

# Utjecaj enzimski potpomognute ekstrakcije na udio eteričnog ulja kadulje i lovora

---

Vujović, Tamara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*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:159:994029>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2020.

Tamara Vujović

1246/PI

**UTJECAJ ENZIMSKI  
POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE  
NA UDIO ETERIČNOG ULJA  
KADULJE I LOVORA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za analitičku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Maje Dent te uz pomoć Anđele Miljanović, mag. ing. (Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama).



Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša“ (HRZZ InteractOomyc, UIP-05-2017) Hrvatske zaklade za znanost HRZZ (2018.-2023.).

## **ZAHVALA**

Želim se zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Maji Dent na pomoći, savjetima i vodstvu tijekom izrade ovog rada.

Hvala Anđeli Miljanović, mag. ing. na razumijevanju, strpljenju i velikoj pomoći pri radu u laboratoriju.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac (Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva) na ustupljenom ultrazvuku.

Za kraj se želim zahvaliti svojim roditeljima, kolegama i prijateljima na velikoj podršci tijekom studiranja.

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za kemiju i biokemiju  
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

## UTJECAJ ENZIMSKI POTPOMOŽNE EKSTRAKCIJE NA UDIO ETERIČNOG ULJA KADULJE I LOVORA

*Tamara Vujović, 1246/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada bio je odrediti optimalne parametre za provođenje predtretmana enzimima (ksilanaza) te njegov utjecaj na udio eteričnog ulja kadulje i lovora nakon vodene destilacije po Clavengeru. U prvom dijelu rada ispitivao se utjecaj pH-vrijednosti otapala, koncentracije enzima i vremena trajanja reakcije na aktivnost ksilanaze pri 40 °C. Utvrđeno je da optimalni uvjeti podrazumijevaju upotrebu pufera 2 (pH = 6,5), masenu koncentraciju enzima od 0,20 mg mL<sup>-1</sup> te vrijeme provođenja enzimske reakcije u trajanju od 4 sata. U drugom dijelu rada istraživao je utjecaj ekstrakcije potpomognute enzimima te ekstrakcije potpomognute ultrazvukom (50 W, 10 minuta) uz dodatak enzima kao predtretmana na udio eteričnog ulja nakon vodene destilacije. Kod obje biljke je najveći ekstrakcijski kapacitet postignut primjenom ekstrakcije potpomognute enzimima kao predtretmana, dok ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima nije značajno doprinijela povećanju udjela ekstrahiranog eteričnog ulja. Zaključno, ekstrakcija potpomognuta enzimima kao predtretmana vodenoj destilaciji po Clavengeru bi se u budućnosti mogla koristiti kao ekološki prihvatljiva metoda za izdvajanje eteričnog ulja iz listova lovora i kadulje.

**Ključne riječi:** *ekstrakcija, enzimi, kadulja, lovor, ultrazvuk*

**Rad sadrži:** 45 stranica, 13 slika, 9 tablica, 78 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Maja Dent

**Pomoć pri izradi:** Anđela Miljanović, mag. ing.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. *Tomislav Vladušić*
2. Izv. prof. dr. sc. *Tomislav Bosiljkov*
3. Doc. dr. sc. *Maja Dent*
4. Doc. dr. sc. *Maja Repajić* (zamjena)

**Datum obrane:** 19. lipnja 2020.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**Department of Chemistry and Biochemistry**  
**Laboratorij for Analytical Chemistry**

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### **INFLUENCE OF ENZYME-ASSISTED EXTRACTION ON THE YIELD OF ESSENTIAL OIL FROM SAGE AND BAY LAUREL**

*Tamara Vujović, 1246/PI*

**Abstract:**

The aim of this study was to determine optimal parameters for enzyme-assisted extraction (xylanase) and its impact on the content of sage and bay laurel essential oils after Clavenger hydrodistillation. Firstly, influence of solvent type, enzyme concentration and time of reaction on the xylanase activity at 40 °C was tested. It was found that the optimal parameters include the usage of buffer 2 (pH = 6,5), mass concentration of 0,20 mg mL<sup>-1</sup> and reaction time of 4 hours. Secondly, influence of enzyme-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction (50 W, 10 minutes) with the addition of enzymes on the essential oil yield after Clavenger hydrodistillation was tested. The highest extraction capacity was observed using enzyme-assisted extraction as pretreatment, while ultrasound-assisted extraction with the addition of the enzymes hasn't significantly contributed to the increase of the essential oil yield. In conclusion, pretreatment with enzyme-assisted extraction prior to the Clavenger hydrodistillation could be used as a green extraction method for bay laurel and sage essential oils.

**Keywords:** *extraction, enzymes, sage, bay laurel, ultrasound*

**Thesis contains:** 45 pages, 13 figures, 9 tables, 78 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** PhD. Maja Dent, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Anđela Miljanović, mag. ing.

**Reviewers:**

1. PhD. *Tomislav, Vladušić*, Assistant professor
2. PhD. *Tomislav, Bosiljkov*, Associate professor
3. PhD. *Maja, Dent*, Assistant professor
4. PhD. *Maja Repajić*, Assistant professor (substitute)

**Thesis defendes:** June 19<sup>th</sup>, 2020



## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
2.1. KADULJA.....	3
2.2. ETERIČNO ULJE KADULJE .....	4
2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja kadulje .....	4
2.3. LOVOR .....	6
2.4. ETERIČNO ULJE LOVORA.....	7
2.4.1. Kemijski sastav eteričnog ulja lovora.....	8
2.5. POSTUPCI EKSTRAKCIJE ETERIČNOG ULJA .....	9
2.5.1. Konvencionalne metode ekstrakcije .....	10
2.5.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije .....	11
2.6. UTJECAJ ENZIMA NA EKSTRAKCIJU ETERIČNOG ULJA.....	13
2.7. EKSTRAKCIJA ULTRAZVUKOM.....	15
2.8. CLAVENGER VODENA DESTILACIJA .....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	18
3.1. MATERIJAL .....	18
3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI .....	18
3.3. APARATURA I PRIBOR .....	19
3.4. METODE RADA .....	20
3.4.1. Određivanje optimalnih uvjeta za enzimsku aktivnost ksilanaze .....	22
3.4.2. Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	27
4.1. ODREĐIVANJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KSILANAZE .....	28
4.1.1. Određivanje optimalnog otapala za enzimsku aktivnost .....	28
4.1.2. Određivanje optimalne koncentracije enzima.....	29
4.1.3. Određivanje optimalnog vremena trajanja enzimske reakcije .....	30
4.2. IZOLACIJA ETERIČNOG ULJA.....	31
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	36
<b>6. LITERATURA</b> .....	37

# 1. UVOD

Kadulja (*Salvia officinalis* L.) i lovor (*Laurus nobilis* L.) su mediteranske samonikle biljke čiji se ekstrakti i eterična ulja uvelike koriste u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Eterična ulja su aromatske hlapljive uljne tekućine i sekundarni metaboliti dobiveni iz različitih dijelova biljnog materijala: cvijeća, pupa, sjemena, lišća, grana, kore, stabljike i dr., s dokazanim antifungalnim, antibakterijskim, insekticidnim, antivirusnim i nematocidnim svojstvima (Kanižai Šarić i sur., 2014; Palfi i sur., 2019).

Najčešći način dobivanja eteričnih ulja kadulje i lovora je vodenom destilacijom njihovih listova, no često se koristi i ekstrakcija organskim otapalima. Međutim, u posljednjih se nekoliko godina intenzivno istražuju tehnike ekstrakcije koje će rezultirati kraćim trajanjem postupka ekstrakcije, smanjenom potrebom za upotrebom organskih otapala za ekstrakciju, smanjenjem troškova pripreme uzoraka te većom kvalitetom i kvantitetom ekstrahiranih tvari. Jedna od metoda koja se sve više istražuje jest ekstrakcija potpomognuta enzimima, koja se pokazala učinkovitom i ekološki prihvatljivom metodom ekstrakcije te koja bi se u budućnosti mogla koristiti za dobivanje eteričnih ulja (Vian i sur., 2008; Chandran i sur., 2012). Kod ovog se postupka koriste enzimi koji djelomično ili potpuno hidroliziraju stanične stijenke i tako olakšavaju izdvajanje eteričnog ulja iz biljnog materijala (Hosni i sur., 2013; Chávez-González i sur., 2016). U ovom radu će se koristiti enzim ksilanaza. To je hidrolitički enzim koji nasumce cijepa  $\beta$ -1,4 veze u ksilanu, složenom polisaharidu i glavnom sastojku stanične stijenke biljaka, pri čemu dolazi do razaranja zbijene strukture stanične stijenke i povećanja dostupnosti intracelularnog materijala prilikom postupka ekstrakcije (Butt i sur., 2008; Amudan i sur., 2011).

Osim ekstrakcije potpomognute enzimima, istražuje se i mogućnost primjene ekstrakcije potpomognute ultrazvukom zbog smanjenja potrošnje energije i otapala te poboljšanja kvalitete eteričnog ulja (Allaf i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj predtretmana enzimima i predtretmana ultrazvukom uz dodatak enzima, odnosno njihov izostanak na udio eteričnog ulja dobivenog iz samoniklog bilja (kadulje i lovora). U prvom dijelu rada određivali su se optimalni uvjeti za enzimsku aktivnost ksilanaze pri 40 °C (vrsta otapala, odnosno njegova pH-vrijednost, masena koncentracija enzima i vrijeme odvijanja enzimske reakcije), budući da su dosadašnja

istraživanja pokazala da su to parametri koji značajno utječu na učinkovitost ekstrakcije (Zhang i sur., 2012). U drugom dijelu rada ispitivao se utjecaj tretmana enzimima i tretmana potpomognutim ultrazvukom (snaga ultrazvuka 50 W, 10 minuta) uz dodatak enzima koji su prethodili vodenoj destilaciji u aparaturi po Clavengeru na udio eteričnog ulja kadulje i lovora.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. KADULJA

Kadulja je višegodišnja biljka iz porodice Lamiaceae (Tablica 1.). Rod *Salvia* obuhvaća više od 900 vrsta, međutim najznačajnije su dalmatinska (obična) kadulja (*Salvia officinalis* L.), grčka kadulja (*Salvia triloba* L.) i španjolska kadulja (*Salvia lavandulifolia* L.) (Miguel i sur., 2011).

**Tablica 1.** Klasifikacija vrste *Salvia officinalis* L. prema taksonomskim kategorijama (USDA, 2020a)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	Plantae
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Lamiales
Porodica	Lamiaceae
Rod	<i>Salvia</i> L.
Vrsta	<i>Salvia officinalis</i> L.

Obična ili dalmatinska kadulja (Slika 1.) raste u obliku grma s drvenastim stabljikama i sivkastim listovima te cvjetovima čija se boja kreće u rasponu od plave do ljubičaste. Podrijetlom je s područja Mediterana (Dalmacija, Albanija, Turska, Italija), no danas je kultivirana diljem svijeta (Cutillas i sur., 2017; Lemle, 2018).



**Slika 1.** Dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis* L.) (Lemle, 2018)

## 2.2. ETERIČNO ULJE KADULJE

Eterično ulje kadulje obično se dobiva vodenom destilacijom listova kadulje i upotrebljava u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji. Široka upotreba ekstrakata i eteričnog ulja kadulje prisutna je zbog njihovih antimikrobnih, antioksidacijskih, hipoglikemijskih, antiupalnih, fungicidnih i drugih svojstava (Glisic i sur., 2010; Cutillas i sur., 2017; Vosoughi i sur., 2018). Primjerice, eterično ulje kadulje se zbog svojih organoleptičkih svojstava u prehrambenoj industriji koristi kao dodatak mesnim proizvodima, salatama i juhama. Antioksidativna svojstva eteričnog ulja kadulje dolaze do izražaja kod sprječavanja oksidacije lipida prisutnih u hrani, dok se kao antimikrobno sredstvo koristi u inhibiciji rasta različitih mikroorganizama kao što su *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* i dr., a koji se mogu naći u hrani (Bandoniene i sur., 2002; Bozin i sur., 2007; Roby i sur., 2013).

Campana i sur. (2017) su u svom radu opisali mogućnost upotrebe sredstava na bazi eteričnog ulja kadulje u sanitaciji uređaja u industrijskim pogonima u kojima se prerađuje hrana, budući da mikroorganizmi poput *Staphylococcus aureus* mogu na površinama od nehrđajućeg čelika tvoriti biofilmove i tako negativno utjecati na zdravstvenu ispravnost hrane.

Osim u prehrambenoj industriji, eterično ulje kadulje koristi se u medicini za tretiranje upala i infekcija sluznice grla i usne šupljine (stomatitisa, gingivitisa i faringitisa), dispeptičkih tegoba i problema pretjeranog znojenja te mentalnih poremećaja (Miguel i sur., 2011, El Euch i sur., 2018).

### 2.2.1. Kemijski sastav eteričnog ulja kadulje

Na kemijski sastav eteričnog ulja kadulje značajno utječu različiti genetički i okolišni čimbenici, starost biljke, klimatski uvjeti te razdoblje u kojem je biljka ubrana (Abu-Darwish i sur., 2013). Najzastupljeniji spojevi u eteričnom ulju kadulje su kamfor i tujon te je njihova prevladavajuća prisutnost u eteričnom ulju kadulje jedan od parametara prema kojima se vrsta *S. officinalis* razlikuje od drugih vrsta iz roda *Salvia* (Grdiša i sur., 2015). U Tablici 2. prikazan je udio najzastupljenijih komponenata u eteričnom ulju kadulje.

