Modifikacija eugenola djelovanjem peroksidaza

Vlašić, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:289802

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

MODIFIKACIJA EUGENOLA DJELOVANJEM PEROKSIDAZE

ZAVRŠNI RAD

MARKO VLAŠIĆ

Matični broj: 5

Split, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

MODIFIKACIJA EUGENOLA DJELOVANJEM PEROKSIDAZE

ZAVRŠNI RAD

MARKO VLAŠIĆ

Matični broj: 5

Split, rujan 2018.

UNIVERSITY OF SPLIT

FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

UNDERGRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY

PEROXIDASE-BASED MODIFICATION OF EUGENOL

BACHELOR THESIS

MARKO VLAŠIĆ

Parent number: 5

Split, September 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

ZAVRŠNI RAD

Sveučilište u Splitu
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu
Preddiplomski studij Prehrambene tehnologije

Znanstveno područje:	**Prirodne znanosti**
Znanstveno polje:	**Kemija**
Tema rada	je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta
Mentor:	Prof. dr. sc. Mladen Miloš
Pomoć pri izradi:	Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić, Doc. dr. sc. Franko Burčul

MODIFIKACIJA EUGENOLA DJELOVANJEM PEROKSIDAZA

Marko Vlašić, 5

Sažetak:
Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj enzima peroksidaze na eugenol odnosno njegovu modifikaciju koja rezultira sa nastankom netopljivih produkata koji se lako uklanjaju iz uzorka eteričnog ulja klinčića. Primjena ove reakcije bi se stoga mogla potencijalno koristiti za uklanjanje eugenola iz različitih uzoraka. Obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da peroksidaza ima učinak na eugenol tj. uzrokuje njegovu modifikaciju što je potvrđeno spektrofotometrijskim i kromatografskim ispitivanjem. Dobiveni rezultati pokazuju da je duljina izlaganja uzoraka eteričnog ulja klinčića djelovanju enzima proporcionalna stupnju njegove degradacije te da trajanje reakcije u vremenu od četiri sata rezultira sa gotovo potpunim nestankom eugenola iz ulja (stupanj degradacije 93%).

Ključne riječi: eugenol, peroksidaza, spektrofotometrija, GC-FID.

Rad sadrži: 24 stranica, 13 slika, 3 tablice, 23 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul
2. Doc. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić
3. Prof. dr. sc. Mladen Miloš

Datum obrane: 17.09.2018

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

BACHELOR THESIS

University of Split
Faculty of Chemistry and Technology Split
Undergraduate study Food Technology

Scientific area:	**Natural sciences**
Scientific field:	**Chemistry**
Thesis subject	was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3
Mentor:	Full Professor Mladen Miloš, Ph. D.
Technical assistance:	Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić, Ph. D. Assistant Professor Franko Burčul, Ph. D.

PEROXIDASE-BASED MODIFICATION OF EUGENOL

Marko Vlašić, 5

Abstract:
The aim of this study was to investigate the effect of peroxidase on eugenol and its modification which results with formation of insoluble compounds that can be easily removed from the clove essential oil. This reaction could be potentially used for the removal of eugenol from various samples. According to the obtained results it can be concluded that peroxidase affects eugenol and causes its modification which has been confirmed using spectrophotometric and chromatographic techniques. The results show that time of reaction between clove essential oil and enzyme is proportional to the degree of eugenol degradation, and that four hour reaction results with almost full disaperance of eugenol from oil sample (degradation of 93%).

Keywords: eugenol, peroxidase, spectrophotometry, GC-FID.

Thesis contains: 24 pages, 13 figures, 3 tables, 23 references

Original in: Croatian

Defence committee:

1. Assistant Professor Franko Burčul, Ph. D.
2. Assistant Professor Ivana Generalić Mekinić, Ph. D.
3. Full Professor Mladen Miloš, Ph. D.

Defence date: 17.09.2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Završni rad je izrađen u Zavodu za biokemiju Kemijsko-tehnološkog fakulteta u Splitu pod neposrednim vodstvom doc. dr. sc. Ivane Generalić Mekinić i mentorstvom prof. dr. sc. Mladena Miloša, u razdoblju od svibnja do rujna 2018. godine.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-6897.

ZAHVALA

Prvenstveno se zahvaljujem doc. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić na stručnim savjetima, uloženom trudu, vremenu, strpljenju i pomoći bez čega ovaj rad ne bi bio moguć. Zahvaljujem joj se na podršci tijekom izrade ovog rada, kao i tijekom cijelog studija. Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Franku Burčulu na pomoći pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada te svom mentoru prof. dr. sc. Mladenu Milošu na svojim stručnim savjetima pri pisanju ovog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i kolegama na pomoći, razumijevanju i potpori koju su mi pružili tijekom studiranja.

ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj enzima peroksidaze na eugenol odnosno modifikacija eugenola na način da se nastali netopljivi produkti reakcije talože iz uzorka. Cilj rad bio je ispitati učinkovitost ove enzimatske reakcije koja bi se potencijalno mogla koristiti za uklanjanje eugenola iz različitih uzoraka, a kao predmet ovog završnog rada koristilo se eterično ulje klinčića koje obiluje ovim spojem.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj enzima peroksidaze na eugenol odnosno njegovu modifikaciju koja rezultira sa nastankom netopljivih produkata koji se lako uklanjaju iz uzorka eteričnog ulja klinčića. Primjena ove reakcije bi se stoga mogla potencijalno koristiti za uklanjanje eugenola iz različitih uzoraka. Obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da peroksidaza ima učinak na eugenol tj. uzrokuje njegovu modifikaciju što je potvrđeno spektrofotometrijskim i kromatografskim ispitivanjem. Dobiveni rezultati pokazuju da je duljina izlaganja uzoraka eteričnog ulja klinčića djelovanju enzima proporcionalna stupnju njegove degradacije te da trajanje reakcije u vremenu od četiri sata rezultira sa gotovo potpunim nestankom eugenola iz ulja (stupanj degradacije 93%).

Ključne riječi: eugenol, peroksidaza, spektrofotometrija, GC-FID.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effect of peroxidase on eugenol and its modification which results with formation of insoluble compounds that can be easily removed from the clove essential oil. This reaction could be potentially used for the removal of eugenol from various samples. According to the obtained results it can be concluded that peroxidase affects eugenol and causes its modification which has been confirmed using spectrophotometric and chromatographic techniques. The results show that time of reaction between clove essential oil and enzyme is proportional to the degree of eugenol degradation, and that four hour reaction results with almost full disaperance of eugenol from oil sample (degradation of 93%)

Keywords: eugenol, peroxidasa, spectrophotometry, GC-FID.

SADRŽAJ

UVOD **1**

1. Opći dio **2**

1.1 Enzimi 2

1.1.1 Utjecaj termičkih procesa na aktivnost enzima 3

1.1.2 Podjela enzima 5

1.1.3 Lipaze 5

1.1.3.1 Oksidoreduktaze 6

1.1.3.1.1 Peroksidaze 6

1.1.3.1.1.1 Peroksidaza iz hrena 8

1.2. Eterična ulja 8

1.2.1 Terpeni 9

1.2.1.1 Terpenski fenoli 11

1.3. Eugenol 11

1.3.1. Dosadašnja istraživanja eugenola 12

2. EKSPERIMENTALNI DIO **15**

2.1. Uređaji i kemikalije 15

2.2. Postupak rada 15

Priprava reagensa: 15

a) Spektrofotometrijsko praćenje modifikacije eugenola 15

b) Kromatografska detekcija uklanjanje eugenola iz eteričnog ulja 16

3. REZULTATI I RASPRAVA **18**

4. ZAKLJUČAK **22**

5. LITERATURA **23**

UVOD

Enzimima katalizirane reakcije u preradi hrane se koriste još od davnih vremena, a njihovo odvijanje u različitim namirnicama vrlo često utječe na njihovu kvalitetu. Enzimi su sastavni dio hrane ili se dobivaju iz mikroorganizama, a što se tiče enzimskih reakcija od najvećeg značaja su enzimski procesi zrenja voća i povrća, te starenje odnosno zrenje mesa i mliječnih proizvoda uz paralelno odvijanje fermentacijskih postupaka. Ipak, dodavanje obogaćenih ili pročišćenih enzimskih pripravaka životinjskog, biljnog ili posebice mikrobnog podrijetla u proizvodnji hrane je aktualno tek posljednjih godina. Većina enzima koji se koriste dolazi od mikroorganizama koji su genetski modificirani. Njihovo korištenje u preradi namirnica rezultira nizom prednosti kao što su visoka brzina reakcije pri blagim reakcijskim uvjetima (temperatura, pH) i brzi, odnosno lako kontrolirani, reakcijski procesi s općenito niskim operativnim troškovima. (2)

