Karakterizacija Biske - tradicionalne istarske travarice

Jedrejčić, Petra

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:159:507992

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Petra Jedrejčić

6833/BT

KARAKTERIZACIJA BISKE – TRADICIONALNE ISTARSKE TRAVARICE

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Proizvodnja jakih alkoholnih pića

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

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

KARAKTERIZACIJA BISKE – TRADICIONALNE ISTARSKE TRAVARICE

Petra Jedrejčić, 6833/BT

Sažetak: Biska je tradicionalna travarica koja se proizvodi maceracijom lišća žute imele na području Istre. Tijekom procesa proizvodnje biske iz imele se u alkoholnu bazu ekstrahiraju različiti spojevi za koje se smatra da pridonose pozitivnim zdravstvenim učincima konačnog proizvoda. Cilj rada bio je utvrditi razlike u sadržaju ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u dvadeset različitih uzoraka biske te utvrditi postojanje korelacija između ta dva parametra. Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa, a antioksidacijska aktivnost FRAP i DPPH metodama. Uzorcima je također određena koncentracija prisutnog etanola odnosno njihova alkoholna jakost. Rezultati su pokazali da se količina fenolnih spojeva u uzorcima znatno razlikuje što je moguće zbog tehnološkog procesa proizvodnje odnosno parametara kao što su količina, podrijetlo i kvaliteta lišća koje se macerira, zbog jakosti alkoholne baze ili duljine same maceracije te da su ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost u pozitivnoj korelaciji.

Ključne riječi: *Biološki aktivne tvari, biska, jaka alkoholna pića, travarica, žuta imela*

Rad sadrži: 27 stranica, 10 slika, 2 tablice, 19 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Pomoć pri izradi: Mag. ing. Karla Hanousek Čiča, asistent

Datum obrane: Lipanj, 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

Department of Food Engineering
Laboratory for Fermentation and Yeast Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

CHARACTERIZATION OF BISKA – TRADITIONAL ISTRIAN SPIRIT DRINK

Petra Jedrejčić, 6833/BT

Abstract: Biska is the traditional spirit drink in Istria. It is produced by maceration of yellow mistletoe. During the production process, various compounds from the mistletoe which contribute to the positive health effects of the final product are extracted to the alcoholic base. The aim of the study was to investigate the differences in the content of total phenols and antioxidant activity in twenty different samples of biska and to establish the correlation between these two parameters. Concentration of total phenols was determined spectrophotometrically using Folin - Ciocalteu reagent, and antioxidant activity by FRAP and DPPH methods. Samples were also analyzed to determine their ethanol concentration. The results showed that the amount of phenolic compounds in the samples differed considerably due to the technological process or parameters such as the amount, origin and quality of the leaves that was used for maceration, the strength of the alcoholic base or the length of the maceration itself and that the total phenols and antioxidant activity are in a positive correlation.

Key words: *Biological active compounds, biska, spirit drink, strong alcoholic beverages, yellow mistletoe*

Thesis contains: 27 pages, 10 figures, 2 tables, 19 references

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD Jasna Mrvčić, Associate Professor

Tehnical support and assistance: Mag. ing. Karla Hanousek Čiča, Assistant

Defence date: June 2017

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Jaka alkoholna pića 2
2.2. Travarica 3
2.2.1. Proizvodnja komovice 3
2.2.2. Proizvodnja travarice 4
2.3. Biska 5
2.3.1. Proizvodnja biske 5
2.3.2. Žuta imela (*Loranthus europaeus*) 5
2.3.3. Polifenolni spojevi 6
2.3.4. Lektini 7
2.3.5. Viskotoksini 8
2.3.6. Terpeni 8
3. MATERIJALI I METODE 9
3.1. Materijali 9
3.1.1. Uzorci biske 9
3.1.2. Kemikalije 10
3.2. Metode rada 11
3.2.1. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa 11
3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom 12
3.2.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom 14
3.2.4. Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin – Dietrichu 15
4. REZULTATI I RASPRAVA 17
4.1. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa 17
4.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom 19
4.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom 20
4.4. Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin – Dietrichu 23
5. ZAKLJUČAK 25
6. LITERATURA 26

1. UVOD

Jaka alkoholna pića (JAP) su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, koja imaju posebna senzorska svojstva, a sadrže minimalno 15% vol. alkohola (Pravilnik RH, NN 61/2009). Proizvode se direktno destilacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla koje sadrže šećer ili maceracijom aromatičnog bilja i voćnih plodova u etilnom alkoholu. Hrvatska je zemlja koja ima različita i vrlo povoljna klimatska područja koja omogućuju sadnju te konzumaciju različitih vrsta biljaka koje se koriste u proizvodnji jakih alkoholnih pića. Za proizvodnju se najčešće koriste vinski destilati, šljive i različite trave, pa tako postoje tradicionalni hrvatski proizvodi, rakije – loza, šljivovica i travarica.

Travarica je jako alkoholno piće karakteristično za Istru i Dalmaciju. Proizvodi se maceracijom različitih vrsta ljekovitog bilja u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici, pri čemu se biološki aktivni spojevi ljekovitog i aromatičnog bilja – eterična ulja, flavonoidi, tanini, sluzi, saponini i gorke tvari – ekstrahiraju u alkoholnu bazu pri sobnoj temperaturi. Od bilja se najčešće upotrebljavaju imela, ruta, ružmarin, gospina trava, melisa, metvica i kadulja. Svaka biljka sadrži specifične tvari koje proizvedenom piću daju specifičnu boju, miris i aromu. U proizvodnji jakih alkoholnih pića mogu se koristiti svi dijelovi biljke, od korijena, cvjetova i listova do plodova i sjemena.

Biska je tradicionalna istarska travarica aromatizirana ekstraktom žute imele. Proizvodi se destilacijom grožđanog dropa ili komine te sadrži oko 40% vol. alkohola. Destilat se obogaćuje maceratom žute imele te eventualno medom. Biska spada u skupinu vrlo cijenjenih rakija zbog različitih bioaktivnih tvari koje sadrži te se može kategorizirati kao ljekovita rakija (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

Cilj ovog rada bio je opisati bisku kao jako alkoholno piće te u prikupljenim uzorcima biske određivanjem ukupnih fenola, antioksidacijske aktivnosti i koncentracije alkohola utvrditi razlike u kemijskom sastavu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Jaka alkoholna pića

Jaka alkoholna pića (JAP) su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva, a sadrže minimalno 15% vol. alkohola (Pravilnik RH, NN 61/09).

Jaka alkoholna pića mogu se proizvoditi na dva načina:

- Izravnim postupkom proizvodnje jakih alkoholnih pića smatra se destilacija prevrelih sirovina poljoprivrednog porijekla, maceracija bilja u etilnom alkoholu, destilatima i/ili JAP te dodavanje aroma, šećera ili drugih poljoprivrednih proizvoda etilnom alkoholu, destilatima i/ili JAP.
- Drugi je način proizvodnje miješanje jakih alkoholnih pića s jednim ili više drugih JAP, etilnim alkoholom poljoprivrednog porijekla ili destilatima poljoprivrednog porijekla i/ili drugim alkoholnim pićima.

Etilni alkohol koji se koristi u proizvodnji jakih alkoholnih pića i svih njihovih sastojaka mora biti poljoprivrednog porijekla (Pravilnik RH, NN 61/09). Korišteni etilni alkohol mora imati minimalno 96 % vol. alkohola te ne smije imati miris i okus drugačiji od onoga koji potječe od upotrijebljenih sirovina.

Ovisno o vrsti sirovine i tehnološkom postupku te količini alkohola i šećera u pićima, jaka alkoholna pića se mogu svrstati u 3 skupine:

- prirodna jaka alkoholna pića
- umjetna jaka alkoholna pića
- aromatizirana vina

Prirodna jaka alkoholna pića proizvode se destilacijom prevrelih komina, a karakterizirana su specifičnom aromom koja potječe od sirovina iz kojih su pića proizvedena. U njihovoj proizvodnji nije dozvoljena upotreba šećera, škrobnog sirupa ili sirovina na bazi škroba, kao niti dodavanje rafiniranog etilnog alkohola i biljnih proizvoda ekstrahiranih etilnim alkoholom te dodavanje umjetnih aroma i boja. Prirodna pića se prema sirovinama iz kojih se dobivaju dijele na voćne rakije (komovica, šljivovica), žitne rakije (viski, vodka) i šećerne rakije (rum).