**Tablica 2.** Kemijski sastav eteričnog ulja kadulje (*Salvia officinalis* L.) dobivenog vodenom destilacijom u aparaturi po Clavengeru (Lakušić i sur., 2013)

<b>Glavne komponente</b>	<b>Udio (%)</b>
kamfor	21,42
<i>cis</i> -tujon	18,63
$\alpha$ -humulen	9,45
viridiflorol	7,13
manool	5,03
kamfen	4,91
1,8-cineol	4,78
linonen	4,28
$\beta$ -pinen	3,37
<i>trans</i> -tujon	3,10
$\alpha$ -pinen	2,62
$\beta$ -kariofilen	1,58
borneol	1,36
<i>trans</i> -sabinen hidrat	1,11
humulen epoksid II	1,09
$\gamma$ -terpinen	1,08
mircen	0,98
sabinen	0,96
<i>p</i> -cimen	0,91
<i>cis</i> - $\beta$ -ocimen	0,71
$\alpha$ -tujen	0,67
terpinen-4-ol	0,58
<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,54
bornil acetat	0,51
$\alpha$ -terpinen	0,48
terpinolen	0,44

### 2.3. LOVOR

Lovor (*Laurus nobilis* L.) je mediteranska biljka iz porodice Lauraceae (Tablica 3.) koja obuhvaća više od 2500 vrsta (Kaurinović i sur., 2010). Podrijetlom je iz Male Azije, s prirodnim populacijama u primorskom području Hrvatske i zemljama oko Sredozemnog mora (Dudaš i Venier, 2009).

**Tablica 3.** Klasifikacija vrste *Laurus nobilis* L. prema taksonomskim kategorijama (USDA, 2020b)

Taksonomska kategorija	Naziv
Carstvo	Plantae
Koljeno	Magnoliophyta
Razred	Magnoliopsida
Red	Lurales
Porodica	Lauraceae
Rod	<i>Laurus</i> L.
Vrsta	<i>Laurus nobilis</i> L.

Lovor (Slika 2.) raste u obliku grma ili drva visine od 3 do 15 metara i ima tamnozeleno listove duguljastog oblika sa sjajnom površinom i zašiljenim vrhovima te žućkaste cvjetove i malene tamne plodove (Mihovilović, 2005; Dudaš i Venier, 2009; Basak i Candan, 2013).



**Slika 2.** Lovor (*Laurus nobilis* L.) (Mihovilović, 2005)

## 2.4. ETERIČNO ULJE LOVORA

Eterično ulje lovora dobiva se destilacijom iz listova lovora i upotrebljava u izradi parfema, sapuna, detergenata, a u prehrambenoj industriji za aromatiziranje alkoholnih pića, smrznutih deserata te pekarskih i mesnih proizvoda. Osim navedenog, postoji mogućnost korištenja eteričnog ulja lovora kao konzervansa u mesnoj industriji, čime bi se produljila trajnost kobasica od mesa divljači i mljevenog mesa te kroz dulje vrijeme očuvala poželjna senzorska svojstva proizvoda (Vilela i sur., 2016; Kos i sur., 2017). U novije vrijeme istražuje se i mogućnost izrade jestivih prevlaka s antimikrobnim svojstvima čime bi se produljila trajnost kriški sira. Takve jestive prevlake izrađivale bi se metodom elektrospredanja, pri čemu bi se u vlaknasti skelet jestive prevlake enkapsuliralo eterično ulje lovora koje pozitivno djeluje kod suzbijanja rasta patogena kao što su *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus* (Göksen i sur., 2020).

Zbog svog antioksidacijskog, baktericidnog i fungicidnog djelovanja, osim u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, svoju primjenu nalazi i u medicini. Primjerice, listovi lovora i njegovi ekstrakti koriste se za snižavanje povišene razine šećera u krvi, suzbijanje bakterijskih i gljivičnih infekcija te tretiranje epilepsije, neuralgije, gastrointestinalnih problema i simptoma Parkinsonove bolesti (El Malti i Amarouch, 2009; Dias i sur., 2014). Još jedna moguća primjena eteričnog ulja lovora jest u zaštiti poljoprivrednih usjeva od nametnika koji se trenutno tretiraju sredstvima koji štetno djeluju na ekosustav, odnosno štetnika koji su razvili otpornost na pesticide. Tako bi se sintetički pesticidi, entomopatogene gljive i nematode koje se trenutno koriste mogli zamijeniti s ekološki prihvatljivim pesticidima kao što su eterična ulja biljaka (Atanasova i Leather, 2018). Işik i Görür (2009) su u svom radu prikazali potencijal upotrebe eteričnog ulja lovora u suzbijanju štetnog djelovanja kupusne lisne uši (*Brevicoryne brassicae* L.), štetnika kupusnjača. Nadalje, Jemâa i sur. (2012) ispitivali su utjecaj eteričnog ulja lovora protiv žitnog kukuljičara (*Rhizopertha dominica*) i kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum*), dva značajna štetnika u skladištima žitarica i njihovih prerađevina, dok su Ebrahimi i sur. (2013) eteričnim uljem lovora uspješno kontrolirali pamukovu lisnu uš (*Aphis gossypii*), nametnika koji napada voće, povrće i ukrasne biljke.



#### 2.4.1. Kemijski sastav eteričnog ulja lovora

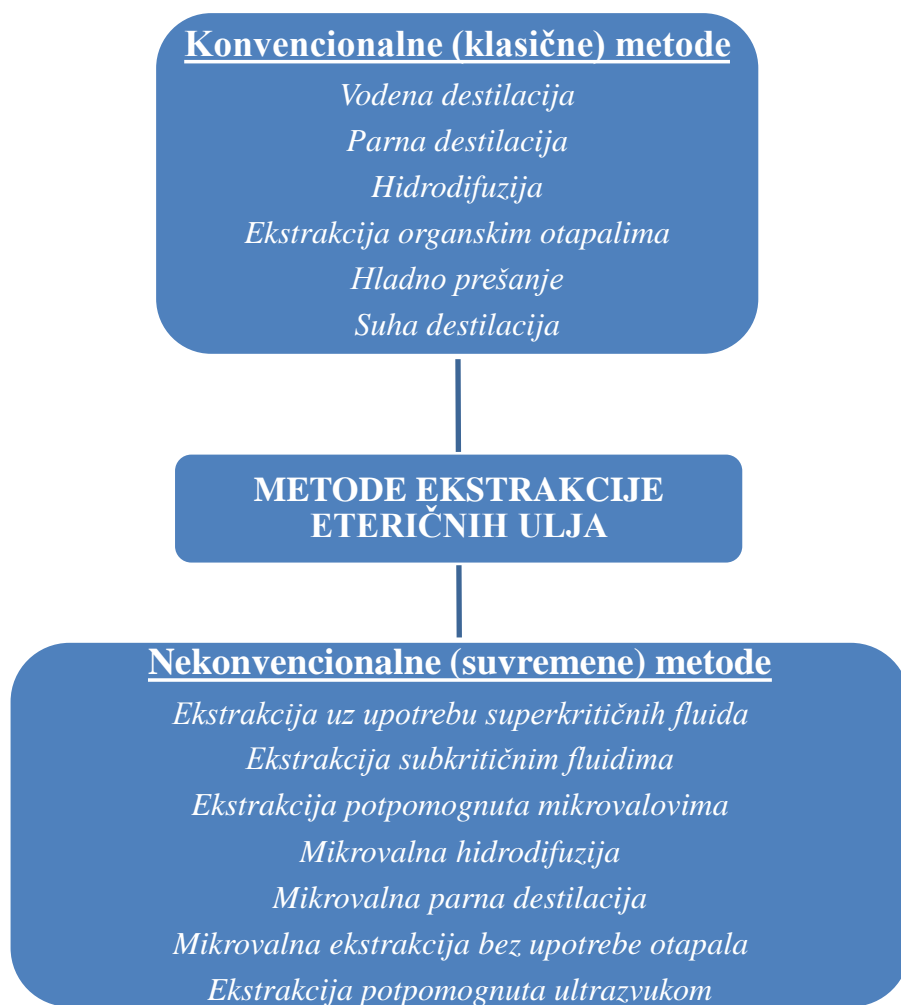
Antibakterijsko, antioksidacijsko, antiupalno i fungicidno djelovanje eteričnog ulja lovora pripisuje se pojedinim spojevima prisutnima u njegovom kemijskom sastavu (Marzouki i sur., 2009). Udio pojedinih biološki aktivnih spojeva u eteričnom ulju lovora ovisi o nekoliko čimbenika: okolišnim uvjetima, primijenjenim metodama ekstrakcije, dijelu biljke iz kojeg se ekstrahira eterično ulje i dr. (Fidan i sur., 2019). U Tablici 4. prikazane su glavne komponente detektirane u eteričnom ulju dobivenom vodenom destilacijom iz osušenih listova lovora.

**Tablica 4.** Kemijski sastav eteričnog ulja lovora (*Lauris nobilis* L.) dobivenog vodenom destilacijom u aparaturi po Clavengeru (Taban i sur., 2018)

Glavne komponente	Udio (%)
1,8-cineol	37,53
$\alpha$ -terpinil acetat	18,65
sabinen	5,93
terpinen-4-ol	4,72
$\alpha$ -pinen	4,11
kariofilen oksid	3,26
$\beta$ -pinen	3,22
metil-eugenol	2,77
$\alpha$ -terpineol	2,41
linalol	1,60
<i>trans</i> -kariofilen	1,33
$\beta$ -elemen	1,05
kariofila-4(12),8(13)-dien-5 $\beta$ -ol	0,88
bornil acetat	0,83
eugenol	0,83
$\delta$ -terpineol	0,78
$\beta$ -mircen	0,72
$\beta$ -eudesmol	0,73
$\gamma$ -terpinen	0,65
neril-acetat	0,63

## 2.5. POSTUPCI EKSTRAKCIJE ETERIČNOG ULJA

Ekstrakcija je postupak izdvajanja i koncentriranja određenih tvari iz biljnih i životinjskih tkiva pomoću odgovarajućeg otapala primjenom standardnih postupaka. Biljni ekstrakti dobivaju se tako da se usitnjeni dijelovi biljke, uglavnom osušeni, dovode u kontakt s otapalom za ekstrakciju u odgovarajućem uređaju (Savić, 2014). Na učinkovitost ekstrakcije utječu različiti parametri kao što su upotreba odgovarajućeg otapala i njegova pH-vrijednost, veličina čestica materijala, omjer otapala i materijala, temperatura pri kojoj se provodi ekstrakcija i trajanje ekstrakcije (Zhang i sur., 2012). Metode ekstrakcije prirodnih sastojaka (Slika 3.), tj. eteričnih ulja iz biljnog materijala možemo podijeliti u dvije osnovne skupine: konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (suvremene) metode ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).



**Slika 3.** Metode ekstrakcije eteričnih ulja (Dima i Dima, 2015)

### 2.5.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Većina konvencionalnih metoda ekstrakcije temelji se na upotrebi različitih otapala sa sposobnošću ekstrakcije željenih komponenata iz materijala, u kombinaciji s grijanjem i/ili miješanjem.

Vodena destilacija je klasična metoda ekstrakcije bioaktivnih komponenata i eteričnih ulja iz biljaka. Kod ove metode ne koriste se organska otapala i u sklopu ove metode razlikujemo tri postupka: vodenu destilaciju, parnu destilaciju i vodeno-parnu destilaciju (Azmir i sur., 2013). Parna i vodena destilacija su najčešće korištene metode za ekstrakciju eteričnih ulja. Proces ekstrakcije ovom metodom može trajati od 1 do 10 sati, a količina dobivenog ulja ovisi o vremenu trajanja ekstrakcije, temperaturi, tlaku i vrsti biljnog materijala. Tijekom destilacije, biljni materijal je u kontaktu s kipućom vodom i/ili parom pri čemu dolazi do evaporacije eteričnog ulja. Nakon kondenzacije vodene pare i para eteričnog ulja, kondenzati se sakupljaju i razdvajaju (Stratakos i Koidis, 2016).

Osim vodene destilacije, koristi se i suha destilacija kod koje se u procesu ekstrakcije ne koriste organska otapala ili voda. Iako se radi o konvencionalnoj metodi, ona se obično primjenjuje u kombinaciji s nekim suvremenim postupkom kao što je zagrijavanje mikrovalovima (Tigrine-Kordjani i sur., 2006).

Hidrodifuzija je slična destilaciji, a razlika je u tome da se kod hidrodifuzije ekstrahirani spojevi skupljaju ispod tretiranog biljnog materijala zbog djelovanja sile gravitacije (Bousbia i sur., 2009).

Ekstrakcija organskim otapalima se već dugi niz godina koristi za izolaciju eteričnih ulja iz prirodnog materijala. Kod ove metode se biljni materijal miješa s otapalom ili otapalima za ekstrakciju uz blago zagrijavanje, filtrira te evaporira otapalo. Dobiveni filtrat je mješavina voskova, mirisnih komponenti i eteričnog ulja. Filtrat se miješa s alkoholom u kojem će se otopiti eterično ulje, nakon čega se dobivena smjesa destilira pri nižoj temperaturi. Tijekom destilacije alkohol apsorbira prisutne mirisne komponente i evaporira, dok eterično ulje zaostaje u posudi kao talog. Učinkovitost ove metode ekstrakcije uvelike ovisi o odabiru otapala i pritom je polarnost komponente koju želimo ekstrahirati najvažniji čimbenik prilikom odabira pogodnog otapala za ekstrakciju. Za ekstrakciju se koriste čista organska otapala ili njihove mješavine, a najčešće korištena otapala su aceton, petroleter, heksan, metanol i etanol. Nedostaci ove metode su zaostajanje dijela organskog otapala u

ekstraktu što predstavlja određeni toksikološki rizik, zatim dugotrajnost samog postupka i niska selektivnost (Luque de Castro i sur., 1999; Azmir i sur., 2013; Aziz i sur., 2018).