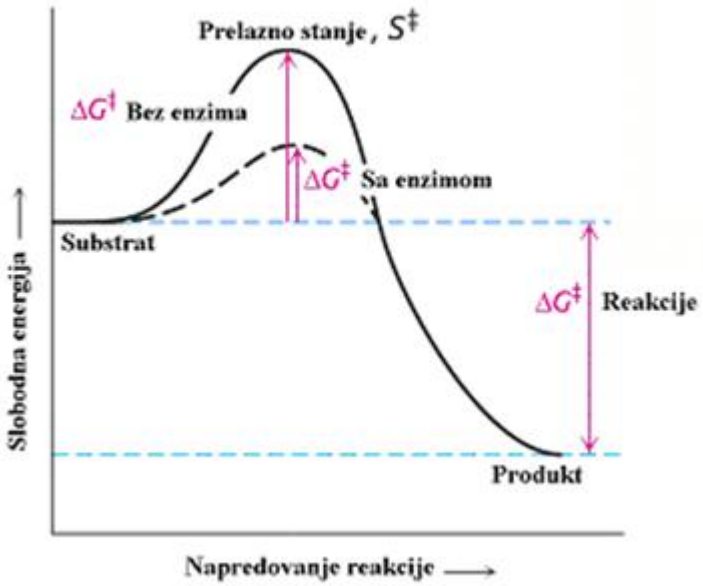
Jedan od enzima koji su izrazito aktivni u namirnicama jest i peroksidaza koja je veoma otporna na djelovanje topline pa se njena aktivnost često koristi kao kriterij određivanja učinkovitosti primijenjenih termičkih postupaka u preradi voća i povrća. U ovom završnom radu se uz perkosidazu istraživao i eugenol koji je glavna komponenta eteričnog ulja klinčića, ali je prisutan i u eteričnim uljima ili ekstraktima različitih drugih biljaka.

1. Opći dio

1.1 Enzimi

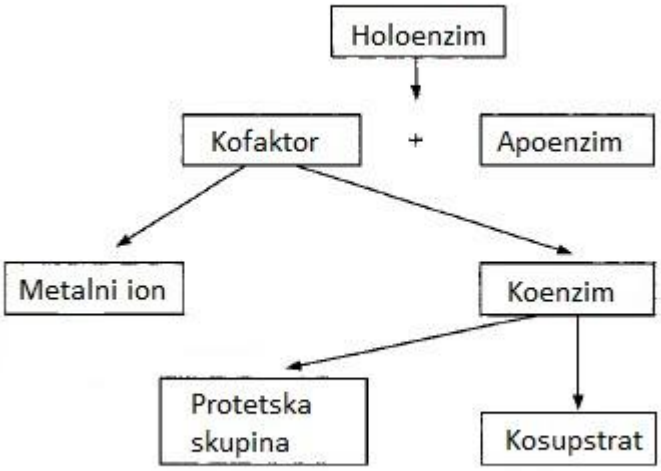
Enzimi su globularni proteini tercijarne ili kvarterne strukture s snažnom katalitičkom aktivnošću. Strukturno su im nepolarni ostaci okrenuti prema unutrašnjosti molekule, dok na površini sadrže polarne aminokiselinske ostatke. Sintetiziraju se u biološkim stanicama svih organizama i uključeni su u gotovo sve metaboličke reakcije. Enzimatski katalizirane reakcije se također odvijaju u hrani te poboljšavaju ili pogoršavaju njenu kvalitetu. Od najvećeg značaja su procesi zrenja voća i povrća, starenje (zrenje) mesa i mliječnih proizvoda, te na koncu, proizvodnja alkoholnih pića postupcima fermentacije. Svojstva enzima su od velikog značaja za kemiju hrane budući da se enzimi sve više koriste kod postupaka proizvodnje ili analize hrane ili pak koriste kao dodatak u prehrambenoj industriji. (1, 2)

Enzimi kao organizirane proteinske molekule imaju visoku katalitičku moć koja se očituje njihovom sposobnošću da smanje energiju aktivacije kemijskih reakcija. (1)



Slika 1. Kinetika enzimskih reakcija (1)

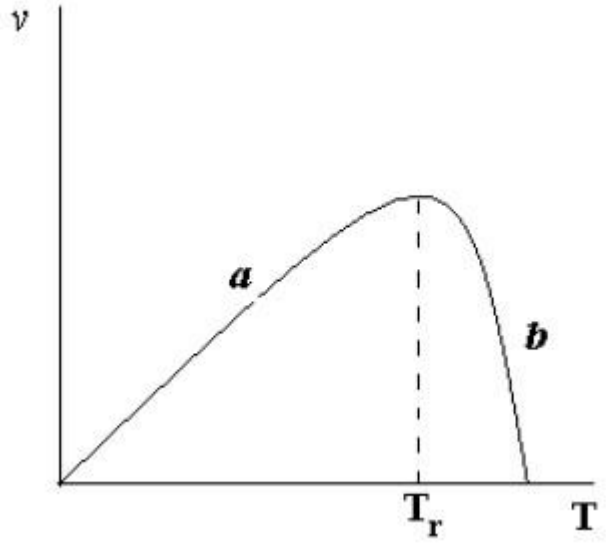
Brojne analize pokazale su da enzimi najčešće nisu čisti proteini, već uz njih često sadrže metalne ione i/ili organske molekule. Prema sistematici (*Slika 2.*), apoenzim je neaktivni protein bez kofaktora. Metalni ioni i koenzimi koji sudjeluju u enzimskim reakcijama spadaju u kofaktore koje dijelimo na protetske skupine i kosupstrate. Protetska skupina čvrsto je vezana za enzim i ne može se iz njega ukloniti, a tijekom enzimske katalize ostaje pričvršćena na enzimsku molekulu. S druge strane, tijekom metabolizma, kosupstrat reagira s najmanje dva enzima te on prenosi vodik ili funkcionalnu skupinu na drugi enzim pa se stoga se označava kao transportni metabolit. (2)



Slika 2. Sistematika enzima koji sadrže kofaktor (2)

1.1.1 Utjecaj termičkih procesa na aktivnost enzima

Enzimske reakcije se ubrzavaju s povišenjem temperature, ali samo do određene vrijednosti, jer na visokim temperaturama dolazi do denaturacije proteina odnosno proteinskog dijela enzima. Dijagram temperaturne ovisnosti za enzime ima karakteristični izgled koji je prikazan na slici 3. Na početku krivulja raste sukladno Arrheniusovom zakonu koji kaže da brzina kemijske reakcije pri porastu temperature za 10 °C poraste u prosijeku dva puta, a kasnije opada zbog razgradnje proteinskog dijela pod utjecajem visokih temperatura. (1)



Slika 3. Dijagram temperaturne ovisnosti enzima (1)