Umjetna jaka alkoholna pića proizvode se maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodatkom rafiniranog alkohola i aromatskih supstanci. Sadrže sve karakteristike sirovine iz koje su proizvedena te ne smiju sadržavati nekorisne, štetne i gorke supstance koje se ne destiliraju.

Aromatizirana vina su pića koja se proizvode maceracijom mirodija i aroma u prevrelim voćnim sokovima odnosno vinima, sa ili bez dodatka šećera i rafiniranog alkohola (Grba i Stehlik-Tomas, 2010).

2.2. Travarica

Travarica je jako alkoholno piće koje se tradicionalno proizvodi u Istri i Dalmaciji. Proizvodi se maceracijom različitih vrsta ljekovitog bilja u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici, pri čemu se biološki aktivni spojevi ljekovitog i aromatičnog bilja – eterična ulja, flavonoidi, tanini, sluzi, saponini i gorke tvari – ekstrahiraju u alkoholnu bazu pri sobnoj temperaturi. Najčešće se kao alkoholna baza koristi rakija komovica, čija kvaliteta uvelike doprinosi i kvaliteti travarice.

2.2.1. Proizvodnja komovice

Grožđe kao sirovina obiluje velikim brojem različitih spojeva arome koje rakiji daju sortna obilježja. Izravan utjecaj na karakteristike završnog proizvoda ima tijek vođenja tehnološkog procesa proizvodnje. Rakije od grožđa međusobno se razlikuju ovisno o tome koji dio prefermentirane komine se destilira (vino, trop, cijeđena ili necijeđena komina).

Komovica je jako alkoholno piće proizvedeno destilacijom prevrele grožđane komine. Koristi se kao temeljna rakija ne samo za proizvodnju travarice, već i za orahovce i domaće likere. Nakon berbe, grožđe se usitnjava čime se dobiva masulj. Ukomljavanje koma se obavlja dodatkom vode i određene kulture kvasaca čime se vrenje ubrzava. Za najbrže vrenje i optimalnu aktivnost kvasca potrebne su temperature od 25 do 30 °C. Destilacija prevrele komine obavlja se najkasnije mjesec dana nakon završenog vrenja te je potrebno kod punjenja kotla za destilaciju dodati još do 30 % vode da komina ne bi zagorila. Destilacijom se odjeljuje etilni alkohol od ostalih sastojaka te o ovom koraku ovisi kvaliteta

rakije. Pri provođenju destilacije, grijanjem se tekuća faza prevodi u parnu te se ponovno kondenzira u tekuću fazu. Kako voda i etanol, glavni sastojci alkoholne fermentacije, imaju različite temperature vrelišta, potrebno je paziti da zagrijavanje masulja ne bude preveliko jer će samo na temperaturama nižim od vrelišta vode isparavanje etanola biti zadovoljavajuće te će se dobiti destilat s većim udjelom alkohola.
Uz isparavanje vode i etanola isparavaju i neki drugi hlapivi spojevi s nižim vrelištem od etanola kao što su acetaldehid i esteri octene kiseline, koji isparavaju pri početku destilacije. Hlapive tvari s višim vrelištem od alkohola kao što su patočna ulja isparavaju kasnije pri višim temperaturama. Zbog toga se primjenjuje dvokratna destilacija gdje se mogu odvojiti pojedine tvari kako bi se dobio kvalitetan destilat.

Komovica koja se proizvede od grožđa s izrazito sortnom aromom čuva se u staklenim posudama čime se osigurava da aroma ostane očuvana, a rakija bezbojna. S druge strane, komovice dobivene od manje kvalitetnih sorti grožđa pune se u hrastove bačve u kojima odležavaju i aromatiziraju te poprimaju zlatno žutu boju (Lučić, 1986). Budući da je u proizvodnji travarica cilj dobiti boju i aromu maceriranog bilja, za proizvodnju travarica preferiraju se komovice bez jakih boja i aroma.

2.2.2. Proizvodnja travarice

Travarice su specijalne rakije koje se proizvode maceracijom ljekovitog i aromatičnog bilja u komovici ili rafiniranom alkoholu, ili destilacijom tog macerata. Maceracija je metoda izdvajanja ili ekstrahiranja biološki aktivnih tvari iz bilja u vodeno alkoholnoj bazi, čime se krajnjem proizvodu daje karakteristična aroma bilja te se postiže ugodan okus, a sam proizvod zbog prisutstva alkohola ima duži rok trajanja i ne kvari se. Osim etilnog alkohola koncentracije od 25 – 40 %, kao baza za maceraciju mogu se koristiti i neka druga organska otapala.

U proizvodnji travarice najčešće se kombinira veći broj biljaka različitih karakteristika koje se međusobno slažu i nadopunjuju. Za maceraciju se mogu koristiti cijele biljke ili njihovi pojedini dijelovi poput listova, cvjetova, plodova, stabljike, kore i korijena, pri čemu je bitno da su korištene sirovine pravilno osušene. Korištenjem svježeg bilja dobiva se kvalitetnija travarica (Lučić, 1986).

2.3. Biska

Biska je tradicionalna istarska rakija aromatizirana ekstraktom žute imele (*Loranthus europaeus*). Sadrži od 60 do 65 % vode, 36 do 40 % vol. etilnog alkohola, 0,20 do 2 % vol. metanola, 200 do 1800 mg L^{-1} ukupnih kiselina i male količine spojeva dobivenih maceracijom imele (Milotić, 2001).

2.3.1. Proizvodnja biske

Prva faza proizvodnje biske je priprema bazne rakije - najčešće komovice, koja je opisana u prethodnom poglavlju. Određena alkoholna jakost bazne rakije određuje se dodavanjem destilirane vode do željenog sadržaja alkohola. Budući da biska sadrži oko 40 % vol. alkohola, komovica se razrijedi na toliki postotak.

U drugoj fazi proizvodnje, u komovicu se stavlja lišće imele koje se prethodno dobro osušilo. Ako se lišće sušilo u hladu, boja gotovog proizvoda je zelenkasta, a ako se sušilo na suncu, boja lišća, kao i krajnjeg proizvoda, je smeđa. Za litru gotovog proizvoda dodaje se 5 g suhog lišća. 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 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.

2.3.2. Žuta imela (*Loranthus europaeus*)

Žuta imela je listopadna biljka iz porodice imela (*Loranthaceae*) koja raste kao poluparazit na granama hrasta, pitomog kestena, a rijeđe na bagremu i jasenu te cvate u travnju i svibnju. Listovi su joj tamnozeleni, cvjetovi žutozeleni, a plod je meka žuta bobica ispunjena sluzavom, ljepljivom masom. Dok su plodovi žute imele otrovni, njezina stabljika i listovi poznati su po svojim izrazitim ljekovitim svojstvima (Vicas i sur., 2011).

Žuta imela može sintetizirati određene kemijske spojeve, ali također dobiva različite nutrijente drveća na kojima raste. Tijekom klijanja imela razvija posebni organ za pričvršćivanje biljke za granu domaćina. Zatim se razvije sisaljka koja izlučuje enzime koji

rastvaraju stanice kore i dolazi do prodiranja u tkivo domaćina. Različitim istraživanjima (Vicas i sur., 2011) dokazano je da imela sadrži visoke udjele biološki aktivnih tvari, a njihova količina ovisi o tome na kojoj vrsti drveta imela raste te o dijelovima biljke.

Neki od najpoznatijih biološki aktivnih spojeva su lektini i viskotoksini koji su u niskoj koncentraciji značajni zbog svojeg apoptotičnog i citotoksičnog utjecaja na stanice zbog čega se koriste u liječenju karcinoma te fenolne kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Također, poznati su fitosteroli, oligosaharidi, polisaharidi i netopivi triterpeni.

Budući da se biska proizvodi maceracijom kroz duži period uz miješanje, topivi spojevi koje žuta imela sadrži se iz lišća ekstrahiraju u alkoholnu bazu što bisku čini ljekovitom rakijom.

2.3.3. Polifenolni spojevi

Polifenolni spojevi čine skupinu sekundarnih biljnih metabolita koji doprinose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti biljnih vrsta. Ovi spojevi posjeduju aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina i čija struktura varira od onih jednostavnijih (fenolne kiseline, fenilpropanoidi, flavonoidi) do visoko polimeriziranih molekula (lignini, melanini, tanini). Polifenoli su izrazito važni u biljci jer ju štite od djelovanja patogena, daju joj pigmentaciju te imaju iznimna antioksidacijska svojstva zahvaljujući kojima pomažu u prevenciji mnogih poremaćaja u organizmu.