Metodom hladnog prešanja dobivaju se eterična ulja iz kore agruma (npr. naranče, limuna, bergamota), budući da je taj materijal vrlo osjetljiv prema postupku destilacije. Kod postupka prešanja prvo se struže kora, čime se iz mehanički oštećenih stanica oslobađa ulje. Zatim se dobivena kaša miješa s vodom i preša ručno ili u strojevima te filtrira, pri čemu dolazi do razdvajanja tekuće heterogene smjese vode i ulja od isprešanog ostatka. U konačnici se dobiveni filtrat razdvaja na ulje i vodu (Glavaš, 1976). Iako je kod ove metode udio ulja manji, prednost hladnog prešanja naspram ekstrakcije otapalima jest minimizirana degradacija ulja (Latif i Anwar, 2009).

S obzirom na to da su konvencionalne metode ekstrakcije dugotrajni procesi koji nerijetko zahtijevaju upotrebu velikih količina organskih otapala visoke čistoće i imajući u vidu njihovu nisku selektivnost te mogućnost termičke razgradnje termolabilnih komponenata tretiranog materijala primjenom metoda ekstrakcije opisanih u ovom potpoglavlju, javila se potreba za razvojem novih metoda ekstrakcije (Azmir i sur., 2013).

### 2.5.2. Nekonvencionalne metode ekstrakcije

Nove (suvremene) metode ekstrakcije još se nazivaju i nekonvencionalnim metodama ekstrakcije. Kod ovih se metoda primjenom različitih suvremenih i ekološki prihvatljivih postupaka nastoji povećati udio i kvaliteta eteričnih ulja izdvojenih iz prirodnog materijala.

Ekstrakcija uz upotrebu superkritičnih fluida je metoda ekstrakcije koja se koristi za ekstrakciju i izolaciju bioaktivnih komponenti i eteričnih ulja biljaka. Superkritični fluidi su tvari iznad svojih kritičnih vrijednosti temperature i tlaka, a koje imaju svojstva i plinova i tekućina. Oni imaju gustoću i svojstva otapanja kao i pojedina organska otapala, no manju viskoznost čime se omogućava bolja difuzija tvari. Najčešće korištene tekućine i plinovi za ovu tehniku ekstrakcije su ugljikov dioksid, etan, dušikov oksid, propan, amonijak, sumporov heksafluorid i dr., dok se za ekstrakciju i izolaciju eteričnih ulja najčešće koristi ekstrakcija superkritičnim ugljikovim dioksidom (CO<sub>2</sub>). Dakle, ova tehnika ima brojne prednosti poput mogućnosti ekstrakcije različitih analita, osobito nepolarnih tvari, zatim visoke selektivnosti superkritičnih tekućina, kao i nemogućnosti zagađenja okoliša do kojeg može doći uslijed

korištenja organskih otapala. Međutim, još uvijek nije u potpunosti istražena isplativost primjene ovog postupka u industrijskim uvjetima (Glisic i sur., 2010; Pourmortazavi i sur., 2019).

Za razliku od superkritičnih fluida, subkritičnim fluidima se nazivaju stlačene tekućine poput vode ili etanola s vrijednostima temperature iznad svoje točke vrelišta i ispod kritične vrijednosti temperatura. Karakteriziraju ih dobra svojstva otapanja što ih čini pogodnima za ekstrakciju velikog broja komponenata iz biljnog materijala te se prema trenutnim saznanjima subkritična ekstrakcija vodom pokazala uspješnom u ekstrakciji eteričnih ulja. Upotrebom subkritičnih fluida ublažuju se određeni nedostaci upotrebe superkritičnih fluida, primjerice superkritičnog CO<sub>2</sub>, čija je primjena ograničena na ekstrakciju polarnih komponenti i koja zahtjeva velika novčana ulaganja (Srinivas i sur., 2009).

Kao što je već navedeno, u zadnjih nekoliko godina intenzivno se istražuju tehnike ekstrakcije koje omogućuju skraćivanje trajanja ekstrakcije, smanjenje korištenja organskih otapala za ekstrakciju, prevenciju onečišćenja okoliša i smanjenje troškova pripreme uzoraka. Imajući u vidu navedene zahtjeve, razvilo se nekoliko metoda ekstrakcije potpomognutih mikrovalovima poput ekstrakcije pomoću mikrovalne hidrodifuzije i gravitacije, mikrovalne parne destilacije i mikrovalne destilacije bez upotrebe otapala (Vian i sur., 2008). Mikrovalovi su dio elektromagnetskog zračenja frekvencije oko 2450 MHz. Oni imaju ograničen energetski potencijal pa ne uzrokuju promjene u strukturi tvari, već molekule vode uzrokuju samo porast temperature i na tom principu rade mikrovalne pećnice. Prilikom ekstrakcije, mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka i oštećuju vodikove veze te posljedično povećavaju kretanje otopljenih iona, odnosno prodiranje otapala u matriks materijala. Mikrovalnom ekstrakcijom ili ekstrakcijom u kombinaciji ultrazvuka i mikrovalova moguće je ekstrahirati eterična ulja kao i klasičnim metodama, no uz puno kraće vrijeme što ovu tehniku čini energetski i ekonomski isplativijom. Međutim, utvrđeno je da je mikrovalna ekstrakcija neučinkovita ako se koristi svjež i neosušen ili potpuno suh materijal uz heksan kao ekstrakcijsko otapalo (Blekić i sur., 2011).

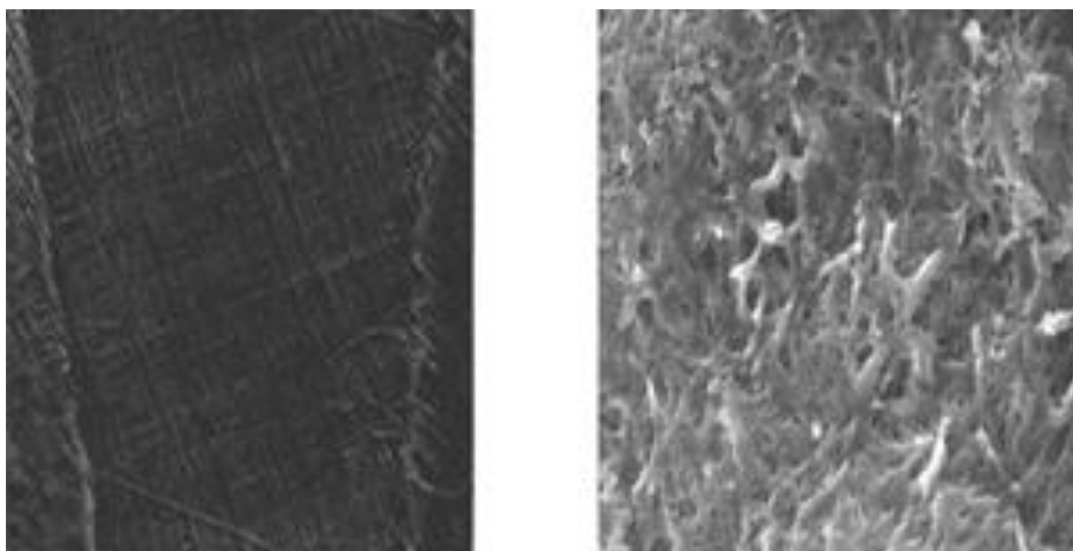
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je ekološki prihvatljiva metoda ekstrakcije kod koje ultrazvučni efekt poboljšava učinkovitost ekstrakcije tako što uslijed kavitacije dolazi do dubljeg prodiranja otapala u biljni materijal i u konačnici većeg udjela eteričnog ulja. Jedna od značajnih prednosti ove metode jest ta da sprječava degradaciju ekstrakata i njihovih

bioaktivnih komponenti (Tekin i sur., 2015). Ova metoda je detaljnije opisana u potpoglavlju 2.7. ovog rada.

## 2.6. UTJECAJ ENZIMA NA EKSTRAKCIJU ETERIČNOG ULJA

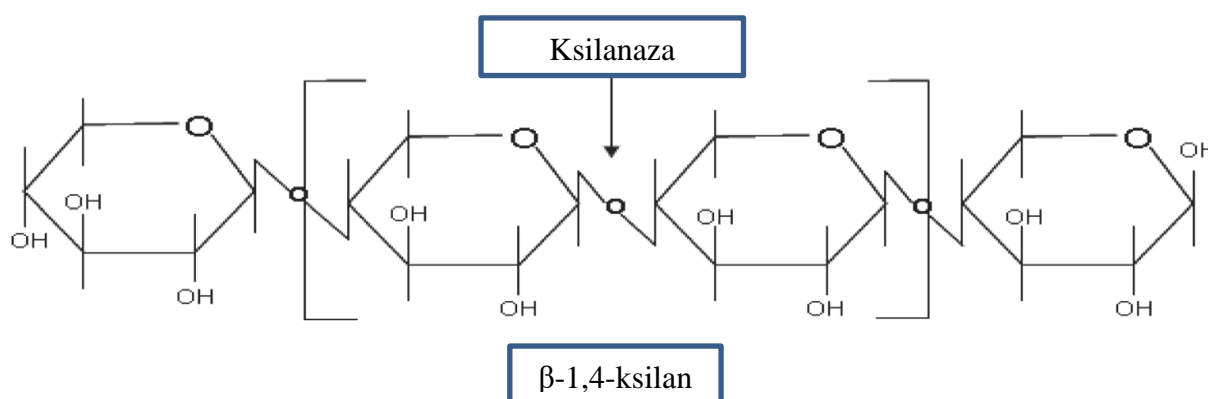
Iako se konvencionalne metode ekstrakcije još uvijek uglavnom koriste za dobivanje eteričnog ulja iz biljnog materijala, primjena tih metoda može negativno utjecati na strukturu, kvalitetu i kvantitetu ekstrahiranih tvari. Još jedna nekonvencionalna metoda, a koja nije navedena i opisana u prethodnom potpoglavlju jest ekstrakcija potpomognuta enzimima. Kod te metode provodi se predtretman materijala enzimima prije same ekstrakcije (Amudan i sur., 2011). Iako je vodena destilacija najčešće korištena metoda za ekstrakciju eteričnih ulja iz biljaka, u posljednje vrijeme sve se više istražuje mogućnost primjene ekstrakcije potpomognute enzimima kao učinkovite i ekološki prihvatljive metode ekstrakcije (Chandran i sur., 2012). Za predtretman se koriste enzimi koji djelomično ili potpuno hidroliziraju stanične stijenke i tako olakšavaju izdvajanje eteričnog ulja iz biljnog materijala (Hosni i sur., 2013; Chávez-González i sur., 2016). Enzimi mogu biti izolirani iz bakterija, gljiva, životinjskih organa ili voća i povrća. Klasificiraju se u nekoliko kategorija: hidrolaze, oksidoreduktaze, ligaze, transferaze, izomeraze i liaze. Na temelju njihovih katalitičkih svojstava i vrsti reakcija koje kataliziraju, određeni enzim veže specifičan supstrat i omogućuje njegovo prevođenje u produkt. Enzimi koji se najčešće koriste za ekstrakciju prirodnih komponenti iz biljaka su celulaze (egzo-1,4- $\beta$ -D-glukanaze, 1,4- $\beta$ -D-glukanaze, 1,4- $\beta$ -glukozidaze), pektinaze (pektin hidrolaze, pektin liaze, pektin esteraze) i hemicelulaze (mananaze, ksilanaze) (Cheng i sur., 2015). Zbog svoje velike specifičnosti i djelotvornosti, enzimi su se pokazali učinkovitima u ekstrakciji eteričnih ulja, pritom rezultirajući značajnim povećanjem udjela eteričnog ulja i bioaktivnih komponenata biljaka (Calinescu i sur., 2014).

Stanične stijenke biljaka izgrađene su od celuloze, hemiceluloze i drugih polimera koji su međusobno isprepleteni i koji pritom otežavaju ekstrakciju. Primjenom hidrolitičkih enzima kao što su celulaze i pektinaze može se djelovati na stanične stijenke biljnog materijala, pri čemu dolazi do razaranja njihove zbijene strukture (Slika 4.) i povećanja dostupnosti intracelularnog materijala prilikom postupka ekstrakcije (Amudan i sur., 2011).



**Slika 4.** Slike staničnih stijenki biljaka snimljenih pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Lijeva slika prikazuje izgled stanične stijenke bez predtretmana, a desna slika izgled stanične stijenke nakon tretmana enzimima (Cheng i sur., 2015)

Za predtretman materijala može se koristiti samo jedan enzim ili kombinacija više njih, međutim potrebno je utvrditi optimalne vrijednosti temperature, pH-vrijednosti, vremena trajanja predtretmana i koncentracije enzima, za koje se pokazalo da imaju značajan utjecaj na uspješnost procesa ekstrakcije (Bich i sur., 2017). U ovom su se radu kod predtretmana koristile ksilanaze, hidrolitički enzimi koji nasumce cijepaju  $\beta$ -1,4 veze u ksilanu (Slika 5.), složenom polisaharidu i glavnom sastojku stanične stijenke biljaka (Butt i sur., 2008).



