) responsible for the functional properties of biska. The content of phenolic compounds in the samples depends on the tested maceration parameters, where the mass concentration of the plant material and the maceration time have a statistically significant influence. Of the tested functional properties, the samples showed significant antioxidant and antiproliferative activity, while the antimicrobial activity against the selected test microorganisms is negligible. The physicochemical parameters of the samples are the result of the production process: the quality and quantity of the plant material, the quality of the hydro-ethanolic base, and the maceration process parameters. By applying the optimal maceration parameters which resulted in the highest content of biologically active compounds (80 g L^{-1} mistletoe, 55 % v/v hydro-ethanolic base and 3 weeks maceration duration), it is possible to improve the production process in order to produce biska with better functional properties. Additionally, that will contribute to the valorization of biska as a traditional, autochthonous product.

Number of pages: 168
Number of figures: 42
Number of tables: 17
Number of references: 252
Original in: Croatian
Key words: biska, mistletoe, maceration, phenolic compounds, functional properties, physicochemical parameters
Date of the thesis defense: December 6th, 2022

Reviewers:
1. PhD Kristina Radošević, Associate Professor
2. PhD Damir Stanzer, Full Professor
3. PhD Marin Mihaljević Žulj, Associate Professor
4. PhD Verica Dragović-Uzelac, Full Professor (substitute)

Thesis deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb, National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb and University of Zagreb, Trg Republike Hrvatske 14, Zagreb).

SAŽETAK

Biska je tradicionalna istarska travarica koja se proizvodi postupkom maceracije lišća i grančica imele (*Viscum album*) u vodeno-etanolnoj bazi, najčešće komovici. Zbog bogatog fitokemijskog sastava imele pretpostavka je da biska, uz spojeve koji joj daju karakterističnu aromu, boju i okus, sadrži i biološki aktivne spojeve imele kao nosioce funkcionalnih svojstava, a koji se tijekom maceracije ekstrahiraju u vodeno-etanolnu bazu. Parametri maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi u cilju proizvodnje biske nisu do sada bili predmet znanstvenih istraživanja. U ovom radu definirani su optimalni parametri procesa maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi s obzirom na volumni udio etanola, koncentraciju biljnog materijala i trajanje samog postupka. Optimalni parametri procesa maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi pri kojima se postiže najveći prinos fenolnih spojeva su 80 g L^{-1} imele, 55 % v/v vodeno-etanolna baza te trajanje maceracije 3 tjedna. Statističkom analizom istraživanih parametara maceracije ($p < 0,05$) utvrđeno je da volumni udio etanola (25, 40, 55 i 70 % v/v) nije značajno utjecao na prinos ekstrahiranih ukupnih fenolnih spojeva. Suprotno utjecaju etanola, masena koncentracija biljnog materijala (20, 40 i 80 g L^{-1}) i trajanje maceracije statistički je značajno utjecala na količinu ukupnih fenolnih spojeva. Pripremljenim maceratima i prikupljenim komercijalnim uzorcima biske napravljena je fitokemijska karakterizacija: ukupni fenolni spojevi (TPC) i ukupni flavonoidi (TFC), te je primjenom ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (UPLC-ESI-MS^2) određen polifenolni profil tj. identifikacija i koncentracija pojedinih polifenolnih spojeva. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u maceratima kreće se od 146,16 do 774,31 mg GAE L^{-1} te u uzorcima biske od 25,51 do 790,98 mg GAE L^{-1}. Sadržaj ukupnih flavonoida u maceratima kreće se u rasponu od 35,59 do 425,98 mg RE L^{-1}. U analiziranim uzorcima identificirana su 43 fenolna spoja od kojih 12 fenolnih kiselina (6 hidroksibenzojevih i 6 hidroksicimetnih kiselina), 18 flavonola, 4 flavona, 4 flavanola, 1 flavanon, 1 izoflavon te 3 kumarina. Od svih fenolnih spojeva najzastupljenija je kvininska kiselina prisutna u koncentracijskom rasponu od 145,33 do 375,42 mg mL^{-1} za macerate i od 18,60 do 357,92 mg mL^{-1} za komercijalne uzorke biske. Nadalje, maceratima i uzorcima biske ispitana su funkcionalna svojstva: antioksidacijska, antimikrobna i antiproliferacijska aktivnost. Rezultati antioksidacijske aktivnosti macerata pokazali su isti obrazac za sve 3 korištene metode (FRAP, DPPH i ABTS): s porastom masene koncentracije imele i volumnog udjela etanola raste i antioksidacijska aktivnost te ACI vrijednost. ACI vrijednost je najveća za macerat M12 (99,94), a najmanja za macerat M1 (11,06). Antioksidacijska aktivnost uzoraka biske mjerena

FRAP metodom krece se u rasponu od 0,28 do 6,91 mM Troloxa, a mjerena DPPH metodom od 1,67 do 70,99 % inhibicije DPPH radikala. Antimikrobna aktivnost uzoraka ispitana je disk-difuzijskom metodom prema određenim test-mikroorganizmima. Ispitivani uzorci macerata i komercijalnih uzoraka biske nisu pokazali inhibicijski učinak na rast odabranih Gram-negativnih bakterija: *Salmonella enterica* s. *Thyphimurium, Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Izmjerena vidljiva zona inhibicije rasta za Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* i kvasac *Candida utilis* iznosila je od 7-10 mm, te je u usporedbi sa kontrolnim antibioticima, antimikrobna aktivnost uzoraka zanemariva. Antiproliferacijska aktivnost uzoraka ispitana je na tumorskoj HeLa i na normalnoj HaCaT humanoj staničnoj liniji. Uzorci su pokazali antiproliferacijski učinak na obje stanične linije, većinom ovisno o primijenjenoj dozi. Najveći antiproliferacijski učinak pokazali su macerati M9 i M12 u volumnom udjelu od 5 % v/v inhibirajući rast 82,41 i 76,9 % tumorskih HeLa stanica te M3 u volumnom udjelu od 10 % v/v inhibirajući rast 72,10 % normalnih HaCaT stanica u usporedbi s kontrolnim stanicama Iako su fenolni spojevi prisutni u maceratima i uzorcima biske nosioci njihovih funkcionalnih svojstava, ona se ne mogu pripisati samo fenolnim spojevima već su rezultat sinergističkog učinka svih bioaktivnih spojeva imele. Kvalitativan i kvantitativan sastav bioaktivnih spojeva u imeli nije stabilan i ovisi o vrsti stabla domaćina i okolišnim uvjetima rasta. Da bi se procijenila bioraspoloživost i stvarni bioaktivni/funkcionalni potencijal fenolnih spojeva macerata imele potrebno je odrediti njihovu stabilnost tijekom gastrointestinalne probave. U tu svrhu korišten je dvofazni model *in vitro* gastrointestinalne probave koji se sastojao od simulacije uvjeta probave u želucu i tankom crijevu. Nakon provedene *in vitro* gastrointestinalne probave koncentracija fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost macerata imele manja je od početnih, neprobavljenih uzoraka. Od fizikalno-kemijskih parametara uzorcima su određeni pH vrijednost, sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta, kromatski parametri te profil aroma spojeva. Sastav vodeno-alkoholne baze značajno utječe na razlike u pH vrijednosti macerata u odnosu na koncentraciju imele. pH vrijednost macerata imele varira između 5,5 i 6,25, pri čemu je najniža pH vrijednost izmjerena u uzorku M1, a najviša u uzorku M11. pH vrijednost komercijalnih uzoraka biske kreću se u rasponu od 4,12 za uzorak B22 do 6,5 za uzorke B9 i B14 s prosječnom pH vrijednosti 5,2. Na sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta značajno utječe masena koncentracija imele. Povećanjem masene koncentracije imele povećava se sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta. Koncentracija ukupnih kiselina u uzorcima varira između 480 i 2880 mg octene kiseline L^{-1}, a sadržaj ukupnog ekstrakta između 4,54 i 19,16 g L^{-1}. Vrijednosti volumnog

udjela etanola u komercijalnim uzorcima biske kreću se u rasponu od 24,33 do 46,72 % v/v, s prosječnim udjelom etanola u uzorcima 37 % v/v te su direktno povezani uz kvalitetu i volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi koju pojedini proizvođači koriste u proizvodnom procesu. Svi dobiveni macerati kao i komercijalni uzorci biske su obojeni te se međusobno vizualno razlikuju što potvrđuju i izmjereni kromatski parametri (*L, a, b, C, h*). Karakteristična boja macerata i uzoraka biske, varira od slamnato žute do zelenkasto žute boje, te je rezultat postupka maceracije. Volumni udio etanola, vrijeme maceracije i količina bilja utječu na ekstrakciju biljnih pigmenata u vodeno-alkoholnu bazu i povezani su s promjenama boje. Primjenom plinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (GC-MS) u dobivenim maceratima i uzorcima biske identificirano je više od 150 različitih aroma spojeva koji pripadaju slijedećim kemijskim skupinama: esteri, alkoholi, uključujući terpenske alkohole, aldehidi, ketoni, acetali, ugljikovodici i terpeni. Analizom spojeva u pojedinim maceratima utvrđeno je da macerati s nižim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) imaju veći udio različitih kiselina, aldehida, alkohola, estera i ketona, dok su macerati s višim udjelom etanola (55 i 70 % v/v) bogati ugljikovodicima i terpenima. U dobivenim maceratima svi detektirani aroma spojevi potječu isključivo iz imele, jer je kao alkoholna baza korišten etanol poljoprivrednog podrijetla dok u uzorcima biske aroma spojevi potječu iz imele te vodeno-alkoholne baze/destilata u kojem je biljni materijal maceriran. Najzastupljenija skupina spojeva u maceratima i komercijalnim uzorcima biske su esteri od kojih je najviše etil estera kratko- i srednjelančanih kiselina odgovornih za voćne i cvjetne note. Dobiveni rezultati i izvedeni zaključci potvrđuju hipotezu istraživanja da tradicionalna istarska travarica biska sadrži biološki aktivne spojeve imele (fenolne ksieline, flavonoide i kumarine) odgovorne za funkcionalna svojstva biske. Udio biološki aktivnih spojeva u biski ovisi o ispitivanim parametrima maceracije. Primjenom optimalnih parametara određenih u ovom istraživanju moguće je unaprijediti proizvodni postupak u cilju proizvodnje biske boljih funkcionalnih svojstava što će doprinijeti dodatnoj valorizaciji biske kao tradicionalnog, autohtonog proizvoda.

SUMMARY

Biska is a traditional Istrian herbal spirit produced by maceration leaves and twigs of mistletoe (*Viscum album*) in a hydro-ethanolic base, usually komovica. Due to its rich phytochemical composition, assumption is that biska, beside compounds which give characteristic aroma, color and taste, also contains biologically active compounds resposible for functional properties, which are extracted into a hydro-ethanolic base during maceration. The parameters of maceration of mistletoe in a hydro-ethanolic base for biska production have not been the subject of scientific research until now. In this paper, the optimal parameters of the maceration process of mistletoe in a hydro-ethanolic base are defined with regard to the volume fraction of ethanol, the concentration of plant material and the duration of the maceration process. The optimal parameters of the maceration process of mistletoe in a hydro-ethanolic base in which the highest yield of phenolic compounds is achieved are 80 g L^{-1} of mistletoe, 55 % v/v hydro-ethanolic base and the 3 weeks maceration duration. Statistical analysis of the investigated maceration parameters ($p < 0.05$) revealed that the volume fraction of ethanol (25, 40, 55 and 70 % v/v) did not significantly affect the yield of extracted total phenolic compounds. Contrary to the influence of ethanol, the mass concentration of plant material (20, 40 and 80 g L^{-1}) and the duration of maceration had a statistically significant effect on the amount of total phenolic compounds. Prepared macerates and collected commercial biska samples were subjected to phytochemical characterization: total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TFC), and using ultra-high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (UPLC-ESI-MS^2) the polyphenolic profile was determined, i.e. identification and the concentration of certain polyphenolic compounds. The content of total phenolic compounds in macerates ranges from 146.16 to 774.31 mg GAE L^{-1} and in biska samples from 25.51 to 790.98 mg GAE L^{-1}. The content of total flavonoids in macerates ranges from 35.59 to 425.98 mg RE L^{-1}. 43 phenolic compounds were identified in the analyzed samples, of which 12 phenolic acids (6 hydroxybenzoic and 6 hydroxycinnamic acids), 18 flavonols, 4 flavones, 4 flavanols, 1 flavanone, 1 isoflavone and 3 coumarins. Among them, quinic acid is the most abundant, present in the concentration range from 145.33 to 375.42 mg mL^{-1} for macerates and from 18.60 to 357.92 mg mL^{-1} for commercial biska samples. Furthermore, macerates and biska samples were tested for its functional properties: antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activity. The results of the antioxidant activity of the macerate showed the same pattern for all 3 methods used (FRAP, DPPH and ABTS): with an increase of the mass

concentration of mistletoe and the volume fraction of ethanol, the antioxidant activity and the ACI value also increase. The ACI value is the highest for macerate M12, 99.94, and the lowest for macerate M1, 11.06. The antioxidant activity of biska samples measured by the FRAP method ranges from 0.28 to 6.91 mM Trolox, and measured by the DPPH method from 1.67 to 70.99 % inhibition of DPPH radicals. The antimicrobial activity of the samples was tested by the disk diffusion method according to certain test microorganisms. The tested macerates and commercial biska samples did not show an inhibitory effect on the growth of selected Gram-negative bacteria: *Salmonella enterica* s. *Typhimurium*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The measured visible zone of growth inhibition for Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and yeast *Candida utilis* was 7-10 mm, and compared to control antibiotics, the antimicrobial activity of the samples is negligible. The antiproliferative activity of the samples was tested on the tumor HeLa and on the normal HaCaT human cell line. The samples showed an antiproliferative effect on both cell lines, mostly depending on the applied dose. The greatest antiproliferative effect was shown by macerates M9 and M12 at 5 % v/v, inhibiting the growth of 82.41 and 76.9 % of tumor HeLa cells, and M3 at 10 % v/v, inhibiting the growth of 72.10 % of normal HaCaT cells in compared with control cells Although phenolic compounds present in macerates and biska samples are carriers of their functional properties, it cannot be attributed to phenolic compounds alone, but is the result of the synergistic effect of all bioactive mistletoe compounds. The qualitative and quantitative composition of bioactive compounds in mistletoe is not stable and depends on the type of host tree and the environmental conditions of growth. In order to assess the bioavailability and actual bioactive/functional potential of the phenolic compounds of mistletoe macerate, it is necessary to determine their stability during gastrointestinal digestion. For this purpose, a two-phase model of *in vitro* gastrointestinal digestion was used, which consisted of simulating digestion conditions in the stomach and small intestine. After *in vitro* gastrointestinal digestion, the concentration of phenolic compounds and the antioxidant activity of mistletoe macerate is lower than the initial, undigested samples. The physico-chemical parameters, the pH value, content of total acids and total extract, chromatic parameters and the profile of aroma compounds were determined. The composition of the hydro-ethanolic base base significantly affects the differences in the pH value of the macerate in relation to the mistletoe concentration. The pH value of mistletoe macerate varies between 5.5 and 6.25, with the lowest pH measured in sample M1 and the highest in sample M11. The pH value of commercial biska samples ranges from 4.12 for sample B22 to 6.5 for samples B9 and B14, with an average pH value of 5.2. The content of

total acids and total extract is significantly influenced by the mass concentration of mistletoe. Increasing the mass concentration of mistletoe increases the content of total acids and total extract. The concentration of total acids in the samples varies between 480 and 2880 mg acetic acid L^{-1}, and the content of the total extract between 4.54 and 19.16 g L^{-1}. The values of the volume fraction of ethanol in commercial samples of biska range from 24.33 to 46.72 % v/v, with an average of 37 % v/v, and are directly related to the quality and volume fraction of ethanol in the hydro-ethanolic base that individual manufacturers use in the production process. All obtained macerates as well as commercial biska samples are colored and visually different from each other, which is also confirmed by the measured chromatic parameters (*L, a, b, C, h*). The characteristic color of macerates and biska samples varies from straw yellow to greenish yellow, and is the result of the maceration process. The volume fraction of ethanol, the maceration time and the amount of herbs affect the extraction of plant pigments into the hydro-ethanolic base and are related to color changes. Using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) in the obtained macerates and biska samples, more than 150 different aroma compounds belonging to the following chemical groups were identified: esters, alcohols, including terpene alcohols, aldehydes, ketones, acetals, hydrocarbons and terpenes. By analyzing the compounds in individual macerates, it was determined that macerates with a lower ethanol content (25 and 40 % v/v) have a higher proportion of various acids, aldehydes, alcohols, esters and ketones, while macerates with a higher ethanol content (55 and 70 % v/v) are rich in hydrocarbons and terpenes. In the obtained macerates, all detected aroma compounds originate exclusively from mistletoe, because ethanol of agricultural origin was used as the hydro-ethanolic base, while in biska samples the aroma compounds originate from mistletoe and the water-ethanolic base/distillate in which the plant material was macerated. The most abundant group of compounds in macerates and commercial biska samples are esters, most of which are ethyl esters of short- and medium-chain acids responsible for fruity and floral notes. The obtained results and derived conclusions confirmed the research hypothesis that the traditional Istrian herbal spirit biska contains biologically active compounds of mistletoe (phenolic acids, flavonoids and coumarins) responsible for the functional properties of biska. The content of biologically active compounds in biska depends on the investigated maceration parameters. By applying the optimal parameters determined in this research, it is possible to improve the production process in order to produce biska with better functional properties, which will contribute to the additional valorization of biska as a traditional, autochtonous product.

ZAHVALE

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jasni Mrvčić, mojoj mentorici, na nesebičnoj pomoći, razumijevanju, savjetima i podršci, ne samo tijekom izrade ovog rada već i u svakodnevnom radu! Hvala i na vrijednim životnim savjetima!

Također, zahvaljujem prof. dr. sc. Damiru Stanzeru na pomoći, potpori i savjetima koji su me pratili od početka ovog puta!

Hvala na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju od prvog dana našeg zajedničkog rada!

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Kristini Radošević i izv. prof. dr. sc. Marinu Mihaljeviću Žulju na potpori, stručnoj i prijateljskoj pomoći!

Zahvaljujem svim dragim kolegicama i kolegama koji su na bilo koji način pridonijeli izradi ovog rada – djelima, riječima i pozitivnom energijom!

Hvala mojoj obitelji na strpljenju, podršci i bezuvjetnoj ljubavi, te na ohrabrenju koji su me vodili ka ostvarenju ovog cilja!

Mojoj dječici, Natali i Benjaminu!

SADRŽAJ

1.UVOD…….…….1

2. TEORIJSKI DIO…….…….3

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA (JAP)……...……..3

2.1.1. Jaka alkoholna pića kroz povijest……..3

2.1.2. Podjela jakih alkoholnih pića……5

2.1.3. Travarice……6

2.1.3.1. Biska……...8

2.1.4. Kemijski sastav jakih alkoholnih pića……...9

2.2. LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE……....11

2.2.1. Upotreba ljekovitog i aromatičnog bilja u proizvodnji JAP-a……....12

2.2.2. Funkcionalna svojstva JAP-a na bazi ljekovitog i aromatičnog bilja……18

2.2.3. Ekstrakcijski postupci……19

2.3. EUROPSKA BIJELA IMELA……..22

2.3.1. Upotreba imele u narodnoj medicini……...25

2.3.2. Biološki aktivni spojevi europske bijele imele……...26

2.3.3. Biološko djelovanje ekstrakta europske bijele imele i njihov farmakološki potencijal……...……31

3. MATERIJALI I METODE……35

3.1. MATERIJALI……35

3.1.1. Biljni materijal…….35

3.1.2. Komercijalni uzorci biske……...35

3.1.3. Kemikalije (kemikalije, puferi, otopine, hranjive podloge).....36

3.1.4. Laboratorijska oprema i uređaji……..38

3.1.5. Test-mikroorganizmi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti…….39

3.1.6. Stanične linije za ispitivanje antiproliferacijske aktivnosti……40

3.2. METODE……...41

3.2.1. Priprema macerata imele……41

3.2.2. Fitokemijska karakterizacija…….....42

3.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC)……42

3.2.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (TFC)……...…..43

3.2.2.3. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (UPLC-ESI-MS^2)……...43

3.2.3. Funkcionalna svojstva uzoraka……...45

3.2.3.1. Antioksidacijska aktivnost……....45

3.2.3.1.1. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom……45

3.2.3.1.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) metodom……..47

3.2.3.1.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metodom……...48

3.2.3.1.4. Ukupni antioksidacijski indeks (ACI)……..49

3.2.3.2. Antimikrobna aktivnost……50

3.2.3.2.1. Priprema hranjivih podloga, kultura test-mikroorganizama i ispitivanih uzoraka……50

3.2.3.2.2. Disk difuzijska metoda……..51

3.2.3.3. Antiproliferacijska aktivnost……51

3.2.3.3.1. Uzgoj i određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo……..51

3.2.3.3.2. Ispitivanje antiproliferacijske aktivnosti primjenom MTS metode...…….53

3.2.3.3.3. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto……...…53

3.2.4. Ispitivanje stabilnosti biološki aktivnih spojeva tijekom *in vitro* gastrointestinalne probave…….54

3.2.5. Fizikalno-kemijski parametri……..55

3.2.5.1. Određivanje pH vrijednosti……..55

3.2.5.2. Određivanje ukupnih kiselina / titracijske kiselosti……..55

3.2.5.3. Određivanje ukupnog ekstrakta……56

3.2.5.4. Određivanje volumnog udjela etanola……..56

3.2.5.5. Određivanje kromatskih parametara…….57

3.2.5.6. Određivanje profila aroma spojeva plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC-MS)……58

3.2.5.6.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)……..58

3.2.5.6.2. Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)……...……....59

3.2.5.7. OAV vrijednost……59

3.2.6. Statistička obrada podataka……60

4. REZULTATI……...61

4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA MACERACIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA……61

4.2. FITOKEMIJSKI KARAKTERIZACIJA……...66

4.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC)……...66

4.2.2. Identifikacija i sadržaj pojedinih fenolnih spojeva……68

4.3. FUNKCIONALNA SVOJSTVA UZORAKA……..74

4.3.1. Antioksidacijska aktivnost……..74

4.3.2. Antimikrobna aktivnost…….....76

4.3.3. Antiproliferacijska aktivnost……...78

4.4. STABILNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA TIJEKOM *IN VITRO* GASTROINTESTINALNE PROBAVE……..83

4.5. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI ……..85

4.5.1. pH vrijednost, ukupne kiseline, sadržaj ukupnog ekstrakta i volumni udio etanola...……85

4.5.2. Kromatski parametri……87

4.5.3. Profil aroma spojeva……89

5. RASPRAVA……..…….....105

5.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA MACERACIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA……...105

5.2. FITOKEMIJSKI KARAKTERIZACIJA……110

5.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC)……110

5.2.2. Identifikacija i sadržaj pojedinih fenolnih spojeva……...114

5.3. FUNKCIONALNA SVOJSTVA UZORAKA……120

5.3.1. Antioksidacijska aktivnost……121

5.3.2. Antimikrobna aktivnost…….....127

5.3.3. Antiproliferacijska aktivnost……130

5.4. STABILNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA TIJEKOM *IN VITRO* GASTROINTESTINALNE PROBAVE……133

5.5. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI ……136

5.5.1. pH vrijednost, ukupne kiseline, sadržaj ukupnog ekstrakta i volumni udio etanola...……..136

5.5.2. Kromatski parametri……..139
5.5.3. Profil aroma spojeva……..141
6. ZAKLJUČCI…….148
7. LITERATURA……..150
8. ŽIVOTOPIS…….....166

1. UVOD

Jaka alkoholna pića su usko povezana s ljudskom prehranom još od davnina. Konzumiraju se većinom na svim društvenim događajima, onim veselim i tužnim, kao znak dobrodošlice, prije jela ili poslije jela, u trenucima zabave ili opuštanja. Nerijetko ih se povezuje sa društvenim/socijalnim statusom: uživanje u kvalitetnim i prepoznatljivim pićima visoke cijene pokazatelj je prestiža i financijske moći pojedinca. Nasuprot tome, jaka alkoholna pića imaju pretežno negativnu konotaciju zbog njihove zloupotrebe koja je nesumnjivo povezana s velikim brojem zdravstvenih, socijalnih i osobnih problema uključujući razvoj ovisnosti o alkoholu i kroničnih bolesti (ciroza jetre, kardiomiopatija, encefalopatija, polineuropatija, demencija) koje na kraju mogu dovesti i do smrtnog ishoda (Arranz i sur., 2012). Međutim, tijekom posljednja dva desetljeća, nekoliko istraživanja pokazalo je da umjereni unos alkoholnih pića, jedno piće dnevno za žene i do dva pića dnevno za muškarce (De Salvo i sur., 2016) ima pozitivne učinke na antioksidacijsku aktivnost, lipidni profil i koagulacijski sustav (Lindberg i Amesterdam, 2008), što dovodi do smanjenja rizika od kardiovaskularnih bolesti (Arranz i sur., 2012), ukupne smrtnosti (Gronbaek i sur., 1995) i drugih bolesti.

Travarice su jaka alkoholna pića posebnog aromatičnog mirisa i okusa, a sadrže uobičajeno oko 40 % v/v etanola. Proizvode se maceracijom jedne ili više vrsta ljekovitog, aromatičnog i začinskog bilja karakterističnog za goransko-mediteransko podneblje u etanolu ili rakijama poput komovice ili loze prema vlastitim recepturama proizvođača. U Hrvatskoj se tradicionalno proizvode u Istri i Dalmaciji. Travarice potječu od nekadašnjih eliksira, koji su se tradicionalno upotrebljavali za dobrobit općeg zdravstvenog stanja i jačanje organizma (Tonutti i Liddle, 2010). Travarice i likeri smatraju se dobrim izvorom biološki aktivnih spojeva, većinom polifenolnih spojeva koji doprinose antioksidacijskoj aktivnosti pića te su predmet brojnih istraživanja (Mrvčić i sur., 2012; Petrović i sur., 2019). Biska je tradicionalna istarska travarica koja se proizvodi postupkom maceracije lišća i grančica bijele imele (*Viscum album*) u vodeno-etanolnoj bazi, najčešće rakiji komovici. U vodeno-etanolnu bazu se iz imele ekstrahiraju različiti spojevi koji biski daju karakterističnu aromu, boju i okus te biološki aktivni spojevi koji su nosioci funkcionalnih svojstava biske. U staroj Grčkoj i Rimu bijela se imela smatrala ljekovitom biljkom čiji su se ekstrakti koristili u medicinske i farmaceutske svrhe. Danas se zna da je imela bogat izvor biološki aktivnih spojeva čiji sadržaj značajno ovisi prije svega o vrsti stabla domaćina na kojem parazitira, ali i o periodu branja. Bijela imela sadrži brojne fitokemikalije kao što su lektini, viskotoksini, polisaharidi, alkaloidi, terpeni, proteini, amini, peptidi, polifenoli, fitosteroli i aminokiseline (Nazaruk i

Orlikowski, 2016). Zahvaljujući bogatom fitokemijskom sastavu bijela imela iskazuje i širok spektar bioloških djelovanja kao što su imunomodulatorno, antioksidacijsko, citotoksično, antihiperzitivno, sedativno, antidijabetsko, te antimikrobno no istraživanja su većinom ograničena na vodene ekstrakte imele dok su alkoholni ekstrakti nedovoljno istraženi.

Upotreba aromatičnog i ljekovitog bilja u ljudskoj prehrani ima pozitivan utjecaj na zdravlje u vidu antioksidacijskog, protuupalnog, antimikrobnog i antitumorskog djelovanja te stimulacije probavnog trakta (Wojdylo i sur., 2007). Maceracija, tehnološki postupak ekstrakcije spojeva iz ljekovitog i aromatičnog bilja u alkoholnoj bazi u cilju proizvodnje travarica, nije znanstveno u potpunosti istražena. Parametri maceracije, kao što su udio etanola u vodeno-etanolnoj bazi, omjer bilja i tekućine, temperatura i trajanje maceracije, utječu na kvalitetu dobivenog macerata (Rodriguez-Solana i sur., 2016a, 2016b; Jovanović i sur., 2017; Caldeira i sur., 2018; Rodriguez-Solana i sur., 2019a; Hanousek Čiča i sur., 2020). Proizvođači travarica postupak maceracije bilja najčešće provode tradicijski, određeno vrijeme, bez točnih saznanja o utjecaju parametara maceracije na količinu i vrstu ekstrahiranih biološki aktivnih spojeva. O vrsti, količini i kvaliteti upotrebljenog bilja, kao i o vremenu i uvjetima provođenja maceracije znatno ovisi količina ekstrahiranih biološki aktivnih i aromatičnih tvari iz bilja.

Budući da parametri maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi za proizvodnju biske nisu do sada bili predmet znanstvenih istraživanja, cilj ovog rada je definirati optimalne parametre procesa maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi s obzirom na volumni udio etanola, koncentraciju biljnog materijala i trajanje samog postupka pri kojima se postiže najveći sadržaj biološki aktivnih spojeva. U pripremljenim maceratima imele i komercijalnim uzorcima biske cilj je identificirati i kvantificirati biološki aktivne spojeve (fitokemijski profil), ispitati njihova funkcionalna svojstva (antioksidacijska, antimikrobna i antiproliferacijska), ispitati stabilnost biološki aktivnih spojeva tijekom *in vitro* gastrointestinalne probave te odrediti fizikalno-kemijske parametre uzoraka (pH vrijednost, sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta, kromatski parametri te profil aroma spojeva). Hipoteze istraživanja: tradicionalna istarska travarica biska sadrži biološki aktivne spojeve imele odgovorne za funkcionalna svojstva biske. Udio biološki aktivnih spojeva u biski ovisi o parametrima maceracije: masenoj koncentraciji biljnog materijala, volumnom udjelu etanola u vodeno-etanolnoj bazi te trajanju maceracije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JAKA ALKOHOLNA PIĆA (JAP)

2.1.1. Jaka alkoholna pića kroz povijest

Iako se alkoholna pića kao što su vino i pivo bila poznata od davnina, ljudi tada nisu znali da je alkohol etanol glavni sastojak alkoholnih pića. Nepoznavanje sastava alkoholnih pića i tehnika destilacije razlozi su što je proizvodnja jakih alkoholnih pića počela mnogo kasnije nego proizvodnja piva i vina. Proizvodnja jakih alkoholnih pića razvijala se i usavršavala usporedno s razvojem uređaja za destilaciju. Smatra se da su arapski znanstvenici u ranom srednjem vijeku upoznali Europljane s tehnikama destilacije. Sama riječ alkohol potječe od arapske riječi „*al-kohl"* koja je označavala fini puder za uljepšavanje žena, a prvi ju je upotrijebio liječnik i kemičar Paracelzus oko 1500. g. kao „*alcohol vini"*, najfiniji sastojak vina.

U srednjem su vijeku Mlečani zbog monopola u trgovini začina donijeli do tada nepoznate biljke u Europu. Te su začinske biljke (kardamon, cimet, češnjak, đumbir, mira, rabarbara, sandolovina) uvozili iz istočne Afrike, Kine, Indije i Indonezije. Zbog toga su od 18. stoljeća nadalje upravo talijanski gradovi Torino, Firenca i Venecija bili najvažniji centri proizvodnje Hipokratovih vina i likera. Najpoznatije takvo piće je vermut koji danas ima posebnu definiciju u europskom zakonodavstvu. Egipćani i Grci već su tada bili upoznati s destilacijskim tehnikama te su ih koristili za proizvodnju destilata različitih aromatskih biljaka. Zatim su tako dobivene destilate koristili za aromatiziranje vina i drugih pića. Destilacija aromatskog bilja je i danas jedna od glavnih tradicionalnih načina ekstrakcije eteričnih ulja. Iako je opijajući karakter vina i piva dobro poznat od davnina, etanol je tek između 1050. i 1150. g. s razvojem destilacijskih tehnika izoliran iz fermentiranih pića. To je omogućilo njegovu upotrebu kao otapala. Tijekom 14. stoljeća etanol, poznat kao „*eau ardente*" ili „*goruća voda*" široko se koristio u liječenju bolesti i sprječavanju epidemija (npr. crna kuga 1348. g.). Terapeutski učinak etanola doveo je do nastanka pogrešne ideje da bi taj alkohol mogao biti neka vrsta „*panacee*" te se u to vrijeme etanol nazivalo „*aqua vitae*" ili u Francuskoj „*eau de vie*" – „*voda života*". Etanol je zahvaljujući svojstvima dobrog otapala brzo postao jedan od najvažnijih sredstava za ekstrakciju hlapljivih i drugih spojeva iz aromatskog bilja. Procesi koji su se u tu svrhu primjenjivali bili su maceracija, perkloracija, digestija i destilacija. Destilacija se koristila za proizvodnju nekoliko vrsta aromatiziranih alkoholnih pića. Zasigurno najpoznatije piće tog vremena bio je *gin* koji se proizvodio

direktnom destilacijom vodeno-alkoholne baze s plodovima borovice. Pisani tragovi o proizvodnji *gina* potječu iz ranog 17. stoljeća iz Nizozemske. U teškim je vremenima *gin* bio poznat kao „*nizozemska snaga*“ te je prethodnik modernog gina. Iako su plodovi borovice i danas osnova *gina*, brojni recepti za *gin* sadrže i različite druge aromatske biljke kao što su korijander, anđelika, limunova korica, papar, itd. Tijekom vremena, promjene u preferenciji potrošača dovele su do stalnog razvoja novih aromatiziranih alkoholnih pića, ekstrakcijskih procesa i receptura u kojima aromatsko bilje i eterična ulja imaju važnu ulogu prirodnih izvora aroma takvih pića. Iz prvih početaka proizvodnje jakih alkoholnih pića, koja su se obavljala u samostanima i apotekama, a kasnije u malih privatnim pogonima, razvila se industrijska proizvodnja jakih alkoholnih pića (JAP) po cijelom svijetu (Tonutti i Liddle, 2010). Budući da su se jaka alkoholna pića prvenstveno proizvodila od lokalno dostupnih sirovina, danas u svijetu postoje jaka alkoholna pića koja su karakteristična za pojedine zemlje (npr. rum - Karipsko otočje, gin - Engleska, votka - Rusija, tequila - Meksiko, sake - Japan) a mnoga su zaštićena oznakom zemljopisnog podrijetla (npr. cognac – Francuska).

Jaka alkoholna pića sastavni su dio ljudske prehrane i posebna skupina uživala koja u Republici Hrvatskoj imaju dugu tradiciju proizvodnje. Industrija proizvodnje jakih alkoholnih pića u Hrvatskoj razvila se na temelju kućne i obiteljske radinosti. Za širenje znanja o destilaciji u srednjem vijeku na prostoru današnje Hrvatske zaslužan je Pietr Buon, talijanski alkemičar i gradski liječnik u Puli i Trogiru. U to vrijeme osim gradskih ljekarni djeluju i samostanske u kojima redovnici izrađuju razne biljne pripravke od ljekovitih biljaka uzgojenih u samostanskim vrtovima. Tako na početku 16. stoljeća dominikanci u Zadru pripremaju aromatični liker od višnje maraske – maraschino. U 16. stoljeću proizvode se destilati iz poljodjelskih kultura o čemu svjedoče pisani dokumenti o konzumaciji jakih alkoholnih pića. U Dalmaciji je proizvodnja rakija počela prije nego u drugim dijelovima Hrvatske zbog utjecaja Mletačke republike koja je bila pionir proizvodnje aromatiziranih rakija na području Europe zahvaljujući trgovini egzotičnih začina (Tonutti i Liddle, 2010). U vrijeme mletačke vladavine dolazi do izvoza rakija i vina iz Dalmacije u Bosnu i Trst. U 18. stoljeću dolazi do razvoja privatnih kućnih destilerija na zadarskom i splitskom području (Josip Calceniga u Zadru, Filipo Frezzo u Splitu) dok se na početku 19.stoljeća osnivaju prve tvornice alkoholnih pića u Splitu, Dubrovniku i Šibeniku. U 19.stoljeću maraskino i industrija likera stječu veliku popularnost. Tako je prijelaz iz 19. u 20. stoljeće obilježila proizvodnja pelinkovca, posebno cijenjenog i popularnog pića. Dolazi i do osnivanja tvornica diljem Hrvatske, a država uvodi monopol na alkoholna pića. Između dva svjetska rata dolazi do

promjena vlasnika tvornica i osnivanja novih (Sisak, Požega, Zadar, Split, Šibenik, Zagreb). Nakon Drugog svjetskog rata zbog političkih previranja dolazi do bitnih promjena u proizvodnji jakih alkoholnih pića. Mnoge su tvornice nacionalizirane te je prekinuta dugogodišnja obiteljska tradicija proizvodnje alkoholnih pića. U drugoj polovici 20. stoljeća dolazi do napretka u proizvodnji jakih alkoholnih pića na cijelom području bivše Jugoslavije ali ga prekida Domovinski rat. U današnje vrijeme osim obnovljene industrijske proizvodnje, proizvodnja jakih alkoholnih pića vraća se na mala obiteljska gospodarstva koja višak proizvedenih sirovina pretvaraju u alkoholna pića koja postaju sastavnim dijelom gastro-turističke ponude te su prezentirana kao dio tradicije i nasljeđa. Zahvaljujući geografskoj i klimatskoj raznolikosti u Hrvatskoj uspijevaju različite sirovine za proizvodnju jakih alkoholnih pića. Tako je za područje Slavonije i Like karakteristična proizvodnja šljivovice dok su za područje Dalmacije i Istre karakteristične rakije od grožđa (komovica, loza) te travarice (Bašić, 2006).

2.1.2. Podjela jakih alkoholnih pića

Jaka alkoholna pića (JAP) su alkoholna pića posebnih senzorskih svojstava koja su namjenjena za ljudsku potrošnju, a sadrže minimalno 15 v/v % etanola. Jaka alkoholna pića mogu biti proizvedena:

1. izravno (i) destilacijom, s ili bez dodatka aroma, prirodno prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla, i/ili (ii) maceracijom ili sličnom preradom bilja u etanolu i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla, i/ili (iii) dodavanjem aroma, šećera ili drugih sladila i/ili drugih poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda etanolu i/ili destilatima poljoprivrednog podrijetla
2. miješanjem jakog alkoholnog pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića, etanolom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog porijekla, te drugim alkoholnim pićima.

Prema Uredbi (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća, etanol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića mora biti isključivo poljoprivrednog podrijetla, te se ne smije osjetiti miris i okus drugačiji od onoga koji potječe od upotrijebljenih sirovina. Dodani etanol smije imati minimalnu alkoholnu jakost od 96 % v/v. Jaka alkoholna pića ne smiju sadržavati etanol sintetičkog podrijetla niti neki drugi alkohol koji nije poljoprivrednog podrijetla. Navedenom Uredbom su definirani uvjeti koje pojedina jaka alkoholna pića moraju zadovoljiti prilikom klasifikacije. Jaka alkoholna pića klasificiraju se u 44 kategorije. Prvih 14

kategorija čine jaka alkoholna pića koja su proizvedena alkoholnom fermentacijom, a zatim destilacijom prevrele voćne, žitne ili šećerne sirovine. Karakterizira ih specifična aroma koja potječe od sirovine iz koje je piće proizvedeno. U njihovoj proizvodnji nije dozvoljeno dodavanje šećera, rafiniranog etanola, biljnih ekstrakata, umjetnih boja i aromatičnih tvari. Dozvoljen je samo dodatak karamela kao sredstva za korekciju boje. Ovdje spadaju rum, whiskey, žitne rakije, rakija od vina, komovica, rakije do voća, voćne komine, jabučnog i kruškovog vina, itd. Ostale kategorije jakih alkoholnih pića (od 15. do 44.) moraju biti proizvedene od poljoprivrednih sirovina, dozvoljen je dodatak etanola, mogu sadržavati prirodne ili prirodno identične aromatične tvari i aromatične pripravke, bojila i zaslađivače kako bi odgovarali posebnim karakteristikama proizvoda. Jaka alkoholna pića koja spadaju u ove kategorije su votka, gin, jaka alkoholna pića aromatizirana anisom, kimom, gorka jaka alkoholna pića ili biteri, likeri, itd. Ostala jaka alkoholna pića koja ne zadovoljavaju kriterije navedenih kategorija (od 1. do 44.) moraju biti proizvedena od poljoprivrednih sirovina i/ili prehrambenih proizvoda namijenjenih za ljudsku potrošnju, te im je dozvoljen dodatak etanola, aromatičnih tvari, bojila i zaslađivača.

2.1.3. Travarice

Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća ne navodi travarice kao posebnu kategoriju jakih alkoholnih pića, ali su nacionalnim Pravilnikom NN 76/2022 navedena dodatna pravila i kriteriji za ostala jaka alkoholna pića u koja spadaju i travarice. Prema njemu se u Republici Hrvatskoj kao rakija travarica označavaju ostala jaka alkoholna pića koje se proizvode na način da se voćnom ili grožđanom masulju ili soku prije destilacije dodaju izgnječeni svježi plodovi ili mljeveno aromatsko bilje odnosno aromatiziranjem vinskog destilata i rakija raznim plodovima, voćem, aromatskim biljem, njihovim maceratima i eteričnim uljima. Za aromatiziranje i/ili spravljanje macerata travarice upotrebljava se odabrano aromatično bilje u količini i sastavu prema vlastitim recepturama proizvođača s osnovnom karakteristikom da prevladavaju aromatske komponente karakteristične za goransko-mediteransko podneblje. Lagano obojenje ovog proizvoda potječe od dodanih macerata aromatičnog bilja, a proizvod može sadržavati dijelove biljaka s kojima je aromatiziran. Travarica se proizvodi tako da se vinskom destilatu ili rakijama od grožđa ili voća dodaju macerati odabranog aromatičnog bilja uvijek u istom omjeru i sastavu, kako bi proizvod zadržao prepoznatljiva, karakteristična senzorska svojstva. 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 % v/v 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 u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla, neutralnim rakijama od grožđa (komovica, lozi) ili voća što je slično proizvodnji biljnih i voćnih likera. U proizvodnji travarica ali i ostalih jakih alkoholnih pića, najčešće korištena metoda ekstrakcije aromatičnih i bioaktivnih spojeva bilja je maceracija u alkoholnoj bazi/destilatu.

Kao alkoholna baza najčešće se koriste voćni destilati (vinski destilat, rakija od voćne komine, rakija od voća ili komovica) koji moraju udovoljavati zahtjevima kvalitete sukladno kategoriji kojoj pripadaju. U Hrvatskoj se najčešće kao alkoholna baza koristi komovica, čija kvaliteta uvelike doprinosi i kvaliteti travarice. Destilati slični komovici proizvode se i u drugim zemljama, posebno u mediteranskoj regiji, kao npr. „*tsipouro*“ u Grčkoj, „*zivania*” na Cipru, „*grappa*” u Italiji, „*aguardente*” u Španjolskoj, „*bagaceira*” u Portugalu, ali i u središnjoj Europi, „*eau-de-vie de marc*” u Francuskoj te „*tshiatshia”* u Gruziji. Komovica se proizvodi destilacijom fermentirane grožđane komine, nusproizvoda u preraadi grožđa koji ostaje nakon prešanja masulja. U proizvodnji komovice može se koristiti svježa komina (dobivena u proizvodnji bijelog vina, sadrži određeni udio šećera te potrebno ju je skladištiti s ciljem provođenja alkoholne fermentacije) ili djelomično prevrela komina (dobivena u proizvodnji crnog vina, sadrži određenu količinu alkohola te se može koristiti odmah kao sirovina za proizvodnju). U slučaju korištenja svježe komine, prije fermentacije potrebno je dokiseliti kominu radi sprječavanja rasta nepoželjnih bakterija i smanjenja aktivnosti pektolitičkih enzima (pH = 3,0-3,3). Slijedi dodatak selekcioniranih kvasaca zbog provođenja kontrolirane fermentacije i dobivanja finije arome budućeg destilata. Temperatura provođenja fermentacije iznosi između 18 i 24 °C, kako bi se spriječila ubrzana fermentacija i gubitak arome. Pri završetku fermentacije, potrebno je čim prije preraditi sirovinu i provesti destilaciju. Destilacijom se odjeljuju hlapivi sastojci iz tekuće smjese na temelju njihovih različitih vrelišta, a cilj je koncentriranje etanola i hlapivih sastojaka koji pridonose kvaliteti rakije te odvajanje sastojaka koji narušavaju kvalitetu rakije. Destilacija prevrele komine temelji se na zagrijavanju složene smjese etanola i vode s drugim različitim hlapivim spojevima do vrelišta, gdje se pare hlapivih sastojaka zajedno s etanolom odvode, kondenziraju i prikupljaju kao destilat. Moguće ju je provesti jednostavnim destilacijskim uređajem, pri čemu je potrebno provesti dvostruku destilaciju, ili složenim uređajem s

kolonama, čime se destilacija provodi jednokratno – na taj način se dobiva destilat visoke alkoholne jakosti. Postupak destilacije započinje punjenjem kotla do ¾ zapremnine s kominom grožđa uz dodatak vode. Kotao se zagrijava čime dolazi do izdvajanja vodeno-alkoholnih para i ostalih sastojaka, poput lako hlapljivih acetaldehida i etil-acetata koji se izdvajaju prvi, ili viših alkohola koji se izdvajaju posljednji. Tijekom destilacije potrebno je odjeljivanje frakcija (prvijenac, srce i patoka) čime se izdvajaju sastojci koji u većoj količini štete kvaliteti destilata i ljudskom zdravlju. Zato se jedino srednja frakcija destilata (srce) koristi za konzumaciju, ali i za proizvodnju drugih jakih alkoholnih pića (Grba i Stehlik-Tomas, 2010). Za kvalitetnu komovicu, prednost imaju sorte grožđa koje imaju izraženu primarnu aromu grožđa, s visokim sadržajem šećera (5-12 %) i visokom koncentracijom kiselina poput muškatnih sorti ili traminca (Nikićević i Tešević, 2010). Pravilnom fermentacijom komine, njenom destilacijom i dozrijevanjem destilata dobiva se alkoholna baza visoke kvalitete koja pozitivno utječe na organoleptička svojstva tj. kvalitetu konačnog proizvoda.

2.1.3.1. Biska

Naziv ove tradicionalne istarske travarice (slika 1) upućuje na sirovinu koja se koristi za njenu proizvodnju, a to je imela, od latinske riječi *Viscum*. Biska se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica imele u etanolu 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 pigmenata pa se tako dužom maceracijom dobiva biska tamnije boje. U rakiju se nakon maceracije može dodati do 50 g L^{-1} meda ili do 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. Recepture za proizvodnju biske koje uključuju dužinu vremena maceracije, količinu i vrstu upotrijebljene rakije kao baze za maceraciju te količinu i vrstu dijelova biljke koji se koriste za maceraciju, razlikuju se od proizvođača do proizvođača.



Slika 1. Biska (Anonymus 1)

2.1.4. Kemijski sastav jakih alkoholnih pića

Budući da su jaka alkoholna pića vrlo raznolika skupina pića, za određivanje kvalitete pojedinog pića nužno je odrediti njegov kemijski sastav. U skladu s tim, kompleksan kemijski sastav različitih jakih alkoholnih pića predmet je brojnih znanstvenih istraživanja. Glavni spojevi ovih pića su voda i etanol koji čine oko 99 % ukupnog sadržaja jakih alkoholnih pića. Osim njih u jakim alkoholnim pićima identificirane su stotine različitih spojeva, koji su prisutni u vrlo niskim koncentracijama, ali su ključni za kvalitetu pića. Kvalitativan i kvantitativan sastav ovih spojeva određuje kvalitetu i karakter pića, a varira ovisno o odabiru odgovarajućih sirovina i njihovim karakteristikama (geografsko podrijetlo, vrijeme berbe, uvjeti uzgoja i skladištenja), procesu fermentacije (vrsta kvasca, parametri), procesu destilacije (oprema i način destilacije), te procesu dozrijevanja/odležavanja pića (uvjeti i vrijeme) (Tešević i sur., 2005). Jaka alkoholna pića su kompleksna smjesa hlapivih i nehlapivih spojeva koji pripadaju različitim skupinama spojeva. Hlapivi spojevi uključuju alifatske karbonilne spojeve, alkohole, monokarboksilne kiseline i njihove estere, spojeve koji sadrže dušik i sumpor, ugljikovodike, terpenske spojeve te heterocikličke i aromatske spojeve. Nehlapivi ekstrakti alkoholnih pića najčešće se sastoje se od nefermentiranih šećera, di- i tribazičnih karboksilnih kiselina, pigmenata, taninskih i polifenolnih spojeva te anorganskih soli. Na temelju kemijskog sastava jakih alkoholnih pića mogu se pratiti promjene u proizvodnom procesu i kvaliteti konačnog proizvoda, kontrolirati sadržaj određenih spojeva koji utječu na aromu pića kao i onih koji mogu negativno utjecati na ljudsko zdravlje (npr. metanol, etil karbamat, cijanovodik), provjeriti autentičnost te odrediti botaničke i geografske karakteristike proizvoda (Sliwinska i sur., 2015). Prvi korak u proizvodnji jakih alkoholnih pića je odabir odgovarajućih sirovina i njihovog oblika. Izbor sirovina ovisi o geografskom položaju i klimatskim uvjetima, načinu skladištenja i vremenu berbe. Voćne rakije i likeri jedni su od najpopularnijih jakih alkoholna pića od voća. Voće se za proizvodnju navedenih pića može koristiti u klasičnom obliku (cijeli plodovi), ili prerađeno u pulpu i/ili sok. Voćne

rakije se najčešće proizvode od šljiva, jabuka, višanja, krušaka, marelica i dunja. Svima je zajednička lijepa, jedinstvena i ugodna aroma karakteristična za sirovinu od koje su proizvedena. U slučaju voćnih rakija, kvaliteta finalnog proizvoda ovisi o prirodnoj aromi voća. Voće sadrži nekoliko stotina spojeva koji imaju kumulativan učinak na aromu. Voćna aroma rezultat je sinergističkog djelovanja točno određenog omjera i koncentracija nekoliko spojeva, a koji pojedinačno ne iskazuju takva svojstva kao što su heksil 2-metilbutanoat, heksil acetat te etil heksanoat koji su odgovorni za karakterističnu aromu jabuke (Soukoulis i sur., 2013). Nadalje, neki su spojevi prisutni u različitim vrstama voća te kao takvi nisu nosioci karakteristične arome. Takvi su npr. linalol, nonanal, (E)-2-heksenol te limonen. Veliki utjecaj na doživljaj arome ima koncentracija spojeva, npr. eugenol prisutan u niskim koncentracijama ima voćnu aromu dok pri visokim ima oporu (Aubert i sur., 2005). Važan faktor u određivanju arome ima i botaničko podrijetlo voća, tj. razlike u kemijskom sastavu između različitih kultivara jedne vrste voća. Tako je terpen α-farnezen prisutan u kultivarima šljiva *P. salicina* i *P. domestica*, dok u *P. cerasifera, P. ussuriensis* i *P. spinosa* nije (Chai i sur., 2006). Spojevi s pripadajućom opisnom aromom koja je vjerojatno odgovorna za karakterističnu aromu odabranog voća prikazani su u tablici 1 (Sliwinska i sur., 2015).

Tablica 1. Spojevi s opisnom aromom odgovorni za aromu voća (Sliwinska i sur., 2015)

Spoj	***Aroma***	***Vrsta voća***
γ-dekalakton	na šljivu	šljiva
Oktil acetat	na krušku, voćna	kruška
Etil (2E,4Z)-2,4-dekadienoat	na krušku	kruška
(E,Z)-2,6-nonadienal	na dinju, krastavac	dinja
Heksil 2-metilbutanoat	zelena	jabuka
Nonanal	cvjetna, voćna, zelena, drvena	različito voće
(R)-limonen	citrusna	grejp
2-fenilacetaldehid	slatka, cvjetna	dinja
(E)-2-heksenol	zelena, na jabuku	jabuka
Etil cinamat	voćna	koštuničavo voće
Benzaldehid	na badem	koštuničavo voće
Cijanovodična kiselina	na gorki badem	koštuničavo voće
Izopentil propanoat	voćna, slatka, na šljivu	šljiva
1-heksenol	na travu, voćna	različito voće
6-metil-5-hepten-2-on	cvjetna	šljiva
(E,E)-2,4-dekadienal	zelena	kruška
linalol	cvjetna, na šljivu	različito voće

Osim odabira odgovarajućih sirovina, procesi fermentacije te zatim destilacije utječu na nastanak spojeva koji pak utječu na kvalitetu konačnog proizvoda. Za proces fermentacije važno je odabrati odgovarajuću vrstu kvasca i fermentacijske parametre kao što su pH vrijednost i temperatura dok destilacijski proces ovisi o vrsti opreme. Da bi se osigurala vrhunska kvaliteta takvih proizvoda sve faze proizvodnje moraju biti pravilno provedene. Pravilnim odabirom i provedbom ovih procesa ne samo da se osigurava visokokvalitetan proizvod, već se ograničava i sadržaj nepoželjnih te ponekad po zdravlje opasnih spojeva. U proizvodnji šljivovice ne-*Saccharomyces* vrste kvasaca odgovorne su za veće koncentracije estera i metanola dok je upotreba *S. cerevisiae* rezultirala većom koncentracijom viših alkohola (Satora i Tuszynski, 2010). Budući da se po završetku destilacije dobiva sirovi destilat kojeg karakteriziraju neharmoničan te oštar miris i okus, proces odležavanja nužan je korak u proizvodnji jakih alkoholnih pića, prvenstveno voćnih i žitnih rakija koji utječe na njihov kemijski sastav i organoleptičku kvalitetu. Upravo su senzorske (organoleptičke) karakteristike, okus i aroma pića glavni atributi koje pri odabiru potencijalni potrošač uzima u obzir. Znajući da su organoleptička svojstva pića ključna stvar pri privlačenju novih potrošača, proučavanje spojeva koje doprinose senzornim svojstvima pića ključno je za poboljšanje kvalitete jakih alkoholnih pića.

2.2. LJEKOVITO I AROMATIČNO BILJE

Od davnina su ljekovite, aromatične i začinske biljke prisutne u ljudskoj prehrani i liječenju bolesti. Termin ljekovito i aromatično bilje odnosi se na velik broj biljnih vrsta koje imaju široku primjenu u farmakologiji, kozmetici, prehrambenoj industriji te industriji jakih alkoholnih pića zbog jedinstvenih karakteristika fitokemikalija koje sadrže (Piccolella i sur., 2018). Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije biljka se može zvati ljekovitom ako u pojedinim dijelovima/organima (npr. list, korijen, rizom, kora, stabljika, cvijet, plod, sjemenka) ili više njih sadrži spojeve koji se mogu koristiti u terapeutske svrhe ili su prekursori za kemo-farmaceutske polusinteze. Aromatično bilje je za razliku od prethodnog bogato eteričnim uljima zbog kojih imaju senzorska svojstva te se mogu koristiti za proizvodnju aroma i parfema. Procjenjuje se da se u razvijenim zemljama 70-95 % populacije koristi tradicionalne lijekove kao primarnu zdravstvenu zaštitu (WHO, 2011). Zbog toga je

WHO objavio niz monografija o odabranom ljekovitom bilju kako bi javnosti pružili znanstvene informacije o sigurnosti, učinkovitosti i kontroli kvalitete široko korištenih ljekovitih biljaka (WHO, 1999, 2003, 2007, 2009, 2010). Nadalje, broj znanstvenih studija o učinkovitosti i važnosti ljekovitog bilja u liječenju različitih bolesti u stalnom je porastu u posljednjim desetljećima. Liječenje ljekovitim biljkama (fitoterapija) ima i sve važniju gospodarsku ulogu, ponaprije zbog visokih troškova zdravstvenog osiguranja ali i „povratka prirodi“ i dodatnih mogućnosti pri liječenju i sprječavanju akutnih i kroničnih bolesti. Međutim, tek je za 15 % takvih biljaka od oko 300 000 vrsta u svijetu određen farmakološki potencijal što daje dodatan poticaj za razvoj novih biljnih preparata (Palhares i sur., 2015). Na tržištu se danas mogu naći različiti proizvodi na bazi ljekovitih i aromatičnih biljaka, a mogu sadržavati neprerađene i prerađene dijelove biljaka (kora, lišće, cvjetovi, plodovi, korijenje, stabljike) u obliku ekstrakta i/ili eteričnog ulja. Takvi proizvodi prisutni su u različitim oblicima kao što su začini, čajevi, tinkture, infuzije, prahovi, tablete, kapsule i eliksiri. Također, mogu se pojaviti u samostalnom obliku ili u formulaciji s drugim spojevima kao što su vitamini, aminokiseline te nenutritivni spojevi. Takvi proizvodi su zahvaljujući nutritivnim i zdravstvenim djelovanjem svoju primjenu našli u kulinarstvu, industriji, farmaciji. Većinom imaju GRAS status i odlična su zamjena za kemijske aditive (Nieto, 2017).

2.2.1. Upotreba ljekovitog i aromatičnog bilja u proizvodnji JAP-a

U proizvodnji jakih alkoholnih pića koriste se različite biljne vrste, osobito one bogate aromatičnim spojevima budući da biljni materijal najčešće služi za aromatiziranje jakog alkoholnog pića. Na taj način jako alkoholno piće poprima prepoznatljivu, karakterističnu biljnu aromu (okus i miris). Bilje je pored aromatičnih komponenti bogat izvor i bioaktivnih spojeva među kojima su najbrojniji polifenoli, fitoaleksinim, alkaloidi, kumarini, lignini, organske kiseline, itd. (Saroya, 2011). Funkcionalne i senzorne karakteristike pića ovise od koncentraciji, kombinaciji i kemijskom sastavu upotrijebljenog bilja. Kemijski sastav bilja varira ovisno o korištenom dijelu biljke, lokaciji, vremenu berbe, uvjetima skladištenja i mnogih drugih. U tablici 2 je dan pregled najčešće korištenih biljnih vrsta u industriji jakih alkoholnih pića. Jaka alkoholna pića, u čijoj proizvodnji se koristi ljekovito, aromatično i začinsko bilje su gorke rakije ili biteri, likeri, aromatizirane rakije/travarice, gin, itd. (Veljković i Stanković, 2003; Tonutti i Liddle, 2010).

Tablica 2. Biljke koje se najčešće koriste u proizvodnji jakih alkoholnih pića (Veljković i Stanković, 2003)

Naziv	***Latinski naziv***	***Dio biljke koji se koristi***	***Jaka alkoholna pica (JAP)***
Anđelika	*Archangelica officinalis*	Korijen, eterično ulje, macerat	Rakije, gin, aromatizirana JAP, likeri
Anis	*Pimpinella anisium*	Sjeme, korijen, eterično ulje, macerat	Rakije, aromatizirana JAP, likeri
Brđanka	*Arnica montana*	Korijen, macerat, perkolat	Gorke rakije, aromatizirana JAP, likeri
Matičnjak	*Melissa officinalis*	Listovi	Likeri, aromatizirana JAP
Bosiljak	*Ocimum basilicum*	Nadzemni dijelovi	Aromatizirana JAP
Blaženi čkalj	*Cnicus benedictus*	Nadzemni dijelovi	Likeri
Bizonova trava	*Hierochloe odorata*	Nadzemni dijelovi	Vodta
Čičak	*Arctium lappa*	Korijen	Aromatizirana JAP
Obični iđirot	*Acorus calamus*	Korijen, eterično ulje, macerat, perkolat	Gorke rakije, aromatizirana JAP, likeri
Kim	*Carum carvi*	Sjeme, eterično ulje, macerat	Rakije, gin, likeri aromatizirana JAP
Kardamom	*Eletaria cardamomum*	Sjeme, eterično ulje	Rakije, likeri aromatizirana JAP
Karanfil	*Dianthus caryophyllus*	Cvjetovi, eterično ulje, macerat	Gorke rakije, aromatizirana JAP, likeri
Celer	*Apium graveolens*	Sjeme, eterično ulje	Likeri
Muškatna kadulja	*Salvia sclarea*	Cvjetovi, listovi, eterično ulje	Aromatizirana JAP, likeri
Neven	*Calendula officinalis*	Cvjetovi	Aromatizirana JAP, likeri
Korijander	*Coriandrum sativum*	Sjeme, eterično ulje, macerat	Rakije, gin, likeri aromatizirana JAP
Maslačak	*Taraxacum officinale*	Cvjetovi, korijen	Aromatizirana JAP, likeri
Kopar	*Anethum graveolens*	Sjeme	Aromatizirana JAP, likeri
Oman	*Inula helenium*	Korijen, macerat, perkolat	Aromatizirana JAP, likeri
Kičica	*Erythraea centaurium*	Cvjetajući nadzemni dijelovi	Gorke rakije
Žuto smilje	*Helichrysum arenarium*	Cvjetovi	Likeri
Komorač	*Foeniculum vulgare*	Sjeme, eterično ulje, macerat	Aromatizirana JAP, likeri
Galangal	*Alpinia officunarum*	Korijen, eterično ulje, macerat	Rakije, likeri
Timijan	*Thymus vulgaris*	Listovi, macerat	Aromatizirana JAP, likeri
Srčanik/lincura	*Gentiana lutea*	Korijen, macerat	Rakija

Tablica 2 (nastavak). Biljke koje se najčešće koriste u proizvodnji jakih alkoholnih pića (Veljković i Stanković, 2003)

Naziv	***Latinski naziv***	***Dio biljke koji se koristi***	***Jaka alkoholna pica (JAP)***
Dubačac	*Teucrium chamaedrys*	Nadzemni dijelovi	Likeri
Kamilica	*Matricaria chamomilla*	Cvjetovi, eterično ulje, macerat	Likeri
Đumbir	*Zingiber officinale*	Korijen, eterično ulje, macerat	Likeri
Izop	*Hyssop officinalis*	Nadzemni dijelovi, eterično ulje	Likeri
Borovica/kleka	*Juniperus communis*	Plodovi, eterično ulje	Rakije, gin, genever, borovička
Lavanda	*Lavandula officinalis*	Cvjetovi, eterično ulje	Likeri
Sladić	*Glycyrrhiza glabra*	Korijen, macerat, perkolat	Rakije, likeri
Ljupčac	*Levisticum offcinale*	Nadzemni dijelovi, cvjetovi, eterično ulje	Likeri
Prava srčenica	*Leonorus cardiaca*	Nadzemni dijelovi	Aromatizirana JAP, likeri
Iris	*Iris germanica*	Korijen, eterično ulje, tinktura	Rakije, likeri
Maćuhica	*Viola tricolor*	Nadzemni dijelovi, cvjetovi	Aromatizirana JAP, likeri
Paprena metvica	*Mentha piperita*	Listovi, eterično ulje, macerat	Aromatizirana JAP, likeri
Rimska kamilica	*Anthemis nobilis*	Cvjetovi	Likeri
Rimski pelin	*Artemisia pontica*	Nadzemni dijelovi	Likeri
Ružmarin	*Rosmarinus officinalis*	Listovi, eterično ulje, macerat	Likeri
Šafran	*Crocus sativus*	Cvjetovi, macerat, perkolat, tinktura	Rakije, likeri
Kadulja	*Salvia officinalis*	Listovi	Aromatizirana JAP, likeri
Kantarion/gospina trava	*Hyperycum perforatum*	Nadzemni dijelovi, cvjetovi	Aromatizirana JAP, likeri
Čubar	*Satureja hortensis*	Nadzemni dijelovi	Aromatizirana JAP, likeri
Žuti kokotac	*Melilotus officinalis*	Nadzemni dijelovi, eterično ulje	Likeri
Mažuran	*Majorana hortensis*	Nadzemni dijelovi, eterično ulje	Aromatizirana JAP, likeri
Estragon	*Artemisia dracunculus*	Listovi, macerat, perkolat	Aromatizirana JAP, likeri
Odoljen	*Valeriana officinalis*	Korijen, eterično ulje	Aromatizirana JAP, likeri
Majčina dušica	*Thymus serpyllum*	Nadzemni dijelovi, cvjetovi	Aromatizirana JAP, likeri
Lazarkinja	*Asperula odorata*	Nadzemni dijelovi, cvjetovi	Rakije, votka
Pravi pelin	*Artemisia absinthium*	Nadzemni dijelovi, macerat, perkolat	Gorke rakije, aromatizirana JAP, likeri

U Hrvatskoj je upotreba bilja u proizvodnji jakih alkoholnih pića, većinom travarica tradicionalno vezana uz mediteransku regiju (Dalmaciju, Primorje i Istru). Raznolikost travarica i drugih jakih alkoholnih pića ovisi prvenstveno o dostupnosti sirovina za njihovu proizvodnju, a koja ovisi o geografskom položaju i klimatskim uvjetima područja u kojem se proizvode. U opsežnoj studiji koju su proveli Luczaj i sur. (2019) na ovom se području s jednom ili mješavinom bilja najčešće aromatizira komovica. Ukupno se koristi 114 biljnih vrsta iz 38 botaničkih porodica. 46 % upotrijebljenog bilja je samoniklo, 38 % je kultivirano, 15 % i samoniklo i kultivirano dok se 2 vrste iz porodice kave uvoze. Od bilja se najčešće koriste komorač, mirta, kadulja, ruta, borovica, rogač, orah, kora i lišće citrusa (gorke naranče i limuna), smokva, lovor, ružmarin, pelin, latice ruže, menta. U proizvodnji likera koriste se većinom pojedine biljne vrste i to najčešće mirta, orah, latice ruže, višnje, žižule, kupine, šipak, oskoruše. Za proizvodnju travarica koriste se mješavine različitih biljaka i to najčešće komorač, kadulja, ruta, borovica, rogač, citrusi, lovor, ružmarin, gospina trava, pelin, vrisak, timijan, mažuran, lavanda, itd. Unatoč bogatoj tradiciji aromatiziranja rakija od grožđa neka su pića danas izumrla kao što je rakija od maginja te vino aromatizirano s pseudo-plodom borovice. Nasuprot tome, javljaju se i novi trendovi kao što je rakija sa zrelim maslinama, dodatak egzotičnog voća kao što je jujube i lokvat, liker od lovora, itd.