Toplinska stabilnost enzima je vrlo promjenjiva i varira. Naime, neki enzimi mogu podnijeti (barem na kratko vrijeme) jaču termičku obradu dok drugi gube svoju katalitičku aktivnost čak i pri nižim temperaturama. (2) Na primjer, lipaza i alkalna fosfataza koje se nalaze u mlijeku su termolabilne, stoga se alkalna fosfataza koristi za razlikovanje sirovog od pasteriziranog mlijeka. Peroksidaza, npr. u krumpiru, je enzim koji se posljednji termički inaktivira pa je zbog toga on prikladan za kontrolu inaktivacije svih prisutnih enzima. Iz ovog razloga se peroksidaza koristi i pri procjeni uspješnosti postupka blanširanja. (2) Međutim, otkriveno je da se enzimi koji uzrokuju neugodne mirise nakon blanširanja mogu, pod nekim uvjetima, regenerirati. Regeneracija enzima je jako česta pojava i do nje dolazi što brže raste temperatura na određenu točku u procesu blanširanja. (8)

Deaktivacija peroksidaze je u funkciji vremena zagrijavanja i temperature. Laktoperoksidaza je potpuno deaktivirana grijanjem na 85°C kroz 13 sekundi, a ista se može regenerirati u uvjetima HTST pasterizacije (kratkotrajna toplinska obrada kod visokih temperatura, engl. *High Temperature Short Time*). Efekt regeneracije uvelike ovisi o temperaturi na kojoj se namirnica čuva; što je niža temperatura skladištenja to je manji učinak regeneracije. (8)

Termički procesi su jako važni čimbenici u preradi hrane jer omogućuju kontrolu enzimskih promjena. Neželjene promjene mogu se odložiti ili zaustaviti postupcima hlađenja, dok toplinska obrada može ubrzati poželjne enzimske reakcije ili inhibirati neželjene promjene inaktivacijom enzima. (2)

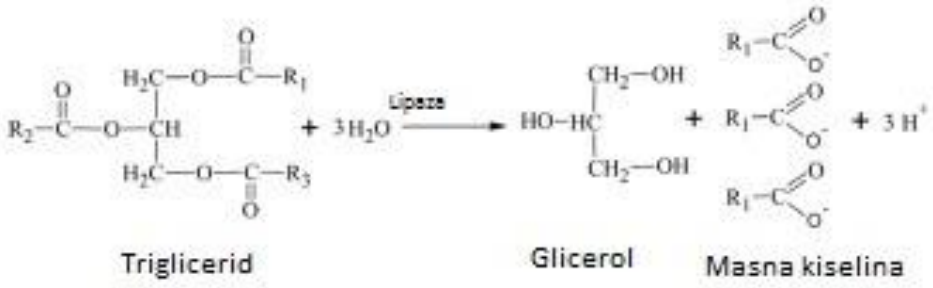
1.1.2 Podjela enzima

Na temelju postavljenih pravila od strane Međunarodne unije kemičara svi enzimi podijeljeni su u šest osnovnih skupina i to na (2,3):

1. Oksidoreduktaze (kataliziraju reakcije redukcije i oksidacije)
2. Transferaze (kataliziraju reakcije prenošenja funkcionalnih grupa s molekule na molekulu)
3. Hidrolaze (kataliziraju hidrolitičke reakcije)
4. Liaze (kataliziraju transport kemijskih grupa na supstrat uz nastajanje dvostruke veze)
5. Izomeraze (kataliziraju reakcije izomerizacije)
6. Ligaze ili sintetaze (kataliziraju reakcije sinteze i stvaranja novih veza).

1.1.3 Lipaze

Lipaza (triacilglicerol acilhidrolaza) je sveprisutni enzim s važnim fiziološkim ulogama i industrijskim potencijalom. Lipaze kataliziraju hidrolizu triglicerida u glicerol i slobodne masne kiseline. Topljivi su u vodi i hidroliziraju netopljive supstrate u polarne lipolitičke produkte. Prvu lipazu identificirao je Claude Bernard 1856. i od tada su pronađene kod brojnih mikroorganizama, biljaka i životinja. Lipaze mogu uzrokovati kvarenje hrane, osobito one koja sadrži značajne količine lipida obzirom da slobodne masne kiseline uzrokuju ranketljivost. (4, 5)



Slika 4. Hidroliza triglicerida uz pomoć lipaze (4)

Zbog njihovog značaja, lipaze su dugo bile predmetom istraživanja brojnih studija koje su se uglavnom bavile njenom strukturom, mehanizmima djelovanja i

kinetikom. Lipaze se obično koriste u preradi masti i ulja, kao dodatak deterdžentima i sredstvima za odmašćivanje, u preradi hrane, kemijskim i farmaceutskim sintezama, itd. Lipaze koje se koriste kao dodatak deterdžentima moraju imati nisku supstratnu selektivnost i biti otporni na prilično sirove uvjete pranja (pH 10-11, 30-60 °C). (4, 5)

1.1.3.1 Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze su rasprostranjene u mikroorganizmima, životinjskim i biljnim organizmima. One kataliziraju izmjenu elektrona između molekula donora i akceptora. Kod djelovanja oksidoreduktaza općenito se odvijaju dvije polu-reakcije, jedna oksidativna i jedna reduktivna te se aktiviraju ili transformiraju najmanje dva supstrata (jedan redukcijski i jedan oksidacijski). (6)

Za postizanje njihove fiziološke funkcije, oksidoreduktaze koriste različite redoks-aktivne centre. Centri su obavijeni polipeptidnom okosnicom oksidoreduktaza, koja može modulirati njihovu selektivnost, stabilnost i otpornost na inhibiciju. Uobičajeni redoks centri uključuju aminokiselinske ostatke (npr. tirozin), metalne ione ili komplekse (npr. Cu, Fe, hem skupinu) i koenzime (npr. FAD, NAD, PPQ). (6,7)

Oksidoreduktaze se mogu klasificirati prema njihovoj sekvenci ili trodimenzionalnoj strukturi, što je vrlo korisno za proučavanje evolucije enzima. Prema posljednjoj klasifikaciji, razlikujemo četiri skupine i to (6,7):

- Oksidaze
- Dehidrogenaze/reduktaze
- Oksigenaze
- Peroksidaze.

1.1.3.1.1 Peroksidaze

Peroksidaze su definirane kao enzimi koji kataliziraju slijedeću reakciju:

$$H_2O_2 + AH_2 \xrightarrow{\text{Peroksidaza}} 2\,H_2O + A$$

Slika 5. Prikaz opće reakcije katalizirane peroksidazom (8)

Ovakva vrsta reakcije katalizirana peroksidazom uključuje vodikov peroksid kao akceptor i spoj AH_2 kao donor vodikovih atoma kao što je prikazano na slici 5. (8)

Peroksidaze se mogu svrstati u dvije skupine (9):

1. Flavoproteinske peroksidaze
2. Peroksidaze koje sadrže željezo.

Peroksidaze koje sadrže željezo se dijele na ferroprotoporfirinske peroksidaze i verdoperoksidaze. (9) Ferroprotoporfirinska grupa obuhvaća peroksidaze iz viših biljaka (hrena, repe) i životinja (triptofan-pirolaza, jodna peroksidaza štitnjače). Te peroksidaze sadrže ferrotrotoporfirin III kao protetsku skupinu zbog čega su smeđe boje. (9) Verdoperoksidaze se nalaze u mijelocitima, mlijeku (laktoperoksidaza) i drugim tkivima. Prostetska skupina tih enzima je jezgra željeznog porfirina. (9) Flavoprotein peroksidaza je izolirana iz nekoliko streptokoka, uključujući najvažnijeg *Streptococcus faecalis* i nekoliko životinjskih tkiva. Protetska skupina ovih peroksidaza je flavin adenin dinukleotid (FAD). (6)

1.1.3.1.1.1 Peroksidaza iz hrena

Hren je višegodišnja biljka koja se uzgaj u umjerenim klimatskim područjima uglavnom zbog kulinarske vrijednosti korijena koji je bogat izvor peroksidaze koja koristi vodikov peroksid kako bi oksidirala široku paletu organskih i anorganskih spojeva. Iako se pojam peroksidaze iz hrena koristi općenito, korijen biljke sadrži niz specifičnih izoenzima peroksidaze od kojih je C izoenzim (HRP C) najzstupljeniji i najznačajniji zbog toga što sadrži dva tipa metalnog centra; željezo (III) protoporfirin IX (obično nazvan 'hem skupina') i dva atoma kalcija. (23)

