

# Polifenolni profil Biske

---

Granić, Dora

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:897101>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-30**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Dora Granić**

6987/PT

**POLIFENOLNI PROFIL *BISKE***

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Proizvodnja jakih alkoholnih pića

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

**Zagreb, 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### POLIFENOLNI PROFIL *BISKE*

*Dora Granić*, 0058205960

**Sažetak:** *Biska* je tradicionalna istarska travarica proizvedena postupkom maceracije lišća i grančica bijele imele u vodeno-alkoholnoj bazi (etilni alkohol poljoprivrednog podrijetla ili rakija komovica). Tijekom procesa maceracije dolazi do ekstrakcije biološki aktivnih spojeva imele (polifenoli, lektini, viskotoksini) koji imaju pozitivan utjecaj na zdravlje, pa se *Biska* ujedno smatra i ljekovitom rakijom. Cilj rada je odrediti i usporediti polifenolni profil 14 uzoraka *Biske* (5 industrijskih i 9 proizvedenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima). Polifenolni profil uzoraka *Biske* određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Najzastupljeniji polifenolni spoj u uzorcima *Biske* je kvercetin-3-glikozid koji je detektiran u svim uzorcima. Od ostalih polifenolnih spojeva u pojedinim uzorcima detektirani su protokatehinska kiselina, katehin te klorogena kiselina.

**Ključne riječi:** *Biska*, imela, maceracija, polifenoli, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

**Rad sadrži:** 24 stranice, 9 slika, 7 tablica, 27 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:** 14. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

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

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Fermentation and Yeast Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

### POLYPHENOL PROFILE OF *BISKA*

*Dora Granić*, 0058205960

**Abstract:** *Biska* is a traditional Istrian spirit drink produced by the smooth maceration of leaves and branches of white mistletoe in an aqueous-alcoholic base (ethyl alcohol of agricultural origin or spirit drink so called komovica). During the maceration process, biologically active compounds (polyphenols, lectins, viscotoxins) that have a positive effect on health are extracted, so *Biska* is considered to be a medicinal spirit. The aim of the paper is to determine and compare the polyphenol profile of 14 *Biska* samples (5 industrial and 9 produced on family farms). The polyphenol profile of *Biska* samples was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The most common polyphenolic compound in *Biska* samples is quercetin-3-glycoside, which was detected in all samples. Other polyphenolic compounds detected in certain samples were protocatechuic acid, catechin and chlorogenic acid.

**Key words:** *Biska*, high performance liquid chromatography, maceration, mistletoe, polyphenols

**Thesis contains:** 24 pages, 9 figures, 7 tables, 27 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

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

**Defence date:** September 14<sup>th</sup> 2018

## Sadržaj:

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD</b> .....                                   | <b>1</b>  |
| <b>2.1. Jaka alkoholna pića</b> .....                  | <b>2</b>  |
| <b>2.2. Travarica</b> .....                            | <b>3</b>  |
| <b>2.3. Biska</b> .....                                | <b>3</b>  |
| 2.3.1. Proizvodnja <i>Biske</i> .....                  | 5         |
| <b>2.4. Imela</b> .....                                | <b>5</b>  |
| 2.4.1. Bijela imela (lat. <i>Viscum album</i> ).....   | 8         |
| 2.4.2. Biološki aktivni spojevi imele .....            | 9         |
| 2.4.2.1. Lektini.....                                  | 9         |
| 2.4.2.2. Viskotoksini .....                            | 10        |
| 2.4.2.3. Terpeni .....                                 | 10        |
| 2.4.2.4. Polifenoli .....                              | 11        |
| <b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....                    | <b>14</b> |
| <b>3.1. Materijali</b> .....                           | <b>14</b> |
| 3.1.1. Uzorci <i>Biske</i> .....                       | 14        |
| 3.1.2. Kemikalije.....                                 | 14        |
| <b>3.2. Metode rada</b> .....                          | <b>14</b> |
| 3.2.1. Određivanje fenolnih spojeva HPLC metodom ..... | 14        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....                   | <b>17</b> |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....                              | <b>21</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....                             | <b>22</b> |

# 1. UVOD

Jaka alkoholna pića su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva te sadrže minimalno 15% vol. alkohola (NN 61/2009). Mogu se proizvesti direktno destilacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla koje sadrže šećer ili maceracijom aromatičnog bilja i voćnih plodova u alkoholnoj bazi. Hrvatska je zemlja povoljnog geografskog položaja koji omogućuje sadnju različitih vrsta biljaka koja se koriste u proizvodnji jakih alkoholnih pića. U skladu s tim postoje i tradicionalni hrvatski proizvodi poput loze (rakija), šljivovice i travarice.

Travarica je jako alkoholno piće koje se proizvodi maceracijom različitih vrsta ljekovitog bilja (kao što su komorač, kadulja, ružmarin, pelin, kadulja, metvica, itd.) u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici s ciljem ekstrakcije tvari arome, boje i okusa. Tijekom ekstrakcije dolazi do prelaska biološki aktivnih spojeva poput flavonoida, tanina, eteričnih ulja, u alkoholnu bazu za koju se najčešće koristi rakija komovica koja pridonosi boljoj kvaliteti travarice. U Hrvatskoj se travarice tradicionalno proizvode u Istri i Dalmaciji.

Za područje Istre karakteristična je proizvodnja *Biske*. *Biska* se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica imele u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla ili najčešće komovici. Količina bilja koja se stavlja u alkoholnu bazu i dugotrajnost maceracije rezultiraju u boji rakije; što je duža maceracija bit će tamnija boja rakija. Također će biti prisutna i veća količina spojeva koji se ekstrahiraju tijekom procesa maceracije.

Cilj rada je odrediti i usporediti polifenolni profil 14 uzoraka *Biske* (5 industrijskih i 9 proizvedenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima). Polifenolni profil uzoraka *Biske* određen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Jaka alkoholna pića

Jaka alkoholna pića su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva te sadrže minimalno 15% vol. alkohola (NN 61/2009). Mogu se proizvesti na dva različita načina:

- Izravnim postupkom odnosno destilacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla (na primjer viski, konjak), maceracijom bilja u etilnom alkoholu (na primjer Biska) te dodavanje aroma, šećera, destilata i različitih sladila;
- Miješanjem jakih alkoholnih pića s jednim ili više drugih jakih alkoholnih pića, etilnim alkoholom poljoprivrednog podrijetla ili destilatima poljoprivrednog podrijetla i drugim alkoholnim pićima.

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

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

- prirodna jaka alkoholna pića,
- umjetna jaka alkoholna pića i
- aromatizirana vina.