U proizvodnji jakih alkoholnih pića mogu se koristiti različiti svježi ili osušeni dijelovi divljih i kultiviranih ljekovitih, aromatičniih i začinskih biljnih vrsta, te voće i povrće ali i njihovi ekstrakti kao što su eterična ulja, etanolni ekstrakti, destilati te rjeđe infuzije. Zbog potrebe za velikim količinama uzgajanje biljaka za ovu namjenu je od velike važnosti. Najčešće se koristi osušeno ili procesirano bilje, svježe nešto rjeđe. Koristiti se mogu različiti dijelovi biljke: stabljike, listovi, cvjetovi, plodovi, korijenje i sjemenke, ovisno u kojem se dijelu biljke nalazi karakteristična aromatična ili bioaktivna tvar. Najčešće se za aromatiziranje koristi više od jedne biljne vrste. Pojedine biljne vrste koriste se za dobivanje karakteristične osnovne arome jakog alkoholnog pića dok se druge koriste za njeno nadopunjavanje. Tako se na primjer za proizvodnju gina uvijek koristi borovica ali se za nadopunjavanje osnovne arome u nekim receptima koriste sjeme korijandra, korijen anđelike ili sjeme kima. Vrste i omjer pojedinih biljaka većinom su proizvođačka tajna. Odabir biljaka temelji se na procjeni njihovih organoleptičkih svojstava. Boja, izgled, miris, sadržaj vlage i eteričnih ulja ili neke druge karakteristike važni su parametri za odabir biljaka i njihovih dijelova.

Biljni materijal bogat je izvor različitih kemijskih spojeva koji se prema mirisu, okusu i drugim svojstvima mogu podijeliti na: aromatične spojeve, gorke spojeve, spojeve trpkog okusa, smolaste tvari, masti i ulja, organske kiseline, šećere, proteine, sluzaste i pektinske spojeve, mineralne spojeve. Ovisno o biljnoj vrsti ti spojevi potječu iz cvijetova, plodova, listova, cijelih biljaka, kore, korijenja, rizoma te sjemenki (Buglass i Caven-Quantrill, 2012). Količina ovih spojeva koja će tijekom ekstrakcije bilja prijeći u ekstrakt ovisi o topljivosti pojedinih spojeva u vodi i etanolu. U vodi i otopinama niže koncentracije etanola dobro se otapaju gorki sastojci, šećeri, tanini, organske kiseline, mineralni i sluzasti spojevi te proteini. Eterična ulja se otapaju u otopinama veće koncentracije etanola. Kada se takvi etanolni ekstrakti razrjeđuju s vodom dolazi do izdvajanja eteričnih ulja koja ili isplivaju na površinu ili su supendirana u otopini u obliku malih kapljica.

Aromatični spojevi

Od aromatičnih spojeva najvažnija i najbrojnija su eterična ulja kao nosioci mirisa i okusa aromatičnih biljaka. Po kemijskom sastavu eterična ulja su lako hlapive i mirisne uljaste mješavine različitih derivata terpena, alkohola, aldehida, ketona i estera.

Gorki spojevi

Gorki spojevi nalaze se u mnogim biljkama, osobito u tipično gorkim. Gorkim spojem nazivamo onaj spoj koji na korijenu jezika izaziva osjećaj gorčine. Preko živčanog sustava refleksno pojačavaju izlučivanje sline u ustima i želučanih sokova te ostalih probavnih sokova, osobito gušterače te potiču peristaltiku crijeva. Na taj način upotrebom gorkih biljaka ili njihovih ekstrakata potiče se probava. U proizvodnji jakih alkohoolnih pića kao aperitivi poznati su korijen lincure, gorka djetelina, kičica, blaženi čkalj, smola aloe vere, kora kininovca, korijen konduranga i rabarbare, a kao aromatične biljke koriste se kora i nezreli plodovi gorke naranče te vršni dijelovi i listovi pelina. Gorki spojevi izdvajaju se iz bilja ekstrakcijom etanolom niže koncentracije te se dodaju pićima u obliku koncentriranih ekstrakata (Tonutti i Liddle, 2010; Nikičević i Tešević, 2010).

Smolaste tvari

Smolaste tvari bilja poželjni su sastojci jakih alkoholnih pića. Nisu topive u nižim koncentracijama etanola te u takvim vodeno-etanolnim otopinama dovode do zamućenja. Izvor smolastih tvari su biljke kurkuma, đumbir, aloe vera, plodovi borovnice.

Masti i ulja

Masti i ulja su prisutni u suhom biljnom materijalu i sjemenkama koje se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića kao što se kakao, anis, komorač, kim, korijander, kardamom i dr. Otapaju se u većim koncentracijama etanola te se prilikom miješanja s vodom izdvajaju.

Organske kiseline

U biljnom materijalu najzastupljenije su nehlapive kiseline (limunska, jabučna i vinska kiselina), dok se octena kiselina nalazi samo u tragovima. Više masne kiseline su prisutne u manjoj količini, najčešće u obliku estera. Slobodne organske kiseline povoljno utječu na okus macerata, posebno gorkih i sirupastih proizvoda.

Šećeri, proteini i mineralni spojevi

Šećeri se u većim količinama nalaze u voću. Biljni materijal obavezno sadrži proteine ali su oni nepoželjni u maceratima i gotovim proizvodima jer uzrokuju zamućenja i taloženja. Ekstrakcijom niže koncentriranim etanolom otopi se nešto proteina ali ne i više koncentriranim etanolom. Količina mineralnih spojeva u proizvodu nema bitnog značaja. Mineralni spojevi prelaze u macerat u niže koncentriranom etanolu.

Od ostalih spojeva u biljkama se nalaze još i spojevi koji izazivaju osjećaj trpkosti i stezanja u ustima, kao što su tanini. Biljke koje sadrže puno tanina ne koriste se osobito za proizvodnju jakih alkoholnih pića. Začinske biljke koje su izvor spojeva oštro-ljutog okusa su ljuta paprika, đumbir, neke vrste papra. Ekstrakti ovih biljaka u pićima mogu izazvati prividan osjećaj veće koncentracije etanola te se u praksi koriste destilati takvih macerata koji imaju blaži okus. Biljka koja izaziva hladan osvježavajući okus je menta. Naime, glavni sastojak eteričnog ulja mente je mentol koji izaziva taj osjećaj. Osjećaj hlađenja izaziva i papar te kardamom i timijan.

Kemijski sastav bilja ovisi o uvjetima uzgoja. Najčešće sadrže 80-90 % vode i 20-10 % suhe tvari. Biljke se mogu koristiti samostalno ili u kombinaciji s ostalima biljkama. Tako jedna biljka može biti glavni sastojak dok druge služe za podešavanje senzorskih karakteristika (boje, okusa i mirisa) ili su nosioci određenih farmakoloških i fitoterapeutskih tj. funkcionalnih svojstava pića (Tonutti i Liddle, 2010).

2.2.2. Funkcionalna svojstva JAP-a na bazi ljekovitog i aromatičnog bilja

Jaka alkoholna pića na bazi različitog ljekovitog, aromatičnog i začinskog bilja potječu od nekadašnjih eliksira, koji su se tradicionalno upotrebljavali za dobrobit općeg zdravstvenog stanja i jačanje organizma. Iako se nijedno jako alkoholno piće ne može svrstati u funkcionalnu hranu, zbog prisustva biljnih komponenata, koje iskazuju širok spektar bioloških aktivnosti, likeri i travarice na bazi ljekovitog bilja se ipak odlikuju funkcionalnim svojstvima. Biološki aktivni spojevi, koji se tijekom proizvodnog procesa ekstrahiraju iz biljnog materijala nosioci su funkcionalnih svojstava ove skupine pića. Ovi spojevi mogu pripadati različitim skupinama kemijskih spojeva pri čemu treba izdvojiti fenolne spojeve (flavonoidi, kumarini, tanini), eterična ulja, alkaloide, glikozide (saponini, srčani glikozidi), itd. (Saroya, 2011). Fenolni spojevi doprinose antioksidacijskoj aktivnosti pića te im je posebna pažnja posvećena u mnogim istraživanjima (Mrvčić i sur., 2012; Andreou i sur., 2018; Issa-Issa i sur., 2019; Rodriguez-Solana i sur., 2016; 2019a; 2021; Hanousek Čiča i sur., 2020; Petrović i sur., 2019). Nadalje, gorkim, aromatičnim i začinskim biljkama koje se koriste u proizvodnji likera i travarica pripisuje se blagotvorno djelovanje na ljudski organizam (Veljković i Stanković, 2003; Vukosavljević i sur., 2009; Karabegović i sur., 2012). Konzumacija takvih pića prije jela (kao aperitivi) ili poslije jela (kao digestivi) doprinosi lučenju sline i probavnih sokova poboljšavajući time apetit i probavu hrane. Stimuliranje receptora za gorke tvari u probavnom sustavu dovodi do lučenja sline, hormona, enzima i kiselina koji sudjeluju u probavi hrane (Janssen i sur., 2011). Spojevi iz bilja koja pićima daju gorčinu pripadaju različitim grupama spojeva, kao na primjer, sekundarnih glikozida (npr. genciopikrin i sverciamarin kod rodova *Gentian* i *Centaurium* kojima pripadaju lincura i kičica), alkaloida (npr. berberin i kofein), seskviterpenskih laktona (npr. absintin iz pelina), flavonoida, saponina,itd. (Snow i Spelman, 2011). Kompleksna i heterogena mješavina aromatičnih spojeva čini eterično ulje biljke sa najzastupljenijim monoterpenima (npr. timol, 1,8-cineol), seskviterpenima (npr. kariofilen, bisabolol) i fenilpropanoidima (npr. eugenol, cinamaldehid). Ove komponente biljnih likera i travarica iskazuju antimikrobnu aktivnost. Tako se u 18. st. kao lijek protiv grčeva izazvanih sindromom iritabilnog crijeva i dizenterije koristilo jako alkoholno piće koje je sadržavalo komorač, pelin, anis, matičnjak i izop (Thompson i sur., 2013).

2.2.3. Ekstrakcijski postupci

Ekstrakcija je proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese primjenom odgovarajućeg otapala u kojem je ta tvar topljiva ili ima boju topljivost od ostalih sastojaka smjese (Lovrić, 2003). Svrha ekstrakcije spojeva iz biljnog materijala je izdvojiti što je moguće veću količinu ciljanih spojeva od ostatka biljnog materijala pomoću selektivnog otapala. Osnovni parametri koji utječu na ekstrakciju ciljanih spojeva su karakteristike biljnog materijala (dio biljke i njeno porijeklo, stupanj procesiranja, sadržaj vlage te veličina čestica), vrsta otapala i ekstrakcijski postupak. Dobiveni ekstrakti su najčešće smjese različitih biljnih metabolita kao što su alkaloidi, glikozidi, terpenoidi, flavonoidi i lignani. Na kvalitativan i kvantitativan fitokemijski sastav ekstrakta utječu način i vrijeme ekstrakcije, temperatura, priroda i koncentracija otapala te njegova polarnost (Handa i sur., 2008).

Cilj ekstrakcije u industriji jakih alkoholnih pića je izolacija spojeva iz biljnog materijala koji doprinose aromi, boji, okusu i mirisu konačnog proizvoda. Tijekom ekstrakcije, otapalo difundira u biljni materijal i otapa spojeve slične topljivosti. Učinkovitost ekstrakcije povećava se prethodnim usitnjavanjem biljnog materijala (veća dodirna površina i mogućnost difuzije otapala u materijal), povećanjem temperature (povećanje topljivosti) i duljim trajanjem ekstrakcije. Ne postoje univerzalni postupci ekstrakcije za sve fitokemikalije i tvari unutar biljaka, već je metode potrebno odabrati ovisno o željenoj skupini tvari koju je potrebno izolirati. Važno je uzeti u obzir i prirodu biljnog materijala i samih spojeva u materijalu – na njihovu topivost u određenom otapalu također utječe njihova lipofilnost, osjetljivost na svjetlost, kisik ili toplinu i kemijska struktura. Budući da biološki aktivni spojevi bilja pripadaju različitim vrstama spojeva različitih kemijskih svojstava, vrsta i količina spojeva koji se ekstrahiraju iz bilja ovisi o vrsti otapala upotrebljenog u ekstrakcijskim procesima. U skladu s tim vrsta otapala i ekstrakcijski proces direktno utječu i na njihovu biološku aktivnost (de Oliviera Melo i sur., 2018). Za ekstrakciju polifenolnih spojeva iz aromatičnog i ljekovitog bilja najčešće se koriste voda, etanol, metanol i njihove smjese (Vajić i sur., 2015). Pojedine skupine fitokemikalija nisu topljive u vodi pa su za njihovu ekstrakciju nužne etanolne otopine. Etanolni ekstrakti u usporedbi s vodenim sadrže veće količine polifenolnih spojeva. Razlog tome je manje polaran karaktera etanola zbog čega je učinkovitiji u degradaciji i prolasku kroz stanične stijenke i membrane što dovodi do ekstrakcije unutarstaničnih spojeva. Osim toga, u vodenim ekstraktima aktivna je polifenol oksidaza, enzim koji razgrađuje polifenole, dok je u etanolnim i metanolnim ekstraktima

neaktivna. Nadalje, etanolni ekstrakti bilja se u odnosu na vodene (npr. čajeve) mogu čuvati duži vremenski period (Tiwari i sur., 2011).

U proizvodnji jakih alkoholnih pića primjenjuju se klasični ekstrakcijski postupci kao što su maceracija, hladna i vruća perkolacija, digestija, destilacija ili kombinacija tih procesa (Singh, 2008). Navedene metode imaju određene nedostatke poput dužeg vremena ekstrakcije, zahtjeva za otapalom visoke čistoće, isparavanja velike količine otapala, male selektivnosti ekstrakcije i termičke razgradnje termolabilnih spojeva (Luque de Castro i Garcia-Ayuso, 1998).

Maceracija je jedna od najstarijih i najčešće korištenih tehnika ekstrakcije u industriji jakih aloholnih pića. Tako je u antičko vrijeme maceracija bilja i začina u vinu bila je uobičajena praksa na području Mediterana. Jedan od prvih tvoraca takvog pripravka bio je Hipokrat, koji je po njemu i nazvan *Hipokratovo vino* te koje se smatra pretečom vermuta. Hipokratova namjera bila je iskoristiti tonična i digestivna svojstva pelina i origana, biljaka koje su bile vrlo rasprostranjene u Grčkoj, pogotovo na otoku Kreti. Rimljani su u proizvodnji takvih vina koristili i druge biljke kao što su ružmarin, timijan, mirta i celer (Tonutti i Liddle, 2010). Usitnjeni biljni materijal potopi se u vodeno-alkoholnu bazu u spremnicima te se periodički promiješa. Postupak maceracije provodi se na sobnoj temperaturi, a traje nekoliko tjedana (ovisno o biljnom materijalu). Dobiveni macerat (tekući dio) odvaja se od biljnog materijala (čvrsti dio) i bistri filtracijom ili dekantiranjem (Singh, 2008). Maceracija se može provoditi kao jednostruka ekstrakcija ili kao dvostruki ekstrakcijski proces. Jednostruka maceracija koristi se za dobivanje macerata suhih plodova oskoruše, borovice i kore naranče. Kod dvostruke maceracije biljni materijal se ekstrahira dva puta, a dobiveni macerati se kasnije spoje. Volumni udio alkohola u vodeno-alkoholnoj bazi koja se koristi za maceraciju kreće se u rasponu od 50–65 % i 70–80 % za suho i svježe voće. Druga ekstrakcija dvostruke maceracije provodi se u bazi s manjim volumnim udjelom alkohola. Općenito, jačina alkohola u bazi ovisi o sadržaju biljnog soka (vode) u biljnom materijalu, prirodi biljnog materijala te vrsti spojeva koje se želi ekstrahirati. Sadržaj spremnika treba često miješati. Tijekom maceracije, dolazi do ekstrakcije hlapivih i nehlapivih spojeva iz biljnog materijala koji onda prelaze u vodeno-alkoholnu bazu. Dobiveni macerat se može koristiti kao baza za proizvodnju jakih alkoholnih pića ili se može podvrgnuti postupku destilacije te se dobiva destilat macerata. Iz destilata macerata se mogu koncentriranjem dobiti arome i esencije koje se također mogu koristiti u proizvodnji jakih alkoholnih pića.

Perkolacija (lat. *percolatio* = cijeđenje) je ekstrakcijska tehnika koja se bazira na tome da se mljevene ili usitnjene biljke ekstrahiraju vodeno-alkoholnom bazom koja polako protječe kroz materijal u perkolatoru (cilindar ili cijev s dvostrukim dnom, od kojih je jedno perforirano). Perkolacija je najekonomičnija tehnika ekstrakcije. Za ekstrakciju svih aromatičnih spojeva iz biljnog materijala bez gubitka aroma treba 3-5 dana. U pravilu se kao otapalo koristi 40-50 % v/v alkohol. Usitnjeni biljni materijal prvo se natopi otapalom, nakon stajanja prebaci se u perkolator, potpuno prekrije otapalom i podvrgne maceraciji. Nakon isteka određenoga vremena, obično 24 sata, otapalo se postupno ispušta iz perkolatora i skuplja do željene količine, odnosno koncentracije, po potrebi uz dolijevanje novoga, a pročišćava se i bistri sedimentacijom i filtracijom.

Digestija je postupak ekstrakcije spojeva iz biljnog materijala pomoću vodeno-alkoholne baze koja je zagrijana na temperaturu 45-60 °C. Budući da se porastom temperature povećava topljivost određenih spojeva te ubrzava proces difuzije smanjuje se i vrijeme ekstrakcije (za nekoliko sati). Međutim, ekstrakt dobiven na ovaj način lošije je kvalitete od onog dobivenog maceracijom na sobnoj temperaturi ili perkolacijom zbog gubitka termolabilnih aroma spojeva (Singh, 2008). Zbog toga se digestija upotrebljava samo kod onih biljaka kod kojih povišena temperatura ne uzrokuje gubitak aroma spojeva te kada je potrebno u kratkom vremenu proizvesti veliku količinu ekstrakta (Nikićević i Paunović, 2013).

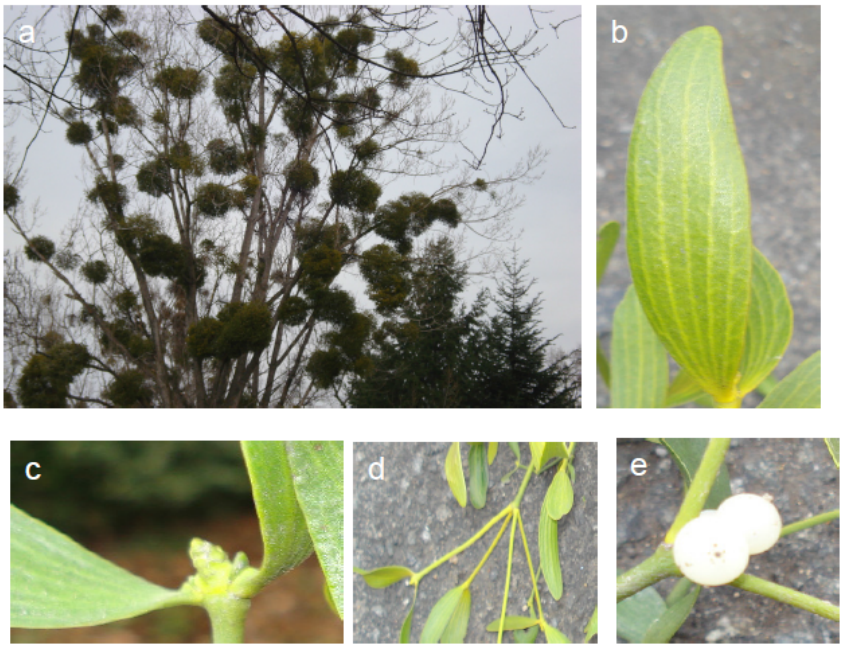
Destilacija biljnog materijala s etanolom koristi se za odvajanje hlapivih aroma spojeva i eteričnih ulja iz trava, kore, korjenja, sjemena, cvjetova, listova, itd. Biljni materijal stavlja se u kotao i potapa u alkoholnu bazu te zatim destilira. Kod takve destilacije aroma spojevi hlape i miješaju se s etanolnim parama. Ova tehnika se koristi za dobivanje bezbojnih destilata aromatiziranih korom citrusa (naranča, limun), sjemenkama (anis, kim) i cvjetovima (ruža, menta).

Nove ili nekonvencionalne metode poput ekstrakcije pomoću superkritičnih tekućina ili mikrovalne vakuum hidrodestilacije također se primjenjuju u industriji jakih alkoholnih pića, a nude neke prednosti kao što je manja potrošnja organskih otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i veća selektivnost (Zhang i sur., 2018). Vakuum mikrovalna hidrodestilacija je proces gdje se ekstrakcija provodi pod smanjenim tlakom pri čemu se istovremeno bilje zagrijava pomoću mikrovalova. Njihov kombinirani učinak omogućuje lakšu ekstrakciju sadržaja iz biljnih stanica. Također se zbog snižene temperature ne uništavaju termolabilni

spojevi. Kao i kod destilacije, ekstrakcijom se dobivaju samo hlapivi spojevi. Ekstrakcija superkritičnim tekućinama je jedna od najnovijih tehnologija ekstrakcije. Superkritične tekućine nastaju zagrijavanjem plinova iznad njihove kritične temperature ili tlačenjem tekućina iznad njihovog kritičnog tlaka, a najkorištenija u industriji je CO_2. Omogućuje proizvodnju „lakših“ ekstrakata sličnim eteričnim uljima (Tonutti i Liddle, 2010). Iako bi upotreba inovativnih ekstrakcijskih metoda mogla povećati prinos ciljanih spojeva i skratiti vrijeme ekstrakcije, skupa oprema ograničava njihovu primjenu (Cendrowski i sur., 2017).

2.3. EUROPSKA BIJELA IMELA

Europska imela (*Viscum album* L., rod *Viscum*, familija *Santalaceae*) je poluparazitska, višegodišnja zimzelena biljka grmolikog oblika koja raste na crnogoričnom i listopadnom drveću, posebice na boru, topoli, jabuci, jasenu, arišu, itd. Na stablima hrasta i kruške raste vrlo rijetko, na bukvi nikada (Vicas i sur., 2012; Singh i sur., 2016). Grm imele okruglastog je oblika s viličasto raspoređenim granama dugim 30-100 cm. 2-8 cm dugački i 1-2,5 cm široki listovi su žutozelene do tamnozelene boje, kožasti, izduženo obrnuto jajastog oblika, tupog vrha i cjelovitog ruba, bez peteljke. Imela je zimzelena biljka, što znači da listovi ostaju na izbojcima i tijekom zime (slika 2).



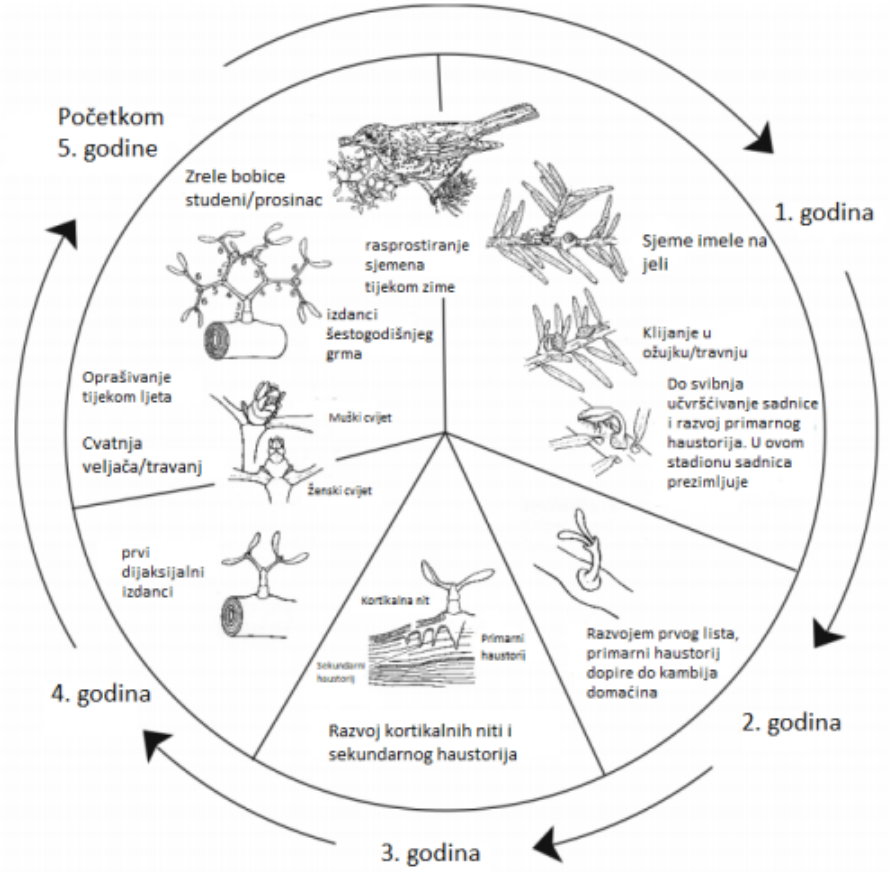
Slika 2. Morfologija bijele imele (*V. album*): a. rast imele na stablu; b. list; c. cvijet; d. grančice; e. sjemenke (Vicas i sur., 2011)

Europska imela raste u velikom dijelu Europe, sjevernozapadnoj Africi, jugozapadnoj i središnjoj Aziji, zahvaljujući velikoj raznolikosti stabla domaćina koji definiraju njezino stanište. U sjevernim i istočnim predjelima Europe na njenu slabu zastupljenost presudno djeluje temperatura - imela je prilagođena umjerenoj klimi, a ne ekstremima. Pretežno raste u brežuljkastom i podplaninskom području, do 1000 m nadmorske visine. Europska bijela imela općenito raste na vrhu stabla, u krošnji domaćina gdje napada njegove relativno mlade izdanke (mladice). Izravno iz njihovog ksilema crpi vodu, mineralne tvari te otopljene anorganske spojeve, ali samostalno sintetizira klorofil i provodi fotosintezu. Europska imela je dvodomna biljka, postoje biljke samo s muškim i samo sa ženskim cvjetovima. Cvate od veljače do travnja, a sitni, blijedo-žućkasto zeleni cvjetovi razvijaju se u pazušcima listova. Oprašuju ih muhe i drugi kukci. U prosincu dozrijevaju plodovi - okrugle, sočne, polu-prozirne, bijele bobice veličina graška koje mogu sadržavati jednu do četiri sjemenke. Bobica se sastoji od epikarpa bijele ili žute boje, gustog mezokarpa koji sadrži sluzavu tvar viscin i jako tankog endokarpa koji obavija sjemenke. Sluz sprječava sušenje ploda i omogućuje da sjemenka ostane svježa i nakon dugotrajne suše, a ujedno služi i kao zaštita od probavnih sokova ptica koje rasprostranjuju sjemenke imele. Sjemenka ima ljepljivi ovoj kako bi se mogla lakše pričvrstiti za stablo i počela klijati. Ne može proklijati ni u vodi, ni u tlu. Za rasprostranjivanje plodova bijele imele najviše su zaslužne ptice. Ptice najčešće progutaju cijeli plod, a kako je sjeme neprobavljivo, s izmetom ga izbacuju iz svog organizma. Četrnaest je vrsta ptica u Hrvatskoj koje se potencijalno hrane plodovima imele. To su: kos (*Turdus merula* L.), drozd cikelj (*T. philomelos* Brehm), drozd bravenjak (*T. pilaris* L.), planinski kos (*T. torquatus* L.), batokljun (*Coccothraustes coccothraustes* L.), zeba (*Fringilla coelebs* L.), zelendur (*Carduelis chloris* L.), kreja (*Nucifraga caryocatactes* L.), čavka (*Corvus monedula* L.), gačac (*C. frugilegus* L.), siva vrana (*C. corone cornix* L.), svraka (*Pica pica* L.) i šojka (*Garrulus glandarius* L.). Najvažniji prenositelj je drozd imelaš (*Turdus viscivorus* L.) koji obitava na cijelom području Hrvatske, dok je u Dalmaciji prisutan samo zimi. Vegetativno razmnožavanje bijele imele vrlo je rijetko (Zuber, 2004).

Iako postoje mnoge vrste imele, do sada je najviše znanstvenih istraživanja provedeno upravo na europskoj imeli (*Viscum album*). Vrsta *Viscum album* dijeli se na više podvrsta ili varijeteta na osnovu morfoloških karakteristika (boja plodova i veličina listova) i vrste domaćina:

- *Viscum album* subsp. *abietis*, parazitira na rodu *Abies* (jela) (bijeli plodovi, do 8 cm dugi listovi)
- *Viscum album* subsp. *album*, parazitira na rodovima *Malus* (jabuka), *Populus* (topola), *Tilia* (lipa), rjeđe na drugom listopadnom drveću kao što je rod *Quercus* (hrast) (bijeli plodovi, listovi 3–5 cm)
- *Viscum album* subsp. *austriacum*, parazitira na rodovima *Larix* (ariš), *Pinus* (bor), *Picea* (smreka) (žuti plodovi, listovi 2-4 cm)
- *Viscum album* subsp. *meridianum*, parazitira na rodovima *Acer* (javor), *Carpinus* (grab), *Juglans* (orah), *Prunus* (šljiva, trešnja, višnja, breskva), *Sorbus* (oskoruša) (žuti plodovi; listovi 3–5 cm)
- *Viscum album* subsp. *creticum*, parazitira na vrsti *Pinus brutia* (bijeli plodovi i kratki listovi).

Imela ima složeni životni ciklus koji se može podijeliti u dvije faze: neparazitsku i parazitsku. Prva, neparazitska faza sastoji se od tri stadija: širenje sjemenki, klijanje sjemenki te stadij prvog učvršćivanja/vezanja na stablo domaćina. Parazitska faza sastoji se od čak pet različitih stadija: trajno učvršćivanje i prodiranje u vaskularni sustav stabla domaćina, rast prvih listova, razvoj izdanaka, razvoj sustava za apsorpciju vode iz stabla domaćina te cvjetanje i nastanak plodova (slika 3) (Nierhaus-Wunderwald i Lawrenz, 1997). Rasprostranjenost bijele imele u Hrvatskoj je mozaična: u prirodnim šumama, šumskim kulturama, parkovima, vrtovima, neodržavanim voćnjacima te na pojedinačnim stablima uz rubove šuma i na otvorenim površinama. Imele su specijalizirane vrste i dolaze samo na određenim vrstama domaćinima. Bijela imela dolazi na najvećem broju taksona od svih vrsta imela (zabilježena je na 452 taksona (vrsta, podvrsta, varijeteta i hibrida) iz 96 rodova i 44 porodice). Osim u prirodi tu su ubrojene i vrste na kojima je uspješno obavljena umjetna inokulacija. Najčešći domaćini su vrste iz rodova *Salix* L., *Populus* L., *Acer* L., *Malus* Mill., *Crataegus* L., *Prunus* L., *Sorbus* L., *Abies Mill*. i *Pinus* L. Od tri podvrste imele najmanje je specijalizirana *V. a.* ssp. *album*, a najviše *V. a.* ssp. *abietis*. To su ujedno i dvije podvrste koje dolaze u Hrvatskoj (*V. a.* ssp. *austriacum* do sada nije zabilježena) (Idžojtić i sur., 2006).



Slika 3. Faze razvoja imele na stablu domaćina (Nierhaus-Wunderwald i Lawrenz, 1997)

2.3.1. Upotreba imele u narodnoj medicini

Malo je biljaka kojima se u prošlosti pripisivalo toliko ljekovitih svojstava i simboličkih značenja kao imeli. Keltski svećenici, druidi, imeli su pridavali magične moći te su je ritualno sjekli zlatnim srpom i koristili kao lijek. Vikinzi su smatrali da imela može probuditi mrtve, dok je starogrčki junak Eneja grančicom imele otvorio vrata podzemnog svijeta. U nekim zemljama i danas imela ima posebnu simboliku tijekom proslave Božića te se stavlja iznad vrata kako bi prizvala goste. Bijela imela se od davnina smatrala ljekovitom biljkom. To je biljka koja je prva nazvana imelom. Prema G. P. Secundusu (23-79 nakon Kr.) ova se biljka koristila kao protuotrov te je postala vrlo popularna u liječenju brojnih bolesti. Infuzije imele koristile su se u narodnoj medicini za liječenje visokog krvnog tlaka, vrtoglavice i osipa. Grčki pisac i filozof (15-85 nakon Kr.) piše da su tijekom 460-377 pr. Kr. bolesti slezene liječene imelom koja je rasla na hrastu. Tijekom 23-79 nakon Kr., Plinius je

ukazao na blagotvorni učinak imele u liječenju neplodnosti, čireva i epilepsije. Platon je oko 150 nakon Kr. opisao upotrebu imele u liječenju tumora. U francuskom djelu o narodnim lijekovima iz 1682.g. imela se smatrala *zlatnom* biljkom u liječenju epilepsije. Tijekom 1731., imela se koristila za liječenje različitih tegoba i stanja kao što su porođajna bol te crijevnih parazita kod djece. Kasnije se koristila za liječenje konvulzija, psihičkih problema, poremećaja urinarnog trakta, srčanih bolesti i mnogih drugih poremećaja neurološkog sustava. Unatoč povijesti i raširenoj narodnoj upotrebi imele, u 19. st. znanstvena zajednica odbacuje liječenje imelom koje je ponovno oživljeno u 20. st. kada je Gaultier ukazao na oralnu/subkutanu primjenu svježih ekstrakata imele u liječenju problema povezanih s krvnim tlakom kod ljudi i životinja. 1921.g. austrijski duhovni vođa Rudolf Steiner napominje da bi se imela mogla koristiti u liječenju tumora budući da je imela, kao i tumor, parazitska i smrtonosna za domaćina. S tom idejom su osnovane švicarske i njemačke klinike koje i danas koriste preparate dobivene trodnevnom fermentacijom imele pomoću bakterijskih vrsta iz roda *Lactobacillus.* Tradicionalno se europska imela koristila dugi niz godina kao lijek protiv visokog tlaka, anksioznosti, nesanice, unutarnjih krvarenja te kao nadomjesna antitumorska terapija. Osim u Europi, imela se često koristila i u drugim dijelovima svijeta. Primjerice, u Japanu se imela koristila za liječenje visokog tlaka, bolesti srca, reumatizma, protiv prijetećeg pobačaja te se lokalno upotrjebljavala za liječenje ozeblina. U Indiji se koristio čaj od listića imele za liječenje dijabetesa, dok se pripravak *Viscum articulatum* Burm. koristio kod vrućice. U Africi su se vrste iz roda *Viscum* koristile kao lijek kod dijareje i želučanih problema kod djece. *Viscum cruciatum* Sieber ex Boiss se često koristila u liječenju konstipacije, bolova i artritisa u Izraelu. U narodnoj medicini Egipta imela se koristila u liječenju epilepsije, arterioskleroze i bolesti srčanih arterija ((Bussing, 2003; Singh i sur., 2016).

2.3.2. Biološki aktivni spojevi europske bijele imele

Prvo istraživanje kemijskog sastava imele proveo je Reinsch 1860.g. koji je analizirao ljepljivu masu iz bobica imele i nazvao ju viscin. Danas se zna da je imela bogat izvor biološki aktivnih spojeva čiji sadržaj značajno ovisi, prije svega o vrsti stabla domaćinu na kojem parazitira, ali i o vremenu branja (Zuber, 2004). Europska imela sadrži brojne fitokemikalije kao što su lektini, viskotoksini, polisaharidi, alkaloidi, terpeni, proteini, amini, peptidi, polifenoli, fitosteroli i aminokiseline (Singh i sur., 2016). Zanimljivo je da neke

fitokemikalije kao što su alkaloidi ne sinetizira sama imela već ih apsorbira iz drveta domaćina.

Viskotoksini

Viskotoksini su skupina bazičnih, cisteinom bogatih proteina male molekulske mase koji spadaju skupini biljnih tionina. Sintetiziraju se u listovima i stabljici. Amfipatske su prirode, sadrže 46 aminokiselina molekulske mase 5 kDA. Polipeptidni lanci povezani su preko tri ili četiri disulfidna mosta na jako konzerviranim pozicijama (Cys3/Cys40, Cys3/Cys32 i Cys16/Cys26) što im omogućava kompaktnu strukturu i veliku stabilnost u denaturirajućim uvjetima kao što su toplina i djelovanje proteaza. Do danas je okarakterizirano sedam različitih izoformi (A1, A2, A3, B, B2, C1 i 1-PS) koje se razlikuju većinom u sekvenci amionokiselina. Sadržaj viskotoksina varira od 0,05 do 0,1 %, dok sastav ovisi o drvetu domaćina. Tako su na primjer viskotoksin A2 and A3 pronađeni u *V. album* ssp. a*lbum*, dok u *V. album* ssp. *austriacum* prevladava PS-V. Nadalje, u *V. album* ssp. *abietis* uz A3 koji prevladava detektirani su i svi ostali viskotoksini osim A2. Istraživanja 3D-strukture viskotoksina otkrila su specifična mjesta vezanja fosfata. Pretpostavlja se da ta mjesta i amfipatska struktura dovode do indukcije citotoksičnosti u eukariotskim stanicama na način da ulaze u interakcije sa staničnom membranom i mijenjaju joj integritet. Biološka aktivnost viskotoksina varira ovisno o izoformama. Viskotoksini su strukturno i farmakološki slični zmijskim (kobrinim) kardiotoksinima. Fiziološka funkcija viskotoksina i drugih tionina nije potpuno razjašnjena. Pretpostavlja se da biljci služe kao zaštita, posebice endosperma protiv mikrobnih infekcija tijekom klijanja (Schaller i sur, 1996, 1998; Singh i sur., 2016).

Lektini

Najznačajnija skupina fitokemikalija imele se lektini. Lektini imele pripadaju tipu 2 ribosom-inaktivirajućih proteina, a sastoje se od dva polipeptidna lanca: lanac A (29,5, 27 i 25 kDa) koji sadrži 3 različite domene i lanac B (32, 32 i 25 kDa) koji sadrži 2 domene slične konfiguracije. Lanci su povezani disulfidnim mostovima. Lanac A posjeduje specifičnu *N*-glikozidaznu aktivnost koja dovodi do degradacije 28S rRNA u ribosomima eukaritoskih stanica te posljedično inhibicije sinteze proteina te ubrzava apoptozu. Lanac B sadrži galaktoza-specifičnu domenu te se može vezati na površinu stanice i poboljšati ulazak toksične podjedinice u stanicu. Iz bijele imele izolirana su tri različita lektina: ML-I, ML-II i ML-III koja se razlikuju prema specifičnosti za vezanje na šećer. Tako se lanac B specifično može vezati na D-galaktozu (ML-I = 115 kDa, dimer), na D-galaktozu/*N*-acetil-D-

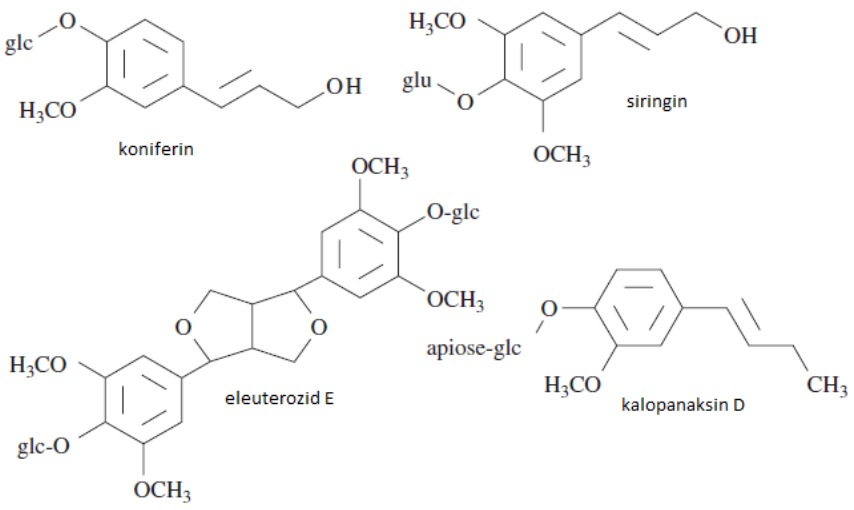
galaktozamin (ML-II = 60 kDa) te *N*-acetil-D-galaktozamin (ML-III = 60 kDa). Sva tri lektina iz imele vrlo su reaktivna s humanim eritrocitima neovisno o krvnoj grupi. Imela koja je rasla na listopadnom drveću većinom sadrži ML-I dok ona sa crnogoričnog drveća, poput bora i jele sadrži ML-III. Sadržaj lektina kreće se u rasponu od 340 do 1000 μg g^{-1} suhog biljnog materijala tj. manji je od 2 % od ukupnih polipeptida i proteina u imeli. Unatoč brojnim studijama fiziološka uloga lektina u imeli nije potpuno razjašnjena. Općenito, biljni lektini smatraju se skladišnim proteinima sjemenki, kao obrana te sudjeluju u procesu prepoznavanja biljke domaćina i simbiotičkih bakterija. Međutim, sadržaj lektina najveći je tijekom zime što je povezano s njihovom fiziološkom funkcijom krioprotektora budući da stabiliziraju stanične membrane. Klice i izdanci sadrže najveće koncentracije lektina (Singh i sur., 2016; Nazaruk i Orlikowski, 2016).

Polifenolni spojevi

Brojne su studije pokazale da je imela bogat izvor različitih fenolnih spojeva koji pripadaju skupini flavonoida, fenilpropanoida i fenolnih kiselina. Zanimljivo je da na njihov kvalitativni i kvantitativni sadržaj u imeli utječe drvo domaćina na kojem ona raste. Tako je npr. velik sadržaj salicilne kiseline detektiran u imeli koja je rasla na *Sorbus aucuparia* dok je u imeli koja je rasla na *Malus domestica* dominantna ružmarinska kiselina. Imela koja je rasla na *Fraxinus excelsior* sadrži velike količine fenolnih kiselina i flavonoida. Od fenolnih kiselina u imeli su detektiran protokatehinksa, *p*-hidroksibenzojeva, kava, salicilna, ferulinska i sinapinska kiselina koje mogu biti u slobodnom obliku ili kao esteri i glikozidi (Luczkiewicz i sur., 2001; Vicas i sur., 2011). Uz navedeno u bobicama europske imele identificirane su 2 fenolne kiseline: galna kiselina i galat (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

Nadalje, od fenilpropanoida iz lišća i grančica imele izolirani su koniferil alkohol 4-*O*-β-D-glukozid (koniferin), siringenin 4-*O*-*β*-D-glukozid (siringin), koniferil alkohol- i siringenin 4-*O*-*β*-D-apiozil(1→2)-*β*-D-glukozid, lignani siringarezinol 4',4"-di-*O*-glukozid (eleuterozid E) te siringarezinol-O-glukozid (Panossian i sur., 1998). Lignanski se kostur također sastoji i od trihidroksi-tetrametoksi-epoksi glukozida: ligalbimozida (A-E) i alangilignozida C (Nhiem i sur., 2012). Sadržaj fenilpropanoida također ovisi o stablu domaćina. Tako je najveći sadržaj siringina i koniferina detektiran u ekstraktima *V. album* ssp. *album*. U ovoj je podvrsti imele po prvi puta otkriven i kalopanaksin D (4-[2-*O*-(apiozil)-β-D-glukoziloksi]-3-metoksicinamil alkohol. U ekstraktu *V. album* ssp. *austriacum* koniferin je pronađen samo u tragovima dok su

u *V. album* ssp. *abietis* siringin i koniferin identificirani ali kalopanaksin D nije detektiran. Kemijske strukture ovih spojeva prikazane su na slici 4.

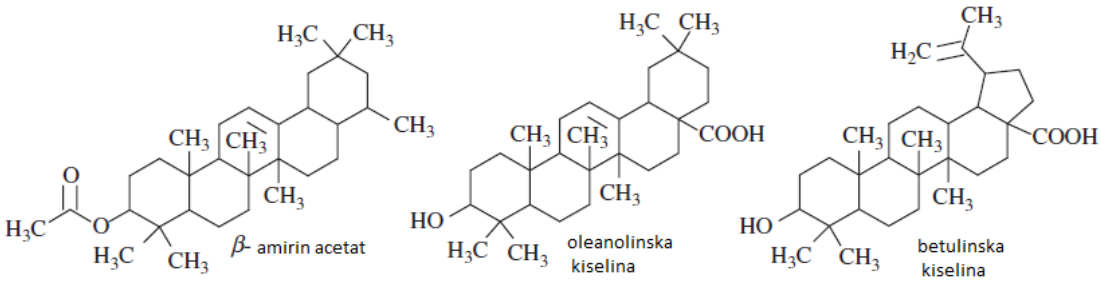


Slika 4. Kemijske strukture fenilpropanoida izoliranih iz *V. album* (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

Flavonoidi izolirani iz metanolnog ekstrakta *V. album* pripadaju skupini čalkona i flavanona. Prisutni su u glikoziliranom obliku, a sadrže i metoksi skupine: 5,7-dimetoksi-flavanon-4'-*O*-glukozid, 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksičalkon-4-*O*-glukozid, 5,7- dimetoksi-flavanon-4'-*O*-[2"-*O*-(5"'-*O*-trans-cinamoil)-apiozil]-glukozid), 2'-hidroksi-4',6'- dimetoksi-čalkon-4-*O*-[2"-*O*-(5"'-*O*-trans- cinamoil)-apiozil]-glukozid, 2'-hidroksi-3,4',6'- trimetoksi-čalkon-4-*O*-glukozid, 2'-hidroksi-4',6'-dimetoksi-čalkon-4-*O*-[apiozil(1→2)] glukozid, 5,7-dimetoksi-flavanon-4'-*O*-[apiozil-(1→2)]-glukozid i (2*S*)-3',5,7-trimetoksi-flavanon- 4'-*O*-glukozid (Deliorman Orhan i sur., 2002). U epukutikularnim voskovima različitih podvrsta *V. album* detektirani su kvercetin, kaempferol te njihovi mono-, di- i trimetileteri (Haas i sur., 2003). U 80 %-tnom metanolnom ekstraktu osušene biljke identificirani su polifenolni spojevi: 4'-*O*-[bapiozil(1→2)]-*β*-glukozil]-5-hidroksi-7-*O*-sinapil-flavanon, 3-(4-acetoksi-3,5-dimetoksi)-fenil-2*E*-propenil-*β*-glukozid, 3-(4-hidroksi-3,5-dimetoksi)-fenil-2*E*-propenil-*β*-glukozid, 5,7-dimetoksi-flavanon-4'-*O*-β-glukozid, 4',5-dimetoksi-7-hidroksi flavanon i 5,7-dimetoksi-4'-hidroksi flavanon (Choudhary i sur., 2010). Iz *V. album* izolirani su i novi spojevi: 3-(3'-karbometoksipropil) galna kiselina i 3-(3'-karbometoksipropil)-7→3"-protokatehoil galoat (Amer i sur., 2013).

Terpenoidi

Od lipofilnih spojeva iz imele su izolirani terpenoidi: oleanolinska, betulinska i ursolična kiselina, *β*-amirin, *β*-amirin acetat, lupeol, lupeol acetat koji pripadaju skupini triterpena te stigmasterol, *β*-sitosterol i njihovi esteri koji pripadaju skupini fitosterola (slika 5). Od ostalih lipofilnih spojeva prisutne su zasićene masne kiseline kao što je palmitinska, arahidonska, lignocerična, behenična i cerotična kiselina te nezasićene masne kiseline: oleinska, linoleinska i linolna kiselina. U ekstraktu dobivenom ekstrakcijom supekritičnim CO_2 prisutne su i dugolančane masne kiseline i ugljikovodici te u tragovima hlapivi spojevi: loliolid, vomifoliol, trans-α-bergamoten i trans-*β*-farnesen (Ćebović i sur., 2008). Pokazalo se da su triterpeni su važni antitumorski spojevi ali je njihova topljivost u vodi slaba pa ih je teško ekstrahirati iz imele. Međutim, dodatkom 2-hidroksipropil-*β*-ciklodekstrina i natrijevog fosfata (pH 7,3) poboljšava se njihova ekstrakcija (Jager i sur., 2007; Nazaruk i Orlikowski, 2016).



Slika 5. Triterpenski derivati izolirani iz *V. album* (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

Ugljikohidrati

U imeli su prisutni strukturno različiti oligosaharidi i polisaharidi. U lišću i grančicama imele identificirani su metil esteri 1→α-4 galakturonske kiseline, visoko metilirani homogalakturonani, pektin, arabinogalaktan, dok su bobice bogate ramnogalakturonanima sa bočnim lancima arabinogalaktana, arabinogalaktanima i u malim količinama ksiloglukana. Monosaharidi i polioli su također identificirani ali nakon kiselinske hidrolize ekstrakta imele. Sadržaj polisaharida varira ovisno o vrsti domaćina (lipa ili bor). Tako je u imeli koja je rasla na lipi dominantan inozitol (58 % suhe tvari) dok je u imeli koja je rasla na boru dominantna galaktoza (44 % suhe tvari) (Arda i sur., 2003).

Ostali spojevi

Od ostalih spojeva u imeli su prisutni ciklički peptidi, aminokiseline, proteini, alkaloidi, amini (histamin i cetilkolin), jasmonska kiselina, cistein, glutation, vitamin C, ksantofil te minerali kalij, kalcij, mangan, natrij, nikal, fosfor, selen, silicij, magnezij i cink (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

2.3.3. Biološko djelovanje ekstrakta europske imele i njihov farmakološki potencijal

Bijela se imela u antičko vrijeme i kroz srednji vijek koristila kao narodni biljni lijek. Tako je Hildegard von Bingen (1098.-1179. g.) ovu biljku koristila za liječenje bolesti slezene i jetre. Od 1920-tih godina ekstrakti bijele imele su se koristili u liječenju tumora (Bussing, 2003). Njemačka Komisija E 1984. odobrila je upotrebu ekstrakta i pripravaka imele u liječenju degenerativnih promjena i upala zglobova te kao palijativnu terapiju kod zloćudnih tumora. Zahvaljujući bogatom fitokemijskom sastavu europska imela iskazuje širok spektar bioloških djelovanja kao što su imunomodulatorno, antioksidacijsko, citotoksično, antihipertenzivno, sedativno, antimikrobno, antidijabetsko, hepatoprotektivno, itd. (Szurpnicka i sur., 2020).

Antitumorsko i imunomodulatorno djelovanje

Većina dosadašnjeg, suvremenog znanstvenog interesa fokusirana je na istraživanje antitumorske aktivnosti bijele imele. U mnogim kliničkim studijama, ovisno o stupnju bolesti i reakciji bolesnika, u antitumorskoj terapiji primjenjuju se različiti pristupi i doze te je uočeno da terapija pripravcima imele dovodi do poboljšanja kvalitete života, produženja životnog vijeka te regresije tumora. U zemljama njemačkog govornog područja vodeni ekstrakti bijele imele se desetljećima koriste u alternativnom i pomoćnom liječenju tumora. Na fitofarmakološkom tržištu su danas prisutni brojni pripravci i ekstrakti imele. Pripravci bijele imele mogu se podijeliti na fitoterapeutske ekstrakte (Cefalektin, Eurixor, Lektinol) i homeopatski proizvedene ekstrakte (AbnobaViscum, Helixor, Iscador, Iscucin, Isorel) (tablica 3) (Freuding i sur., 2019). Fitoterapeutski pripravci dobivaju se od imele koja se bere tijekom zime sa stabala topole te su standardizirani na određenu koncentraciju lektina (od 1 do 15 ng kg^{-1} tjelesne mase). Homeopatski pripravci proizvode se od imele koja je rasla na različitim vrstama stabla domaćina kao što je hrast, jabuka, bor i drugi. Komercijalni preparat, Helixor (Helixor® Heilmittel GmbH & Co., Rosenfeld, Njemačka) je standardizirana vodena otopina

ekstrakta bijele imele sa jelinog drveta (*Abies alba*) dok se komercijalni preparat Iscador M (Iscador® M, Weleda AG, Schwabisch Gmund, Njemačka), dobiva fermentacijom vodene otopine ekstrakta svježeg biljnog materijala bijele imele sakupljene sa drveta jabuke (*Malus domestica*) pomoću baketrija iz roda *Lactobacillus*. Procedura branja imele je standardizirana a ekstrakti dobiveni od imele ubrane tijekom ljetne i zimske sezone branja se miješaju.

Tablica 3. Pripravci imele dostupni na tržištu (Nazaruk i Orlikowski, 2016)

<table>
<tr><th>Naziv pripravka</th><th>Stablo domaćina</th><th>Tip ekstrakta</th><th>Korišteni dio imele</th><th>Sezona berbe</th><th>Proizvođač</th></tr>
<tr><td>AbnobaViscum</td><td>Jela, javor, badem, breza, glog, jasen, jabuka, bor, topola, hrast</td><td>Svježi sok</td><td rowspan="3">Svježi izdanci listova, plodovi</td><td rowspan="6">Zima i ljeto</td><td>Abnoba</td></tr>
<tr><td>Helixor</td><td>Jela, jabuka, bor</td><td>Vodeni ekstrakt svježe biljke (1:20)</td><td>Helixor</td></tr>
<tr><td>Iscador</td><td>Jabuka, bor, hrast, brijest</td><td>Vodeni fermentirani ekstrakt svježe biljke</td><td>Weleda</td></tr>
<tr><td>Iscucin</td><td>Jela, glog, jabuka, bor, topola, hrast, vrba, lipa</td><td rowspan="3">Vodeni ekstrakt</td><td>Suhi izdanci listova, plodovi</td><td>Wala</td></tr>
<tr><td>Isorel</td><td>Jela, jabuka, bor</td><td>Svježi izdanci listova, plodovi</td><td>Novipharm</td></tr>
<tr><td>Cefalektin</td><td rowspan="3">Topola</td><td rowspan="3">Suhi izdanci listova</td><td rowspan="3">Zima</td><td>Cefak</td></tr>
<tr><td>Eurixor</td><td>-</td></tr>
<tr><td>Lektinol</td><td>Vodeno-etanolni ekstrakt (1,1-1,5:1)</td><td>Madaus</td></tr>
</table>

Lektini i viskotoksini su najvažniji antitumorski spojevi koji su izolirani iz vrsta *Viscum* (Eggenschwiler i sur. 2007; Schaller i sur.,1996). Navedeni komercijalni pripravci imele značajno se razlikuju po koncentraciji ovih skupina spojeva. Tako npr. Iscador sadrži veću koncentraciju viskotoksina u odnosu na lektine dok Helixor sadrži značajno više lektina nego viskotoksina. Kasnije studije pokazale su da i drugi spojevi, poput polifenolnih spojeva (de Oliveira Melo i sur., 2018), triterpenskih kiselina (Delebinski i sur., 2012) i nepolarnih spojeva (Ćebović i sur., 2008), također iskazuju antitumorska svojstva. Također, utvrđeno je da cjelovit ekstrakt imele ima bolje inhibitorno djelovanje na rast tumorskih stanica od pojedinih izoliranih spojeva zbog sinergističkog djelovanja različitih skupina spojeva imele

(Nazaruk i Orlikowski, 2016.; Delebinski i sur., 2012.; Strüh i sur., 2013.; Ćebović i sur., 2008). U antitumorskoj terapiji imela ima dvostruku ulogu. Prvo, utječe na poboljšanje kvalitete života oboljelih od tumora u vidu ublažavanja nuspojava klasičnog liječenja kao što su umor, iscrpljenost, povraćanje, mučnine, nesanica, gubitak apetita, depresija, anksioznost i bolovi (Tröger i sur., 2014; Singh i sur., 2016; de Oliviera Melo i sur., 2018). Drugo, antitumorska aktivnost imele temelji se na citotoksičnom učinku, indukciji apoptoze (Ćebović i sur., 2008; Park i sur., 2012; Han i sur. 2015; Mishra i sur. 2018) te inhibiciji angiogeneze (Elluru i sur. 2009). *In vitro* studije antitumorske aktivnosti imele potvrdile su njen utjecaj na različite signalne puteve koji imaju ključnu ulogu u proliferaciji tumora, uključujući MAPK (mitogen aktivirajuća protein kinaza) i PI3K/AKT (fosfatidilinozitol 3-kinaza/ protein kinaza B) (Park i sur., 2012). Nadalje, imela može uzrokovati zaustavljanje staničnog ciklusa (de Oliveira Melo i sur., 2018), gubitak propusnosti mitohondrijske membrane (MMP) (Mishra i sur. 2018) te aktivirati kaspaze i regulirati pro- i anti-apoptotičke proteine (Fan i sur., 2019). Antitumorska aktivnost imele povezana je s njezinim imunomodulatornim djelovanjem (Gardin, 2019.): ubrzava sazrijevanje i aktiviranje dendritičnih stanica (Elluru i sur., 2009; Steinborn i sur., 2017.), povećava broj leukocita, eozinofila, granulocita (Huber i sur., 2005) i limfocita (Semiglasov i sur., 2004.), povećava izlučivanje citokina (Elluru i sur., 2009), povećava aktivnost NK stanica (Kim i sur., 2018) te pojačava stanični i humoralni imunološki odgovor (Gardin, 2009). Kliničke su studije provedene na pacijentima oboljelim od različitih vrsta tumora: rak mokraćnog mjehura, rak dojke, rak debelog crijeva, gliom, rak pluća, melanom (Steele i sur., 2015; Kienle i sur., 2016; Schläppi i sur., 2017; Freuding i sur., 2019). Dodatno, u posljednje vrijeme pozornost je posvećena studijama sinergističkog učinka pripravaka imele i klasičnih antitumorskih postupaka kao što su kemoterapija i radioterapija (Schötterl i sur., 2019; Menke i sur., 2019).

Antihipertenzivno djelovanje

Tradicionalna primjena ekstrakata imele u narodnoj medicini za liječenje hipertenzije i bolesti srca potvrđena je suvremenim *in vitro* i *in vivo* istraživanjima (Poruthukaren i sur., 2014; Montero i sur., 2016). Vodeni ekstrakt bijele imele dovodi do povećanja aktivnosti enzima NO/sGC (topljiva gvanilil ciklaza) i signalnog puta koja rezultira povećanom koncentracijom cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) i dušikovog oksida (NO) koji djeluju kao vazodilatatori ključni u regulaciji protoka krvi i krvnog tlaka (Tenorio-Lopez i sur., 2006). Osim djelovanja na NO/sGC signalni put vazodilatorna aktivnost ekstrakta imele ostvaruje se i putem blokade kalcijevih kanala čime se smanjuje unutarstanična koncentracija Ca^{2+} iona

koji aktiviraju kontrakcijsku aktivnost glatkih mišića. Metanolni ekstrakt *Viscum articulatum* Burm. pokazao je antihipertenzivno djelovanje zbog prisutnosti triterpenoida, kao što su oleanolinska i betulinska kiselina. Studije na životinjama pokazale su da se primjena etanolnog ekstrakta značajno smanjuje krvni tlak. Ovo djelovanje ekstrakta imele ostvaruje se uglavnom putem receptora muskarina. Vodeni ekstrakt također je pokazao značajno smanjenje krvnog tlaka kod hipertenzivnih životinja. Pretpostavlja se da je ova aktivnost ekstrakata imele rezultat djelovanja na živčani sustav i periferne krvne žile. Polifenolni spojevi - fenilpropanoidi i flavonoidi izolirani iz *V. album* ssp. *album*, ovisno o dozi utjecali su na vaskularno opuštanje, što također može pridonijeti snižavanju krvnog tlaka. Ti spojevi vjerojatno inhibiraju (cAMP) –fosfodiesterazu (Szurpnicka i sur., 2020).

Antioksidacijsko djelovanje

Oksidativni stres, definiran kao neravnoteža između oksidansa i antioksidansa, dovodi do mnogih biokemijskih promjena u organizmima i važan je čimbenik koji pridonosi razvoju kroničnih bolesti kod ljudi, kao što je arterioskleroza i kardiovaskularne bolesti, mutageneza i rak, neurodegenerativni poremećaji i starenje (Cassidy i sur., 2020). Posljednjih desetljeća se za sprječavanje oksidativnog stresa sve više istražuju i koriste antioksidansi dobiveni iz prirodnih izvora. U skladu s tim, antioksidacijska aktivnost imele zahvaljujućim bogatom fitokemijskom sastavu bila je predmet je brojnih istraživanja (Onay-Ucar i sur., 2006; Leu i sur., 2006; Yao i sur., 2006; Vicas i sur., 2012; Choudhary i sur., 2010). Različiti ekstrakti imele kao i lektini izolirani iz imele pokazali su sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i zaštitnu ulogu od oksidativnog stresa izazvanog slobodnim radikalima (Sengul i sur., 2009; Papuc i sur., 2010; Kim i sur., 2018; Kusi i sur., 2015). Polarniji ekstrakti pokazali su veću antioksidacijsku aktivnost a razlog tome može biti veća koncentracija polifenolnih spojeva (Deliorman Orhan i sur., 2006; Khatun i sur., 2016; Pietrzak i sur., 2017). Međutim, zbog uočenih razlika ovisnih o metodama ekstrakcije i metodama istraživanja, antioksidacijska aktivnost ne ovisi samo o koncentraciji polifenolnih spojeva. Antioksidacisjki potencijal ekstrakata imele ovisi o kemijskom sastavu na kojeg značajan utjecaj ima stablo domaćin na kojem je imela rasla te o sezoni branja (Onay-Ucar i sur. 2006; Vicas i sur. 2011; Deliorman Orhan i sur. 2006; Pietrzak i sur., 2017).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Biljni materijal

Biljni materijal korišten za istraživanja u ovom radu mješavina je osušenih i usitnjenih grančica i listova bijele imele (*Viscum album*) (slika 6), kupljen kod proizvođača ljekovitog bilja.



Slika 6. Osušene i usitnjene grančice i listovi bijele imele (*Viscum album*)

3.1.2. Komercijalni uzorci biske

Komercijalni uzorci biske prikupljeni su od obiteljsko-poljoprivrednih gospodarstava i destilerija s područja Istre. Tijekom tri uzastopne godine, u razdoblju od 2017. do 2019. godine, prikupljena su 34 uzorka biske (B1-B34) (slika 7) od kojih su 24 proizvedena na obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima (uzorci iz domaće radinosti) te 10 u destilerijama (industrijski uzorci).