Molekulska masa peroksidaze iz hrena je oko 40 000 g/mol, optimalni pH je 7.0 što je relativno blisko izoelektričnoj točki koja iznosi 7,2, a 70% maksimalne aktivnosti enzima se dobiva pri pH vrijednosti između 6 i 8. Enzim sadrži jedan atom željeza po molekuli, a time i jednu protohemsku skupinu. (10)

1.2. Eterična ulja

Eterična ulja su složene mješavine jače ili slabije hlapivih spojeva koji se najčešće izoliraju samo fizikalnim postupcima (prešanjem i destilacijom) iz cijele biljke ili nekog njenog dijela. Odgovarajući glavni spojevi eteričnih ulja uglavnom su izvedeni iz tri biosintetska puta, put mevalonata koji vodi do seskviterpena, put metil-eritritila koji vodi do mono- i diterpena i put kroz šikiminske kiseline do fenilpropena. Eterična ulja su slabo viskozne tekućine, intenzivnog i najčešće ugodnog mirisa. Dobro se miješaju sa svim lipofilnim otapalima (apsolutni etanol, kloroform, eter, itd.), dok im je topljivost u vodi vrlo mala. Duljim skladištenjem, eterična ulja postaju tamnija, gusta i reagiraju kiselo te im se mijenja se miris i kvaliteta pa se stoga čuvaju u tamnim i dobro zatvorenim bocama. (11,12)

Eterična ulja su složene smjese spojeva koje imaju vrelište između 150 i 200°C, stoga da bi se odvojili od ostatka biljnog materijala, potrebno je zagrijati biljke na tu temperaturu. Uzimajući u obzir da pri visokoj temperaturi u biljci se pokreću procesi oksidacije, obično se kroz biljnu masu propušta vruća vodena para umjesto da se biljka destilira na visokim temperaturama. Uz pomoć vodene pare destiliraju se tvari koje se ne otapaju u vodi niti s njom reagiraju, koje obično sadrže 15 do 20 ugljikovih atoma i koje su dovoljno termostabilne. Uobičajeni načini dobivanja eteričnih ulja su destilacija i tiještenje. (11)

Prilikom procesa tiještenja, biljka ili dio biljke se preša kako bi se oslobodio sadržaj iz žlijezda te taj isti novo oslobođeni sadržaj se miješa s vodom, a ulje se potom odvaja od vodenog dijela metodama kao što je centrifugiranje, dekantiranje, ekstrakcija. Destilacijske postupke obično dijelimo na postupke vodene destilacije, vodeno-parne destilacije i parne destilacije. Vodena destilacija je najstariji i najskuplji način destilacije, a izvodi se uranjanjem biljnog materijala u kotao s dva do pet puta većom količinom vode koja se zagrijava do vrenja. Kod vodeno-parne destilacije biljni materijal koji se nalazi na perforiranoj podlozi ne dolazi u dodir s vodom već samo sa zasićenom vodenom parom koja odnosi spojeve eteričnog ulja u sustav za hlađenje nakon kojeg dolazi do kondenzacije vode i eteričnog ulja. Izolirani produkti se zajedno se sakupljaju u posebnoj posudi, a obzirom da se eterično ulje ne otapa u vodi, slojevi se odjeljuju. Ovakva vrsta izolacija pogodna je za izolaciju manje osjetljivih eteričnih ulja kao što je klinčićevo. U modernijem načinu proizvodnje kod parne destilacije, kotao u kojem se nalazi biljni materijal ne sadrži vodu pa se na taj način smanjuje doticaj vode s biljnim materijalom čime se sprječava hidrolitičko djelovanje vode na pojedine spojeve. (11)

1.2.1 Terpeni

Terpeni ili terpenoidi predstavljaju jednu od najvećih skupina prirodnih spojeva, a njihova nevjerojatna kemijska raznolikosti proizlazi iz biokemijskih transformacija jednostavnih početnih jedinica prenil difosfata. Terpenoidi su hlapljive spojevi koje daju biljkama i cvijeću miris. Jednostavni mono- i seskviterpeni su glavni sastojci eteričnih ulja dobivenih iz sapuna i tkiva pojedinih biljaka i stabala, a tetraterpenoidi tvore zasebnu skupinu spojeva nazvanih karotenoidi. Pojam "terpen" izvorno se koristi za opisivanje mješavine izomernih ugljikovodika molekulske formule $C_{10}H_{16}$ koji se pojavljuju u eteričnim uljima, a neki od najznačajnijih su prikazani u tablici 1. (13,14)

Tablica 1. Glavni sastojci eteričnih ulja u različitim biljnim vrstama (15)

Eterično ulje	Glavni monoterpenski sastojak	Udio
Grejpfrut	Limonen	Oko 97%
Limun	Limonen, pinen	Oko 95%
Korijander	Pinen, terpinen	Oko 45%
Ružmarin	Pinen, kamfen	Oko 35%

Najviše prirodnih terpena imaju opću formulu $(C_5H_8)_n$. Mogu se klasificirati na temelju vrijednosti n ili broja ugljikovih atoma prisutnih u strukturi što je prikazano u tablici 2.

Tablica 2. Klasifikacija terpena (14)

Broj ugljikovih atoma	**Numerička vrijednost broja n**	**Razred**
10	2	Monoterpeni ($C_{10}H_{16}$)
15	3	Seskviterpeni ($C_{15}H_{24}$)
20	4	Diterpeni ($C_{20}H_{32}$)
25	5	Sesterpeni ($C_{25}H_{40}$)
30	6	Triterpeni ($C_{30}H_{48}$)
40	8	Tetraterpeni ($C_{40}H_{64}$)
>40	>8	Politerpeni $(C_5H_8)_n$

Terpeni se dalje dijele u podrazrede prema broju prstenova prisutnih u strukturi na (14):

- Aciklički terpenoidi: sadrže otvorenu strukturu
- Monociklički terpenoidi: sadrže jedan prsten u strukturi
- Biciklički terpenoidi: sadrže dva prstena u strukturi
- Triciklički terpenoidi: sadrže tri prstena u strukturi
- Tetraciklički terpenoidi: sadrže četiri prstena u strukturi.

1.2.1.1 Terpenski fenoli

, Klasifikacija terpenskih fenola iste razvrstava u sljedeće kategorije (16):

- Monohidridni fenoli
- Dihidridni fenoli.

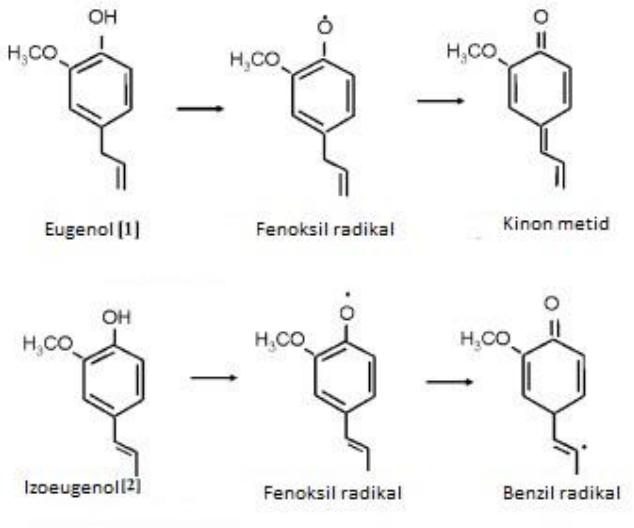
Tipični primjeri monohidridnih fenola su: karvakrol, eugenol, timol, dok od dihidridnih fenola koje nalazimo u prirodnim proizvodima ističu katehol i protokatehinska kiselina. (16)