Prirodna jaka alkoholna pića proizvode se destilacijom prevrelih komina, a sadrže specifičnu aromu koja potječe od sirovina iz kojih su pića proizvedena. Tijekom tehnološkog postupka proizvodnje nije dozvoljena upotreba šećera, škrobnog sirupa ili sirovina na bazi škroba, ujedno ni dodavanje rafiniranog etilnog alkohola i biljnih proizvoda koji su ekstrahirani etilnim alkoholom te naposljetku ni dodavanje umjetnih aroma i boja. Prirodna pića se dijele prema sirovinama iz koji se dobivaju na: voćne rakije (komovica, viljemovka), žitne rakije (viski, gin) i šećerne rakije (rum).

Umjetna jaka alkoholna pića proizvode se maceracijom sirovina u alkoholu, destilacijom voćnih sokova i/ili dodatkom rafiniranog alkohola i aromatski supstanci. Poželjno je da

sadrže sve karakteristike sirovine iz koje su proizvedena, ali 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 dodataka šećera i rafiniranog alkohola (Grba i Stehlik-Tomas, 2010).

## **2.2. Travarica**

Travarica je jako alkoholno piće koje se proizvodi maceracijom različitih vrsta ljekovitog bilja (kao što su komorač, kadulja, ružmarin, pelin, kadulja, metvica, itd.) u razrijeđenom etilnom alkoholu ili u rakiji komovici s ciljem ekstrakcije tvari arome, boje i okusa. Po načinu proizvodnje spada u likere i miješana jaka alkoholna pića osim što se ne koristi šećer tijekom tehnološkog postupka, a s druge strane ima obilježja po kojima spada u destilirana pića jer sadrži 40% vol. alkohola. U Hrvatskoj se travarice tradicionalno proizvode u Istri i Dalmaciji. Tijekom ekstrakcije dolazi do prelaska biološki aktivnih spojeva poput flavonoida, tanina, eteričnih ulja, sluzi, saponina i gorkih tvari u alkoholnu bazu za koju se najčešće koristi rakija komovica koja pridonosi boljoj kvaliteti travarice.

Rakija od groždane komine ili komovica se nalazi u kategoriji jakih alkoholnih pića podrijetlom iz Hrvatske (NN 61/09), predstavlja jako alkoholno piće proizvedeno isključivo iz fermentirane groždane komine (kruti ostatak tijekom proizvodnje vina nakon odvajanja mošta) i neposredno destilirano vodenom parom ili nakon dodavanja vode groždanoj komini. Isključivo kod tradicionalnih metoda proizvodnje ju je moguće aromatizirati, inače je moguće koristiti samo karamel kao sredstvo za prilagodbu boje. Kada se stavlja na tržište kao gotov proizvod potrebno je da sadrži najmanje 37,5% vol. alkohola.

## **2.3. Biska**

*Biska* ili rakija od imele (slika 1) je tradicionalna istarska rakija aromatizirana ekstraktom bijele imele (lat. *Viscum album*). U najvećem postotku sadrži vodu od 60 do 65%, zatim sadrži 36 do 40% vol. etilnog alkohola, 0,20 do 2% vol. metanola, 200 do 1800 mg/L ukupnih kiselina te male količine spojeva dobivenih samom maceracijom imele (Milotić, 2001). *Biska* također sadrži i ljekovita svojstva, te je jedan od najboljih prirodnih lijekova protiv arterioskleroze i pomaže za regulaciju visokog i niskog tlaka.



Ne postoji jedinstven recept za proizvodnju *Biske*, već ovisi o dugotrajnosti maceracije, količini i vrsti alkoholne baze za maceraciju i količini i vrsti bilja koje se koriste tijekom tehnološkog procesa, a ti parametri ovise od proizvođača do proizvođača. Recept je star otprilike dvije tisuće godina. Nasljeđe je starih Kelta koji su nekada živjeli na ovim prostorima, a smatra se da je bijela imele (*Viscum album*) bila njihova kulturna biljka. Najpoznatija je humska *Biska* koja se sprema prema recepturi pokojnog humskog župnika, koji je bio vrsni travar, Josipa Vidala (Anonymus 1). Primjer recepta za proizvodnju *Biske* dan je u tablici 1.

**Tablica 1.** Recept za proizvodnju *Biske* (Keršek, 2008)

| <i>Sastojci</i>  | <i>Priprema</i>   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ listići imele 30 – 40 g</li> <li>➤ 1 L 45 % - tne rakije (komovica ili loza)</li> </ul> | <p>U rakiju dodati usitnjene grančice s listovima imele koje je potrebno prethodno dobro oprati u mlakoj vodi.</p> <p>Staklenku ostaviti 2 – 3 tjedna prije konzumacije na tamnom i hladnom mjestu.</p> |



**Slika 1.** *Biska* ili rakija od imele (Anonymus 2)

### 2.3.1. Proizvodnja *Biske*

*Biska* se proizvodi maceracijom lišća i mladih grančica imele u etilnom alkoholu poljoprivrednog podrijetla ili najčešće komovici. Svakodnevno je potrebno rakiju miješati, a maceracija traje ovisno o količini dodanog lišća (minimalno 30 dana). Količina bilja koja se stavlja u alkoholnu bazu i dugotrajnost maceracije rezultiraju boji rakije, što je duža maceracija bit će tamnija boja rakija. Također će biti prisutna i veća količina spojeva koji se ekstrahiraju tijekom procesa maceracije. Nakon završene maceracije u rakiju se može dodati 50 g/L meda ili 3% šećera. Faza homogenizacije svih sastojaka traje od 40 do 60 dana, a zatim se rakija filtrira te lijeva u boce do 1 L.

## 2.4. Imela

Imela (lat. *Viscum album*) raste kao parazit u obliku grma, najčešće pri vrhu grana na stablima bjelogorice, većinom na jabuci kruški i hrastu (slika 2).



**Slika 2.** Imela (lat. *Viscum album*) (Anonymus 3)

Zimzeleni grm može narasti promjera i do 1 m. Na žutozelenoj, drvenastoj stabljici se nalaze žutozeleni listovi, a dvodomni cvjetovi izlaze iz koljena stabljike. Plod je gotovo bijel i poluproziran (slika 3), pun ljepljivog soka s jednom tvrdom sjemenkom u sredini. Sadrži

zelenu smolu, masno ulje, eterično ulje, viscin, sluz, gumu, kiselinu, vosak, holin, alkaloid viskotoksin, inozitolin i flavonske heterozide (Gursky, 1985).