Slika 7. Komercijalni uzorci biske

3.1.3. Kemikalije (kemikalije, puferi, otopine, hranjive podloge)

Kemikalije:

- acetonitril, C_2H_3N, HPLC čistoće (J. T. Baker, Nizozemska)
- aluminijev klorid, $AlCl_3$, p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- amonijev karbonat, $(NH_4)_2CO_3$, p.a. (Fisher Scientific, UK)
- destilirana voda
- etanol 96 % (v/v) (Kefo, Slovenija)
- etil-acetat, $C_4H_8O_2$, p.a. (Carlo Erba, Francuska)
- fenolftalein (Gram mol, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Hrvatska)
- galna kiselina, analitički standard (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- kalcijev klorid dihidrat, $CaCl_2x2H_2O$, p.a. ()
- kalijev bikromat, $K_2Cr_2O_7$, p.a. (Kemika, Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)
- kalijev jodid, KI, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)
- kalijev klorid, KCl, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)
- kalijev persulfat, $K_2S_2O_8$, p.a. (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- kanamicin – diskovi 50 μg (Biolab, Mađarska)
- nistatin – diskovi 100 U (Biolab, Mađarska)
- klorovodična kiselina, HCl, 37 % (Fisher Scientific, UK)
- magnezijev klorid heksahidrat, $MgCl_2x6H_2O$, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)
- metanol, CH_4O, HPLC čistoće, (J. T. Baker, Nizozemska)
- natrijev acetat, $NaC_2H_3O_2$, p.a. (Gram mol, Hrvatska)
- natrijev hidrogenkarbonat, $NaHCO_3$, p.a. (Lach-Ner, Češka)

- natrijev hidroksid, NaOH, p.a. (Kemika, Hrvatska)

- natrijev karbonat, Na_2CO_3, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)

- natrijev klorid, NaCl, p.a. (Gram-mol, Hrvatska)

- octena kiselina, ledena, $C_2H_4O_2$, (Kemika, Hrvatska)

- pankreatin (4xUSP) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- pepsin (3200 – 4500 U mg^{-1} proteina) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- rutin, analitički standard (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- sumporna kiselina, H_2SO_4, 95-97% (Kefo, Slovenija)

- škrob, topljivi, $(C_6H_{10}O_5)_n$, p.a. i indikator (Kemika, Hrvatska)

- željezo(III) klorid heksahidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (Gram-mol, Hrvatska)

- žučne soli (goveđe), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- žučne soli (svinjske), (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- tripsin (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- seruim goveđeg fetusa (FBS, engl. Fetal Bovine Serum), (Gibco, UK)

- boja tripan plavo (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- boja kristal-ljubičasto (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- hranjivi medij za uzgoj stanica (DMEM, engl. Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Gibco, UK)

- dušik, visoka čistoća 5.0 (Messer, Hrvatska)

- helij, visoka čistoća 5.0 (Messer, Hrvatska)

- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina (Trolox), $C_{14}H_{18}O_4$ (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- 1,2-diklorbenzen, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

- volumetrijski standard natrijevog hidroksida, 0,1 mol L^{-1} (Gram-mol, Hrvatska)

- volumetrijski standard natrijevog tiosulfata, 0,1 mol L^{-1} (Gram-mol, Hrvatska)

- diamnoijeva sol 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Puferi:

- acetatni pufer, pH=3,6

- fosfatni pufer

- PBS pufer

Otopine:

- alkalna voda

- aluminijev klorid, 10 %-tna otopina (w/v)

Hranjive podloge:

- hranjivi agar (engl. *Nutrient agar*) (Biolife, Italija)

- Mueller Hinton agar 2 (Millipore, Njemačka)

3.1.4. Laboratorijska oprema i uređaji

- analitička vaga BP 210 S (Sartorius)

- autoklav (Instrumentaria, Hrvatska)

- čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska)

- eksikator

- GC kolona Stabilwax (polietilen glikol) (Restek, SAD)

- inkubator s kontroliranom atmosferom CO_2 (Kambič, Slovenija)

- inverzni svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Njemačka)

- laboratorijska centrifuga Rotofix 32 (Hettich, Njemačka)

- laboratorijski sušionik ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)

- laboratorijsko stakleno i plastično posuđe

- mikrobiološki zaštitni kabinet KTB-NS III (Klimaoprema d.d., Hrvatska)

- pH metar CG 842 (Schott, Njemačka)

- plinski kromatograf GCMS-QP2010 (Shimadzu Corportion, Japan).

- potrošni laboratorijski pribor (sterilne Petrijeve ploče, sterilni diskovi, mikrotitarske ploče, tipsevi, filter papir, šprice, kivete, viale za HPLC i GC, čepovi za viale)

- rotacijski vakuum uparivač (Buchi, Švicarska)

- SPME 50/30 μm vlakna DVB/CAR/PDMS, Stableflex (Supelco, SAD)

- staklena aparatura za određivanje volumnog udjela etanola po Martin- Dietrichu

- tehnička vaga KB1200-2N (Kern, Njemačka)

- tekućinski kromatograf Agilent 1260 s Agilent 6490 trostrukim kvadropolom MS/MS detektorom (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

- termoblok Reacti-Therm 18971 (Pierce, SAD)

- termostat (Instrumentaria, Hrvatska)

- ultrazvučna kupelj Sonorex RK 100 H (Bandelin, Njemačka)

- UPLC kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (Agilent, Santa Clara, CA, SAD)

- UV/VIS spektrofotometar Helios β (Unicam, Velika Britanija)

- vodena kupelj s tresilicom WNE 10 (Memmert GmbH+COKG, Njemačka)

- vortex Reax top (Heidolph, Njemačka)

3.1.5. Test-mikroorganizmi za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Kao test-mikroorganizmi za određivanje antimikrobne aktivnosti ispitivanih uzoraka korištene su bakterije i kvasci čuvane u zbirci mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju vrenja i kvasca Prehrambeno-biotehnološkog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstavnici Gram-negativnih bakterija:

- *Escherichia coli* 3014
- *Salmonella enterica* s. *Thyphimurium* 3064
- *Pseudomonas aeruginosa*

Predstavnici Gram-pozitivnih bakterija:

- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus* 3048
- *Enterococcus faecalis*
- *Listeria monocytogenes*

Kvasci:

- *Candida albicans*
- *Candida utilis*
- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Rhodotorula* sp.

Čiste kulture test-mikroorganizama čuvane su na kosom hranjivom agaru na +4 °C.

3.1.6. Stanične linije za ispitivanje antiproliferacijske aktivnosti

U ovom radu korištene su dvije humane stanične linije: tumorska HeLa stanična linija i normalna HaCaT stanična linija dobivene iz American Type Culture Collection (ATCC) radne banke stanica. HeLa je prva humana stanična linija uspostavljena 1952. a izolirana je iz tumora vrata maternice. U usporedbi s drugim humanim staničnim linijama, HeLa kontinuiranu staničnu liniju karakterizira izrazito velika specifična brzina rasta te je zbog toga korištena u velikom broju istraživanja tumora, toksičnosti kemikalija, djelovanja lijekova, genetičkih i drugih istraživanja. HaCaT stanična linija uspostavljena je spontanom transformacijom keratinocita odraslog čovjeka. Radi se o normalnoj staničnoj liniji uspostavljenoj pri niskim koncentracijama kalcija i povišenoj temperaturi (38,5 °C). HaCaT stanice su stanice klonalnog tipa, određene specifičnim i stabilnim citogenetičkim markerima. Stanične linije su prije provedbe eksperimenata čuvane na -70 ˚C u mediju za smrzavanje.

3.2. METODE

3.2.1. Priprema macerata imele

Macerati imele pripremljeni su maceracijom suhog, usitnjenog biljnog materijala (listovi i grančice imele) u vodeno-etanolnoj bazi u laboratorijskim uvjetima u triplikatu. Za pripremu vodeno-etanolnih baza korištena je destilirana voda i 96 % etanol. S ciljem optimizacije parametara maceracije imele pripremljeno je 12 macerata (M1-M12) koji se razlikuju prema masenoj koncentraciji biljnog materijala (20, 40 i 80 g L^{-1}), volumnom udjelu etanola u vodeno-etanolnoj bazi (25, 40, 55 i 70 %) te trajanju maceracije (21 i 28 dana) (tablica 4). Odvagana masa biljnog materijala prelivena je s 0,5 L vodeno-etanolne baze u bocama s čepom, odložena na tamno mjesto pri sobnoj temperaturi kako bi se izbjeglo izlaganje sunčevoj svjetlosti te povremeno promiješana. Na tjednoj bazi uzorcima je određivana koncentracija ukupnih fenolnih spojeva (TPC) te je kraj maceracije određen na temelju ustaljene koncentracije ovih spojeva. Nakon završene maceracije biljni materijal je uklonjen filtracijom pomoću filter-papira i mehanički iscijeđen, a dobiveni macerati spremljeni na + 4 °C do analiza.

Tablica 4. Parametri maceracije imele u vodeno-alkoholnoj bazi

Broj uzorka	**Jakost vodeno-etanolne baze (% v/v etanola)**	**Masena koncentracija imele (g L^{-1})**	**Trajanje maceracije (dani)**
M1	25	20	21
M2		40	21
M3		80	21
M4	40	20	21
M5		40	21
M6		80	28
M7	55	20	21
M8		40	28
M9		80	28
M10	70	20	28
M11		40	28
M12		80	28

3.2.2. Fitokemijska karakterizacija

3.2.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC)

Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) određen je pomoću Folin-Ciocalteu reagensa, prema modificiranoj metodi po Singletonn i Rossi (1965). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline. Pri oksidaciji fenolnih sojeva, 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.

Postupak rada

U odmjernu tikvicu od 10 ml odpipetira se 300 µL uzorka, 500 µL 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 (Helios β, Unicam). Slijepa proba se priprema na isti način kao i uzorak, ali se umjesto 300 µL uzorka doda isto toliko destilirane vode. Za izradu baždarnog pravca kao standard korištena je galna kiselina u rasponu masenih koncentracija 50-300 mg L^{-1}. Koncentracija ukupnih fenola (TPC) izračuna se prema jednadžbi pravca (1) a rezultati analize izraženi kao mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po L macerata (mg GAE L^{-1})

$$y = 0{,}0041x + 0{,}0204 \ (R^2 = 0{,}998) \quad (1)$$

gdje je: y - apsorbancija pri 760 nm, x - koncentracija galne kiseline (mg L^{-1}), a R^2 - koeficijent determinacije.

3.2.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida (TFC)

Ukupni flavonoidi (TFC) u uzorcima određeni su kolorimetrijskom metodom pomoću aluminijevog klorida (Pękal i Pyrzynska, 2014). U prisustvu aluminijevog klorida dolazi do stvaranja kiselih kompleksa s C-4 keto skupinom ili C-3 ili C-5 hidroksilnom skupinom flavona i flavonola.

Postupak rada

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

Za izradu baždarnog pravca kao standard korišten je rutin u rasponu masenih koncentracija 5-250 mg L^{-1}. Iz pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standardnih otopina rutina, dobiven je baždarni pravac. Iz jednadžbe pravca (2) izračunava se koncentracija ukupnih flavonoida u uzorku izražena kao mg ekvivalenata rutina (RE) po L macerata (mg RE L^{-1}):

$$y = 0{,}0059x + 0{,}003 \quad (R^2 = 0{,}999) \qquad (2)$$

gdje je: y - apsorbancija pri 415 nm, x - koncentracija rutina (mg L^{-1}), a R^2 -koeficijent determinacije. Budući da su uzorci razrijeđeni 5 puta, dobiveni rezultat potrebno je pomnožiti s faktorom 5.

3.2.2.3. Određivanje fenolnih spojeva primjenom ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (UPLC-ESI-MS^2)

Kvalitativno i kvantitativno određivanje fenolnih spojeva u maceratima (M3, M6, M9 i M12) i uzorcima biske provedeno je na sustavu za tekućinsku kromatografiju Agilent 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, SAD) opremljenim s: kvarternom pumpom, autosemplerom, termostatiranim modulom za kolonu, zatim Agilent 6490 trostrukim kvadropolom MS/MS detektorom te računalnim programom za upravljanje sustavom, prikupljanje i obradu

podataka *MassHunter Work Station for QQQ*. Kromatografsko razdvajanje fenolnih spojeva prisutnih u uzorcima provedeno je na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (100 mm x 2,1 mm I.D., veličina čestica 1,8 µm) (Agilent, Santa Clara, CA, SAD). Kolona je termostatirana na 35 °C, dok je injektirani volumen uzorka bio 2,5 µL. Kao mobilne faze korištene su 0,1 % mravlja kiselina u redestiliranoj vodi (mobilna faza A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (mobilna faza B) prema gradijentnom programu eluiranja (tablica 5).

Tablica 5. Gradijentni program mobilnih faza za UPLC-ESI-MS^2 analizu fenolnih spojeva (Elez Garofulić i sur., 2020)

t (min)	Mobilna faza A	Mobilna faza B	Protok (mL min^{-1})
0	95	5	0,35
10	65	35	0,35
10,1	20	80	0,35
11	20	80	0,35
11,1	95	5	0,35
12,5	95	5	0,35

Ionizacija je provedena primjenom ESI ionskog izvora u negativnom i pozitivnom modu, a podaci su prikupljeni u MRM načinu snimanja (m/z 100 do 1000). Parametri izvora ionizacije bili su: pozitivan/negativan napon na kapilari od +4000 do -3500 V, temperatura plina 300 °C s protokom od 11 L h^{-1} i tlakom nebulizera 40 psi. Kao plin korišten je dušik visoke čistoće (99,999 %) (Messer, Hrvatska). Identifikacija fenolnih spojeva provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Kvantitativne vrijednosti za pojedinačne fenolne spojeve izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravaca standardnih spojeva koji prikazuju ovisnost površine pika i masene koncentracije spoja prikazanih u tablici 6. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa usporedbom njihovih prekursor i fragment iona s literaturnim podacima. Kvantifikacija spojeva bez referentnih standarda provedena je na sljedeći način: kaempferol, kaempferol-3-O-glukozid, kaempferol-ramnozid, kaempferol-pentozid, kaempferol-pentozil-heksozid i kaempferol-3-O-ramnozil-heksozid kvantificirani su prema standardu kaempferol-3-O-rutinozida, kvercetin, kvercetin-pentozid, kvercetin-acetil-heksozid, kvercetin-3-O-ramnozid, kvercetin-pentozil-

heksozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-acetil-rutinozid, izoramnetin i izoramnetin-3-O-rutinozid prema standardu kvercetin-3-O-glukozida, krizoeriol i apigenin-7-O-glukozid prema standardnoj baždarnoj jednadžbi apigenina, umbeliferon prema standardu skopoletina. Protokatehinska, gentizinska i p-hidroksibenzojeva kiselina kvantificirane su prema standardu galne kiseline, dok su cimetna i siringinska kiselina prema kafeinskoj kiselini. Dobivene koncentracije izražene su kao mg mL^{-1} uzorka.

Tablica 6. Jednadžbe baždarnih pravaca za pojedine fenolne spojeve (Elez Garofulić i sur., 2020)

Naziv standarda	**Jednadžba baždarnog pravca**
Kvercetin-3-glukozid	y = 1390,14x
Kamferol-3-rutinozid	y = 1232,2x
Kafeinska kiselina	y = 659,26x
Epikatehin	y = 1239,51x
Ferulinska kiselina	y = 79,62x
Galna kiselina	y = 203,59x
Klorogena kiselina	y = 615,27x
p-kumarinska kiselina	y = 464,21x
Katehin	y = 1267,87x
Epigalokatehin galat	y = 902,69x
Rutin	y = 900,48x
Epikatehin galat	y = 532,75x
Kvininska kiselina	y = 27,21x
Naringenin	y = 73,56x
Miricetin	y = 207,5x
Apigenin	y = 1468,46x
Luteolin	y = 1657,9x
Sinapinska kiselina	y = 5,28x
Skopoletin	y = 11,15x
Eskuletin	y = 137,3x

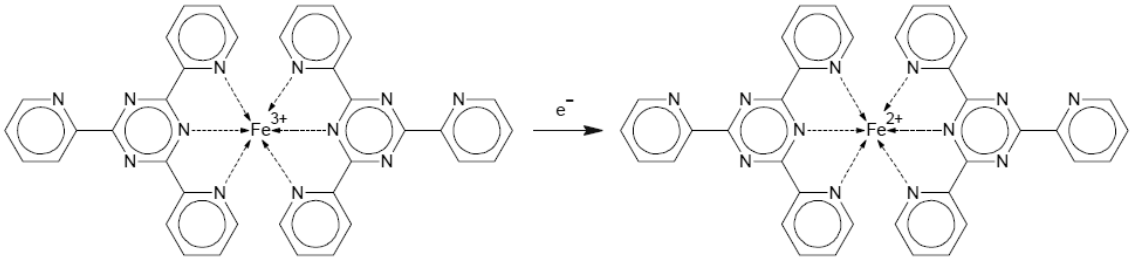
3.2.3. Funkcionalna svojstva uzoraka

3.2.3.1. Antioksidacijska aktivnost

3.2.3.1.1. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka FRAP (engl. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) metodom

FRAP metoda se bazira na redukciji žuto obojenog kompleksa feri-2,4,6-tripiridil-s-triazina (Fe(III)-TPTZ) u kiselom mediju (pH 3,6) i u prisutnosti antioksidanasa, u intenzivno

plavo obojeni fero-kompleks (Fe(II)-TPTZ), sa apsorpcijskim maksimumom na 593 nm (slika 8).



Slika 8. Reakcija redukcije Fe^{3+}-TPTZ kompleksa

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. 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.

Postupak rada

Redukcijski potencijal je određen metodom po Benzie i Strain, 1999. Kako bi se ispitala antioksidativna aktivnost uzoraka 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 termostatiranja u termostatu na 37 °C mjeri se apsorbancija na 595 nm. U slijepu probu umjesto uzorka dodaje se 80 µL etanola. Za izradu baždarnog pravca korišten je standard

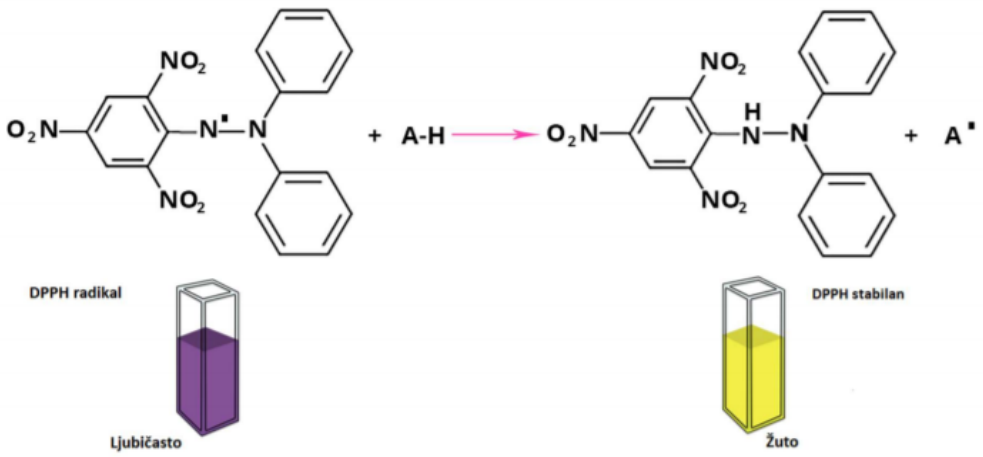
Trolox (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiselina) u rasponu koncentracija 0,1-2,0 mM. Redukcijski potencijal analiziranih uzoraka računa se prema jednadžbi baždarnog pravca (3), a rezultati su izraženi kao mM Troloxa.

$$y = 1{,}0038x + 0{,}0051 \ (R^2 = 0{,}998) \quad (3)$$

gdje je: y - apsorbancija pri 593 nm, x - koncentracija Troloxa (mM), a R^2 -koeficijent determinacije.

3.2.3.1.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) metodom

DPPH metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti temelji se na redukciji DPPH radikala (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) koja je praćena kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jaku apsorpciju u vidljivom dijelu spektra (517 nm). 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 apsorbancije u opadanju (slika 9) (Brand-Williams i sur., 1995).



$$DPPH\bullet + AH \rightarrow DPPH - H + A\bullet$$

Slika 9. Reakcija redukcije DPPH radikala

Postupak rada

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.

U kivetu se otpipetira 2 mL 96 %-tnog etanola, zatim se doda 200 μL 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 μL uzorka, dodaje 200 μL etanola. Sadržaj kivete se promiješa te se one stave na tamno mjesto. Nakon 30 minuta spektrofotometrijski se odredi antioksidacijska aktivnost mjerenjem apsorbancije na 517 nm. Postotak inhibicije DPPH radikala uzoraka računa se prema jednadžbi (4):

$$\% \text{ inhibicije} = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 \quad (4)$$

gdje je: A_0 - apsorbancija otopine DPPH radikala; A_t – apsorbancija reakcijske smjese.

3.2.3.1.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metodom

ABTS metoda se temelji na “utišavanju“ plavo-zelenog ABTS radikal-kationa (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) koji se formira kemijskom ili enzimskom oksidacijom otopine ABTS-a nekoliko sati prije analize. Reakcijom ABTS-a s kalijevim persulfatom nastaje kromoforni ABTS• radikal koji daje plavo-zelenu boju otopine s maksimumom apsorpcije pri valnim duljinama od 415, 645, 734 i 815 nm. Antioksidansi dodani u pripremljenu otopinu reduciraju ABTS• čime se gubi obojenje (slika 13). Razina obezbojenja odražava postotak inhibicije ABTS• radikala i određuje se kao funkcija koncentracije i vremena te uspoređuje sa standardom ekvivalenta. Metoda je primjenjiva za tvari topljive u vodi i mastima, za čiste tvari i ekstrakte prehrambenih proizvoda (Re i sur., 1999).

Postupak rada

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti uzoraka potrebne su:
1. 7 mM otopina ABTS reagensa koji se priprema otapanjem 0,0384 g ABTS-a u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

2. 140mM otopina kalijeva persulfata koja se priprema otapanjem 0,37846 g kalijeva persulfata ($K_2S_2O_8$) u odmjernoj tikvici od 10 mL i nadopuni se do oznake destiliranom vodom.

Pomiješa se 89 µL kalijeva persulfata sa 5 mL ABTS-a. Tikvica se potom obloži s aluminijskom folijom i čuva se u mraku 12 do 16 sati. Tako pripremljen reagens je stabilan dva dana. Sljedeći dan je potrebno pripremiti 1 % otopinu ABTS tako da se 1 mL ABTS otopi u 96 % etanol i nadopuni se do oznake u odmjernoj tikvici od 100 mL. Daljnjim dodavanjem ABTS ili 96 % etanola potrebno je postići apsorbanciju pri 734 nm u iznosu od 0,700 ± 0,02.

Uzorci se pripremaju dodavanjem 20 µL uzorka te 2 mL ABTS. Reakcija se odvija 6 min u mraku te se na kraju apsorbancija tako pripremljenih uzoraka mjeri na 734 nm. Za izradu baždarnog dijagrama korišten je standard Trolox u rasponu koncentracija 0,25-2,0 mM. Antioksidacijski potencijal uzoraka računa se prema jednadžbi baždarnog pravca (5), a rezultati su izraženi kao mM Troloxa.

$$y = 0{,}3009x - 0{,}0052 \ (R^2 = 0{,}992) \quad (5)$$

gdje je: y - apsorbancija pri 734 nm, x - koncentracija Troloxa (mM), a R^2 -koeficijent determinacije.

3.2.3.1.4. Ukupni antioksidacijski indeks (ACI)

Rezultate antioksidacijske aktivnosti izmjerene različitim metodama teško je međusobno uspoređivati, kako zbog različitih mehanizama djelovanja tako i zbog različitih mjernih jedinica koje se koriste za izražavanje rezultata. Da bi se rezultati antioksidacijske aktivnosti dobiveni različitim metodama sveli na međusobno usporedive vrijednosti izračunat je ukupni antioksidacijski indeks (ACI, engl. *Antioxidant Composite Index*). Najvišoj vrijednosti za svaki set mjerenja u pojedinoj metodi data je vrijednost 100, dok su za ostale uzorke antioksidacijski indeksi (ACI uzorka) računati prema formuli (6):

$$\text{ACI uzorka} = (\text{vrijednost uzorka} / \text{najveća vrijednost uzorka}) \times 100 \quad (6)$$

Ukupni antioksidacijski indeks nekog uzorka izražen je kao srednja vrijednost antioksidacijskog indeksa uzorka za FRAP, DPPH i ABTS metodu (Seeram i sur., 2008).

3.2.3.2. Antimikrobna aktivnost

3.2.3.2.1. Priprema hranjivih podloga, kultura test-mikroorganizama i ispitivanih uzoraka

Tekuće hranjive podloge za pripremu kultura test-mikroorganizama pripremljene su otapanjem određene količine sastojaka u destiliranoj vodi nakon čega su sterilizirane u autoklavu na 121 °C u trajanju od 15 minuta. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka disk difuzijskom metodom korišten je Mueller Hinton agar 2 koji je pripremljen otapanjem određene količine prema uputama proizvođača. Nakon provedene sterilizacije u autoklavu hranjiva podloga se u sterilnim uvjetima izlijeva u Petrijeve ploče koje se zatim ostavljaju da se ohlade i stvrdnu.

Čiste kulture test-mikroorganizama koje su korištene u ovom istraživanju čuvane su u epruvetama na kosom agaru. Porasle kolonije odabranih čistih kultura test-mikroorganizama sa kosog agara, precijepljene su pomoću mikrobiološke ušice u 10 mL tekuće hranjive podloge i stavljene u termostat na inkubaciju pri temperaturi od 37 ˚C za bakterije te na 28 ˚C za kvasce kroz 24 sata. Tako dobivene suspenzije test-mikroorganizama korištene su za određivanje antimikrobne aktivnosti. Krajnja koncentracija test-mikroorganizama u tekućoj hranjivoj podlozi iznosila je oko 0,5 McFarland-ovog standarda, što odgovara 1-2×10^8 CFU broju stanica.

20 mL uzoraka macerata (M3, M6, M9 i M12) i odabranih komercijalnih uzoraka biske (B20, B24, B33 i B34) upareno je do suhog taloga na temperaturi od 50 °C u rotacijskom vakuum-uparivaču (Buchi, Švicarska). Kako bi se tijekom određivanja antimikrobne aktivnosti uzoraka isključio inhibicijski učinak etanola na rast test-mikroorganizama dobiveni talog svakog uzorka otopljen je u 0,5 mL 10 % v/v etanolu čime su uzorci koncentrirani 40 puta te svedeni na isti volumni udio etanola. Tako pripremljeni uzorci korišteni su za određivanje potencijalne antimikrobne aktivnosti.

3.2.3.2.2. Disk difuzijska metoda

Određivanje potencijalne antimikrobne aktivnost uzoraka provedeno je primjenom disk difuzijske metode, mjerenjem promjera zona inhibicije rasta (mm). Ova metoda je jednostavna, brza i jeftina, a omogućuje utvrđivanje osjetljivosti mikroorganizma na više agensa odnosno više različitih koncentracija nekog agensa istovremeno. Na Petrijeve ploče s Mueller Hinton agarom ravnomjerno se nacijepi 0,1 mL suspenzije prethodno uzgojenog test-mikroorganizmi. Zatim su sterilnom pincetom na hranjivu podlogu stavljeni sterilni diskovi promjera 6 mm (Macherey-Nagel, Njemačka) na koje je naneseno 20 µL ispitivanog uzorka (macerati i komercijalni uzorci biske). Tako pripremljene Petrijeve ploče stavljene su u termostat na inkubaciju na 28 °C za kvasce i 35 °C za bakterije. Tijekom inkubacije spoj difundira radijalno iz diska u agar tvoreći gradijent koncentracije i ovisno o njegovom antimikrobnom djelovanju inhibira rast mikroorganizma u okolini diska. Ako je test-mikroorganizam osjetljiv na djelovanje ispitivanog uzorka neće doći do njegovog rasta. Prozirna zona u kojoj nema vidljivog rasta naziva se zona inhibicije rasta, a osjetljivost test-mikroorganizma upravo je proporcionalna promjeru zone inhibicije koji se očitava u milimetrima. Nakon 24 h inkubacije izmjereni su promjeri zona inhibicije rasta (mm) svakog test-mikroorganizma. Kao pozitivna kontrola za bakterije korišten je antibiotik kanamicin (50 µg), a za kvasce antibiotik nistatin (100 U). Kao negativna kontrola korišteno je otapalo, 10 % v/v etanol. Sva mjerenja su izvedena u 3 paralele.

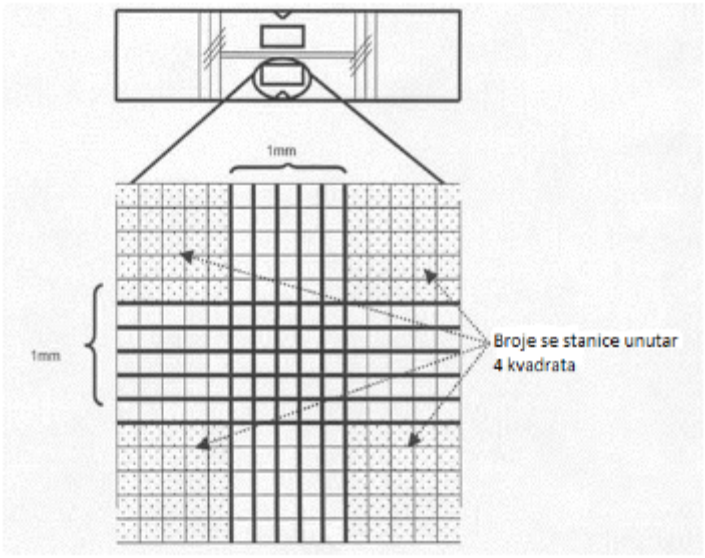
3.2.3.3. Antiproliferacijska aktivnost

3.2.3.3.1. Uzgoj i određivanje broja stanica uz dodatak boje tripan-plavo

Za provedbu eksperimenta stanice su prethodno odmrznute uranjanjem u vodenu kupelj na 30 °C. Stanice su odcentrifugirane pri 1000 okretaja min^{-1} tijekom 3 minute. Supernatant je pažljivo uklonjen pipetom, a talog stanica je resuspendiran u DMEM mediju za uzgoj koji sadrži 10 % FBS. Stanice su zatim prebačene u petrijevku koja je stavljena u inkubator s reguliranom atmosferom koja sadrži 95 % zraka i 5 % CO_2 na temperaturu od 37 °C. Uzgoj u petrijevkama omogućava održavanje biomase stanica za potrebe postavljanja pojedinačnih eksperimenata. Stanice je potrebno održavati u eksponencijalnoj fazi rasta te su

morfologija stanica, njihovo opće stanje i brojnost praćeni pod inverznim mikroskopom. Također praćena je i boja medija, jer nagla promjena boje često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi ili prerastanja podloge za uzgoj. Tijekom provedbe eksperimenta potrebno je osigurati i održavati aseptične uvjete rada.

Za određivanje broja stanica najprije je iz petrijevke uklonjen hranjivi medij te je dodano 2 mL PBS pufera za ispiranje stanica. Nakon toga, PBS pufer je uklonjen te je dodan 1 mL otopine tripsina kako bi se stanice odvojile od podloge. Tretman tripsinom završen je kada su stanice, gledajući pod inverznim mikroskopom, zaokružene i odvojene od površine. Zatim se djelovanje tripsina zaustavlja dodatkom 1 mL DMEM sa 10 % FBS-a. Alikvot suspenzije stanica (20 µL) pomiješan je s 20 µL boje tripan plavo te je 20 µL preneseno u Neubauer komoricu za brojanje stanica (slika 10). Komora je podijeljena na 4 velika kvadrata u kojima se broje stanice.



Slika 10. Neubauer komorica za brojanje stanica

Koncentracija stanica (broj stanica po mL suspenzije) dobije se prema izrazu:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata x 5000} \quad (8)$$

3.2.3.3.2. Ispitivanje antiproliferacijske aktivnosti primjenom MTS metode

MTS metoda je kolorimetrijska metoda koja se koristi za praćenje proliferacije stanica u ovisnosti o faktorima rasta, citokinima, mitogenima i nutrijentima, zatim za analizu citotoksičnih i citostatičkih spojeva te za određivanje antitijela koja inhibiraju rast. MTS reagens se sastoji od tetrazolijeve soli MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] i PES (phenazine ethosulfate). PES poveća stabilnost reagensa. MTS se djelovanjem mitohondrijskih dehidrogenaza u stanicama reducira do formazana ljubičaste boje koji je otopljen u mediju te nije potrebno otapanje kristala formazana.

HeLa i HaCaT stanice u eksponencijalnoj fazi rasta izbrojane uz dodatak boje tripan plavo te nacijepljene u mikrotitarske ploče s 96 jažica u početnoj koncentraciji od $3x10^4$ stanica mL^{-1}. Stanice su inkubirane 24 sata na 37 °C. Nakon toga, stanice su tretirane odabranim maceratima imele i komercijalnim uzorcima biske u rasponu volumnih udjela od 1,25 do 10 % v/v. Stanice su inkubirane pri 37 °C tijekom 72 sata nakon čega je određen citotoksičan učinak primjenom MTS metode. Nakon tretmana, u svaku je jažicu dodano 10 µL MTS-a. Inkubacija je trajala 3 sata nakon čega je određen intenzitet obojenja spektrofotometrijski pri 492 nm na čitaču mikrotitarskih ploča. Apsorbancija je proporcionalna broju živih stanica u mjerenoj jažici. Preživljenje stanica (%) izraženo je tako što su u odnos stavljene dobivene vrijednosti apsorbancije za tretirane i netretirane (kontrolne) stanice, za koje se preživljenje smatra 100 % prema izrazu:

$$\text{Preživljenje stanica (\%)} = \text{srednja vrijednost A490 uzorka / srednja vrijednost A490 kontrole} \times 100 \quad (9)$$

3.2.3.3.3. Bojanje stanica otopinom boje kristal-ljubičasto

Morfološke promjene na HeLa i HaCaT stanicama uzrokovane djelovanjem ispitivanih uzoraka određene su bojanjem stanica s kristal-ljubičastim. Stanice su prvo nacijepljene u ploču s 12 jažica i tretirane ispitivanim uzorcima u volumnom udjelu od 10 % v/v. Nakon 72 sata tretmana uklonjen je medij za uzgoj te su stanice isprane dodatkom PBS pufera, a zatim je dodano 200 µL otopine boje kristal-ljubičasto. Nakon 10 min boja je

uklonjena, stanice su isprane PBS puferom te slikane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom

3.2.4. Ispitivanje stabilnosti biološki aktivnih spojeva tijekom *in vitro* gastrointestinalne probave

Da bi se utvrdio utjecaj uvjeta gastrointestinalne probave na stabilnost biološki aktivnih spojeva macerata provedena je *in vitro* gastrointestinalna probava. Dvofazni model *in vitro* gastrointestinalne probave sastoji se od simulacije uvjeta probave u želucu (pH 3, djelovanje pepsina, žučani probavni sok) nakon kojeg slijedi probava u početnom dijelu tankog crijeva (dvanaesniku) (pH 7, djelovanje pankreatina i žućnih soli, probavni sok tankog crijeva) prema metodi Jara-Palacios i sur. (2018). Probavni sokovi želuca i tankog crijeva pripremljeni su miješanjem otopina soli KCl, KH_2PO_4, $NaHCO_3$, NaCl, $MgCl_2$ x 6(H_2O) i $(NH_4)_2CO_3$ u različitim omjerima (tablica 7) prema radu Minekus i sur. (2014). Za želučanu fazu probave 5 mL macerata pomiješano je s 3,75 mL probavnog soka želuca, 0,8 mL otopine pepsina (25000 U mL^{-1}) te 2,5 µL 0,3 M $CaCl_2$ x 2(H_2O). pH reakcijske smjese podešen je na 3 pomoću 1M HCl te je volumen nadopunjen s simuliranim probavnim sokom želuca do 10 mL. Reakcijska smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 37 °C 2 h uz miješanje. Nakon toga je dio uzorka izuzet i smrznut na -20 ºC do analize sadržaja ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti, a ostatak uzorka dalje podvrgnut probavi u tankom crijevu. Za simulaciju probave u tankom crijevu, 7 mL uzorka probavljenog u želucu je pomiješano s 3,85 mL simuliranog probavnog soka tankog crijeva, 1,75 mL otopine pankreatina (800 U mL^{-1}), 20 mg goveđih žućnih soli, 20 mg svinjskih žućnih soli i 14 µL i 0,3 M $CaCl_2$. pH reakcijske smjese je podešen na 7 pomoću 1 M NaOH te je volumen nadopunjen s probavnim sokom do 14 mL. Reakcijska smjesa je inkubirana u vodenoj kupelji na 37 °C 2 h uz miješanje. Nakon toga su uzorci smrznuti na -20 ºC do analize sadržaja ukupnih fenolnih spojeva, ukupnih flavonoida i antioksidacijske aktivnosti

Tablica 7. Sastav simuliranih probavnih sokova želuca i tankog crijeva (Minekus i sur., 2014)

Sol	**Koncentracija stock otopine**		**Simulirani probavni sok želuca, pH 3**		**Simulirani probavni sok tankog crijeva, pH 7**	
	g L^{-1}	mol L^{-1}	volumen stock otopine (mL)	konačna koncentracija (mmol L^{-1})	volumen stock otopine (mL)	konačna koncentracija (mmol L^{-1})
KCl	37,3	0,5	6,9	6,9	6,8	6,8
KH_2PO_4	68,0	0,5	0,9	0,9	0,8	0,8
$NaHCO_3$	84,0	1,0	12,5	25,0	42,5	85,0
NaCl	117,0	2,0	11,8	47,2	9,6	38,4
$MgCl_2x6(H_2O)$	30,5	0,15	0,4	0,1	1,1	0,33
$(NH_4)_2CO_3$	48,0	0,5	0,5	0,5	-	-
$CaCl_2x2(H_2O)^*$	44,1	0,3		0,15		0,6

*$CaCl_2x2(H_2O)$ se ne dodaje u simulirane probavne sokove, već direktno u probavnu reakcijsku smjesu

3.2.5. Fizikalno-kemijski parametri

3.2.5.1. Određivanje pH vrijednosti

pH vrijednosti uzoraka macerata izmjerene su pomoću Schott CG 842 (Mainz, Njemačka) laboratorijskog pH-metra. Kalibracija sustava postignuta je uranjanjem pH-elektrode u pufer pH=4 i pH=7.

3.2.5.2. Određivanje ukupnih kiselina / titracijske kiselosti

Ukupna titracijska kiselost određuje se titracijom alkoholnog pića sa 0,1 M otopinom NaOH uz fenolftalein kao indikator (Barros i sur., 2014). Na ovaj način se može određivati sadržaj kiselina svih alkoholnih pića. U Erlenmajerovu tikvicu od 100 ml se odpipetira 25 ml uzorka macerata, doda 200 ml destilirane vode i kuha 10 minuta pod povratnim hladilom radi

uklanjanja otopljenog CO_2. Nakon hlađenja uzorka pod mlazom hladne vode doda 3-4 kapi indikatora fenolftaleina i titrira sa 0,1 M NaOH do prve pojave ružičaste boje koja mora biti stabilna 20 sekundi. Ukupna količina kiselina izražava se u mg octene kiseline po litri pića, prema formuli:

$$\text{Ukupne kiseline (mg octene kis. } L^{-1} \text{ pića)} = 6 \times a \times f \times 40 \quad (10)$$

gdje je: a - ml 0,1 M NaOH utrošenog za titraciju; f - faktor molariteta NaOH; 6 - faktor za octenu kiselinu; 40 - faktor korekcije na 1 L pića.

3.2.5.3. Određivanje ukupnog ekstrakta

Ekstrakt jakog alkoholnog pića podrazumijeva sve neisparljive sastojke koji ostaju nakon uparavanja vode i etanola u određenoj količini alkoholnog pića. Ukupni ekstrakt se određuje postupkom direktog uparavanja alkoholnog pića u vodenoj kupelji i dodatnim sušenjem u sušioniku na 105 °C do konstantne mase (Da Silva i sur., 2019). U prethodno izvaganu posudicu doda se 5 mL termostatiranog macerata i stavi u vodenu kupelj da lagano isparava. Kad tekućina potpuno ispari, talog se ostavi u sušionik na 105 °C minimalno 2 sata. Nakon završenog sušenja uzorak se prenese u eksikator, ohladi i izvaže. Sadržaj ekstrakta izražen je u g L^{-1} pića a računa se po sljedećoj formuli:

$$\text{Ukupni ekstrakt (g } L^{-1}) = (m_1 - m_2) \times 1000/\text{mL uzorka} \quad (11)$$

gdje je: m_1- masa posude s ekstraktom (g); m_2 - masa prazne posude (g).

3.2.5.4. Određivanje volumnog udjela etanola

Metoda za određivanje volumnog udjela etanola po Martin-Dietrichu (Kellermann, 1960) 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

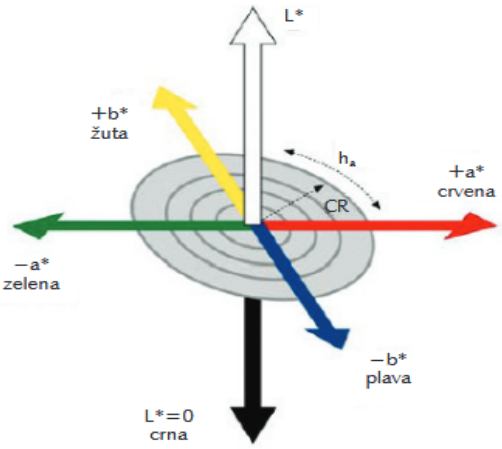
bikromata (20 mL). Destilacija traje do promjene boje uzorka u zelenkasto-smeđu te se nakon toga mjeri vrijeme od 1 minute kada se prekida destilacija. Nakon hlađenja do sobne temperature, uzorku se dodaje kalijev jodid na vrhu špatule i 1 mL otopine škroba, te se otopina retitrira natrijevim tiosulfatom do pojave plavozelene boje uzorka. Volumni udio alkohola izračunava se prema formuli:

$$\text{EtOH (\%)} = (V1 - V2) \text{ x } f / \text{ volumen uzorka x r} \qquad (12)$$

gdje je: V1- utrošak natrijevog tiosulfata za slijepu probu; V2- utrošak natrijevog tiosulfata za uzorak; f- faktor (0,146); r- razrjeđenje.

3.2.5.5. Određivanje kromatskih parametara

Kromatski parametri dobivenih macerata određeni su spektrofotometrijski prema CIElab sustavu (engl. *International Commission on Illumination*) (slika 11) (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 kromatski 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. Parametri C koji označava zasićenje i h (kut) definiraju ton boje.



Slika 11. CIE Lab prostor boja (CIELab)

Vrijednost *L* (eng. Lightness) predstavlja svjetlinu boje ili luminanciju, pri čemu više *L* vrijednosti ukazuju na slabiju obojenost, odnosno svjetlije obojenje, a niže *L* vrijednosti ukazuju na tamnije obojenje (*L*=100 apsolutno bijelo; *L*=0 apsolutno crno). Vrijednost *C* (engl. *Chroma, Saturation*) predstavlja intenzitet boje ili zasićenost boje. Visokom se zasićenošću odlikuju jarke i čiste boje bez primjesa dok smanjenjem zasićenosti i približavanjem ishodištu raste udio sive (bijele...crne) boje, te boje djeluju pastelnije i blaže. Niža *C* vrijednost ukazuje na nižu čistoću boje. Negativna *a* vrijednost označava zelenu, a pozitivna *a* vrijednost označava crvenu boju. Vrijednost *b* predstavlja odnos žute i plave komponente. Negativna *b* vrijednost označava plavu, a pozitivna *b* vrijednost označava žutu boju. Vrijednost *h* (engl. *Hue angle*) ton boje ili tonalnost tj. vizualni doživljaj predstavlja osjet izazvan različitim dijelovima spektra uz jednaku svjetloću.

3.2.5.6. Određivanje profila aroma spojeva plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC-MS)

Profil aroma spojeva dobivenih macerata određen je plinskom kromatografijom spregnutom sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Prije same kromatografske analize aroma spojevi su iz prostora iznad uzorka (engl. *Headspace (HS)*) izdvojeni primjenom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction* (SPME)).

3.2.5.6.1. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

U staklenu vialu (20 mL) stavljeno je 7 mL uzorka macerata i 1 µL 1,2-diklorbenzena (0,1 % u metanolu) te zatvoreno čepom sa silikonskom septom. Kroz septu u prostor iznad uzorka (headspace, HS) uvedeno je 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (divinilbenzen/karboksen/ polidimetilsiloksan) vlakno (dužine 1 cm) (Supelco, SAD) i izloženo parama uzorka tijekom 20 min na 25 °C uz konstantno miješanje pomoću magnetića. Tijekom ovog postupka dolazi do adsorpcije hlapivih spojeva iz uzorka na SPME vlakno. Nakon toga SPME vlakno je preneseno u injektor plinskog kromatografa gdje na 250 °C kroz 5 min dolazi do desorpcije

hlapivih spojeva koji nošeni plinom nosiocem ulaze u kromatografski sustav. SPME vlakno je prije upotrebe kondicionirano prema uputama proizvođača (270 °C, 30 min).

3.2.5.6.2. Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Plinska kromatografija sa masenom spektrometrijom je provedena na instrumentu GCMS-QP2010 (Shimadzu Corportion, Japan). Razdvajanje hlapivih spojeva provedeno je na koloni Stabilwax (polietilen glikol) (Restek, SAD), dimenzija 30 m x 0,25 mm, debljine filma 0,25 μm. Kao plin nositelj korišten je helij za kromatografiju brzine protoka 0,65 mL min^{-1}. Temperatura injektora iznosila je 250 ℃. Korišten je gradijentni temperaturni program uz početnu temperaturu kolone 35 ℃ (1 minuta), zagrijavanje za 5 °C min^{-1} do 220 °C (zadržavanje tijekom 2 min) te za 10 °C min^{-1} do konačnih 240 °C. Ukupno vrijeme analize bilo je 40 min. Temperature interfacea i ionskog izvora bile su 260 °C i 250 °C, dok je energija ionizacija iznosila 70 eV. Analize su provedene u duplikatu ili triplikatu. 1,2-diklorbenzen je korišten za semi-kvantifikaciju hlapivih spojeva dok je njihova identifikacija provedena na temelju NIST 47, NIST 147 i Wiley 175 knjižnica spektara masa.

3.2.5.7. OAV vrijednost

S ciljem procjene doprinosa pojedinih hlapivih spojeva ukupnoj aromi macerata određena je OAV vrijednost (engl. *Odour Activity Value*) koja predstavlja omjer koncentracije pojedinog hlapivog spoja i njegovog senzorskog praga osjetljivosti. OAV vrijednost izračunata je prema formuli:

$$OAV = Ci/OTi \quad (13)$$

gdje je: Ci – koncentracija spoja u uzorku; OTi – granična vrijednost praga osjetljivosti u 10 % v/v vodeno-etanolnoj otopini navedena u literaturi. Spojevi čiji je OAV > 1 značajno doprinose karakterističnoj aromi pića. Nadalje, spojevi čiji je OAV < 1 zbog sinergističkog učinka također mogu doprinijeti kompleksnosti arome pića (Tian i sur., 2021).

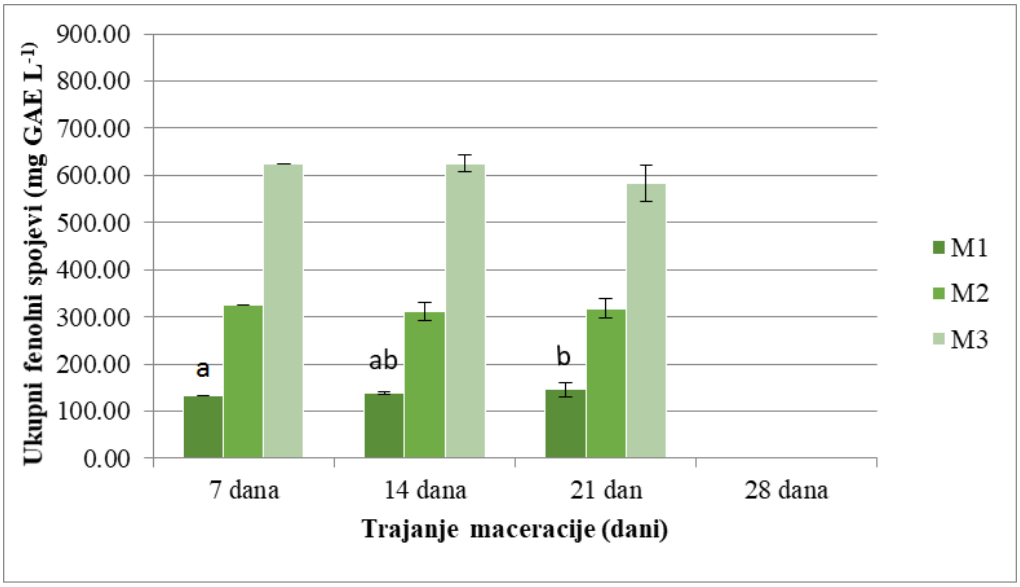
3.2.6. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je primjenom programa Microsoft Office Excel programa, nadograđenog statističkim programom XLStat (Addinsoft, Francuska) i Statistica 8 programa (StatSoft Inc., SAD). Sva analitička mjerenja su provedena u 3 paralele. Rezultati su prikazani tablično i grafički te su im izračunati parametri deskriptivne statistike: aritmetička sredina i standardna devijacija. Rezultati analiza su obrađeni analizom varijance (ANOVA), a značajnost razlika između uzoraka ispitana je post-hoc Tukey's HSD testom na razini značajnosti 95 %. Iznimka je statistička obrada istraživanih procesnih parametara maceracije na prinos ukupnih fenolnih spojeva gdje je provjera distribucije podataka rađena Kolmogorov-Smirnov testom te je provedena ANOVA ili neparametrijski Kruskal Wallis test. U slučaju ANOVE varijanca je testirana Levene testom te je ovisno o varijanci rađen Scheffe ili Tamhane post-hoc test na razioni značajnosti 95 %. Analiza glavnih komponenti (PCA, engl. *Principal Component Analysis*) provedena je kako bi se vizualizirao odnos i utvrdilo moguće grupiranje uzoraka na osnovi ispitivanih parametara: kromatskih karakteristika i aroma spojeva. Ova metoda se zasniva na korelaciji između varijabli te grupira uzorke u glavne komponente (PC, engl. *Principal Component*). Metoda daje opis odnosa između varijabli, te omogućava njegovu vizualizaciju. Objekti koji su slični jedan drugome grupiraju se zajedno, dok su oni različiti udaljeniji. PCA je primijenjena na set podatka koje čine srednje vrijednosti mjerenja.

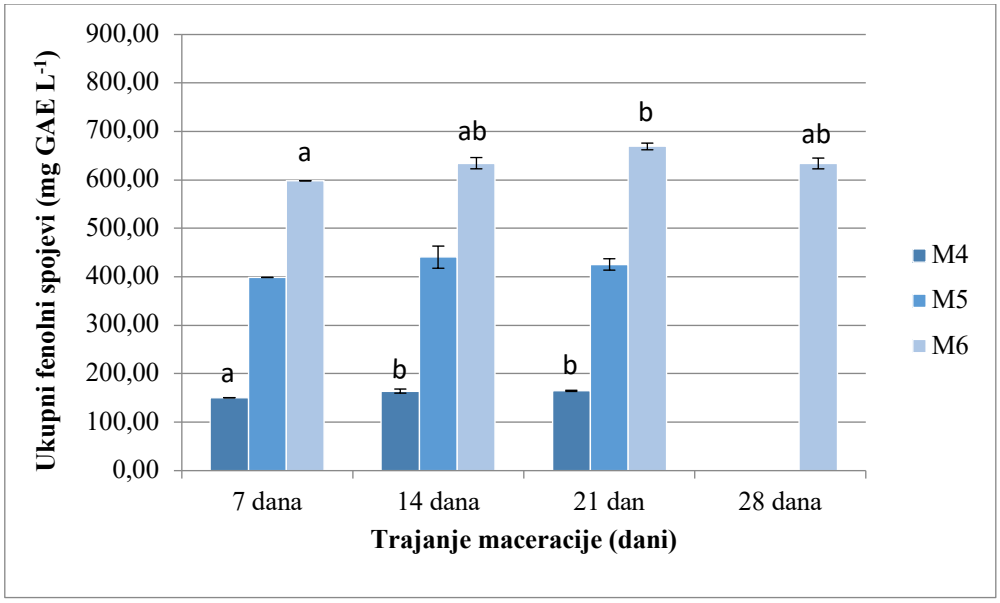
4. REZULTATI

4.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA MACERACIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

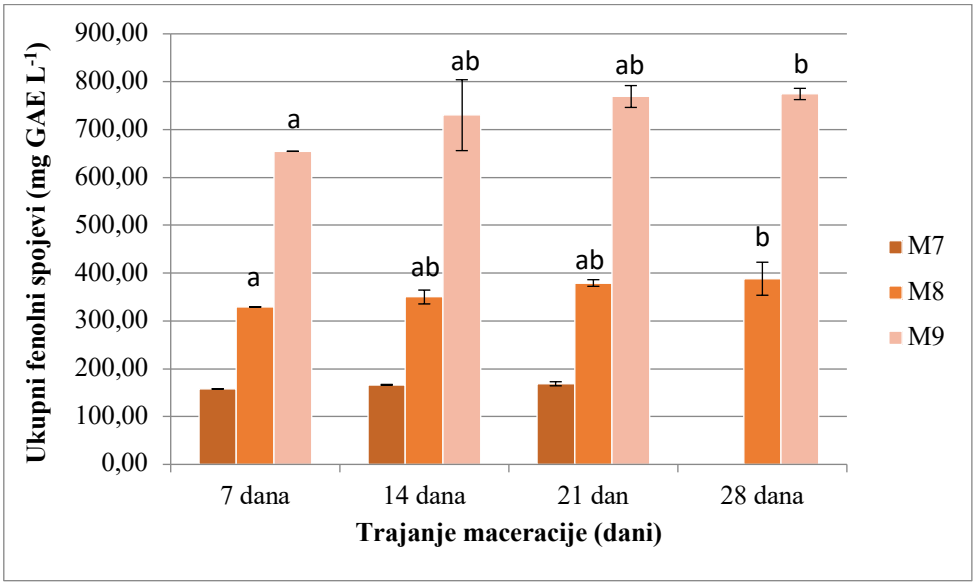
U ovom radu istraženi su parametri maceracije imele u vodeno-etanolnoj otopini s ciljem dobivanja macerata s najvećim sadržajem biološki aktivnih spojeva. Za istraživanje je pripremljeno 12 macerata (M1-M12) koji se razlikuju na temelju različitog volumnog udjela etanola u vodeno-etanolnoj bazi (25, 40, 55 i 70 %) i masene koncentracije imele (20, 40 i 80 g L^{-1}). Da bi se utvrdilo optimalno trajanje maceracije uzorci za analizu ukupnih fenolnih spojeva (TPC) uzimani su nakon 7, 14, 21 i u nekim slučajevima nakon 28 dana maceracije, odnosno do ustaljenja njihove koncentracije. Na slikama 12-15 prikazana je promjena prinosa ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u uzorcima tijekom maceracije. Različita slova unutar istih uzoraka praćenih kroz vrijeme ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$). Utjecaj istraživanih procesnih parametara maceracije na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}) prikazan je Box-plot dijagramima kao srednja vrijednost tri određivanja s minimalnim i maksimalnim vrijednostima (slika 16-21).



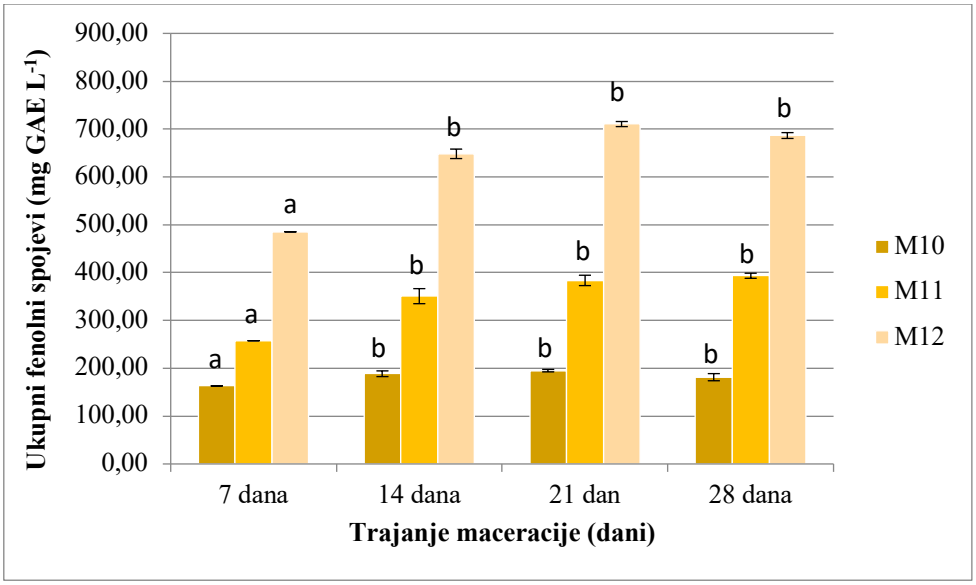
Slika 12. Prinos ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u maceratima (M1-M3) s 25 % v/v etanola tijekom vremena. Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



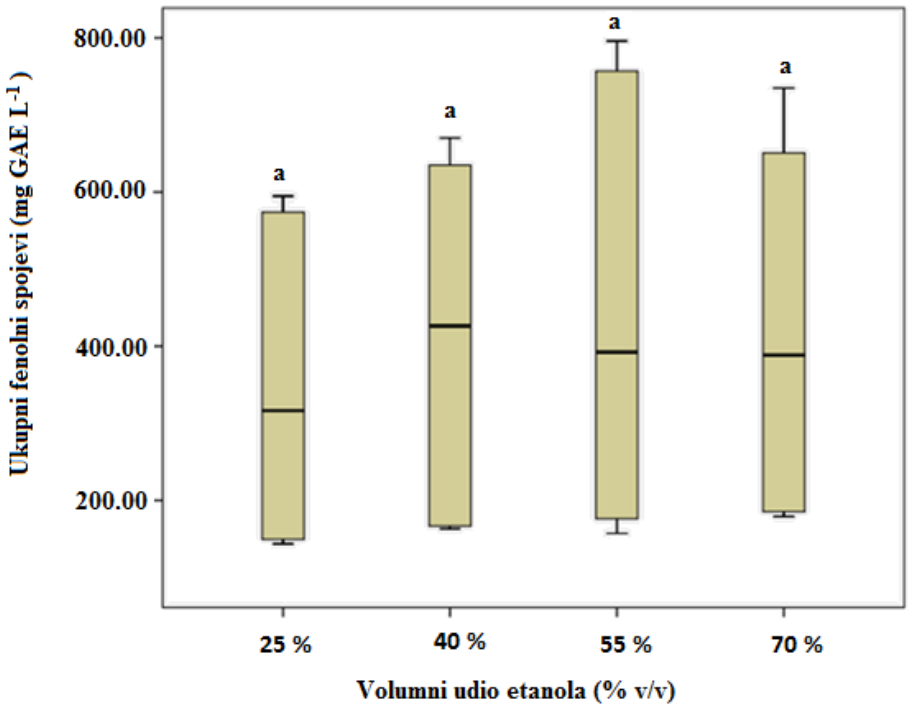
Slika 13. Prinos ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u maceratima (M4-M6) s 40 % v/v etanola tijekom vremena. Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



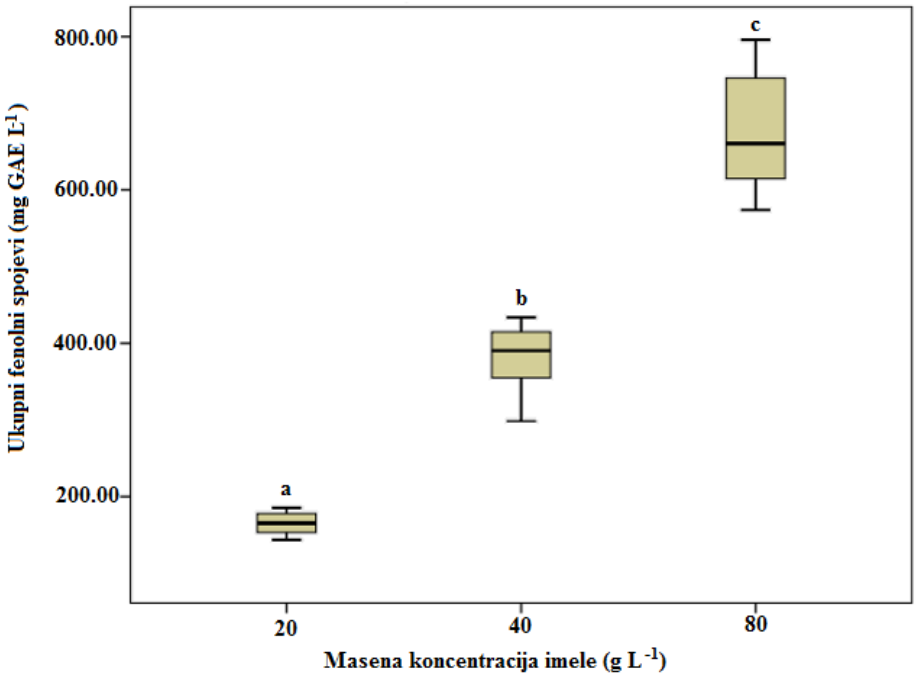
Slika 14. Prinos ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u maceratima (M7-M9) s 55 % v/v etanola tijekom vremena. Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



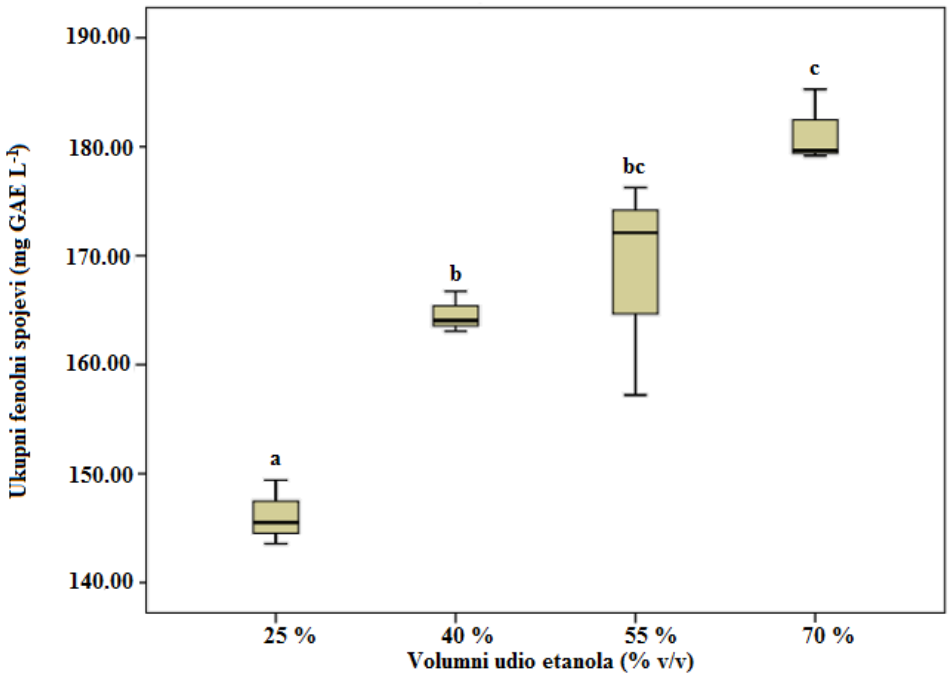
Slika 15. Prinos ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u maceratima (M10-M12) sa 70 % v/v etanola tijekom vremena. Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



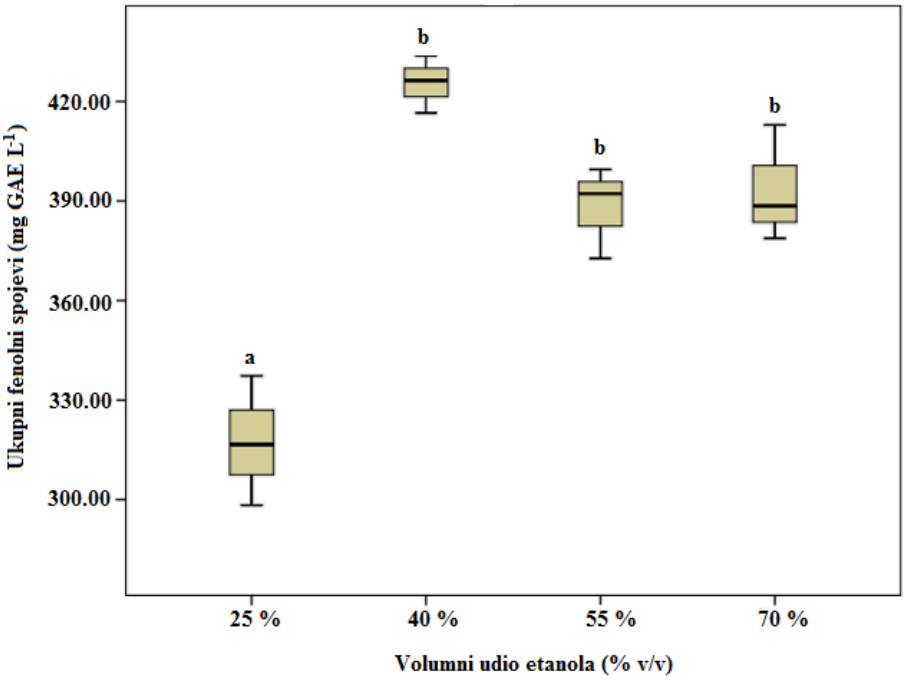
Slika 16. Utjecaj volumnog udjela etanola (% v/v) na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



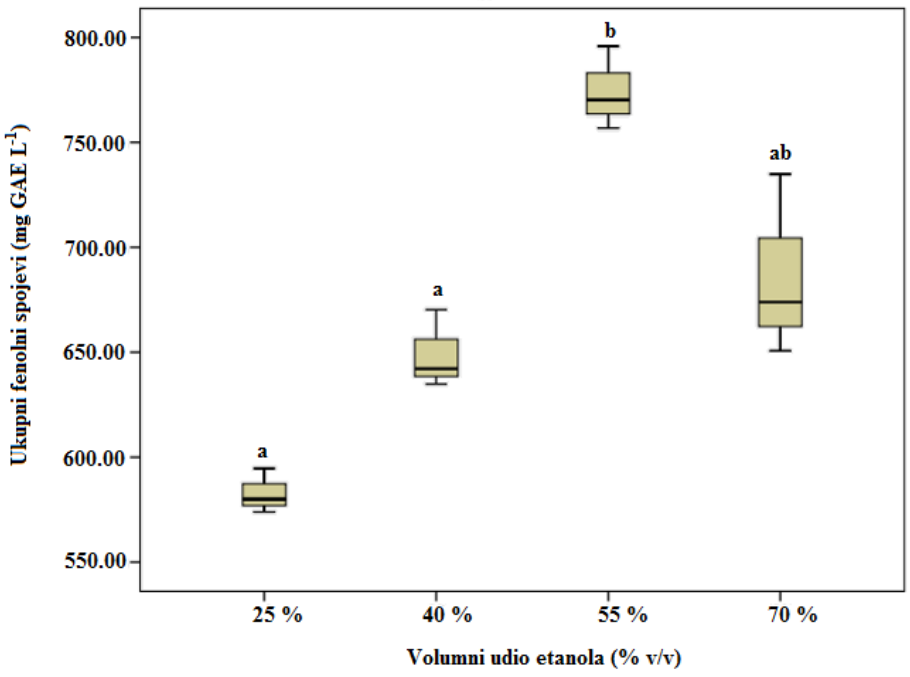
Slika 17. Utjecaj masene koncentracije imele (g L^{-1}) na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



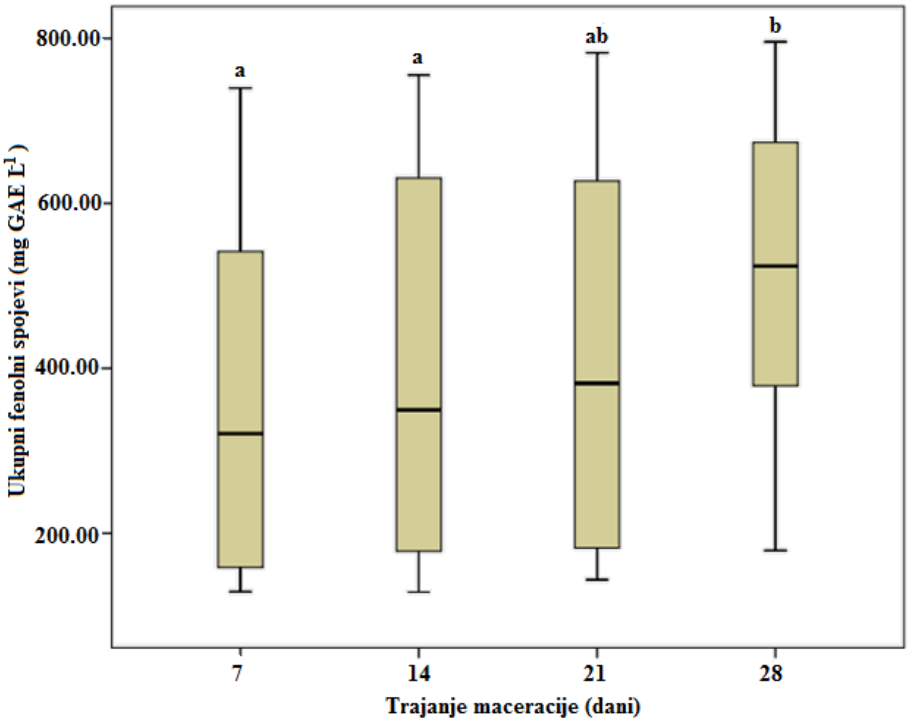
Slika 18. Utjecaj volumnog udjela etanola (% v/v) i masene koncentracije imele 20 g L^{-1} na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



Slika 19. Utjecaj volumnog udjela etanola (% v/v) i masene koncentracije imele 40 g L^{-1} na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).