1.3. Eugenol

Eugenol (4-alil-2-metoksifenol) je spoj blijedo žute boje i molekulske mase 164,2 g/mol. Ova molekula je slaba kiselina koja je topljiva u organskim otapalima i glavna je komponenta ulja klinčića, ali je također prisutna u eteričnim uljima ili ekstraktima mnogih drugih biljaka uključujući cimet, bosiljak i muškatni oraščić. Ulje dobiveno od cvjetnih pupova klinčića uglavnom se sastoji od eugenola (60-90%), eugenil acetata i drugih tvari, dok se ulje dobiveno iz lišća klinčića sastoji se od eugenola (82-88%) i vrlo malo eugenil acetata. (17,18)

Eugenol je prvi put izoliran 1929. godine, a njegova komercijalna proizvodnja započela je tek 40-ih godina prošlog stoljeća. Eugenol se pretežno priprema iz prirodnih izvora odnosno ulja, miješanjem eteričnog ulja sa suviškom vodene otopine natrija (3%) što dovodi do formiranja fenolne alkalijske soli. Netopljivi ne-fenolni dio se zatim ekstrahira destilacijom na pari, alkalijska otopina se zakiseljeva na niskoj temperaturi, a u konačnici se eugenol pročišćava frakcijskom destilacijom. (19,20)

Eugenol (slika 6) je izuzetno „svestrana“ molekula, a primarno je neizostavni sastojak kozmetičkih preparata, zaslužna je za pikantni okus sladoleda i bombona, te se koristi kao industrijski izvor za proizvodnju izoeugenola. S druge strane, izoeugenol (slika 6), izomer eugenola, nalazi se u eteričnim uljima, sapunima i vinu te služi kao sredstvo za aromatiziranje. (19)



Slika 6. Kemijske strukture eugenola i izoeugenola i njihovih međuprodukata (20)

1.3.1. Dosadašnja istraživanja eugenola

Antibakterijska svojstva

Nejad, Özgüneş i Başaran (2016) su u svom istraživanju ispitivali farmakološka i toksikološka svojstva eugenola te su donijeli sljedeće zaključke. Eugenol je prepoznat kao siguran aditiv u hrani u klasifikaciji sigurnih tvari od strane Federalne uprave za hranu, lijekove i kozmetiku, ali zbog širokog raspona različitih primjena i opsežne upotrebe i dostupnosti postoji velika zabrinutost zbog njegove toksičnosti. Čak i male promjene molekulske strukture eugenola mogu dovesti do različitih svojstava spoja koja mogu imati drugačije biološke aktivnosti. Promatranja iz nekoliko studija pokazuju sinergističke učinke eugenola i drugih antimikrobnih spojeva koji omogućuju upotrebu eugenola kao odgovarajućeg aditiva za hranu. Također, istraživanjima antimikrobnih učinaka, eugenol se pokazao sposoban oštetiti membrane bakterija što može rezultirati povećanjem učinka nekih antibiotika. (18)

Oksidacije eugenola s peroksidazom iz hrena

Thompson, Norbeck, Olsson, Constantin-Teodosiu, Van der Zee i Moldeus (1988) su proučavali oksidaciju eugenola djelovanjem peroksidaze iz hrena. Nakon pokretanja reakcije s vodikovim peroksidom, eugenol se oksidirao do fenoksilnog radikala koji je potom stvorio žuti obojeni međuprodukt identificiran kao kinon metid, koji je potom dalje reagirao tvoreći netopljivi kompleksni polimerni materijal.

Dodavanje glutationa spriječilo je pojavu kinonskih metida, ali u prisutnosti glutationa otkriven je tiolni radikal. Također se opazilo povećanje potrošnje kisika i stvaranje oksidiranog glutationa što sugerira da je glutation reagirao s eugenolom fenoksilnog radikala i vratio ga natrag u primarni spoj. (17)

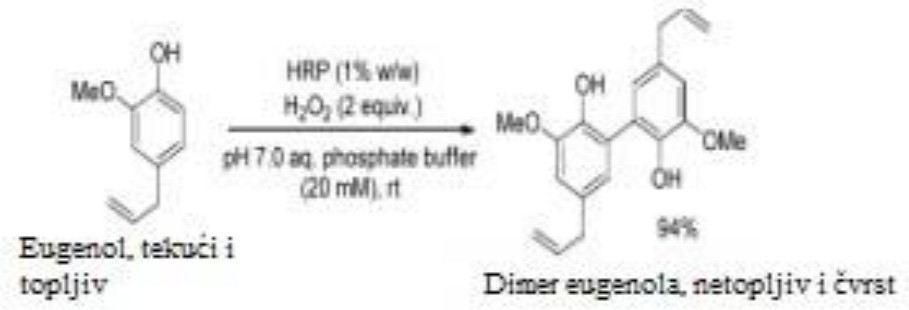
Uklanjanje eugenola iz eteričnog ulja ruže pomoću peroksidaze

Bouhlel, Dolhem, Fernandez i Antoniotti (2012) su peroksidazu iz hrena otopili u fosfatnom puferu, dodali otopinu peroksida i tikvicu prekrili aluminijskom. Nakon otprilike 90 minuta, dodala se je katalaza i eterično ulje ruže, a reakcija u smjesi se provodila tijekom 4 sata. Nakon završetka, reakcijska smjesa je filtrirana i sačuvan je netopljivi kruti materijal. Ekstrakcija filtrata i uklanjanjem otapala dobilo se modificirano eterično ulje. Ovaj eksperiment je pokazao kako se peroksidaza iz hrena može upotrijebiti na nekonvencionalan način da se ukloni eugenol iz eteričnog ulja ruže što je potvrđeno GC-MS analizom. Rad je uključivao prvu fazu aktivacije enzima pomoću H_2O_2, popraćeno gašenjem s katalazom prije dodavanja eteričnog ulja kako bi se izbjegla oksidacija terpena. Uz pomoć plinske kromatografije opaženo je kako modificirano eterično ulje koje nije sadržavalo eugenol, što se tiče ostalih spojeva nije bilo značajno različito od čistog nemodificiranog eteričnog ulja. (21)

Derivatizacija eugenola iz ulja klinčića

Tursiloadi, Artanti i Sulaswatty 2015. godine su istraživali sintezu dimerskog eugenola koji ima antioksidacijska i protuupalna svojstva. Dimerizacija eugenola je oksidativna fenolna reakcija koja se može provesti djelovanjem metalniog kompleksnog katalizatorg. Sadržaj eugenola kao glavnog spoja u eteričnom ulju u cvijetu i listovima klinčića ima raspon od 82-95%. Ostale spojeve u ulju klinčića dijelimo u dvije kategorije: fenole (eugenol) i ne-fenole (β-kariofilen) koji se mogu derivatizirati s različitim katalitičkim i biokatalitičkim procesima. Odvajanje spojeva u ulju klinčića provodi se dodavanjem NaOH uz destilaciju pri čemu nastaju dva sloja. Prvi sloj sadrži eugenol i NaOH, dok drugi sloj sadrži β-kariofilen. Derivatizacija eugenola provodi se za proizvodnju različitih produkata kao što su vanilin, eugenil eter itd. Mehanizmi reakcije koji se javljaju u procesu dimerizacije eugenola su oksidacijske reakcije spajanja u kojima dolazi do formiranja slobodnih radikala. Mehanizam reakcije slobodnih radikala pri čemu dolazi do stvaranje eugenol dimera su inicijacija, propagacija i terminacija. Proces biokatalizirane dimerizacije derivata ulja od klinčića temelji se na korištenju peroksidaze iz hrena i H_2O_2 nakon čega slijedi reakcija

oksidacije rezidualnog H_2O_2. Proces je temeljen na biokatalizi peroksidaze iz hrena koja oksidativno dimerira eugenol u eteričnom ulju čime se tekuća, topljiva komponenta mijenja u netopljivu, čvrstu komponentu koja se može odvojiti filtriranjem. (22)



Slika 7. Dimerizacija eugenola koristeći peroksidazu iz hrena u prisutnosti H_2O_2 (22)

2. EKSPERIMENTALNI DIO

2.1. Uređaji i kemikalije

U eksperimentalnom dijelu ovoga rada korišteni su sljedeći reagensi:

- Natrijev fosfat dihidrat, $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD)
- Dinatrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich)
- Eugenol (Sigma-Aldrich)
- Peroksidaza (engl. *Horse Radish Peroxidase*, HRP), (Sigma-Aldrich)
- 35% otopina H_2O_2 (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Dietileter (Kemika).