**Slika 3.** Plod imele (Anonymus 4)

Primjena imele seže davno u povijest kada se javljaju prvi zapisi od grčkog liječnika i autora Dioskorid (15. – 85. god.) koji navodi da ju je Hipokrat (460.-377. god. prije n.e.) koristio za liječenje slezena i menstrualnih bolova. Tijekom povijesti su se stjecale nove spoznaje o ljekovitom djelovanju imele (Tablica 2).

**Tablica 2.** Kratka povijest korištenja imele u Europi (Büssing, 2000)

|                        |  |
|------------------------|--|
| 5. stoljeće prije n.e. | Bolesti slezena i menstrualni bolovi                             |
| 1. stoljeće            | Liječi mnoge bolesti, protulijek za otrov, neplodnost            |
| 12. stoljeće           | Epilepsiju, bolesti jetre i selzena, neplodnost kod žena         |
| 16. stoljeće           | Epilepsiju, bolesti bubrega i slezena                            |
| 18. stoljeće           | Epilepsiju, bolesti pluća i jetre, porođajnu bol, srčane bolesti |
| 20. stoljeće           | Hipertenziju, artrozu i rak                                      |

Danas se i dalje realiziraju ispitivanja i različita istraživanja vezana za ljekovito djelovanje imele. Također su ujedno nastali i neki mitovi vezanih uz imelu koji se navode u nastavku.

- **Francuski mit** – po starom vjerovanju imela je otrovna jer je rasla na drvetu iz kojega je napravljen križ na kojem je Isus razapet.
- **Vikinški mit** – imela ima sposobnost dizanja mrtvih što se povezuje sa uskrsnućem Baldera, boga ljetnog sunca. Balder je imao san u kojem je vidio da će umrijeti, a njegova majka Frigga, božica ljubavi i ljepote, je prorekla da će u tom slučaju sve na zemlji umrijeti. Da bi osigurala sinovu sigurnost od biljaka, životinja i prirodnih elemenata je tražila da ga ne ubiju. Posljedica je da su ljudi na Baldera bacali sve moguće stvari dok ga neprijatelj Loki nije ubio s otrovnom strelicom od imele. Suze koje je Frigga isplakala promijenile su boju bobica iz crvene u bijelu što je diglo Baldera iz mrtvih, a Frigga je očistila imelu od loše reputacije.
- **Britanski mit** – odnosno druidska vjerovanja su išla od toga da imela osigurava plodnost u ljudi i životinja. Druidi su rezali imelu 5 dana poslije mladog mjeseca iza zimskog solsticija. Morala je biti odrezana sa zlatnim srpom i moralo se paziti da ne padne na tlo kako se ne bi „onečistila“, za tu su priliku koristili bijelu tkaninu. Potom su žrtvovali dva bijela bika i dijelili vjernicima.

Budući imela ostaje zelena tijekom cijele godine, najčešće se zamjećuje zimi u vrijeme Božića kada su razne trgovine njome ukrašene, ali se crkve ne ukrašavaju jer se imela smatra poganim ukrasom. Poganska upotreba u doba oko solsticija je bila jako raširena pa ju je Crkva zabranila. Zabranom imele predložena je upotreba božikovine čiji su listovi podsjećali na Kristovu krunu, a crvene bobice na kapi krvi. Tijekom cijelog srednjeg vijeka je imela bila zabranjena, a u Engleskoj je zabrana bila na snazi sve do kasnog 20. stoljeća (Anonymus 5).

Imela je biljka koja se ne uzgaja već njezino razmnožavanje omogućavaju ptice; naime, ptice jedu plodove imele te svoj izmet, koji ujedno sadržava i njezine sjemenke, ostavljaju na granama. Iz sjemenki izrastaju nove biljke, kojima je potrebno i do nekoliko godina da u potpunosti stasaju.

Imela ima i ljekovito djelovanje, te omogućava liječenje od padavice, grčeva, arterioskleroze, povišenog krvnog tlaka, tegoba u vrijeme klimakterija, potiče rad žlijezde gušterače, čisti nezdravu krv (osobito kod raka), regulira stolicu, umiruje živce, pomaže protiv nesаницe, itd. U tablici 3. je prikazan jedan od brojnih recepata za pripremanje lijeka od imele.

**Tablica 3.** Recept za pripremu lijeka od imele (Gursky, 1985)

| <i>Sastojci</i>  | <i>Priprema</i>   |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ prašak imele (osušeni i usitnjeni dijelovi biljke i lišća)</li> <li>➤ topla voda</li> </ul> | <p>Prašak imele se uzima dva puta dnevno koliko stane na vrh noža, s vodom ili u jelu.</p> <p>Uzeti u pola žličice od kave prah od imele i staviti u 2 dcl tople vode, te pustiti da stoji 3 sata. Dobiveni ekstrakt se popije u dva obroka: pola ujutro, a pola navečer prije spavanja</p> |

#### 2.4.1. Bijela imela (lat. *Viscum album*)

Za proizvodnju Biske se koristi europska bijela imela (lat. *Viscum album*), a ona je ujedno i vrsta imele koja se u današnje vrijeme najviše istražuje. Bijela imela je poluparazit koji raste u Europi, sjeverozapadnoj Africi, južno zapadnoj i centralnoj Aziji. Raste na različitim stablima i ovisno na kojem stablu raste sadrži različite biološki aktivne spojeve. Njen kemijski sastav ovisi o vremenu berbe, vrsti drveta na kojem raste kao i o procesu proizvodnje (Nazaruk i Orlikowski, 2016). U tablici 4 je prikazana znanstvena klasifikacija ove vrste imele.

**Tablica 4.** Znanstvena klasifikacija vrste *Viscum album* (Vicas i sur., 2012)

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>Koljeno</b>  | <i>Magnoliophyta</i>  |
| <b>Razred</b>   | <i>Magnoliopsida</i>  |
| <b>Red</b>      | <i>Santalales</i>   |
| <b>Porodica</b> | <i>Santalaceae (Viscaceae), Opiliaceae, Misodendraceae, Olacaceae, Loranthaceae</i> |
| <b>Rod</b>      | <i>Viscum</i>   |
| <b>Vrsta</b>    | <i>Viscum album</i>   |

## 2.4.2. Biološki aktivni spojevi imele

Imela sadrži visoki udjel biološki aktivnih spojeva što je dokazano raznim istraživanjima (Vicas i sur., 2011), a njihova količina ovisi kako o vrsti drveta na kojem imela raste, tako i o dijelovima same biljke (tj. imele).