Prema Naczk i Shahidi (2006) polifenoli se dijele na :

- Fenolne kiseline (hidroksicimetne, hidroksibenzojeve)
- Flavonoide (antocijanini, flavonoli, flavanoli, flavoni)
- Tanine (kondenzirani i hidrolizirani) i ostale (lignani, kumarini).

Polifenoli reagiraju kao antioksidansi zahvaljujući sposobnosti prelaska u fenoksil – radikale otpuštajući vodikov atom, koji se veže na slobodne radikale. Osim sposobnosti sparivanja elektrona slobodnih radikala, polifenolne spojeve karakterizira i sposobnost vezanja iona prijelaznih metala (Fe^{2+} , Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}) te aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).

Različitim istraživanjima dokazano je kako žuta imela sadrži velik broj polifenola. Istraživanjem Vicas i sur. (2011), HPLC analizom određeni su udjeli biološki aktivnih tvari u

imeli s obzirom na vrstu drveta na kojem raste, vremenu berbe i dijelu biljke koji se ekstrahira. Dokazano je da najveću koncentraciju ukupnih fenola sadrže uzorci listova imele koji su ubrani u svibnju sa stabla bagrema.

Također je određen udio pojedinih fenolnih kiselina i fenilpropanoida u imeli. Najznačajniji fenilpropanoidi su koniferin i siringin detektirani u lišću i stabljici. Najviše fenolnih kiselina sadrži imela koja je rasla na jasenu, a to su protokatehinska, klorogenska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, salicilna, *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska te kava kiselina. Od ostalih fenolnih kiselina detektirane su još galna kiselina na imeli koja je rasla na bagremu (uz ferulinsku i sinapinsku kiselinu) te trans – cimetna kiselina na imeli koja je rasla na javoru (uz klorogensku, *p*-hidroksibenzojevu, salicilnu, ferulinsku, sinapinsku i kava kiselinu) (Vicas i sur., 2011).

2.3.4. Lektini

Lektini su obrambeni biljni proteini koji imaju sposobnost vezanja na ugljikohidrate ili na proteine koji sadrže ugljikohidrate, a nalaze se prvenstveno u sjemenkama (Pevalek-Kozlina, 2003). Sudjeluju u prenošenju šećera u biljci, djeluju kao antitijela protiv različitih nametnika te reguliraju rastezljivost stanične stijenke zbog nekovalentnih veza koje tvore sa polisaharidima stanične stijenke.

Lektini žute imele (ML I, ML II, ML III) klasificirani su kao tip II ribosom – inaktivirajući proteini. Sastoje se od dva peptidna lanca, A – lanac koji se sastoji od tri različite domene te B – lanac koji se sastoji od dvije domene sličnih konfiguracija. Žuta imela koja raste na listopadnom drveću sadrži uglavnom lektine ML I, čiji se B – lanac specifično veže na D – galaktozu, a kad raste na zimzelenom drveću poput jela i borova, sadrži lektine ML III koji se specifično vežu na N – acetil – D – galaktozamin. Lektini su u visokim koncentracijama toksični za sisavce, no pri niskim koncentracijama djeluju povoljno na organizam te se zbog svoje citotoksičnosti sve češće koriste u liječenju tumora (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

2.3.5. Viskotoksini

Viskotoksini su amfipatski proteini male molekulske mase koji se nalaze u listovima i stabljikama biljaka. Ovisno o redoslijedu 46 aminokiselina koje sadrže te o rasporedu disulfidnih mostova razlikuje se šest izomera ovih polipeptida. Najpoznatiji izomeri su viskotoksin A2, A3 koji pokazuje najveću i B koji ima nešto slabiju citotoksičnu aktivnost, dok su ostali poznati pod nazivima A1, 1-PS i U-PS. Izomerni oblik viskotoksina ovisi o stablu domaćinu na kojem imela raste.

Prema istraživanju Nazaruk i Orlikowski (2016), u žutoj imeli prevladavaju viskotoksini A2 i A3 te je primjećena odsutnost PS-V, koji je kombinacija 1-PS i U-PS viskotoksina.

2.3.6. Terpeni

Terpeni su organski spojevi netopivi u vodi, a sintetiziraju se iz izopentenskih jedinica koje sadrže pet C atoma. Imaju vrlo važnu ulogu u rastu i razvitku biljaka kao komoponente stanične membrane, pomoćni pigmenti (karotenoidi) te kao prenositelji šećera u staničnoj stijenci (dugolančani politerpenski alkoholi). Međutim, neki su biljni terpeni sekundarni metaboliti uključeni u obranu biljaka jer su otrovni za brojne kukce i sisavce.

Triterpeni izolirani iz imele su β-amirin acetat, oleanolična kiselina, betulinska kiselina te smjesa fitosterola i njihovih glukozida. Navedeni su spojevi vrlo važni u obrani imele od kukaca te unatoč slaboj topljivosti imaju izraženo antikancerogeno djelovanje (Nazaruk i Orlikowski, 2016). .

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci biske

U ovom radu određeni su ukupni fenoli, antioksidativna aktivnost te volumni udio alkohola u različitim uzorcima biske – tradicionalne istarske travarice. Ukupno je korišteno 20 uzoraka biske koji su na osnovi proizvodnje podijeljeni u dvije skupine:

- Domaća proizvodnja (tablica 1)
- Industrijska proizvodnja (tablica 2).

Tablica 1. Uzorci domaće proizvodnje

1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**12**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**

Tablica 2. Uzorci industrijske proizvodnje

Broj uzorka	Proizvođač
8	P.T.O SOŠIĆ
9	VINOGRADI BENČIĆ
10	AURA
11	VINA NOVAK
13	MARIS
14	VINOGRADI BENČIĆ

3.1.2. Kemikalije

U eksperimantalnom dijelu rada korištene su sljedeće kemikalije:

- Destilirana voda
- 96 % vol. etanol - Kefo
- Folin-Ciocalteu reagens - Kemika
- Galna kiselina - Sigma-Aldrich
- Natrijev karbonat bezvodni - Gram-mol
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) - Fluka
- 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-tirazin (TPTZ) - Fluka
- Željezo (III) klorid - Kemika
- Trolox - Sigma-Aldrich
- Kalijev bikromat - Kemika
- Kalijev jodid – T.T.T.
- Natrijev tiosulfat – Kefo
- Škrob, topljiv– Kemika
- Natrijev hidroksid – Kemika
- Sumporna kiselina
- Natrijev acetat bezvodni - Gram-mol
- Klorovodična kiselina - Fisher Scientific.

3.2. Metode rada

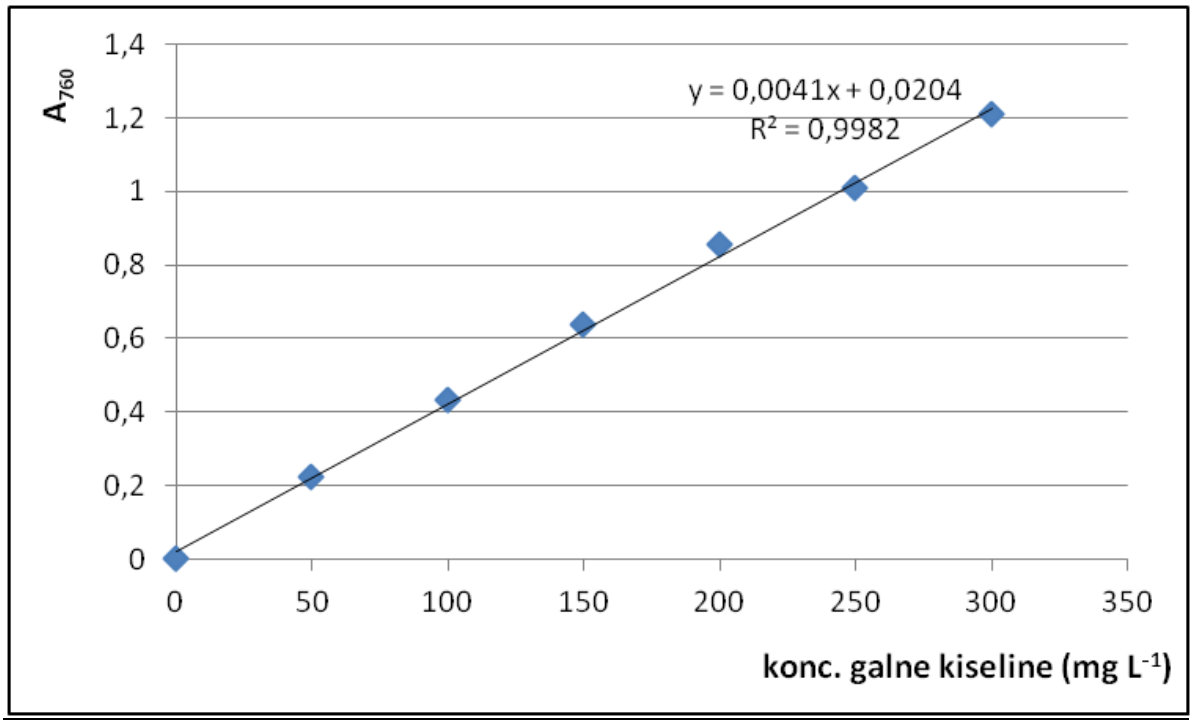
3.2.1. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa