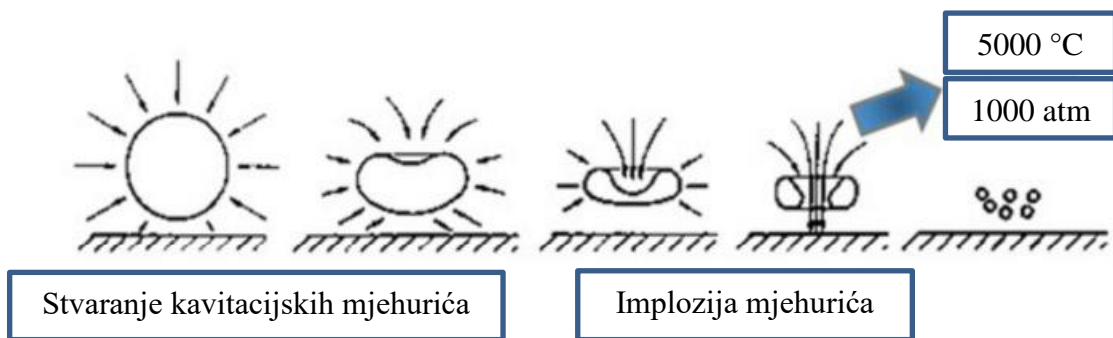
**Slika 5.** Struktura ksilana i djelovanje ksilanaza na  $\beta$ -1,4 veze u ksilanu (Butt i sur., 2008)

## 2.7. EKSTRAKCIJA ULTRAZVUKOM

Ekstrakcija ultrazvukom (20-100 kHz), odnosno ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je jedna od novijih nekonvencionalnih metoda ekstrakcije. Trenutno se istražuju mogućnosti primjene ove metode zbog njezine visoke obnovljivosti u kraćem vremenu te u svrhu smanjenja potrošnje energije i otapala te poboljšanja kvalitete eteričnog ulja (Allaf i sur., 2013).

Tijekom tretiranja biljnog materijala ultrazvukom niske frekvencije dolazi do pojave kavitacije. Naime, prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije te ekspanzivnih vrtloga. Kao rezultat oscilacija tlaka u mediju, mjehurići osciliraju te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije. U određenom trenutku, kada mjehurić dosegne određenu kritičnu veličinu i ne može više učinkovito apsorbirati energiju, a bez ulazne energije šupljina se ne može sama održavati, mjehurić se urušava sam u sebe. Pritom kritična veličina mjehurića ovisi o primijenjenoj frekvenciji i mediju koji se tretira. Takve ciklusne fluktuacije tlaka dovode do formiranja velikog broja udubljenja, koja nastaju zbog povećane difuzije plina u mjehuriću tijekom ekspanzijskog ciklusa uslijed povećanja površine mjehurića. Kada energija ultrazvuka nije dostatna da se zadrži plinska faza u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije te se kondenzirane molekule sudaraju velikom brzinom, pri čemu nastaju udarni valovi. Takvi udarni valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa), što dovodi do mijenjanja fizikalno-kemijskih svojstava lokalnih molekula. Najvažniji faktor za stvaranje kavitacijskih mjehurića (Slika 6.) je frekvencija ultrazvuka. Pri frekvencijama višim od 1 MHz male su šanse za kavitaciju, dok iznad 2,5 MHz nema kavitacije. Osim o frekvenciji i intenzitetu ultrazvuka, pojava kavitacije ovisi o svojstvima poput viskoznosti medija, gustoći, površinskoj napetosti medija i dr., dok je temperatura obrnuto proporcionalna početku kavitacije. Kavitacije uzrokuju bubrenje stanica i probijanje staničnih stijenki biljnog materijala, što omogućuje bržu difuziju kroz staničnu stijenku te jednostavniju ekstrakciju sastojaka stanice (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Dalla Nora i Borges, 2017).

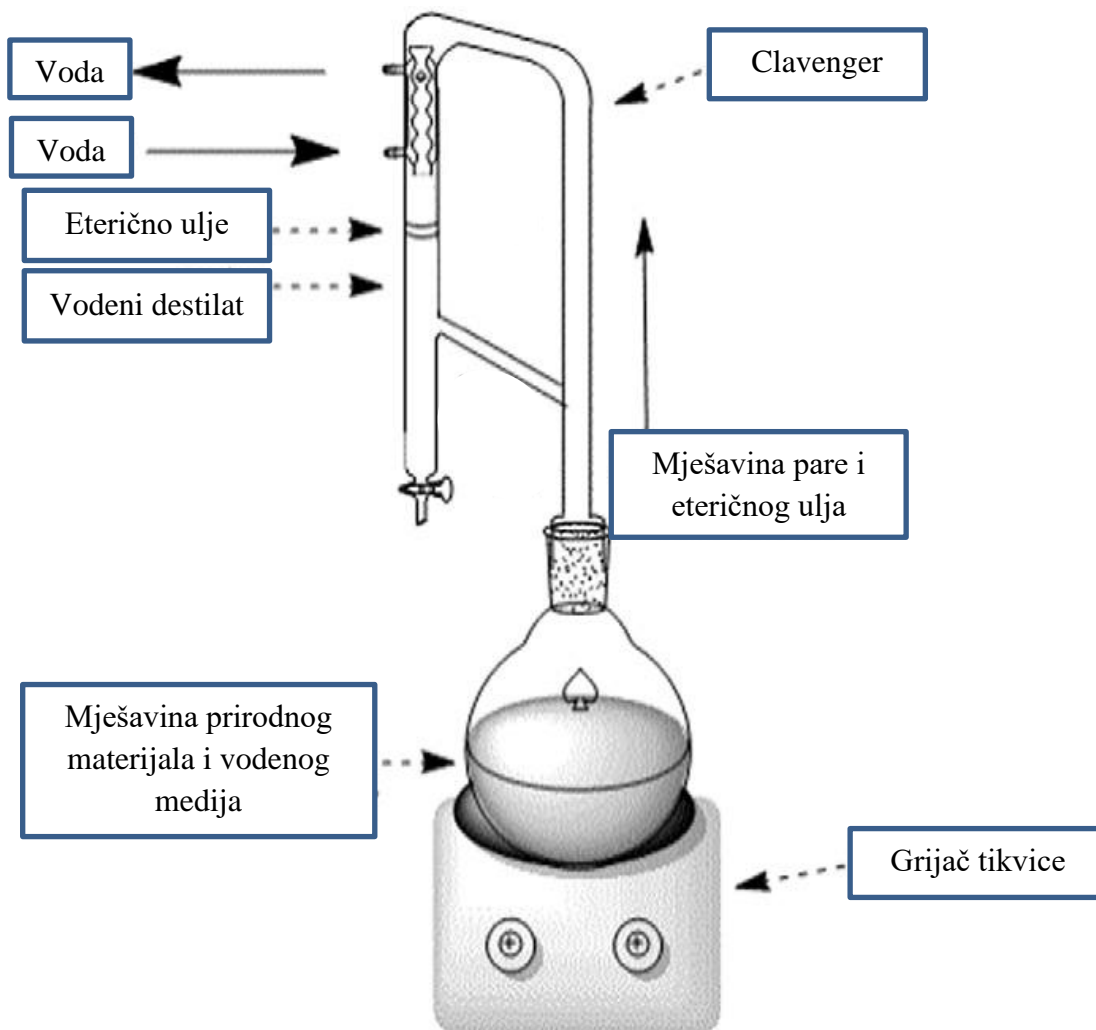




**Slika 6.** Stvaranje, rast i implozija kavitacijskih mjehurića u tekućem mediju (Dalla Nora i Borges, 2017)

## 2.8. CLAVENGER VODENA DESTILACIJA

Vodena destilacija u aparaturi po Clavengeru je klasična metoda za izdvajanje eteričnog ulja iz biljnog materijala (Slika 7.). Aparatura se sastoji od tri osnovna dijela: okrugle tikvice s okruglim dnom, kondenzatora i separatora. Mješavina vodenog medija i prirodnog materijala iz kojeg se želi izdvojiti eterično ulje nalazi se u okrugloj tikvici s okruglim dnom koja se zagrijava pomoću grijača tikvice do temperature vrenja. Nakon postizanja željene temperature destilacija traje 2 – 2,5 sata. Za to vrijeme dolazi do isparavanja vodenog medija i eteričnog ulja koji se kondenziraju u kondenzatoru te razdvajaju u graduiranoj cijevi separatora (Clavenger, 1928; Samadi i sur., 2017).



**Slika 7.** Aparatura za Clavenger vodenu destilaciju (Samadi i sur., 2017)

## **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### **3.1. MATERIJAL**

U provedbi eksperimenata koristile su se dvije biljke: kadulja (*Salvia officinalis* L.) i lovor (*Laurus nobilis* L.). Osušeni listovi kadulje nabavljeni su od tvrtke Suban d.o.o. (Strmec Samoborski, Hrvatska), dok su listovi lovora ubrani na području Konavala (Hrvatska), osušeni i čuvani na suhom i tamnom mjestu u plastičnim vrećicama te usitnjeni prije provedbe analiza.

### **3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI**

#### **Kemikalije za pripremu citratnog pufera**

- limunska kiselina monohidrat (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- natrijev hidroksid (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)

#### **Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje**

- ksilanaza (Sigma-Aldrich, Søborg, Danska)
- ksiloza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- ksilan (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- 3,5-dinitrosalicilna kiselina (DNSA) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- kalijev natrijev tartarat tetrahidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

#### Priprema otopine K-Na-tartarata:

Odvaži se 20 g kalijevog natrijevog tartarata tetrahidrata u laboratorijsku čašu, doda 50 mL pročišćene vode i miješa na magnetskoj miješalici dok se kalijev natrijev tartarat ne otopi.

### 3.3. APARATURA I PRIBOR

- analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan)
- automatske pipete volumena 2 – 1000  $\mu$ L (KemoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- centrifuga (Z 216 MK, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- Clavenger aparatura
- električni mlinac (GT 1108, Tefal, Bratislava, Slovačka)
- Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL i 500 mL
- graduirane pipete volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL i 10 mL
- kapaljka
- kivete
- laboratorijska metalna žlica
- laboratorijska špatula
- laboratorijske boce volumena 500 mL
- laboratorijske čaše volumena 250 mL i 500 mL
- magnetska miješalica (MS-H-S, DLAB Scientific, Peking, Kina)
- menzura volumena 100 mL
- odmjerne tikvice volumena 25 mL, 50 mL i 100 mL
- pH-metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- plastične epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf)
- propipete
- spektrofotometar (Lambda 1, Perkin-Elmer, Waltham, SAD)
- staklene laboratorijske čaše volumena 250 mL i 500 mL
- stakleni lijevak
- stakleni štapići
- tehnička vaga (MK-500C, Chyo, Kyoto, Japan)
- termometar
- tresilica s grijačem (TS-100, Biosan, Riga, Latvija)
- ultrazvučna sonda (UP200Ht, Hielscher, Njemačka)
- vodena kupelj
- vorteks tresilica (VTX, Labo Moderne, Pariz, Francuska)

### 3.4. METODE RADA

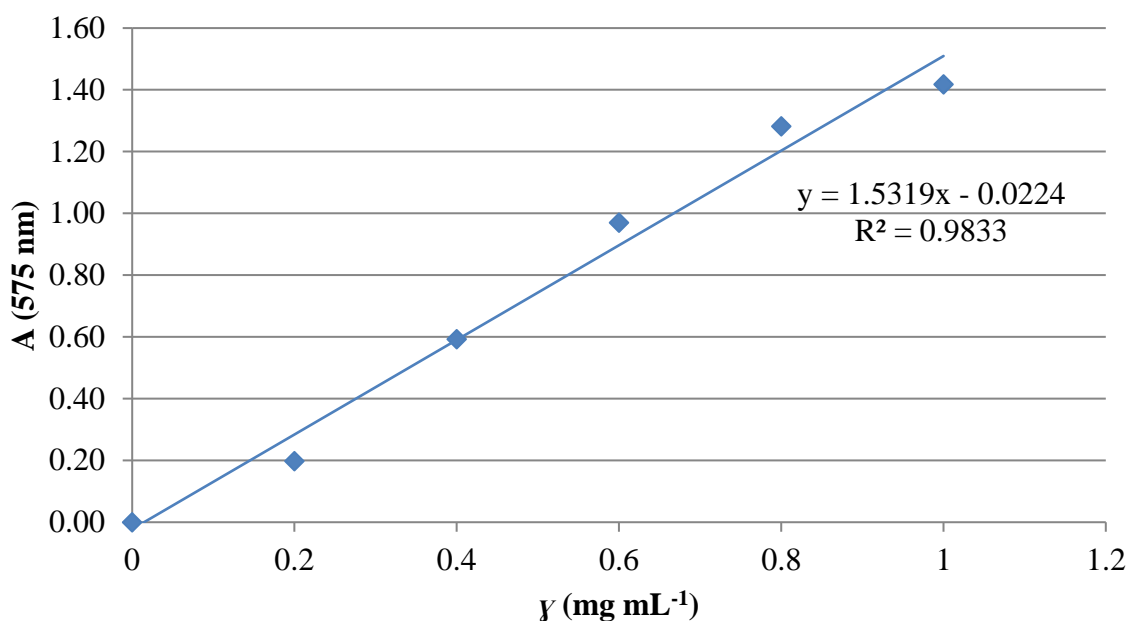
#### Izrada baždarnog pravca za ksilozu:

Za pripremu baždarnog pravca za ksilozu pripreme se standardne otopine ksiloze različitih koncentracija. Prvo se odvažuje 100 mg ksiloze koja se otopi u 80 mL pročišćene vode u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni pročišćenom vodom do oznake kako bi se dobila standardna otopina ksiloze masene koncentracije  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ . Potom se rade razrjeđenja tako da se u odmjerne tikvice od 25 mL otpipetiraju redom 20 mL, 15 mL, 10 mL i 5 mL alikvota standardne otopine ksiloze ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te tikvice nadopune pročišćenom vodom do oznake kako bi u konačnici koncentracije tih otopina iznosile  $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ . Zatim se iz svake odmjerne tikvice otpipetira  $600 \text{ }\mu\text{L}$  otopine standarda u epruvetu i doda  $600 \text{ }\mu\text{L}$  DNSA. Za izradu slijepe probe se umjesto standardne otopine uzima  $600 \text{ }\mu\text{L}$  pročišćene vode. Sadržaj epruveta se promiješa pomoću vorteksa i potom inkubira u tresilici s grijačem 15 minuta pri temperaturi od  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije, u epruvete se doda po  $200 \text{ }\mu\text{L}$  K-Na-tartarata te sadržaj hladi 5 minuta. Zatim se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od  $575 \text{ nm}$  (Tablica 5.).