Jedni od najvažnijih, a ujedno i najpoznatijih biološki aktivnih spojeva imele su lektini i viskotoksini. Oni su značajni zbog svojeg apoptotičnog i citotoksičnog utjecaja na stanice zbog čega se koriste u liječenju karcinoma. Od polifenolnih spojeva prisutne su fenolne kiseline, fenilpropanoidi i flavonoidi koji imaju izraženu antioksidacijsku aktivnost (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Biološkom djelovanju doprinose i ostali sekundarni metaboliti bijele imele kao što su alkaloidi, amini i terpenoidi (Ochocka i Piotrowski, 2002).

Prije se pozitivan učinak biološkog djelovanja imele povezivao sa smanjenjem krvnog tlaka i normalnim radom srca, a danas se najviše koristi u medicinske svrhe kao terapije za ljude oboljele od raka (Barberaki i Kintzios, 2002).

### 2.4.2.1. Lektini

Lektini spadaju u obrambene biljne proteine koji imaju sposobnost vezanja na ugljikohidrate ili na proteine s ugljikohidratima, a prvenstveno se mogu naći u sjemenkama imele (Pevalek-Kozlina, 2003). Pomažu biljci u prenošenju šećera, imaju ulogu antitijela protiv raznih nametnika i tvore s polisaharidima nekovalentne veze što čini staničnu stijenku rastezljivom.

Iz imele su izolirane tri različite vrste lektina. Lektini se međusobno razlikuju u molekularnoj masi i specifičnosti šećera:

- Lektin I –  $M_r$  11500; šećer: D-galaktoza
- Lektin II –  $M_r$  60000; šećer: D-galaktoza i N – acetil – D - galaktozamin
- Lektin III –  $M_r$  50000; šećer: N-acetil- D- galaktozamin

Sva tri lektina reagiraju s ljudskim eritrocitima neovisno o vrsti krvne grupe (Franz i sur., 1981). U visokim koncentracijama su toksični za sisavce, ali pri niskim koncentracijama djeluju povoljno na organizam jer imaju citotoksični utjecaj pa se sve češće primjenjuje kod liječenja tumora (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

### 2.4.2.2. Viskotoksini

Viskotoksini su mješavine malih, aktivnih proteina koji su načinjeni od 46 aminokiselinskih ostataka i sadrže molekulsku masu oko 5000 (Samuelsson, 1971) te se mogu pojaviti u šest izomera, od kojih su najpoznatiji viskotoksin A2, viskotoksin A3 i viskotoksin B. Izomerni oblici ovise o redosljedu aminokiselina, rasporedu disulfidnih mostova i o vrstu stabla na kojem imela raste (Schaller i sur., 1998).

### 2.4.2.3. Terpeni

Terpeni su vrsta hlapljivih organski spojeva koja je odgovorna za miris biljaka i cvijeća. Nisu topljivi u vodi, a dobivaju se kao destilat pri zagrijavanju biljnog materijala. Sastavljeni su od izoprenskih jedinica koje se sastoje od pet ugljikovih atoma i dvije dvostruke veze. Mogu se podijeliti u više skupina (tablica 5).

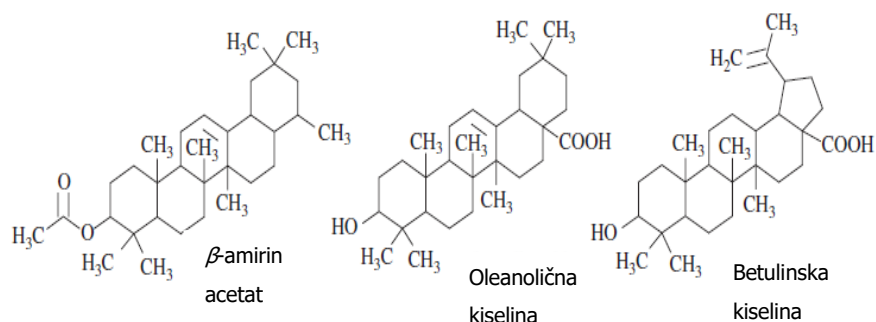
**Tablica 5.** Podjela terpena (Pine, 1994)

| Vrsta         | Broj ugljikovih atoma | Broj izoprenskih jedinica |
|---------------|-----------------------|---------------------------|
| Monoterpeni   | 10                    | 2                         |
| Seskviterpeni | 15                    | 3                         |
| Diterpeni     | 20                    | 4                         |
| Triterpeni    | 30                    | 6                         |
| Tetraterpeni  | 40                    | 8                         |

Jedan od važnijih spojeva koji se nalazi u biljkama je  $\beta$ -karoten koji spada u skupinu tetraterpena poznatih i kao karotenoidi. Karotenoidi apsorbiraju svjetlo u vidljivom području spektra i daju boje mnogim biljkama (Pine, 1994).

Triterpeni izolirani iz imele su smjesa fitosterola i njihovih glukozida, betulinske kiselina, oleanolična kiselina i  $\beta$ -amirin acetat (slika 4), a oni su vrlo važni u obrani imele od kukaca te iako imaju slabu topljivost pokazuju značajno antikancerogeno djelovanje (Nazaruk i Orlikowski, 2016).





**Slika 4.** Strukturne formule:  $\beta$ -amirin acetata, oleanolične i betulinske kiseline (Nazaruk i Orlikowski, 2016).

#### 2.4.2.4. Polifenoli

Polifenolni spojevi spadaju u biljne sekundarne metabolite koji pridonose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti, ali ujedno štite od nepoželjnih nametnika, utječu na samu pigmentaciju te imaju jaka antioksidacijska svojstva. U svojoj strukturi sadrže aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina te sukladno s brojem hidroksilnih skupina vezanih na prsten postoje jednostavniji spojevi poput fenolnih kiselina, fenilpropanoida, flavonoida i složenije polimerne molekule kao što su lignini, melanini i tanini. Na slici 5. je prikazana podjela polifenola prema Naczki i Shahidi (2006).