Princip metode

Folin – Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibdene kiseline. Pri oksidaciji fenolnih tvari, ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid, čime se dobije plavo obojenje otopine. Metoda se temelji na kolorimetrijskoj reakciji u kojoj svi fenolni spojevi izreagiraju s Folin – Ciocalteu reagensom. Nakon toga, spektrofotometrijski se odredi intenzitet nastalog plavog obojenja na 760 nm, pri čemu je intenzitet obojenja direktno proporcionalan udjelu fenolnih spojeva u ispitivanom uzorku. Kao standard se koristi galna kiselina (Singleton i Rossi, 1965).

Postupak rada

Za određivanje ukupnih fenola u uzorcima biske, u odmjernu tikvicu od 10 mL odpipetira se 300 µL uzorka, 500 µL Folin – Ciocalteu reagensa i 6 mL destilirane vode. Sadržaj tikvice se promiješa te se nakon 5 minuta doda 1,5 mL natrijeva karbonata nakon čega se tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom. Odmjerna tikvica stavi se na tamno mjesto, na sobnoj temperaturi te se nakon 2 sata spektrofotometrijski mjeri apsorbancija na 760 nm. Slijepa proba priprema se na isti način kao uzorak, ali se umjesto 300 µL uzorka doda 300 µL destilirane vode.

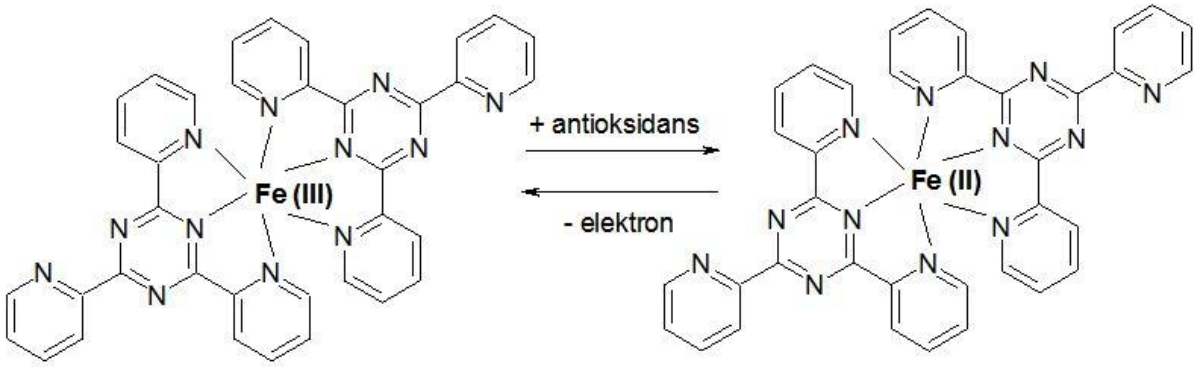


Slika 1. Baždarni pravac za određivanje fenolnih spojeva spektrofotometrijski pomoću Folin - Ciocalteu reagensa

3.2.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip metode

FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) u prisutnosti uzorka, pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. 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 se povećava redoks potencijal, koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru transfera elektrona (Benzie i Strain, 1999).



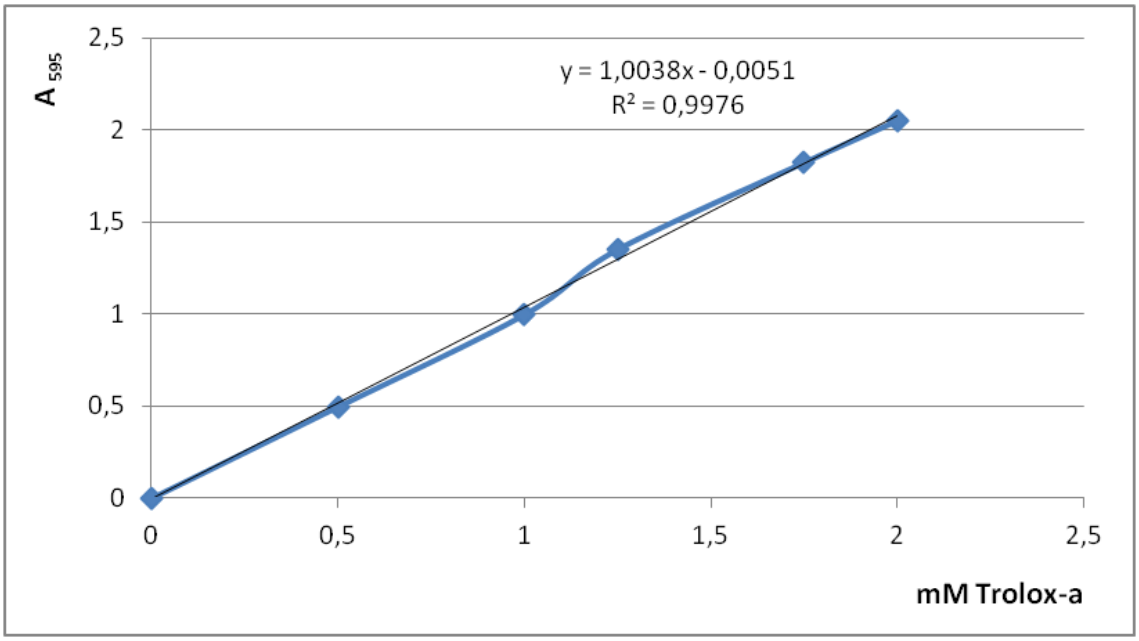
Slika 2. Reakcija redukcije željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)

Redoks potencijal redukcije Fe(III)/Fe(II) iznosi 0,77 V te će svi spojevi s nižim redoks potencijalom ulaziti u reakciju redukcije željeza te tako doprinijeti konačnom rezultatu antioksidacijskog kapaciteta. Metoda se temelji na sposobnosti ekstrakta da reducira Fe^{3+} u Fe^{2+} ione u otopini 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri nižem pH. Rezultati su prikazani kao µmol Fe^{2+} ekvivalenta (Fe)/mL uzorka.

Postupak rada

Za dokazivanje antioksidativne aktivnosti korištenih uzoraka biske, prvo je potrebno pripremiti FRAP reagens. FRAP reagens dobiva se miješanjem 50 mL 0,3 M acetatnog pufera, 5 mL 10 mM otopine TPTZ reagensa i 5 mL 20 mM otopine željezovog (III) – klorida. 10 mM TPTZ reagens priprema se tako da se odvaže 0,0312 g TPTZ-a u tikvicu od 10 mL te se do oznake nadopuni s 40 mM HCl. Otopina željezovog (III) – klorida priprema se vaganjem 0,0541 g željezovog (III) – klorida u odmjernoj tikvici od 10 mL koja se zatim do oznake nadopuni destiliranom vodom. Acetatni pufer dobije se otapanjem 0,93 g bezvodnog natrijevog acetata u 8 mL ledene octene kiseline u tikvici od 500 mL, nakon čega se tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom.