**Tablica 5.** Korištene masene koncentracije standardnih otopina ksiloze i njihove izmjerene vrijednosti apsorbancije pri valnoj duljini od  $575 \text{ nm}$

Masena koncentracija ksiloze ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Apsorbancija ( $575 \text{ nm}$ )
0,0	0,000
0,2	0,198
0,4	0,593
0,6	0,970
0,8	1,283
1,0	1,419

Baždarni pravac ovisnosti izmjerenih vrijednosti apsorbancija pri  $575 \text{ nm}$  o masenoj koncentraciji ksiloze ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) nacrtan se pomoću programa Microsoft Excel (Slika 8.).



**Slika 8.** Baždarni pravac ksiloze

Priprema otopine enzima:

U čistu laboratorijsku čašu volumena 250 mL izvaže se 100 mg enzima ksilanaze i otopi u 100 mL pročišćene vode kako bi se dobila otopina enzima masene koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup>. Zatim su se razrjeđivanjem pripremljene otopine enzima masene koncentracije 1 mg mL<sup>-1</sup> pripremale otopine enzima manjih masenih koncentracija: 0,20 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup> i 0,02 mg mL<sup>-1</sup>.

Postupak određivanja enzimске aktivnosti:

Enzimska aktivnost ksilanaze određivala se prema protokolu za određivanje celulazne i hemicelulazne aktivnosti enzima pomoću 3,5-dinitrosalicilne kiseline (DNSA) (Kracher i sur., 2014). Prema tom postupku, prvo se u plastičnoj epruveti volumena 1,5 mL (Eppendorf) pomiješa 5-10 mg supstrata (ksilan) i 1000 µL otopine enzima ksilanaze. Potom se sadržaj epruvete vorteksira i epruvete se inkubiraju u tresilici s grijačem. Inkubacija traje 1 sat (kod ispitivanja optimalnog vremena trajanja reakcije i više (vidi Potpoglavlje 3.4.1.3.)) i provodi se na temperaturi od 40 °C. Nakon inkubacije, uzorci se centrifugiraju (10000 rpm, 5 minuta). Nakon centrifugiranja, u nove plastične epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf) izdvoji se

600  $\mu\text{L}$  supernatanta i doda 600  $\mu\text{L}$  DNSA. Epruvete se ponovo inkubiraju, no ovoga puta inkubacija traje 15 minuta i provodi se na temperaturi od 95  $^{\circ}\text{C}$ . Nakon druge inkubacije, u epruvete se doda po 200  $\mu\text{L}$  K-Na-tartarata, sadržaj epruveta se vorteksira i zatim se epruvete hlade 5 minuta u hladnjaku. Nakon hlađenja, uzorcima se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 575 nm.

#### Izračun enzimske aktivnosti:

Od vrijednosti apsorbancija izmjerenih pri valnoj duljini od 575 nm oduzme se izmjerena vrijednost apsorbancije slijepe probe. Dobivena razlika uvrsti se u formulu baždarnog pravca ksiloze (Slika 8.) te se dobivena vrijednost pomnoži s faktorom konverzije za ksilozu koji iznosi 6,6609  $\mu\text{mol}$ . Nakon izračuna oslobođene količine šećera, enzimska aktivnost ksilanaze izračuna se prema sljedećoj formuli:

$$\text{Enzimska aktivnost } (U \text{ mL}^{-1}) = \frac{\text{Oslobođeni šećer } [\mu\text{mol}]}{\text{Vrijeme inkubacije } [\text{min}] \times 1 \text{ mL}} \times \text{faktor razrjeđenja}$$

#### 3.4.1. Određivanje optimalnih uvjeta za enzimsku aktivnost ksilanaze

U svrhu dobivanja maksimalnog udjela eteričnog ulja i optimizacije postupka ekstrakcije uz predtretman enzimima određivali su se optimalni uvjeti za enzimsku aktivnost enzima ksilanaze. Ksilanaze su proizvodi različitih vrsta plijesni iz rodova *Aspergillus* i *Trichoderma*. S obzirom na to da se dobivaju iz različitih izvora, imaju optimalnu aktivnost pri različitim vrijednostima temperature, pH-vrijednosti i dr. (Butt i sur., 2008), stoga se u ovom radu određivala optimalna vrsta otapala, koncentracija enzima i vrijeme provođenja enzimske reakcije, odnosno predtretmana ksilanazama dobivenima iz plijesni *Aspergillus oryzae*.

##### 3.4.1.1. Određivanje optimalnog otapala za enzimsku aktivnost

Za određivanje optimalnog otapala za provođenje enzimske reakcije ispitivala se enzimska aktivnost ksilanaze u prisutnosti tri različita otapala – pročišćenoj vodi, puferu 1 (pH = 5,5) i puferu 2 (pH = 6,5).

### Postupak pripreme pufera:

U čistu laboratorijsku čašu volumena 500 mL odvaži se 4,80 g limunske kiseline, zatim doda 400 mL pročišćene vode te miješa na magnetskoj miješalici. Sonda pH-metra uroni se u otopinu te uz postupno dodavanje 2M otopine NaOH podešava pH-vrijednost otopine do 5,5 (pufer 1), odnosno 6,5 (pufer 2). Pripremljeni pufer prebaci se u bocu volumena 500 mL i nadopuni pročišćenom vodom do oznake te čuva na hladnom i tamnom mjestu.

#### *3.4.1.2. Određivanje optimalne koncentracije enzima*

Nakon određivanja optimalnog otapala u kojem će se provoditi predtretman biljnog materijala enzimom, potrebno je odrediti optimalnu koncentraciju enzima ksilanaze. Enzimsku aktivnost se ispitala pri koncentracijama enzima od 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, 0,05 mg mL<sup>-1</sup>, 0,10 mg mL<sup>-1</sup> i 0,20 mg mL<sup>-1</sup>.

#### *3.4.1.3. Određivanje optimalnog vremena trajanja enzimske reakcije*

Zadnji parametar koji se određivao je vrijeme trajanja enzimske reakcije kako bi se odredilo optimalno vrijeme trajanja predtretmana biljaka i istovremeno smanjili energetske troškove. Ispitivao se utjecaj različitih vremena inkubacije tijekom 24 sata (0, 1, 2, 4, 6, 8, 16 i 24 sata) na enzimsku aktivnost ksilanaze.

### 3.4.2. Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala

Za izolaciju eteričnih ulja korišteni su usitnjeni listovi kadulje i lovora. Vodena destilacija usitnjenih biljnih materijala provodila se metodom po Clavengeru, bez predtretmana i nakon provedenih predtretmana odnosno različitih metoda ekstrakcije. Tretmani biljnih materijala (kadulje i lovora) koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clavengeru su:

- a) ekstrakcija potpomognuta enzimom (ksilanaza);



b) ultrazvučna ekstrakcija (snaga ultrazvuka 50 W, 10 minuta) uz dodatak enzima (ksilanaza).

Nakon provedenih predtretmana, uzorci su podvrgnuti vodenoj destilaciji u aparaturi po Clavengeru u svrhu izdvajanja eteričnog ulja.

#### *3.4.2.1. Ekstrakcija potpomognuta enzimima*

Ekstrakcija potpomognuta enzimima (ksilanaza) provodila se u puferu 2 (pH = 6,5) kao predtretman vodenoj destilaciji po Clavengeru. U Erlenmeyerovu tikvicu odvaži se 20 g usitnjenog biljnog materijala (kadulje ili lovora) i 50 mg enzima te doda 250 mL pufera 2. Sadržaj tikvice se promiješa i potom se provodi predtretman enzimima na vodenoj kupelji (Slika 9.). Predtretman se provodio pri temperaturi od 40 °C i u trajanju od 4 sata. Nakon predtretmana, sadržaj Erlenmeyerove tikvice se kvantitativno prenese u okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL i potom započne s vodenom destilacijom u aparaturi po Clavengeru radi izdvajanja eteričnog ulja.



**Slika 9.** Predtretman enzimom ksilanazom na vodenoj kupelji (vlastita fotografija)

### 3.4.2.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodila se primjenom ultrazvučne sonde snage 50 W u trajanju od 10 minuta. U laboratorijsku čašu od 250 mL odvažuje se 20 g usitnjenog biljnog materijala (kadulje ili lovora) i doda 250 mL pufera 2. Sadržaj čaše se dobro promiješa pomoću staklenog štapića nakon čega se u nju uroni ultrazvučna sonda (Slika 10.).



**Slika 10.** Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (vlastita fotografija)

Nakon tretiranja materijala ultrazvukom, u čašu je dodano 50 mg enzima, a sadržaj čaše promiješan i zatim kvantitativno prebačen u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL. Zatim je uslijedio tretman enzimom na vodenoj kupelji koji se provodio pri temperaturi od 40 °C i u trajanju od 4 sata. Nakon provedene ekstrakcije, sadržaj Erlenmeyerove tikvice je prebačen u okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL radi provedbe vodene destilacije u aparaturi po Clavengeru i izdvajanja eteričnog ulja.

### 3.4.2.3. Clavenger vodena destilacija

U okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL odvaže se 20 g usitnjenog biljnog materijala i doda 250 mL pufera 2 (pH = 6,5). Sadržaj tikvice se zagrijava u aparaturi po Clavengeru dok on ne provrije, nakon čega destilacija traje sljedeća 2,5 sata, uz održavanje stalne temperature (Slika 11.). Nakon završetka vodene destilacije, sadržaj tikvice se hladi 30 minuta i potom se izdvaja eterično ulje.



**Slika 11.** Vodena destilacija u aparaturi po Clavengeru (vlastita fotografija)

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivao se utjecaj predtretmana, odnosno njegov izostanak na udio eteričnog ulja dobivenog iz samoniklog bilja (kadulje i lovora) primjenom vodene destilacije po Clavengeru. Tretmani koji su prethodili vodenoj destilaciji uključivali su primjenu ekstrakcije potpomognute enzimima i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom uz dodatak enzima. Prvo su se određivali optimalni uvjeti za enzimsku aktivnost ksilanaze dobivene iz plijesni *Aspergillus oryzae*. Nakon određivanja optimalnog otapala, koncentracije enzima i vremena provođenja enzimske reakcije, pristupilo se izolaciji eteričnog ulja kadulje i lovora. Nakon provedenih predtretmana i vodene destilacije u aparaturi po Clavengeru, analizirao se udio eteričnog ulja te utjecaj predtretmana i vrste osušenog i usitnjenog biljnog materijala na količinu izdvojenog eteričnog ulja.

## 4.1. ODREĐIVANJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI KSILANAZE

Kako bi se odredili optimalni uvjeti procesa ekstrakcije, ispitivao se utjecaj otapala i njegove pH-vrijednosti, koncentracije enzima ksilanaze te vremena odvijanja enzimske reakcije na djelotvornost enzimski potpomognute ekstrakcije ksilanazom i povećanje udjela eteričnog ulja te biološki aktivnih spojeva. Enzimske reakcije provodile su se pri 40 °C, budući da se pokazalo da je enzim ksilanaza dobiven iz vrste *Aspergillus oryzae* termostabilan u rasponu temperature 37 – 50 °C, odnosno ima optimalnu aktivnost pri mezofilnim temperaturama (Tuyen i sur., 2016; Walia i sur., 2017). Aktivnost enzima ksilanaze određena je spektrofotometrijski, pri valnoj duljini od 575 nm. Napravljena su dva mjerenja za svaki uzorak, a rezultati prikazani kao njihova srednja vrijednost  $\pm$  SD te su izračunate enzimske aktivnosti ( $U\ mL^{-1}$ ).