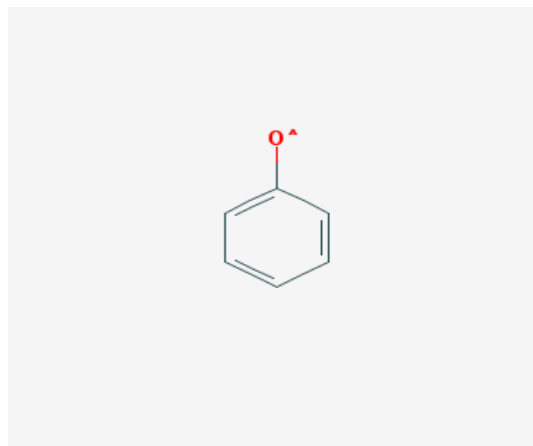
| fenolne kiseline   | flavonoidi  | tanini  |
|--|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• hidroksicimetna</li> <li>• hidroksibenzojeva</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• antocijani</li> <li>• flavanoli</li> <li>• flavanali</li> <li>• flavoni</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• kondenzirani i hidrolizirani</li> <li>• lignani, kumarini..</li> </ul> |

**Slika 5.** Podjela polifenolnih spojeva (Naczki i Shahidi, 2006)



Polifenoli posjeduju antioksidativnu aktivnost koja sprječava nastanak oksidativnog stresa, definiranog kao neuravnoteženost između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansima. Takva neuravnoteženost dovodi do mnogobrojnih biokemijski promjena u životinjskim i ljudskim organizmima koji uzrokuju brojne kronične bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, mutageneza i karcinom, neurodegenerativne poremećaje i starenje (Papuc i sur., 2010).

Njihov antioksidacijski mehanizam temelji se na prelasku u fenoksil – radikal (slika 6) otpuštajući svoj vodikov atom, koji se potom veže na slobodne radikale. Osim što mogu sparivati elektrone slobodnih radikala, karakterizira ih i sposobnost vezanja prijelaznih metala ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) te aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Kazazić, 2004).



**Slika 6.** Fenoksil – radikal (Anonymus 6)

Biljke imaju sposobnost sintetiziranja neograničenih količina aromatičnih spojeva, od kojih je najviše fenola i njihovih derivata. Prema istraživanju Vicas i sur. (2011) HPLC analizom određeni su udjeli biološki aktivnih tvari u imeli koji se međusobno razlikuju s obzirom na vrstu drveta na kojem raste, vremenu berbe i dijelu biljke koji se ekstrahira. Dokazano je da najveću koncentraciju sadrže uzorci listova imele koji su ubrani u svibnju sa stabla bagrema.

U istraživanju Choudhary i sur. (2010) otkrivena su i dva nova spoja (flavanol glikozid i fenil propanoid) uz pomoć NMR spektroskopije. Pokazalo se kako najjače antioksidacijsko djelovanje sadrži 4,5 – dimetoksi – 7 – hidroksiflavanon, čak veće i od standarda koji je korišten za istraživanje. Provedena istraživanja pokazala su da je imela bogat izvor fenolnih kiselina koje se međusobno neznatno razlikuju u svom kvantitativnom i kvalitativnom sadržaju. Kako udio biološki aktivnih spojeva ovisi o vrstu drveta i o dijelovima biljke na kojima raste, osim fenolnih kiselina i flavonoida pronađeni su i fenilpropanoidi u lišću i

stabljici, a kao najznačajniji predstavnici su siringin i koniferin. Između svih uzoraka, najviši udio ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida sadržavala je bijela imela koja je rasla na jasenu (Vicas i sur., 2011). Pošto su istraživanju bile podvrgnute imele koje su rasle na jasenu, bagremu i javoru uzorci su sadržavali različite fenolne kiseline. Fenolne kiseline pronađene u uzorku s jasena su protokatehinska, klorogenska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, salicilna, *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kavakiselina. Zatim uzorak s bagrema je sadržavao galnu, ferulinsku i sinapinsku kiselinu dok je uzorak s javora sadržavao trans – cimetnu, klorogensku, *p*-hidroksibenzojevu, salicilnu, ferulinsku, sinapinsku i kava kiselinu) (Vicas i sur., 2011).

## **3. MATERIJALI I METODE**

### **3.1. Materijali**

#### 3.1.1. Uzorci *Biske*

Ukupno je analizirano 14 uzoraka *Biske* prikupljenih s područja Istre: 5 industrijskih biski (uzorci 8, 9, 10, 13, 14) i 9 biski proizvedenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (uzorci 1-7, 11, 12). Sve do analize čuvani su u zamrzivaču na -18 °C.

#### 3.1.2. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada korištene su sljedeće kemikalije:

- destilirana voda
- etil-acetat (J.T. Baker, Nizozemska)
- metanol, HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska)
- 0,2% orto fosforna kiselina (Carlo Erba, )
- acetonitril, HPLC čistoće (J.T. Baker, Nizozemska).

### **3.2. Metode rada**

#### 3.2.1. Određivanje fenolnih spojeva HPLC metodom

##### Priprema otopine standarda

Otopine određenih koncentracija fenolnih spojeva priređeni su razrjeđivanjem standardnih otopina fenolnih spojeva. Standardi su korišteni za određivanje retencijskih vremena ( $R_t$ ) i UV spektra pojedinih fenolnih spojeva (tablica 6).

##### Priprema uzoraka

Volumen uzorka od 10mL se otpari na rotavaporu u tikvici s okruglim dnom na temperaturi od 30°C, nakon što etanol otpari u tu tikvicu se doda 5 mL destilirane vode i pH se podesi sa 2,6 M HCl na pH=2. Otopina se prelije u plastičnu epruvetu i doda se 5 mL etil

acetata te se uzorak centrifugira 5 minuta na 40,000 okr/min. Nakon centrifugiranja došlo je do odvajanja faza, u gornjoj fazi, u etil acetatu su otopljeni fenoli te se ta gornja faza pažljivo odvoji u staklenu bočicu s čepom, a na donju fazu dodamo 3 mL etil acetata te ponovno centrifugiramo. Postupak sa 3 mL etil acetata ponovi se još jednom. Nakon toga etil acetat se otpari s dušikom. Na fenole izdvojene na taj način dodaje se 1,5 mL metanola i uzorak se čuva u zamrzivaču do određivanja na HPLC uređaju.

#### Kromatografski uvjeti

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| Kromatograf:                  | ProStar Varian 230                     |
| Kolona:                       | Nucleosil 5u C18 100A, Phenomenex, SAD |
| Mobilna faza:                 | Otapalo A: 0,2% orto fosforna kiselina |
|                               | Otapalo B: Metanol                     |
|                               | Otapalo C: Acetonitril                 |
| Eluiranje:                    | 96% A, 2% B, 2% C (protok: 1,5 mL/min) |
| Detektor:                     | Photodiode Array                       |
| Temperatura kolone:           | 30 °C                                  |
| Vrijeme trajanja:             | 25 min                                 |
| Injektirani volumen:          | 20 µL                                  |
| Vrijeme uravnoteženja kolone: | 10 min                                 |

Identifikacija pojedinih fenolnih spojeva provedena je na temelju UV spektra i retencijskog vremena (Rt) standarda.