Od uređaja su korišteni:

- Ultrazvučna kupelj (Ultrasonic cleaner, Digital pro$^+$)
- Analitička vaga ALS 120-4 (Kern, Inscale, Kingston, UK)
- Spektrofotometar, UV-VIS Lambda EZ 201 (Perkin-Elmer, SAD)
- Plinski kromatograf sa plameno-ionizacijskim detektorom (GC-FID) 7890A GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, SAD).

2.2. Postupak rada

Priprava reagensa:

- Fosfatni pufer, pH=7, c=0,2 M

Odvaže se 1,165 g natrijevog fosfata (NaH_2PO_4) i 3,097 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4), te se količina otopi u tikvici sa 800 mL destilirane vode. Otopina se zatim podešava do pH vrijednosti 7 pomoću HCl ili NaOH, a ostatak se nadopuni destiliranom vodom do oznake u tikvici od 1 L.

a) Spektrofotometrijsko praćenje modifikacije eugenola

Pripravi se otopina peroksidaze (124 U/mg) su 25 mL fosfatnog pufera kojoj se doda 50 mg eugenola te i 1μL otopine H_2O_2. Posuda se prekrije aluminijsko folijom kako bi se izbjegla dekompozicija peroksida. Reakcija se provodi pri sobnoj

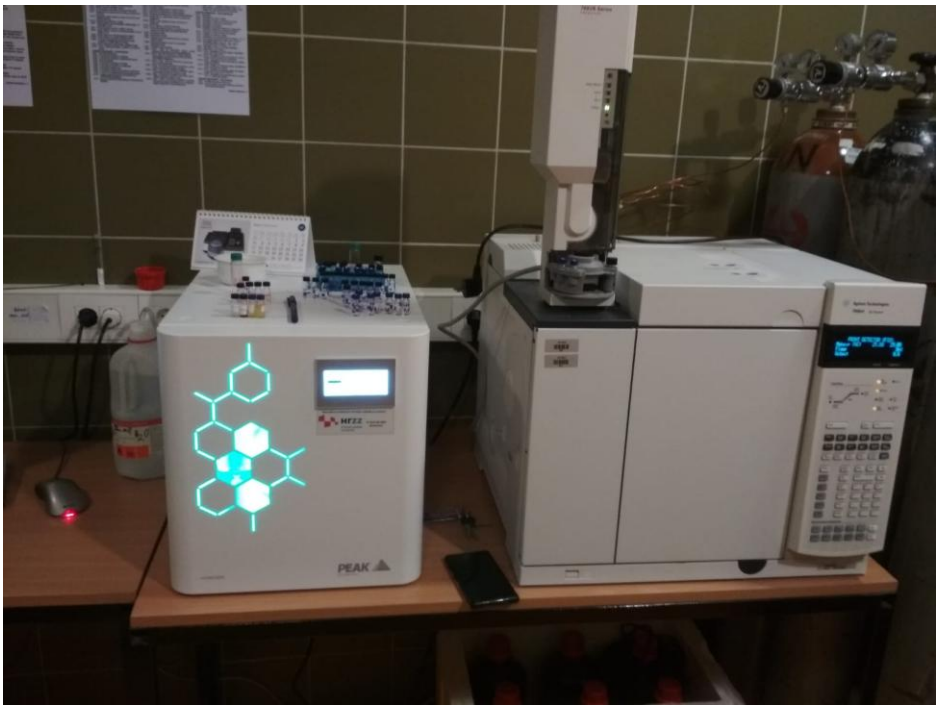
temperaturi, na način da dodatkom peroksidaze nastaje bijela, mutna tekućina kojoj se spektrofotometrijski snimao spektar od 250 do 500 nm te pratila promjena njegova intenziteta. Obzirom da je pripravljena otopina bila prekoncentrirana u kivete u kojima s vršilo mjerenje se pipetiralo 100 uL navedene smjese i 2 mL fosfatnog pufera kako bi se uzorak razrijedio.

b) Kromatografska detekcija uklanjanje eugenola iz eteričnog ulja

Kvalitativna i kvantitativna analiza eugenola u eteričnom ulju klinčića određivana je tehnikom plinske kromatografije opremljene sa plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID, Agilent 7890A) prikazan na slici *8.* Za analize navedenih uzoraka korištena je nepolarna kolona HP-5 (dimenzije: 30 m dužine, unutarnji promjer 0,32 mm i debljina nepokretne faze 0,25 μm). Temperaturni program za korištenu kolonu HP-5 je postavljen na način da je početna temperatura bila 60 °C izotermno u trajanju od 3 minute, nakon čega je povećavana do 150 °C brzinom 7 °C/min. Nakon postizanja zadane temperature postavljena je izotermno u trajanju od 1 minute nakon čega je temperatura povećavana sa 150 °C do 250 °C brzinom od 50 °C/min gdje je postavljena izotermno u trajanju od 5 minuta. Ostali kromatografski uvjeti su bili kako slijedi: plin nositelj je bio helij; brzina protoka je bila 1 mL/min; injekcijski blok je bio namješten na 250 °C; volumen analiziranog uzorka je bio 1,0 μL; omjer raspodjele je bio 1:100; temperatura FID-a je bila 300 °C.

Pikovi eugenola su potvrđeni usporedbom njihovih vremena zadržavanja sa vremenom zadržavanja komercijalnog standarda eugoenola.

U 25 mg eteričnog ulja se doda 5 mL fosfatnog pufera, 31 μL peroksidaze (12,4 U) te 1 μL H_2O_2 nakon čega se posuda zatvori kako bi se izbjegla dekompozicija peroksida. Već nakon par minuta boja otopine se promijeni u blijedo-žutu što je vidljivo na slici *10*, a ista s vremenom blijedi i nestaje. Na isti način ali bez dodatka enzima pripremljen je uzorak slijepe probe, ali i dva uzorka ulja od kojih je jedna izložen djelovanju enzima 1 sat, a drugi 4 sata. Nakon što uzorci odstoje navedeno vrijeme, ekstrahiraju se s dietil eterom (2 mL) te se dietileterski ekstrakt analizira GC-FID tehnikom kojom se potvrđuje prisustvo odnosno degradacija eugenola iz uzoraka ulja (slika *12*).

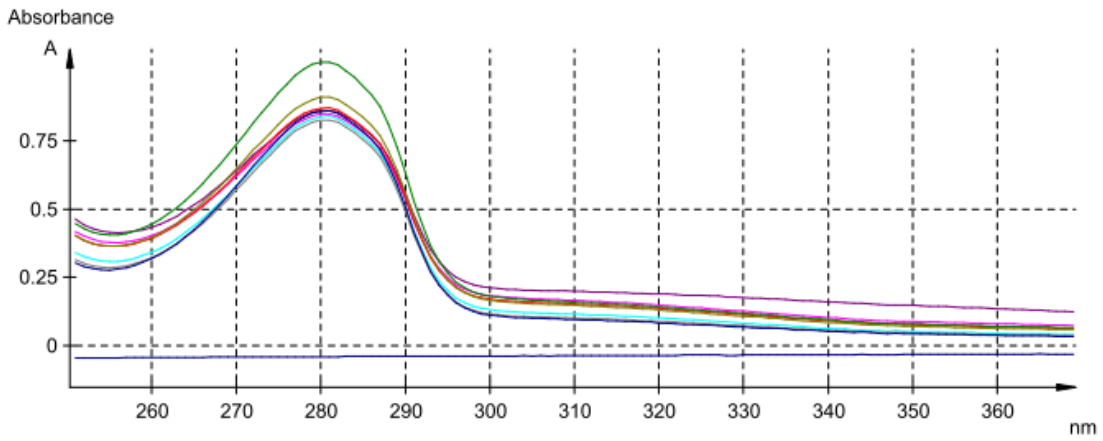


Slika 8. Prikaz GC-FID uređaja Agilent 7890A

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog završnog rada bio je dokazati utjecaj enzima peroksidaze na modifikaciju eugenola odnosno njegovo uklanjanje iz otopina ili smjesa.