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

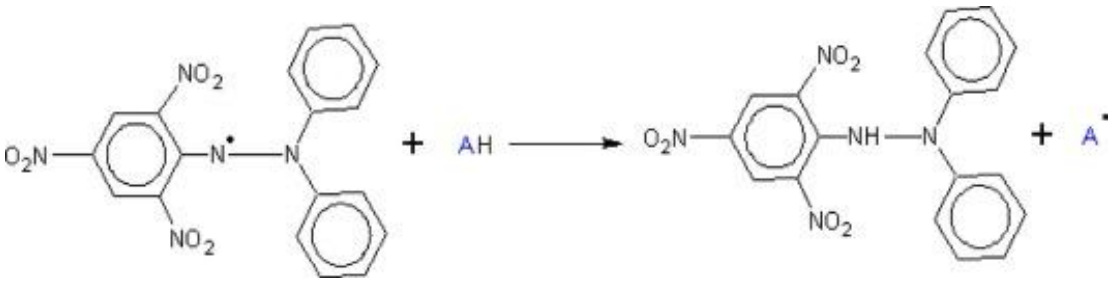


Slika 3. Baždarni pravac za određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

3.2.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

Princip metode

Za određivanje antioksidativnog kapaciteta određenog spoja DPPH metodom, prati se reakcija između stabilnog radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila i uzorka u kojem se mjeri antioksidativna aktinost. Redukcija DPPH radikala u metanolnoj otopini popraćena je kolorimetrijskom reakcijom. DPPH radikal zbog nesparenog elektrona pokazuje jako apsorpciju u viljivom 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 (Blois, 1958; Brand – Williams i sur., 1995).



Slika 4. Mehanizam reakcije DPPH radikala s antioksidansom

Postotak inhibicije DPPH radikala u uzorcima računa se prema jednadžbi (1):

$$\textbf{\% inhibicije} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \qquad [1]$$

$\mathbf{A_0}$ – apsorbancija otopine DPPH radikala

$\mathbf{A_t}$ – apsorbancija reakcijske smjese

Priprema reagensa

DPPH reagens dobije se otapanjem 0,03943 g DPPH s 96 % - tnim etanolom u tikvici od 10 mL. Od ove otopine se 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 % - tnim etanolom u tikvici od 50 mL.

Postupak rada

Za spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti korištenih uzoraka, u kivetu se odpipetira 200 µL ispitivanog uzorka te se doda 2 mL etanola i 2 mL prethodno pripremljene otopine DPPH. Slijepa proba se priprema na isti način, osim što se umjesto 200 µL uzorka, dodaje 200 µL etanola. Sadržaj kivete se promiješa te se nakon 30 minuta mjeri apsorbancija na 517 nm.

3.2.4. Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin – Dietrichu

Princip metode

Metoda se temelji na oksidaciji alkohola u prisutnosti sumporne 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 (Kretschmar, 1955).

Postupak

10 mL alkalne vode doda se 1 mL uzorka u kojem se određuje alkohol. Spoji se aparatura tako da je ″most″ uronjen u 20 mL otopine kalijeva bikromata. Prati se promjena

boje uzorka u zelenosmeđu te se nakon toga mjeri vrijeme, 1 minuta i 30 sekundi, 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 se izračunava se prema dolje navedenoj formuli (2) gdje je V_1 utrošak (mL) natrijevog tiosulfata za slijepu probu, V_2 utrošak (mL) natrijevog tiosulfata za uzorak, V_{uzorka} uzeti volumen uzorka (mL), *r* razrijeđenje uzorka, a *f* faktor 0,146.

$$EtOH\ (\%) = \frac{(V_1 - V_2) * f}{V_{uzorka}} * r \qquad [2]$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

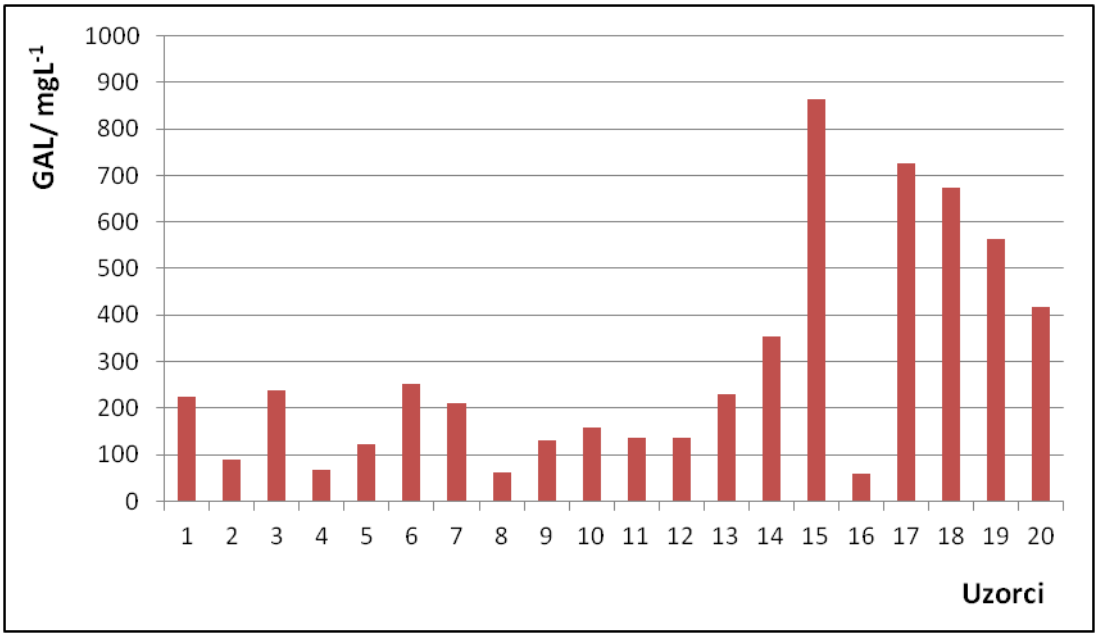
Biska je travarica koja se od davnina proizvodi maceracijom lišća žute imele na području Istre. Tijekom procesa proizvodnje iz imele se u alkoholnu bazu ekstrahiraju različiti spojevi za koje se smatra da pridonose pozitivnim zdravstvenim učincima konačnog proizvoda. Neki od istraženih učinaka su snižavanje krvnog tlaka i šećera u krvi te pojačavanje imunološkog sustava i inhibicija rasta tumorskih stanica kao rezultat djelovanja lektina i viskotoksina koji se u niskim koncentracijama ekstrahiraju iz imele (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Također je poznato da je ovo jako alkoholno piće bogato antioksidansima koji ulaze u reakcije sa slobodnim radikalima u organizmu, pritom ih oslabljujući i deaktivirajući.

Prilikom provedenog istraživanja spektrofotometrijski su određeni ukupni fenoli i antioksidacijska aktivnost korištenih uzoraka FRAP i DPPH metodama. Uzorcima je također određena koncentracija prisutnog etanola, odnosno njihova alkoholna jakost.

Cilj rada bio je ispitati razlike u sadržaju ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u dvadeset različitih uzoraka istarske biske te utvrditi postojanje korelacija između ta dva parametra.

4.1. Određivanje ukupnih fenola spektrofotometrijski pomoću Folin – Ciocalteu reagensa

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta nastalog obojenja pri valnoj duljini od 760 nm. Dobivene su apsorbancije zatim preračunate u koncentracije ukupnih fenola, što je prikazano na slici 5. Koncentracije su izražene kao ekvivalenti galne kiseline (GAL) u mg L^{-1}.



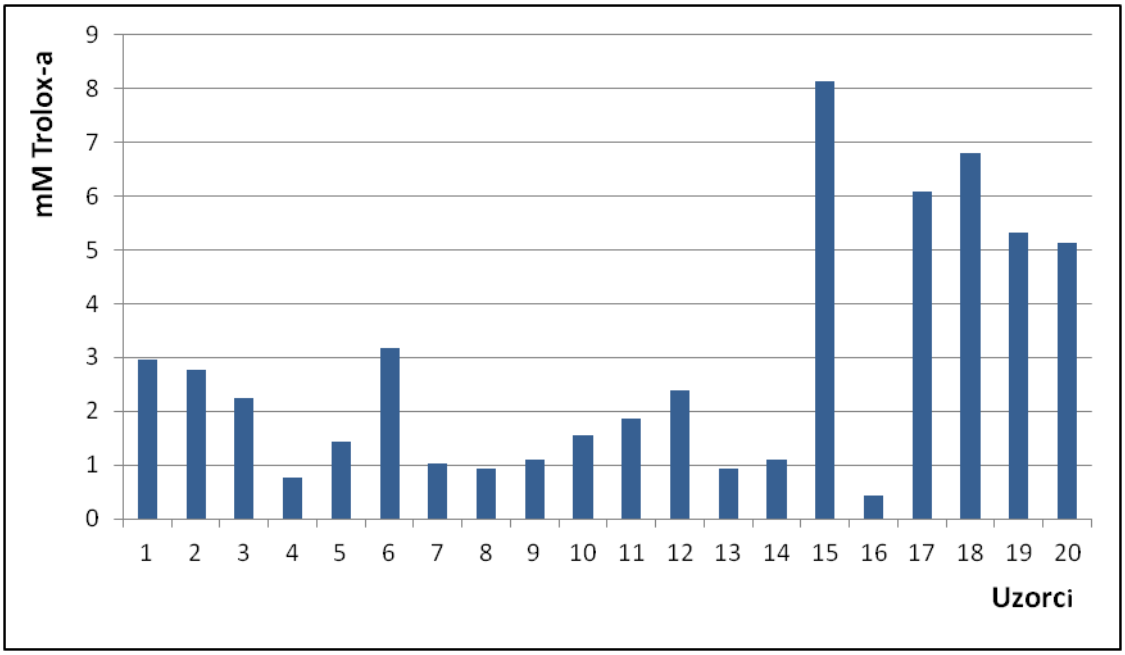
Slika 5. Koncentracije ukupnih fenola u uzorcima biske (1-20) određene pomoću Folin – Ciocalteu reagensa