**Tablica 6.** Retencijska vremena određenih fenolnih spojeva na navedenoj koloni i pri navedenim uvjetima kromatografije

| Fenolni spojevi          | Retencijsko vrijeme (min) |
|--------------------------|---------------------------|
| protokatehinska kiselina | $\cong 7,5$               |
| klorogena                | $\cong 9,5$               |
| katehin                  | $\cong 10,1$              |
| kvercetin -3- glikozid   | $\cong 26,05$             |
| kvercetin                | $\cong 30,1$              |

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je odrediti i usporediti polifenolni profil različitih uzoraka *Biske*. Metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) analizirano je 14 uzoraka *Biske* prikupljenih s područja Istre: 5 industrijskih uzoraka (uzorci 8, 9, 10, 13, 14) i 9 uzoraka proizvedenih na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (uzorci 1-7, 11, 12).

*Biska* ili rakija od imele je tradicionalna istarska rakija aromatizirana ekstraktom bijele imele (lat. *Viscum album*). Sastoji se od vode koja je ujedno i u najvećem postotku od 60 do 65%, 36 do 40% vol. etilnog alkohola, 0,20 do 2% vol. metanola, 200 do 1800 mg/L ukupnih kiselina, među koje spadaju i polifenoli te male količine spojeva dobivenih samom maceracijom imele (Milotić, 2001). *Biska* je u narodnoj medicini poznata i po ljekovitim svojstvima, a ujedno i jedan je od najboljih prirodnih lijekova protiv arterioskleroze i smatra se da pomaže za regulaciju visokog i niskog tlaka. Ne postoji jedinstven recept za proizvodnju *Biske*, već ovisi o proizvođaču koji samo određuju dugotrajnosti maceracije, količinu i vrstu alkoholne baze za maceraciju i količinu i vrstu bilja koje se koriste tijekom tehnološkog procesa.

Polifenolni spojevi spadaju u biljne sekundarne metabolite koji pridonose nutritivnoj i senzorskoj kvaliteti, utječu na pigmentaciju, sadrže jaka antioksidacijska svojstva, i štite biljku od raznih nametnika. U svojoj strukturi sadrže aromatski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina te sukladno s brojem hidroksilnih skupina vezanih na prsten postoje jednostavniji spojevi poput fenolnih kiselina, fenilpropanoide, flavonoida i složenije polimerne molekule kao što su lignini, melanini i tanini. Sastav i količina fenolnih spojeva uvelike ovisi o vrsti drveta na kojem bijela imela raste, proizvodnom procesu te vremenu branja. Također udio fenolnih spojeva ovisi o vremenu trajanja maceracije, ukoliko proces maceracije duže traje više će se fenolnih spojeva ekstrahirati u alkoholnu bazu i obratno (Nazaruk i Orlikowski, 2016). Tijekom kromatografske analize prikupljenih uzoraka s ciljem određivanja polifenolnog profila, identificirana su četiri polifenolna spoja. Rezultati kromatografske analize prikazani su u tablici 7.

**Tablica 7.** Polifenolni sastav uzoraka *Biske* (1-14)

|                          | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
| Kvercetin-3-glikozid     | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  | +  | +  | -  | +  |
| Protokatehinska kiselina | + | - | + | - | - | - | + | + | - | +  | -  | -  | -  | +  |
| Katehin                  | - | + | - | - | - | - | - | - | - | -  | -  | +  | -  | -  |
| Klorogena kiselina       | - | - | - | + | - | - | - | - | - | -  | -  | -  | -  | -  |

+ = spoj je detektiran

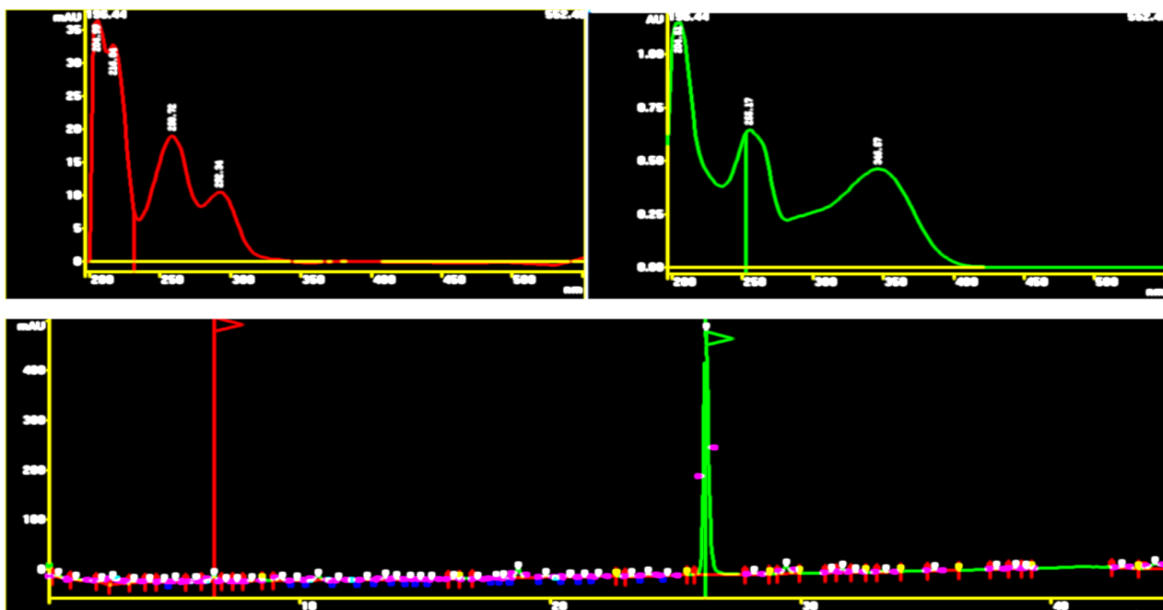
- = spoj nije detektiran

Analizom 14 uzoraka *Biske* detektirana su 4 različita polifenolna spoja: kvercetin-3-glikozid, katehin, protokatehinska kiselina te klorogena kiselina. Svi uzorci sadrže barem jedan polifenolni spoj, dok u uzoraku broj 13 nije detektiran niti jedan polifenolni spoj te je na temelju tih rezultata zaključeno da je taj uzorak patvoren. Uzorak 13 je patvoren na način da je obojan karamelom s ciljem imitacija procesa maceracije. Dodatak karamela u proizvodnji jakih alkoholnih pića je dozvoljen Pravilnikom o jakim alkoholnim pićima (NN 61/2009), ali njegova upotreba bez navođenja na deklaraciji proizvoda predstavlja prevaru potrošača i primjer je loše proizvođačke prakse.