U tu svrhu prvi dio rada bio je pratiti kinetiku djelovanja peroksidaze na eugenol i to spektrofotometrijski snimajući spektar otopine eugenola koja je izložena djelovanju enzima. Na slici 9 je vidljiv karakteristični spektar eugenola kod kojeg se može zamijetiti najveći intenzitet tj. pik pri 280 nm. Također vidljivo je da otopina eugenola koja nije izložena djelovanju enzima ima najviši pik (zelena linija), dok kod otopina s enzimom koje su uzorkovane u intervalima od 1 minute, je vidljiv pad intenziteta tog pika što je dokaz smanjenja koncentracije eugenola u uzorku.



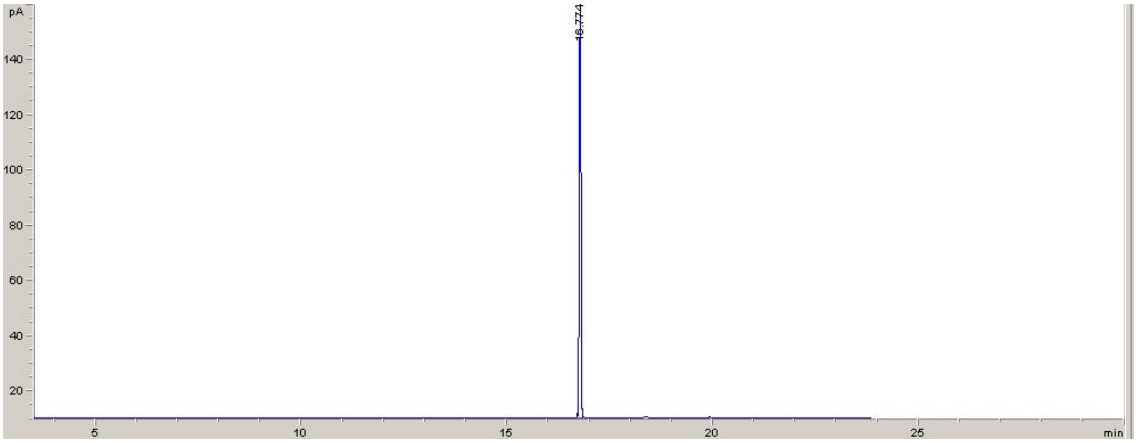
Slika 9. Spektrofotometrijsko određivanje promjene spektra eugenola djelovanjem peroksidaze

Na slici 10 prikazani su uzorci eugenola u koje je dodana peroksidaza. Kao što je vidljivo sa slike po dodatku enzima uzorci su promjenili boju u blijedo-žutu, dok je nakon stajanja tijekom 4 sata boja uzoraka u potpunosti bila bijela. Navedenu pojavu žutog obojenja po dodatku peroksida i brzi prelazak u mutnu bezbojnu tekućinu opisuju i Thompson i suradnici (1989) u njihovom istraživanju. Prema literaturnim navodima pri ovoj reakciji nastaje kinon metid koji se u slučaju korištenja većih koncentracija

eugenola može lako taloženjem ukloniti iz otopine. Za razliku od eugenola maksimalna apsorpcija ovog spoja je pri 320 nm.

Slika 10. Otopina eteričnog ulja klinčića nakon dodatka peroksidaze, a) odmah po dodatku enzima, b) nakon 4 sata

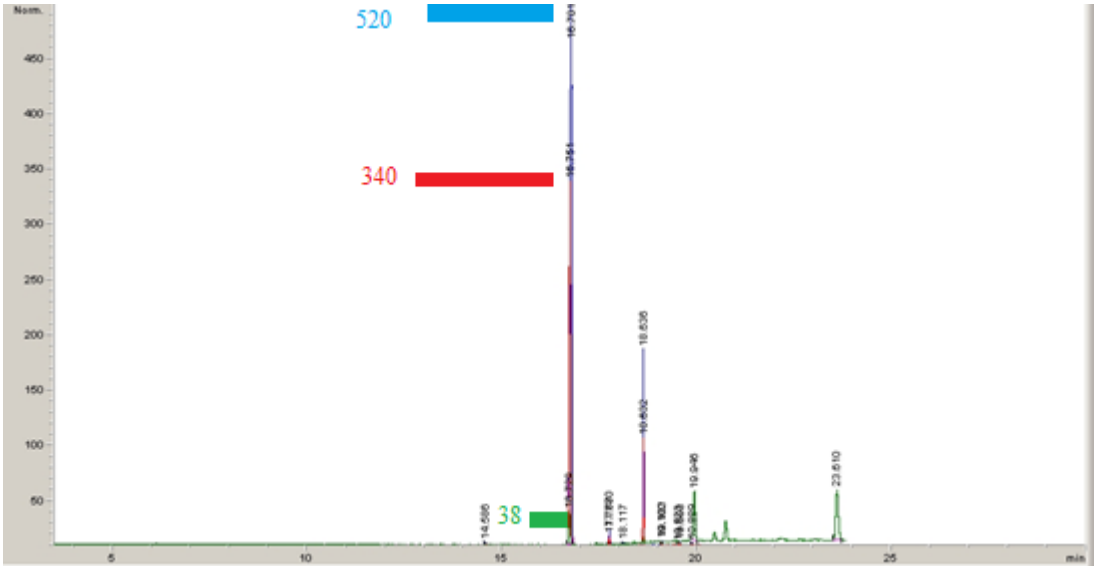
Na slici 11 prikazan je kromatogram eugenola dobiven GC-FID tehnikom na kojem je vidljivo da pik eugenola izlazi na retencijskom vremenu od 16,7 minuta. Analiza samog eugenola je vrlo važna za detekciju i identifikaciju ovog spoja u uzorku eteričnog ulja.



Slika 11. Kromatogram analize eugenola GC-FID tehnikom

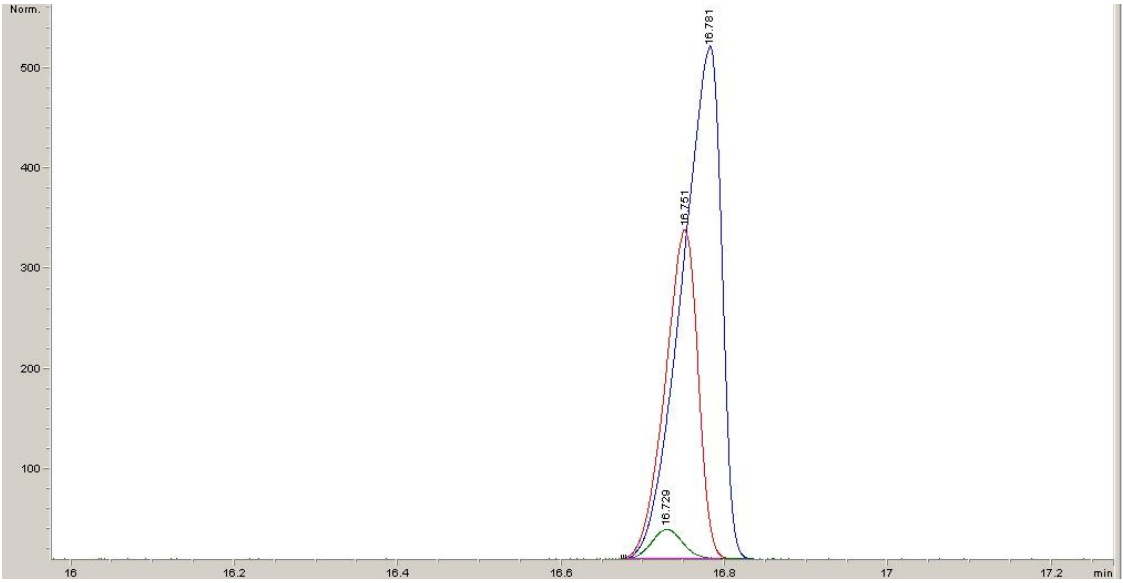
Na slici 12 prikazani su rezultati analize eteričnog ulja klinčića kao i ulja koje je bilo izloženo djelovanju peroksidaza tijekom 1, odnosno tijekom 4 sata. Kao što je vidljivo sa slike svi uzorci su imali dominantan pik na 16,7 minuta što je potvrda da je

riječ o eugenolu čiji je udio u ovako viskoj koncentraciji vec dokazan različitim studijama.