### 4.1.1. Određivanje optimalnog otapala za enzimsku aktivnost

Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na aktivnost enzima ksilanaze je pH-vrijednost, budući da ona značajno utječe na trodimenzionalnu strukturu enzima te ako nije optimalna može uzrokovati njegovu denaturaciju i inaktivaciju. S obzirom na to da je u rasponu pH-vrijednosti od 4,5 do 6,5 zabilježena najveća enzimsko aktivnost ksilanaze dobivene iz *Aspergillus* vrsta (He i sur., 2015; Ling Ho, 2017), u ovom radu se ispitala enzimsko aktivnost enzima u tri medija s različitim pH-vrijednostima unutar navedenog raspona. Prilikom određivanja optimalnog otapala za provođenje enzimske reakcije ispitala se enzimsko aktivnost ksilanaze u prisutnosti tri različita otapala: pročišćenoj vodi, puferu 1 (pH = 5,5) i puferu 2 (pH = 6,5). Iz Tablice 6. vidljivo je da je korištenjem pufera 2 (pH = 6,5) dobivena najveća enzimsko aktivnost, dok je najmanja enzimsko aktivnost zabilježena u pročišćenoj vodi. Budući da ksilanaze fungalnog podrijetla pokazuju optimalnu aktivnost u blago kiselom mediju (Walia i sur., 2017), dobiveni rezultati podudaraju se s rezultatima autora navedenih u ovom potpoglavlju, stoga se u daljnjim eksperimentima s enzimom ksilanazom u ovom radu kao otapalo koristio isključivo pufer 2.

**Tablica 6.** Enzimaska aktivnost ksilanaze ( $c = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u različitim medijima

Medij	Prosječna enzimaska aktivnost ( $\text{U mL}^{-1}$ ) $\pm$ SD
Pročišćena voda	$0,01065 \pm 0,00102$
Pufer 1 (pH = 5,5)	$0,02044 \pm 0,00154$
<b>Pufer 2 (pH = 6,5)</b>	<b><math>0,04073 \pm 0,00205</math></b>

#### 4.1.2. Određivanje optimalne koncentracije enzima

Nakon određivanja optimalnog otapala u kojem će se provoditi predtretman biljnog materijala enzimom, potrebno je bilo odrediti optimalnu koncentraciju enzima ksilanaze u rasponu od  $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$  do  $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ . Iz rezultata prikazanih u Tablici 7. vidljivo je da je najveća enzimaska aktivnost dobivena pri najvećoj ispitivanoj masenoj koncentraciji enzima koja je iznosila  $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ , odnosno da je enzimaska aktivnost rasla s povećanjem masene koncentracije enzima. U sklopu ovog rada nisu se ispitivale koncentracije enzima veće od  $0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ , budući da količina upotrebljenog enzima značajno utječe na ekonomske troškove procesa dobivanja željenog proizvoda, u ovom slučaju eteričnog ulja. Nadalje, s obzirom na to da još nije razvijen novi postupak proizvodnje ovog enzima koji bi bio ekonomski isplativiji od onoga koji se trenutno koristi te rezultirao komercijalno dostupnijim ksilanazama (Walia i sur., 2017), upotreba većih koncentracija enzima dovela bi u pitanje isplativost procesa izolacije eteričnog ulja koji uključuju predtretmane potpomognute enzimima.

**Tablica 7.** Enzimaska aktivnost ksilanaze u puferu 2 pri različitim masenim koncentracijama enzima

Masena koncentracija enzima ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	Prosječna enzimaska aktivnost ( $\text{U mL}^{-1}$ ) $\pm$ SD
0,02	$0,00444 \pm 0,00021$
0,05	$0,04073 \pm 0,00205$
0,10	$0,08207 \pm 0,00128$
<b>0,20</b>	<b><math>0,09367 \pm 0,00512</math></b>

#### 4.1.3. Određivanje optimalnog vremena trajanja enzimske reakcije

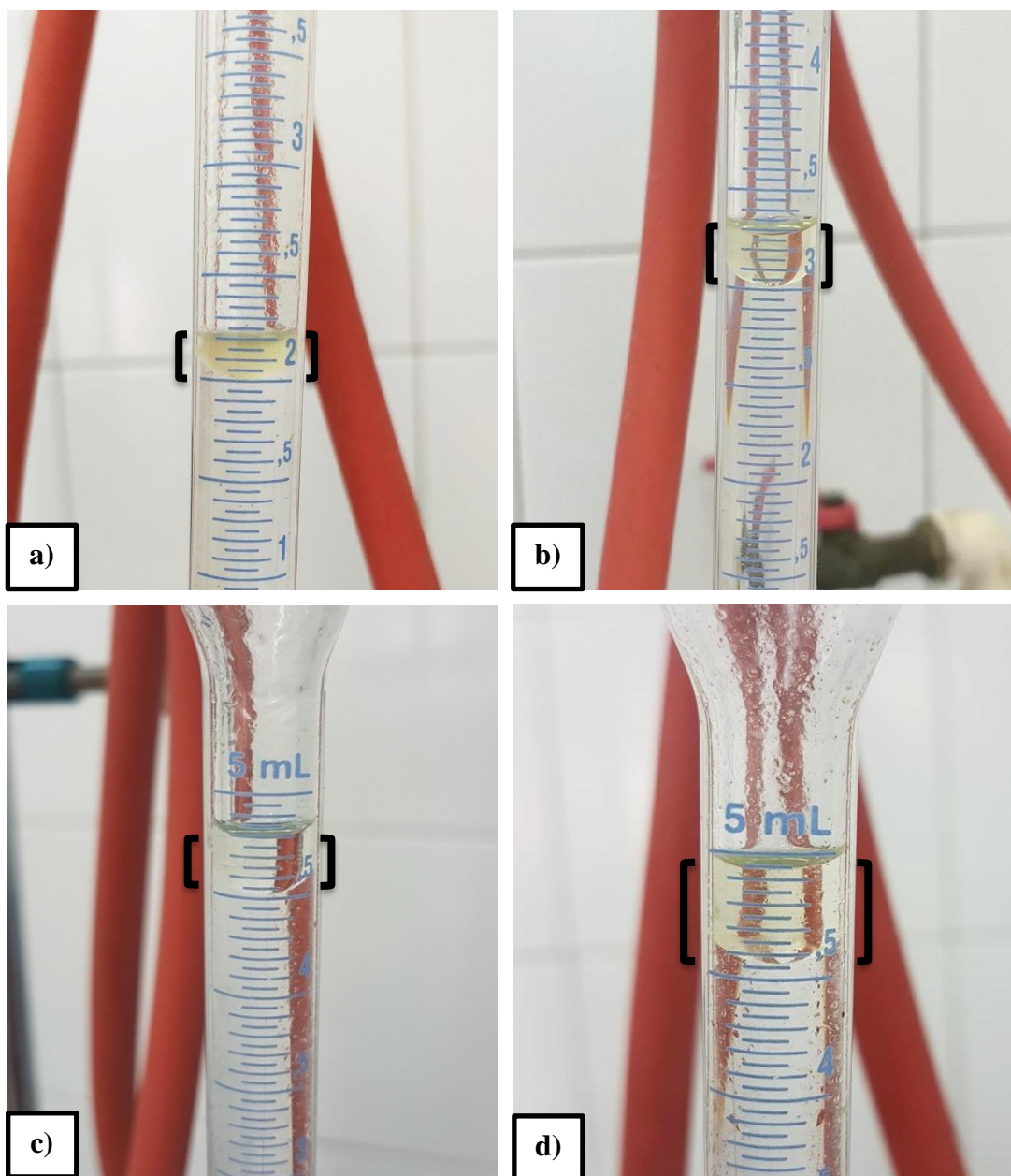
Zadnji parametar koji se određivao je vrijeme trajanja enzimske reakcije kako bi se odredilo optimalno vrijeme trajanja predtretmana biljaka i istovremeno smanjili ekonomski i energetske troškovi. Ispitivala su se različita vremena inkubacije tijekom 24 sata, pri čemu je najveća enzimsko aktivnost dobivena nakon 4 sata inkubacije (Tablica 8.). Ovaj rezultat ukazuje na to da je najveći utjecaj enzima na biljni materijal zabilježen nakon provođenja enzimske reakcije u trajanju od 4 sata te će se u sklopu ovog rada kod ekstrakcija potpomognutim enzimima, odnosno ekstrakcija potpomognutim ultrazvukom uz dodatak enzima, predtretmani enzimima provoditi u trajanju od 4 sata.

**Tablica 8.** Enzimsko aktivnost ksilanaze ( $\gamma = 0,20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u puferu 2 pri različitim vremenima inkubacije

Vrijeme inkubacije (h)	Enzimsko aktivnost ( $\text{U mL}^{-1}$ ) $\pm$ SD
0	0,00000 $\pm$ 0,00000
1	0,13914 $\pm$ 0,00512
2	0,11577 $\pm$ 0,00384
<b>4</b>	<b>0,26415 <math>\pm</math> 0,00769</b>
6	0,09711 $\pm$ 0,00341
16	0,03614 $\pm$ 0,00576
24	0,08221 $\pm$ 0,00480

## 4.2. IZOLACIJA ETERIČNOG ULJA

Izolacija eteričnog ulja provodila se postupkom vodene destilacije u aparaturi po Clavengeru. Kadulja i listovi lovora koji su se koristili za dobivanje eteričnih ulja bili su prethodno osušeni i usitnjeni te skladišteni na tamnom mjestu, budući da se pokazalo da svjetlost i vlaga značajno utječu na udio eteričnog ulja (Manhães i sur., 2012). Nakon provedene destilacije, očitani su volumeni izdvojenog eteričnog ulja (Slika 12.).



**Slika 12.** Prikaz izdvojenog eteričnog ulja nakon vodene destilacije po Clavengeru (bez predtretmana (**a** i **c**) i nakon predtretmana enzimima (**b** i **d**)). Crnim uglatim zagradama su pod **a** i **b**) označene izdvojene količine eteričnog ulja kadulje (vlastite fotografije), a pod **c**) i **d**) lovora (foto: Anđela Miljanović)

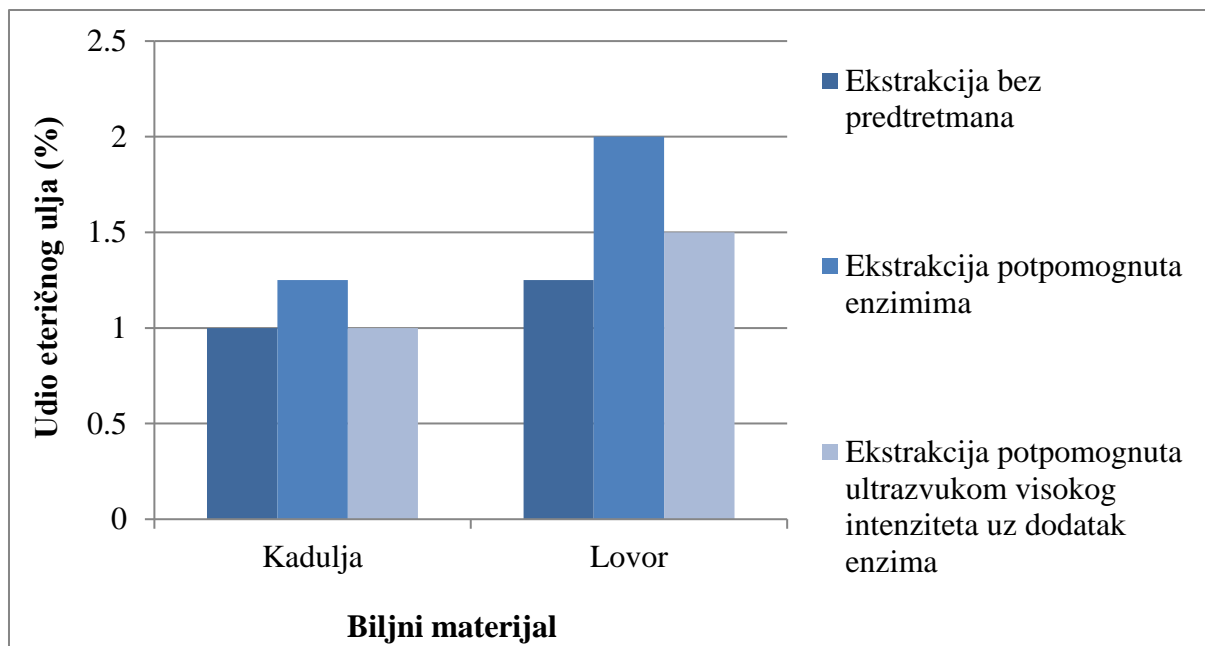


Kod kadulje se izmjereni volumen eteričnog ulja kretao u rasponu od 0,20 do 0,25 mililitara na 20,000 grama osušene i usitnjene biljke. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da u usporedbi s lovrom nije zamijećen značajan porast u volumenu dobivenog eteričnog ulja kadulje primjenom predtretmana enzimima ili predtretmana ultrazvukom i enzimima u usporedbi s udjelom ulja dobivenim nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru bez predtretmana. Kod lovora je zabilježen veći udio eteričnog ulja, gdje su se izmjereni volumeni eteričnog ulja kretali u rasponu od 0,25 do 0,40 mililitara na 20,000 grama biljnog materijala (Tablica 9.).