Mrvčić i suradnici (2012) su spektrofotometrijskim određivanjem u uzorku istarske biske odredili koncentraciju ukupnih fenola od 640 mg GAE L^{-1}, sa čime se može usporediti rezultat dobiven analizom uzorka broj 18 koji iznosi 672,195 mg GAE L^{-1}. Također, Katsarou i suradnici (2012) su u alkoholnom ekstraktu lišća žute imele dobili koncentraciju od 161 mg GAE po gramu lišća. Budući da se u proizvodnji biske za 1 litru gotovog proizvoda macerira 5 grama suhog lišća imele, prethodno navedena vrijednost preračunata iznosi 805 mg GAE na 1 litru biske.

Iz rezultata prikazanih na slici 5 vidljivo je da uzorak broj 15 sadrži najveću koncentraciju ukupnih fenola, 863,659 mg GAE L^{-1} koja se može usporediti sa rezultatima koje su dobili Katsarou i suradnici (2012), a koji iznosi 805 mg GAE L^{-1}. Uzorak broj 16 sadrži najmanju koncentraciju spektrofotometrijski određenih ukupnih fenola, koja iznosi 60,00 mg GAE L^{-1}. Prosječna koncentracija ukupnih fenola u svih dvadeset uzoraka biske iznosi 285,691 mg GAE L^{-1}, što dokazuje da je biska jako alkoholno piće bogato fenolima.

4.2. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

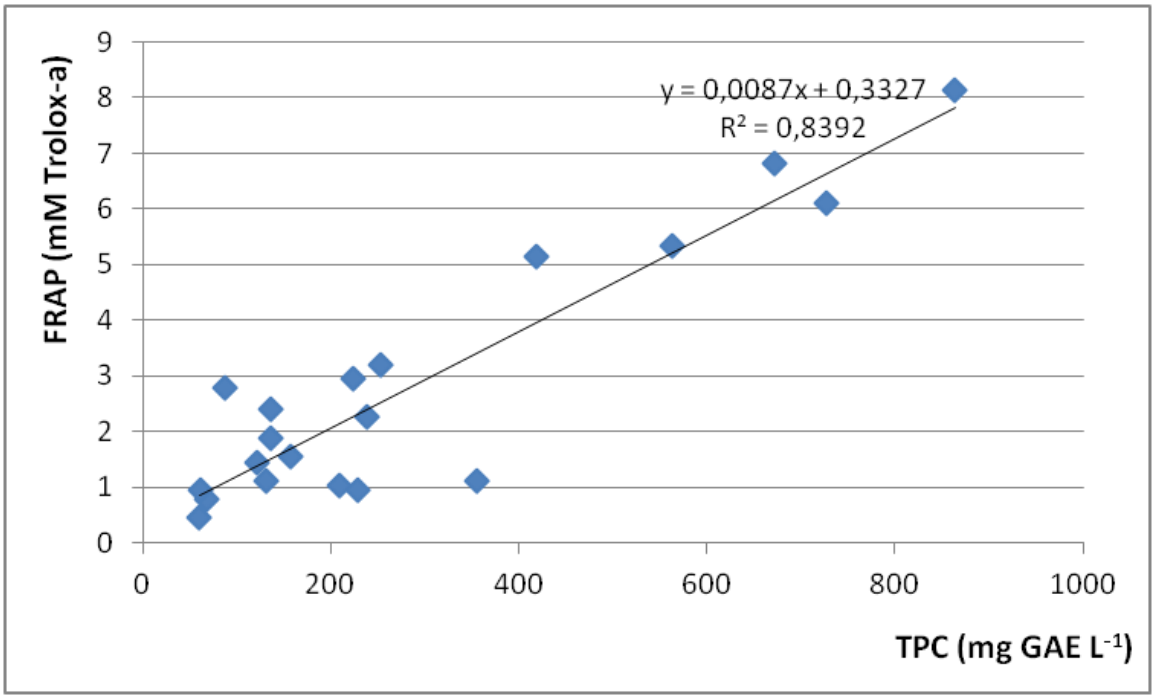
Antioksidacijska aktivnost u korištenim uzorcima određena je spektrofotometrijski nakon tretiranja uzoraka FRAP reagensom. Prisutni antioksidansi reduciraju žuto obojeni kompleks željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt, čija se apsorbancija mjeri spektrofotometrom pri 595 nm. Rezultati su izraženi kao mM Trolox-a (Slika 6).



Slika 6. Antioksidacijska aktivnost uzoraka biske (1-20) određena FRAP metodom

Iz rezultata prikazanih na slici 6 može se vidjeti da uzorak broj 15 pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost koja iznosi 8,13 mM Trolox-a dok uzorak broj 16 ima najmanju sposobnost redukcije TPTZ-a koja iznosi 0,44 mM Trolox-a što je u skladu s pretpostavkom da će onaj uzorak koji sadrži najveću ili najmanju koncentraciju ukupnih fenola pokazivati najveću odnosno najmanju antioksidacijsku aktivnost. Istraživanjima Mrvčić i suradnika (2012) određeno je da biska sadrži 4 mM Trolox-a, što je više od prosječne vrijednosti antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka koja iznosi 2,81 mM Trolox-a. Na slici 7 prikazana je ovisnost antioksidativne aktivnosti izmjerene FRAP metodom o količini ukupnih fenola u uzorcima biske. Utvrđena je pozitivna korelacija (koeficijent korelacije R^2 iznosi 0,8392) između ta dva parametra što upućuje na činjenicu da prisutnost ukupnih fenola

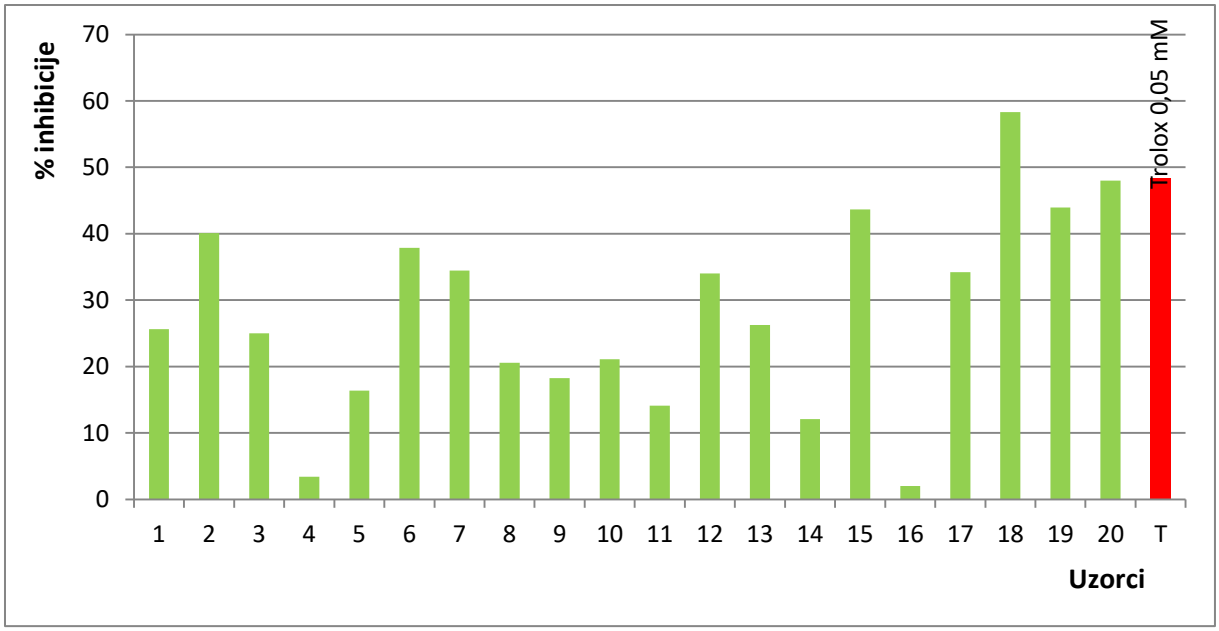
značajno doprinosi i antioksidativnoj aktivnosti uzoraka biske. Međutim, antioksidativna aktivnost uzoraka biske ne ovisi samo o količini ukupnih fenola, već i o prisutnim drugim kemijskim spojevima.