Slika 12. Kromatogrami analize eteričnog ulja klinčića GC-FID tehnikom; a) čistog ulja (plavo), b) ulja koje je reagiralo s enzimom 1 h (crveno), c) ulja koje je reagiralo s enzimom 4 h (zeleno)

Obzirom da je predmet ovog rada bio isključivo utjecaj enzima peroksidaze na eugenol na slici 13 pobliže su prikazani pikovi eugenola testiranih uzoraka kako bi se bolje uočile razlike među njima.



Slika 13. Izdvojen prikaz pikova eugenola iz kromatograma analize eteričnog ulja klinčića GC-FID tehnikom; a) čistog ulja (plavo), b) ulja koje je reagiralo s enzimom 1 h (crveno), c) ulja koje je reagiralo s enzimom 4 h (zeleno)

Tablica 3. Prikaz rezultata degradacije eugenola u uzorcima eteričnog ulja klinčića

Uzorak	**Visina pika**	**Degradacija (%)**
Ulje bez enzima (slijepa proba)	520	-
1 h	340	35
4 h	38	93

Prvi pik, prikazan u plavoj boji, sa visinom od 520 predstavlja ulje klinčića kojem nije dodan enzim. Nadalje, sljedeći pik, prikazan u crvenoj boji, predstavlja ulje koje je bilo izloženo djelovanju peroksidaze tijekom jednog sata, dok je posljednji pik, prikazan zelenom bojom, ulje koje je bilo izloženo djelovanju peroksidaze tijekom četiri sata. Sa svakim mjerenjem uočena je degradacija eugenola, odnosno smanjenje intenziteta (visine) pika u odnosu na početni uzorak odnosno samo ulje. Visina pika u uzorku koje je bilo izloženo djelovanju peroksidaze 1 sat je iznosila 340, dok je kod uzorka izloženog 4 sata bila samo 38.

Ako navedene vrijednosti visine pika računski prebacimo na stupanj degradacije eugenola u odnosu na uzorak ulja onda je vidljivo da se početna koncentracija eugenola u uzorku izloženom djelovanju enzima smanji za čak 35%, a nakon 4 sata za čak 93%. Ovim rezultatima je potvrđena početna teza rada i potencijalna mogućnost uklanjanja eugenola iz uzoraka ulja djelovanjem peroksidaze.

4. ZAKLJUČAK

Obzirom na rezultate dobivene u ovom istraživanju može se zaključiti da peroksidaza ima učinak na eugenol tj. uzrokuje njegovu modifikaciju i nastanak produkata koji se taložе te se stoga ovaj enzim može učinkovito koristiti za uklanjanje eugenola iz uzoraka eteričnog ulja.

5. LITERATURA

1. *M. Miloš***.** Biokemija- (Nastavni tekst za internu upotrebu). 2017. str. 43,49.

2. *H. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle,* Food Chemistry. Leipzig : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2009. str. 93,98,130-134,144-145.

3. *D. Bešlo,* Praktikum iz biokemije (skripta), Osijek : Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2014. str. 98.

4. *E. Lasoń, i J. Ogonowski,* Lipase – characterization, applications and methods of immobilization, Cracow : Institute of Organic Chemistry and Technology, Cracow University of Technology, 2010, Svez. **64**, str. 97-102.

5. *S. Thakur,* Lipases, its sources, Properties and Applications: A Review. 7, Summer Hill, Shimla : Department of Biotechnology, Himachal Pradesh University, July 2012, International Journal of Scientific & Engineering Research, Svez. **3**, str. 1-29. 2229-5518.

6. *R. Whitehurst, M. Oort,* Enzymes in Food Technology, Ames : Blackwell Publishing Ltd, 2010. str. 121.

7. *F. Xu***,** Applications of oxidoreductases: Recent progress. 1, Davis, California : GEN PUBLISHING INC, 2005, INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, Svez. **1**, str. 38-50.

8. *J. deMan,* Principles of food chemistry. Ontario : Springer Science Business Media New York, 1999. str. 418-419. 1572-0330.

9. *J. Whitaker,* Principles of Enzymology for the Food Sciences Food Science and Technology. Davis : Marcel Dekker, inc, 1994, Svez. **61**, str. 566..

10. *D. Wong,* Food Enzymes-Structure and Mechanism.. : Springer Science Business Media Dordrecht, 1995. s**.l** str. 321-339.

11. *I. Budetić,* Reguliranje eteričnih ulja u Hrvatskoj, Split : Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet, 2016. str. 1-3.

12. *K. Baser, C. Hüsnü, G. Buchbauer,* Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications. s.**l**. : Taylor and Francis Group, LLC, 2010. str. 39-40. 978-1-4200-6315-8.

13. *Z. Jiang, C. Kempinski, i J. Chappell,* Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids, s.l. : Curr. Protoc. Plant Biol, 2016, Svez. **1**, str. 345-358.

14. *N. Yadava, R. Yadava, A. Goyalb,* Chemistry of Terpenoids. July-August 2014, Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, str. 272-278. 0976 – 044X.

15. https://www.doterra.com/US/en/essential-oil-terpenes-monoterpenes. [Citirano: 31. October 2017.]

16. http://www.epharmacognosy.com/2012/05/classification-terpene-phenols.html. [Citirano: 31. October 2017.]

17. *D. Thompson. K. Norbeck, L. Olsson, D. Constantin-Teodosiu, J. Van der Zee , P. Moldéus* Peroxidase-catalyzed Oxidation of Eugenol: Formation of a Cytotoxic Metabolite(s) USA : an., 1989, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Svez. **264**, str. 1016-1022.

18. *M. Nejad, H. Özgüneş i N. Başaran,* Pharmacological and Toxicological Properties of eugenol. 2, Ankara : Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology, 2017, Svez. **14**, str. 201-206.

19. *P. Kamatou, I. Vermaak, i A. Viljoen,* Eugenol—From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule 2012, Molecules, Svez. **17**, str. 6953-6981. 1420-3049.

20. *T. Atsumi, S. Fujisawa i K. Tonosaki***,** A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. December19 2005, Svez. **8**, str. 1025-1033.

21. *Bouhlel, Charfeddine, G*. Dolhem, X. Fernandez, S. Antoniotti Model Study of the Enzymatic Modification of Natural Extracts: Peroxidase-Based Removal of Eugenol from Rose Essential Oil**.**. 4, Nice : Université de Nice−Sophia Antipolis, Institut de Chimie de Nice, 2012, J. Agric. Food Chem, Svez. **60**, str. 1052–1058.

22. *S. Tursiloadi, , N. Artanti i A. Sulaswatty,* Chemical catalytic and biocatalytic process of clove oil derivatives review. 1, June 2015, Svez. **17**, str. 69-85. 0853 – 2788.

23. *N. Veitch* Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. 2003. Phytochemistry, Svez **65**, str. 249-259