Slika 20. Utjecaj volumnog udjela etanola (% v/v) i masene koncentracije imele 80 g L^{-1} na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).

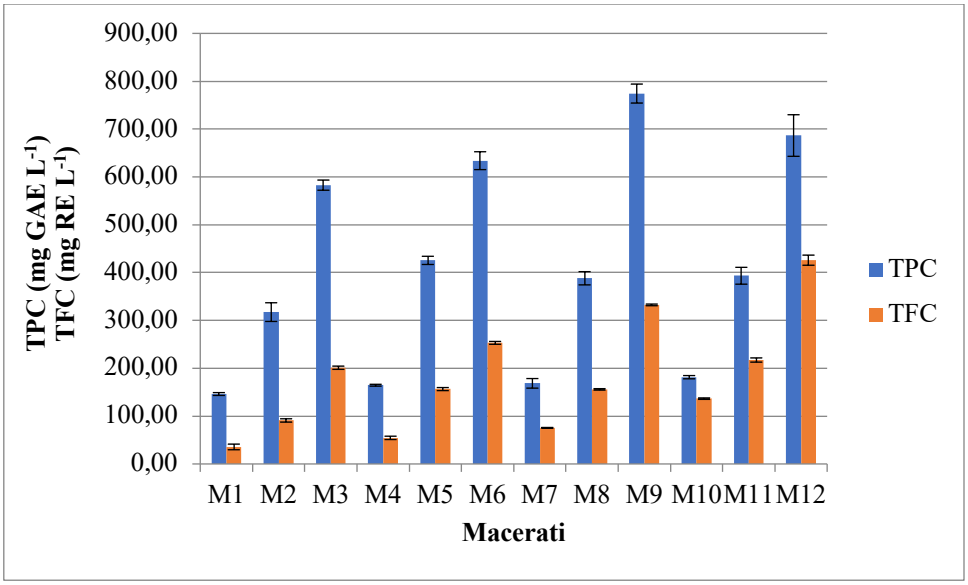


Slika 21. Utjecaj trajanja maceracije (dani) na prinos ukupnih fenolnih spojeva (mg GAE L^{-1}). Različita slova ukazuju na statistički značajnu razliku između uzoraka ($p < 0,05$).

4.2. FITOKEMIJSKI KARAKTERIZACIJA

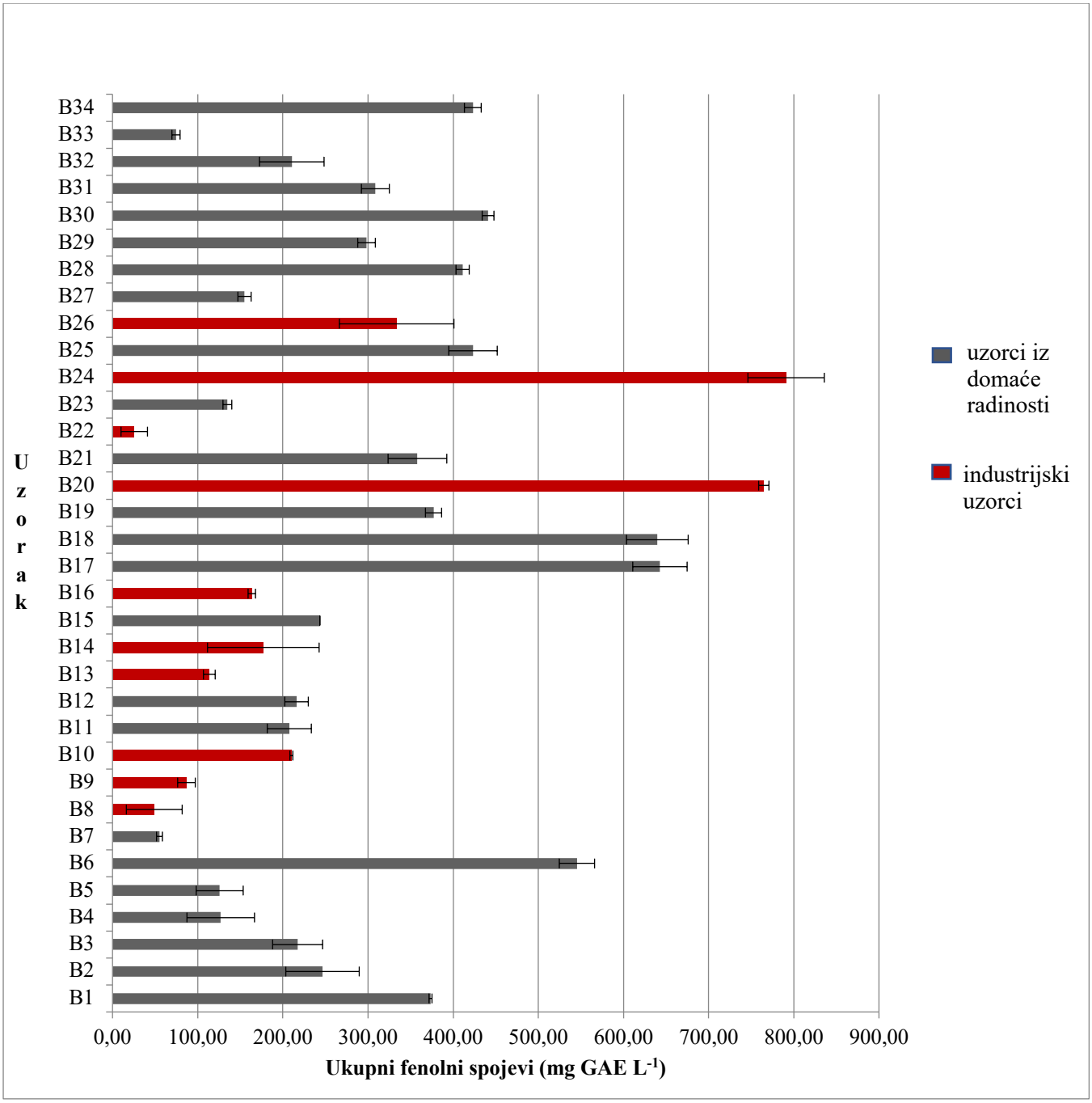
4.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC)

Nakon provedene maceracije u dobivenim maceratima imele (M1-M12) određen je konačan sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) kolorimetrijski pomoću Folin-Ciocalteu reagensa te sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) kolorimetrijskom metodom pomoću aluminijevog klorida. Rezultati su prikazani na slici 22. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u uzorcima macerata (M1-M12) izražen je kao mg ekvivalenta galne kiseline po L macerata (mg GAE L^{-1}), dok je sadržaj ukupnih flavonoida izražen kao mg ekvivalenta rutina po L macerata (mg RE L^{-1}).



Slika 22. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) i ukupnih flavonoida (TFC) (mg RE L^{-1}) u dobivenim maceratima (M1-M12)

Također, sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) određen je i u prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34) te su rezultati prikazani na slici 23.



Slika 23. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (mg GAE L^{-1}) u prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34). Statistički značajna razlika između industrijskih uzoraka i uzoraka iz domaće radinosti određena t-testom na razini $p < 0,05$.

4.2.2. Identifikacija i sadržaj pojedinih fenolnih spojeva

U pripremljenim maceratima (M3, M6, M9 i M12) i odabranim komercijalnim uzorcima biske (B17, B18, B22, B25, B30 i B34) provedena je identifikacija i kvantifikacija

pojedinih fenolnih spojeva primjenom ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije uz masenu detekciju (UPLC-ESI-MS^2). Rezultati analize prikazani su u tablici 8. Ukupno su identificirana 43 fenolna spoja na temelju kromatografskih pikova i usporedbe s odgovarajućim standardima koji su prikazani u tablici 5 u eksperimentalnom dijelu rada. Za spojeve koji nisu imali referentne standarde, identifikacija je temeljena na podacima o spektru masa, usporedbom njihovih molekularnih i fragment iona s literaturnim podacima. Identifikacija spojeva se provodila usporedbom vremena zadržavanja/retencijskog vremena (Rt) (min) razdvojenih spojeva s vremenima zadržavanja standarda, polarnosti i usporedbom karakterističnih vrijednosti prekursor iona (m/z) i fragment iona (m/z) koji su specifični za svaki pojedini spoj. Nakon identifikacije, spojevi su kvantificirani te je njihova koncentracija izražena u mg mL^{-1}.

Tablica 8. Identificirani pojedini fenolni spojevi na temelju spektrometrije masa i njihov sadržaj u maceratima (M3, M6, M9 i M12) i odabranim komercijalnim uzorcima biske

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Identificirani spoj	Skupina fenolnih spojeva	Energija kolizije (V)	Prekursor ion (m/z)	Fragment ion (m/z)	Koncentracija u uzorku (mg mL^{-1})									
							M3	M6	M9	M12	B17	B18	B22	B25	B30	B34
1	0,479	Protokatehinska kiselina	Fenolna kiselina	9	153	109	0,64	1,08	1,06	1,37	0,93	0,23	0,28	0,57	3,06	0,31
2	0,534	Kaempferol 3-O-glukozid	Flavonol	5	449	287	0,09	0,17	0,08	0,13	0,33	0,1	0,29	0,34	0,07	0,08
3	0,541	Epikatehin galat	Flavanol	5	443	291	0,31	0,18	0,08	0,08	0,08	0,05	0,13	0,25	0,1	0,14
4	0,544	Kvercetin-pentozid	Flavonol	5	435	303	0,19	0,04	0,26	0,07	0,15	0,04	0,34	0,17	0,1	0,03
5	0,576	Kaempferol	Flavonol	0	285	285	1	1,07	3,22	0,75	1,17	1,33	2,31	0,71	1,12	0,84
6	0,582	Klorogenska kiselina	Fenolna kiselina	10	353	191	0,44	0,13	0,36	0,49	0,06	0,05	0,06	0,12	0,04	0,25
7	0,688	Kvercetin-acetil-heksozid	Flavonol	10	507	303	0,15	0,09	0,09	0,04	0,04	0,03	0,02	0,07	0,03	0,02
8	0,712	Kaempferol-ramnozid	Flavonol	5	433	287	0,16	0,02	0,38	0,23	0,31	0,36	0,11	0,2	0,08	0,21
9	0,722	Miricetin	Flavonol	25	319	273	0,12	0,21	0,5	0,27	0,34	0,42	0,09	0,1	0,07	0,12
10	0,725	Epikatehin	Flavanol	10	291	139	0,49	0,45	0,45	0,21	0,76	0,63	0,19	0,04	0,41	0,47
11	0,732	Katehin	Flavanol	10	291	139	0,83	1,04	0,85	0,95	2,06	2,71	0,67	0,77	0,36	0,74
12	1,241	Kvininska kiselina	Fenolna kiselina	20	191	85	355,39	375,42	155,55	145,33	157,66	18,6	251,82	60,27	357,92	108,01
13	2,453	Gentizinska kiselina	Fenolna kiselina	9	153	109	0,27	0,28	1,03	1,41	0,42	0,45	0,29	0,94	3,24	0,31
14	2,785	Cimetna kiselina	Fenolna kiselina	5	147	103	1,18	0,24	0,15	1,72	1,52	1,5	1,14	0,22	1,49	1,36

Tablica 8 (nastavak). Identificirani pojedini fenolni spojevi na temelju spektrometrije masa i njihov sadržaj u maceratima (M3, M6, M9 i M12) i odabranim komercijalnim uzorcima biske

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Identificirani spoj	Skupina fenolnih spojeva	Energija kolizije (V)	Prekursor ion (m/ž)	Fragment ion (m/ž)	Koncentracija u uzorku (mg mL^{-1})									
							M3	M6	M9	M12	B17	B18	B22	B25	B30	B34
15	6,118	Kvercetin 3-O-ramnozid	Flavonol	5	449	303	0,09	0,21	0,17	0,05	0,05	0,09	0,15	0,04	0,27	0,17
16	8,139	Luteolin	Flavon	35	287	153	0,04	0,09	0,05	0,07	0,36	0,47	0,39	0,36	0,38	0,37
17	8,978	Krizoeriol	Flavon	20	229	284	0,48	0,34	0,16	0,2	0,8	0,3	0,37	1,06	0,23	0,41
18	9,259	Kaempferol-pentozid	Flavonol	5	419	287	0,25	0,27	0,05	0,28	0,05	0,03	0,06	0,13	0,34	0,23
19	9,505	p-kumarinska kiselina	Fenolna kiselina	10	163	119	0,28	0,13	0,27	0,13	0,98	0,23	0,44	0,29	0,32	0,25
20	9,889	Epigalokatehin galat	Flavanol	15	459	139	0,11	0,04	0,05	0,03	0,16	0,06	0,05	0,14	0,05	0,03
21	10,45	Naringenin	Flavanon	16	271	151	0,67	0,75	0,72	0,72	0,87	0,64	1,16	2,12	0,64	0,64
22	10,596	Apigenin	Flavon	30	271	153	0,15	0,18	0,32	0,29	0,31	0,28	0,3	0,31	0,11	0,34
23	10,638	Skopoletin	Kumarin	8	191	176	5,92	2,96	1,88	2,15	6,82	2,15	4,57	8,79	3,05	1,61
24	10,771	Kvercetin	Flavonol	15	301	151	0,04	0,05	0,02	0,03	0,04	0,02	0,03	0,07	0,03	0,01
25	10,822	Umbeliferon	Kumarin	19	161	133	0,27	0,22	0,13	0,18	0,44	0,22	0,33	0,65	0,2	0,13
26	10,843	Izoramnetin 3-O-rutinozid	Flavonol	15	625	317	0,04	0,03	0,02	0,03	0,06	0,07	0,03	0,08	0,03	0,02
27	10,847	Rutin	Flavonol	5	611	465	0,06	0,03	0,05	0,03	0,04	0,04	0,04	0,1	0,04	0,04

Tablica 8 (nastavak). Identificirani pojedini fenolni spojevi na temelju spektrometrije masa i njihov sadržaj u maceratima (M3, M6, M9 i M12) i odabranim komercijalnim uzorcima biske

Spoj	Retencijsko vrijeme (min)	Identificirani spoj	Skupina fenolnih spojeva	Energija kolizije (V)	Prekursor ion (m/ž)	Fragment ion (m/ž)	Koncentracija u uzorku (mg mL^{-1})									
							M3	M6	M9	M12	B17	B18	B22	B25	B30	B34
28	10,857	Kvercetin-pentozil-heksozid	Flavonol	15	597	303	0,03	0,04	0,03	0,04	0,02	0,04	0,02	0,08	0,03	0,05
29	10,864	Kaempferol 3-O-rutinozid	Flavonol	15	595	287	0,07	0,04	0,03	0,02	0,04	0,04	0,04	0,07	0,03	0,03
30	10,867	Kaempferol-pentozil-heksozid	Flavonol	15	581	287	0,05	0,03	0,03	0,03	0,02	0,01	0,03	0,1	0,05	0,04
31	10,868	Kvercetin 3-O-rutinzoid	Flavonol	5	611	303	0,07	0,03	0,05	0,06	0,05	0,05	0,04	0,06	0,07	0
32	10,956	Siringinska kiselina	Fenolna kiselina	7	197	182	0,29	0,18	0,08	0,12	0,32	0,09	0,32	0,56	0,07	0,18
33	10,959	Ferulinska kiselina	Fenolna kiselina	5	193	178	0,6	0,43	0,51	0,85	0,92	0,26	0,73	1,36	0,44	0,29
34	10,98	Galna kiselina	Fenolna kiselina	10	169	125	0,48	0,28	0,42	0,87	0,55	1,62	0,5	1,37	0,83	1,11
35	11,004	Kvercetin-acetil-rutinozid	Flavonol	15	653	303	0,18	0,25	0,22	0,22	0,3	0,22	0,27	0,29	0,17	0,21
36	11,025	Kaempferol 3-O-ramnozidheksozid	Flavonol	15	595	287	0,04	0,04	0,02	0,03	0,11	0,03	0,02	0	0,04	0,07
37	11,059	Apigenin 7-O-glukozid	Flavon	5	433	271	0,14	0,14	0,19	0,15	0,88	0,32	0,26	1,67	0,24	1,63
38	11,097	Izoramnetin	Flavonol	21	315	300	0,02	0,02	0,31	0,54	0,07	0,02	0,03	0,07	0,03	0,02

Tablica 8 (nastavak). Identificirani pojedini fenolni spojevi na temelju spektrometrije masa i njihov sadržaj u maceratima (M3, M6, M9 i M12) i odabranim komercijalnim uzorcima biske

Spoj	**Retencijsko vrijeme (min)**	**Identificirani spoj**	**Skupina fenolnih spojeva**	**Energija kolizije (V)**	**Prekursor ion (m/ž)**	**Fragment ion (m/ž)**	**Koncentracija u uzorku (mg mL^{-1})**									
							M3	**M6**	**M9**	**M12**	**B17**	**B18**	**B22**	**B25**	**B30**	**B34**
39	11,339	p-hidroksibenzojeva kiselina	Fenolna kiselina	10	137	93	0,64	10,07	1,92	2,02	1	0,6	3,21	1,15	1,1	2,83
40	11,603	Genistein	Izoflavon	32	269	133	0,48	0,71	0,2	0,19	0,86	0,23	0,72	1,41	0,5	0,53
41	11,61	Sinapinska kiselina	Fenolna kiselina	17	223	193	8,34	4,93	3,22	3,6	10,04	2,65	9,28	13,64	3,98	5,87
42	11,958	Kafeinska kiselina	Fenolna kiselina	10	179	135	5,71	6,53	5,27	6,32	2,58	14,05	4,49	4,3	8,2	8,2
43	11,962	Eskuletin	Kumarin	15	177	133	2,09	3,63	3,71	4,84	3,19	7,23	4,01	4,24	3,66	2,94

4.3. FUNKCIONALNA SVOJSTVA UZORAKA

Ispitivanje funkcionalnih svojstava macerata i komercijalnih uzoraka biske obuhvatilo je ispitivanje antioksidacijske, antimikrobne i antiproliferacijske aktivnosti.

4.3.1. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost macerata (M1-M12) ispitana je primjenom FRAP (engl. Ferric Reducing Antioxidant Power) metode (Benzie i Strain,1999), DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) metode (Brand-Williams i sur., 1995) te ABTS (2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)) metode (Re i sur., 1999). Antioksidacijski indeks izračunat je na osnovu mjerenja antioksidacijske aktivnosti macerata pomoću FRAP, DPPH i ABTS metode. Ukupni antioksidacijski indeks (ACI) pojedinih uzoraka izražen je kao srednja vrijednost antioksidacijskog indeksa za sve tri metode. Dobiveni rezultati su prikazani u tablici 9. Iz dobivenih rezultata sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih flavonoida te antioksidacijske aktivnosti macerata izračunati su Pearsonovi koeficijenti korelacije između navedenih varijabli što je prikazano u tablici 10. Antioksidacijska aktivnost komercijalnih uzoraka biske (B1-B34) ispitana je primjenom FRAP i DPPH metode te su rezultati prikazani na slikama 24 i 25.

Tablica 9. Antioksidacijska aktivnost macerata (M1-M12) ispitana FRAP, DPPH i ABTS metodom, pripadajući antioksidacijski indeksi za svaku metodu te izračunati ukupni antioksidacijski indeks (ACI)

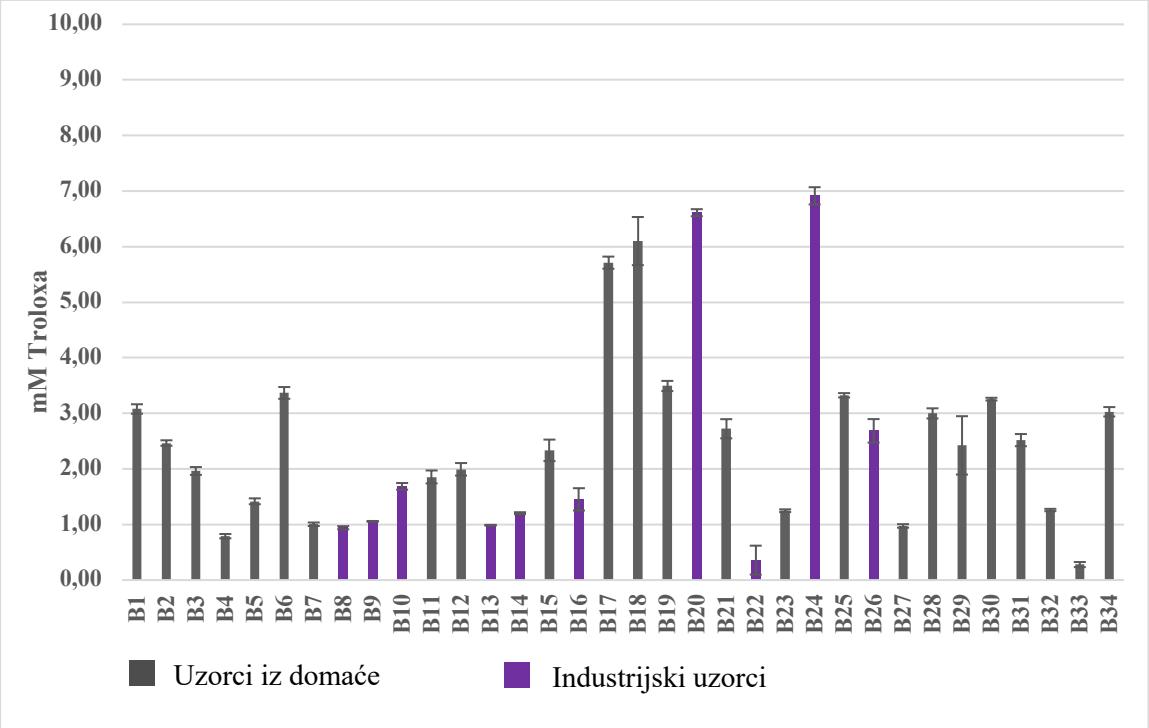
Uzorak	FRAP (mM Trolox)	DPPH (% inhibition)	ABTS (mM Trolox)	FRAP indeks	DPPH indeks	ABTS indeks	ACI
M1	0,69 ± 0,00	4,37 ± 1,48	1,16 ± 0,11	11,92	6,92	14,34	11,06
M2	1,45 ± 0,01	8,22 ± 1,24	1,73 ± 0,07	25,04	13,01	21,38	19,81
M3	2,50 ± 0,04	10,81 ± 1,14	3,17 ± 0,04	43,18	17,11	39,18	33,16
M4	1,24 ± 0,02	10,44 ± 3,29	1,41 ± 0,11	21,42	16,52	17,43	18,46
M5	2,90 ± 0,05	25,04 ± 4,62	2,99 ± 0,22	50,09	39,63	36,96	42,23
M6	3,87 ± 0,02	24,30 ± 5,70	4,09 ± 0,10	66,84	38,46	50,56	51,95
M7	1,29 ± 0,06	7,70 ± 1,64	1,45 ± 0,26	22,28	12,19	17,92	17,46
M8	2,77 ± 0,03	25,11 ± 5,02	2,83 ± 0,07	47,84	39,74	34,98	40,85

M9	5,79 ± 0,15	55,11 ± 6,60	5,40 ± 0,38	100,00	87,21	66,75	84,65
M10	1,62 ± 0,02	19,04 ± 4,69	1,85 ± 0,26	27,98	30,13	22,87	26,99
M11	3,06 ± 0,16	41,93 ± 5,78	3,06 ± 0,50	52,85	66,36	37,82	52,34
M12	5,78 ± 0,06	63,19 ± 6,81	8,09 ± 0,21	99,83	100,00	100,00	99,94

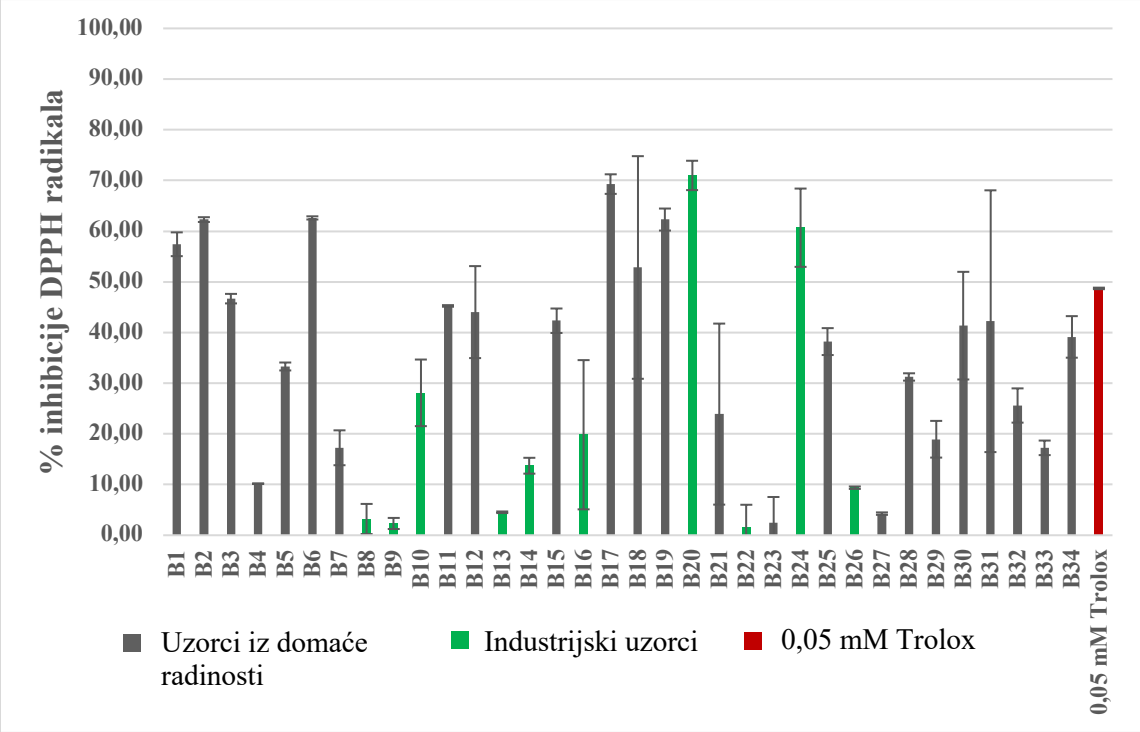
Tablica 10. Pearsonovi koeficijenti korelacije (r^2) između sadržaja ukupnih fenolnih spojeva (TPC), ukupnih flavonoida (TFC) te antioksidacijske aktivnosti macerata određene FRAP, DPPH i ABTS metodom

Varijabla	TPC	TFC	FRAP	DPPH	ABTS
TFC	0,90	1,00			
FRAP	0,92	0,97	1,00		
DPPH	0,74	0,91	0,93	1,00	
ABTS	0,86	0,98	0,95	0,90	1,00

Svi koeficijenti korelacije su statistički značajni na nivou $p < 0,05$.



Slika 24. Antioksidacijska aktivnost (mM Trolox) u prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34) ispitana FRAP metodom. Statistički značajna razlika između industrijskih uzoraka i uzoraka iz domaće radinosti određena t-testom na razini $p < 0,05$.



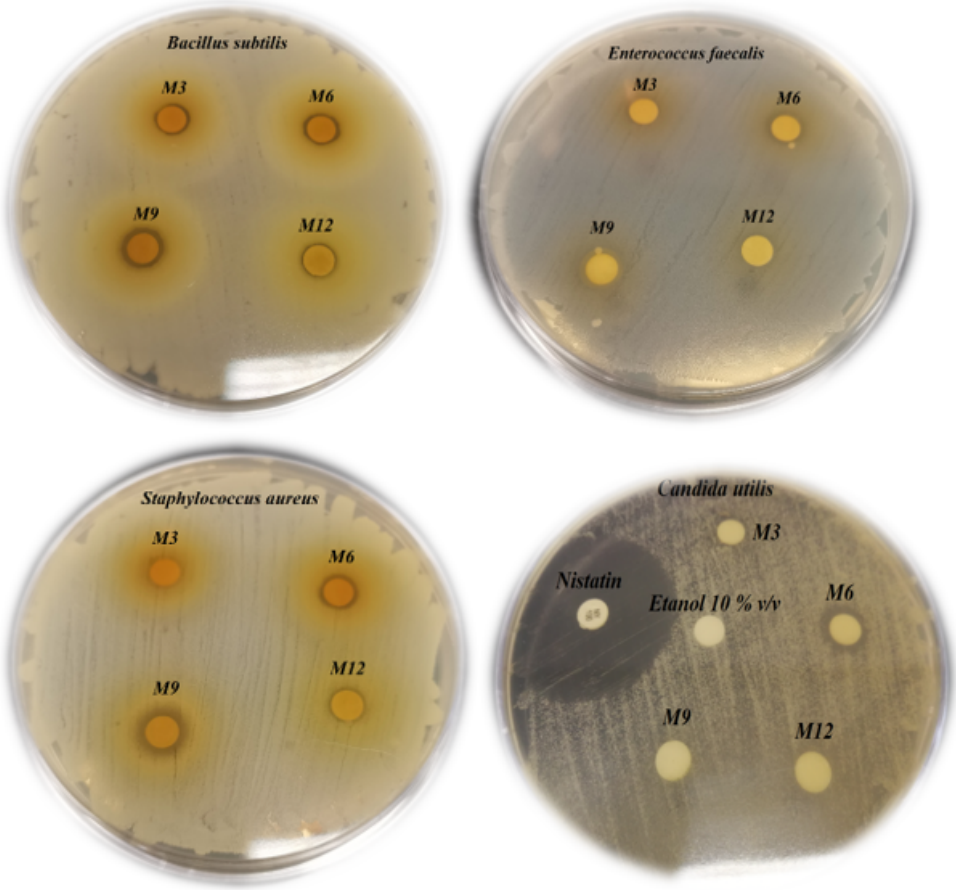
Slika 25. Antioksidacijska aktivnost (% inhibicije DPPH radikala) u prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34) i 0,05 mM Troloxa ispitana DPPH metodom. Statistički značajna razlika između industrijskih uzoraka i uzoraka iz domaće radinosti određena t-testom na razini $p < 0,05$.

4.3.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost macerata (M3, M6, M9 i M12) i odabranih komercijalnih uzoraka biske (B20, B24, B33 i B34) ispitana je primjenom disk difuzijske metode kojom se određuje osjetljivost odabranih sojeva mikroorganizma na antimikrobne agense prema principu radijalne difuzije uzorka kroz agar pri čemu nastaje gradijent koncentracije. Promjeri zona inhibicije rasta (mm) odabranih test-mikroorganizama su izmjereni te su rezultati prikazani u tablici 11. Rast test-mikroorganizama koji su pokazali osjetljivost na ispitane uzorke s vidljivim zonama inhibicije rasta prikazani su na slici 26.

Tablica 11. Promjer zone inhibicije rasta (mm) ispitanih test-mikroorganizama

Test-mikroorganizam	**Promjer zone inhibicije rasta (mm)**									
	M3	**M6**	**M9**	**M12**	**B20**	**B24**	**B33**	**B34**	**Kanamicin/ nistatin***	**10 % v/v etanol****
Gram-negativne bakterije										
Salmonella enterica s. *Thyphimurium*	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ± 0,02	-
Escherichia coli	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ± 0,08	-
Pseudomonas aeruginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	36 ± 0,02	-
Gram-pozitivne bakterije										
Staphylococcus aureus	-	8 ± 0,00	7,67 ± 0,58	7 ± 0,00	-	-	-	-	30 ± 0,02	-
Bacillus subtilis	7,33 ± 0,58	8 ± 0,00	8 ± 0,00	7,67 ± 0,58	8 ± 0,00	8 ± 0,00	7 ± 0,00	-	26 ± 0,08	-
Enterococcus faecalis	-	8 ± 0,00	8 ± 0,00	-	-	-	-	-	15 ± 0,00	-
Listeria monocytogenes	-	-	-	-	-	-	-	-	23 ± 0,00	-
Kvasci										
Candida utilis	7, 33 ± 0,58	10 ± 0,00	-	-	-	-	-	-	25 ± 0,10	-
Candida albicans	-	-	-	-	-	-	-	-	18 ± 0,00	-
Rhodotorula sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	26 ± 0,02	-
Saccharomyces cerevisiae	-	-	-	-	-	-	-	-	25 ± 0,02	-
- nema inhibicije rasta; * pozitivna kontrola; ** negativna kontrola										

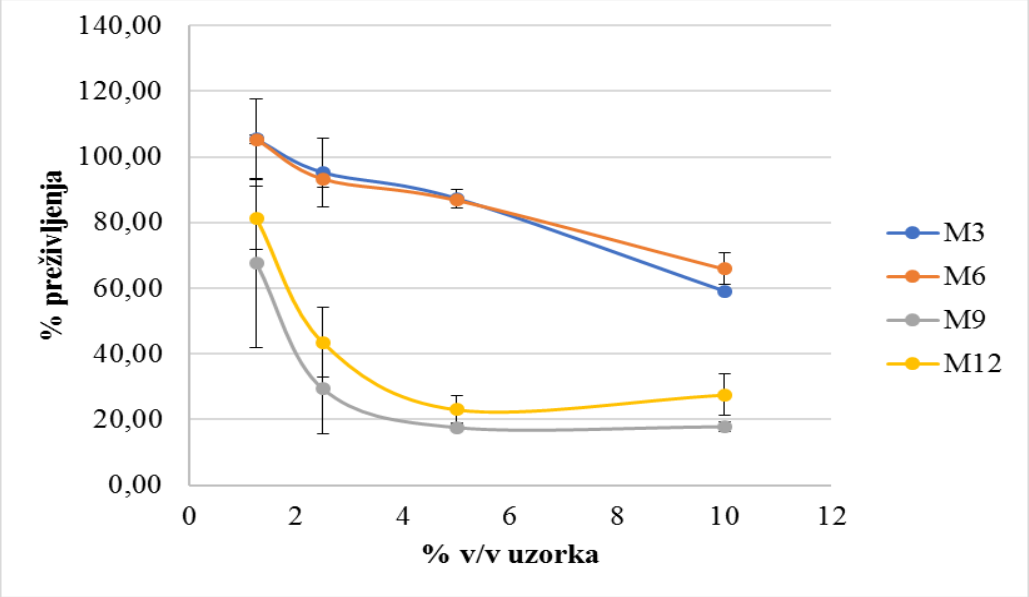


Slika 26. Antimikrobna aktivnost macerata (M3, M6, M9 i M12), pozitivne (nistatin) i negativne (etanol 10 % v/v) kontrole prema test-mikroorganizmima (*Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* i *Candida utilis*) određena disk difuzijskom metodom

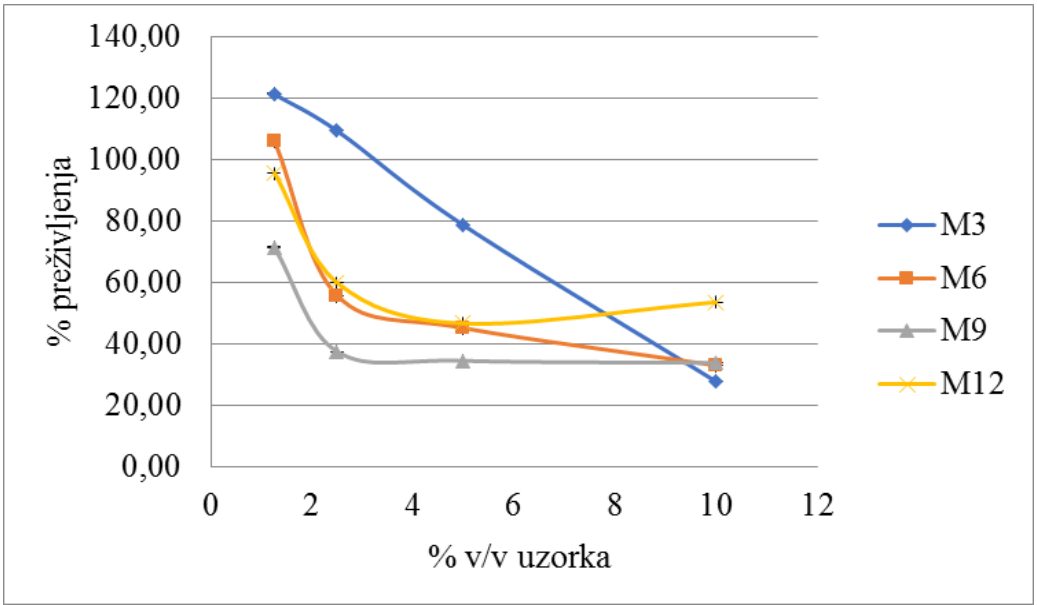
4.3.3. Antiproliferacijska aktivnost

Antiproliferacijska aktivnost macerata imele s najvećom masenom koncentracijom bilja (80 g L^{-1}) i odabranih uzoraka biske ispitana je na tumorskoj humanoj staničnoj liniji HeLa i normalnoj humanoj staničnoj liniji HaCaT. Stanice su izložene djelovanju macerata M3, M6, M9 i M12 te uzoraka biske B20, B24, B33 i B34 u rasponu volumnih udjela od 1,25 do 10 % v/v tijekom 72 sata. Postotak preživljenja (%) tretiranih stanica određen je primjenom MTS metode i izražen u odnosu na kontrolne, netretirane stanice (slike 27-30). Da bi se isključila potencijalna toksičnost etanola paralelno je ispitan i učinak 25, 40, 55 i 70 % v/v etanola na obje stanične linije u istom rasponu volumnih udjela kao i za uzorke.

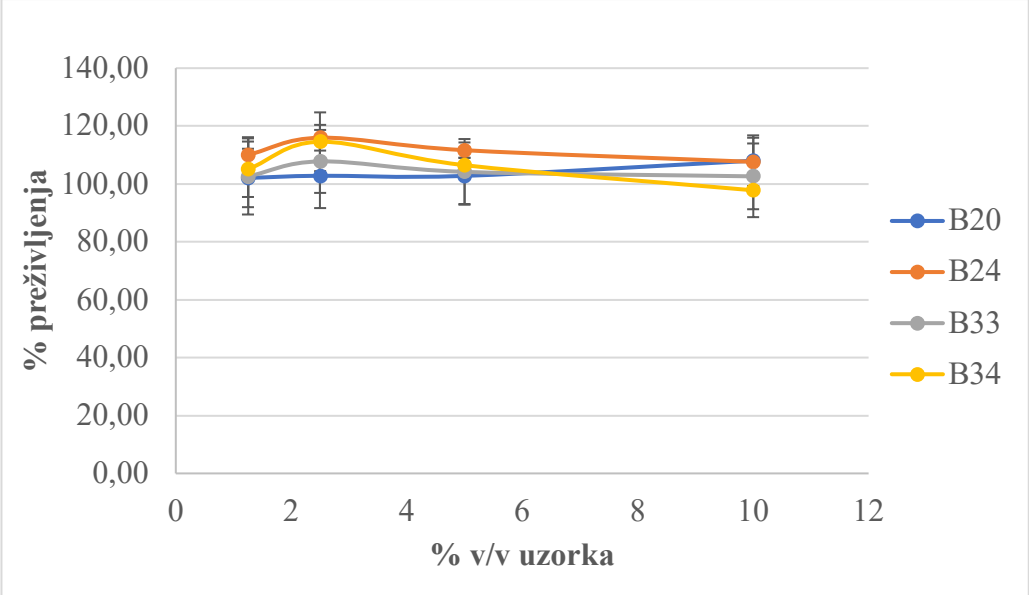
Morfološke promjene stanica izazvane djelovanjem navedenih uzoraka u volumnom udjelu od 10 % v/v prikazane su na slikama 31 i 32.



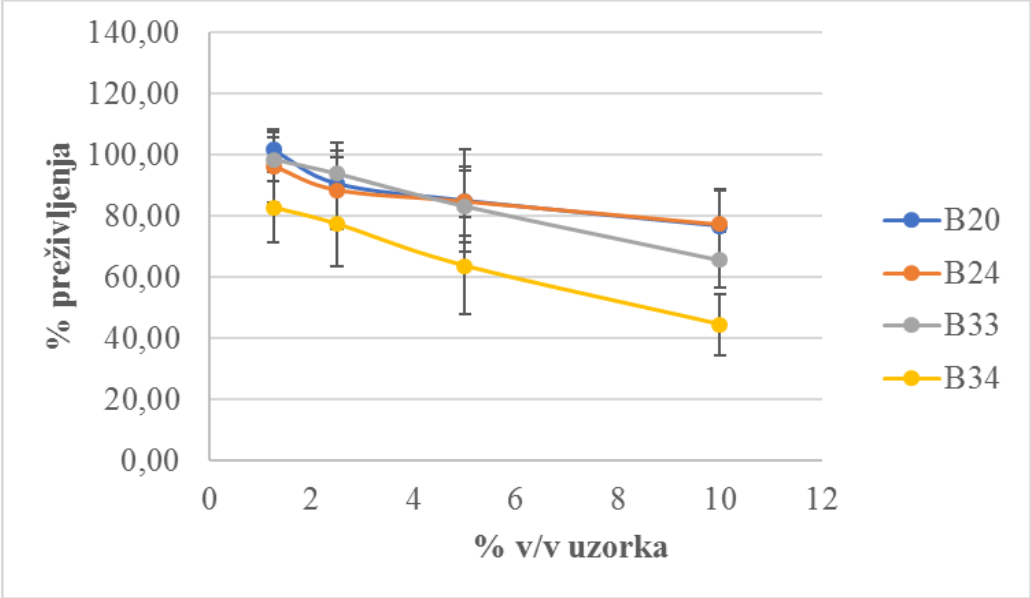
Slika 27. Preživljenje HeLa stanica (%) 72 h nakon tretiranja maceratima



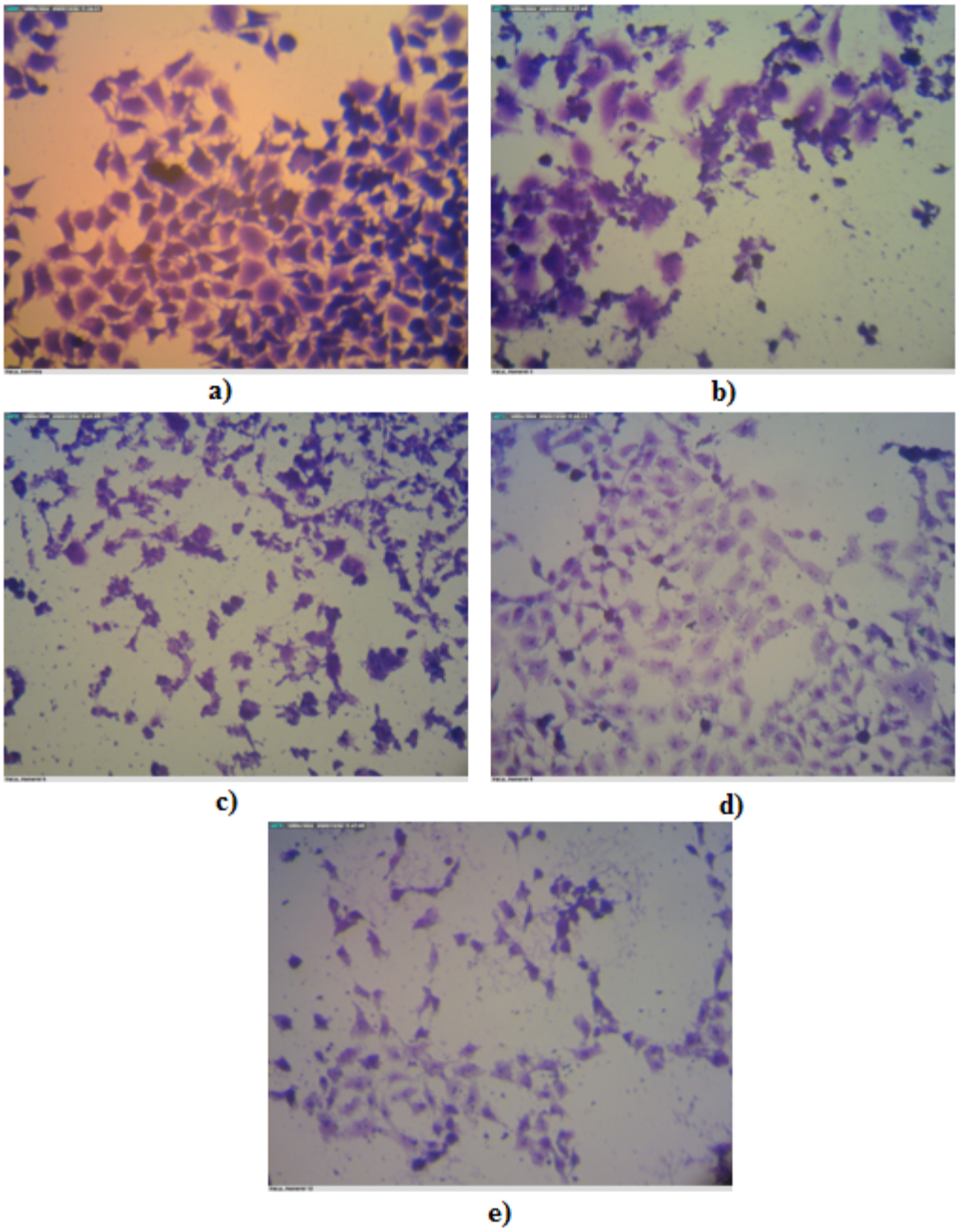
Slika 28. Preživljenje HaCaT stanica (%) 72 h nakon tretiranja maceratima



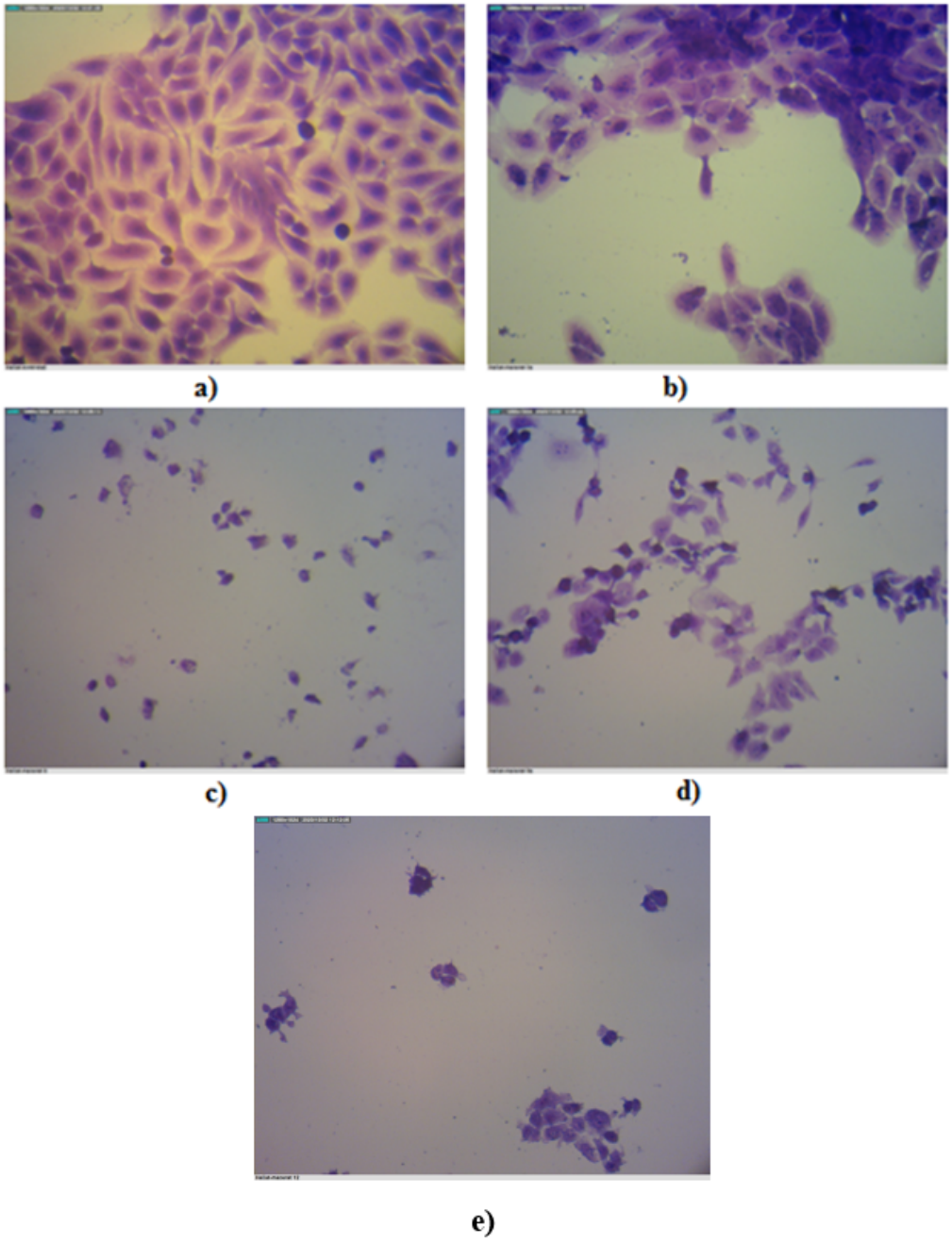
Slika 29. Preživljenje HeLa stanica (%) 72 h nakon tretiranja uzorcima biske



Slika 30. Preživljenje HaCaT stanica (%) 72 h nakon tretiranja uzorcima biske



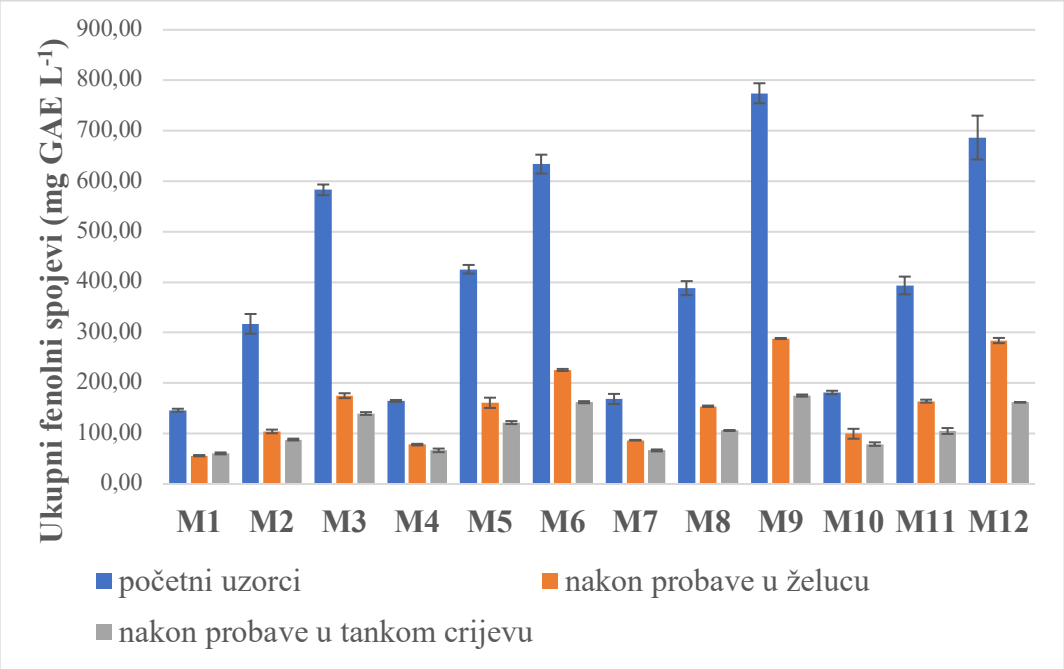
Slika 31. Fotografije HeLa tumorskih stanica pod inverznim svjetlosnim mikroskopom 72 h nakon tretiranja s 10 % v/v uzorka: a) kontrolne, netretirane stanice b) stanice tretirane maceratom M3 c) stanice tretirane maceratom M6 d) stanice tretirane maceratom M9 e) stanice tretirane maceratom M12



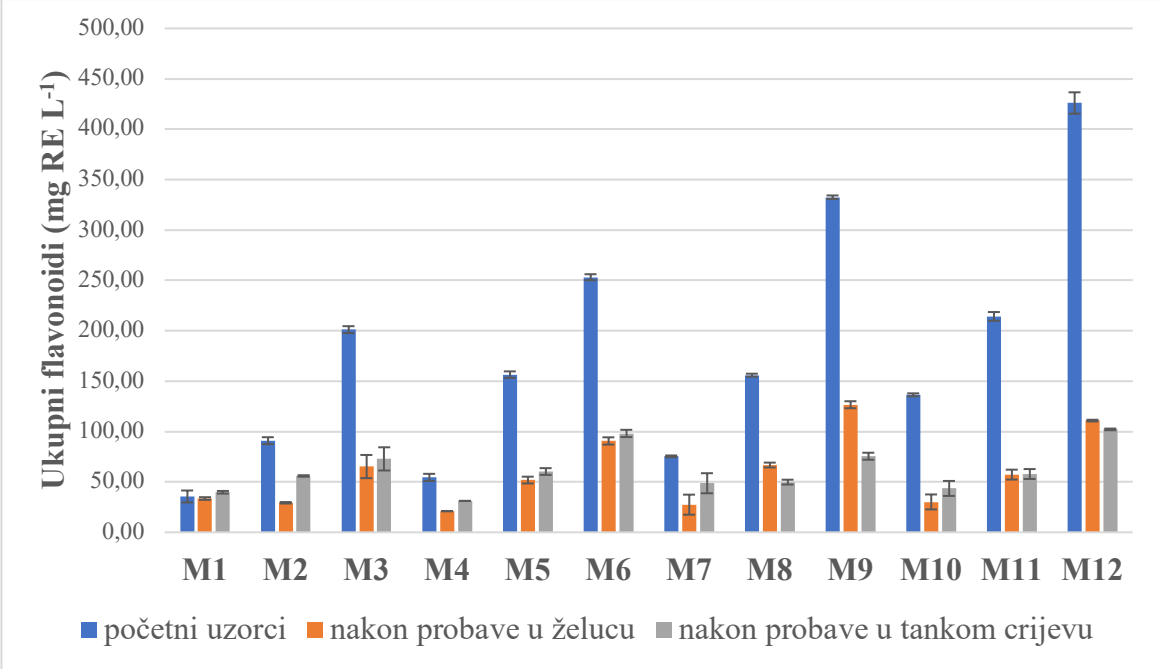
Slika 32. Fotografije HaCaT normalnih stanica pod inverznim svjetlosnim mikroskopom 72 h nakon tretiranja s 10 % v/v uzorka: a) kontrolne, netretirane stanice b) stanice tretirane maceratom M3 c) stanice tretirane maceratom M6 d) stanice tretirane maceratom M9 e) stanice tretirane maceratom M12

4.4. STABILNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA TIJEKOM *IN VITRO* GASTROINTESTINALNE PROBAVE

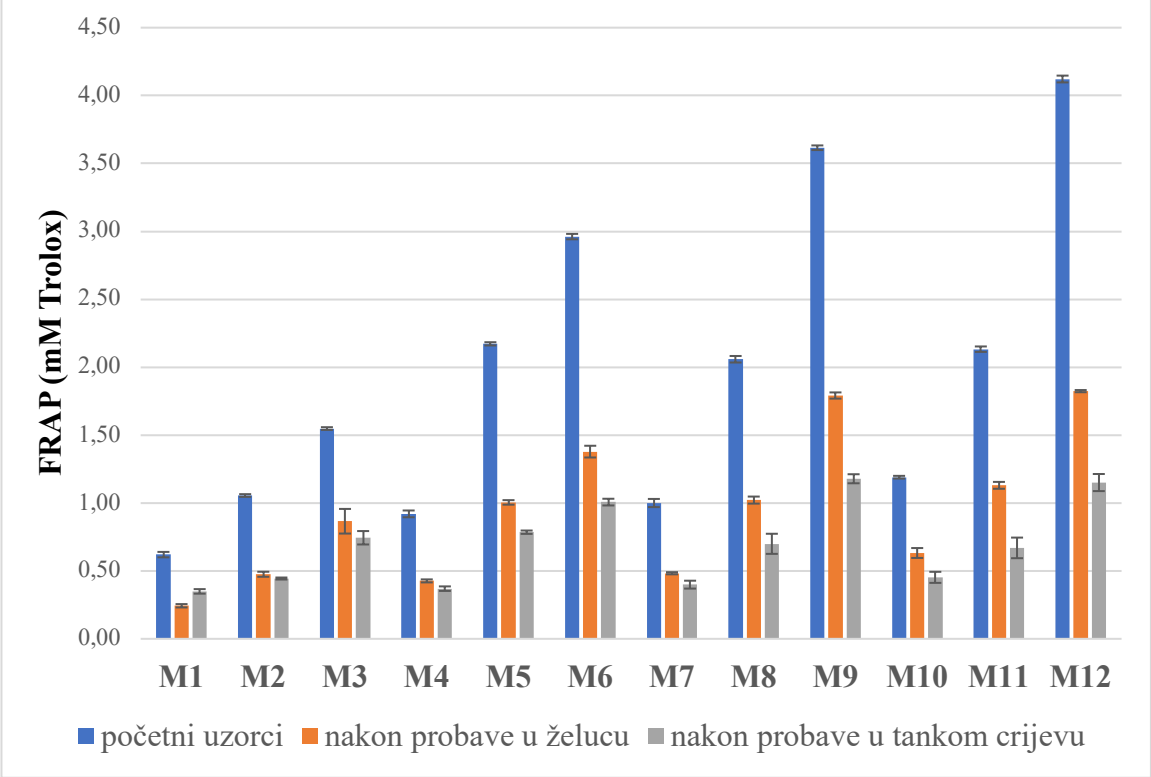
Da bi se utvrdio utjecaj uvjeta gastrointestinalne probave na stabilnost biološki aktivnih spojeva macerata provedena je *in vitro* gastrointestinalna probava prema metodi Jara-Palacios i sur. (2018). Dvofazni model probave sastojao se od simulacije uvjeta probave u želucu (pH 3, djelovanje pepsina - želučani probavni sok) nakon kojeg je slijedila probava u početnom dijelu tankog crijeva (dvanaesniku) (pH 7, djelovanje pankreatina i žućnih soli - probavni sok tankog crijeva). Nakon svake faze probave izuzet je dio uzoraka te im je određen sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (slika 33), sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) (slika 34) te antioksidacijska aktivnost primjenom FRAP metode (slika 35).