Slika 7. Ovisnost antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom o koncentraciji ukupnih fenola (TPC) u uzorcima

4.3. Ispitivanje antioksidacijske aktivnosti DPPH metodom

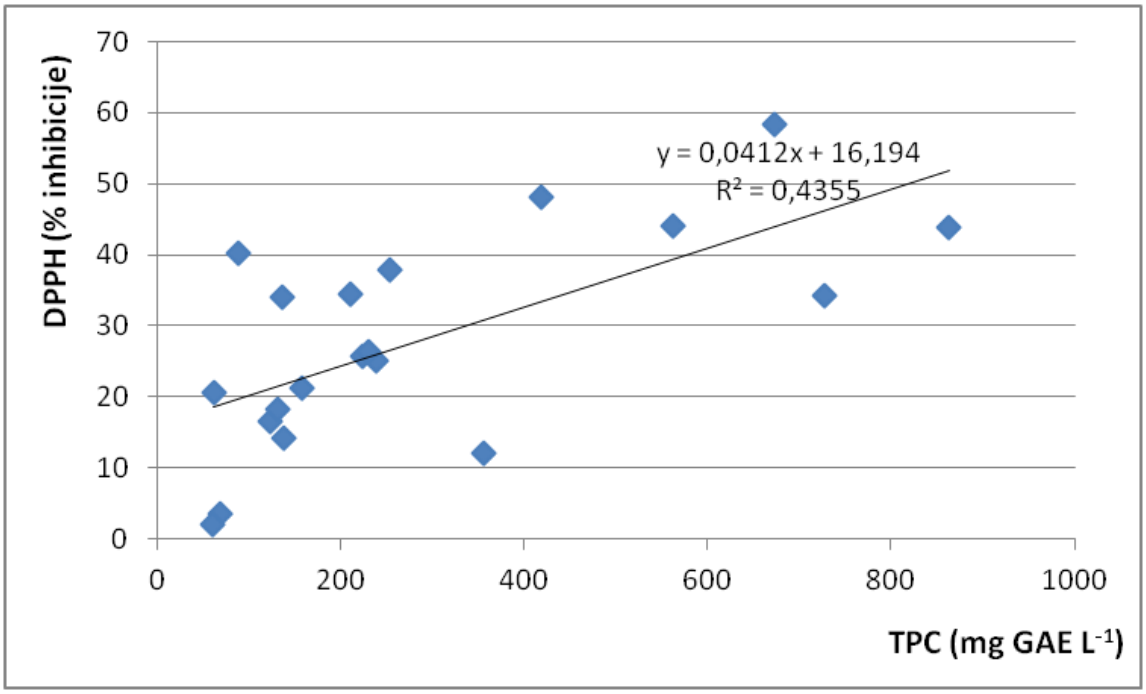
Antioksidacijska aktivnost korištenih uzoraka određena je spektrofotometrijski mjerenjem intenziteta nastalog ljubičastog obojenja pri valnoj duljini od 517 nm. Obojenje je posljedica redukcije stabilnog radikala DPPH u prisutnosti antioksidansa. Kao standard korišten je 0,05 mM Trolox koji pokazuje 48,34 %-tnu inhibiciju DPPH radikala. Rezultati su izraženi kao postotak inhibicije DPPH radikala (Slika 8).



Slika 8. Antioksidacijska aktivnost uzoraka biske (1-20) i Troloxa određena DPPH metodom

Vicas i suradnici (2012) su kao rezultat analize etanolnog ekstrakta imele koja je rasla na bagremu dobili 11,49 %-tnu inhibiciju DPPH radikala, što se može usporediti s uzorkom broj 14 (Slika 8) koji pokazuje 12,07 %-tnu inhibiciju. Önay-Uçar i suradnici (2006) su istraživanjima antioksidacijske aktivnosti metanolnog ekstrakta imele sa bagrema dobili rezultat od 73,44 % inhibicije. Velika razlika u postotku inhibicije kod Vicas i suradnika te kod Önay-Uçar i suradnika moguća je zbog korištenja različitih otapala.

Iz priložene slike 8 može se vidjeti da uzorak broj 16 daje najmanji postotak inhibicije DPPH radikala od 2,02 %, dok uzorak broj 18 pokazuje najveću antioksidacijsku aktivnost koja iznosi 58,33 %. Prosječna antioksidacijska aktivnost iznosi 27,96 %. Na slici 9 prikazana je ovisnost antioksidativne aktivnosti izmjerene DPPH metodom o količini ukupnih fenola u uzorcima biske. Iako je i u ovom slučaju utvrđena pozitivna korelacija (koeficijent korelacije R^2 iznosi 0,4355) između ta dva parametra, bolja korelacija postignuta je FRAP metodom.



Slika 9. Ovisnost antioksidacijske aktivnosti određene DPPH metodom o koncentraciji ukupnih fenola (TPC) u uzorcima

Rezultate dobivene analizom antioksidacijske aktivnosti FRAP i DPPH metodama može se usporediti sa rezultatima dobivenim određivanjem ukupnih fenola u uzorcima biske, što je prikazano na slikama 7 i 9. Naime, koncentracija ukupnih fenolnih spojeva trebala bi odgovarati njihovom antioksidacijskom kapacitetu, iz čega proizlazi da bi onaj uzorak koji sadrži najveću koncentraciju ukupnih fenola trebao imati najjaču antioksidacijsku aktivnost. Iz priloženih rezultata može se vidjeti da se je za većinu uzoraka ova tvrdnja pokazala točnom. Kao primjer se najviše ističe uzorak broj 15 koji pokazuje najveću koncentraciju spektrofotometrijski određenih ukupnih fenola te pokazuje najjaču antioksidacijsku aktivnost određenu FRAP metodom. S druge strane, uzorak broj 16 u svim primjenjenim metodama pokazuje najmanju koncentraciju ukupnih fenola te najslabiju antioksidacijsku aktivnost. Uzorci koji najbolje potvrđuju postavljenu pretpostavku su uzorci 3, 5, 18 i 19 kod kojih je koncentracija ukupnih fenola proporcionalna antioksidacijskom kapacitetu i kod FRAP i kod DPPH metoda.

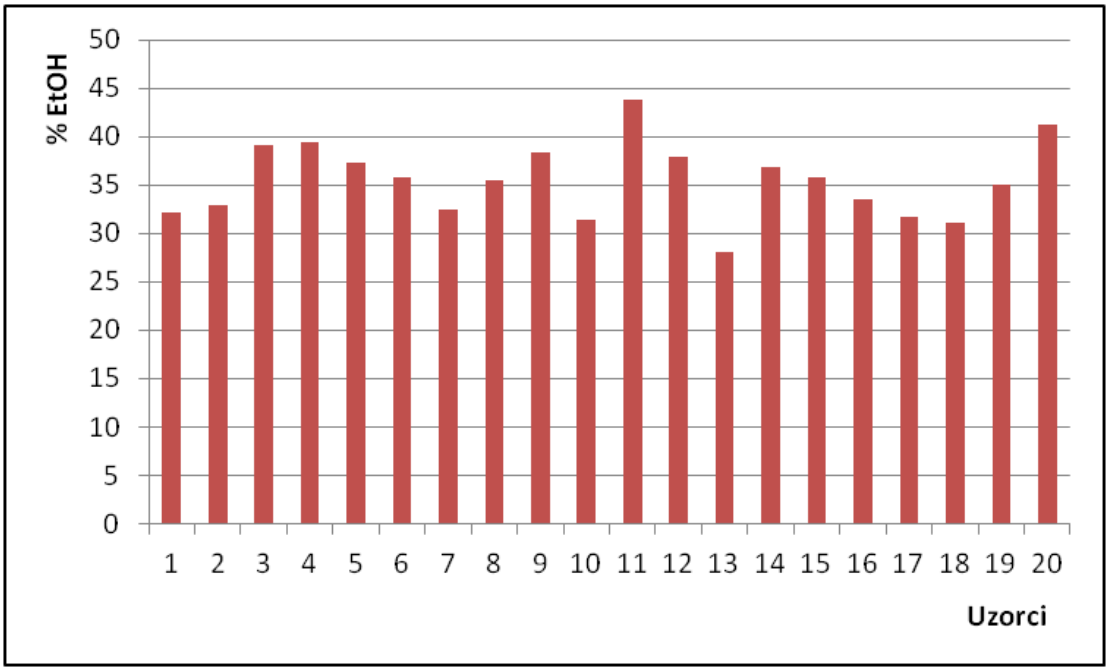
Velike razlike u rezultatima između pojedinih uzoraka mogu biti posljedica različitog staništa imele odnosno razlika između domaćina na kojima je imela rasla. Znanstveno je dokazano da imela apsorbira nutrijente koje proizvodi stablo na kojem raste te da njezin kemijski sastav ovisi upravo o domaćinu (Vicas i sur., 2011). Kod proizvodnje biske također