**Tablica 9.** Utjecaj predtretmana na dobivenu količinu eteričnog ulja

Metoda ekstrakcije	Volumen eteričnog ulja (mL)	
	Kadulja	Lovor
Ekstrakcija bez predtretmana	0,20	0,25
Ekstrakcija potpomognuta enzimima	0,25	0,40
Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom visokog intenziteta uz dodatak enzima	0,20	0,30

Na temelju volumena eteričnih ulja (mL) prikazanih u Tablici 9., izračunat je udio eteričnog ulja u 100 g osušenog i usitnjenog biljnog materijala, a rezultati grafički prikazani na Slici 13. Kod eteričnog ulja kadulje je primjenom predtretmana enzimima dobiven 25 % veći udio u usporedbi s udjelima dobivenima nakon ekstrakcije bez predtretmana, odnosno ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima. Kod eteričnog ulja lovora je najveće povećanje udjela zabilježeno također nakon predtretmana enzimima. Udio je bio 60 % veći u usporedbi s udjelom eteričnog ulja dobivenim bez prethodno tretiranih listova lovora. Za razliku od kadulje, u slučaju eteričnog ulja lovora zamijećeno je povećanje udjela od 20 % nakon ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima u usporedbi s udjelom dobivenim nakon ekstrakcije bez predtretmana.



**Slika 13.** Razlike u udjelu eteričnog ulja kadulje i lovora izraženog u postotcima ovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije

Postoji više mogućih uzroka razlika u udjelima eteričnih ulja. Naime, biosinteza eteričnih ulja uvjetovana je različitim okolišnim čimbenicima koji značajno utječu na udio eteričnih ulja. Neki od tih čimbenika su intenzitet svjetlosti, klimatski uvjeti i dostupnost hranjivih tvari u tlu (Ben Taarit i sur., 2009). Nadalje, Lakušić i sur. (2013) su u svom radu naveli da razlike u udjelima i kvaliteti eteričnih ulja ovise o različitim čimbenicima kao što su razlike prisutne između biljnih vrsta, zatim korištenje različitih dijelova biljaka, stadij razvoja u kojem je ubrana, kao i mogućnost uzgoja biljaka na različitim lokacijama pri čemu dolazi do promjena u kemijskom sastavu biljaka uslijed njihove prilagodbe na različite okolišne uvjete. Primjerice, Bolarić i sur. (2019) su u svom radu analizirali udio eteričnih ulja lovora s različitih lokacija u Hrvatskoj i najveći udio je zabilježen kod listova lovora s područja Konavala koji su i korišteni u ovom radu. S druge strane, Raal i sur. (2007) su u svom radu usporedili udjele eteričnih ulja kadulje iz različitih europskih zemalja te se pokazalo da se oni razlikuju od države do države.

Udjeli eteričnog ulja kadulje dobivenog nakon vodene destilacije po Clavengeru kojoj nisu prethodili tretmani bilja enzimima ili ultrazvukom i enzimima podudaraju se s rezultatima Couladis i sur. (2002) te Arraiza i sur. (2012) kod kojih se udio eteričnog ulja kadulje kretao oko 1 %. Nasuprot tome, udjeli eteričnog ulja lovora dobivenog nakon vodene destilacije po Clavengeru bez predtretmana bili su nešto niži (1,25 %) u usporedbi s eteričnim

uljem lovora dobivenim primjenom istih metoda u radu Taban i sur. (2018). Razlike u udjelima mogu biti rezultat drugačijih okolišnih uvjeta, budući da su listovi lovora korišteni u radu njihovom radu ubrani na području Irana.

Kod obje je biljke najveći volumen, odnosno udio eteričnog ulja zabilježen nakon vodene destilacije po Clavengeru kojoj je prethodio tretman enzimima, tj. ekstrakcija potpomognuta enzimima. No, u slučaju lovora je zabilježen porast udjela ulja u usporedbi s kaduljom. Osim toga, vodena destilacija po Clavengeru kojoj je prethodila ekstrakcija potpomognuta enzimima rezultirala je većim udjelom eteričnog ulja lovora od onog dobivenog u radu Boulila i sur. (2015), što bi se opet moglo pripisati drugačijoj lokaciji uzgoja biljaka (Tunis) i okolišnim uvjetima.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima u slučaju eteričnog ulja kadulje nije pridonijela povećanju njegovog udjela, dok je kod eteričnog ulja lovora zabilježen veći volumen u usporedbi s ekstrakcijom bez predtretmana. No, u oba slučaja rezultati nisu u skladu s očekivanjima jer se očekivalo da će se primjenom dvije vrste predtretmana (prvo ultrazvuka, pa zatim i enzima) dobiti veći udjeli eteričnih ulja u usporedbi s korištenjem samo jedne vrste predtretmana ili bez provođenja predtretmana. Budući da učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ovisi o primijenjenoj frekvenciji, intenzitetu, temperaturi i vremenu trajanja tretmana te vrsti i volumenu korištenog otapala, kao i karakteristikama uzorka (udio vlage i veličina čestica), bitno je ovu vrstu ekstrakcije provoditi pri optimiziranim uvjetima (Xu i sur., 2017). Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja u svrhu optimiziranja parametara pri kojima će se provoditi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima, a koja će u konačnici rezultirati većim udjelima eteričnih ulja.

U konačnici, manji udio eteričnih ulja kadulje u usporedbi s udjelom eteričnih ulja lovora je očekivan s obzirom na to da se radi o biljkama iz različitih porodica. Sličan trend zamijećen je i u radu Loizzo i sur. (2007) gdje je udio eteričnog ulja kadulje bio manji u usporedbi s udjelom eteričnog ulja lovora nakon primjene istih metoda ekstrakcije, tj. nakon provedene vodene destilacije u aparaturi po Clavengeru.

Osim na udio eteričnog ulja, različite metode ekstrakcije imaju utjecaj i na udio pojedinih komponenti eteričnih ulja. Osim komponenata koje su topljive u vodenom mediju, u biljkama su prisutne i biološki aktivne komponente koje su vezane za staničnu stijenku čime

je dodatno otežana njihova ekstrakcija primjenom klasičnih metoda. Jedna od mogućih alternativa konvencionalnim metodama ekstrakcije uz upotrebu otapala jest ekstrakcija potpomognuta enzimima (Nadar i sur., 2018). Pokazalo se da primjena enzima za izdvajanje biološki aktivnih spojeva ne utječe na kvalitetu komponenata eteričnog ulja, već rezultira većim varijacijama u udjelima najzastupljenijih biološki aktivnih spojeva u ulju, osobito oksigeniranih monoterpena poput 1,8-cineola, kamfora, terpinen-4-ola i dr., čime su poboljšana antioksidacijska svojstva eteričnih ulja (Hosni i sur., 2013; Boulila i sur., 2015). Nadalje, Cheng i sur. (2015) ispitivali su učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima na udio izdvojenih biološki aktivnih spojeva iz biljnog materijala, budući da ultrazvučni valovi mogu poboljšati učinkovitost enzima. Pokazalo se da primjena ultrazvuka i enzima zajedno rezultira većim udjelima proteina ekstrahiranim iz listova masline te izoflavona iz soje u usporedbi s klasičnim metodama ekstrakcije, što ukazuje na potencijal primjene ove metode za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz listova lovora i kadulje.

Rezultati prikazani u ovom radu su obećavajući imajući u vidu trend porasta potražnje za primjenom ekološki prihvatljivih metoda ekstrakcije eteričnih ulja i biološki aktivnih spojeva iz biljaka, među njima i ekstrakcije potpomognute enzimima. Osim toga, rezultati ukazuju na mogućnost industrijske primjene enzima za ekstrakciju eteričnih ulja, osobito lovora, budući da se enzimi poput pektinaza, celulaza i hemicelulaza (pod koje se ubraja i enzim ksilanaza korišten u ovom radu) već koriste u prehrambenoj industriji u proizvodnji piva i voćnih sokova (Puri i sur., 2012). No, potrebno je ispitati ekonomsku isplativost njihove primjene u ekstrakciji većih količina eteričnih ulja. Nadalje, potrebna su daljnja istraživanja metoda ekstrakcije i optimalnih uvjeta u kojima bi se biljke trebale uzgajati kako bi se dobila ujednačena kvaliteta sirovine, tj. biljnog materijala iz kojeg se želi izdvojiti eterično ulje.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1. Udjeli eteričnog ulja kadulje su kod svih primijenjenih metoda u ovom radu bili manji (1,00 – 1,25 %) u usporedbi s udjelima eteričnog ulja lovora (1,25 – 2,00 %).
2. Primjena ekstrakcije potpomognute enzimima (ksilanazama) je kod obje biljke rezultirala najvećim porastom udjela eteričnog ulja. Kod eteričnog ulja kadulje zabilježeno je povećanje udjela od 25 %, a kod eteričnog ulja lovora povećanje udjela od 60 % u usporedbi s udjelima eteričnih ulja dobivenima iz prethodno netretiranog biljnog materijala.
3. Primjena ekstrakcije potpomognute ultrazvukom uz dodatak enzima nije značajnije utjecala na povećanje udjela eteričnog ulja u usporedbi s udjelom eteričnog ulja dobivenog nakon provedene vodene destilacije po Clavengeru bez predtretmana. Stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja i dodatno optimizirati parametre pri kojima će se provoditi ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima.
4. Rezultati prikazani u ovom radu su obećavajući s obzirom na rastući trend potražnje za primjenom ekološki prihvatljivih metoda ekstrakcije eteričnih ulja i bioaktivnih spojeva iz biljaka te sve veću potražnju za eteričnim uljima.

## 6. LITERATURA

Abu-Darwish, M. S., Cabral, C., Ferreira, I. V., Gonçalves, M. J., Cavaleiro, C., Cruz, M. T., Al-bdour, T. H., Salgueiro, L. (2013) Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. *Biomed. Res. Int.* (objavljeno online 9. listopada 2013.). doi: 10.1155/2013/538940.

Allaf, T., Tomao, V., Ruiz, K., Chemat, F. (2013) Instant controlled pressure drop technology and ultrasound assisted extraction for sequential extraction of essential oil and antioxidants. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 239-246.

Amudan, R., Kamat, D. V., Kamat, S. D. (2011) Enzyme-assisted extraction of essential oils from *Syzygium aromaticum*. *South Asian J. Exp. Biol.* **1**, 248-254.

Arraiza, M. P., Arrabal, C., López, J. V. (2012) Seasonal Variation of Essential Oil Yield and Composition of Sage (*Salvia officinalis* L.) Grown in Castilla - La Mancha (Central Spain). *Not. Bot. Horti. Agrobi.* **40**, 106-108.

Atanasova, D., Leather, S. R. (2018) Plant essential oils: the way forward for aphid control? *Ann. Appl. Biol.* **173**, 175-179.

Aziz, Z. A. A., Ahmad, A., Setapar, S. H. H., Karakucuk, A., Azim, M. M., Lokhat, D., Rafatullah, M., Ganash, M., Kamal, M. A., Ashraf, G. M. (2018) Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential – A Review. *Curr. Drug Metab.* **19**, 1100-1110.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., Omar, A. K. M. (2013) Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J. Food Eng.* **117**, 426-436.

Bandoniene, D., Venskutonis, R., Gruzdienė, D., Murkovic, M. (2002) Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **104**, 286-292.

- Basak, S. S., Candan, F. (2013) Effect of *Laurus nobilis* L. Essential Oil and its Main Components on  $\alpha$ -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity. *Iran. J. Pharm. Res.* **12**, 367-379.
- Ben Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K., Hammami, M., Kchouk, M. E., Marzouk, B. (2009) Plant growth, essential oil yield and composition of sage (*Salvia officinalis* L.) fruits cultivated under salt stress conditions. *Ind. Crops Prod.* **30**, 333-337.
- Bich, H. T., Huong, L. M., Chien, N. Q., Thuy, D. T. T., Thanh, L. T., Sy, D. T., Hang, L. T. T., Hai, P. H. (2017) Optimization of the enzyme assisted extraction of essential oil from the leaves and branches of *Cinnamomum cassia* using Box-Wilson method. *Vietnam J. Sci. Technol.* **55**, 690-697.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3**, 32-47.
- Bolarić, S., Dunkić, V., Bezić, N., Kremer, D., Karlović, K., Tuković, A., Jelak, L., Srećec, S. (2019) Influence of Geographic Position, Leaf Surface and Genetic Variability on Content of Total Essential Oils in 12 Distinct Populations of Bay Laurel (*Laurus nobilis* L.). *Agric. Conspec. Sci.* **84**, 83-89.
- Boulila, A., Hassen, I., Haouari, L., Mejri, F., Amor, I. B., Casabianca, H., Hosni, K. (2015) Enzyme-assisted extraction of bioactive compounds from bay leaves (*Laurus nobilis* L.). *Ind. Crops Prod.* **74**, 485-493.
- Bousbia, N., Vian, M. A., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355-362.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. (2007) Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 7879-7885.
- Butt, M. S., Tahir-Nadeem, M., Ahmad, Z., Sultan, M. T. (2008) Xylanases and Their Applications in Baking Industry. *Food Technol. Biotechnol.* **46**, 22-31.