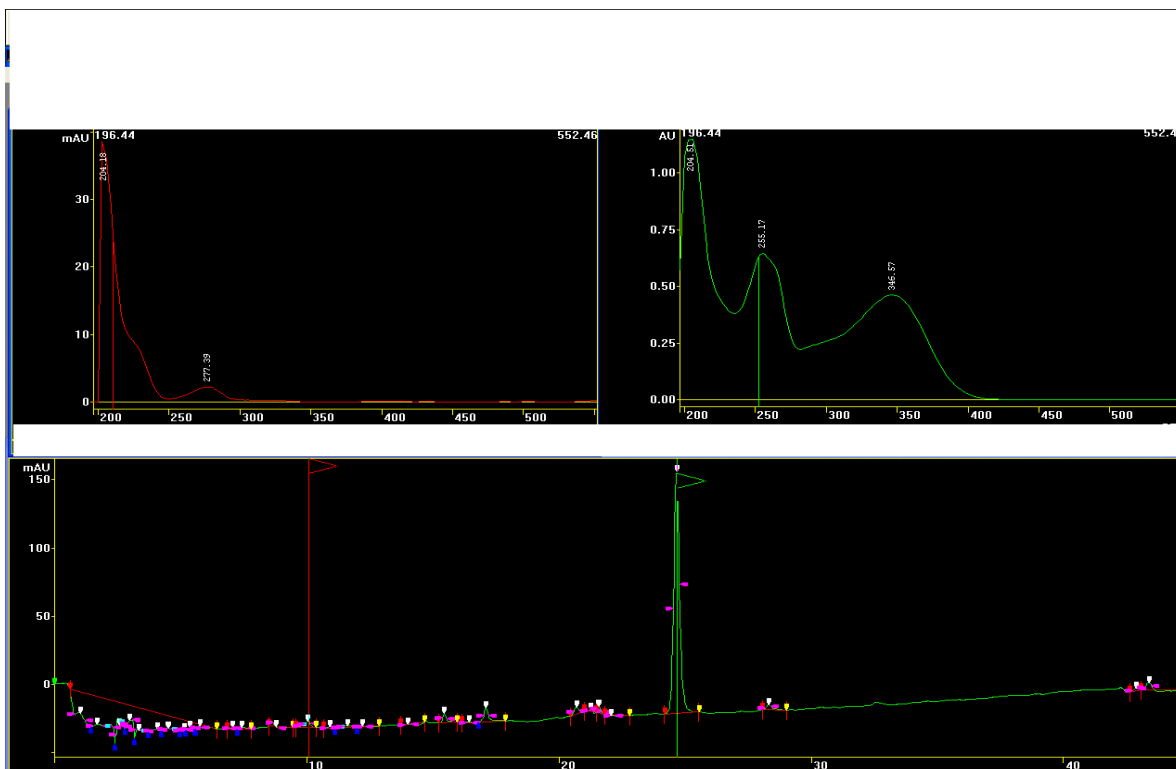
Iz dobvenih rezultata može se vidjeti da svi uzorci *Biske* osim uzorka 13 sadrže kvercetin – 3- glikozid, nekolicina uzoraka (1, 3, 7, 8, 10 i 14) sadrži protokatehinsku kiselinu, samo dva uzorka (2 i 12) sadrže katehin dok klorogenu kiselinu sadrži samo uzorak broj 4.

Vicas i sur. (2011) su detektirali različite fenolne kiseline i flavonoide u imelama koje su rasle na različitim vrstama drveta. Analizirali su imele koje su rasle na jasenu, javoru i bagremu te dokazali da je najviši udio ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida sadržavala imela koja je rasla na jasenu. Uzorak s jasena je sadržavao pprotokatehinska, klorogenska, *p*-hidroksibenzojeva, siringinska, salicilna, *p*-kumarinska, ferulinska, sinapinska i kava kiselinu. Nadalje, uzrak s javora sadržavao je trans – cimetnu, klorogensku, *p*-hidroksibenzojevu, salicilnu, ferulinsku, sinapinsku i kava kiselinu dok je uzorak s bagrema sadržavao galnu, ferulinsku i sinapinsku kiselinu.

Na slikama 7 i 8 prikazani su reprezentativni kromatogrami uzorka *Biske*.



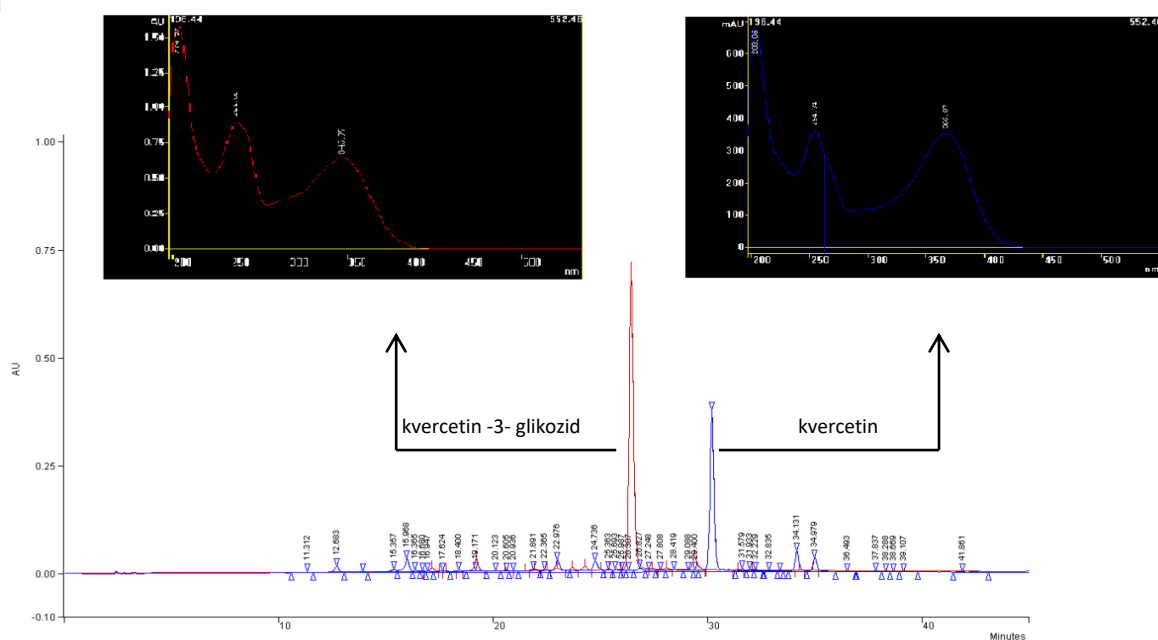
**Slika 7.** Reprezentativni kromatogram uzorka 1 (crveno=protokatehinska kiselina, zeleno=kvercetin-3-glikozid)