je vrlo bitno u koje je vrijeme imela ubrana te koji su njezini dijelovi macerirani jer se osim lišća mogu macerirati i stabljike. Marvibaigi i suradnici (2014) u svom istraživanju su koristili ekstrakte lista i stabljike imele u razrijeđenom acetonu. Dokazali su da najveću koncentraciju ukupnih fenola kao i najveću antioksidacijsku aktivnost određenu DPPH metodom, pokazuju upravo stabljike imele. Nadalje, Katsarou i suradnici (2012) proveli su DPPH analizu metanolnih ekstrakata grančica i stabljika žute imele. Ekstrakti grančica pokazivali su 92 %-tnu, dok su ekstrakti stabljika dali 88 %-tnu inhibiciju DPPH radikala.

Većina korištenih uzoraka biske iz domaće je proizvodnje gdje proizvođači proizvoljno, prema različitim receptima, proizvode bisku. Stoga je moguće da se u alkoholnoj bazi macerira manja količina suhog lišća imele kroz kraći vremenski period čime se u krajnjem proizvodu dobiva i manja koncentracija fenola i ostalih spojeva koji se ekstrahiraju prilikom maceracije imele. Osim toga, na različitu koncentraciju fenolnih spojeva u uzorcima biske može utjecati različita jakost alkoholne baze, temperatura na kojoj se provodila maceracija i dodatak šećera tokom maceracije. Dodatkom šećera povisuje se osmotski tlak te se time pospješuje izvlačenje vode i arome iz lišća koje se macerira.

4.4. Određivanje volumnog udjela alkohola metodom po Martin – Dietrichu

Volumni udio alkohola (%) u ispitivanim uzorcima biske određen je na temelju oksidacije alkohola u prisutnosti sulfatne kiseline sa kalijevim bikromatom u octenu kiselinu, nakon čega je preostalom kalijevom bikromatu dodan kalijev jodid. Izlučeni elementarni jod je uz škrob kao indikator, titriran natrijevim tiosulfatom (Kretschmar, 1955). Rezultati su izraženi kao volumni postoci etanola (% EtOH) u uzorcima (Slika 10).



Slika 10. Volumni udio alkohola u uzorcima biske (1-20) određen metodom po Martin - Dietrichu

Biska je definirana kao specijalna rakija dobivena maceracijom aromatičnog bilja u komovici. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima, Članku 39., specijalne rakije prilikom stavljanja na tržište kao gotovi proizvodi moraju imati alkoholnu jakost najmanje 37,5 % vol. alkohola.

U skupini domaćih biski najmanju alkoholnu jakost od 31,03 % ima uzorak broj 18, dok najveću pokazuje uzorak broj 20 sa 41,25 % vol. alkohola. Prosječna alkoholna jakost biski iz domaće proizvodnje iznosi 35,38 % vol. alkohola što je ispod zakonom propisane vrijednosti od 37,5 % vol. alkohola. U skupini industrijskih biski najmanju alkoholnu jakost od 28,1 % vol. alkohola pokazuje uzorak broj 13, a najveću uzorak broj 11 sa 43,8 % vol. alkohola. Prosječna alkoholna jakost korištenih industrijskih biski je 37,88 % vol. alkohola što je u skladu sa Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima RH.

5. ZAKLJUČAK

1. Biska je prirodno jako alkoholno piće koje spada u travarice, a proizvodi se maceracijom lišća žute imele (*Loranthus europaeus*) u rakiji komovici.

2. Žuta imela ovisno o stablu na kojem raste sadrži visoke koncentracije polifenolnih spojeva, od kojih najviše fenilpropanoida – koniferin i siringin i fenolnih kiselina – sinapinske, ferulinske, p-hidroksibenzojeve i kava kiseline. Osim polifenolnih spojeva imela sadrži lektine i viskotoksine koji sprječavaju rast tumorskih stanica, netopive triterpene, fitosterole te oligosaharide i polisaharide. Biološki aktivni spojevi maceracijom prelaze u bisku čime se ona svrstava u ljekovite rakije.

3. Količina fenolnih spojeva u uzorcima biske se znatno razlikuje zbog različitog tehnološkog procesa proizvodnje odnosno parametara kao što su količina, podrijetlo i kvaliteta lišća koje se macerira, zbog jakosti alkoholne baze ili duljine same maceracije.

4. Koncentracija ukupnih fenola u biski kreće se od 60 do 863,659 mg GAE L^{-1} i u pozitivnoj je korelaciji s antioksidacijskom aktivnošću.

5. Analiza uzoraka FRAP metodom pokazala je da najveću antioksidacijsku aktivnost od 8,13 mM Trolox-a pokazuje uzorak broj 15 dok je DPPH analizom najveću antioksidacijsku aktivnost od 58,33 % inhibicije DPPH radikala pokazao uzorak broj 18.

6. Prema Pravilniku o jakim alkoholnim pićima biska mora imati minimalno 37,5 % vol. alkohola. Prosječna jakost industrijskih uzoraka je 37,88 % vol. dok je prosječna jakost domaćih uzoraka biske 35,38 % vol. alkohola.

6. LITERATURA

Benzie I. 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. *Methods in Enzymology* **299**: 15 – 27.

Blois M. (1958) Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **181**: 1199.

Brand – Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. (1995) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT Food, Science and Technology* **28**: 25 – 30.

Grba S., Stehlik Tomas V. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, 1. izd., Plejada, str. 173 - 175.

Katsarou A., Rhizopoulou S., Kefalas P. (2012) Antioxidant Potential of the Aerial Tissues of the Mistletoe *Loranthus europaeus Jacq*. *Records of Natural Products* **6**: 394–397.

Kazazić S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279 – 290.

Kretschmar H. (1955) Hefe und alcohol, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, str. 579-600.

Lučić R. (1986) Proizvodnja jakih alkoholnih pića, 1. izd., Nolit, Beograd.

Marvibaigi M., Aminia N., Supriyantoa E., Jamilb S., Majidc F.A.A., Khangholi S. (2014) Total Phenolic Content, Antioxidant and Antibacterial Properties of *Scurrula ferruginea* Extracts. *Jurnal Teknologi*, **70**: 65 – 72.

Milotić A. (2001) Zaštita istarskih rakija kao tipičnih proizvoda. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Završna izvješća odobrenih VIP projekata, 2001. godina.

Mrvčić J., Posavec S., Kazazić S., Stanzer D., Peša A., Stehlik-Tomas V. (2012) Spirit Drinks: a Source of Dietary Polyphenols. *Croatian Journal of Food Science and Technology* **4**: 102 – 111.

Naczk M., Shahidi F. (2006) Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523 – 42.

Nazaruk J., Orlikowski P. (2016) Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. *Natural Product Research* **30**: 373-385.

Önay Uçar E., Karagöz A., Arda N. (2006) Antioxidant Activity of *Viscum album* ssp. *Album. Fitoterapia*, **77**: 556 – 560.

Pevalek-Kozlina B. (2003) Fiziologija bilja, 1. izd. Profil, Zagreb.

Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (2009) *Narodne novine* **61** (NN 61/2009).

Singleton V.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **16**: 144 – 158.

Vicas S., Rugina D., Leopold L., Pintea A., Socaciu C. (2011) HPLC Fingerprint of Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of *Viscum album* from Different Host Trees. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* **39**: 48 – 57.

Vicas S., Rugina Socaciu C. (2012) Antioxidant Activity of European Mistletoe (*Viscum album)*. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health* **7**: 115 – 130.

Izjava o izvornosti

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

Petra Jedrejčić

ime i prezime studenta