Slika 33. Ukupni fenolni spojevi (TPC) (mg GAE L^{-1}) u maceratima (M1-M12) prije i nakon simulirane gastrointestinalne probave



Slika 34. Ukupni flavonoidi (TFC) (mg RE L^{-1}) u maceratima (M1-M12) prije i nakon simulirane gastrointestinalne probave

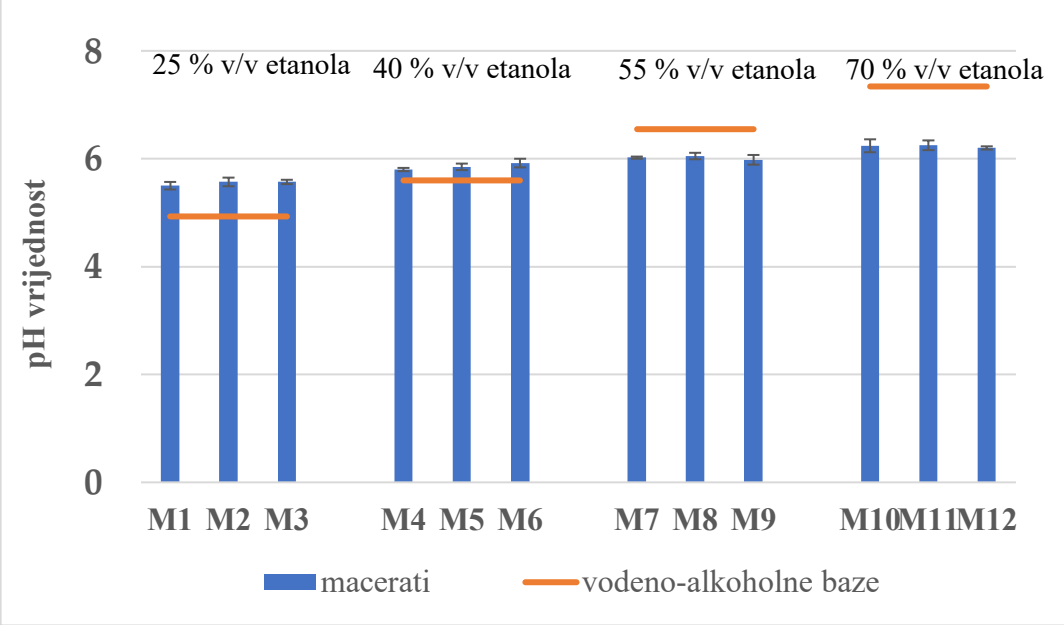


Slika 35. Antioksidacijska aktivnost macerata (M1-M12) prije i nakon simulirane gastrointestinalne probave mjerena FRAP metodom

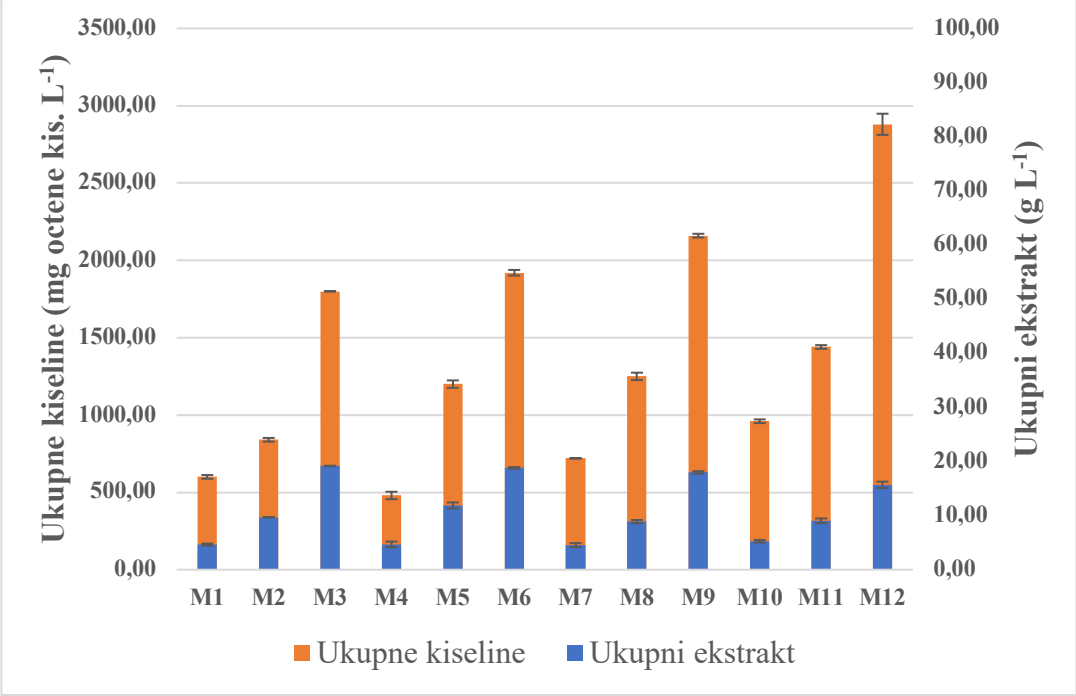
4.5. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

4.5.1. pH vrijednost, ukupne kiseline, sadržaj ukupnog ekstrakta i volumni udio etanola

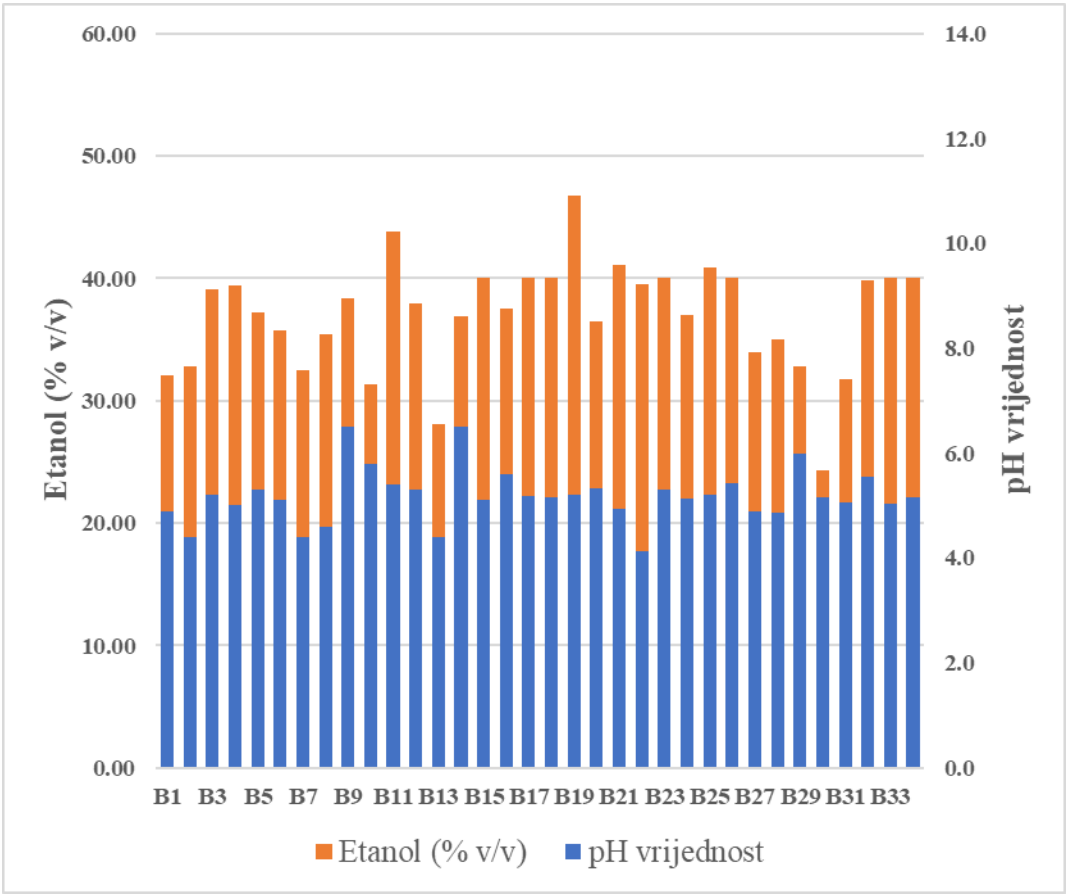
U dobivenim maceratima (M1-M12) od fizikalno-kemijskih parametara određena je pH vrijednost (slika 36), sadržaj ukupnih kiselina (mg octene kiseline L^{-1}) i ukupnog ekstrakta (g L^{-1}) (slika 37) dok je prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34) određena pH vrijednost te volumni udio etanola (% v/v) (slika 38).



Slika 36. pH vrijednosti macerata (M1-M12) i vodeno-alkoholnih baza (25, 40, 55 i 70 % v/v etanola)



Slika 37. Sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta macerata (M1-M12)



Slika 38. pH vrijednost i volumni udio etanola (% v/v) izmjereni u prikupljenim komercijalnim uzorcima biske (B1-B34)

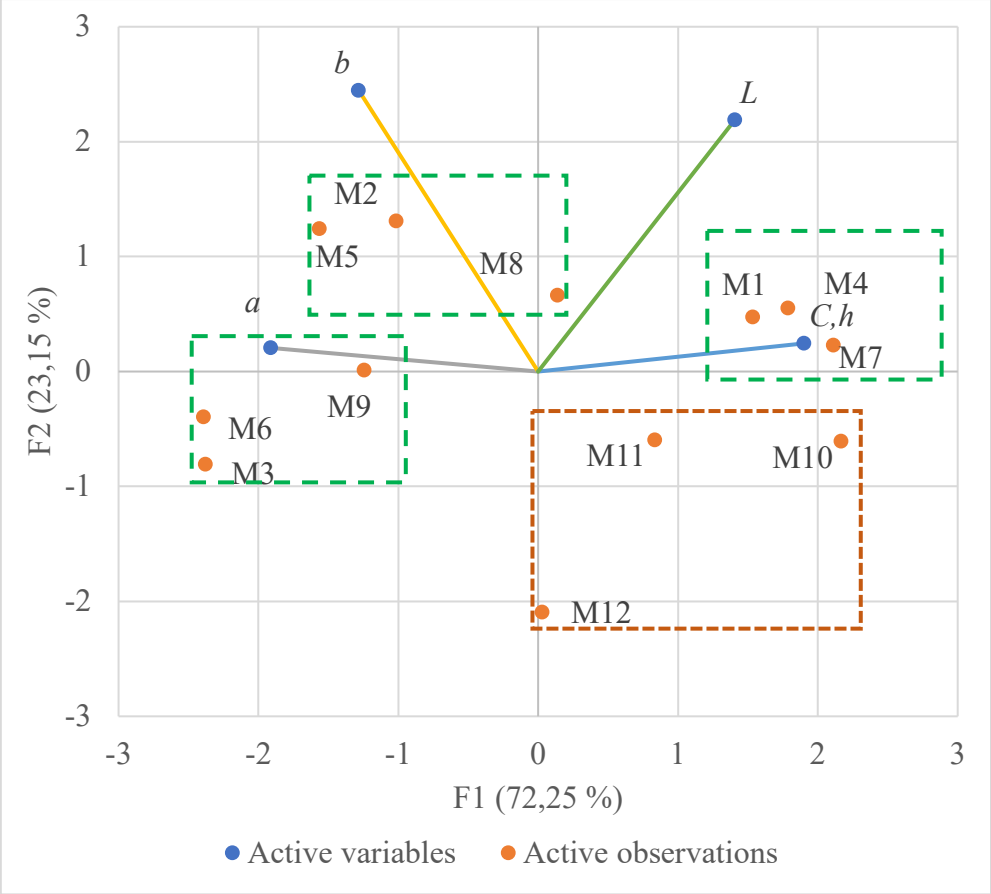
4.5.2. Kromatski parametri

Kromatski parametri dobivenih macerata imele (M1-M12) i prikupljenih komercijalnih uzoraka biske (B1-B34) izmjereni su spektrofotometrijski primjenom CIELab sustava. Parametri koji su određeni su: svjetlina *L* koja ima interval od 0 (crno) do 100 (prozirno), kromatske koordinate *a* i *b* gdje vrijednosti variraju od *–a* (zelena boja) do *+a* (crvena boja), odnosno od *–b* (plava boja) do *+b* (žuta boja), parametar *C* koji označava ton boje te kut nijanse *h.*

Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama 12 i 13. Na temelju dobivenih podataka napravljena je PCA analiza s ciljem mogućeg grupiranja macerata na osnovi kromatskih parametara (*L, C, a, b, h*) (slika 39).

Tablica 12. Kromatski parametri (*L, C, a, b, h*) dobivenih macerata (M1-M12)

Uzorak	**Kromatski parametri**				
	L	***C***	***a***	***b***	***h***
M1	81,95 ± 0,01	66,98 ± 0,02	9,31 ± 0,01	66,33 ± 0,02	1,43 ± 0,01
M2	66,05 ± 0,01	89,54 ± 0,05	25,72 ± 0,01	85,77 ± 0,05	1,28 ± 0,01
M3	42,70 ± 0,05	81,46 ± 0,16	37,88 ± 0,05	72,12 ± 0,16	1,09 ± 0,05
M4	82,01 ± 0,00	67,47 ± 0,01	6,54 ± 0,02	67,15 ± 0,01	1,47 ± 0,01
M5	60,10 ± 0,01	93,30 ± 0,08	29,50 ± 0,02	88,15 ± 0,08	1,25 ± 0,01
M6	45,00 ± 0,01	84,90 ± 0,01	37,86 ± 0,01	76,00 ± 0,01	1,11 ± 0,01
M7	77,21 ± 0,00	65,68 ± 0,02	2,58 ± 0,00	65,63 ± 0,02	1,53 ± 0,00
M8	63,94 ± 0,01	79,97 ± 0,01	14,43 ± 0,02	78,65 ± 0,01	1,39 ± 0,02
M9	48,81 ± 0,01	82,75 ± 0,07	25,03 ± 0,01	78,87 ± 0,08	1,26 ± 0,02
M10	67,52 ± 0,01	60,30 ± 0,03	1,48 ± 0,01	60,28 ± 0,03	1,55 ± 0,00
M11	56,08 ± 0,01	67,58 ± 0,02	8,86 ± 0,02	66,99 ± 0,02	1,44 ± 0,02
M12	36,86 ± 0,06	60,42 ± 0,01	13,90 ± 0,06	58,80 ± 0,01	1,34 ± 0,08



Slika 39. PCA dijagram raspodjele uzoraka (M1-M12) s obzirom na kromatske parametre (*L, C, a, b, h*)

Tablica 13. Kromatski parametri (*L, C, a, b, h*) prikupljenih komercijalnih uzoraka biske (B1-B34)

Uzorak	**Kromatski parametri**				
	L	***C***	***a***	***b***	***h***
B1	80,20	54,36	3,62	54,24	1,50
B2	85,25	48,63	3,36	48,51	1,50
B3	84,79	45,02	-5,07	44,74	-1,46
B4	95,65	12,17	-3,20	11,74	-1,30
B5	86,17	58,27	2,20	58,23	1,53
B6	85,49	56,63	2,27	56,58	1,53
B7	92,04	30,06	-0,98	30,05	-1,54
B8	89,44	35,06	0,70	35,05	1,55
B9	77,74	62,54	5,44	62,31	1,48
B10	81,17	64,78	5,51	64,54	1,49

Tablica 13 (nastavak). Kromatski parametri (*L, C, a, b, h*) prikupljenih komercijalnih uzoraka biske (B1-B34)

Uzorak	Kromatski parametri				
	L	***C***	***a***	***b***	***h***
B11	83,56	56,33	0,03	56,33	1,57
B12	87,10	50,20	-1,05	50,19	-1,55
B13	66,72	75,49	18,80	73,11	1,32
B14	77,88	67,19	6,22	66,90	1,48
B15	85,01	57,41	0,73	57,41	1,56
B16	89,34	51,88	-2,66	51,81	-1,52
B17	76,16	81,00	7,48	80,66	1,48
B18	85,08	61,89	-7,52	61,44	-1,45
B19	83,44	59,98	-2,63	59,92	-1,53
B20	67,55	97,04	22,44	94,41	1,34
B21	84,81	48,44	-0,66	48,44	-1,56
B22	89,17	34,11	0,07	34,11	1,57
B23	92,37	32,38	-4,42	32,07	-1,43
B24	77,06	86,63	9,16	86,14	1,46
B25	82,22	70,53	2,09	70,49	1,54
B26	84,71	48,73	-1,00	48,72	-1,55
B27	94,41	19,72	-3,14	19,46	-1,41
B28	84,41	58,46	-0,53	58,46	-1,56
B29	74,12	76,68	7,56	76,30	1,47
B30	55,93	67,74	14,82	66,10	1,35
B31	88,64	54,54	-2,52	54,48	-1,52
B32	81,34	63,37	1,92	63,34	1,54
B33	82,18	56,02	2,3	65,97	1,54
B34	83,25	52,71	2,5	59,8	1,48

4.5.3. Profil aroma spojeva

Profil aroma spojeva macerata (M1-M12) određen je primjenom plinske kromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (GC-MS) uz prethodnu

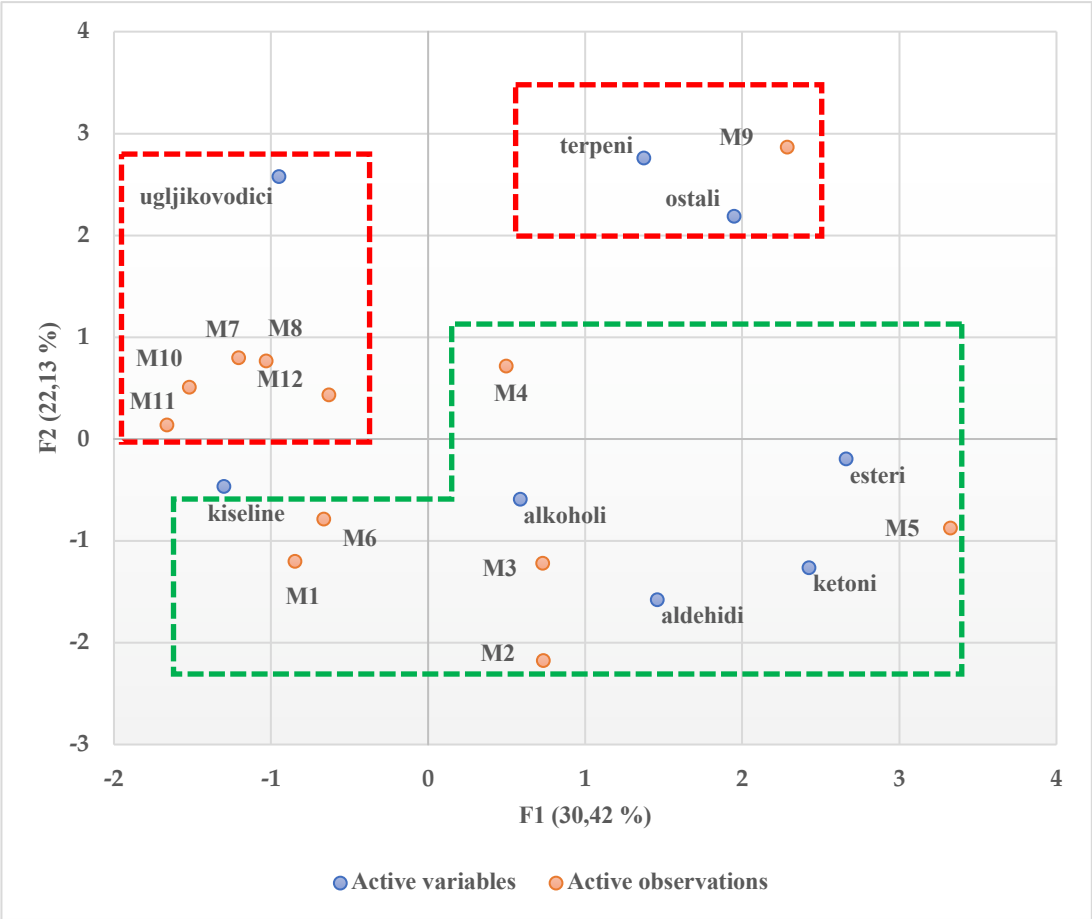
mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME, engl. *solid-phase microextraction*). U tablici 14 je prikazan relativni udio (%) aroma spojeva u maceratu M5. U tablici 15 prikazani su karakteristični terpeni i terpenski alkoholi koji su detektirani u maceratima imele te njihove relativne koncentracije (mg L^{-1}) uz opisnu aromu. Relativne koncentracije dane su u smislu ekvivalenata internog standarda korištenog u metodi. Relativna koncentracija je izračunata kao srednja vrijednost relativnih koncentracija spoja prisutnog u svim maceratima. Nadalje, kako bi se procijenio njihov doprinos ukupnoj aromi macerata određena im je OAV vrijednost (engl. *Odour Activity Value*) koja predstavlja omjer koncentracije pojedinog hlapivog spoja i njegovog senzorskog praga osjetljivosti. Podebljano su istaknuti spojevi čiji je OAV > 1. Podaci o pragu osjetljivosti uzeti su iz literature (Burdock, 2010). S ciljem mogućeg grupiranja macerata na temelju detektiranih aroma spojeva napravljena je PCA analiza čiji su rezultati prikazani na slikama 40 i 41.

Tablica 14. Relativni udio (%) aroma spojeva u maceratu imele M5

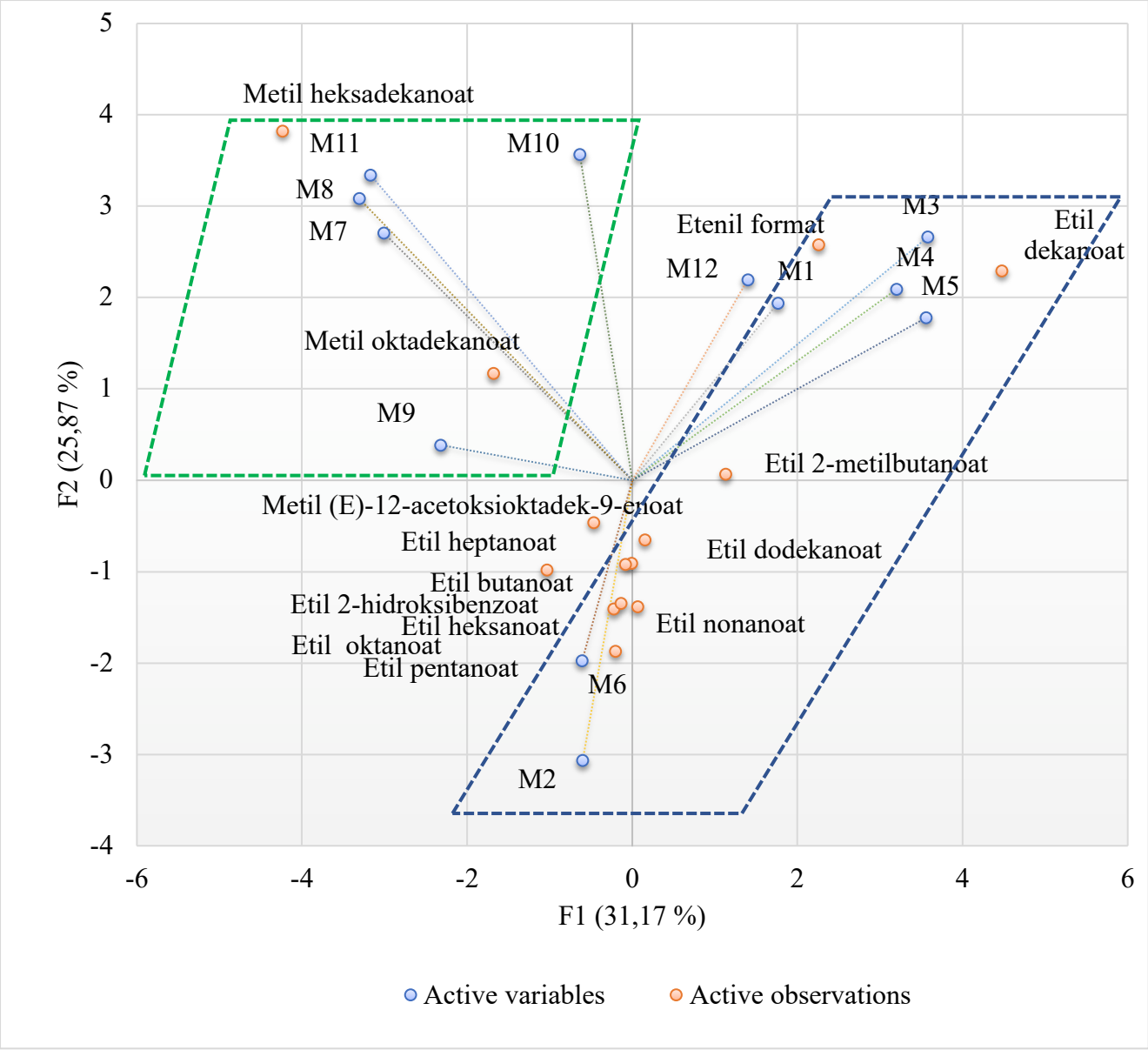
Skupina	Identificirani spojevi	Opisna aroma	Relativni udio (%)
KISELINE	dekanska kiselina	masna, citrusi	0,317 ± 0,01
ALKOHOLI	3-metil-acetat-1-butanol	sladna	0,359 ± 0,01
	1-metil-4-(1-etiletenil)-cikloheksanol		1,152 ± 0,02
	1,8-cineol	eukaliptus, slatka, osvježavajuća	1,587 ± 0,06
	3-metil-1-butanol		0,282 ± 0,02
	1-heksanol		0,317 ± 0,01
	3-heksen-1-ol		0,021 ± 0,00
	1-okten-3-ol		0,269 ± 0,00
	acetat-ciklooktanol		0,372 ± 0,01
	2-furan-metanol		0,531 ± 0,00
	metoksi-fenil-oksim		3,187 ± 0,10
	benzen metanol		0,435 ± 0,01
	1,2,3-propantriol		2,270 ± 0,09
ALDEHIDI	acetaldehid	opora, slatka	0,552 ± 0,01
	heksanal		1,607 ± 0,02

Tablica 14 (nastavak). Relativni udio (%) aroma spojeva u maceratu imele M5

Skupina	Identificirani spojevi	Opisna aroma	Relativni udio (%)
ALDEHIDI	oktanal	masna, sapunasta, limun, zelena	0,593 ± 0,02
	benzaldehid	bademi, zagoreni šećer	2,208 ± 0,05
ESTERI	etenil format		9,928 ± 0,22
	etil butanoat	voće, ananas	1,621 ± 0,31
	2-metil-etil butanoat	voćna	5,678 ± 0,05
	etil pentanoat	voćna	2,049 ± 0,03
	etil heksanoat	jabuka, banana, ljubičica	7,651 ± 0,21
	etil heptanoat	grožđe	0,690 ± 0,03
	etil oktanoat	ananas, kruška	4,070 ± 0,22
	etil nonanoat	voćna, masna	3,036 ± 0,02
	etil dekanoat	cvjetna, masna	14,956 ± 0,30
	metil salicilat	pepermint	1,649 ± 0,02
	etil dodekanoat	cvjetna	1,725 ± 0,02
	metil heksadekanoat		0,538 ± 0,00
	etil heksadekanoat		0,359 ± 0,02
UGLJIKOVODICI	undekan		1,980 ± 0,04
KETONI	2,2-dimetil-3-heptanon		0,338 ± 0,01
	fenkon		1,283 ± 0,05
	α-tujon		3,615 ± 0,09
	β-tujon		2,532 ± 0,06
	5-metil-2-(1-metiletil)-cis-cikloheksanon		4,250 ± 0,13
	teaspiran		4,629 ± 0,12
	2,6,10,10-tetrametil-1-oksa-spiro[4,5]dec-6-en		1,877 ± 0,04
OSTALI	(S)-l-alanin etilamid		0,973 ± 0,02
	tetranitro-metan		1,690 ± 0,03
	1,1-dietoksi-3-metil-butan		5,775 ± 0,30
	1-metil-3-(1-metiletil)-benzen		0,772 ± 0,02
	ZBROJ		100,00 ± 2,80



Slika 40. PCA dijagram raspodjele uzoraka (M1-M12) s obzirom na karakterističke skupine spojeva. Macerati s nižim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) i karakterističnim skupinama spojeva uokvireni su zeleno a macerati s višim udjelom etanola (55 i 70 % v/v) i karakterističnim skupinama spojeva uokvireni su crveno.



Slika 41. PCA dijagram raspodjele uzoraka (M1-M12) s obzirom na karakteristične estere. Macerati s nižim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) i karakterističnim esterima uokvireni su plavo a macerati s višim udjelom etanola (55 i 70 % v/v) i karakterističnim esterima uokvireni su zeleno.

Tablica 15. Terpeni i terpenski alkoholi identificirani u maceratima imele s pripadajućim relativnim koncentracijama (mg L^{-1}) i dobivenim OAV vrijednostima

Terpen	IUPAC naziv	Opisna aroma	Koncentracija (mg L^{-1})	Prag osjetljivosti (mg L^{-1})	OAV
β-pinen	6,6-dimethyl-2-methylidenebicyclo[3.1.1]heptane	terpentin	0,56	0,752	0,745
p-cimen	1-methyl-4-propan-2-ylbenzene	blago drvenasta, citrusna, zeleni papar i origano	0,56	10	0,056
l-limonen	1-methyl-4-prop-1-en-2-ylcyclohexene	**limun**	1,23	0,2	**6,15**
m-cimen	1-methyl-3-propan-2-ylbenzene	**cistrusna, zemljana, drvenasta**	2,06	0,12	**17,16**
trans-menton	(2S,5R)-5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-one	**pepermint, osvježavajuća**	6,50	0,476	**13,65**
ylangen	(1S,8S)-1,3-dimethyl-8-propan-2-yltricyclo[4.4.0.02.7]dec-3-ene	papar, začini	1,41	-	-
β-bourbonen	(1S,2R,6S,7R,8S)-1-methyl-5-methylidene-8-propan-2-yltricyclo[5.3.0.02.6]decane	biljna, drvenasta, cvjetna, balzamična	1,58	-	-
kamfor	1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	topla, mentol	0,70	1	0,70
***α*-humulen**	(1E,4E,8E)-2,6,6,9-tetramethylcycloundeca-1,4,8-triene	**drvenasta**	0,84	0,39	**2,15**
α-bourbonen	3,7-dimethyl-10-propan-2-yltricyclo[5.3.0.02.6]dec-3-ene	drvenasta, začinska	7,50	-	-
izomenton	(2S,5S)-5-methyl-2-propan-2-ylcyclohexan-1-one	**pepermint**	1,14	0,63	**1,81**
α-bergamoten	2,6-dimethyl-6-(4-methylpent-3-enyl)bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	papar s drvenastim i začinskim notama	0,13	-	-
trans-kariofilen	(1R,4E,9S)-4,11,11-trimethyl-8-methylidenebicyclo[7.2.0]undec-4-ene	slatka, drvenasta, začinska, klinčić	0,11	0,15	0,73
1,8-cineol/ eukaliptol	1,3,3-trimethyl-2-oxabicyclo[2.2.2]octane	**eukaliptus, slatka, osvježavajuća**	0,201	0,064	**3,14**
linalol	3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol	**cvjetovi naranče, cvjetna, ruža**	0,059	0,05	**1,18**
borneol	4,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-3-ol	**bor, drvenasta, kamfor, balzamična**	0,134	0,08	**1,675**
mentol	(1R,2S,5R)-2-isopropyl-5-methylcyclohexanol	mentol	0,29	1	0,29

Profil aroma spojeva komercijalnih uzoraka biske (B1-B14) određen je primjenom plinske kromatografije spregnute sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Rezultati prikazani u tablicama 16 i 17 predstavljaju prosječnu površinu pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u komercijalnim uzorcima biske. Na slici 42 je prikazan PCA dijagram raspodjele uzoraka biske (B1-B14) s obzirom na detektirane aroma spojeve.

Tablica 16. Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B1-B7)

Spojevi	Uzorak biske						
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**
ESTERI							
Izopropil miristat	23,9 ± 14,5a	15,5 ± 1,1a	38,2 ± 37,8a	16,9 ± 5,4a	25,5 ± 10,4a	13,4 ± 7,4a	58,5 ± 1,3a
Etil heksadekanoat	22,2 ± 1,1abc	47,0 ± 2,7 cde	24,9 ± 5,1abc	18,4 ± 1,2ab	34,3 ± 2,4bcd	30,0 ± 9,6bcd	65,9 ± 5,4ef
Etil oktanoat	1298,3 ± 15,2abcde	2469,8 ± 39,2de	1360,5 ± 192,2abcde	2295,0 ± 8,4 cde	2876,6 ± 31,6e	1159,7 ± 42,9abcde	1310,7 ± 1745,7abcde
Etill dekanoat	939,1 ± 4,6ab	1782,2 ± 40,0bc	1023,8 ± 35,9ab	1756,0 ± 41,5bc	2225,7 ± 30,6c	958,7 ± 48,7ab	833,6 ± 1067,2ab
Etil dodekanoat	163,3 ± 1,1b	339,6 ± 10,9d	205,4 ± 38,4bc	268,3 ± 8,1 cd	450,4 ± 5,7e	216,4 ± 12,9bc	345,5 ± 19,3d
Etil heksanoat	754,2 ± 12,3 fg	880,1 ± 8,9gh	619,4 ± 27,1ef	928,3 ± 13,2 h	1263,3 ± 29,2i	472,7 ± 25,9 cd	1319,1 ± 9,8i
Etil pentadekanoat	9,5 ± 0,4abc	22,3 ± 1,6def	11,3 ± 3,9bc	9,6 ± 1,4abc	23,3 ± 0,1ef	14,0 ± 2,0 cde	28,4 ± 3,8 fg
3-Metilbutil oktanoat	14,4 ± 3,7ab	49,3 ± 5,2bc	48,4 ± 5,4bc	17,6 ± 5,1ab	31,2 ± 4,9ab	11,8 ± 0,1ab	29,4 ± 37,8ab
Izoamil acetat	204,8 ± 37,2c	547,8 ± 23,9e	128,4 ± 26,2abc	200,5 ± 1,4c	n.d.	166,1 ± 14,8bc	294,9 ± 7,3d
Dietill butandioat	88,1 ± 14,4 cde	58,3 ±2,9bc	121,3 ± 16,9efg	49,0 ± 1,4abcd	n.d.	95,8 ± 10,1def	71,3 ± 7,2bcde
Etil nonanoat	45,1 ± 0,2d	59,2 ± 3,4e	24,9 ± 5,0b	77,1 ± 6,6f	47,2 ± 1,3d	38,7 ± 0,2c	n.d.
Etil heptanoat	13,1 ± 0,8bc	18,9 ± 0,1 cd	31,7 ± 3,0e	22,8 ± 4,2d	11,2 ± 2,0bc	7,6 ± 1,7ab	n.d.
Metill heksanoat	8,3 ± 1,2ab	27,1 ± 1,1bc	8,2 ± 3,5ab	21,3 ± 0,0bc	30,9 ± 1,5c	n.d.	33,1 ± 17,4c
Metil oktanoat	7,0 ± 1,9ab	34,3 ± 1,2e	8,2 ± 0,5bc	18,7 ± 0,7d	38,0 ± 6,0e	n.d.	n.d.

Tablica 16 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B1-B7)

Spojevi	Uzorak biske						
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**
ESTERI							
Izobutil kaprilat	3,0 ± 0,2a	8,7 ± 0,7ab	6,1 ± 0,9ab	3,2 ± 0,6a	7,0 ± 0,8ab	2,9 ± 0,1a	29,5 ± 22,5b
Etil dek-9-enoat	9,1 ± 3,3a	90,5 ± 2,9b	45,2 ± 0,9ab	6,8 ± 3,2b	n.d.	13,2 ± 4,1a	46,8 ± 46,0a
Izobutil kaprat	2,2 ± 1,7ab	4,2 ± 0,6bc	n.d.	3,1 ± 1,2b	4,8 ± 1,4bcd	n.d.	6,9 ± 0,4 cde
3-Metilbutil dekanoat	5,4 ± 1,3ab	16,6 ± 0,5c	n.d.	6,1 ± 0,1ab	17,1 ± 1,7c	6,5 ± 0,4b	14,9 ± 0,5c
Metil oleat	8,1 ± 0,3b	23,4 ± 2,9c	n.d.	38,6 ± 3,0d	9,0 ± 1,4b	45,5 ± 3,0e	n.d.
Izopentil heksanoat	8,5 ± 0,9bc	12,1 ± 0,2bcd	9,6 ± 2,1bcd	7,3 ± 0,5abc	5,5 ± 1,1ab	6,5 ± 0,9ab	15,5 ± 2,3 cd
ALKOHOLI							
2-feniletanol	68,0 ± 15,2bcd	n.d.	69,4 ± 18,7bcd	29,7 ± 11,3ab	105,5 ± 19,3 cd	113,0 ± 11,7d	96,2 ± 17,1 cd
Tetradekan-1-ol	9,6 ± 2,2bcd	7.4 ± 0.5abcd	n.d.	9,1 ± 0,9bcd	15,0 ± 1,3d	4,3 ± 0,3abc	8,5 ± 1,4bcd
2-Etildekan-1-ol	5,9 ± 2,7 cd	n.d.	n.d.	5,0 ± 1,5bcd	n.d.	4,9 ± 2,0bcd	n.d.
Heksadekan-1-ol	4,2 ± 1,1ab	3,2 ± 0,8ab	n.d.	5,4 ± 1,4ab	8,5 ± 1,3b	n.d.	n.d.
2-Heksildekan-1-ol	5,3 ± 0,6ab	4,7 ± 0,5ab	n.d.	7,7 ± 0,4ab	12,6 ± 6,7b	n.d.	n.d.
Nonan-1-ol	4,2 ± 1,5bc	11,0 ± 0,6e	n.d.	n.d.	n.d.	7,7 ± 2,4e	n.d.

Tablica 16 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B1-B7)

Spojevi	Uzorak biske						
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**
ALKOHOLI							
Lauril alkohol	1,1 ± 0,5a	2,3 ± 0,4a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Karbitol	n.d.	n.d.	56,8 ± 12,1b	25,6 ± 4,6a	n.d.	22,6 ± 6,3ab	56,3 ± 7,9b
ALDEHIDI							
Dekanal	9,7 ± 2,8a	16,7 ± 1,2b	11,5 ± 3,4c	13,3 ± 8,1d	15,3 ± 3,0e	9,5 ± 1,6f	1336,8 ± 1861,3g
Dodekanal	2,8 ± 0,0a	4,2 ± 0,0b	3,0 ± 0,3c	2,7 ± 0,2d	3,8 ± 0,1e	2,0 ± 0,7f	875,7 ± 1234,5g
Benzaldehid	54,8 ± 9,4b	58,7 ± 3,1b	n.d.	n.d.	n.d.	70,3 ± 8,5b	195,4 ± 25,3c
Nonanal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	47,7 ± 0,1b	72,7 ± 7,3c
TERPENI							
Linalol	10,1 ± 3,0bc	20,9 ± 1,1d	5,0 ± 0,6ab	33,1 ± 3,8e	37,7 ± 5,2e	n.d.	13,7 ± 0,5 cd
Limonen	n.d.	121,6 ± 10,4b	33,6 ± 6,9a	n.d.	236,5 ± 39,3c	n.d.	n.d.
Kampfen	12,0 ± 6,0bcd	21,9 ± 0,8e	16,0 ± 2,8cd	n.d.	11,8 ± 0,3bc	12,8 ± 0,1bc	n.d.
α-terpinolen	6,7 ± 0,3a	43,6 ± 1,8d	n.d.	n.d.	23,4 ± 3,3b	9,4 ± 1,4a	30,3 ± 2,3c

Tablica 16 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B1-B7)

Spojevi	Uzorak biske						
	B1	**B2**	**B3**	**B4**	**B5**	**B6**	**B7**
ACETALI							
Acetaldehid etil amil acetal	244,6 ± 1,0de	255,7 ± 3,1de	311,9 ± 26,0e	315,7 ± 12,0e	94,7 ± 10,7abc	112,2 ± 16,2c	164,3 ± 3,0cd
Izovaleraldehid dietil acetal	236,2 ± 2,8bc	83,7 ± 2,5a	311,0 ± 35,4cd	416,7 ± 11,0d	n.d.	123,8 ± 4,5ab	44,3 ± 34,9a
Heksanal dietil acetal	4,7 ± 1,0b	18,1 ± 1,4c	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	24,4 ± 2,6d
KISELINE							
Miristinska	8,2 ± 3,4a	21,6 ± 1,7b	n.d.	11,0 ± 1,6a	11,5 ± 1,4a	n.d.	12,2 ± 3,6a
Oleinska	4,7 ± 1,1a	13,7 ± 0,6b	n.d.	5,1 ± 1,4a	7,8 ± 2,4a	n.d.	n.d.
OSTALI							
Kaprilni eter	19,2 ± 12,5ab	20,6 ± 4,3ab	n.d.	58,9 ± 15,0b	12,2 ± 0,1ab	3,5 ± 4,6ab	25,8 ± 4,3ab
UKUPAN BROJ IDENTIFICIRANIH SPOJEVA	**52**	**58**	**42**	**49**	**48**	**37**	**46**

n.d. = spoj nije detektiran. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD. Različita slova unutar istog reda ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).

Tablica 17. Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B8-B14)

Spojevi	Uzorak biske						
	B8	**B9**	**B10**	**B11**	**B12**	**B13**	**B14**
ESTERI							
Izopropil miristat	68,5 ± 60,7a	0,7 ± 1,0a	53,3 ± 28,5a	252,9 ± 80,1b	54,9 ± 17,5a	69,1 ± 21,7a	12,0 ± 2,7a
Etil heksadekanoat	31,5 ± 13,9bcd	1,8 ± 2,5a	77,5 ± 14,4f	54,3 ± 0,2def	20,9 ± 3,2abc	67,2 ± 1,4ef	17,7 ± 7,1ab
Etil oktanoat	740,3 ± 8,9abcd	47,5 ± 5,4a	459,4 ± 23,7abc	1986,9 ± 73,3bcde	1897,9 ± 73,1abcde	462,3 ± 12,0abc	158,9 ± 7,0ab
Etill dekanoat	516,6 ± 5,7a	31,4 ± 2,9a	257,2 ± 18,2a	1811,7 ± 53,5bc	1864,6 ± 78,9bc	232,4 ± 23,3a	112,3 ± 4,7a
Etil dodekanoat	147,5 ± 11,6b	n.d.	43,0 ± 3,2a	464,9 ± 53,9e	453,8 ± 43,7e	18,4 ± 0,6a	29,1 ± 3,9a
Etil heksanoat	341,3 ± 18,1bc	12,9 ± 1,8a	524,6 ± 34,4de	686,9 ± 70,1f	359,8 ± 85,8bc	253,2 ± 4,6b	34,6 ± 6,1a
Etil pentadekanoat	12,4 ± 2,3bcd	n.d.	8,9 ± 0,6abc	33,9 ± 3,5 g	25,7 ± 4,8 fg	4,2 ± 0,0abc	3,7 ± 2,7ab
3-Metilbutil oktanoat	8,0 ± 0,0ab	n.d.	6,0 ± 0,7a	83,6 ± 3,4c	77,9 ± 2,5c	n.d.	n.d.
Izoamil acetat	58,6 ± 5,6a	n.d.	n.d.	169,5 ± 2,8bc	72,1 ± 3,3a	111,9 ± 26,0ab	n.d.
Dietill butandioat	170,7 ± 44,0g	n.d.	n.d.	128,2 ± 3,8 fg	35,9 ± 3,6abc	20,8 ± 2,2ab	n.d.
Etil nonanoat	4,7 ± 1,1a	n.d.	n.d.	33,0 ± 1,1bc	28,0 ± 2,0b	25,1 ± 0,0b	n.d.
Etil heptanoat	n.d.	n.d.	n.d.	16,4 ± 5,5 cd	18,7 ± 1,1 cd	n.d.	n.d.
Metill heksanoat	n.d.	n.d.	n.d.	19,3 ± 1,9bc	11,0 ± 0,8ab	n.d.	n.d.
Metil oktanoat	n.d.	n.d.	n.d.	14,8 ± 2,5 cd	10,8 ± 2,0bc	n.d.	n.d.

Tablica 17 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B8-B14)

Spojevi	Uzorak biske						
	B8	**B9**	**B10**	**B11**	**B12**	**B13**	**B14**
ESTERI							
Izobutil kaprilat	n.d.	n.d.	n.d.	9,8 ± 0,2ab	15,3 ± 0,6ab	n.d.	n.d.
Etil dek-9-enoat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11,2 ± 1,4a	n.d.	n.d.
Izobutil kaprat	n.d.	n.d.	n.d.	7,7 ± 0,5e	7,3 ± 0,2de	n.d.	n.d.
3-Metilbutil dekanoat	n.d.	n.d.	n.d.	25,0 ± 5,1d	27,3 ± 2,2d	n.d.	n.d.
Metil oleat	n.d.	0,5 ± 0,7a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Izopentil heksanoat	n.d.	n.d.	n.d.	29,3 ± n.d.e	17,8 ± 1,7d	n.d.	n.d.
ALKOHOLI							
2-feniletanol	107,3 ± 35,3d	1,3 ± 0,1a	n.d.	50,1 ± 1,6abc	35,7 ± 1,3ab	6,3 ± 1,9a	n.d.
Tetradekan-1-ol	n.d.	3,0 ± 4,2ab	2,6 ± 0,7ab	9,9 ± 4,4bcd	n.d.	11,1 ± 2,7 cd	4,2 ± 1,6abc
2-Etildekan-1-ol	4,6 ± 0,6abcd	0,5 ± 0,8ab	2,7 ± 0,7abc	n.d.	n.d.	9,1 ± 1,9d	2,2 ± 0,3abc
Heksadekan-1-ol	n.d.	3,8 ± 5,4ab	n.d.	5,0 ± 0,9ab	n.d.	7,2 ± 1,9b	2,8 ± 0,7ab
2-Heksildekan-1-ol	n.d.	n.d.	n.d.	4,2 ± 1,0ab	n.d.	11,7 ± 5,5b	2,3 ± 0,6a
Nonan-1-ol	n.d.	n.d.	2,8 ± 0,5ab	n.d.	3,7 ± 0,6bc	7,0 ± 1,4 cd	n.d.

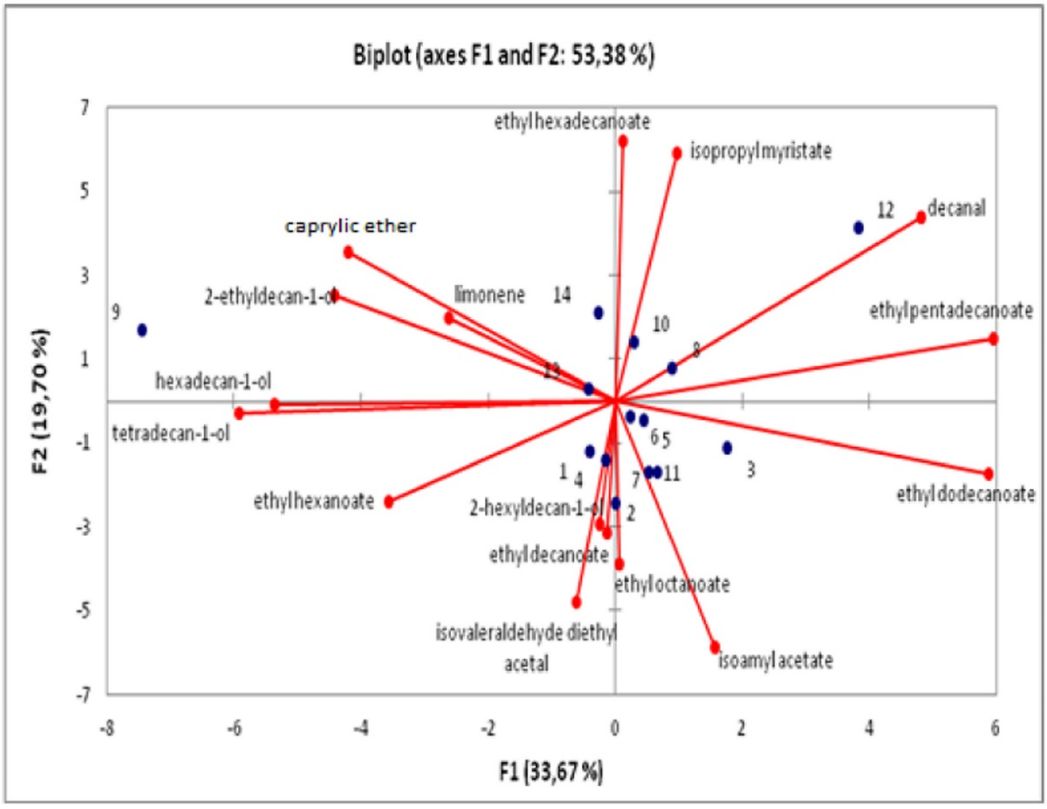
Tablica 17 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B8-B14)

Spojevi	Uzorak biske						
	B8	**B9**	**B10**	**B11**	**B12**	**B13**	**B14**
ALKOHOLI							
Lauril alkohol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,9 ± 0,3a	n.d.
Karbitol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	44,0 ± 3,0b
ALDEHIDI							
Dekanal	8,3 ± 0,9h	n.d.	13,7 ± 3,2i	6,5 ± 0,9j	23,5 ± 0,3 k	10,4 ± 3,7 l	4,7 ± 3,5 m
Dodekanal	3,3 ± 0h	n.d.	2,3 ± 0,0i	n.d.	n.d.	1,7 ± 2,1j	n.d.
Benzaldehid	n.d.	11,8 ± 3,2a	12,1 ± 3,1a	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Nonanal	n.d.	2,6 ± 1,6a	n.d.	n.d.	6,0 ± 1,6a	39,8 ± 122,5b	n.d.
TERPENI							
Linalol	n.d.	n.d.	6,0 ± 0,3abc	9,3 ± 1,6bc	3,5 ± 0,1ab	n.d.	n.d.
Limonen	n.d.	7,0 ± 2,8a	n.d.	n.d.	1,3 ± 0,5a	7,4 ± 67,0a	114,0 ± 53,4b
Kampfen	n.d.	n.d.	n.d.	18,7 ± 2,2de	n.d.	9,5 ± 8,0a	n.d.
α-terpinolen	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ACETALI							
Acetaldehid etil amil acetal	99,6 ± 11,7b	n.d.	n.d.	162,7 ± 81,8cd	81,1 ± 7,8abc	4,4 ± 23,1ab	n.d.

Tablica 17 (nastavak). Prosječna površina pikova i ukupan broj detektiranih aroma spojeva u uzorcima biske (B8-B14)

Spojevi	Uzorak biske						
	B8	**B9**	**B10**	**B11**	**B12**	**B13**	**B14**
ACETALI							
Izovaleraldehid dietil acetal	n.d.	4,6 ± 1,0a	n.d.	317,1 ± 106,1cd	74,3 ± 9,8a	n.d.	n.d.
Heksanal dietil acetal	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,7 ± 20,2a	n.d.	n.d.
KISELINE							
Miristinska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10,1 ± 17,4a	n.d.
Oleinska	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,4 ± 5,1a	n.d.
OSTALI							
Kaprilni eter	35,9 ± 36,4ab	4,5 ± 6,4a	13,1± 2,8ab	31,2 ± 13,3ab	3,6 ± 1,1a	45,3 ± 180,2ab	5,0 ± 2,2a
UKUPAN BROJ IDENTIFICIRANIH SPOJEVA	**20**	**24**	**31**	**34**	**73**	**44**	**19**

n.d. = spoj nije detektiran. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju određivanja ± SD. Različita slova unutar istog reda ukazuju na statistički značajnu razliku ($p < 0,05$).



Slika 42. PCA dijagram raspodjele uzoraka biske (B1-B14) s obzirom na detektirane aroma spojeve

5. RASPRAVA

5.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA MACERACIJE NA PRINOS UKUPNIH FENOLNIH SPOJEVA

Maceracija je tehnološki postupak ekstrakcije spojeva iz ljekovitog i aromatičnog bilja pomoću alkoholne baze koja se koristi u proizvodnji travarica i voćnih i biljnih likera. Provodi se na sobnoj temperaturi u spremnicima uz povremeno ili stalno miješanje tijekom određenog vremenskog perioda koji ovisi o karakteristikama biljnog materijala. Parametri maceracije kao što su udio etanola u alkoholnoj bazi, omjer bilja i alkoholne baze, temperatura i trajanje maceracije utječu na kvalitetu dobivenog macerata, a posljedično tome i na kvalitetu finalnog proizvoda – travarice ili likera (Rodriguez-Solana i sur., 2016a, 2016b; 2019a; Jovanović i sur., 2017; Caldeira i sur., 2018; Hanousek Čiča i sur., 2020). Proizvođači travarica postupak maceracije bilja najčešće vode tradicijski, određeno vrijeme, bez točnih saznanja o utjecaju parametra maceracije na količinu i vrstu ekstrahiranih biološki aktivnih i aromatičnih spojeva iz bilja. O vrsti, količini i kvaliteti upotrijebljenog bilja kao i o vremenu i uvjetima provođenja maceracije znatno ovisi količina poželjnih biološki aktivnih i aromatičnih spojeva. Stoga bi se definiranje optimalnih uvjeta maceracije trebalo temeljiti na ispitivanju promjena u sastavu i količini biološki aktivnih spojeva tijekom vremena čime bi se u konačnici osigurala i kvaliteta finalnog proizvoda (Rodriguez-Solana i sur., 2016a). Parametri maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi s ciljem proizvodnje biske do sada nisu bili predmet znanstvenih istraživanja. Cilj ovog rada je definirati optimalne procesne parametre maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi s obzirom na volumni udio etanola, koncentraciju biljnog materijala i trajanje samog postupka pri kojima se postiže najveći sadržaj biološki aktivnih spojeva kao nosioca funkcionalnih svojstava.

Da bi se utvrdilo optimalno trajanje maceracije uzorci za analizu ukupnih fenolnih spojeva (TPC) uzimani su nakon 7, 14, 21 i u nekim slučajevima nakon 28 dana tj. do ustaljenja koncentracije ukupnih fenolnih spojeva te je unutar istih uzoraka praćenih kroz vrijeme provedena statistička analiza. Statistička analiza je pokazala da kod uzoraka s 25 % etanola praćenih kroz vrijeme postoji značajna razlika ($p < 0,05$) u količini ekstrahiranih ukupnih fenolnih spojeva samo za uzorak M1 kojeg karakterizira i najmanja koncentracija biljnog materijala ($p = 0,036$), dok za uzorke M2 i M3 te razlike nema (slika 12). Za uzorke s 40 % v/v etanola, M4 i M6 statistički značajna razlika u količini ukupnih fenolnih spojeva uočena je nakon 14. dana maceracije u odnosu na 7. dan, dok se za uzorak M5 količina ukupnih fenolnih spojeva statistički ne razlikuje tijekom vremena (slika 13). Kod uzoraka s 55 %

etanola značajna razlika u količini ukupnih fenolnih spojeva postignuta je nakon 28. dana maceracije u odnosu na 7. dan (uzorci M8 i M9). U uzorku M7 koji sadrži najmanju količinu biljnog materijala tijekom maceracije, količina ukupnih fenolnih spojeva statistički se značajno ne mijenja (slika 14). Promjena količine ukupnih fenolnih spojeva tijekom maceracije u uzorcima sa 70 % etanola (M10, M11 i M12) pokazuje isti trend: značajna razlika postignuta je nakon 14 dana maceracije ($p < 0,001$) nakon čega dolazi do uspostavljanja ravnoteže (slika 15).

Statističkom analizom istraživanih parametara maceracije ($p < 0,05$) utvrđeno je da volumni udio etanola (25, 40, 55 i 70 %) nije značajno utjecao na prinos ekstrahiranih ukupnih fenolnih spojeva ($p = 0,828$) (slika 16). Suprotno utjecaju etanola, masena koncentracija biljnog materijala (20, 40 i 80 g L^{-1}) statistički je značajno utjecala na količinu ukupnih fenolnih spojeva ($p < 0,001$) (slika 17). Nadalje, međusobni utjecaj nezavisnih varijabli: volumnog udjela etanola (25, 40, 55 i 70 %) i koncentracije biljnog materijala (20, 40 i 80 g L^{-1}) na zavisnu varijablu: prinos ukupnih fenolnih spojeva (TPC) ispitan je dvosmjernom ANOVOM ($p < 0,05$). Kada se u obzir uzme masena koncentracija imele od 20 g L^{-1} i volumni udio etanola (25, 40, 55 i 70 %) statistički značajna razlika u prinosu ukupnih fenolnih spojeva postoji za sve uzorke ($p < 0,001$) (slika 18). Iznimka je uzorak s 55 % v/v etanola za koji statistički značajna razlika u TPC nije utvrđena u usporedbi s uzorcima s 40 % i 70 % v/v etanola. Za uzorke s 40 g L^{-1} imele jedino se TPC za uzorak s 25 % v/v etanola statistički razlikuje ($p < 0,001$) od ostalih uzoraka (slika 19). TPC se za uzorke s 80 g L^{-1} imele statistički razlikuje ($p < 0,001$) samo za uzorak s 55 % v/v etanola (slika 20). Što se tiče trajanja maceracije, neparametrijskim Kruskal Wallis testom utvrđena je statistički značajna razlika ($p = 0,023$) u prinosu ukupnih fenolnih spojeva za 7 i 14 dana u odnosu na 28 dana (slika 21) što je u skladu s drugim Fickovom zakonu difuzije prema kojem se dužim trajanjem maceracije povećava i prinos polifenola do uspostavljanja ravnoteže (Nayak i sur., 2015).

Ekstrakcijski postupak se tijekom maceracije zasniva na principima difuzije spojeva iz biljnog materijala u ekstrakcijski medij (Vuleta i sur., 2012). Izbor samog ekstrakcijskog medija ovisi o fizikalnim i kemijskim svojstvima ciljanih spojeva. Polarna otapala kao što su voda, etanol, metanol te njihove smjese najprikladniji su ekstrakcijski mediji za izolaciju polifenola iz biljnog materijala (Vajić i sur., 2015; Cendrowski i sur., 2017). Prema istraživanjima, smjese vode i etanola najčešće se koristi za ekstrakciju polifenola, posebice onih u glikoziliranom obliku, pokazavši se učinkovitijima od jednokomponentnog sustava otapala (Jovanović i sur., 2017; Vajić i sur., 2015). U takvoj smjesi jedno otapalo može povećati topljivost polifenolnih

spojeva dok drugo utječe na desorpciju (Mustafa i Turner, 2011). Nadalje, mala količina vode u dvokomponentnim sustavima ima značajan utjecaj jer povećava polarnost medija, a pucanjem vodikovih veza olakšava se ekstrakcija polifenola (Uma i sur., 2010). Iako raznoliki i ponekad oprečni, rezultati studija potvrđuju da na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva vodeno-etanolnim otopinama uvelike utječe biljni materijal i uvjeti ekstrakcije te da previsoke ili preniske koncentracije etanola u vodi ne pogoduju istodobnoj ekstrakciji svih fenolnih spojeva. Tako su se vodeno-etanolne otopine koje sadrže 50 % etanola pokazale najučinkovitijima u ekstrakciji ukupnih fenola, flavonoida i antocijana iz komine borovnice (Bamba i sur., 2018), aronije (Ćujić i sur., 2016) i kadulje (Dent i sur., 2013). Suprotno tome, Safdar i sur. (2017) navode značajno bolju ekstrakciju ukupnih fenola iz mandarine s 80 % etanolom u usporedbi s 50 % i 100 % etanolom, dok su Wang i sur. (2018) pokazali da je raspon od 60-70 % etanola najprikladniji za ekstrakciju polifenola iz lišća borovnice. Etanol smanjuje dielektričnu konstantu vodenog otapala, čime se povećava difuzija molekula, ali previsoke koncentracije etanola mogu dehidrirati biljne stanice, čime se spriječava difuzija fenolnih spojeva iz biljnog materijala u otapalo (Librán i sur., 2013). Osim što je prikladno otapalo za ekstrakciju polifenola, prednosti etanola pred drugim organskim otapalima su sigurnost upotrebe u prehrambenim i farmaceutskim proizvodima, biorazgradivost, dostupnost u visoko pročišćenom obliku i niska cijena (Chemat i sur., 2017). Polifenolni spojevi se iz biljnog materijala, kao i svi ostali spojevi, brže ekstrahiraju na početku maceracije zbog velike razlike u koncentraciji polifenola u biljnom materijalu u odnosu na onu u vodeno-alkoholnoj bazi. Difuzijom polifenola iz biljnog materijala u vodeno-alkoholnu bazu, njihova koncentracija se u otopini s vremenom povećava, čime raste i viskoznost ekstrakcijskog medija što uzrokuje smanjenje brzine difuzije (Jovanović i sur., 2017). Nakon određenog vremena maceracije dolazi do postizanja ravnoteže u koncentraciji polifenola unutar i izvan biljnog materijala čime ekstrakcija prestaje (Zhang i sur., 2018). Tako su rezultati ovog istraživanja pokazali da se kod uzoraka s niskom koncentracijom bilja (20 g L^{-1}), koncentracija fenola ustaljuje već tijekom 7 dana maceracije. Kod uzoraka s većom koncentracijom bilja (40 g L^{-1}) i većim udjelom etanola u vodeno-alkoholnoj otopini (40, 55 i 70 % v/v) vrijeme maceracije je dulje te je uočen značajan i konstantan porast koncentracije fenola tijekom 14 dana maceracije. Nakon 21 dana kod većine uzoraka dolazi do ustaljenja ukupne koncentracije fenola. Upotrebom većeg volumena otapala povećava se omjera čvrsto/tekuće što dovodi do povećanja prinosa polifenola jer se sprječava zasićenje ekstrakcijskog medija (Ćujić i sur., 2016). S druge strane, upotreba veće količine biljnog

materijala dovodi do povećanja viskoznosti ekstrakcijskog medija čime se smanjuje brzina difuzije (Vuleta i sur., 2012).

Slično ovom, Rodríguez-Solana i sur. (2016b) istražili su utjecaj volumnog udjela etanola u vinskom destilatu (40, 55 i 70 %), masene koncentracije biljnog materijala (10, 25 i 40 g L^{-1}) te trajanja maceracije (1, 3 i 5 tjedana) na ukupne fenolne spojeve. Nadalje, macerirani su različiti dijelovi biljaka koje se koriste u proizvodnji biljnih likera i travarica: cvijet kamilice (*Matricaria recutita* L.), sjemenke korijandera (*Coriandrum sativum* L.), korijen sladića (*Glycyrrhiza Glabra* L.) i listovi eukaliptusa (*Eucalyptus globulus* Labill.). Kao optimalni parametri maceracije odabranog bilja u vinskom destilatu pokazali su se volumni udio etanola 70 %, masena koncentracija bilja 40 g L^{-1} te vrijeme između 2 i 3 tjedna. Iznimka je bio korijen sladića za koji se kao optimalni udio etanola pokazao 53,12 %. U usporedbi s volumnim udjelom etanola i vremenom maceracije, najveći utjecaj na ispitivane parametre imala je koncentracija bilja što je u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu. Maceracija u trajanju od 3 tjedna u 45 % v/v destilatu smokve pokazala se optimalnom i kod maceracije rogača s ciljem proizvodnje likera (Rodriguez-Solana i sur., 2019a). Maceracija u 70 % etanolu 40 g L^{-1} bilja tijekom 72 sata također se pokazala kao najprikladnija metoda za pripremu ekstrakta lista biljke *Moringa oleifera* (Vongsak i sur., 2013). Hanousek Čiča i sur. (2020) pokazali su da su optimalni uvjeti maceracije mahuna rogača za dobivanje aromatičnog macerata bogatog biološki aktivnim spojevima udio etanola 50 %, omjer čvrsto/tekuće 1:5 i trajanje maceracije 6-8 tjedana u tami. Hanousek Čiča i sur. (2020) istražili su utjecaj parametara maceracije na fizikalno-kemijske i kromatske karakteristike macerata rogača (*Ceratonia siliqua* L.) – rogač je maceriran u vodeno-alkoholnim bazama s 30, 50 i 70 % v/v etanola, pri sobnoj temperaturi, na suncu i tami, s različitim koncentracijama bilja (omjer rogača i vodeno-etanolne baze 1:5 i 1:10). Maceracija rogača u tami pri 50 % v/v etanola rezultirala je najvećim prinosom ukupnih fenola u maceratima. Maceracija rogača u tami rezultirala je oko 20-40 % većim sadržajem fenolnih spojeva u odnosu na maceraciju rogača provedenu na sunčevoj svjetlosti. Na stabilnost fenolnih spojeva utječu brojni čimbenici poput svjetlosti, temperature, prisutnosti kisika ili pH vrijednosti. Razgradnja fenolnih spojeva posebno je izražena na višim temperaturama i u prisutnosti svjetla, a upravo su to uvjeti pri kojima se travarice i likeri proizvode u domaćoj radinosti. Naime, takva se pića na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima proizvode od dostupnih sirovina prema tradicionalnim recepturama prema kojima se maceracija bilja i/ili voća provodi u staklenim posudama izloženim sunčevoj svjetlosti, najvjerojatnije zbog brže ekstrakcije pri višim

temperaturama. U skladu s rezultatima istraživanja Hanousek Čiča i sur. (2020), treba naglasiti da takve uvjete treba izbjegavati zbog osjetljivosti i razgradnje fenolnih spojeva te posljedično očuvanju antioksidacijskog potencijala dobivenog pića. Sukladno tome, u ovome radu maceracija imele provedena je u tami. Senica i Mikulić-Petkovšek (2020) proveli su slično istraživanje gdje je cilj bio ekstrahirati maksimalnu moguću količinu ukupnih fenola iz 8 različitih biljaka (pelin, limun, paprena metvica, ruta, kadulja, kičica, komorač te kumin) maceracijom u 40 % v/v etanola. U maceratima rute, kadulje i pelina najveći sadržaj fenola postignut je nakon 7 dana maceracije, u maceratima paprene metvice, kadulje i komorača nakon 14 dana te kima i kičice nakon 21 dan maceracije. Najveći sadržaj fenolnih spojeva utvrđen je u maceratu kima nakon 3 tjedna maceracije (58,04 mg g^{-1}), a najmanji u maceratu rute nakon 28 dana maceracije (1,26 mg g^{-1}). U radu Cendrowski i sur. (2017) s ciljem proizvodnje likera od ruže, istražen je utjecaj parametara maceracije ružinih latica (*Rosa rugosa*) na kvalitativan i kvantitativan sastav fenolnih spojeva u dobivenim maceratima. Ružine latice macerirane su tijekom 18 dana u vodeno-alkoholnoj bazi s 40 i 65 % v/v etanola, uz ili bez dodatka limunske kiseline (0,8 g 100 mL^{-1}). Rezultati su pokazali da je tijekom maceracije ekstrahirano od 72 do 96 % prethodno određene koncentracije ukupnih fenolnih spojeva u ružinim laticama. Za razliku od volumnog udjela etanola, zakiseljavanje vodeno-etanolne baze limunskom kiselinom tijekom maceracije dovelo je do učinkovitije ekstrakcije polifenolnih spojeva iz latica ruže.