- Calinescu, I., Gavrilă, A. I., Ivopol, M., Ivopol, G. C., Popescu, M., Mircioaga, N. (2014) Microwave assisted extraction of essential oils from enzymatically pretreated lavender (*Lavandula angustifolia* Miller). *Cent. Eur. J. Chem.* **12**, 829-836.
- Campana, R., Casettari, L., Fagioli, L., Cespi, M., Bonacucina, G., Baffone, W. (2017) Activity of essential oil-based microemulsions against *Staphylococcus aureus* biofilms developed on stainless steel surface in different culture media and growth conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **241**, 132-140.
- Chandran, J., Amma, K. P. P., Menon, N., Purushothaman, J., Nisha, P. (2012) Effect of Enzyme Assisted Extraction on Quality and Yield of Volatile Oil from Black Pepper and Cardamom. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 1611-1617.
- Chávez-González, M. L., López- López, L. I., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J., Aguilar, C. N. (2016) Enzyme-assisted extraction of citrus essential oil. *Chem. Pap.* **70**, 412-417.
- Cheng, X., Bi, L., Zhao, Z., Chen, Y. (2015) Advances in Enzyme Assisted Extraction of Natural Products. U: *Proceedings of the 3rd International Conference on Material, Mechanical and Manufacturing Engineering* (Yarlagadda, P., ured.), Atlantis Press, Pariz, str. 371-375.
- Clevenger, J. F. (1928) Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Am. Pharm. Assoc.* **17**, 345-349.
- Couladis, M., Tzakou, O., Mimica-Đukić, N., Jančić, R., Stojanović, D. (2002) Essential oil of *Salvia officinalis* L. from Serbia and Montenegro. *Flavour Fragr. J.* **17**, 119-126.
- Cutillas, A.-B., Carrasco, A. Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., Tudela, J. (2017) *Salvia officinalis* L. Essential Oil from Spain: Determination of Composition, Antioxidant Capacity, Antienzymatic and Antimicrobial Bioactivities. *Chem. Biodivers.* (objavljeno online 6. svibnja 2017.). doi: 10.1002/cbdv.201700102.
- Dalla Nora, F. M., Borges, C. D. (2017) Ultrasound pretreatment as an alternative to improve essential oils extraction. *Cienc. Rural.* (objavljeno online 31. srpnja 2017.). doi: 10.1590/0103-8478cr20170045.



- Dias, M. I., Barros, L., Dueñas, M., Alves, R. C., Oliveira, M. B. P. P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C. F. R. (2014) Nutritional and antioxidant contributions of *Laurus nobilis* L. leaves: Would be more suitable a wild or a cultivated sample? *Food Chem.* **156**, 339-346.
- Dima, C., Dima, S. (2015) Essential oils in foods: extraction, stabilization and toxicity. *Curr. Opin. Food Sci.* **5**, 29-35.
- Drmić, H., Režek Jambrak, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2**, 22-33.
- Dudaš, S., Venier, L. (2009) Varijabilnost sadržaja eteričnog ulja u listovima lovora *Laurus nobilis* L. *Glasnik zaštite bilja* **6**, 46-54.
- Ebrahimi, M., Safaralizade, M. H., Valizadegan, O., Amin, B. H. H. (2013) Efficacy of three plant essential oils, *Azadirachta indica* (Adr. Juss.), *Eucalyptus camaldulensis* (Dehn.) and *Laurus nobilis* (L.) on mortality cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Hem: Aphididae). *Arch. Phytopathology Plant Protect* **46**, 1093-1101.
- El Euch, S. K., Hassine, D. B., Cazaux, S., Bouzouita, N., Bouajila, J. (2018) *Salvia officinalis* essential oil: Chemical analysis and evaluation of anti-enzymatic and antioxidant bioactivities. *S. Afr. J. Bot.* **120**, 253-260.
- El Malti, J., Amarouch, H. (2009) Antibacterial effect, histological impact and oxidative stress studies from *Laurus nobilis* extract. *J. Food Qual.* **32**, 190-208.
- Fidan, H., Stefanova, G., Kostova, I., Stankov, S., Damyanova, S., Stoyanova, A., Zheljzakov, V. D. (2019) Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *Laurus nobilis* L. Essential Oils from Bulgaria. *Molecules* (objavljeno online 22. veljače 2019.). doi: 10.3390/molecules24040804.
- Glavaš, S. (1976) Eterična ulja. U: *Tehnička enciklopedija* (Viličić, Ž., Hranuelli, F., Jakobović, Z., Podlesnik, V., ured.), Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, str. 360-370.
- Glisic, S., Ivanovic, J., Ristic, M., Skala, D. (2010) Extraction of sage (*Salvia officinalis* L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes. *J. Supercrit. Fluids* **52**, 62-70.

- Göksen, G., Fabra, M. J., Ekiz, H. I., López-Rubio, A. (2020) Phytochemical-loaded electrospun nanofibers as novel active edible films: characterization and antibacterial efficiency in cheese slices. *Food Control* (objavljeno online 23. siječnja 2020.). doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107133.
- Grdiša, M., Jug-Dujaković, M., Lončarić, M., Carović-Stanko, K., Ninčević, T., Liber, Z., Radosavljević, I., Šatović, Z. (2015) Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): A Review of Biochemical Contents, Medical Properties and Genetic Diversity. *Agric. Conspec. Sci.* **80**, 69-78.
- He, H., Qin, Y., Li, N., Chen, G., Liang, Z. (2015) Purification and Characterization of a Thermostable Hypothetical Xylanase from *Aspergillus oryzae* HML366. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **175**, 3148-3161.
- Hosni, K., Hassen, I., Chaâbane, H., Jemli, M., Dallali, S., Sebei, H., Casabianca, H. (2013) Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Ind. Crops Prod.* **47**, 291-299.
- Işik, M., Görür, G. (2009) Aphidicidal activity of seven essential oils against the cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* L. (Hemiptera: Aphididae). *Mun. Ent. Zool.* **4**, 424-431.
- Jemâa, J. M. B., Tersim, N., Toudert, K. T., Khouja, M. L. (2012) Insecticidal activities of essential oils from leaves of *Laurus nobilis* L. from Tunisia, Algeria and Morocco, and comparative chemical composition. *J. Stored Prod. Res.* **48**, 97-104.
- Kanižai Šarić, G., Milaković, Z., Kovačević, M., Krstanović, V., Dorotić, D. (2014) Eterična ulja – inhibitori rasta gljiva i sinteze mikotoksina. *Glasnik zaštite bilja* **4**, 52 – 57.
- Kaurinović, B., Popović, M., Vlaisavljević, S. (2010) *In Vitro* and *in Vivo* Effects of *Laurus nobilis* L. Leaf Extracts. *Molecules* **15**, 3378-3390.
- Kos, I., Bedeković, D., Širić, I., Vnučec, I., Pećina, M., Glumpak, A., Carović Stanko, K. (2017) Technological characterization and consumer perception of dry fermented game sausages with bay leaf (*Laurus nobilis* L.) essential oil. *J. Cent. Eur. Agric.* **18**, 794-805.

Kracher, D., Oros, D., Yao, W., Preims, M., Rezic, I., Haltrich, D., Rezic, T., Ludwig, R. (2014) Fungal secretomes enhance sugar beet pulp hydrolysis. *Biotechnol. J.* (objavljeno online 14. veljače 2014.). doi: 10.1002/biot.201300214.

Lakušić, B. S., Ristić, M. S., Slavkowska, V. N., Stojanović, D. Lj., Lakušić, D. V. (2013) Variations in essential oil yields and compositions of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) at different developmental stages. *Bot. Serb.* **37**, 127-139.

Latif, S., Anwar, F. (2009) Physicochemical studies of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil using enzyme-assisted cold-pressing. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**, 1042-1048.

Lemle, K. L. (2018, 1. siječanj) *Salvia officinalis* used in pharmaceuticals. *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* [online], <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/294/1/012037>>. Pristupljeno 29. svibnja 2020.

Ling Ho, H. (2017) *Aspergillus Xylanases*. *JAMB* **5**, 1-12.

Loizzo, M. R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A. M., Statti, G. A., Menichini, F. (2007) Cytotoxic Activity of Essential Oils from Labiatae and Lauraceae Families Against *In Vitro* Human Tumor Models. *Anticancer Res.* **27**, 3292-3300.

Luque de Castro, M. D., Jiménez-Carmona, M. M., Fernández-Pérez, V. (1999) Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trends Anal. Chem.* **18**, 708-716.

Manhães, A. P., Veiga-Júnior, V. F., Wiedemann, L. S. M., Fernandes, K. S., Sampaio, P. T. B. (2012) Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. *Acta Amaz.* **42**, 355-362.

Marzouki, H., Piras, A., Salah, K. B. H., Medini, H. (2009) Essential oil composition and variability of *Laurus nobilis* L. growing in Tunisia, comparison and chemometric investigation of different plant organs. *Nat. Prod. Res.* **23**, 343-354.

Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M. L., Simões, M. T. F., Figueiredo, A. C., Barroso, J. G., Pedro, L. G. (2011) *Salvia officinalis* L. essential oils: effect of hydrodistillation time on the chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Nat. Prod. Res.* **25**, 526-541.

Mihovilović, I. (2005) *Proizvodnja i prerada ljekovitog i aromatičnog bilja*. Grad Senj, Razvojna agencija Senj d.o.o., Hrvatski zavod za zapošljavanje, Senj.

Nadar, S. S., Rao, P., Rathod, V. K. (2018) Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food. Res. Int.* **108**, 309-330.

Palfi, M., Vrandečić, K., Popijač, V., Čosić, J. (2019) Utjecaj eteričnih ulja na fitopatogene gljive. *Poljoprivreda* **25**, 32-40.

Pourmortazavi, S. M., Rahimi-Nasrabadi, M., Hajimirsadeghi S. S. (2019) Supercritical Fluid Extraction in Plant Analysis. U: *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online] (Meyers, R. A., ured.), John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ, str. 1-42, <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470027318.a9903.pub2>>. Pristupljeno 29. svibnja 2020.

Puri, M., Sharma, D., Barrow, C. J. (2012) Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends Biotechnol.* **30**, 37-44.

Raal, A., Orav, A., Arak, E. (2007) Composition of the essential oil of *Salvia officinalis* L. from various European countries. *Nat. Prod. Res.* **21**, 406-411.

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., Khalel, K. I. (2013) Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Ind. Crops Prod.* **43**, 827-831.

Samadi, M., Abidin, Z. Z., Yunus, R., Biak, D. R. A., Yoshida, H., Lok, E. H. (2017) Assessing the kinetic model of hydro-distillation and chemical composition of *Aquilaria malaccensis* leaves essential oil. *Chin. J. Chem. Eng.* **25**, 216-222.

Savić, Lj. (2014) Metode ekstrakcije biljnih materijala: Usporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek. Sirov.* **34**, 93-103.

Srinivas, K., King, J. W., Monrad, J. K., Howard, L. R., Hansen, C. M. (2009) Optimization of Subcritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds Using Hansen Solubility Parameters. *J. Food Sci.* **74**, 342-354.

Stratakos, A. C., Koidis, A. (2016) Methods for Extracting Essential Oils. U: *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (Preedy, V. R., ured.), Irish Academic Press, San Diego, str. 31-38.

Taban, A., Saharkhiz, M. J., Niakousari, M. (2018) Sweet bay (*Laurus nobilis* L.) essential oil and its chemical composition, antioxidant activity and leaf micromorphology under different extraction methods. *Sustain. Chem. Pharm.* **9**, 12-18.

Tekin, K., Akalın, M. K., Şeker, M. G. (2015) Ultrasound bath-assisted extraction of essential oils from clove using central composite design. *Ind. Crops Prod.* **77**, 954-960.

Tigrine-Kordjani, N., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2006) Microwave ‘dry’ distillation as a useful tool for extraction of edible essential oils. *Int. J. Aromather.* **16**, 141-147.

Tuyen, D. T., Thanh, N. S. L., Thao, N. T. (2016) Purification and evaluation for effects of temperature on extracellular xylanase activity from *Aspergillus oryzae* DSM 1863. *J. Viet. Env.* **8**, 9-13.

USDA (2020a) Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Salvia officinalis* L. USDA – United States Department of Agriculture, Washington, <<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=SAOF2>>.

Pristupljeno 14. svibnja 2020.

USDA (2020b) Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Laurus nobilis* L. USDA – United States Department of Agriculture, Washington, <<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=LANO80>>.

Pristupljeno 14. svibnja 2020.

Vian, M. A., Fernandez, X., Visinoni, F., Chemat, F. (2008) Microwave hydrodiffusion and gravity, a new technique for extraction of essential oils. *J. Chromatogr. A* **1190**, 14-17.

Vilela, J., Martins, D., Monteiro-Silva, F., González-Aguilar, G., de Almeida, J. M. M. M., Saraiva, C. (2016) Antimicrobial effect of essential oils of *Laurus nobilis* L. and *Rosmarinus officinallis* L. on shelf-life of minced “Maronesa” beef stored under different packaging conditions. *Food Packag. Shelf Life* **8**, 71-80.

Vosoughi, N., Gomarian, M., Pirbalouti, A. G., Khaghani, S., Malekpoor, F. (2018) Essential oil composition and total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) extract under chitosan application and irrigation frequencies. *Ind. Crops Prod.* **117**, 366-374.

Walia, A., Guleria, S., Mehta, P., Chauhan, A., Parkash, J. (2017) Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. *3 Biotech* (objavljeno online 8. travnja 2017.). doi: 10.1007/s13205-016-0584-6.

Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J.-J., Li, H.-B. (2017) Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int. J. Mol. Sci.* (objavljeno online 5. siječnja 2017.). doi: 10.3390/ijms18010096.

Zhang, W.-g., Zhang, D.-c., Chen, X.-y. (2012) A novel process for extraction of tea oil from *Camellia oleifera* seed kernels by combination of microwave puffing and aqueous enzymatic oil extraction. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **114**, 352-356.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

*Jamara Vujanić*

Ime i prezime studenta