**Slika 8.** Reprezentativni kromatogram uzorka 2 (crveno=katehin; zeleno=kvercetin-3-glikozid)



Identifikacija fenolnih spojeva u uzorcima *Biske* bazirana je na usporedbi retencijskih vremena i apsorpcijskih spektara razdvojenih pikova s retencijskim vremenima i spektrima odgovarajućih standarada (tablica 6). Iz kromatograma je vidljiv položaj pika na vremenskoj osi koji omogućuje identifikaciji spoja u uzorku. Na slici 7 prikazan je reprezentativni kromatogram uzorka 1 koji sadrži dva različita pika te na temelju različitih položaja pikova u usporedbi sa retencijskim vremenima standarada prikazanim u tablici 6 identificirani su protokatehinska kiselina i kvercetin -3- glikozid. Katehin i kvercetin -3- glikozid koji su prikazani na slici 8 također su detektirani u skladu s retencijskim vremenima (tablica 6).



**Slika 9.** Kromatogram standarda kvercetina i uzorka 5 (kvercetina -3- glikozid (crveno) i kvercetin (plavo))

U prirodi su flavonoli nađeni u glikozidnom obliku u kojem priroda i pozicija supstituenta tj glikozida uvelike utječe na njihovu biološku aktivnost. Na slici 9 su vidljivi spektri kvercetina koji nije detektiran ni u jednom uzorku već je pušten kroz kolonu samo kao standard i kvercetin -3- glikozida koji se nalazi u uzorku broj 5. Kvercetin -3- glikozid razlikuje se od kvercetina po vezanom glikozidu na trećem ugljikovom atomu polifenolnog prstena što uzrokuje promjenu njegovog retencijskog vremena i UV spektra (slika 9). Molekula kvercetin -3- glikozida pokazuje maksimalnu apsorpciju zračenja pri  $\lambda_{max} = 345$  nm dok molekula kvercetina pokazuje maksimalnu apsorpciju zračenja pri  $\lambda_{max} = 366$  nm.

## 5. ZAKLJUČAK

1. Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti utvrđeno je da je kvercetin -3-glikozid najzastupljeniji polifenolni spoj u uzorcima *Biske*.
2. U uzorku 13 nije detektiran nijedan polifenolni spoj već je obojan karamelom s ciljem imitacije procesa maceracije tj. patvoren je
3. Od ostalih polifenolnih spojeva u pojedinim uzorcima detektirani su protokatehinska kiselina, katehin te klorogena kiselina.

## 6. LITERATURA

1. Anonymus 1, <<https://www.tz-buzet.hr/hr/gastronomija/Biska>> Pristupljeno 8. kolovoza 2018.
2. Anonymus 2, <<https://ndnr.com/oncology/viscum-album-as-treatment-for-cancer>> Pristupljeno 8. kolovoza 2018.
3. Anonymus 3, <[http://www.cvijet.info/zacinsko\\_i\\_ljekovito\\_bilje/](http://www.cvijet.info/zacinsko_i_ljekovito_bilje/)> Pristupljeno 10. kolovoza 2018.
4. Anonymus 4, <[https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenoxy\\_radical](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenoxy_radical) > Pristupljeno 28. kolovoza 2018.
5. Anonymus 5, <<https://alexhyde.photoshelter.com/image/I00002LSRVBKHp6A>> Pristupljeno 4. rujna 2018.
6. Barberaki M., Kintzios S. (2002) Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. *Scientia Horticulturae* **95**: 133-150.
7. Büssing A. (2000) Mistletoe The Genus *Viscum*
8. Choudhary M. I., Maher S., Begum A., Abbaskhan A., Ali S., Khan A., Shafique-ur-Rehman, Atta-ur-Rahman (2010) Characterization and Antiglycation Activity of Phenolic Constituents from *Viscum album* (European Mistletoe). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **58** (7): 980—982
9. Day A. J., Bao Y., Morgan M. R. A., Williamson G (2000) Conjugation position of quercetin glucuronides and effect on biological activity. *Free Radical Biology and Medicine* **29** (12): 1234-1243.
10. Franz H., Ziska P., Kindt A. (1981) Isolation and properties of three lectins from mistletoe (*Viscum album* L.). *Biochemical Journal* **195**: 481–484.
11. Grba S., Stehlik Tomas V. (2010) Kvasci u biotehnološkoj proizvodnji, 1. izd., *Plejada*: 173 - 175.
12. Gursky Z. (1985) Zlatna knjiga ljekovitog bilja, 3. izd., Nakladni zavod matice hrvatske, Zagreb.


13. Kazazić S. (2004) Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **55**: 279 – 290.
14. Keršek E. (2008) Ljekovite biljne i voćne rakije: rakijska biljaruša, V.B.Z., Zagreb str. 79 - 80.
15. Milotić A. (2001) Zaštita istarskih rakija kao tipičnih proizvoda. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, Završna izvješća odobrenih VIP projekata, 2001. godina.
16. Naczk M., Shahidi F. (2006) Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **41**: 1523 – 42.
17. Nazaruk J., Orlikowski P. (2016) Phytochemical Profile and Therapeutic Potential of *Viscum album* L. *Natural Product Research* **30**: 373-385.
18. Ochocka J. R., Piotrowski A. (2002) Biologically active compounds from European mistletoe (*Viscum album* L.) *Canadian Journal of Plant Pathology* **24**: 21–28.
19. 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*). *Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition*.
20. Pevalek - Kozlina B. (2003) Fiziologija bilja, 1. izd. Profil, Zagreb.
21. Pine S.H. (1994) Organska kemija, 3. izd. Školska knjiga, Zagreb.
22. Plumb G. W., Price K. R., Rhodes M. J. C., Williamson G. (1997) Antioxidant properties of the major polyphenolic compounds in broccoli. *Free Radical Research* **27**: 429-435.
23. Pravilnik o jakim alkoholnim i alkoholnim pićima (2009) Narodne novine **61** (NN 61/2009).
24. Samuelsson G., Pettersson B. M. (1971) The Amino Acid Sequence of Viscotoxin B from the European Mistletoe (*Viscum album* L, Loranthaceae). *European Journal of Biochemistry* **21**: 86-89.
25. Schaller G., Urech K., Grazi G., Giannattasio M. (1998) Viscotoxin composition of the three European subspecies of *Viscum album*. *Planta Medica* **64**: 677–678.
26. 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.

27. 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.*

  
ime i prezime studenta