Tradicionalna maceracija, tijekom koje se za učinkovitu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva bilja koriste lako dostupne i potpuno biorazgradive vodeno-alkoholne baze, pogodna je za upotrebu u prehrambenoj industriji. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je najveći prinos fenolnih spojeva ostvaren maceracijom 80 g L^{-1} imele u 55 % vodeno-etanolnoj otopini tijekom 3 tjedna. No, kao što pokazuju navedena istraživanja za svaku biljnu vrstu treba provesti istraživanje utjecaja procesnih parametara maceracije na prinos fenolnih spojeva i/ili drugih spojeva koji mogu utjecati na kvalitetu i sigurnost konačnog proizvoda. Osim toga, na učinkovitost ekstrakcije fenolnih spojeva iz biljnog materijala utječu i temperatura, pH medija, različiti enzimi te svjetlost (Hanousek Čiča i sur., 2020; Coelho i sur., 2019; Rodriguez-Solana i sur., 2016b) te bi se i ti parametri trebali uzeti u obzir.

5.2. FITOKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA

5.2.1. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC)

Nakon provedene maceracije u dobivenim maceratima imele određen je konačan sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) (slika 22). Dobiveni rezultati potvrđuju da tijekom maceracije dolazi do ekstrakcije polifenola iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu (Mrvčić i sur., 2012). Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju, masena koncentracija bilja statistički je značajno utjecala na količinu ukupnih fenolnih spojeva. Porastom masene koncentracije bilja u vodeno-alkoholnoj bazi raste i sadržaj ukupnih fenolnih spojeva – macerati s 20 g L^{-1} bilja (M1, M4, M7 i M10) imaju najniže a uzorci s 80 g L^{-1} (M3, M6, M9 i M12) bilja imaju najviše koncentracije ukupnih fenolnih spojeva. Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva kreće se od 146,16 do 774,31 mg GAE L^{-1}. Iako udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi statistički nije značajno utjecao na količinu ekstrahiranih fenolnih spojeva, razlika u TPC u konačnim maceratima postoji. Kada se usporede uzorci s istom masenom koncentracijom bilja može se vidjeti da porastom volumnog udjela etanola raste i TPC. Razlog tome je polarnost otapala tj. vodeno alkoholne smjese – do učinkovitije ekstrakcije fenolnih spojeva dolazi u otapalima koja su manje polarna nego voda (Haminiuk i sur., 2012) iako mala količina vode povoljno utječe na njihovu ekstrakciju. Najveća konačna količina TPC (774,31 mg GAE L^{-1}) izmjerena je u maceratu M9 kojeg karakterizira volumni udio etanola 55 % i najveća masena koncentracija bilja (80 g L^{-1}). Ovaj rezultat posljedica je velike količine maceriranog bilja ali i omjera etanola i vode od skoro 1:1. Većinu destilata koji se u proizvodnji travarica i likera koriste kao vodeno-alkoholne baze karakterizira volumni udio etanola 40-50 %.

Prema literaturi, kada se usporede ekstrakti dobiveni od različitih dijelova imele najveći sadržaj fenolnih spojeva utvrđen je u ekstraktima listova, zatim grančica, te sjemenki i bobica. Značajne razlike u sadržaju ukupnih fenolnih spojeva utvrđene su za 70 % v/v etanolne ekstrakte listova i grančica imele koja je rasla na različitim vrstama stabla domaćina (Vicas i sur., 2011). Najveći TPC pokazao je ekstrakt lišća imele rasle na bagremu (*Robinia pseudoacacia)* 65,30 mg GAE g^{-1} svježe tvari, a najmanji ekstrakt grančica imele rasle na klenu (*Acer campreste*) 23,86 mg GAE g^{-1} svježe tvari. Za razliku od etanolnih ekstrakata, metanolni ekstrakti (80 % v/v) listova i grančica imele *Viscum album* subsp. *album* s različitih stabala sadrže sličnu količinu ukupnih fenolnih spojeva (30,56–38,73 mg GAE g^{-1} suhe tvari). Po najvećem sadržaju TPC ističe se ekstrakt imele *Viscum album* subsp. *abietis* ubrane s

obične jele (*Abies alba* Mill.), 56,75 mg GAE g^{-1} suhe tvari (Pietrzak i Nowak, 2021). Sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u 80 % metanolnim ekstraktima bobica imele kreće se u rasponu od 4,78 mg GAE g^{-1} svježe tvari za imelu ubranu s divlje lipe (*Tilia cordata* Mill.) do 10,43 mg GAE g^{-1} svježe tvari za imelu s crne topole (*Populus nigra* „Italica" L.) (Pietrzak i sur., 2017), dok je nešto veći TPC utvrđen u bobicama imele s običnog bora (17,17 mg GAE g^{-1} svježe tvari) (Stefanucci i sur., 2020).

Budući da su flavonoidi velika skupina fenolnih spojeva, u skladu s rastom TPC u maceratima očekivano raste i sadržaj ukupnih flavonoida (TFC). Prema rezultatima na slici 22 koncentracije ukupnih flavonoida u maceratima variraju između 35,59 i 425,98 mg RE L^{-1}. Najniža koncentracija flavonoida izmjerena je u uzorku M1, a najviša u uzorku M12. Također, porastom volumnog udjela etanola u vodeno-alkoholnoj bazi dolazi do rasta ukupnih flavonoida u maceratima. Za razliku od ukupnih fenola, kod kojih su više vrijednosti ostvarene primjenom 55 %-tnih vodenih otopina etanola više vrijednosti ukupnih flavonoida ostvarene su primjenom 70 %-tnih vodenih otopina etanola. Prema Sun i sur. (2015), pri nižim koncentracijama etanola poput 25 % v/v, dolazi do ekstrakcije polarnih tvari iz bilja zbog povećanog udjela vode, a povećanjem koncentracije etanola smanjuje se polarnost otapala čime se pospješuje ekstrakcija manje polarnih tvari. Većina flavonoida iz imele poput kaempferola, kvercetina, rutina, sakuranetina, homoeriodiktiola, naringenina, viskolina, ramnazina i izoramnetina (Urech i Baumgartner, 2015) slabo su polarni te posljedično slabije topljivi u vodi. Kada se usporede čisti vodeni i čisti etanolni ekstrakti imele, etanolni sadrže veće koncentracije ukupnih flavonoida od vodenih ekstrakata (Garcia-Garcia i sur., 2021). Povećanjem koncentracije etanola u vodeno-alkoholnoj bazi poboljšava se topljivost flavonoida i njihova ekstrakcija. Sukladno tome, uzorci sa 70 % v/v etanola imaju najveće vrijednosti TFC. Takve rezultate potvrđuju i Cosmulescu i sur. (2014) gdje najveću koncentraciju ukupnih flavonoida u orahovom likeru imaju macerati sa 70 % v/v etanola. Isti autori navode da se koncentracija flavonoida može dodatno povećati dodatkom šećera i meda u macerate. U većini receptura za pripremu biske dodaje se med, čime se ona dodatno obogaćuje flavonoidima i poboljšavaju joj se funkcionalna svojstva (Hanousek Čiča i sur., 2019). Prema Holandino i sur. (2020) najveći sadržaj ukupnih flavonoida (TFC) utvrđen je 80 % etanolnom ekstraktu listova i grančica imele rasle na stablu hrasta (*Quercus robur*), 9,67 mg g^{-1} svježe tvari, zatim na stablu jabuke (*Malus domestica*), 6,30 mg g^{-1} svježe tvari i brijesta (*Ulmus carpinifolia*), 4,67 mg g^{-1} svježe tvari. Pietrzak i sur. (2017; 2021) utvrdili su da se sadržaj flavonoida u metanolnim ekstraktima listova i grančica *V. album* s različitih

vrsta stabla domaćina kretao od 10,11 do 16,90 mg GAE g^{-1} suhe tvari, dok se za bobice kretao od 0,286 do 0,428 mg GAE g^{-1} suhe tvari. Najveći TFC, 16,90 mg Q g^{-1} suhe tvari izmjeren je u imeli rasloj na običnom boru (*Pinus sylvestris* L.).

Za usporedbu, u 34 prikupljena komercijalna uzorka biske, 10 industrijskih i 24 iz domaće radinosti također je određen sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) (slika 23). Dobiveni rezultati pokazuju da se prikupljeni uzorci biske razlikuju prema sadržaju ukupnih fenolnih spojeva, ali da između industrijskih uzoraka i uzoraka iz domaće radinosti ne postoji statistički značajna razlika ($p = 0,541$) u sadržaju fenolnih spojeva. Sadržaj fenolnih spojeva u uzorcima kretao se od 25,51 do 790,98 mg GAE L^{-1}, s prosječnom vrijednošću od 293,26 mg GAE L^{-1}. Najveći TPC izmjeren je u industrijski dobivenim uzorcima biske B24 (790,98 mg GAE L^{-1}) te B20 (764,76 mg GAE L^{-1}). Od uzoraka iz domaće radinosti najveći TPC izmjeren je u uzorcima B17 (642,81 mg GAE L^{-1}) i B18 (639,76 mg GAE L^{-1}), a zatim u uzorku B6 (545,37 mg GAE L^{-1}). Najmanji TPC izmjeren je u uzorku B22 (25,51 mg GAE L^{-1}) te zatim u uzorku B8 (49,02 mg GAE L^{-1}) koji su industrijski proizvedeni, dok je najmanji TPC u uzorcima iz domaće radinosti izmjeren u uzorku B7 (55,12 mg GAE L^{-1}). Velike razlike u sadržaju ukupnih fenolnih spojeva pripisuju se razlikama u proizvodnom procesu: podrijetlo, količina i sastav bilja, volumni udio etanola u vodeno-alkoholnoj bazi/destilatu, temperatura pri kojoj se provodi maceracija te dodatak šećera ili meda tijekom maceracije. Naime, proizvođači proizvode bisku prema različitim recepturama koje većinom nisu poznate. Uz imelu kao osnovnu biljku, tijekom maceracije često se dodaju i druge aromatične i začinske biljke, dok se kao vodeno-alkoholna baza koriste neutralni destilati, najčešće rakija komovica koja također može biti iz domaće radinosti. Nadalje, u macerat se može dodati i med. Od svih prikupljenih uzoraka biske jedino su za industrijski dobivene uzorke B8, B9, B10, B13 i B14 na temelju deklaracije poznate korištene sirovine. Uzorci B8 i B13 proizvedeni su maceracijom lišća imele u komovici, dok je za uzorak B10 kao vodeno-alkoholna baza korišten vinski destilat. Uzorci B9 i B14 dobiveni su maceracijom imele u etanolu poljoprivrednog porijekla te su sadržavali 38 i 36 % v/v etanola. Budući da fenolni spojevi potječu isključivo iz biljnog materijala koji se macerira u vodeno-alkoholnoj bazi/destilatu te zbog nedostatka informacija o proizvodnom procesu pretpostavlja se da je kod uzoraka s većim sadržajem ukupnih fenolnih spojeva maceracija trajala duži vremenski period i/ili je provedena pod boljim uvjetima (temperatura, u vodeno-alkoholnoj bazi s većim udjelom etanola, itd.). Isto tako postoji mogućnost da su u tim uzorcima korištene i druge aromatične i začinske biljke i/ili med koji također sadrže polifenolne spojeve. Naime, proizvodnja travarica

karakteristična je za cijelu mediteransku regiju pa tako i za Dalmaciju, Primorje i Istru gdje postoji povoljna klima za rast raznolikog samoniklog i kultiviranog ljekovitog i aromatičnog bilja. Prema Luczaj i sur. (2019) regionalni mali proizvođači s 36 dalmatinskih i kvarnerskih otoka za proizvodnju travarica koriste 114 ljekovitih biljnih vrsta. Najčešće korištene vrste su *Foeniculum vulgare*, *Myrtus communis* L., *Salvia officinalis* L., *Ruta graveolens* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Ceratonia siliqua* L., *Juglans regia* L., *Citrus* spp., *Ficus carica* L., *Laurus nobilis* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Artemisia absinthium* L., *Rosa centifolia* L. i *Mentha piperita* L. Na temelju dobivenih rezultata, raspon ukupnih fenolnih spojeva u komercijalnim uzorcima biske sličan je ostalim travaricama proizvedenim od različitog bilja. Tako travarice dobivene maceracijom jedne vrste bilja kao što je *Thymus vulgaris*, *Mentha piperita, Salvia officinalis*, *Satureja montana, Foeniculum vulgare, Matricaria chamomilla, Melissa officinalis*, itd sadrže TPC u rasponu od 72 do 658 mg GAE L^{-1} (Issa-Issa i sur., 2019). U radu Andreou i sur. (2018) TPC u 16 različitih travarica kretao se u rasponu od 26,80 to 4569,33 mg GAE L^{-1}. Veći sadržaj fenolnih spojeva utvrđen je u travaricama dobivenim maceracijom cimeta (*Cinnamomum burmannii)*, 1300,44 mg GAE L^{-1}; klinčića (*Syzygium aromaticum* L.), 4569,33 mg GAE L^{-1}; eukaliptusa (*Eucalyptus globulus* Labill.), 2153,60 mg GAE L^{-1}; jasmina (*Jasminum officinale* L.), 3490,44 mg GAE L^{-1} te limunovca (*Lippia citriodora* Kunth.), 1482,33 mg GAE L^{-1}, dok je najmanji TPC utvrđen u travarici dobivenoj maceracijom sjemenki pasjeg trna (*Hippophae rhamnoides* L.), 26,80 mg GAE L^{-1}. Ostala alkoholna pića poput vina (Gorjanović i sur. 2010a), piva (Gorjanović i sur. 2010b), destilata odležavanih u bačvama te voćnih i biljnih likera (Alamprese i sur., 2005; Lee i sur., 2005; Mrvčić i sur., 2012; Rodriguez-Solana i sur., 2021) također sadrže značajnu količinu ukupnih fenolnih spojeva (TPC): bijelo i crno vino, te razna piva u rasponu od 8,4–1031, 155–2314, 125-544 mg GAE L^{-1}, voćna vina i likeri, *nocino* liker i korejski liker od lotosa, te liker od metvice u rasponu od 91-1820, 239-3884, 1063 odnosno 10,49-446,80 mg GAE L^{-1}. Mrvčić i sur. (2012) usporedili su sadržaj fenolnih spojeva među različitim kategorijama jakih alkoholnih pića s hrvatskog tržišta i zaključili da jaka alkoholna pića koja su odležavala u drvenim bačvama, poput vinjaka i šljivovice, sadrže TPC u rasponu od 40-90 mg GAE L^{-1} dok likeri od oraha ili višanja sadrže daleko najveći TPC, u rasponu od 680-3360 mg GAE L^{-1}. Petrović i sur. (2019) odredili su sadržaj ukupnih fenolnih spojeva u nekoliko komercijalnih gorkih likera i travarica prisutnih na tržištu Republike Srbije u rasponu od 249 mg GAE L^{-1} za *Gorki list* do 1365 mg GAE L^{-1} za *Underberg*, dok su *Jagermeister, Bitter 54* i *Bitter 55* sadržavali od 500 do 700 mg GAE L^{-1}. *Bitter 54* proizveden od ekstrakata 54 biljne vrste sadrži 321,1 mg RE L^{-1} ukupnih flavonoida (Karabegović i sur., 2012) dok liker od metvice sadrži 107,15

mg RE L^{-1} (Rodriguez-Soalana i sur., 2021). Sadržaj fenolnih spojeva u biljkama ovisi o vrsti i dijelu biljke koji se koristi, o uvjetima uzgoja te prerade, dok učinkovitost njihove ekstrakcije iz biljnog materijala te posljedično njihov sadržaj u travaricama i biljnim likerima dodatno ovisi o uvjetima maceracije. Ljekovito, aromatično i začinsko bilje izvor je biološki aktivnih spojeva te aroma spojeva kojima se destilati tijekom maceracije obogaćuju. Na taj način nastaju proizvodi dodane vrijednosti koji osim poboljšanih organoleptičkih svojstava iskazuju i određena funkcionalna svojstva.

5.2.2. Identifikacija i sadržaj pojedinih fenolnih spojeva

Brojna znanstvena istraživanja dokazala su da na kvalitativan i kvantitativan polifenolni sastav imele i njezinih ekstrakata utječu različiti čimbenici: vrsta stabla domaćina (Luczkiewicz i sur., 2001; Nazaruk i Orlikowski, 2016; Kleszken i sur., 2022), korišteni dio imele (lišće, grančice, sjemenke) (Stefanucci i sur., 2020), period sakupljanja (Urech i sur., 2006), lokacija rasta i sakupljanja (Zhao i Liu, 2012; Pietrzak i Nowak, 2021), vrsta otapala i metode ekstrakcije (Ko i sur., 2016). Tijekom maceracije polifenolni spojevi ekstrahiraju se iz biljnog materijala u vodeno-alkoholnu bazu te su dobiveni macerati, kemijski gledano, zapravo vodeno-alkoholni ekstrakti imele bogati polifenolnim spojevima. Budući da je prethodno utvrđeno da je masena koncentracija biljnog materijala statistički značajno utjecala na prinos ukupnih fenolnih spojeva u dobivenim maceratima te da su najveće vrijednosti TPC i TFC utvrđene u maceratima s najvišom koncentracijom imele (80 g L^{-1}), polifenolni profil macerata M3, M6, M9 i M12 određena je primjenom ultra visoko djelotvorne tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa (UPLC-ESI-MS^2). Polifenolni profil tj. identifkacija i koncentracija pojedinih polifenolnih spojeva u odabranim maceratima i komercijalnim uzorcima biske (B17, B18, B22, B25, B30 i B34) kao i parametri masene spektrometrije prikazani su u tablici 8. U analiziranim uzorcima identificirana su 43 fenolna spoja od kojih 12 fenolnih kiselina (6 hidroksibenzojevih i 6 hidroksicimetnih kiselina), 18 flavonola, 4 flavona, 4 flavanola, 1 flavanon, 1 izoflavon te 3 kumarina. Identifikacija spojeva provedena je na temelju kromatografskog razdvajanja i usporedbe vremena zadržavanja na koloni (Rt) s vremenom zadržavanja analitičkih standarda te usporedbom spektra masa tj. usporedbom njihovih karakterističnih prekursor i fragment iona (m/z). Za spojeve koji nisu imali referentne analitičke standarde kojima bi potvrdili identifikaciju, identifikacija je provedena na temelju spektra masa tj. usporedbom njihovih prekursor i fragment iona s

literaturnim podacima. Nakon identifikacije, pojedini spojevi su kvantificirani te im je koncentracija u uzorcima izražena u mg/mL.

Polifenolni spojevi koji su identificirani u uzorcima prema kemijskoj strukturi pripadaju sljedećim skupinama:

- Fenolne kiseline (12)
    1. Hidroksibenzojeve kiseline (6): protokatehinska, kvininska, gentizinska, siringinska, galna i *p*-hidroksibenzojeva kiselina
    2. Hidroksicimetne kiseline (6): klorogena, cimetna, *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kafeinska kiselina
- Flavonoidi (28)
    1. Flavonoli (18): kaempferol, kaempferol-3-O-glukozid, kaempferol-ramnozid, kaempferol-pentozid, kaempferol-3-O-rutinozid, kaempferol-pentozil-heksozid, kaempferol-3-O-ramnozil-heksozid, kvercetin, kvercetin-pentozid, kvercetin-acetil-heksozid, kvercetin-3-O-ramnozid, kvercetin-pentozil-heksozid, kvercetin-3-O-rutinozid, kvercetin-acetil-rutinozid, miricetin, rutin, izoramnetin i izoramnetin-3-O-rutinozid
    2. Flavanoli (4): epikatehin, katehin, epikatehin galat i epigalokatehin galat
    3. Flavoni (4): luteolin, krizoeriol, apigenin i apigenin-7-O-glukozid
    4. Flavanon (1): naringenin
    5. Izoflavon (1): genistein
- Kumarini (3): skopoletin, umbeliferon i eskuletin.

Spoj **12** identificiran je kao kvininska kiselina na temelju karakterističnog fragment iona m/z 191 ([kvininska kiselina-H]$^-$) (Ruan i sur., 2019). Od svih fenolnih spojeva ova hidroksibenzojeva kiselina prisutna u koncentracijskom rasponu od 145,33 do 375,42 mg L^{-1} najzastupljenija je u svim maceratima. Zbog polarnog karaktera u maceratima s 25 i 40 % etanola prisutna je u najvećoj koncentraciji, čak za 50 % većoj nego u maceratima s 55 i 70 % etanola. Prisutnost kvininske kiseline također je potvrđena u 80 % v/v etanolnom ekstraktu *Viscum album* (Holandino i sur., 2020) i alkoholnom ekstraktu *Viscum schimperi* (Abdallah i sur., 2015). Derivat kvininske kiseline identificiran je i u metanolnom ekstraktu bobica, listova i sjemenki imele (*Viscum album*) ubrane s običnog bora (Stefanucci i sur., 2020). Od hidroksicimetnih kiselina u značajnoj koncentraciji u uzorcima su prisutni spojevi **41** i **42**, identificirani kao sinapinska i kafeinska kiselina. Sinapinsku kiselinu karakterizira fragment

ion m/z 223 te najveća izmjerena koncentracija u maceratu M3 (8,34 mg mL^{-1}) s 25 % v/v etanola a zatim u M6 (4,93 mg mL^{-1}) s 40 % v/v etanola. Porastom volumnog udjela etanola u maceratima njena koncentracija se smanjuje. Kafeinska kiselina identificirana je na temelju fragmenata specifičnih za kafeoil jedinicu s fragment ionima m/z 179 ([kafeoil-H]$^-$) i m/z 135 ([kafeoil-H-CO_2]$^-$) (Ruan i sur., 2019). Koncentracije ove hidroksicimetne kiseline približno su jednake u svim uzorcima macerata te se kreću u rasponu od 5,27 do 6,53 mg mL^{-1}. Nadalje, spoj **39** identificiran kao *p*-hidroksibenzojeva kiselina s prekursor ionom m/z 137 i fragment ionom m/z 93 (Ali i sur., 2021) prisutan je u značajno većoj koncentraciji u maceratu M6 (10,07 mg mL^{-1}) u odnosu na ostale macerate (0,64-2,02 mg mL^{-1}). Klorogenska kiselina (spoj **6**) kao spoj karakterističan za europsku imelu identificirana je na temelju deprotoniranog prekursor iona m/z 353 (ANSM, 2012). Prisutnost klorogenske kiseline potvrđena je i u etanolnom ekstraktu *V. album* u istraživanjima Luczkiewicz i sur. (2001), de Oliveira Melo i sur. (2018) te Holandino i sur. (2020). Spojeve **1** (protokatehinska kiselina), **13** (gentizinska kiselina), **14** (cimetna kiselina), **19** (*p*-kumarinska kiselina) i **34** (galna kiselina) karakteriziraju fragment ioni m/z 109, 109, 103, 119 i 125 nastali odcjepljenjem CO_2 jedinice (-44 Da) s prekursor iona. Ovaj obrazac fragmentacije specifičan je za većinu identificiranih fenolnih kiselina u analiziranim uzorcima. Za protokatehinsku i gentizinsku kiselinu najmanje koncentracije su izmjerene u maceratu M3 s 25 % v/v etanola (0,64 i 0,27 mg mL^{-1}) te porastom volumnog udjela etanola raste i njihova koncentracija u maceratima. Spojeve **32** i **33** karakteriziraju fragment ioni m/z 182 i 178 koji su nastali gubitkom metilne skupine tijekom fragmentacije prekursor iona te su na temelju toga identificirani kao siringinska i ferulinska kiselina. Najveća koncentracija siringinske kiseline izmjerena je u maceratu M3 (0,29 mg mL^{-1}), a ferulinske kiseline u maceratu M9 (0,85 mg mL^{-1}).

Osim fenolnih kiselina koje su prema sadržaju u uzorcima bile najzastupljenije, najviše spojeva identificirano je iz skupine flavonoida, ukupno 28. Flavonoidi čine najveću skupinu niskomolekularnih polifenolnih spojeva (više od 6000) koji se akumuliraju u staničnim stijenkama biljaka. Razlike između pojedinih flavonoidnih podskupina proizlaze iz varijacija u broju i rasporedu hidroksilnih skupina, kao i iz prirode i stupnja njihove alkilacije i/ili glikozidacije. Najčešće se javljaju flavoni i flavonoli s hidroksilnim skupinama u položajima 3'- i 4'- u prstenu B, a rjeđe oni s hidroksilnom grupom samo u položaju 4'-. Flavonoidi se u biljkama mogu nalaziti u obliku aglikona ali u većini slučajeva su glikozilirani tj. na aglikonsku strukturu vezane su šećerne jedinice (D-glukoza, D-galaktoza, L-ramnnoza, L-arabinoza, D-ksiloza, D-galakturonska kiselina i disaharid rutinoza (glukoza + ramnoza)).

Glikozilacija se kod flavonoida najčešće javlja u položaju 3'-, a manje u položaju 7'- (Kazazić, 2004; Vuolo i sur., 2019). U analiziranim maceratima najviše identificiranih flavonoidnih spojeva pripada podskupini flavonola, zatim flavanola i flavona. Flavanoni i flavoni često se nalaze zajedno, npr. u agrumima i povezani su sa specifičnim enzimima. Iako se flavoni i flavonoli međusobno isključuju u mnogim biljkama, ovdje to nije slučaj: uz 18 flavonola identificirana su i 4 flavona. Od flavonola dominiraju kaempferol i kvercetin te njihovi derivati što je u skladu s literaturnim podacima prema kojima su ovi spojevi detektirani u različitim podvrstama europske imele (Haas i sur., 2003; Kleszken i sur., 2022). Spoj **5** prisutan u najvećoj koncentraciji u maceratu M9 (3,22 mg mL^{-1}) identificiran je kao kaempferol (produkt ion m/z 285). Spojevi **2, 8, 18, 29, 30** i **36** identificirani su kao njegovi glikozidi na temelju istog specifičnog fragment iona m/z 287. Radi se o kaempferol-3-O-glukozidu, kaempferol-ramnozidu, kaempferol-pentozidu, kaempferol-3-O-rutinozidu, kaempferol-pentozil-heksozidu i kaempferol-3-O-ramnozil-heksozidu. Usporedba prekursor i fragmentnih iona ovih spojeva ukazuje na gubitak heksoze (-162 Da), pentoze (-132 Da) i/ili ramnoze (-146 Da) (Carocho i sur., 2014). Spoj **24** na temelju karakterističnog fragment iona m/z 151 identificiran je kao kvercetin, dok se za spojeve **4, 7, 15, 28, 31** i **35** pokazalo da su strukturno slični i da je riječ o derivatima kvercetina, a zajednička karakteristika im je da posjeduju zajednički fragmentni ion m/z 303. Na temelju fragmentacije i specifičnih gubitaka kemijskih jedinica identificirani su kao kvercetin-pentozid (gubitak pentoze -132 Da), kvercetin-acetil-heksozid (gubitak acetilne skupine -42 Da i heksoze -162 Da), kvercetin-3-O-ramnozid (gubitak ramnoze -146 Da), kvercetin-pentozil-heksozid (gubitak pentoze -132 Da i heksoze -162 Da) , kvercetin-3-O-rutinozid (gubitak ramnoze -146 Da i glukoze -162 Da) i kvercetin-acetil-rutinozid (gubitak acetilne skupine -42 Da, ramnoze -146 Da i glukoze -162 Da) (Pinheiro i Justino, 2012; Elez Garofulić i sur., 2020). Razlike u koncentraciji kvercetina i njegovih derivata između macerata gotovo da i nema budući da su zbog prisutnosti nekoliko hidroksilnih skupina dobro topljivi u svim vodeno-etanolnim bazama, za razliku od kaempferola i izoramnetina. Od ostalih spojeva iz skupine flavonola u maceratima je identificiran miricetin (spoj **9**), izoramnetin-3-O-rutinozid (spoj **26**), rutin (spoj **27**) i izoramnetin (spoj **38**). Miricetin i rutin identificirani su na temelju MS-MS spektra te usporedbom s analitičkim standardima. Izoramnetin je detektiran na temelju fragment iona m/z 300 koji je nastao nakon odcjepljenja metilne jedinice (-15 Da) (Ali i sur., 2021). Izoramnetin sadrži manje hidroksilnih skupina od npr. kvercetina te je bolje topljiv u etanolu nego u vodi što potvrđuju i dobiveni rezultati: s porastom volumnog udjela etanola raste i njegova koncentracija. U skladu s tim najveća koncentracija je izmjerena u maceratu M12

(0,54 mg mL^{-1}). Izoramnetin-3-O-rutinozid karakterizira prekurosr ion m/z 625 koji nakon fragmentacijskog gubitka ramnoze (-146 Da) i glukoze (-162 Da) daje fragment ion m/z 317. Spojevi iz podskupine flavanola, koji su u tablici 8 prikazani kao spojevi **3, 10, 11** i **20** identificirani su usporedbom s referentnim standardima kao epikatehin-galat, epikatehin, katehin i epigalokatehin-galat. Koncentracija identificiranih flavanola osim katehina najveća je u maceratu M3 s 25 % v/v etanola (0,31, 0,49 i 0,11 mg mL^{-1}) te porastom volumnog udjela etanola se smanjuje. Iz podskupine flavonona identificirani su luteolin (spoj **16**), krizoeriol (spoj **17**), apigenin (spoj **22**) i apigenin-7-O-glukozid (spoj **37**) na temelju MS-MS spektra i usporedbe s analitičkim standardima. Apigenin je u najvećoj koncentraciji prisutan u maceratu M9 (0,32 mg mL^{-1}). Spoj **40** je genistein koji pripada podskupini izoflavona te mu je najveća koncentracija izmjerena u maceratu M6 (0,71 mg mL^{-1}), a najmanja u M12 (0,19 mg mL^{-1}). Flavanon naringenin (spoj **21**) karakterizira specifični prekurosr ion m/z 271 dok je fragmentacijom prema Retro-Diels-Alder reakciji dobiven fragment ion m/z 151 (Zeng i sur., 2018).

Uz velik broj fenolnih kiselina i flavonoida, u uzorcima je potvrđena i prisutnost kumarina koji pripadaju podskupini hidroksikumarina. To su skopoletin (spoj **23**), umbeliferon (spoj **25**) i eskuletin (spoj **43**). Skopoletin karakterizira produkt ion m/z 191 te fragment ion m/z 151. Umbeliferon i eskuletin karakteriza fragment ion m/z 133 koji je u slučaju umbeliferona nastao fragmentacijom produkt iona m/z 161 i gubitkom CO (-28 Da) te u slučaju eskuletina gubitkom CO_2 (-44 Da) s produkt iona m/z 177 (Ammar i sur., 2015). Skopoletin i eskuletin su u svim maceratima prisutni u značajno većoj koncentraciji nego većina ostalih identificiranih fenolnih spojeva. Za skopoletin i umbeliferon karakteristična bolja topljivost u vodeno-alkoholnoj bazi s najmanjim udjelom etanola (M3, 5,92 i 0,27 mg mL^{-1}) te s porastom volumnog udjela etanola u maceratima njihova se koncentracija smanjuje, za razliku od eskuletina koji je bolje topljiv u vodeno-alkoholnoj bazi s većim udjelom etanola. Koncentracija eskuletina izmjerena u maceratu M12 iznosila je 4,84 mg mL^{-1}.

Za imelu korištenu u ovom radu nisu poznati faktori koji utječu na profil fenolnih spojeva npr. vrsta stabla domaćina, uvjeti rasta i vrijeme berbe, te su dobiveni rezultati u skladu su s literaturnim podacima. Pregled fenolnih spojeva prisutnih u različitim ekstraktima imele te ovisno o vrsti stabla domaćina dan je u radovima Pietrzak i Nowak (2021) i Kleszken i sur. (2022). Prema literaturi, najviše fenolnih spojeva identificiranih u imeli pripada skupini fenolnih kiselina: hidroksibenzojevih (galna i protokatehinska kiselina) i hidroksicimetnih kiselina (kafeinska, ferulinska i sinapinska kiselina) te skupini flavonoida uključujući

flavanone (naringenin, eriodiktiol), flavone (apigenin), flavonole (3-O-Met kvercetin, miricetin, kaempferol). Prema Vicas i sur. (2011), kvantitativnom HPLC analizom 70 % etanolnih ekstrakata listova i grančica imele ubrane s 5 različitih stabala (klen, bijeli jasen, crna topola, jabuka i bagrem) utvrđena je prisutnost 12 fenolnih kiselina, 2 flavonoida: kaempferola i kvercetina te ružmarinske kiseline. Ekstrakti listova imele bogatiji su fenolnim spojevima od ekstrakta grančica. Kvalitativno i kvantitativno fenolima najbogatiji ekstrakt bio je onaj dobiven od imele rasle na stablu bijelog jasena. Nadalje, u njemu je za razliku od drugih, utvrđena prisutnost *p*-kumarinske kiseline (1,82 μg g^{-1} suhe tvari). Galna kiselina u koncentraciji od 39,93 μg g^{-1} suhe tvari utvrđena je jedino u ekstraktu imele rasle na bagremu. Od svih fenolnih kiselina jedino su ferulinska i sinapinska kiselina utvrđene u svim ekstraktima te se može reći da nisu specifične za vrstu stabla domaćina. Gentizinska kiselina i naringenin, čija je prisutnost utvrđena u analiziranim maceratima imele i komercijalnim uzorcima biske, u tom radu nisu pronađeni. *O*-kumarinska kiselina karakteristična je za imelu raslu na stablu hrasta lužnjaka (*Quercus robur*), dok je digalna kiselina utvrđena samo u imeli rasloj na norveškom javoru (*Acer plantanoides*). Imele ubrane sa stabla jabuke (*Malus domestica*) i kruške (*Pyrus communis*) imaju sličan profil fenolnih kiselina, dok imela sa stabla planinske oskoruše (*Sorbus aucuparia*) sadrži značajne koncentracije salicilne i vanilinske kiseline (Luczkiewicz i sur., 2001).

Polifenolni profil odabranih komercijalnih uzoraka biske B17, B18, B25, B30 i B34 (uzorci iz domaće radinosti) te B22 (industrijski uzorak) određen je primjenom UPLC-ESI-MS^2 (tablica 8). Uzorci su izabrani na temelju volumnog udjela etanola od 40 i 25 % i sadržaja ukupnih fenolnih spojeva kako bi bili usporedivi s dobivenim maceratima s istim % etanola (v/v) (M3 i M6). Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da se komercijalni uzorci razlikuju prema sadržaju pojedinih fenolnih spojeva. Kvininska kiselina (**spoj 12**) karakteristična je za sve uzorke biske te je kao i u maceratima, prisutna u najvećoj koncentraciji u svim uzorcima. Uzorak B30 ističe se najvećom koncentracijom kvininske kiseline od 357,92 mg mL^{-1} dok je najmanja koncentracija izmjerena u B18 (18,60 mg mL^{-1}). Uzorak B30 sadrži oko 25 % v/v etanola te je koncentracija kvininske kiseline gotovo ista kao i u maceratu M3 (355,39 mg mL^{-1}). U industrijskom uzorku B22 kvininska kiselina prisutna je u koncentraciji od 251,82 mg mL^{-1}. Sve analizirane uzorke karakterizira visok sadržaj i drugih fenolnih kiselina. U svim uzorcima prisutne su u padajućem koncentracijskom nizu sinapinska (**spoj 41**) > kafeinska (**spoj 42**) > *p*-hidroksibenzojeva (**spoj 39**) > cimetna (**spoj 14**) > galna (**spoj 34**) > gentizinska (**spoj 13**) > protokatehinska (**spoj 1**) > ferulinska (**spoj 33**) > *p*-kumarinska (**spoj**

19) > siringinska **(spoj 32**) > klorogenska kiselina (**spoj 6**). Uzorak B30 se među uzorcima ističe i po najvećem sadržaju gentizinske i protokatehinske kiseline prisutnih u koncentracijama od 3,24 mg mL^{-1} i 3,06 mg mL^{-1}. Najveći sadržaj kafeinske i galne kiseline (14,05 mg mL^{-1} i 1,62 mg mL^{-1}) izmjeren je u uzorku B18, a sinapinske, ferulinske, siringinske i klorogenske kiseline (13,64, 1,36, 0,56 i 0,12 mg mL^{-1}) u uzorku B25. *p*-hidroksibenzojeva kiselina u najvećoj je koncentraciji prisutna u industrijski dobivenom uzorku B22, 3,21 mg mL^{-1} dok su cimetna i *p*-kumarinska kiselina u najvećoj je koncentraciji prisutne u B17 (1,52 i 0,98 mg mL^{-1}). U uzorku B34 od svih identificiranih fenolnih spojeva fenolne su kiseline prisutne u najvećoj koncentraciji i to kvininska, kafeinska i sinapinska kiselina (108,01, 8,20 i 5,87 mg mL^{-1}). Za razliku od fenolnih kiselina, flavonoidi su u svim uzorcima biske prisutni u nižim koncentracijama. Najveće su koncentracije izmjerene za flavanol katehin (**spoj 11**) – od 0,36 (B30) do 2,71 mg mL^{-1} (B18) te flavonol kaempferol (**spoj 5**) - od 0,71 (B25) do 2,31 mg mL^{-1} (B22). Od ostalih flavonoida u uzorcima značajne koncentracije su izmjerene za naringenin (**spoj 21**) u rasponu od 0,64 (B18, B30, B34) do 2,12 mg mL^{-1} (B25), apigenin-7-O-glukozid (**spoj 37**) u rasponu od 0,24 (B30) do 1,67 mg mL^{-1} (B25) te genistein (**spoj 40**) u rasponu od 0,23 (B18) do 1,41 mg mL^{-1} (B25). U uzorku B30 kojeg karakterizira 25 % v/v etanola izmjerene koncentracije pojedinih flavonoida (kaempferol-3-O-glukozid (**spoj 2**), kaempferol-ramnozid (**spoj 8**), miricetin (**spoj 9**), krizoeriol (**spoj 17**), naringenin **(spoj 21**), kvercetin-acetil-rutinozid (**spoj 35**) i apigenin-7-O-glukozid (**spoj 37**) su najmanje u odnosu na druge uzorke biske budući da su ti spojevi slabije topljivi u vodi nego u etanolu. Ostali flavonoli, većinom derivati kvercetina i kaempferola u uzorcima su prisutni u jako niskim koncentracijama. Komercijalne uzorke biske, kao i macerate, karakterizira visok sadržaj kumarina skopoletina (**spoj 23**) i eskuletina (**spoj 43**). Skopoletin je u uzorcima prisutan u rasponu od 1,61 do 8,79 mg mL^{-1} sa najvećim sadržajem u uzorku B25 dok je eskuletin prisutan u rasponu od 2,94 do 7,23 mg mL^{-1} sa najvećim sadržajem u uzorku B18. Navedene vrijednosti su slične kao za macerate s istim volumnim udjelom etanola, M3 i M6.

5.3. FUNKCIONALNA SVOJSTVA

Osim što konzumacija jakih alkoholnih pića predstavlja određeni užitak, travarice i biljni/voćni likeri također sadrže brojne bioaktivne spojeve koji potječu iz biljaka. Za mnoge

biljne vrste kroz povijest se pokazalo da pozitivno djeluju na ljudsko zdravlje pri čemu su učinci cijele biljke obično veći od učinka koji imaju određeni biološki aktivni spojevi pojedinačno, zbog mogućeg pojačanog sinergističkog djelovanja različitih spojeva (Caesar i Cech, 2019). Uzimajući u obzir da metabolizam alkohola dovodi do proizvodnje hidroksilnih radikala povezanih s potencijalnim oštećenjem jetre (Albano, 1996), prirodni antioksidansi prisutni u jakim alkoholnim pićima mogu biti od posebne važnosti. Destilati imaju zanemarivu količinu biološki aktivnih spojeva, ali se njihov sastav može oplemeniti sazrijevanjem u drvenim bačvama ili dodatkom bilja čime se povećavaju funkcionalna svojstva. Veliku su pozornost privukli fenolni spojevi koji se tijekom maceracije bilja ekstrahiraju u vodeno-alkoholnu bazu kao i njihov antioksidacijski potencijal (Mrvčić i sur., 2012; Andreou i sur., 2018; Issa-Issa i sur., 2019; Rodriguez-Solana i sur., 2016; 2019a; 2021; Hanousek Čiča i sur., 2020; Petrović i sur., 2019). Europska agencija za lijekove navodi tradicionalnu upotrebu etanolnih ekstrakata imele u liječenju kardiovaskularnih bolesti (EMA, 2020). Nadalje, prema Poruthukaren i sur. (2014) upotreba etanolnog ekstrakta imele tijekom 12 tjedana dovela je do smanjenja krvnog tlaka. Stoga, iako se alkoholna pića ne mogu klasificirati kao funkcionalna pića, može se smatrati da jaka alkoholna pića bogata fenolnim spojevima pokazuju određena funkcionalna svojstva.

5.3.1. Antioksidacijska aktivnost

Već dugi niz godina slobodni radikali i oksidacijski stres među najpopularnijim su temama znanstvenih istraživanja. Slobodni radikali su nestabilne i vrlo reaktivne kemijske čestice koje nastaju tijekom aerobnih metaboličkih procesa. Mnoge studije navode da je oksidacijski stres, stanje u kojem dolazi do reakcija između slobodnih radikala i bioloških molekula kao što su lipidi, proteini i DNA te njihovog oštećenja, povezan s nastankom degenerativnih i kroničnih bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, dijabetes melitus i karcinom (Cassidy i sur., 2020). Sprječavanje i kontrola oksidacijskog stresa igraju ključnu ulogu u mehanizmima nastanka ovih bolesti. Zbog toga je ispitivanje antioksidacijske aktivnosti različitih spojeva, a posebice onih prirodnog podrijetla u fokusu istraživačke zajednice već godinama. U potrazi za učinkovitim prirodnim antioksidansima najčešće se istražuju biljni ekstrakti bogati fitokemikalijama kao što su fenolni spojevi i eterična ulja (Clarke i sur., 2013). Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih

metala (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} i Mg^{2+}), aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004). Razlike u biološkoj aktivnosti pojedinih fenolnih spojeva povezuju se sa strukturnim razlikama između molekula, broju i položaju OH skupina i dvostrukih veza. Međutim, mehanizam djelovanja flavonoida u biološkim sustavima na molekulskoj razini nije u potpunosti razjašnjen zbog njihovih različitih kemijskih svojstava i strukturalne heterogenosti. Za određivanje antioksidacijskog potencijala biljnih ekstrakata razvijene su brojne *in vitro* kao što su određivanje sposobnosti hvatanja aktivnih vrsta kisika, neprirodnih radikala, npr. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilnih radikala (DPPH) i 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonatnih radikal-kationa ($ABTS^{+}$), enzimsko i neenzimsko mjerenje inhibicije lipidne peroksidacije, itd. (Kazazić, 2004).

Budući da su macerati imele zapravo vodeno-etanolni ekstrakti imele koji sadrže značajne količine fenolnih spojeva, u radu je određena njihova antioksidacijska aktivnost. Budući da pojedini antioksidansi ovisno o korištenoj metodi različito doprinose antioksidacijskoj aktivnosti, nijedan test ne može točno odražavati sve antioksidanse prisutne u biljnom ekstraktu. Zbog toga je antioksidacijska aktivnost macerata imele i prikupljenih komercijalnih uzoraka biske određena primjenom FRAP, DPPH i ABTS metode. Rezultati primijenjenih metoda su za macerate radi bolje usporedivosti svedeni na vrijednosti ukupnog antioksidacijskog indeksa (ACI) (tablica 9). Nadalje, kako su fenolni spojevi nositelji antioksidacijskog potencijala za svaku metodu utvrđen je i Pearsonov koeficijent korelacije između koncentracije fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti (tablica 10).

Metoda FRAP (eng. ferric reducing/antioxidant power) je jednostavni direktni test antioksidacijskog kapaciteta gdje se antioksidacijska aktivnost opisuje kao sposobnost antioksidansa da reduciraju žuti feril-tripiridil-s-triazin kompleks (Fe(III)–TPTZ) u plavi željezni kompleks (Fe(II)–TPTZ) pri niskom pH. Dobivene vrijednosti redukcijskog potencijala kreću se u rasponu od 0,69 do 5,79 mM Troloxa (tablica 10). Najbolji redukcijski potencijal pokazali su macerati M9 (5,79 mM Troloxa) i M12 (5,78 mM Troloxa) tj. uzorci koje karakterizira najveća masena koncentracija imele (80 g L^{-1}) dok je najmanji redukcijski potencijal pokazao macerat s 20 g L^{-1} imele macerirane u 25 % v/v etanolu (M1). Prema Vicas i sur. (2012) najveću antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom pokazali su metanolni ekstrakti lišća imele rasle na jabuci i jasenu te ekstrakti stabljike imele (0,14 i 0,13 mg ekvivalenta vitamina C g^{-1} svježe tvari).

DPPH metodom mjeri se sposobnost potencijalnih antioksidansa da djeluju kao donori vodika ili elektrona te na taj način stabiliziraju radikal (antiradikalna aktivnost). Antioksidacijske aktivnosti ispitivanih macerata DPPH metodom kreće se u rasponu od 4,37 do 63,19 %

inhibicije DPPH radikala. Najveći % inhibicije DPPH radikala pokazao je macerat M12 (63,9 %) kojeg karakterizira najveća masena koncentracija imele (80 g L^{-1}) i najveći volumni udio etanola (70 %). Najmanji % inhibicije pokazao je očekivano macerat M1 (4,37 %) budući da je pripremljen s najmanjom masenom koncentracijom imele (20 g L^{-1}). Za usporedbu standard 0,05 mM Trolox uzrokovao je 48,7 % inhibicje DPPH radikala. U radu Vicas i sur. (2012) % inhibicije DPPH radikala kretao se u rasponu od 2,2 za vodeni ekstrakt lišća imele rasle na stablu jabuke (*Mallus domestica*) do 11,49 % za vodeni ekstrakt lišća imele rasle na bagremu (*Robinia pseudoacacia)*. Više vrijednosti % inhibicije DPPH radikala pokazao je 98 %-tni etanolni ekstrakt: od 50,47 % za imelu raslu na javoru (*Acer campestre*) do 77,19 % za imelu raslu na jasenu (*Fraxinus excelsior*). Svi vodeni i etanolni ekstrakti grančica imele pokazali su nižu ili nikakvu antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte lišća. Slični rezultati su dobiveni i u istraživanju Onay-Ucar i sur. (2006). Nadalje u radu Papuc i sur., (2010) 60 %-tni etanolni ekstrakt imele pokazao je 7,2 % inhibicije DPPH radikala.

ABTS metoda također se zasniva na sposobnosti antioksidansa da stabilizira stabilni 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonatni radikal-kation ($ABTS^{+}$). Antioksidacijska aktivnost macerata izmjerena ABTS metodom kreće se u rasponu od 1,16 do 8,09 mM Troloxa s najvećom vrijednosti za macerat M12 i najmanjom za macerat M1. Za vodene i etanolne ekstrakte lišća i grančica imele u literaturi se navodi da imaju sposobnost stabilizacije $ABTS^{+}$ radikala (Vicas 2011; 2012). Vodeni ekstrakti imele pokazali su veće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti mjerene ovom metodom u odnosu na etanolne ekstrakte. Najveće ABTS vrijednosti izmjerene su za vodene ekstrakte lišća i grančica imele rasle na javoru (678,72 i 577,94 mM Trolox g^{-1} svježe tvari) dok su za etanolne ekstrakte najveće vrijednosti pokazali ekstrakti lišća imele rasle na jasenu i ekstrakti grančica imele rasle na topoli (461,09 i 306,68 mM Trolox g^{-1} svježe tvari) (Vicas i sur., 2012). Prema Stefanucci i sur. (2020) metanolni ekstrakti lišća imele pokazali su bolju antioksidacijsku aktivnost mjerenu DPPH i ABTS metodom u odnosu na sjemenke i plodove imele.

Kako u znanstvenoj zajednici nema standardizirane metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti radi lakše usporedbe rezultata s drugim istraživanjima, antioksidacijska aktivnost se može izraziti kao antioksidacijski indeks (ACI). Na temelju dobivenih ACI vrijednosti, kao zbirnih rezultata za sve 3 primijenjene metode, može se zaključiti da najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao macerat M12 koja iznosi 99,94 i najmanjom za macerat M1 koja iznosi 11,06. Seeram i sur. (2008) i Piljac-Žegarac i sur. (2010) su antioksidacijsku aktivnost pića bogatih polifenolima kao što su crno vino, voćni sokovi i voćni čaj izrazili kao ACI

vrijednost. Najveću ACI vrijednost pokazao je čaj koji je sadržavao 75 % šipka/ploda ruže i 25 % hibiskusa (100), zatim sok nara (95,8), crno vino (68,3), sok od grožđa (61,7), sok od borovnice (50,9) zeleni ledeni čaj (24,2), itd. Kao što je prethodno rečeno, porastom masene koncentracije imele u vodeno-alkoholnoj bazi raste sadržaj ukupnih fenolnih spojeva. Budući da fenolni spojevi imaju značajan utjecaj na antioksidacijsku aktivnost isti se obrazac ponavlja i za rezultate sve tri korištene metode: s porastom masene koncentracije imele i volumnog udjela etanola u maceratima raste i antioksidacijska aktivnost te u konačnici ACI macerata. Antioksidacijska aktivnost različitih biljnih ekstrakata povezana je s prisutnošću fenolnih spojeva što je dokazano u brojnim istraživanjima (Miliauskas i sur., 2004; Aqil i sur., 2006; Roman i sur., 2009). Da fenolni spojevi imele imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost dokazuje i izračunati Pearsonovi koeficijenti korelacije između TPC i TFC i antioksidacijske aktivnosti izmjerene FRAP, DPPH i ABTS metodama. Koeficijenti korelacije su pokazali vrlo jaku korelaciju između rezultata za TPC i FRAP ($r^2 = 0,92$) i TPC i ABTS ($r^2 = 0,86$) dok je za DPPH ta korelacija jaka ($r^2 = 0,74$). Nešto niža korelacija između TPC i DPPH ukazuje na to da su za antiradikalnu aktivnost mjerenu DPPH metodom uz fenolne spojeve odgovorne i druge skupine spojeva imele npr. proteini viskotoksini kao što se navodi u istraživanju Roman i sur. (2009), a koji se tijekom maceracije imele u vodeno-alkoholnoj bazi nisu ekstrahirali u dovoljnoj koncentraciji. Kako u maceratima imele nisu određivane druge skupine spojeva s antioksidacijskim potencijalom pretpostavlja se da se antioksidacijska aktivnost macerata ne može pripisati samo fenolnim spojevima već je ona rezultat sinergističkog učinka svih bioaktivnih spojeva imele. Korelacija između rezultata za TFC i FRAP i ABTS još je jača ($r^2 = 0,97$ i $r^2 = 0,98$) što ukazuje na to da flavonoidi imaju veliki antioksidacijski potencijal. Jaka korelacija između sadržaja fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti potvrđena je i u istraživanjima Pietrzak i sur. (2017) i Stefanucci i sur. (2020). Nadalje, u maceratima je identificirano najviše fenolnih spojeva iz skupine flavonoida (ukupno 28) te se može reći da su upravo flavonoidi nosioci antioksidacijske aktivnosti macerata imele što je potvrđeno i u istraživanjima antioksidacijske aktivnosti imele *Viscum coloratum* (Leu i sur., 2006; Yao i sur., 2006). Iako je mehanizam zaštitnog djelovanja flavonoida predmet brojnih istraživanja i rasprava, vjeruje se da se antioksidacijsko djelovanje flavonoida temelji na njihovoj sposobnosti doniranja vodika i hvatanja slobodnih radikala čime nastaju manje reaktivni flavonoidni fenoksidni radikali. Antioksidacijska aktivnost flavonoida ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi. Glavne strukturne značajke flavonoida važne za sposobnost hvatanja radikala jesu: O-dihidroksilna (kateholna) struktura u B-prstenu koja daje stabilnost radikalu i omogućuje delokalizaciju elektrona; 2,3-dvostruka

veza u konjugaciji s 4-keto-skupinom, što omogućuje delokalizaciju elektrona iz B-prstena; hidroksilne skupine na položaju 3- i 5- koje osiguravaju vodikovu vezu s keto skupinom (Kazazić, 2004). Navedene strukturne uvjete zadovoljava većina flavonoida idenificiranih u maceratima imele. Koeficijenti korelacije između primijenjenih metoda antioksidacijske aktivnosti također su vrlo jaki. Rezultati dobiveni FRAP metodom pokazali su bolju korelaciju s rezultatima dobivenim ABTS metodom (r^2 = 0,95) nego s DPPH metodom (r^2 = 0,93) dok je korelacija ABTS i DPPH metode iznosila 0,90.

Antioksidacijska aktivnost imele bila je predmet brojnih istraživanja te je dokazano da ovisi o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu fitokemikalija kao što su fenolni spojevi, prisutnih u imeli (Onay-Ucar i sur. 2006; Leu i sur., 2006; Yao i sur., 2006; Vicas i sur., 2011; 2012; Choudhary i sur., 2010; Stefanucci i sur., 2020; Pieterzak i Nowak, 2021). Fitokemijski sastav imele nije stabilan te ovisi o vrsti stabla domaćina i okolišnim uvjetima rasta kao što su temperatura, koncentracija CO_2, onečišćenje, plodnost tla te godišnje doba. Utjecaj razdoblja sakupljanja imele na kemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost ekstrakata prethodno su proučavali Vicas i sur. (2011) i Onay-Ucar i sur. (2006). Autori su određivali TPC i antioksidacijsku aktivnost vodenih i metanolnih ekstrakta listova i stabljika imele sakupljenih u tri različita razdoblja (svibanj, srpanj i prosinac) (Vicas i sur., 2011) i antioksidacijsku aktivnost metanolnih ekstrakata lišća *Viscum album* sakupljenog u veljači i srpnju (Onay-Ucar i sur., 2006). Utvrdili su da na kemijski sastav i antioksidacijsko djelovanje imele osim stabla domaćina značajno utječe i razdoblje sakupljanja tj. okolišni uvjeti rasta kao što su klima i temperatura. Pietrzak i Nowak (2021) išli su korak dalje te istražili utjecaj meteoroloških faktora (srednja temperatura zraka, dubina snijega, broj snježnih dana, mjesečna količina padalina i broj sunčanih sati), perioda i mjesta sakupljanja imele te vrste stabla domaćina na fitokemijski sastav i antioksidacijsku aktivnost metanolnih ekstrakta imele iz roda *Viscum* L. Kemometrijska analiza pokazala je da su ekstrakti imele, prikupljene sa četinjača (*Viscum abietis* i *Viscum austriacum*), imali najbogatiji polifenolni sastav i najveće antioksidacijsko djelovanje. Štoviše, polifenolni profil i antioksidacijska aktivnost ekstrakta bili su usko povezani s meteorološkim uvjetima i mjestom sakupljanja imele te su tako veći sadržaj fenolnih spojeva i veća antioksidacijska aktivnost utvrđeni u ekstraktima imele koja je sakupljena u jesensko-zimskom razdoblju koje je obilježilo hladno vrijeme, sa snijegom i malo sunca.

Antioksidacijska aktivnost prikupljenih komercijalnih uzoraka biske (B1-B34) određena je FRAP i DPPH metodom. Prema rezultatima FRAP metode prikazanima na slici 24 najveću

antioksidacijsku aktivnost imaju industrijski uzorci B24 (6,91 mM Trolox) i B20 (6,61 mM Trolox), dok se od uzoraka iz domaće radinosti ističu uzorci B18 (6,10 mM Trolox) i B17 (5,71 mM Trolox). Navedene uzorke karakterizira i najveći sadržaj ukupnih fenolnih spojeva. Najmanja antioksidacijska aktivnost izmjerena je u B33 (0,28 mM Trolox) a zatim u B22 (0,36 mM Trolox). Antiokisdacijska aktivnost industrijskih uzoraka statistički se ne razlikuje ($p = 0,887$) od antioksidacijske aktivnosti uzoraka iz domaće radinosti mjerene FRAP metodom. Antioksidacijska aktivnost mjerena DPPH metodom utvrđena je u uzorcima B20 (70,99 %) a zatim u B17 (69,28 %), B6 (62,61 %) i B2 (62,28 %) (slika 25). Najmanji % inhibicije DPPH radikala pokazali su uzorci B22 (1,67 %), B9 (2,32 %) i B8 (3,21 %). Za razliku od rezultata antioksidacijske aktivnosti mjerene FRAP metodom, između industrijskih uzoraka i uzoraka iz domaće radinosti postoji statistički značajna razlika ($p = 0,042$) u % inhibicije DPPH radikala. Antioksidacijsko djelovanje jakih alkoholnih pića uglavnom ovisi o količini i vrsti prisutnih fenolnih spojeva. Čisti destilati zbog načina proizvodnje ne sadrže fenolne spojeve te je njihova antioksidacijska aktivnost zanemariva. Međutim, destilati koji nakon proizvodnje odležavaju u drvenim bačvama, kao što je šljivovica ili vinjak, zbog ekstrakcije fenolnih spojeva iz drveta pokazuju prosječnu antioksidacijsku aktivnost od 0,53 mM Troloxa. Najveću prosječnu antioksidacijsku aktivnost mjerenu FRAP metodom pokazali su travarice (1,18 mM Trolox) i voćni likeri (9,54 mM Trolox) kao i antiradikalnu aktivnost mjerenu DPPH metodom (oko 1,6 mM Troloxa) (Mrvčić i sur., 2012). Prema Issa-Issa i sur. (2019) % inhibicije DPPH radikala likera proizvedenih od jedne biljne vrste kretao se od 18,15 mg TEAC L^{-1} (*Lipia triphylla*) do 86,80 mg TEAC L^{-1} (*Melissa officinalis*). Snažna antiradikalna aktivnost (prosjek 82,7 mg TEAC L^{-1}) utvrđena je za likere pripremljene od biljaka iz porodice *Lamiaceae* kao što je *Melissa officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Sideritis leucantha*, *Mentha pulegium* i *Salvia officinalis*. Sokoł-Łetowska i sur. (2014) utvrdili su sličnu antioksidacijsku aktivnost u likerima napravljenim od različitih vrsta crvenog voća: najveću aktivnost pokazali su likeri od crne ruže (*Rosa spinosissima* L.), aronije (*Aronia melanocarpa* Elliot), trnine (*Prunus spinosa* L.), i plodova mahonije (*Mahonia aquifolia* (Pursch) Nutt). Li i Beta (2011) zaključili su da umjerena konzumacija likera, vina, piva i destilata može imati korisne učinke na zdravlje čovjeka zbog prisutnih antioksidansa.

5.3.2. Antimikrobna aktivnost

Zbog široke i neciljane upotrebe antibiotika, otpornost bakterija na antibiotike predstavlja globalni zdravstveni problem 21. stoljeća. Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji infektivne bolesti su drugi po redu vodeći uzrok smrti ljudi u svijetu. U skladu s tim, potreba za novim antimikrobnim lijekovima je prijeko potrebna. Jedna od strategija je povratak prirodnim izvorima antimikrobnih spojeva kao što su ljekovite biljne vrste koje se u narodnoj medicini koriste od davnina. Zbog velike raznolikosti i potencijala biljaka, znanstvena istraživanja usmjerena su na pronalazak biljnih izvora novih lijekova, antimikrobnih spojeva, insekticida i herbicida (Dewick, 2002). Biljke i njihovi ekstrakti bogati su raznolikim fitokemikalijama koje doprinose različitim biološkim aktivnostima. Kao potencijalni antimikrobni spojevi istražuju se terpeni, eterična ulja, alkaloidi, lektini, polipeptidi te polifenoli. Isto tako, sve su veći zahtjevi kupaca za hranom bez kemijskih aditiva i konzervansa. Jaka alkoholna pića na bazi bilja sadrže biljne ekstrakte bogate različitim biološki aktivnim spojevima s različitim mehanizmima djelovanja na stanice mikroorganizama te je antimikrobna aktivnost rezultat njihovog sinergističkog djelovanja. Antimikrobna aktivnost ljekovitog, aromatičnog i začinskog bilja, kao i pića na bazi biljaka, doprinosi njihovom blagotvornom djelovanju i na probavne funkcije u organizmu. Smatra se da biljne komponente, djelujući na patogene mikroorganizme, koji se mogu naći u probavnom sustavu zapravo doprinose održavanju ravnoteže prirodne mikroflore. Kao što je već navedeno, macerati i uzorci biske korišteni u ovom istraživanju su vodeno-etanolni ekstrakti imele te je u ovom radu ispitana njihova potencijalna antimikrobna aktivnost. Antimikrobna aktivnost macerata imele s najvećom masenom koncentracijom biljnog materijala (M3, M6, M9 i M12) i odabranih komercijalnih uzoraka biske (B20, B24, B33 i B34) ispitana je primjenom disk difuzijske metode prema odabranim sojevima mikroorganizama, najčešćih kontaminanata hrane i uzroka trovanja. Dobiveni promjeri zona inhibicije rasta prikazani u tablici 11 pokazuju da ispitivani uzorci imaju neznatnu antimikrobnu aktivnost prema odabranim test-mikroorganizmima. Ispitivani uzorci macerata i komercijalnih uzoraka biske nisu pokazali inhibicijski učinak na rast odabranih Gram-negativnih bakterija: *Salmonella enterica* s. *Thyphimurium, Escherichia coli* i *Pseudomonas aeruginosa*. Macerat M6 pokazao je inhibicijski učinak na najveći broj test-mikroorganizama između kojih se ističe izraženiji inhibicijski učinak na kvasac *Candida utilis* s promjerom zone inhibicije rasta 10 mm. Od Gram-pozitivnih bakterija *Bacillus subtilis* se pokazao podjednako osjetljivim na sve

ispitivane uzorke s promjerom zona inhibicije od 7-8 mm, osim za uzorak B34. *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* sa zonama inhibicije od 8 mm pokazali su osjetljivost na macerate M6 i M9, dok *Listeria monocytogenes* nije pokazala osjetljivost niti na jedan ispitivani uzorak. Iz skupine kvasaca na djelovanje uzoraka osjetljivom se pokazala jedino *Candida utilis* i to na uzorke M3 i M6. Rast test-mikroorganizama koji su pokazali osjetljivost na ispitane uzorke s vidljivim zonama inhibicije rasta (*Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* i *Candida utilis*) prikazani su na slici 26. Iako je za određene test-mikroorganizme poput bakterija *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus* i kvasca *Candida utilis* izmjerena vidljiva zona inhibicije rasta od 7-10 mm, u usporedbi sa zonom inhibicije rasta koju uzrokuju antibiotici kanamicin za bakterije i nistatin za kvasce, antimikrobna aktivnost uzoraka je zanemariva. Antibiotici kao pozitivne kontrole najučinkovitiji su u inhibiranju rasta odabranih sojeva test-mikroorganizama. Iz tog razloga minimalne inhibitorne koncentracije uzoraka na test-mikroorganizme nisu određene. U istraživanju Shah i sur. (2017) disk difuzijskom metodom ispitana je antimikrobna aktivnost različitih organskih ekstrakata grančica, listova i bobica imele (*Viscum album*) prema 10 vrsta patogenih mikroorganizama. Etilacetatni, butanolni, metanolni i vodeni ekstrakt imele pokazali su značajan inhibitorni učinak na rast svih testiranih mikroorganizama, posebice Gram-pozitivnih bakterija i kvasca *Candida albicans*. Kao najosjetljivije na djelovanje ekstrakta pokazale su se Gram-pozitivne bakterije *Bacillus subtilis* i *Staphylococcus aureus* kao i u ovom istraživanju, te *Bacillus atrophaeus* čiji su rast inhibirali svi ekstrakti osim n-heksana. Nadalje, suprotno rezultatima ovog istraživanja najosjetljivije vrste Gram-negativnih bakterija bile su *Escherichia coli*, *Erwinia carotovora* i *Agrobacterium tumefaciens*, dok je najotpornija Gram-negativna bakterija bila je *Salmonella typhi*. Slične rezultate su pokazali i Hussain i sur. (2011) u istraživanju antimikrobne aktivnosti različitih organskih ekstrakta imele prema bakterijama *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Enterococcus faecium, Escherichia coli, Bordetella bronchisiptica, Salmonella typhi, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas syringae,* kvascu *Saccharomyces cerevisiae* i plijesni *Aspergillus flavus*. Svi ekstrakti imele pokazali su značajno antimikrobno djelovanje na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, posebice etilacetatni i metanolni ekstrakti. Etanolni ekstrakti imele pokazali su umjerenu antimikrobnu aktivnost prema svim testiranim bakterijama. Međutim, ispitani ekstrakti nisu pokazali antifungalno djelovanje. Navedeni rezultati djelomično su u skladu s rezultatima dobivenim u ovom radu, gdje također ispitani uzorci nisu pokazali antifungalnu aktivnost prema *Candida. albicans,* kao ni prema kvascima *Saccharomyces cerevisae* i *Rhodotorula* sp. ali prema *Candida utilis* jesu. Mnoge studije dokazuju osjetljivost

bakterije *S. aureus* na djelovanje biljnih ekstrakta i izoliranih biljnih spojeva (Lino i Deogracious, 2006; Ghasemi i sur., 2010; Ceyhan i sur., 2012) za razliku od *Escherichia coli* i kvasca *Candida albicans* koji često pokazuju veliku rezistentnost na djelovanje ekstrakata ljekovitog bilja (Ghasemi i sur., 2010; Ceyhan i sur., 2012; Stanković i sur., 2012; Nazzaro i sur., 2013; Vlase i sur., 2014). Slaba antimikrobna aktivnost vodeno-etanolnog ekstrakta kadulje prema ovom kvascu pokazana je i u drugim studijama (Garcia i sur., 2013). Razlog veće osjetljivosti Gram-pozitivnih bakterija na djelovanje antimikrobnih spojeva je sama građa stanica. Naime, Gram-negativne bakterije imaju dodatnu vanjsku membranu koja vjerojatno predstavlja zaštitnu barijeru djelovanju antimikrobnih spojeva, dok enzimi u periplazmatskom prostoru razgrađuju takve spojeve (Gao i sur., 1999). Gram-pozitivne bakterije nemaju vanjsku membranu pa antimikrobni spojevi lako prolaze kroz staničnu membranu uzrokujući istjecanje citoplazme iz stanice i njenu koagulaciju (Nikaido, 1994).

Od alkoholnih pića, najčešće je proučavana antimikrobna aktivnost vina, pri čemu se ona pripisuje sinergističkom djelovanju etanola, fenolnih spojeva i niskog pH (Medina i sur., 2007; Boban i sur., 2010; Jana i sur., 2014). Posebno su zanimljivi podaci koji ukazuju na značajnu antimikrobnu aktivnost vina i vodke, obogaćenih suhim voćem, listovima metvice, zelenog čaja i kore cimeta, prema bakteriji *Helicobacter pylori* (Lin i sur., 2005). Literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti biljnih likera su oskudni. Karabegović i sur. (2012) su proučavali antibakterijsku i antifungalnu aktivnost gorkog likera Bitera 54 koji je pokazao najbolje antimikrobno djelovanje na sojeve *E. coli* O157:H7 i *S. typhimurium*. Issa-Issa i sur. (2019) disk difuzijskom metodom ispitali su antimikrobnu aktivnost 12 likera dobivenih od pojedinačnih biljnih vrsta. Kao najosjetljiva Gram-negativna bakterija pokazala se *S. enterica* sa prosječnom zonom inhibicije rasta za sve testirane likere od 5,17 mm. Od Gram-pozitivnih bakterija najosjetljivija je bila *S. aureus* sa prosječnom zonom inhibicije rasta od 6,33 mm, dok je prosječna zona inhibicije rasta za kvasce iz roda *Candida* iznosila 6,11 mm. Najbolju inhibiciju rasta pokazao je liker od *Matricaria chamomilla* prema *S. enterica* i *S. aureus,* zatim liker od *Mentha piperita* prema *S. aureus* te liker od *Centaurea benedicta* i *Sideritis leuchanta* prema *C. albicans* i *C. glabrata*.

Brojni različiti literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti biljnih ekstrakta rezultat su brojnih parametara kao što je geografsko podrijetlo i klimatski uvjeti rasta, vegetacijski period sakupljanja biljnog materijala, starost biljaka itd. (Petrović i Antić, 2015), a u slučaju imele i vrsta stabla domaćina na kojem parazitira. Pored toga, uvjeti eksperimenta, kao što je vrsta

otapala i njegova koncentracija, odabrani sojevi mikroorganizama i primjenjena metoda ispitivanja antimikrobne aktivnosti u velikoj mjeri utječu na ishod istraživanja.

5.3.3. Antiproliferacijska aktivnost

Većina znanstvenih istraživanja bijele imele (*Viscum album* L.) bavi se upravo njenom antitumorskom aktivnošću dok se u službenoj fitofarmaceutskoj praksi brojnih europskih zemalja standardizirani vodeni pripravci bijele imele primjenjuju u antitumorskoj terapiji (Ochocka i Piotrowski, 2002; Singh i sur., 2016). Brojne studije navode da vodeni ekstrakti imele imaju citotoksična i imunomodulacijska svojstva, poboljšavaju toleranciju pacijenata na kemoterapiju te tako unaprijeđuju kvalitetu života oboljelih od raka jajnika, raka vrata maternice, neuroblastoma, glioma i raka pluća (Tröger i sur., 2014; Singh i sur., 2016; de Oliviera Melo i sur., 2018). Imunomodulacijsko djelovanje vodenih ekstrakata imele posljedica je interakcije sa staničnim i humoralnim dijelom imunološkog sustava (Gardin, 2009). Najviše proučavani bioaktivni spojevi u vodenim pripravcima imele su lektini i viskotoksini. Ovi spojevi induciraju citotoksičnost posredovanu makrofagima, stimuliraju fagocitozu, povećavaju izlučivanje citokina i pojačavaju *in vitro* citotoksični učinak na različite stanične linije (Timoshenko i sur., 1995; Estko i sur., 2015). Međutim, uz njih u imeli su prisutni i drugi biološki aktivni spojevi kao što su fenolne kiseline, fenilpropanoidi, flavonoidi, triterpeni, fitosteroli, oligo i polisaharidi (Nazaruk i Orlikowski, 2016.; Delebinski i sur., 2012.; Strüh i sur., 2013.; Ćebović i sur., 2008) čije je sinergističko djelovanje vjerojatno uključeno u antitumorsku aktivnost ekstrakata imele. Primjena različitih otapala kao i uvjeta ekstrakcije utječe na kemijski sastav ekstrakta imele, a time i na *in vitro* i *in vivo* antitumorsko djelovanje. Citotoksično djelovanje vodeno-alkoholnih tinktura imele dokazano je na tumorske Ehrlich stanice (Stan i sur., 2013) i proliferaciju tumorskih HeLa stanica (Sarpataki i sur., 2015) što ukazuje na to da biološki aktivni spojevi topljivi u etanolu također doprinose antitumorskoj aktivnosti ekstrakta imele. S obzirom na niz znanstvenih istraživanja koji ukazuju na pozitivne biološke učinke ekstrakata imele, u ovom radu provedeno je ispitivanje antiproliferacijskog djelovanja macerata imele s najvećom masenom koncentracijom biljnog materijala (M3, M6, M9 i M12) i odabranih komercijalnih uzoraka biske (B20, B24, B33 i B34). Antiproliferacijska aktivnost uzoraka ispitana je na tumorskoj HeLa humanoj staničnoj liniji. Budući da je u ovakvim istraživanjima bitan i utjecaj ispitivane tvari na normalne, netumorske stanice antiproliferacijska aktivnost uzoraka ispitana je i na

normalnoj HaCaT humanoj staničnoj liniji. Stanice su izložene djelovanju navedenih uzoraka pri volumnim udjelima od 1,25 do 10 % v/v tijekom 72 sata. Nakon toga, MTS metodom određena je vijabilnost stanica. Rezultati mjerenja su izraženi kao % preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice i prikazani su na slikama 27-30. Također, kako bi se isključila potencijalna toksičnost etanola paralelno je ispitan i učinak 25, 40, 55 i 70 % v/v etanola na obje stanične linije u istim volumnim udjelima kao i za uzorke.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da macerati utječu na vijabilnost tumorskih HeLa stanica na način ovisan o dozi te da je došlo do smanjenja % preživljenja tumorskih stanica u odnosu na netretirane stanice. Macerati M9 i M12 pokazali su antiproliferacijski učinak već pri najnižem primjenjenom volumnom udjelu od 1,25 % v/v pri čemu je preživljavanje iznosilo 67,69 i 81,38 % dok su macerati M3 i M6 izraženiji antiproliferacijski učinak pokazali pri volumnim udjelima većim od 5 % v/v. Najveći antiproliferacijski učinak pokazali su macerati M9 i M12 u volumnim udjelima od 5 % v/v inhibirajući rast 82,41 i 76,9 % stanica u usporedbi s kontrolnim stanicama (slika 27). Međutim, ispitani macerati pokazali su antiproliferacijski učinak i na normalne HaCaT stanice (slika 28) pri čemu je M3 djelovao inhibirajuće na rast stanica na način ovisan o dozi te je najveći antiproliferacijski učinak postignut pri volumnom udjelu od 10 % v/v inhibirajući rast 72,10 % stanica. Ostali macerati (M6, M9 i M12) značajnu antiproliferacijsku aktivnost pokazuju pri volumnim udjelima većim od 2,5 % v/v rezultirajući preživljenjem 37,36–59,78 % stanica. Budući da sama otapala u vodi, odnosno 25 i 40 % v/v etanol, nisu pokazala antiproliferacijski učinak do najvećeg primjenjenog volumnog udjela od 20 % v/v na obje stanične linije, može se pretpostaviti da je zapaženi antiproliferacijski učinak macerata M3 i M6 rezultat djelovanja spojeva ekstrahiranih iz imele. Za pripremu macerata M9 i M12 kao otapalo korišteni su 55 odnosno 70 % v/v etanol, stoga se može pretpostaviti da je zapaženo inhibicijsko djelovanje navedenih macerata rezultat učinka etanola i spojeva ekstrahiranih iz imele. Odabrani komercijalni uzorci biske (40 % v/v etanola) nisu pokazali antiproliferacijski učinak na HeLa tumorsku staničnu liniju (slika 29) budući da je % preživljenja stanica isti kao i kod kontrolnih stanica. Međutim, kod HaCaT stanične linije došlo je do pada % preživljenja te se može govoriti o antiproliferacijskoj aktivnosti uzoraka ovisno o primijenjenoj dozi (slika 30). Uzorci B20, B24 i B33 pokazali su umjerenu antiproliferacijsku aktivnost te je najveći primjenjeni volumni udio uzoraka od 10 % v/v uzrokovao inhibiciju rasta stanica 23-34 %. Uzorak B34 pokazao je značajniji antiproliferacijski učinak pri čemu je primjena najvećeg

volumnog udjela uzorka rezultirala preživljenjem 44,61 % stanica u odnosu na kontrolne stanice.

Budući da lektini nisu stabilni u vodeno-alkoholnim otopinama (de Oliveira Melo i sur., 2018), a sadržaj viskotoksina zbog bolje topljivost veći je u vodi nego u vodeno-alkoholnim otopinama (Urech i sur., 2006), za antiproliferacijsku aktivnost macerata i uzoraka biske mogu biti odgovorni drugi biološki aktivni spojevi kao što su fenolni spojevi čija je prisutnost u ovom radu i potvrđena. Prema literaturi, kafeinska i klorogenska kiselina djeluju inhibitorno na adheziju, proliferaciju i migraciju tumorskih stanica (Yagasaki i sur., 2000; Weng i Yen, 2012). Fenetil ester kafeinske kiseline uzrokovao je smanjenje migracije stanica melanoma zbog inhibicije nuklearnog faktora kapa B (NF-κB) (Jones i Katiyar, 2013). Klorogenska kiselina nije imala citotoksični učinak na održivost Hep3B stanica tretiranih različitim koncentracije ovog spoja (Jin i sur., 2005). Međutim, ista je studija pokazala da klorogenska kiselina inhibira aktivnost metaloproteinaze-9 (MMP-9), povezane sa širenjem tumora. Nadalje, u radu Pan i sur. (2016) kvercetin glukozid pokazao se kao učinkovit inhibitor rasta HepG2, PC3 i HT29 tumorskih stanica dok je antitumorska aktivnost flavanona na tumorske stanične linije opisana u radovima Alday i sur. (2015) i Ke i sur. (2017). *In vitro* studije pokazale su da metanolni ekstrakti bobica imele i vodeno-etanolne tinkture imele (45 % etanola) smanjuju proliferaciju stanica raka debelog crijeva i održivost mišjih stanice melanoma na način ovisan o dozi (Pietrzak i sur., 2017; de Oliveira Melo i sur., 2018). Stanične promjene do kojih je došlo posljedica su promjena mitohondrijske aktivnosti i staničnog ciklusa, kao i oštećenja stanica. Obje studije navode da identificirani fenolni spojevi prisutni u ekstraktima imele pridonose njihovom antiproliferacijskom i apoptotskom učinku. Holandino i sur. (2020) također su istražili *in vitro* antitumorski potencijal vodeno-alkoholnih tinktura (80 % etanola) različitih vrsta imele ubranih s različitih vrsta stabla domaćina. Mehanizam stanične smrti uključuje nekrotični učinak ovisno o vrsti stabla domaćina, vremenu i dozi s različitom selektivnošću prema tumorskim stanicama. Kao najučinkovitija pokazala se tinktura dobivena od *V. album* ssp. *abietis* rasle na jeli (*Abies alba*) dok je tinktura od *V. album* ssp. *austriacum* rasle na boru (*Pinus sylvestris*) pokazala neznatan antitumorski učinak. Tumorske stanične linije MOLT-4 (ljudska stanična linija akutne limfoblastične leukemije) i Yoshida (mišji sarkom) bile su osjetljivije na djelovanje tinktura od normalnih stanica NIH/3 T3 (mišji embrijski fibroblasti).

Morfološke promjene stanica mogu biti posljedica citotoksičnosti ispitivane tvari te je prilikom ispitivanja antiproliferacijske aktivnosti uzoraka potrebno pratiti i morfologiju

stanica. U tu svrhu HeLa i HaCaT stanice tretirane su najvećim odabranim volumnim udjelom uzoraka (10 % v/v) tijekom 72 sata. Nakon tretmana, stanice su obojane kristal ljubičastom bojom i fotografirane Dyno-Eye kamerom pod inverznim svjetlosnim mikroskopom, što je prikazano na slikama 31 i 32. Na slikama su prikazane i kontrolne, netretirane HeLa tumorske i HaCaT normalne stanice. Na temelju prikazanih fotografija može se uočiti razlika između kontrolnih, netretiranih stanica i stanica tretiranih uzorcima macerata i komercijalnih uzoraka biske. U odnosu na kontrolne stanice vidljiva je puno manja gustoća tretiranih stanica, koja je za uzorke M6, M9 i M12 najmanja, što je u skladu s rezultatima antiproliferacijske aktivnosti. Također, vidljiv je gubitak kontakata stanica te se mogu uočiti tamnije obojane i zaokružene stanice, što se pripisuje kondenzaciji kromatina u procesu apoptoze (Zainal Ariffin i sur., 2009).

5.4. STABILNOST BIOLOŠKI AKTIVNIH SPOJEVA TIJEKOM *IN VITRO* GASTROINTESTINALNE PROBAVE

Pozitivan učinak fenolnih spojeva na ljudsko zdravlje ovisi o njihovoj bioraspoloživosti i bioaktivnosti. Fenolni spojevi su spojevi niske bioraspoloživosti: od ukupne količine unesene prehranom, u probavnom se traktu apsorbira samo od 1 do 5 %. Slaba je apsorpcija vjerojatno posljedica njihove slabe topljivosti u vodi i slabe stabilnosti u gastrointestinalnom traktu (Chang, 2019). Tijekom probave zbog niskog pH želuca, prisutnosti probavnih enzima i djelovanja crijevne mikrobiote dolazi do biotransformacija fenolnih spojeva koje utječu na bioraspoloživost i stabilnost ovih spojeva, te posljedično na potencijalnu bioaktivnost. Konačna kemijska struktura i biološka svojstva ovise o apsorpciji, metabolizmu, distribuciji i izlučivanju spojeva unutar tijela i redukcijskim svojstvima nastalih metabolita. Nadalje, na bioraspoloživost i stabilnost fenolnih spojeva, osim njihove kemijske strukture, utječu i interakcije s komponentama hrane kao što su proteini. Naime, interakcije s proteinima mogu smanjiti topljivost, a time i probavljivost i funkcionalnost fenolnih spojeva kao npr. antioksidacijski potencijal (Ozdal i sur., 2019). Za procjenu bioraspoloživosti različitih spojeva/sastojaka hrane razvijene su *in vitro* metode u kojima se simuliraju uvjeti tijekom gastrointestinalne probave. *In vitro* metode su brze i jednostavne, no za razliku od *in vivo* metoda ne mogu točno simulirati fiziološku kompleksnost probavnog sustava i dati preciznu procjenu bioraspoloživosti ispitivanih spojeva (Minekus i sur., 2014). Da bi se procijenila bioraspoloživost i stvarni bioaktivni/funkcionalni potencijal fenolnih spojeva

macerata imele potrebno je odrediti njihovu stabilnost tijekom gastrointestinalne probave. U tu svrhu korišten je dvofazni model *in vitro* gastrointestinalne probave koji se sastojao od simulacije uvjeta probave u želucu (pH 3, djelovanje pepsina=simulirani probavni sok želuca) nakon kojeg je slijedila probava u početnom dijelu tankog crijeva (dvanaesniku) (pH 7, djelovanje pankreatina i žućnih soli=simulirani probavni sok tankog crijeva). Nakon svake faze *in vitro* gastrointestinalne probave uzorcima je određen sadržaj ukupnih fenolnih spojeva (TPC) i ukupnih flavonoida (TFC) te im je određena antioksidacijska aktivnost primjenom FRAP metode. Rezultati prikazani na slici 33 pokazuju da se sadržaj ukupnih fenolnih spojeva nakon simulirane probave u želucu u maceratima kreće u rasponu od 30,03 do 54,88 mg GAE L^{-1} što je smanjenje 69,97 do 45,12 % od TPC početnih, neprobavljenih uzoraka. Najveći pad TPC zabilježen je za macerat M3 kojeg karakterizira 25 % v/v etanola i 80 g L^{-1} imele. Macerati s najvećim volumnim udjelom etanola (M10, M11 i M12) nakon probave u želucu imaju najmanji pad TPC, od 45,12 do 58,59 % od TPC početnih uzoraka. Nadalje, nakon simulacije probave u tankom crijevu došlo je do dodatnog smanjenja TPC u odnosu na neprobavljene uzorke. Tako se konačni sadržaj TPC u uzorcima nakon simulirane *in vitro* probave kreće u rasponu od 79,09 do 175,27 mg GAE L^{-1} što iznosi 56,39 do 77,36 % od TPC početnih, neprobavljenih uzoraka. Isti trend pada sadržaja TPC u odnosu na početne, neprobavljene uzorke utvrđen je i za sadržaj ukupnih flavonoida (TFC), a kreće se u rasponu od 31,19 do 102,12 mg RE L^{-1} tj. 35,39 do 77,29 % manje od TFC početnih, neprobavljenih uzoraka (slika 34). Međutim, za većinu uzoraka pad TFC veći je nakon probave u želucu u odnosu na probavu u tankom crijevu, odnosno nakon provedene probave u tankom crijevu dolazi do povećanja TFC u odnosu na probavu u želucu. Ortega i sur. (2011) navode da je razlog tome cijepanje veze između flavonoida i vezanih šećernih jedinica te zaštitni učinak ostalih spojeva u smjesi kao što su šećeri i topljiva vlakna. Macerati s najvećim volumnim udjelom etanola, 70 % v/v (M10, M11 i M12) imaju najveći pad TFC nakon provedene *in vitro* gastrointestinalne probave budući da ih karakterizira i najveći početni sadržaj TFC. Fenolni spojevi, osobito flavonoidi su jako osjetljivi na alkalne uvjete te u uvjetima probave u tankom crijevu (pH 7) može doći do njihove razgradnje i/ili strukturnih pretvorbi koje rezultiraju različitim kemijskim svojstvima. Nadalje, neki flavanoni djelovanjem enzima pankreatina i žućnih soli u alkalnim uvjetima prelaze u netopljive čalkone te kao takvi nisu bioraspoloživi (Tarko i sur., 2009). Na temelju dobivenih rezultata može se reći da se pad sadržaja ukupnih flavonoida (TFC) preslikava na pad ukupnih fenolnih spojeva nakon provedene *in vitro* gastrointestinalne probave. Na sadržaj fenolnih spojeva utječe proces *in vitro* probave te se taj učinak može pripisati promjenama pH vrijednosti tijekom probave te

djelovanju probavnih enzima (Gutiérrez-Grijalva i sur., 2016). Naime, promjene pH vrijednosti tijekom želučane (pH=3) i crijevne (pH=7) faze gastrointestinalne probave, mogu uzrokovati značajne promjene u strukturi i fizikalno-kemijskim svojstvima bioaktivnih spojeva i/ili različite interakcije s enzimima prisutnim u probavnoj smjesi koje rezultiraju oksidacijom, taloženjem fenola (npr. tanini), te interakcije s drugim komponentama kao što su polisaharidi, itd. U dostupnoj znanstvenoj literaturi o stabilnosti fenolnih spojeva tijekom *in vitro* gastrointestinalne probave postoje oprečni rezultati. Dok neka istraživanja navode značajno smanjenje udjela ukupnih fenola nakon crijevne faze probave, druga navode veću stabilnost fenolnih spojeva u odnosu na želučanu fazu probave. Tako su dobiveni rezultati za macerate imele u skladu s radovima Wong i sur. (2014) i Mtolo i sur. (2017) u kojima je došlo do značajnog smanjenja koncentracije fenolnih spojeva nakon probave pomoću pankretina i žućnih soli. U radu Jurinjak Tušek i sur. (2020) nakon *in vitro* probave 6 vrsta biljnih čajeva iz porodice *Lamiaceae* također je došlo do značajnog smanjenja sadržaja ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijske aktivnosti. Najveći pad TPC od čak 95 % zabilježen je za čaj od mente dok je najveća konačna koncentracija ukupnih fenolnih spojeva nakon *in vitro* probave izmjerena za čaj od majčine dušice. Međutim, Rodriguez-Solana i sur. (2019b) su *in vitro* probavi podvrgnuli liker od rogača nakon koje je uočen značajan porast TPC, TFC i antioksidacijske aktivnosti u odnosu na početne vrijednosti. Osim razlika u primijenjenim metodama *in vitro* gastrointestinalne probave, do različitih rezultata dolazi i zbog različitog matriksa hrane. Likeri i travarice su za razliku od krute hrane/namirnica, tekući ekstrakti i sadrže lako dostupne, već otopljene bioaktivne spojeve te nema zaštitne uloge matriksa. Kod krutih namirnica koncentracija fenolnih spojeva nakon svake faze probave ovisi i o razgradnji i složenosti matriksa koji utječe na stupanj otpuštanja i stupanj stabilnosti fenolnih spojeva.

Antioksidacijska aktivnosti izmjerena FRAP metodom nakon provedene *in vitro* gastrointestinalne probave također je niža u odnosu na početne, neprobavljene uzorke što je u skladu s dobivenim vrijednostima TPC i TFC. Rezultati se kreću u rasponu od 0,35 do 1,18 mM Troloxa što je pad od 43,66 do 67,40 % od početnih uzoraka (slika 35). Najveći pad antioksidacijske aktivnosti izmjeren je u M11 i M12 koje karakterizira najveći volumni udio etanola (70 % v/v) što je i očekivano budući da je u tim uzorcima izmjeren i najveći pad TFC nakon provedene *in vitro* gastrointestinalne probave. Do smanjenja antioksidacijske aktivnosti, osim zbog smanjenja sadržaja fenolnih spojeva može doći i zbog različite reakcije nastalih fenolnih metabolita s FRAP reagensom. Ukupni rezultati ovog istraživanja pokazuju da koncentracija fenolnih spojeva i antioksidacijska aktivnost macerata imele nakon *in vitro*

gastrointestinalne probave ne odražava koncentraciju fenolnih spojeva početnih, neprobavljenih macerata te da bi u istraživanjima bioloških učinaka fenolnih spojeva trebalo uzeti u obzir i njihovu stabilnost tijekom gastrointestinalne probave.

5.5. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI

5.5.1. pH vrijednost, ukupne kiseline, sadržaj ukupnog ekstrakta i volumni udio etanola

Za dobivanje jakih alkoholnih pića najviše kvalitete potrebno je kontrolirati njihova fizikalno-kemijska svojstva. S ciljem fizikalno-kemijske karakterizacije dobivenih macerata određena je pH vrijednost, sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta dok je prikupljenim komercijalnim uzorcima biske određena pH vrijednost te volumni udio etanola (% v/v). Rezultati pokazuju da pH vrijednost macerata imele varira između 5,5 i 6,25 (slika 36), pri čemu je najniži pH izmjeren u uzorku M1, a najviši u uzorku M11. Na temelju rezultata može se uočiti da sastav vodeno-alkoholne baze značajno utječe na razlike u pH vrijednosti macerata u odnosu na masenu koncentraciju imele. pH vrijednosti samih vodeno-alkoholnih baza (25, 40, 55 i 70 % v/v etanola) značajno se razlikuju, pri čemu veći udio etanola vodi ka neutralnom, a veći udio vode ka kiselom. Zanimljivo je da dodavanje biljaka u vodeno-alkoholne baze s nižim koncentracijama etanola (25 % i 40 % v/v) povećava pH, dok dodavanje biljaka u vodeno-alkoholne baze s višim koncentracijama etanola (55 % i 70 % v/v) smanjuje pH. To ukazuje da medij za maceraciju značajno utječe na vrstu i količinu spojeva koji se ekstrahiraju. Jovanović i sur. (2017) smatraju da je najprikladnije otapalo za ekstrakciju fenola mješavina otapala različitih polarnosti, jer se iz biljnog materijala pospješuje ekstrakcija spojeva različitih polarnosti. Vodeni ekstrakti imaju veće količine polarnih spojeva, dok organska otapala imaju veći udio manje polarnih spojeva – vrijedi pravilo da se „slično otapa u sličnome“. Dobiveni rezultati pokazuju da imela sadrži različite spojeve (i bazne i kisele) koji se tijekom maceracije ekstrahiraju u vodeno-alkoholne baze pa se isto tako mogu očekivati različite funkcionalne i fizikalno-kemijske karakteristike dobivenih macerata.

pH vrijednost komercijalnih uzoraka biske kreću se u rasponu od 4,12 za uzorak B22 do 6,5 za uzorke B9 i B14 s prosječnom pH vrijednosti 5,2 (slika 38). Većina uzoraka biske (64,7 %) ima pH vrijednost u rasponu 5-6. pH vrijednost je vrlo važno fizikalno-kemijsko svojstvo jer

ukazuje na proces proizvodnje biske tj. na korištene sirovine. Niža pH vrijednost ukazuje na to da se tijekom maceracije imele koristio destilat čija kvaliteta ovisi o provedenom postupku fermentacije i destilacije dok viši pH ukazuje da je imela macerirana u etanolu poljoprivrednog podrijetla. Uzorci B9 i B14 čiji je pH gotovo neutralan su industrijski i proizvedeni su maceracijom imele u etanolu poljoprivrednog podrijetla. Prema propisima Europske Unije ukupna kiselost u etanolu poljoprivrednog podrijetla, izražena u gramima octene kiseline po hektolitru 100 % v/v alkohola, treba iznositi 1,5 g hL^{-1}. Ostali uzorci proizvedeni su od rakije komovice i/ili drugih destilata koji sadrže više kiselina. Niska pH vrijednost, kao u uzorku B22, dokaz je prisutnosti veće koncentracije kiselina. Razlog je najvjerojatnije loše proveden postupak fermentacije, ili odgođen postupak destilacije nakon procesa fermentacije pri čemu starenjem prefermentirane komine dolazi do oksidacije etanola u octenu kiselinu. Takav destilat ima loša senzorska svojstva i loše je kvalitete. Nadalje, navedeni uzorak ima vrlo mali sadržaj ukupnih fenolnih spojeva te neznatnu antioksidacijsku aktivnost te se na temelju toga može zaključiti da je proizveden dodatkom boje i arome u destilat (komovica ili loza). Nadalje, med koji se prema nekim receptima može dodati u bisku, također ima utjecaj na pH vrijednost. Med sadrži različite kiseline te mu prosječna pH vrijednost iznosi 3,9. Između uzoraka proizvedenih maceracijom imele u rafiniranom etanolu i onih maceriranih u destilatima postoji statistički značajna razlika ($p < 0,05$) u pH vrijednostima. Na temelju toga pH može poslužiti za brzu detekciju vrste alkoholne baze koja se koristi za proces maceracije.

Koncentracije ukupnih kiselina u uzorcima varirale su između 480 i 2880 mg octene kiseline L^{-1} (slika 37). Uzorak M4 ima najnižu vrijednost, a uzorak M12 najveću. Povećanjem količine bilja povećava se i ukupna kiselost macerata. Porast ukupne kiselosti macerata ukazuje na ekstrakciju kiselina iz bilja u vodeno-alkoholnu bazu. Pri niskim koncentracijama etanola (25 % v/v), dolazi do ekstrakcije polarnih spojeva zbog prevladavajuće polarne prirode vode. Međutim, povećanje koncentracije etanola u maceratima mijenja polarnost otapala i omogućuje ekstrakciju manje polarnih spojeva, koji povećavaju koncentraciju ukupnih kiselina (Senica i Mikulić-Petkovšek, 2020). Listovi i grančice imele sadrže triterpenske kiseline poput oleanolinske, betulinske i ursolne kiseline (Soursouri i sur., 2019). Nadalje, imela je vrlo bogata zasićenim i nezasićenim masnim kiselinama – od zasićenih kiselina sadrži palmitinsku, arahidonsku, lignoceričnu, behensku i cerotsku kiselinu, a od nezasićenih već navedenu oleinsku, linolnu i linoleinsku (Singh i sur., 2016). Ekstrakcijom

navedenih kiselina iz imele u vodeno-alkoholnu bazu, dolazi do njihove reakcije s etanolom čime nastaju etilni esteri srednjih i dugolančanih masnih kiselina.

Sadržaj ukupnog ekstrakta čine šećeri, minerali i druge organske tvari zaostale isparavanjem vode i hlapivih tvari (slika 37). Očekivano, količina ekstrahiranih tvari u maceratima raste s povećanjem masene koncentracije imele. Stoga macerati s većim udjelom biljaka imaju i veću količinu ukupnog ekstrakta. Rezultati pokazuju da najveću količinu ukupnog ekstrakta sadrže macerat M3 s 25 % v/v etanola i najvećom koncentracijom biljaka (80 g L^{-1}). U maceratima s najvećom koncentracijom imele (80 g L^{-1}), sadržaj ukupnog ekstrakta se smanjuje kako se povećava koncentracija etanola. Ukupni ekstrakt u maceratima s najmanjom koncentracijom imele (20 g L^{-1}) ne ovisi o volumnom udjelu etanola u vodeno-alkoholnoj bazi. U tim uzorcima koncentracijski gradijent je najveći, pa se duljim vremenom maceracije (28 dana) komponente imele ekstrahiraju neovisno o volumnom udjelu etanola u vodeno-alkoholnoj bazi. U maceratima sa 40 g L^{-1} imele najveću koncentraciju ekstrahiranih komponenti imao je uzorak M5 (40 % v/v etanola). Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjem Snoussi i sur. (2012) gdje su najveće vrijednosti ukupnog ekstrakta izmjerene također u maceratima s nižom koncentracijom etanola. Slične rezultate potvrđuju i Pham i sur. (2015) gdje su različita otapala korištena za dobivanje ukupnog ekstrakta pri čemu je voda bila najprikladnije otapalo, a ekstrakcija etanolnim otopinama ispostavila se manje učinkovitom. Imela sadrži značajne količine glukoze, fruktoze i saharoze, pri čemu saharoza prevladava. Od polisaharida sadrži pektin, visoko metilirani homogalakturonan, arabinogalaktan i α-1,4-metil ester galakturonske kiseline (Escher i sur., 2004, Singh i sur., 2016). Smanjenje sadržaja ukupnog ekstrakta s povećanjem sadržaja etanola može se objasniti smanjenjem topljivosti šećera u vodeno-alkoholnoj bazi s porastom koncentracije etanola. Šećeri s pet i šest hidroksilnih skupina stvaraju više vodikovih veza s vodom nego s etanolom. Povećanjem udjela etanola smanjuje se broj vodikovih veza u otapalu čime se smanjuje topljivost (Alves i sur., 2007; Crestani i sur., 2013; Galvao i sur., 2013).

Volumni udio etanola važan je parametar u proizvodnji jakih alkoholnih pića koji je Uredbom (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća za većinu jakih alkoholnih pića propisan. Biska se s obzirom na način proizvodnje ubraja u skupinu travarica tj. aromatiziranih jakih alkoholnih pića. Za travarice nije definirana niti minimalna niti maksimalna koncentracija etanola, ali ona u praksi najčešće iznosi oko 40 % v/v (kao i kod čistih destilata). Prema rezultatima analize, najveći volumni udio etanola zabilježen je u uzorku B19 (46,72 % v/v), a najmanji u uzorku B30 (24,33 % v/v) (slika 38). Vrijednosti

volumnog udjela etanola za ostatak uzoraka kreću se u rasponu od 28,11 do 43,80 % v/v, dok je prosječni udio etanola u uzorcima 37 % v/v. Većina uzoraka biske (76,5 %) sadrži više od 35 % v/v etanola. Razlog ovom relativno velikom rasponu je volumni udio etanola u vodeno-alkoholonoj bazi koju u proizvodnom postupku proizvođači koriste. Naime, biska se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica imele u etanolu poljoprivrednog podrijetla, lozi ili najčešće komovici čija kvaliteta, pa tako i volumi udio etanola, ovisi o procesima u postupku proizvodnje: fermentaciji, destilaciji i odležavanju. Neki proizvođači koji tijekom proizvodnje biske dodaju u svoj proizvod šećer ili med, obavezni su na deklaraciji to i napisati. Iako Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća propisuje vrijednosti parametara za svaku grupu ili pojedina jaka alkoholna pića proizvodi koji se ne stavljaju na tržište ne moraju imati deklaracije. Nadalje, među domaćim proizvođačima vlada poprilična zbunjenost kada se radi o nazivu jakih alkoholnih pića te se mnogi nazivi krivo koriste. Tako neki proizvođači bisku s medom nazivaju biljnim likerom. Za likere je Uredbom (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća propisano da moraju sadržavati minimalno 100 g L^{-1} šećera te alkoholna jakost proizvoda stavljenih na tržište pod tim nazivom mora biti najmanje 15 % v/v, što je niža vrijednost u odnosu na uobičajenu alkoholnu jakost travarica. Za analizirane uzorke biske nije poznata koncentracija šećera.

5.5.2. Kromatski parametri

Kromatski parametri (*L, a, b, C, h*) dobivenih macerata imele i komercijalnih uzoraka biske mjerene su spektrofotometrijski prema CIELab sustavu (OIV, 2014), a rezultati su prikazani u tablici 12. Svi dobiveni macerati su obojeni, ali se razlikuju po svojim kromatskim karakteristikama (slika 39). Vrijednosti parametra *L* koji označava svjetlinu macerata kreću se u rasponu od 36,86 do 82,01. Uzorci pripremljeni s nižom koncentracijom biljke (20 g L^{-1}) i nižom koncentracijom etanola pokazali su najveću svjetlinu (*L*). S povećanjem koncentracije etanola, vrijednosti svjetline se smanjuju. Uzorci su također manje svijetli s povećanjem koncentracije biljaka (40 g L^{-1} i 80 g L^{-1}). Pri manjim koncentracijama imele dolazi do ekstrakcije manje količine tvari koje mogu utjecati na boju i svjetlinu. Kako se količina biljaka povećava, razni pigmenti i tvari kao što su fenoli, minerali i kiseline ekstrahiraju se iz biljnog materijala u vodeno-alkoholnu bazu, smanjujući svjetlinu i čineći macerate tamnijim i mutnijim (Gironés-Vilaplana i sur., 2015). Štoviše, s povećanjem udjela etanola u vodeno-

alkoholnoj bazi raste i udio tvari topljivih u etanolu. Osim toga, svi macerati imaju pozitivne *a* i *b* vrijednosti, odnosno radi se o uzorcima crvene i žute nijanse. Vrijednosti navedenih kromatskih parametara nalaze se u širokom rasponu - komponenta *a* ima raspon od 1,48 do 37,88, dok komponenta *b* ima raspon od 58,80 do 88,51. Vrijednosti komponente *a* najveće su u uzorcima s visokom koncentracijom biljaka (80 g L^{-1}) (M3, M6, M9 i M12). Komponenta *b* ima najveće vrijednosti u uzorcima s koncentracijom bilja od 40 g L^{-1} (M4, M5 i M6). Vrijednosti komponente *b* su veće od vrijednosti komponente *a*, što znači da u uzorcima prevladavaju žute nijanse. Vrlo slične rezultate pokazalo je i istraživanje Hanousek Čiča i sur. (2020) za macerate rogača, gdje u većini uzoraka žute nijanse prevladavaju nad crvenim. Vrijednosti parametra *C* (ton boje, zasićenost) slične su onima za parametar *b*, kreću se u rasponu od 60,30 do 93,30. Jednako kao i za parametar *b*, najveće vrijednosti imaju uzorci s koncentracijom bilja od 40 g L^{-1} (M4, M5 i M6) među kojima najveću vrijednost od 93,3 pokazuje uzorak s 40 % v/v etanola (M5). Povećanjem vrijednosti parametra *C* udio čistoće u boji vizualno je veći. Kut nijanse (*h*) ima vrijednosti između 1,09 i 1,55. Uzorci s najmanjom koncentracijom biljaka (M1, M4, M7 i M10) imaju najveće *h* vrijednosti budući da boju macerata karakteriziraju žute nijanse različite svjetline. Povećanjem koncentracije imele u maceratima smanjuje se parametar *h*, pa se boje macerata približavaju crveno-ljubičastom spektru, iako sadrže i žute nijanse. Svi uzorci prema dobivenoj *h* vrijednosti nalaze se u crveno-ljubičastom i žutom spektru boja.

Svi komercijalni uzorci biske također su obojani i međusobno se vizualno razlikuju što potvrđuju i izmjereni kromatski parametri (tablica 13). Ispitivani uzorci biske imaju vrlo visoke vrijednosti parametra *L* koje se kreću u rasponu od 55,93 (B30) do 95,65 (B4) te su jako svijetli. Vrijednosti zasićenja *C* kreću se, slično kao i za parametar *b*, u velikom rasponu - od 12,17 za uzorak B4 do 97,04 za uzorak B20. Što je vrijednost ovog parametra veća, boja uzorka je čišća tj. udio čiste boje u ukupnom vizualnom doživljaju je veći. Vrijednosti parametra *b* u svim uzorcima su pozitivne što znači da imaju žutu nijansu, a nalaze se u širokom rasponu, od 11,74 (B4) do 94,41 (B20). Za razliku od parametra *b*, negativan parametar *a* izmjeren je u 13 uzoraka - B3, B4, B7, B12, B16, B18, B19, B21, B23, B26-B28, B31 što znači da ih uz žutu karakterizira i zelenkasta nijansa. Navedeni uzorci su i vizualno žuto-zelenkaste boje. Vrijednosti parametra *a* kreću se u rasponu od – 5,07 za uzorak B3 do 22,44 za uzorak B20. Za preostale uzorke, *a* vrijednosti su pozitivne te ih karakterizira crvenkasto-žuta boja. Iz rezultata se može primijetiti da se na temelju izmjerenih kromatskih parametara izdvajaju uzorci B3, B4, B20 i B30 koje karakteriziraju maksimalne ili minimalne

vrijednosti određenih parametara. Svi uzorci biske imaju nizak kut nijanse boje (između -1,56 i 1,57), što odgovara zeleno-žutom i žuto-narančastom području spektra Uzorci biske tamnije boje i žućkasto - smeđeg tona imaju niže *L* vrijednosti i veće vrijednosti *a* i *b*, što može biti posljedica dodatka karamela ili dužeg trajanja maceracije. Prema Uredbi (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća dodatak karamela kao sredstva za prilagodbu boje je u jaka alkoholna pića dozvoljen. Upotrebom karamela stvara se dojam da je jako alkoholno piće odležavalo u bačvama duži niz godina u slučaju žitnih i voćnih destilata ili da je za proizvodnju korišteno bilje u slučaju travarica i biljnih likera.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da karakteristična boja biske, kao i većine ostalih travarica, varira od slamnato žute do zelenkasto žute boje, te je rezultat postupka maceracije. Količina suhog ili svježeg lišća i trajanje maceracije utječu na boju biske. 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. Boja jakih alkoholnih pića važan je pokazatelj njihove kvalitete i igra ključnu ulogu među potrošačima. Čimbenici kao što su proces sušenja bilja, enzimsko i neenzimsko posmeđivanje utječu na konačnu boju bilja, a time i na boju macerata i konačnog proizvoda (Thamkaew i sur., 2021). Volumni udio etanola, vrijeme maceracije i količina bilja utječu na ekstrakciju biljnih pigmenata (npr. klorofila) u vodeno-alkoholnu bazu i povezani su s promjenama boje (Mujić, 2010; Hanousek Čiča i sur., 2020). Razgradnja ovih pigmenata dovodi do neenzimskog posmeđivanja i promjene boje macerata. Tamnija boja macerata može se objasniti i prisutnošću enzima polifenol oksidaze u biljci, koji uzrokuje stvaranje melanina i benzokinona iz fenola, što rezultira smeđom obojenošću (Mayer, 2006).

5.5.3. Profil aroma spojeva

Organoleptička svojstva važan su faktor kvalitete jakih alkoholnih pića i rezultat su jedinstvene i složene kombinacije hlapivih kemijskih spojeva koji potječu iz sirovina, nastaju tijekom fermentacije, destilacije i odležavanja destilata. Kvalitativan i kvantitativan sastav

aroma spojeva nekog jakog alkoholnog pića određuje se kemijskim analizama, dok potrošači promatraju njihova ukupna organoleptička svojstva. Aroma spojevi se u jakim alkoholnim pićima nalaze u različitim koncentracijama te neovisno o tome mogu imati različit, značajan ili neznačajan, doprinos ukupnoj aromi. Do sada je u literaturi objavljeno nekoliko radova o sastavu hlapivih spojeva ekstrakta imele (Hayashi i sur., 1996; Ćebović i sur., 2008; Vlad i sur., 2016; Wang i sur., 2019). Navedena istraživanja temelje se na kratkim postupcima ekstrakcije imele (od nekoliko minuta do par sati) vrućom vodom, superkritičnim CO_2 te smjesom etanola i metanola. Nadalje, analizirani podaci su vrlo raznoliki jer je imela parazitska biljka čiji sastav uvelike ovisi o stablu domaćinu, kao i o uvjetima rasta i geografskom podrijetlu (Luczkiewicz i sur., 2001; Nazaruk i Orlikowski, 2016; Pietrzak i Nowak, 2021; Kleszken i sur., 2022), što svakako utječe na sastav hlapivih spojeva u različitim ekstraktima. U dobivenim maceratima svi detektirani aroma spojevi potječu isključivo iz imele, jer je kao alkoholna baza korišten etanol poljoprivrednog podrijetla te je na temelju toga moguće definirati aroma spojeve karakteristične za imelu koje se tijekom maceracije ekstrahiraju u vodeno-alkoholnu bazu.

Analiza profila aroma spojeva pokazala je da svi macerati imele imaju određenu količinu hlapivih spojeva. U dobivenim maceratima primjenom GC-MS metode identificirano je više od 150 različitih spojeva svrstanih u 6 kemijskih skupina: kiseline, alkoholi, uključujući terpenske alkohole, aldehidi, esteri, ugljikovodici i terpeni. Analizom spojeva u pojedinim maceratima utvrđeno je da macerati s nižim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) imaju veći udio različitih kiselina, aldehida, alkohola, estera i ketona, dok su macerati s višim udjelom etanola (55 i 70 % v/v) bogati ugljikovodicima i terpenima (slika 40). Isti rezultat dobiva se i ako se analiza provodi prema relativnim udjelima (%) pojedinih skupina hlapivih spojeva u maceratima (slika 41) koji djelomično prate maseni udio biljnog materijala. Očekivalo se da će uzorci s 80 g L^{-1} imele imati najveću koncentraciju hlapivih spojeva. Međutim, uzorak M5 s 40 g L^{-1} imele i 40 % v/v etanola imao je najvišu koncentraciju hlapivih spojeva, posebice estera i ketona kao i najveći broj identificiranih spojeva, ukupno 42 (tablica 14). Razlog može biti zasićenost otopine drugim ekstrahiranim spojevima (pigmenti, fenoli, flavonoidi) čime se sprječava ekstrakcija hlapivih spojeva u visokim koncentracijama u maceratima s najvećim masenim udjelom imele. Hlapive kiseline općenito su najmanje zastupljeni spojevi koji se pojavljuju samo u pojedinim maceratima, dok su esteri bili najzastupljeniji. U maceratima je ukupno identificirano 9 različitih kiselina uključujući heptansku, nonansku i dekansku kiselinu, čiji su etil esteri također detektirani u maceratima. Ukupno je detektirano 40 estera,

od čega je 21 različit ester detektiran u više od jednog macerata. Esteri predstavljaju najvažniju skupinu spojeva koji doprinose aromi jakih alkoholnih pića jer imaju niske vrijednosti praga osjetljivosti (10-250 ppb) (Miller, 2019). Njihov doprinos aromi uvelike ovisi o njihovoj koncentraciji. Iz skupine estera u maceratima su najzastupljeniji etil esteri kratko- i srednjelančanih kiselina odgovorni za voćne i cvjetne note arome. Etil heksanoat piću daje voćnu aromu, pa je njegovo prisustvo poželjno. Etil oktanoat je oštriji i manje mirisan, dok je etil dekanoat manje intenzivan i ima masne tonove (Spaho, 2017). Etil esteri dugolančanih masnih kiselina utječu na aromu pića samo kada su prisutni u većim koncentracijama te imaju miris voska i stearinske kiseline. Zbog slabe topljivosti u vodi, macerati s većim volumnim udjelom etanola (55 i 70 % v/v) bogatiji su esterima dugolančanih kiselina. Macerati s nižim volumnim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) bogatiji su esterima kratko- i srednjelančanih kiselina: esterima maslačne, pentanske, heksanske, oktanske i dekanske kiseline (slika 41). Pretpostavlja se da ti etil esteri nastaju tijekom maceracije esterifikacijom s kiselinama imele. Uz estere, dominantna skupina spojeva u maceratima su alkoholi. Identificirano je 39 alkohola, od toga 14 u više od jednog macerata, s tim da su alkoholi bili zastupljeniji u maceratima s nižim volumnim udjelom etanola (25 i 40 % v/v) etanola. U tablici 15 prikazani su terpeni i terpenski alkoholi karakteristični za macerate biske. Macerat M9 je najbogatiji terpenskim spojevima. Zbog prisutnosti u visokim koncentracijama i niskog praga osjetljivosti terpenski spojevi imaju značajan doprinos ukupnoj aromi macerata. Za razliku od terpena koji su topljiviji u etanolu i više ih ima u maceratima s većim volumnim udjelom etanola (55 i 70 % v/v), terpenski alkoholi prisutni su i u maceratima s nižim volumnim udjelom etanola (25 i 40 % v/v). 1,8-cineol/eukaliptol i linalol, iako topljivi u etanolu, također su imali dobru topljivost u vodi (3500 mg L^{-1} za 1,8-cineol), što možda opravdava ovaj rezultat. 1,8-cineol je bio prisutan u gotovo svim uzorcima, kao i alkaloid oksim metoksi-fenil. Oksimi (R1R2C=NOH) su kemijski spojevi koji sadrže dušik i nastaju u biljci na važnim metaboličkim točkama. Većina biljnih oksima su metaboliti koji nastaju iz aminokiselina. Različite studije pokazale su da su terpeni biološki aktivni spojevi koji iskazuju antikancerogeno, antimikrobno i antioksidacijsko djelovanje te smanjuju rizik od nastanka kardiovaskularnih bolesti (Buchbauer, 2010). Stoga bi, uz fenolne spojeve, terpeni mogli doprinijeti antioksidacijskom i antiproliferacijskom djelovanju macerata imele. Od ketonskih spojeva najzastupljeniji su α-tujon i β-tujon te fenkon. Tujon je karakterističan za biljke poput pelina, kadulje, majčine dušice i ružmarina. Zbog toksičnosti propisana mu je maksimalno dozvoljena količina u pićima. U maceratima u kojima je utvrđena njegova prisutnost zbroj α-tujona i β-tujona iznosio je maksimalno 2,1 mg L^{-1}, što je znatno niže od

propisanih granica za alkoholna pića. Nadalje, identificirani su i teaspiran i *p*-menton. Od aldehida je u svom maceratima s 25 i 40 % v/v etanola utvrđena prisutnost benzaldehida i to koncentracijama iznad granične vrijednosti praga osjetljivosti, što potvrđuje njegov doprinos aromi navedenih macerata. Macerati s visokim volumnim udjelom etanola su bogati ugljikovodicima, posebice nezasićenim alifatskim ugljikovodicima s 10-17 ugljikovih atoma. Neki od njih, kao što su 1-undecen, 1-dodecen, 3-dodecen ili zasićeni heptadekan, hlapive su komponente ugodnog mirisa i nalaze se u sastavu nekih eteričnih ulja.

U istraživanju Wang i sur. (2019) u vodenom ekstraktu imele identificirano je ukupno 66 spojeva od kojih su ketoni, aldehidi i alkoholi bili najzastupljeniji. U skladu s našim rezultatima, Wang i sur. (2019) detektirali su aldehide, benzaldehid i oktanal kao i veliki broj terpena, te geranilaceton, *β*-linalol i metil-salicilat kao najzastupljenije pojedinačne spojeve koji značajno doprinose svježoj, drvenasto-orašastoj aromi s cvjetnim notama. Osim benzaldehida koji ima bademastu aromu, heksanal i oktanal imaju nizak prag osjetljivosti (Miller, 2019) i značajno pridonose aromi macerata. Keton geranilaceton doprinosi voćnoj i cvjetnoj aromi dok je *β*-linalol terpenski alkohol koji daje drvene, slatke i cvjetne note. Metilsalicilat koji je detektiran u maceratima ima cvjetne, voćne i slatke note (Katsuno i sur, 2014). Ylangen, *α*-bourbonen i *β*-bourbonen neki su od identificiranih terpena koji do sada prema literaturi nisu pronađeni u imeli. Ostali terpeni navedeni u tablici 15 otkriveni su u stabljikama i listovima imele (Hayashi i sur., 1996). Wang i sur. (2019) kao najznačajnije navode linalol i ionon, dok su Ćebović i sur. (2008) identificirali trans-*α*-bergamoten, trans-*β*-farnezen, loliolid i vomifoliol.

Aroma spojevi detektirani u uzorcima biske potječu iz biljnog materijala, prvenstveno imele te vodeno-alkoholne baze/destilata u kojem je biljni materijal maceriran. U analiziranim komercijalnim uzorcima biske (B1-B14) primjenom GC-MS metode ukupno je identificirano 166 spojeva: 53 estera, 32 alkohola, 25 terpena, 18 karbonilnih spojeva kao što su aldehidi i ketoni, 12 alkana, 9 acetala, 8 kiselina i 9 neidentificiranih spojeva. Popis detektiranih aroma spojeva prisutnih u uzorcima biske prikazan je u tablicama 16 i17. Između uzoraka biske utvrđene su razlike u profilu aroma spojeva. Pojedini aroma spojevi detektirani su u samo jednom uzorku, dok u pojedinim uzorcima nema spojeva prisutnih u svim ostalima. Do razlika može doći jer su uzorci proizvedeni od različitih vodeno-alkoholnih baza/destilata i od vrsta imele koje su rasle na različitim stablima domaćinima. Zanimljivo je da neke od spojeva pronađenih u imeli ne proizvodi sama biljka, već potječu iz stabla domaćina te se takvi spojevi mogu naći i u biski. Najmanji broj spojeva detektiran je u industrijski proizvedenim

uzorcima B14 – 19 spojeva, B8 – 20 spojeva i B9 – 24 spoja. Za uzorke B9 i B14 to je i očekivano budući da je za njihovu proizvodnju korišten rafinirani etanol kao vodeno-alkoholna baza. Uzorci B8 i B13 proizvedeni su od iste vrste vodeno-alkoholne baze, ali je uzorak B13 sadržavao znatno veći broj spojeva, ukupno 44. Osim upotrebe različitih vodeno-alkoholnih baza/destilata različite kvalitete na profil aroma spojeva utječe i dodatak drugih ljekovitih i aromatičnih biljnih vrsta što ovisi o recepturama proizvođača.

Esteri su, kao i u maceratima, najvažnija skupina spojeva u komercijalnim uzorcima biske. Međutim, zastupljenost pojedinih estera je nešto drugačija. U komercijalnim uzorcima najzastupljeniji je etil oktanoat, zatim etil dekanoat, etil heksanoat, etil dodekanoat i etil heksadekanoat. Ovi spojevi čine s 5-30% ukupnih aroma spojeva za etil heksanoat, 25-35% za etil oktanoat, 15-25% za etil dekanoat (osim uzorka B12), 2-7% za etil dodekanoat (osim uzorka B9) i 0,5-4 % za etil heksadekanoat i izopropil miristat. U maceratima je najzastupljeniji etil dekanoat, zatim ostali navedeni, te dodatno etenil ester mravlje kiseline koji nije detektiran u komercijalnim uzorcima. Razlike u zastupljenosti pojedinih estera mogu se objasniti razlikama u alkoholnoj bazi koja se koristi za maceraciju i proizvodnju biske kao i količinom macerata/biljke koja se koristi u pripremi komercijalnih uzoraka. Osim toga, etil dekanoat ima kraće vrijeme poluraspada od etil oktanoata, te ovisno o starosti alkoholnog pića, etil oktanoat može s vremenom postati najzastupljeniji ester u maceratima. U svakom uzorku biske detektirano je 5 estera: etil heksadekanoat , etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat i izopropil miristat. Nadalje, u svim uzorcima s izuzetkom uzorka B9, detektirani su i etil dodekanoat, etil pentadekanoat i dekanal. Ovi spojevi daju pozitivan doprinos općoj kvaliteti jakog alkoholnog pića, te su odgovorni su za njihove voćne i cvjetne note. Etil heksanoat ima aromu tropskog voća, a etil oktanoat je povezan s aromama banane i ananasa, dok se uljaste, voćne i arome grožđa pripisuju etil dekanoatu (Genovese i sur., 2004; Pino i Queris, 2011). Kaprilni eter (1,1'-oksibisoktan) također je detektiran u svim uzorcima osim u uzorku B3. Također se pojavljuju izobutilni i izoamilni esteri kratkolančanih masnih kiselina, koji se nazivaju "voćni esteri". Tešević i sur. (2005) otkrili su različite estere u starim šljivovicama, npr. metil oktanoat, etil heksanoat i 3-metilbutil dekanoat. Najzastupljeniji aldehid u uzorcima biske bio je dekanal, koji je identificiran u 13 uzoraka, a karakterizira ga slatka aroma naranče i citrusa (Orav i Kann, 2001). Ostali aldehidi uključuju benzaldehid, nonanal, heksadekanal i dodekanal. S izuzetkom ovih spojeva, aldehidi i ketoni općenito pokazuju vrlo niske koncentracije u destiliranim alkoholnim pićima. Ipak, zbog vrlo niskog praga osjetljivosti, mogu imati značajan utjecaj (Matijašević i sur., 2013). U analiziranim uzorcima biske otkriveni su i neki acetali, kao što su izovaleraldehid dietilacetal, acetaldehid

etilamil acetal, heksanal dietilacetal i oktanal dietilacetal. Iako destilati uglavnom sadrže niske količine acetala, važnost ove skupine aroma spojeva je značajna za ukupnu aromu destilata. Acetali niže molekularne težine imaju oštre i neugodne note, dok oni s većom molekularnom težinom, kao što je isovaleraldehid dietil acetal (1,1-dietoksi-3-metil butan), imaju ugodnu voćnu i biljnu aromu. Izovaleraldehid dietilacetal identificiran je u grožđu, konjaku, kalvadosu i brendiju, ali uvijek u vrlo malim količinama (Masino i sur., 2009). Heksanal dietilacetal ima aromu koja se opisuje kao 'konjak, kruška, cvjetna, jabuka, voćna', dok je aroma oktanaldietil acetala okarakterizirana kao 'zelena, citrus, uljasta i masna s drvenastom, začinskom i voćnom nijansom'. Od terpenskih alkohola identificirani su farnesol, karbitol, tujanol, nerol, linalol koji doprinose cvjetnim i voćnim aromama pića. Najznačajniji terpeni su L-limonen, D-limonen, α-terpinolen, β-burbonen i kamfen. Ti su spojevi identificirani u voću (kupine), bilju (npr. bosiljak) i začinima te su odgovorni za širok spektar ugodnih aroma (slatki, citrusni, biljni, cvjetni, drvenasti, terpenski, menta i začinski) (Deibler i Delwiche, 2003; Qian i Wang, 2005). Nonanol i dekanol su srednjelančani viši alkoholi. Viši alkoholi sastoje se uglavnom od n-alkohola C6 duljine lanca i aromatskih spojeva kao što je 2-fenil etanol. Prisutnost ovih spojeva daje cvjetne i slatkaste note piću (Camara i sur., 2007). 2-fenil etanol je detektiran je u 11 uzoraka. Sljedeća skupina identificiranih spojeva su masne kiseline: palmitinska, oleinska i miristinska kiselina. Prema rezultatima Varnam i Sutherland (1994), prisutnost masnih kiselina u konjaku povezana je s biomasom kvasca. U jakim alkoholnim pićima poput armagnaca masne kiseline su esterificirane. U uzorcima biske također su identificirani esteri masnih kiselina, npr. izobutil kaprilat, izobutil kaprat i metil oleat.

p-cimen je također otkriven u ulju dobivenom iz listova i stabljika imele (Luebke, 1997). Limonen je bezbojna tekućina koja se nalazi u eteričnim uljima bora i citrusa, a postoji u dva izomerna oblika, tj. L-limonen i D-limonen. L-Limonen se komercijalno obično koristi kao miris. D-limonen je jedan od najčešćih terpena u prirodi (Sun, 2007). Etilbenzoat je ester koji ima aromu opisanu kao 'sladak, zimzelen, voćni, trešnje, grožđa' (31). Nadalje, etil 2-hidroksiizovalerat i L-mentil acetat određeni su isključivo u uzorcima B9 i B14. L-Mentilacetat je prirodni monoterpen i acetatni ester mentola. Otkriven je zajedno s mentolom i mentonom u eteričnim uljima mente (Djenane i sur., 2012). Mentil acetat čini 3-5% hlapljivog ulja *M. piperita*, pridonoseći njegovom mirisu i okusu. Također je otkriven u nekim drugim biljkama poput kadulje (Reverchon i Taddeo, 1995). Etil 2-hidroksiizovalerat (etil 2-hidroksi-3-metilbutanoat) ima voćni miris jagode. Ovaj hidroksi ester detektiran je kao

hlapivi spoj borovnice i vina (Hirvi i Honkanen, 1983) a pridonosi i aromi ananasa (Elss i sur., 2005). Nadalje, ciklopentil 4-etil benzoat i β-tujon nalaze se u uzorku B9. β-tujon je povezan s organoleptičkim svojstvima opisanim kao ' cedar, tujonski, pikantni' ili 'drvenasti' (Luebke, 1997), dok odgovarajući podaci za 4-etil benzoat nisu pronađeni u dostupnoj literaturi. Prema Hayashi i sur. (1996), identificirano je više od 200 spojeva u eteričnom ulju tri različite vrste imele (*Viscum album* var. *coloratum*, *Viscum album* i *Taxillus kaempferi*). Studija je pokazala različiti sastav hlapivih spojeva imele iako pripadaju istoj porodici *Loranthaceae*. Glavni spojevi bile su heksanska, oktanska i dekanska kiselina, koje su također pronađene u uzorcima biske u obliku etilnih i metilnih estera (tablica 16 i 17, slika 42) i odgovarajućih viših alkohola (heksadekanol, 2-heksildekanol, 2-etildekanol, tetradekanol). Također, detektirani su i terpeni, poput eukaliptola, linaloola, *p*-cimena, *α*-humulena, kamfora, nerola i farnezola. Na osnovu dobivenih rezultata uzoraka može se zaključiti da korištena alkoholna baza definira profil aroma spojeva komercijalnih uzoraka biske. Alkoholne baze razlikuju se po kvalitativnom i kvantitaivnom sastavu hlapivih spojeva u ovisnosti o kvaliteti polaznih sirovina i proizvodnom procesu. Nadalje, tijekom starenja/odležavanja pića kemijski sastav se mijenja jer kemijski spojevi međusobno reagiraju te dolazi do nastanka novih spojeva. Kao što je već navedeno, imela sadrži spojeve koji potječu od stabla domaćina, dok neki spojevi mogu nastati tijekom procesa sušenja biljnog materijala (Hayashi i sur., 1996).

6. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti slijedeće:

1. Optimalni parametri procesa maceracije imele u vodeno-etanolnoj bazi pri kojima se postiže najveći sadržaj biološki aktivnih spojeva kao nosioca funkcionalnih svojstava su: 80 g L^{-1} imele, 55 % v/v vodeno-etanolna baza te trajanje maceracije 3 tjedna.

2. Analizom fitokemijskog profila utvrđeno je da macerati imele i prikupljeni uzorci biske sadrže fenolne spojeve – fenolne kiseline, flavonoide i kumarine. Fenolni spojevi se tijekom maceracije ekstrahiraju iz imele, a na njihov sadržaj utječu ispitivani parametri maceracije pri čemu statistički značajan utjecaj imaju masena koncentracija biljnog materijala i trajanje samog procesa. Porastom masene koncentracije imele u vodeno-alkoholnoj bazi raste sadržaj ukupnih fenolnih spojeva, ali i vremenski period potreban za njihovu ekstrakciju. Prikupljeni komercijalni uzorci biske se značajno razlikuju prema sadržaju ukupnih fenolnih spojeva. U većini uzoraka biske sadržaj ukupnih fenolnih spojeva manji je od sadržaja fenolnih spojeva u maceratu M9, dobivenom primjenom optimalnih parametara maceracije što ukazuje na nužnost primjene znanstveno utvrđenih optimalnih parametara u proizvodnji biske.

3. Svi ispitani uzorci su pokazali određena antioksidacijska svojstva koja ovise o sadržaju fenolnih spojeva, većinom flavonoida. U skladu s tim, izraženija antioksidacijska svojstva pokazali su uzorci s većim sadržajem ukupnih fenolnih spojeva. Analiza korelacije potvrdila je da fenolni spojevi prisutni u uzorcima imaju veliki antioksidacijski potencijal. Međutim, antioksidacijska svojstva uzoraka ne mogu se pripisati samo fenolnim spojevima već su ona rezultat sinergističkog učinka svih biološki aktivnih spojeva prisutnih u uzorcima, prvenstveno onih koji potječu iz imele. U maceratima svi biološki aktivni spojevi potječu isključivo iz imele dok u uzorcima biske, osim imele kao osnovne biljke, njihov izvor mogu biti i druge korištene biljke, med i/ili destilati odležali u bačvama.

4. Ispitivani uzorci macerata i komercijalnih uzoraka biske su prema odabranim test-mikroorganizmima pokazali zanemarivu antimikrobnu aktivnost.

5. Većina ispitanih uzoraka pokazala je antiproliferacijski učinak na dvije korištene humane stanične linije, uglavnom ovisan o pojedinom uzorku i primijenjenoj dozi. Macerat M9, s najvećim sadržajem ukupnih fenolnih spojeva i M12, s najvećim sadržajem ukupnih flavonoida i najvećim ACI, pokazuju izraženiji inhibicijski učinak na tumorske HeLa stanice nego na normalne HaCaT stanice. Ispitani komercijalni uzorci biske imaju manji antiproliferacijski učinak na obje stanične linije.

6. Fenolni spojevi u maceratima u uvjetima *in vitro* gastrointestinalne probave nisu stabilni budući da su sadržaj ukupnih fenolnih spojeva i ukupnih flavonoida kao i njihova antioksidacijska svojstva značajno manja u odnosu na početne, neprobavljene uzorke.

7. Određeni fizikalno-kemijski parametri uzoraka (pH vrijednost, sadržaj ukupnih kiselina i ukupnog ekstrakta, volumni udio etanola, kromatski parametri te profil aroma spojeva) rezultat su proizvodnog postupka: kvalitete i količine biljnog materijala, kvalitete vodeno-alkoholne baze te procesnih parametara maceracije.

8. Dobiveni rezultati i izvedeni zaključci potvrđuju hipotezu istraživanja da tradicionalna istarska travarica biska sadrži biološki aktivne spojeve imele (fenolne kiseline, flavonoide i kumarine) odgovorne za njena funkcionalna svojstva. Udio biološki aktivnih spojeva u biski ovisi o ispitivanim parametrima maceracije. Primjenom optimalnih parametara određenih u ovom istraživanju moguće je unaprijediti proizvodni postupak u cilju proizvodnje biske boljih funkcionalnih svojstava što će doprinijeti dodatnoj valorizaciji biske kao tradicionalnog, autohtonog proizvoda.

7. LITERATURA

1. Abdallah, H.M., Farag, M.A., Abdel-Naim, A.B., Ghareib, S.A., Abdel-Sattar, E.A. (2015) Mechanistic evidence of *Viscum schimperi* (*Viscaceae*) Antihyperglycemic activity: from a bioactivity-guided approach to comprehensive metabolite profiling. *Phyther Res.*, **29**(11), 1737–43. https://doi.org/10.1002/ptr.5424
2. Alamprese, C. (2005) Characterization and antioxidant activity of nocino liqueur. Food *Chemistry*, **90**, 495–502.
3. Albano, E., Clot, P., Morimoto, M., Tomasi, A., Ingelman-Sundberg, M., French, S.W. (1996) Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology*, **23**, 155-163.
4. Alday, E., Valencia, D., Carreño, A.L., Picerno, P., Piccinelli, A.L., Rastrelli, L., et al. (2015) Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line. *Chem Biol Interact,* **242**, 35–44. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.013.
5. Ali, A., Bashmil, Y.M., Cottrell, J.J., Suleria, H.A.R., Dunshea, F.R. (2021) LC-MS/MS-QTOF Screening and Identification of Phenolic Compounds from Australian Grown Herbs and Their Antioxidant Potential. *Antioxidants*, **10**, 1770. https://doi.org/10.3390/ antiox10111770
6. Alves, L. A., Almeida e Silva, J. B., Giulietti, M. (2007) Solubility Of d-Glucose In Water and Ethanol/Water Mixtures. *J Chem Eng Dana,* **52**(6), 2166–2170. doi:10.1021/je700177n
7. Amer, B., Juvik, O.J., Francis, G.W., Fossen, T. (2013) Novel GHB-derived natural products from European mistletoe (*Viscum album*). *Pharm Biol,* **51**(8), 981–986.
8. Ammar, S., del Mar Contreras, M., Belguith-Hadrich, O., Bouaziz, M., Segura-Carretero, A. (2015) New insights into the qualitative phenolic profile of *Ficus carica* L. fruits and leaves from Tunisia using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry and their antioxidant activity. *RSC Adv*, **5**, 20035–20050.
9. Andreou, V., Strati, I. F., Fotakis, C., Liouni, M., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V. J. (2018) Herbal distillates: A new era of grape marc dis- tillates with enriched antioxidant profile. *Food Chem*, **253**, 171-178. https://doi.org/ 10.1016/j.foodchem.2018.01.162.
10. Anonymus 1, <https://www.tz-buzet.hr/hr/gastronomija/biska>
11. ANSM, (2012) Mistletoe from the apple tree. France: French National Agency for Medicines and Health Products Safety. French Pharmacopoeia, https:// www.ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7f95691f825881bf869c78d 533eabc7c.pdf.
12. 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.
13. Arda, N., Onay, E., Koz, O., Kirmizigul, S. (2003) Monosaccharides and polyols from mistletoes (*Viscum album* L.) growing on two different host species. *Biol Bratislava*, 58, 1037–1041.
14. Arranz, S., Chiva-Blanch, G., Valderas-Martínez, P., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventós, R. M., Estruch, R. (2012) Wine, Beer, Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. *Nutrients*, **4**(7), 759-781. doi: 10.3390/nu4070759
15. Aubert, C., Baumann, S., Arguel, H. (2005) *J. Agric. Food Chem*, **53**, 8881.
16. Bamba, B.S.B., Shi, J., Tranchant, C.C., Xue, S.J., Forney, C.F., Lim, L.-T. (2018) Influence of Extraction Conditions on Ultrasound-Assisted Recovery of Bioactive

Phenolics from Blueberry Pomace and Their Antioxidant Activity. *Molecules*, **23**, 1685. https://doi.org/10.3390/molecules23071685
17. Barros, A., Gouvinhas, I., Machado, N., Pinto, J., Cunha, M., Rosa, E., Domínguez-Perles, R. (2016) New grape stems-based liqueur: Physicochemical and phytochemical evaluation. *Food Chem*, **190**, 896–903.
18. Bašić, Ž. (2006) Voda života: povijest proizvodnje alkoholnih pića, Tiskara Malenica, Šibenik.
19. Benzie, F.F., Strain, J.J. (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Method Enzymol*, **299**, 15–23.
20. Boban, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-Polic, V., Boban, M. (2010) Antimicrobial effects of wine: separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. *Journal of Food Science*,**75**(5), M322-M326.
21. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT,* **28**, 25-30.
22. Buchbauer, G. (2010) Biological activities of essential oils. Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, pp. 235 – 280.
23. Buglass, A.J., Caven-Quantrill, D.J. (2012) Applications of natural plant extracts in alcoholic drinks. U: Natural food additives, ingredients and flavourings(Baines, D., Seal, R., ured.), Woodhead, Cambridge, UK, str. 358–416.
24. Burdock, G.A. (2010) Fenaroli's Hand Book of Flavor Ingredients, CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
25. Bussing, A. (2003) Mistletoe: the genus Viscum, arwood Academic Publishers, Amsterdam.
26. Buyel, J. F. (2018) Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv,* **36 (**2), 506–520. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.02.002
27. Caesar, L.K., Cech, N.B. (2019) Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Nat Prod Rep*, **36**(6), 869-888.
28. Caldeira, I., Lopes, D., Delgado, T., Canas, S., Anjos, O. (2018) Development of blueberry liquor: Influence of distillate, sweetener and fruit quantity. *J Sci Food Agric,* **98**, 1088–1094.
29. Camara, J. S., Marques, J. C., Perestrelo, R. M., Rodrigues, F., Oliveira, L., Andrade, P., and Caldeira, M. (2007) Comparative study of the whisky aroma profile based on headspace solid phase microextraction using different fibre coatings. *J Chromatogr A*, **1150**, 198–207.
30. Carocho, M., Barros, L., Bento, A., Santos-Buelga, C., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R. (2014) *Castanea sativa* Mill. Flowers amongst the Most Powerful Antioxidant Matrices: A Phytochemical Approach in Decoctions and Infusions. *Biomed Res Int*, 232956.
31. Cassidy, L., Fernandez, F., Johnson, J. B., Naiker, M., Owoola, A. G., Broszczak, D. A. (2020) Oxidative stress in Alzheimer's disease: A review on emergent natural polyphenolic therapeutics. *Complementary Therapies in Medicine*, **49**, 102294. https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102294
32. Cendrowski, A., Ścibisz, I., Kieliszek, M., Kolniak-Ostek, J., Mitek, M. (2017) UPLC-PDA-Q/TOF-MS Profile of Polyphenolic Compounds of Liqueurs from Rose Petals (*Rosa rugosa*). *Molecules*, ***22***, 1832. https://doi.org/10.3390/molecules22111832
33. Ceyhan, N., Keskin, D., Uğur, A. (2012) Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microoorganisms. *Journal of Food, Agriculture Environment*, **10**(1), 193-197.

34. Chai, Q., B. Wu, W. Liu, L. Wang, C. Yang, Y. Wang, J. Fang, Y. Liu, S. Li. (2006) *Food Chem*, **130**, 432.
35. Chang, S. K. (2019) How food structure and processing affect the bioavailability of nutrients and antioxidants. U: Encyclopedia of Food Chemistry (Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 158-166.
36. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.S., Abert-Vian, M. (2017) Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason Sonoche,* **34**, 540–560.
37. Choudhary, M.I., Maher, S., Begum, A., Abbaskhan, A., Ali, S., Khan, A., Rehman, S.U., Rahman, A.U. (2010) Characterization and antiglycation activity of phenolic constituents from *Viscum album* (European mistletoe). *Chem Pharm Bull,* **58**(7), 980–982.
38. Clarke, G., Ting, K., Wiart, C., Fry, J. (2013) High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. *Antioxidants*, **2**(1), 1-10.
39. Coelho, E.M., de Souza, M.E.A.O., Corrêa, L.C., Viana, A.C., de Azevêdo, L.C., dos Santos Lima, M. (2019) Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mango Peel Liqueurs (*Mangifera indica* L.) Produced by Different Methods of Maceration. *Antioxidants, **8***, 102. https://doi.org/10.3390/antiox8040102
40. Cosmulescu, S., Trandafir, I., Nour, V., Ionica, M., Tutulescu, F. (2014) Phenolics Content, Antioxidant Activity and Color of Green Walnut Extracts for Preparing Walnut Liquor. *Not Bot Horti Agrobo,* **42**(2), 551-555. doi:10.15835/nbha4229649
41. Crestani, C. E., Bernardo, A., Costa, C. B. B., Giulietti, M. (2013) Fructose Solubility in Mixed (Ethanol + Water) Solvent: Experimental Data and Comparison among Different Thermodynamic Models. *J Chem Eng Dana*, **58**(11), 3039–3045. doi:10.1021/je400471m
42. Ćebović, T., Spasić, S., Popović, M. (2008) Cytotoxic effects of the *Viscum album* L. extract on Ehrlich tumour cells *in vivo*. *Phytother Res*, **22**, 1097–1103.
43. Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., Ibric, S. (2016) Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chem*, **194**, 135–142.
44. Da Silva, H.R., da Cruz de Assis, D., Lafourcade Prada, A., Carrera Silva, J.O., de Sousa, M.B., Ferreira, A.M., Rodríguez Amado J.R., de Oliveira Carvalho, H., Tavares de Lima Teixeira dos Santos, A.V., Tavares Carvalho, J.C. (2019) Obtaining and characterization of anthocyanins from *Euterpe oleracea* (açaí) dry extract for nutraceutical and food preparations. *Rev Bras Farmacogn*, **29**, 677–685.
45. de Olievera Melo, M.N., Oliveira, A.P., Wiecikowski, A.F., Carvalho, R.S., et al. (2018) Phenolic compounds from *Viscum album* tinctures enhanced antitumor activity in melanoma murine cancer cells. *Saudi Pharm J,* **26**(3), 311–22.
46. De Salvo, K.B., Olson, R., Casavale, K.O. (2016) Dietary Guidelines for Americans, Office of the Assistant Secretary for Health, US Department of Health and Human Services, 200 Independence Ave SW, Washington, DC 20201.
47. Deibler, K. D., Delwiche, J. (2003) Handbook of Flavour Characterization: Sensory Analysis, Chemistry, And Physiology, CRC Press, Boca Raton, RL, str. 442–443.
48. Delebinski, C. I., Jaeger, S., Kemnitz-Hassanin, K., Henze, G., Lode, H. N., Seifert, G. J. (2012) A new development of triterpene acid-containing extracts from *Viscum album* L. displays synergistic induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Prolif*, **45**(2), 176–187. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00801.x

49. Deliorman Orhan, D., Calis, I,, Ergun, F. (2002) Two new flavonoid glycosides from *Viscum album* ssp. *album*. *Pharm Biol,* **40**(5), 380–383.
50. Deliorman Orhan, D., Orhan, I. (2006) Fatty acid composition of *Viscum album* subspecies from Turkey. *Chem Nat Compd*, **42**, 641–644.
51. Dent, M., Dragović-Uzelac, V., Penić, M., Brnčić, M., Bosiljkov, T., Levaj, B. (2013) The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol Biotechnol,* **51**, 84–91.
52. Dewick, P.M. (2002) Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Hoboken.
53. Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idire, L., Gómez, D., Roncalés, P. (2012) Antioxidant and antibacterial effects of Lavandula and Mentha essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. *Meat Sci*, **92**, 667–674.
54. 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.
55. Elez Garofulić, I., Kruk, V., Martić, A., Martić, I., Zorić, Z., Pedisić, S., Dragović, S., Dragović-Uzelac, V. (2020) Evaluation of Polyphenolic Profile and Antioxidant Activity of *Pistacia lentiscus* L. Leaves and Fruit Extract Obtained by Optimized Microwave-Assisted Extraction. *Foods*, **9**, 1556. https://doi.org/10.3390/foods9111556
56. Elluru, S.R., Duong, D., Van Huyen, J.P., Delignat, S., Prost, F., Heudes, D., Kazatchkine, M.D., Friboulet, A., Kaveri, S.V. (2009) Antiangiogenic properties of *Viscum album* extracts are associated with endothelial cytotoxicity. *Anticancer Res*, **29**, 2945–2950.
57. Elss, S., Preston, C., Hertzig, C., Heckel, F., Richling, E., Schreier, P. (2005) Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr.) and pineapple products. *LWT-Food Sci Technol,* **38**, 263–274.
58. Escher, P., Eiblmeier, M., Hetzger, I., Rennenberg, H. (2004) Seasonal and spatial variation of carbohydrate sin mistletoes (*Viscum album*) and the xylems apofits hosts (*Populus x euamericana* and *Abie salba*). *Physiol Plant*, **120**(2), 212–219. doi:10.1111/j.0031-9317.2004.0230.x
59. Estko, M., Baumgartner, S., Urech, K., Kunz, M., Regueiro, U., Heusser, P., Weissenstein, U. (2015) Tumour cell derived effects on monocyte/macrophage polarization and function and modulatory potential of *Viscum album* lipophilic extract *in vitro*. *BMC Complement. Alternat Med,* **15**, 130.
60. European Medicines Agency. Assessment report on *Viscum album* L., herba. EMA/HMPC/246778/2009/https://www.ema.europa.eu/en/documents/ herbareport/final-assessment-report-viscum-album-l-herba_en.pdf
61. Freuding, M., Keinki, C., Micke, O., Buentzel, J., Huebner, J. (2019) Mistletoe in oncological treatment: a systematic review : Part 1: survival and safety. *J Cancer Res Clin Oncol*, **145**(3), 695-707.
62. Galvão, A. C., Robazza, W. S., Sarturi, G. N., Goulart, F. C., Conte, D. (2016) Sucrose Solubility in Binary Liquid Mixtures Formed by Water–Methanol, Water–Ethanol, and Methanol–Ethanol at 303 and 313. *K J Chem Eng Dana,* **61**(9), 2997–3002. doi:10.1021/acs.jced.5b01102
63. Gao, Y., Van Belkum, M. J., Stiles, M. E. (1999). The outer membrane of Gram-negative bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(10), 4329-4333.

64. Garcia, C. S. C., Ely, M. R., Wasum, R. A., Zoppa, B. C. D. A., Wolhheim, C., Neves, G. Â., Souza, K. C. B. D. (2013) Assessment of *Salvia officinalis* (L.) hydroalcoholic extract for possible use in cosmetic formulation as inhibitor of pathogens in the skin. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, **33**(4), 509-514.
65. García-García, J.D., Anguiano-Cabello, J.C., Arredondo-Valdés, R., Candido del Toro, C.A., Martínez-Hernández, J.L., Segura-Ceniceros, E.P., Govea-Salas, M., González-Chávez, M.L., Ramos-González, R., Esparza-González, S.C., et al. (2021) Phytochemical Characterization of *Phoradendron bollanum* and *Viscum album* subs. *austriacum* as Mexican Mistletoe Plants with Antimicrobial Activity. *Plants*, **10**, 1299. https://doi.org/10.3390/plants10071299
66. Gardin, N.E. (2009) Immunological response to mistletoe (*Viscum album* L.) in cancer patients: a four-case series. *Phytother Res,* **23**, 407-411.
67. Genovese, A., Ugliano, M., Pessina, R., Gambuti, A., Piombino, P., Moio, L. (2004) Comparison of the aroma compounds in apricot (*Prunus armeniaca*, L. Cv. Pellecchiella) and apple (*Malus pumila*, L. Cv. Annurca) raw distillates. *Ital J Food Sci*, **16**, 185–196.
68. Ghasemi, P. A., Jahanbazi, P., Enteshari, S., Malekpoor, F., Hamedi, B. (2010) Antimicrobial activity of some Iranian medicinal plants. *Archives of Biological Sciences*, **62**(3), 633-641.
69. Gironés-Vilaplana, A., Calín-Sánchez, Á., Moreno, D.A., Carbonell Barrachina, Á.A., García-Viguera, C. (2015) Novel maqui liquor using traditional pacharán processing. *Food Chem*, **173**, 1228–1235.
70. Gorjanović, S.Z., Novaković, M.M., Potkonjak, N.I., Sužnjević, D.Z. (2010a) Antioxidant activity of wines determined by a polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenge. *J Agric Food Chem*, **58**, 4626–4631.
71. Gorjanović, S.Z., Novaković, M.M., Vukosavljević, P.V. et al (2010b) Polarographic assay based on hydrogen peroxide scavenging in determination of antioxidant activity of strong alcohol beverages. *J Agric Food Chem*, **58**, 8400–8406.
72. Grba, S., Stehlik-Tomas, V. (2010) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Plejada d.o.o., Zagreb, str. 229-264.
73. Gronbaek, M., Deis, A., Sorensen, T.I., Becker, U., Schnohr, P., Jensen, G. (1995) Mortality associated with moderate intakes of wine, beer, or spirits. *BMJ*, *310*, 1165-1169.
74. Gupta, A., Ellis, M.E., Oduse, K.A. (2013) The roles of phytochemicals in red wine as a protective agent against alcohol damage. *Int Food Res J*, **20**(3), 1191-1197.
75. Gutiérrez-Grijalva, E.P., Ambriz-pére, D.L., Leyva-lópez, N., Castillo-lópez, R.I., Heredia, J.B. (2016) Review: Dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Arch Latinoam Nutr,* **66**, 87–100.
76. Haas, K., Bauer, M.,Wollenweber, E. (2003) Cuticular waxes and flavonol aglycones of mistletoes. *Z Naturforsch C*, **58**, 464–470.
77. Haminiuk, C. W. I., Plata-Oviedo, M. S. V., de Mattos, G., Carpes, S. T., Branco, I. G. (2012) Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformisus* in different solvents. *J Food Sci Technol,* **51**(10), 2862–2866. doi:10.1007/s13197-012-0759-z
78. Han, S.Y., Hong, C.E., Kim, H.G., Lyu, S.Y. (2015) Anti-cancer effects of enteric-coated polymers containing mistletoe lectin in murine melanoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cell Biochem*, **408**, 73–87.
79. Handa, S.S. (2008) An Overview of Extraction Techniques for Medicinal and Aromatic Plants. U: Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. (Handa, S.S., Khanuja S.P.S., Longo, G., Rakesh D.D., ured.). International Centre for Science and High Technology, Trieste, str. 22-23

80. Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Srečec, S., Filipan, K., Blažić, M., Stanzer, D. (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions. *Food Sci Nutr*, **8**(2), 942-954. doi:10.1002/fsn3.1374
81. Hanousek Čiča, K., Rupert, M., Koczoń, P., Derewiaka, D., Gajdoš-Kljusurić, J., Petravić-Tominac, V., Mrvčić, J., Stanzer, D. (2018) Characterisation of Flavour Compounds in Biska - a Herbal Spirit Produced with Mistletoe. *J Inst Brew,* **125**, 143–154. doi:10.1002/jib.526.
82. Hayashi, S., Miyamoto, E., Kudo, K., Kameoka, H., and Hanafusa, M. (1996) Comparison of the volatile components of three mistletoes. *J Essent Oil Res*, **8**, 619–626.
83. Hirvi, T., Honkanen, E. (1983) The aroma of blueberries. *J. Sci. Food Agric,* **34**, 992–996.
84. Holandino, Carla & Melo, Michelle & Passos Oliveira, Adriana & da Costa Batista, Joao & Alves, Marcia & Capella, Márcia & Garrett, Rafael & Grazi, Mirio & Ramm, Hartmut & Torre, Claudia & Schaller, Gerhard & Urech, Konrad & Weissenstein, Ulrike & Baumgartner, Stephan (2020) Phytochemical analysis and *in vitro* antiproliferative activity of *Viscum album* ethanolic extracts. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, **20**.
85. Huber, R., Rostock, M., Goedl, R., Ludtke, R., Urech, K., Buck, S., Klein, R. (2005) Mistletoe treatment induces GM-CSF- and IL-5 production by PBMC and increases blood granulocyte- and eosinophil counts: a placebo controlled randomized study in healthy subjects. *Eur J Med Res*, **10**, 411–418.
86. 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.
87. Idžojtić, M., Glavaš, M., Zebec, M., Pernar, R., Beuk, P. i Prgić, I. (2006) Intenzitet zaraze žutom i bijelom imelom na području uprava šuma podružnica Vinkovci i Nova Gradiška. *Šumarski list*, **130** (9-10), 399-409.
88. Issa-Issa, H., Ivanišová, E., Noguera-Artiaga, L., Kántor, A., López-Lluch, D., Kačániová, M., et al. (2019) Effect of the herbs used in the formulation of a Spanish herb liqueur, Herbero de la sierra de Mariola, on its chemicaland functional compositions and antioxidant and antimicrobial activities. *Eur Food Res Technol*, **245**, 1197–1206.
89. Jager, S., Winkler, K., Pfuller, U., Scheffler, A. (2007) Solubility studies of oleanolic acid and betulinic acid in aqueous solutions and plant extracts of *Viscum album* L. *Planta Med*, **73**, 157–162.
90. Jana, D., Ghorai, S. K., Jana, S., Dey, P. P. (2014) Determination of antimicrobial activity of rice based fermented beverage-Haria/Handia. *International Journal of Current Research and Academic Review*, **2**(5), 85-91.
91. Janssen, S., Laermans, J., Verhulst, P. J., Thijs, T., Tack, J., Depoortere, I. (2011) Bitter taste receptors and α-gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **108**(5), 2094-2099.
92. Jara-Palacios, M.J., Gonçalves, S., Hernanz, D., Heredia, F.J., Romano, A. (2018) Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of different white winemaking byproducts extracts. *Food Res Int,* **109**, 433–439.
93. Jin, U.H., Lee, J.Y., Kang, S.K., Kim, J.K., Park, W.H., Kim, J.G., Moon, S.K., Kim, C.H. (2005) A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. *Life Sci*, **77**, 2760–2769.
94. Jones, V., Katiyar, S.K. (2013) Emerging phytochemicals for prevention of melanoma invasion. *Cancer Lett,* **335**, 251–258.

95. Jovanović, A., Petrović, Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski B. (2017) Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*, **37**, 45-49.
96. Jurinjak Tušek, A, Marić, L, Benković, M, Valinger, D, Jurina, T, Gajdoš Kljusurić, J. (2020) *In-vitro* digestion of the bioactives originating from the *Lamiaceae* family herbal teas: A kinetic and PLS modeling study. *J Food Biochem*, **44**, e13233. https://doi.org/10.1111/jfbc.13233
97. Karabegović, I. T., Vukosavljeviš, P. V., Novaković, M. M., Gorjanoviš, S. Ž., Džamić, A. M., Lazić, M. L. (2012) Influence of the storage on bioactive compounds and sensory attributes of herbal liqueur. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **7**(4), 1587-1598.
98. Katsuno, T., Kasuga, H., Kusano, Y., Yaguchi, Y., Tomomura, M., et al. (2014) Characterisation of odorant compounds and their biochemical formation in green tea with a low temperature storage process. *Food Chemistry*, **148**, 388−95.
99. Kazazić, S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, **55**, 279-290.
100. Ke, J.-Y., Banh, T., Hsiao, Y.-H., Cole, R.M., Straka, S.R., Yee, L.D., et al. (2017) Citrus flavonoid naringenin reduces mammary tumor cell viability, adipose mass, and adipose inflammation in obese ovariectomized mice. *Mol Nutr Food Res,* **61**(9). https://doi.org/10.1002/mnfr.201600934
101. Kellermann, E. (1960) Quick method for determination of alcohol in solutions and mashes. *Kvasny prumysl*.
102. Khatun, A., Rahman, M., Rahman, M.M., Hossain, H., Jahan, I.A., Nesa, L. (2016) Antioxidant, antinociceptive and CNS activities of *Viscum orientale* and high sensitive quantification of bioactive polyphenols by UPLC. *Front Pharmacol*, **7**, 176.
103. Kienle, G.S., Mussler, M., Fuchs, D., Kiene, H. (2016) Intravenous mistletoe treatment in integrative cancer care: a qualitative study exploring the procedures, concepts, and observations of expert doctors. *Evid Based Complement Altern Med*, **2016**, 1–16.
104. Kim, Y., Kim, I., Park, C.H., Kim, J.B. (2018) Korean mistletoe lectin enhances natural killer cell cytotoxicity via upregulation of perforin expression. *Asian Pac J Allergy Immunol,* **36**, 175–183.
105. Kleszken, E., Timar, A.V., Memete, A.R., Miere, F., Vicas, S.I. (2022) On Overview Of Bioactive Compounds, Biological And Pharmacological Effects Of Mistletoe (*Viscum Album* L). *Pharmacophore*, **13**(1), 10-26. https://doi.org/10.51847/Tmo2sXGQRs
106. Ko, B.-S., Kang, S., Moon, B. R., Ryuk, J. A., Park, S. (2016) A 70% ethanol extract of mistletoe rich in Betulin, betulinic acid, and Oleanolic acid potentiated β-cell function and mass and enhanced hepatic insulin sensitivity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2016**, 1–13.
107. Kusi, M., Shrestha, K., Malla, R. (2015) Study on Phytochemical, Antibacterial, Antioxidant and Toxicity Profile of *Viscum album* Linn Associated with Acacia catechu. *Nepal J Biotechnol*, **3**(1), 60-65.
108. Lee, H.K., Choi, Y.M., Noh, D.O., Suh, H.J. (2005) Antioxidant effect of Korean traditional lotus liquor (Yunyupju). *Int J Food Sci Technol*, **40**, 709–715.
109. Leu, Y.L., Hwang, T.L., Chung, Y.M., Hong, P.Y. (2006) The inhibition of superoxide anion generation in human neutrophils by *Viscum coloratum*. *Chem Pharm Bull,* **54**(7), 1063–1066.
110. Li, W., Beta, T. (2011). Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of anthograin liqueur. *Food Chemistry*, **127**(3), 968-975.

111. Librán, C.M., Mayor, L., Garcia-Castello, E.M., Vidal-Brotons, D. (2013) Polyphenol extraction from grape wastes, solvent and pH effect. *Agric Sci,* **4**, 56–62.
112. Lin, Y. T., Vattem, D., Labbe, R. G., Shetty, K. (2005) Enhancement of antioxidant activity and inhibition of *Helicobacter pylori* by phenolic phytochemical-enriched alcoholic beverages. *Process Biochemistry*, **40**(6), 2059-2065.
113. Lindberg, M.L., Amsterdam, E.A. (2008) Alcohol, wine, and cardiovascular health. *Clin Cardiol*, **31**, 347–351. doi: 10.1002/clc.20263
114. Lino, A., Deogracious, O. (2006). The *in-vitro* antibacterial activity of *Annona senegalensis, Securidacca longipendiculata* and *Steganotaenia araliacea*-Ugandan medicinal plants. *African Health Sciences*, **6**(1), 31-35.
115. Lovrić T. (2003) Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva Zagreb, HINUS Miramarska 13b, str. 299-300.
116. Luczaj, L., Jug-Dujaković, M., Dolina, K., Vitasović-Kosić, I. (2019) Plants in alcoholic beverages on the Croatian islands, with special reference to rakija travarica. *J Ethnobiol Ethnomed,* **15**, 51. doi:10.1186/s13002-019-0332-1
117. Luczkiewicz, M., Cisowski, W., Kaiser, P., Ochocka, R., Piotrowski, A. (2001) Comparative analysis of phenolic acids in mistletoe plants from various hosts. *Acta Polonia Pharm Drug Res,* **58**, 373-379.
118. Luebke, W. (1997) The good scents company. http:// www.thegoodscentscompany.com
119. Lukić, I., Miličević, B., Tomas, S., Radeka, S., Persurić, Đ. (2012) Relationship between volatile aroma compounds and sensory quality of fresh grape marc distillates. *J Inst Brew,* **118**, 285–294.
120. Luque de Castro, M.D., Garcia-Ayuso, L.E. (1998) Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta*, **369** (1–2), 1–10.
121. Masino, F., Montevecchi, G., Riponi, C., and Antonelli, A. (2009) Composition of some commercial grappas (grape marc spirit): The anomalous presence of 1,1-diethoxy-3-methylbutane: A case study. *Eur Food Res Technol,* **228**, 565–569.
122. Matijašević, S., Todić, S., Bešlić, Z., Ranković Vasić, Z., Žunić, D., Atanačković, Z., Vukosavljević, V., Cirković, B. (2013) Volatile components of grape brandies produced from Muscat table grapevine (*Vitis vinifera* L.) cultivars. *Bulg J Agric Sci,* **19**, 783–791.
123. Mayer, A. M. (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, **67**, 2318–2331.
124. Medina, E., Romero, C., Brenes, M., de Castro, A. (2007) Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, **70**(5), 1194-1199.
125. Menke, K., Schwermer, M., Falke, K., Eisenbraun, J., Schramm, A., Zuzak, T.J. (2019) Preclinical investigation of interaction of mistletoe extract (*Viscum album* L.) with radio- and chemotherapy in pediatric tumor cell lines. *Phytomedicine,* **61**, 4.
126. Miliauskas, G., Venskutonis, P.R., Van Beek, T.A. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**(2), 231-237.
127. Miller, G.H. (2019) Whiskey Science, 1st ed., Springer: Cham, Switzerland, str. 421–468.
128. Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Mènard, O., Recio, I., Santos, C. N., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W., Brodkorb, A. (2014) A standardised static *in vitro*

digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct*, **5**(6), 1113-1124.
129. Mishra, R., Sharma, S., Sharma, R.S., Singh, S., Sardesai, M.M., Sharma, S., Mishra, V. (2018) *Viscum articulatum* Burm. f. aqueous extract exerts antiproliferative effect and induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells. *J Ethnopharmacol*, **219**, 91–102.
130. Montero, G.D., Valladares, M.B., Tornes, C.Y.L.F., Agramonte, R.E.A., Calderon, J.B., Fundora, H.R. (2016) Tratamiento homeopático y convencional de la hipertensión arterial. *Rev Méd Homeopat,* **9**, 53–58.
131. Mrvčić, J., Posavec, S., Kazazic S., Stanzer, D., Peša, A., Stehlik-Tomas V. (2012) Spirit drinks: a source of dietary polyphenols. *Croat J Food Sc. Techno,* **4**(2), 102-111.
132. Mtolo, M., Gerrano, A., Mellem, J. (2017) Effect of simulated gastrointestinal digestion on the phenolic compound content and in vitro antioxidant capacity of processed Cowpea (*V. unguiculata*) cultivars. *CyTA Journal of Food*, **15**, 391–399. https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1285816
133. Mujić, I. (2010) Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića, AGRO-HIT PZ, Bjelovar.
134. Mustafa, A., Turner, C., (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review. *Anal Chim Acta* **703**, 8–18.
135. Nayak, B., Dahmoune, F., Moussi, K., Remini, H., Dairi, S., Aoun, O., Khodir, M. (2015) Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food Chemistry*, **187**, 507–516.
136. Nazaruk J., Orlikowski P. (2016) Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. *Nat Prod Res*, **30**, 373-385. doi: 10.1080/14786419.2015.1022776
137. Nazzaro, F., Fratianni, F., Granese, T., Cozzolino, A., Maione, M., Ombra, M. N., Coppola, R. (2013) Antimicrobial property of the hydro-alcoholic extract from purple basil (*Ocimum basilicum* var. *purpurascens*). *Worldwide Research Efforts in the Fighting Against Microbial Pathogens*, **68**.
138. Nhiem, N.X., Lee, H.Y., Kim, N.Y., Park, S.J., Kim, E.S., Han, J.E., Yang, H., Kim, S.H. (2012) Stereochemical assignment of five new lignan glycosides from *Viscum album* by NMR study combined with CD spectroscopy. *Magn Reson Chem*, **50**(11), 772–777.
139. Nierhaus-Wunderwald, D., Lawrenz, P. (1997) Zur Biologie der Mistel. *Merkbl Prax,* **28**, 1-8.
140. Nieto, G. (2017) Biological activities of three essential oils of the *Lamiaceae* family. *Medicines (Basel)*, **4**, 63.
141. Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets—permeability barriers and active efflux. *Science*, **264**, 382–388.
142. Nikičević, N., Paunović, R. (2013) Tehnologija jakih alkoholnih pića. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivreni fakultet, Beograd.
143. Nikičević, N., Tešević, V. (2010) Proizvodnja voćnih rakija vrhunskog kvaliteta, Nik-Press, Beograd, str. 214-216.
144. Nowakowska, J. (1939) The Refractive Indices of Ethyl Alcohol and Water Mixtures (diplomski rad), Loyola University, Chicago.
145. Ochocka, J.R., Piotrowski, A. (2002) Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.). *Canadian Journal of Plant Pathology*, **24**, 21–28.
146. OIV – Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin (2014) Determination of chromatic characteristics, OIV-MA-BS-27, International Organisation of Vine and Wine, Paris.
147. Onay-Uçar, E., Karagöz, A., Arda, N. (2006) Antioxidant activity of *Viscum album* ssp. *album*. *Fitoterapia*, **77**(7-8), 556–560. doi:10.1016/j.fitote.2006.08.001

148. Orav, A., Kann, J. (2001) Determination of peppermint and orange aroma compounds in food and beverages. *Proc Estonian Acad Sci Chem,* **50**, 217–225.
149. Ortega, N., Macià, A., Romero, M.P., Reguant, J., Motilva, M.J. (2011) Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chem*, **124**, 65–71.
150. Ozdal, T., Yalcinkaya, İ. E., Toydemir, G., Capanoglu, E. (2019) Polyphenol-protein interactions and changes in functional properties and digestibility. U: Encyclopedia of Food Chemistry (Melton, L., Shahidi, F., Varelis, P., ured.), Academic Press, Amsterdam, str. 566-577.
151. Palhares, R.M., Drummond, M.G., Brasil, B.D.S.A.F., Cosenza, G.P., Brandao, M.D.G.L., Oliveira, G. (2015) Medicinal plants rec-ommended by the World Health Organization: DNA bar-code identification associated with chemical analysesguarantees their quality. *PLoS ONE*, **10**, e0127866.
152. Pan, Y., Zheng, Y.M., Ho, W.S. (2016) Effect of quercetin glucosides from *Allium* extracts on HepG2, PC-3 and HT-29 cancer cell lines. *Oncol Lett,* **15**, 4657–61. https://doi.org/10.3892/ol.2018.7893
153. Panossian, A., Kocharian, A., Matinian, K., Amroyan, E., Gabrielian, E., Mayr, C., Wagner, H. (1998) Pharmacological activity of phenylpropanoids of the mistletoe, *Viscum album* L., host: *Pyrus caucasica* Fed. *Phytomedicine,* **5**(1), 11–17.
154. Papuc, C., Crivineanu, M., Goran, G., Nicorescu, V., Durdun, N. (2010) Free radicals scavenging and antioxidant activity of European mistletoe (*Viscum album*) and European Birthwort (*Aristolochia clematitis*). *Rev Chim*, **61**, 619–622.
155. Park, Y.K., Do, Y.R., Jang, B.C. (2012) Apoptosis of K562 leukemia cells by Abnobaviscum F®, a European mistletoe extract. *Oncol Rep*, **28**, 2227–2232.
156. Pekal, A., Pyrzynska, K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Methods*, **7**(9), 1776–1782. doi:10.1007/s12161-014-9814-x
157. Petrović, M., Antić, M. (2015) Uticaj klimatskih promena na sekundarne metabolite lekovitih i aromatičnih biljaka. Međunarodni naučni skup ―Životna sredina i adaptacija privrede na klimatske promene, Zbornik apstrakata, 90-91.
158. Petrović, M., Vukosavljević, P., Đurović, S., Antić, M., Gorjanović, S. (2019) New herbal bitter liqueur with high antioxidant activity and lower sugar content: innovative approach to liqueurs formulations. *J Food Sci Technol*, **56**(10), 4465-4473.
159. Peumans, W. J., Van Damme, E. J. M. (1995) The role of lectins in plant defence. *Histochem,* **27**(4), 253–271.
160. Pham, H.N.T., Nguyen, V.T., Vuong, Q.V., Bowyer, M.C., Scarlett, C.J. (2015) Effect of Extraction Solvents and Drying Methods on the Physicochemical and Antioxidant Properties of Helicteres hirsuta Lour. Leaves. *Technologies,* **3**, 285-301.
161. Piccolella, Simona & Crescente, Giuseppina & Pacifico, Francesca & Pacifico, Severina (2018) Wild aromatic plants bioactivity: a function of their (poly)phenol seasonality? A case study from Mediterranean area. *Phytochemistry Reviews*, **17**. 10.1007/s11101-018-9558-0.
162. Pietrzak, W., Nowak, R. (2021) Impact of Harvest Conditions and Host Tree Species on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts from *Viscum album* L. *Molecules*, **26**, 3741.
163. Pietrzak, W., Nowak, R., Gawlik-Dziki, U., Lemieszek, M.K., Rzeski, W. (2017) LC-ESI-MS/MS identification of biologically active phenolic compounds in mistletoe berry extracts from different host trees. *Molecules,* **22**, 624.

164. Piljac-Žegarac, J., Valek, L., Stipčević, S., Martinez, S. (2010) Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. *Food Chem*, **121**, 820–825.
165. Pinheiro, P.F., Justino, G.C. (2012) Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds—A Review of Spectroscopic Applications. U: Phytochemicals—A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health (Rao, V., ured.), InTech: Rijeka, Croatia, str. 33–56.
166. Pino, J. A., Queris, O. (2011) Analysis of volatile compounds of mango wine. *Food Chem,* **125**, 1141–1146.
167. Poruthukaren, K.J., Palatty, P.L., Baliga, M.S., Suresh, S. (2014) Clinical evaluation of *Viscum album* mother tincture as an antihypertensive: a pilot study. *J Evidence-Based Complement Altern Med,* **19**(1), 31–5. https://doi.org/ 10.1177/2156587213507726.
168. Pravilnik o proizvodnji, označivanju, zaštićenim oznakama, stavljanju u promet i službenim kontrolama jakih alkoholnih pića, Ministarstvo poljoprivrede (2022). Narodne Novine, 76/2022.
169. Qian, M. C., Wang, Y. (2005) Seasonal variation of volatile com- position and odour activity value of 'Marion' (*Rubus* spp. hyb) and 'Thornless Evergreen' (*R. laciniatus* L.) blackberries. *J Food Sci*, **70**, 13–20.
170. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med,* **26**, 1231– 1237.
171. Reverchon, E., Taddeo, R. (1995) Extraction of sage oil by supercritical CO_2: Influence of some process parameters. *J Supercrit Fluids,* **8**, 302–309.
172. Rodríguez-Solana, R., Carlier, J.D., Costa, M.C., Romano, A. (2018) Multi-element characterisation of carob, fig and almond liqueurs by MP-AES. *J Inst Brew,* **124**, 300–309.
173. Rodríguez-Solana, R., Coelho, N., Santos-Rufo, A., Gonçalves, S., Pérez-Santín, E., Romano, A. (2019b) The Influence of *In Vitro* Gastrointestinal Digestion on the Chemical Composition and Antioxidant and Enzyme Inhibitory Capacities of Carob Liqueurs Obtained with Different Elaboration Techniques. *Antioxidants*, **8**, 563. https://doi.org/10.3390/antiox8110563
174. Rodríguez-Solana, R., Esteves, E., Mansinhos, I., Gonçalves, S., Pérez-Santín, E., Galego, L., Romano, A. (2021) Influence of elaboration process on chemical, biological, and sensory characteristics of European pennyroyal liqueurs. *J Sci Food Agric*, **101**, 4076-4089. https://doi.org/10.1002/jsfa.11043
175. Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., and Cortés- Diéguez, S. (2014) First approach to the analytical characterization of barrel-aged grape marc distillates using phenolic compounds and colour parameters. *Food Technol Biotechnol,* **52**, 391–402.
176. Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Pérez-Santín, E., Romano, A. (2019a) Effect of carob variety and roasting on the antioxidant capacity, and the phenolic and furanic contents of carob liquors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **99**, 2697–2707. https://doi. org/10.1002/jsfa.9437
177. Rodríguez-Solana, R., Salgado, J.M., Domínguez, J.M., Cortés Diéguez, S. (2016a) Phenolic compounds and aroma-impact odorants in herb liqueurs elaborated by maceration of aromatic and medicinal plants in grape marc distillates. *J Instit Brew,* **122**, 653-660. doi: 10.1002/jib.377
178. Rodríguez-Solana, R., Vázquez-Araújo, L., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Cortés-Diéguez, S. (2016b) Optimization of the process of aromatic and medicinal plant maceration in grape marc distillates to obtain herbal liqueurs and spirits. *J Sci of Food Agric,* **96**(14), 4760–4771. doi:10.1002/jsfa.7822

179. Roman, G.P., Neagu, E., Radu, G.L. (2009). Antiradical activities of *Salvia officinalis* and *Viscum album* L. Extracts concentrated by ultrafiltration process. *Acta Sci Pol Technol Aliment*, **8**(3), 47-58.

180. Ruan, J., Yan, J., Zheng, D., Sun, F., Wang, J., Han, L., Zhang Y., Wang, T. (2019) Comprehensive chemical profiling in the ethanol extract of *Pluchea indica* aerial parts by liquid chromatography/mass spectrometry analysis of its silica gel column chromatography fractions. *Molecules*, **24**, 2784.

181. Safdar, M.N., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., Saddozai, A.A. (2017) Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulate* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *J Food Drug Anal,* **25**, 488–500.

182. Saroya, A.S. (2011) Herbalism, phytochemistry and ethnopharmacology. Science Publishers, New Hampshire .

183. Sarpataki, O., Páll, E., Sevastre-Berghian, A.C., Stan, R.L., Hanganu, D., Benedec, D., Hangan, A.C., Sevastre, B., Marcus, I. (20159 Antiproliferative effect of *Viscum album* alcoholic extract in vitro. *Bull UASVM Vet Med,* **72**, 170–173.

184. Satora, P., Tuszyński, T. (2010) Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. *Food Microbiology*, **27**(3), 2010, 418-424.

185. Schaller, G,, Urech, K., Giannattasio, M. (1996) Cytotoxicity of different viscotoxins and extracts from the European subspecies of *Viscum album* L. *Phytother Res,* **10**(6), 473–477.

186. Schaller, G., Urech, K., Grazi, G., Giannattasio, M. (1998) Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Med,* **64**(7), 677–678.

187. Schläppi, M., Ewald, C., Kuehn, J.J., Weinert, T., Huber, R. (2017) Fever therapy with intravenously applied mistletoe extracts for cancer patients: a retrospective study. *Integr Cancer Ther*, **16**, 479–484.

188. Schötterl, S., Miemietz, J.T., Ilina, E.I., Wirsik, N.M., Ehrlich, I., Gall, A., Huber, S.M., Lentzen, H., Mittelbronn, M., Naumann, U. (2019) Mistletoe-based drugs work in synergy with radio-chemotherapy in the treatment of glioma *in vitro* and *in vivo* in glioblastoma bearing mice. *Evid Based Complement Alternat Med,* **2019**, 1376140.

189. Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem,* **56**, 1415–1422.

190. Semiglasov, V.F., Stepula, V.V., Dudov, A., Lehmacher, W., Mengs, U. (2004) The standardised mistletoe extract PS76A2 improves QoL in patients with breast cancer receiving adjuvant CMF chemotherapy: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. *Anticancer Res,* **24**, 1293–1302.

191. Sengul, M., Yildiz, H., Gungor, N., Cetin, B., Eser, Z., Ercisli, S.(2009) Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. *Pak J Pharm Sci,* **22**(1), 102-6..

192. Senica, M., Mikulić-Petkovšek, M. (2020) Changes in beneficial bioactive compounds in eight traditional herbal liqueurs during a one-month maceration process. *J Sci Food Agric,* **100**, 343–353. doi:10.1002/jsfa.10044

193. Shah, S., Syed & Ur Rehman, Yaseen & Iqbal, Arshad & Rahman, Zia Ur & Zhou, Bangwei & Peng, Mu & Li, Zhijian (2017) Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of Stem, Leaves and Fruit Extracts of *Viscum album* L.. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, **11**, 1337-1349.

194. Singh, J. (2008) Maceration, Percolation and Infusion Techniques for the Extraction of Medicinal and Aromatic Plants. U: Extraction technologies for medicinal and aromatic

plants (Handa, S.S., Sing Khanuja, S.P., Longo, G., Rakesh, D.D., ured.), ICS Unido, Trieste, str. 67-82.
195. Singh, B.N., Saha, C., Galun, D., Upreti, D.K., Bayry, J., Kaveri, S.V. (2016) European *Viscum album*: a potent phytotherapeutic agent with multifarious phytochemicals, pharmacological properties and clinical evidence. *RSC Advances*, **6** (28), 23837–23857.
196. Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic- Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J of Enol Vitic,* **16**, 144 – 158.
197. Sliwińska, M., Wiśniewska, P., Dymerski, T., Wardencki, W., and Namieśnik, J. (2015) The flavour of fruit spirits and fruit liqueurs: a review. *Flavour Fragr J*, **30**, 197–207. doi: 10.1002/ffj.3237.
198. Snoussi, A., Hayet, B. H. K., Essaidi, I., Zgoulli, S., Moncef, C. M., Thonart, P., Bouzouita, N. (2012) Improvement of the Composition of Tunisian Myrtle Berries (*Myrtus communis* L.) Alcohol Extracts. *J Agric Food Chem*, **60**(2), 608–614.doi:10.1021/jf202883s
199. Snow, J., Spelman, K. (2011) The Influence of Bitter, Aromatic, and Pungent Medicinal Plants on Gut Function. Gastrointestinal and Liver Disease Nutrition Desk Reference, str. 237.
200. Sokół-Łętowska, A., Kucharska, A. Z., Wińska, K., Szumny, A., Nawirska-Olszańska, A., Mizgier, P., & Wyspiańska, D. (2014) Composition and antioxidant activity of red fruit liqueurs. *Food Chemistry*, **157**, 533–539.
201. Soukoulis, C., Cappellin, L., Aprea, E., Costa, F., Viola, R., Märk, T. D., Gasperi, F., Biasioli, F. (2013), *Food Biopr. Technol*, **6**, 2831.
202. Soursouri, A., Hosseini, S. M., Fattahi, F. (2019) Biochemical analysis of European mistletoe (*Viscum album* L.) foliage and fruit settled on Persian ironwood (*Parrotia persica* C. A. Mey.) and hornbeam (*Carpinus betulus* L.). *Biocatal Agric Biotechnol*, **22**. doi:10.1016/j.bcab.2019.101360
203. Spaho, N. (2017) Distillation Techniques in the Fruit Spirits Production. U: Distillation—Innovative Applications and Modeling (Mendes, M.F., ured.), IntechOpen: London, UK.
204. Stan, R.L., Hangan, A.C., Dican, L., Sevastre, B., Hanganu, D., Catoi, C., Sárpataki, O., Ionescu, C.M. (2013) Comparative study concerning mistletoe viscotoxins antitumor activity. *Acta Biol Hung,* **64**, 279–288.
205. Stanković, M. S., Stefanović, O., Čomić, L., Topuzović, M., Radojević, I., Solujić, S. (2012) Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of Teucrium species. *Central European Journal of Biology*, **7**(4), 664-671.
206. Steele, M.L., Axtner, J., Happe, A., Kröz, M., Matthes, H., Schad, F. (2015) Use and safety of intratumoral application of European mistletoe (*Viscum album* L.) preparations in oncology. *Integr Cancer Ther*, **14**, 140–148.
207. Stefanucci, A., Zengin, G., Llorent-Martinez, E.J., Dimmito, M.P., Valle, A.D., Pieretti, S., Ak, G., Sinan, K.I., Mollica, A. (2020) *Viscum album* L. homogenizer-assisted and ultrasound-assisted extracts as potential sources of bioactive compounds. *J Food Biochem*, **44**, e13377.
208. Steinborn, C., Klemd, A.M., Sanchez-Campillo, A.S., Rieger, S., Scheffen, M., Sauer, B., Garcia-Kaufer, M., Urech, K., Follo, M., Ucker, A., Kienle, G.S., Huber, R., Grundemann, C. (2017) *Viscum album* neutralizes tumor-induced immunosuppression in a human *in vitro* cell model. *PLoS ONE*, **12**, e0181553.

209. Strüh, C.M., Jäger, S., Kersten, A., Schempp, C.M., Scheffler, A., Martin, S.F. (2013) Triterpenoids amplify anti-tumoral effects of mistletoe extracts on Murine B16. F10 Melanoma *In Vivo*. *PLoS One*, **8,** 1–11.
210. Sun, C., Wu, Z., Wang, Z., Zhang, H. (2015) Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid Based Complementary Altern Med,* **2015**, 1–9. doi:10.1155/2015/595393
211. Sun, J. (2007) D-Limonene: Safety and clinical applications. *Altern Med Rev,* **12**, 259–264.
212. Szurpnicka, A., Kowalczuk, A., Szterk, A. (2020) Biological activity of mistletoe: *in vitro* and *in vivo* studies and mechanisms of action. *Arch Pharm Res*, **43**, 593–629.
213. Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., Satora, P., Michalik, J. (2009) Transformations of phenolic compounds in an *in vitro* model simulating the human alimentary tract. *Food Technol Biotechnol,* **47**(4), 456-463.
214. Tenorio-Lopez, F.A., Del Valle, M.L., Olvera, G.Z., Narvaez, J.C.T., Pastelin, G., (2006) *Viscum album* aqueous extract induces NOS-2 and NOS-3 overexpression in Guinea pig hearts. *Nat Prod Res,* **20**, 1176–1182.
215. Tešević, V., Nikićević, N., Jovanović, A., Đoković, D., Vujisić, Lj., Vučković, I., Bonić, M. (2005) Volatile components from old plum brandies. *Food Technology and Biotechnology*, **43**, 367-372.
216. Thamkaew, G., Sjöholm, I., Gómez Galindo, F. (2021) A review of drying methods for improving the quality of dried herbs. *Crit Rev. Food Sci Nutr*, **61**, 1763–1786.
217. Thompson, A., Meah, D., Ahmed, N., Conniff-Jenkins, R., Chileshe, E., Phillips, C. O., Row, P. E. (2013) Comparison of the antibacterial activity of essential oils and extracts of medicinal and culinary herbs to investigate potential new treatments for irritable bowel syndrome. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **13**(1), 338.
218. Tian, T.T., Sun, J.Y., Wu, D.H., Xiao, J.B., Lu, J. (2021) Objective measures of greengage wine quality: From taste-active compound and aroma-active compound to sensory profiles. *Food Chem*, **340**, 128179.
219. Timoshenko, A.V., Cherenkevich, S.N., Gabius, H.J. (1995) *Viscum album* agglutinin-Iinduced aggregation of blood cells and the lectin effects on neutrophil function. *Biomed Pharmacother,* **49**, 153.
220. Tiwari, P.K., Bimlesh, K.M., Kaur, G., Kaur, H. (2011) Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Sciencia*, **1**, 98-106.
221. Tonutti, I., Liddle, P. (2010) Aromatic plants in alcoholic beverages. A review. *Flavour Fragr J*, **25**(5), 341–350. doi: 10.1002/ffj.2001
222. Tröger, W., Galun, D., Reif, M., Schumann, A., Stanković, N., Milićević, M. (2014) Quality of life of patients with advanced pancreatic cancer during treatment with mistletoe: a randomized controlled trial. *Deutsches Arzteblatt Int*, **111**(29–30), 493–502.
223. Uma, D.B., Ho, C.W., Aida, W.M. (2010) Optimization of extraction parameters of total phenolic compoundsfrom henna (*Lawsonia inermis*) leaves. *Sains Malaysiana*, **39**(1), 119–128.
224. Urech, K., Baumgartner, S. (2015) Chemical Constituents Of *Viscum album* L.: Implications for the Pharmaceutical Preparation of Mistletoe. U: Mistletoe: From Mythology to Evidence-Based Medicine, 4 izd. (Zänker, K.S., Kaveri, S.V., ured.), Karger Publishing, Basel, str. 11-23. doi:10.1159/000375422
225. Urech, K., Schaller, G., Jäggy, C. (2006) Viscotoxins, mistletoe Lectins and their isoforms in mistletoe (*Viscum album* L.) extracts Iscador. *Arzneimittelforschung,* **56**(06), 428–34. https://doi.org/10.1055/s-0031-1296808

226. Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća. Službeni list Europske unije, L 130, 1-54.
227. Vajić, U.-J., Grujić-Milanović, J., Živković, J., Šavikin, K., Gođevac, D., Miloradović, Z., Bugarski, B. and Mihailović-Stanojević, N. (2015) Optimization of extraction of stinging nettle leaf phenolic compounds using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, **74**, 912–917.
228. Varnam, A.H., Sutherland, J.P. (1994) Beverages: Technology, Chemistry and Microbiology, Aspen, Philadelphia, PA.
229. Veljković, V.B., Stanković, M.Z. (2003) Herbs used in alcoholic drinks. U: Encyclopedia of food sciences and nutrition (Caballero, B., ured.), Burlington: Academic, str. 3098–3107.
230. Vicas S., Rugina Socaciu C. (2012) Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album*). U: Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health (Venkteteshwer, R., ured.), InTech, Rijeka. str. 115 – 130. doi: 10.5772/26845
231. Vicas, S.I., Rugina, O.D., Leopold, L., Pintea, A., Socaciu, C. (2011) HPLC Fingerprint of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Viscum album* from Different Host Trees. *Not Bot Hort Agrobot Cluj*, **39**(1), 48-57.
232. Vlad, D.C., Popescu, R., Dumitrascu, V., Cimporescu, A., Vlad, C.S., Vágvölgyi, C., Krisch, J., Dehelean, C., Horhat, F.G. (2016) Phytocomponents identification in mistletoe (*Viscum album*) young leaves and branches, by GC-MS and antiproliferative effect on HEPG2 and McF7 cell lines. *Farmacia*, **64**, 82–87.
233. Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., Tilea, I. (2014) Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys. Molecules*, **19**(5), 5490-5507.
234. Vongsak, Boonyadist Sithisarn, Pongtip & Mangmool, Supachoke & Thongpraditchote, Suchitra & Wongkrajang, Yuvadee & Gritsanapan, Wandee (2013) Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* Leaf extract by the appropriate extraction method. *Industrial Crops and Products*, **44**, 566– 571. 10.1016/j.indcrop.2012.09.021.
235. Vukosavljević, P., Novaković, M., Bukvić, B., Nikšić, M., Stanisavljević, I., Klaus, A. (2009) Antioxidant activities of herbs, fruit and medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* extracts produced by microfiltration process. *Journal of Agricultural Sciences*, **54**, 24-28.
236. Vuleta, G., Milic, J., Savic, S. (2012) Farmaceutska tehnologija (Pharmaceutical technology), Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Belgrade, Serbia.
237. Vuolo, M.M., Lima, V.S., Junior, M.R.M. (2019) Phenolic compounds: structure, classification, and antioxidant power. U: Bioactive Compounds, Elsevier, str. 33–50.
238. Uredba (EU) 2019/787 Europskog parlamenta i Vijeća. Službeni list Europske unije, L 130, 1-54.
239. Wang, Q., Chen, D., Zhang, Q., Qin, D., Jiang, X., Li, H., Fang, K., Cao, J., Wu, H. (2019) Volatile components and nutritional qualities of *Viscum articulatum* Burm.f. parasitic on ancient tea trees. *Food Sci Nutr,* **7**, 3017–3029.
240. Wang, T., Guo, N., Wang, S.X., Kou, P., Zhao, C.J., Fu, Y.J. (2018) Ultrasound-negative pressure cavitation extraction of phenolic compounds from blueberry leaves and evaluation of its DPPH radical scavenging activity. *Food Bioprod Process*, **108**, 69–80.
241. Weng, C.J., Yen, G.C. (2012) Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treat Rev,* **38**, 76–87.

242. WHO (1999, 2003, 2007, 2009, 2010) Monographs on selected medicinal plants, vol 1.WHO Headquarters, Geneva.
243. WHO (2011) The World traditional medicines situation 2011—traditional medicines: global situation, issues and chal-lenges. Geneva 3, 1–14.
244. Wojdylo, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007) Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, **105**(3), 940–949.
245. Wong, Y.-H., Tan, C.-P., Long, K., & Nyam, K.-L. (2014) *In vitro* simulated digestion on the biostability of Hibiscus cannabinus L. seed extract. *Czech Journal of Food Science*, **32**, 177– 181.
246. Yagasaki, K., Miura, Y., Okauchi, R., Furuse, T. (2000) Inhibitory effects of chlorogenic acid and its related compounds on the invasion of hepatoma cells in culture. *Cytotechnology*, **33**, 229–235.
247. Yao, H., Liao, Z.X., Wu, Q., Lei, G.Q., Liu, Z.J., Chen, D.F., Chen, J.K., Zhou, T.S., (2006) Antioxidative flavanone glycosides from the branches and leaves of *Viscum coloratum*. *Chem Pharm Bull,* **54**(1), 133–135.
248. Zainal Ariffin, S.H., Wan Omar, W.H.H., Zainal Ariffin, Z., Safian, M.F., Senafi, S., Megat Abdul Wahab, R. (2009) Intrinsic anticarcinogenic effects of *Piper sarmentosum* ethanolic extract on a human hepatoma cell line. *Cancer Cell Int,* **9**.
249. Zeng, X., Su, W., Zheng, Y., Liu, H., Li, P., Zhang, W., Liang ,Y., Bai, Y., Peng, W., Yao, H. (2018) UFLC-Q-TOF-MS/MS-based screening and identification of flavonoids and de- rived metabolites in human urine after oral administration of *Exocarpium Citri Grandis* extract. *Molecules,* **23**, 895.
250. Zhang, Q., Lin, L. Ye, W. (2018) Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med J*, **13**, 20.
251. Zhao, Y., Liu, Z. (2012). First report of black spot disease caused by *Alternaria alternata* on cherry fruits in China. *Plant Disease*, **96**(10), 1580–1580.
252. Zuber, D. (2004) Biological flora of Central Europe: *Viscum album* L. *Flora,* **199**, 181–203.

8. ŽIVOTOPIS

Karla Hanousek Čiča rođena je 9. prosinca 1988. godine u Virovitici, Republika Hrvatska. Osnovnu školu i opću gimnaziju pohađala je i završila u Grubišnom Polju. Po završetku gimnazije 2007. godine upisala je preddiplomski studij Biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a 2011. diplomski studij Molekularne biotehnologije. Diplomirala je 2013. godine izradivši diplomski rad naslova „Fitotoksičnost imidazolijevih ionskih tekućina“ koji je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Radojčić Redovniković u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije te stekla zvanje magistre inženjerke molekularne biotehnologije. 2014. godine ulazi u program 1-godišnjeg stručnog osposobljavanja na Hrvatskom šumarskom institutu u Laboratoriju za fizikalno-kemijske analize pod mentorstvom dr. sc. Tamare Jakovljević. Od 2015. godine zaposlena je na suradničko mjesto asistenta u Laboratoriju za tehnologiju vrenja i kvasca na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Mrvčić. Iste godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu upisala je poslijediplomski sveučilišni (doktorski) studij Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo, prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Biotehnologija i bioprocesno inženjerstvo. Kao asistent aktivno je uključena u nastavne aktivnosti koje izvodi Laboratorij za tehnologiju vrenja i kvasca na 3 predmeta na preddiplomskom studiju Prehrambene tehnologije i Biotehnologije (Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Tehnologija alkohola i kvasca, Instrumentalna analiza) i 3 predmeta na diplomskom studiju Prehrambenog inženjerstva i Bioprocesnog inženjerstva (Principi biotehnološke proizvodnje hrane, Tehnologija alkohola i kvasca, Proizvodnja i primjena pekarskog i prehrambenog kvasca) te u izradi završnih i diplomskih radova. Kao suradnik sudjelovala je na provedbi projekata Hrvatske zaklade za znanost: „Taksonomija, ekologija i uporaba rogača (*Ceratonia siliqua* L.) i lovora (*Laurus nobilis* L.) u Hrvatskoj“ voditelja dr. sc. Siniše Srečeca (2013.-2018.) i „Održiva proizvodnja biokemikalija iz sekundarnih lignoceluloznih sirovina“ voditelja prof. dr. sc. Božidara Šanteka (2018.-2022.), a trenutno sudjeluje na projektu „Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija“ voditeljice prof. dr. sc. Lidije Barišić (2021.-2025.). Dosadašnji rezultat svog znanstveno-istraživačkog rada objavila je putem 8 znanstvenih radova a1 kategorije, 6 radova a2 kategorije, 3 rada a3 kategorije te posterskih izlaganja na domaćim i međunarodnim znanstveno-stručnim skupovima. Osim na kongresima svoja znanja i vještine usavršava pohađanjem radionica, seminara i stručnih skupova. Dobitnica je Potpore mladim istraživačima Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta za 2018.g. Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju i Hrvatskog mikrobiološkog društva.

Popis znanstvenih radova (a1) iz znanstvenoga područja doktorskoga rada:

1. **Hanousek Čiča, K.**, Lukin, P., Derewiaka, D., Mrvčić, J., Stanzer, D. (2022) Chemical Composition, Physical Properties, and Aroma Profile of Ethanol Macerates of Mistletoe (*Viscum album*), Beverages, 8 (8), 46-61.

2. Križanović, S., Stanzer, D., Mrvčić, J., **Hanousek Čiča, K.**, Kralj, E., Čanadi Jurešić, G. (2020) Lipid Composition of *Sheffersomyces stipitis* M12 Strain Grown on Glycerol as a Carbon Source, Food technology and biotechnology, 58 (2), 203-213.

3. **Hanousek Čiča, K.**, Mrvčić, J., Srečec, S., Filipan, K., Blažić, M., Stanzer, D. (2020) Physicochemical and aromatic characterization of carob macerates produced by different maceration conditions, Food Science and Nutrition., 8, 942-954.

4. **Hanousek Čiča, K**., Rupert, M., Koczoń, P., Derewiaka, D., Gajdoš-Kljusurić, J., Petravić-Tominac, V., Mrvčić, J., Stanzer, D. (2019) Characterisation of flavour compounds in Biska – a herbal spirit produced with mistletoe, Journal of The Institute of Brewing, 125 (1), 143-154.

5. **Hanousek Čiča, K.**, Pezer, M., Mrvčić, J., Stanzer, D., Čačić, J., Jurak, V., Krajnović, M., Gajdoš Kljusurić, J., (2019) Identification of phenolic and alcoholic compounds in wine spirits and their classification by use of multivariate analysis, Journal of the Serbian Chemical Society, 84 (7), 663-677.

6. Jakopović, Ž., **Hanousek Čiča, K.**, Mrvčić, J., Pucić, I., Čanak, I., Frece, J., Pleadin, J., Stanzer, D., Zjalić, S., Markov, K. (2018) Properties and Fermentation Activity of Industrial Yeasts *Saccharomyces cerevisiae, S. uvarum, Candida utilis,* and *Kluyveromyces marxianus* Exposed to AFB1, OTA, and ZEA, Food technology and biotechnology, 56 (2), 208-217.

7. Radojčić Redovniković, I., De Marco, A., Proietti, C., **Hanousek, K.**, Sedak, M., Bilandžić, N., Jakovljević, T. (2017) Poplar response to cadmium and lead soil contamination, Ecotoxicology and environmental safety, 144, 482-489.

8. Cvjetko Bubalo, M., **Hanousek, K.**, Radošević, K., Gaurina Srček, V., Jakovljević, T., Radojčić Redovniković, I. (2014) Imidiazolium based ionic liquids : Effects of different anions and alkyl chains lengths on the barley seedlings, Ecotoxicology and environmental safety, 101, 116-123.

Popis znanstvenih radova (a2) iz znanstvenoga područja doktorskoga rada:

1. Mrvčić, J., Trontel, A., **Hanousek Čiča, K.**, Vahčić, N., Nikićević, N., Spaho, N., Mihaljević Žulj, M., Brodski, A., Jurak, V., Krajnović, M., Sahor, R., Rubeša Vili, V., Petrović, R., Stanzer, D. (2021) Chemical and sensorial characteristics of traditional fruit spirits from Southeast Europe, Glasnik Zaštite Bilja, 44 (6), 80-89.

2. Petravić-Tominac, V., Tolvajčić, M., Stanzer, D., Mrvcic, J., **Hanousek-Čiča, K.**, Šantek, B. (2018) Potencijal bakterija za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloznih sirovina, Glasnik zaštite bilja, 41 (4), 74-82.

3. **Hanousek Čiča, K.**; Mrvčić, J.; Stanzer, D.; Jakovljević, T.; Radojčić Redovniković, I. (2018) Voće i povrće kao biokatalizatori za dobivanje kiralnih spojeva, Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 13 (3-4), 70-77.

4. Stanzer, D.; Ivanuša, I., Kazazić, S., **Hanousek Čiča, K.**; Mrvčić, J. (2017) Diversity of lactic acid bacteria on organic flours and application of isolates in sourdough fermentation, Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition, 12 (1-2), 44-51.

5. **Hanousek Čiča, K.**; Stanzer, D.; Markov, K., Frece, J., Mrvčić, J. (2015) Mikrobiološka kvaliteta komercijalnog pekarskog kvasca na hrvatskom tržištu, Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju biotehnologiju i nutricionizam, 10 (3-4), 95-100.

6. Jakovljević, T.; Halambek, J.; Radošević, K., **Hanousek, K.**, Gradečki-Poštenjak, M., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I., De Marco, A. (2015) The Potential Use of Indigobush (*Amorpha fruticosa* L.) as Natural Resource of Biologically Active Compounds, South-east European forestry, 6 (1), 171-178.