

Izolacija eteričnog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) vodenom destilacijom uz primjenu predtretmana ultrazvukom i enzimima

Blažević, Katja

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:159:936519>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Katja Blažević
0058216310**

**IZOLACIJA ETERIČNOG ULJA BOSILJKA (*Ocimum
basilicum* L.) VODENOM DESTILACIJOM UZ
PRIMJENU PREDTRETMANA ULTRAZVUKOM I
ENZIMIMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: .doc.dr.sc.Maja Dent

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

**Izolacija eteričnog ulja bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) vodenom destilacijom uz primjenu
predtretmana ultrazvukom i enzimima
Katja Blažević, 0058216310**

Sažetak:

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje bosiljka vodenom destilacijom po Clevengeru uz primjenu predtretmana. Vodenoj destilaciji prethodili su predtretmani ultrazvukom potpomognute ekstrakcije u različitim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30 i 40 minuta), predtretman enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1) i kombinacija predtretmana ultrazvukom potpomognute ekstrakcije i enzimima. Ispitano je kako navedeni predtretmani utječu na prinos eteričnog ulja bosiljka te su spektrofotometrijskim metodama ispitani maseni udjeli ukupnih polifenola i antioksidacijska aktivnost nusprodukata vodene destilacije bosiljka. Niti jedna od metoda predtretmana nije rezultirala povećanjem prinosa eteričnog ulja bosiljka, ali došlo je do promjene njegove boje. Primjena predtretmana rezultirala je povećanjem masenog udjela ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti u nusproduktima vodene destilacije u odnosu na negativnu kontrolu. Nusprodukti vodene destilacije dobar su izvor polifenola s dokazanom antioksidacijskom aktivnosti.

Ključne riječi: vodena destilacija, eterično ulje, bosiljak, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, predtretman enzimima

Rad sadrži: 34 stranica, 5 slika, 7 tablica, 54 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc.dr.sc. Maja Dent

Datum obrane: 13. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for analytical chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Extraction of essential oil from basil (*Ocimum basilicum* L.) by hydrodistillation using
ultrasound-assisted extraction and enzymatic pretreatment

Katja Blažević, 0058216310

Abstract:

The purpose of this research was to isolate basil essential oil by Clavenger hydrodistillation with the application of pretreatment. Hydrodistillation was preceded by ultrasound-assisted extraction at different time intervals (5, 10, 20, 30 and 40 min), enzyme pretreatment (xylanase-pectinase-cellulase, 1:1:1) and a combination of ultrasound-assisted extraction and enzyme pretreatment. It was tested how the mentioned pretreatments affect the yield of basil essential oil and, using spectrophotometric methods, mass fractions of total polyphenolic content and antioxidant activity of by-products of water distillation of basil were tested. None of the previous methods resulted in an increase in the yield of basil essential oil, but there was a change in its colour. The application of pretreatment resulted in an increase in the mass fraction of total polyphenols and antioxidant activity in the by-products of water distillation compared to the negative control. By-products of water distillation are a good source of polyphenols with proven antioxidant activity.

Keywords: hydrodistillation, essential oil, basil, ultrasound-assisted extraction, enzymatic pretreatment

Thesis contains: 34 pages, 5 figures, 7 tables, 54 references, 0 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: Maja Dent, PhD

Thesis defended: August 13, 2022

Sadržaj

1.UVOD	1
2.TEORIJSKI DIO	2
2.1. BOSILJAK	2
2.2. ETERIČNO ULJE BOSILJKA	2
2.3. FENOLNI SPOJEVI	3
2.3.1. FENOLNI SPOJEVI BOSILJKA	4
2.4. VODENA DESTILACIJA	5
2.5. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM	6
2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ENZIMIMA	7
3.EKSPERIMENTALNI DIO	8
3.1. MATERIJAL	8
3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI	8
3.3. APARATURA I PRIBOR	10
3.4. METODE	11
3.4.1. IZOLACIJA ETERIČNOG ULJA IZ BILJNOG MATERIJALA	11
3.4.2. PREDTRETMAN ENZIMIMA	11
3.4.3. PREDTRETMAN EKSTRAKCIJOM POTPOMOGNUTOM ULTRAZVUKOM	11
3.4.4. KOMBINACIJA PREDTRETMANA EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE ULTRAZVUKOM I DODATKOM ENZIMA	12
3.4.5. CLAVENGER VODENA DESTILACIJA	12
3.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE	12
3.5.1. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA U VODENOM OSTATKU BOSILJKA	12
3.5.2. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG KAPACITETA U EKSTRAKTU BOSILJKA FRAP	

METODOM	14
4.REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. ETERIČNO ULJE	17
4.1.1. PRINOS ETERIČNOG ULJA	17
4.1.2. BOJA ETERIČNOG ULJA BOSILJKA	19
4.2. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA NAKON PROVEDENIH PREDTRETMA NA I VODENE DESTILACIJE PO CLEVENGERU	21
4.2.1. U VODENOM OSTATKU BOSILJKA	21
4.2.2. U HIDROLATU BOSILJKA	23
4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI NAKON PROVEDENIH PREDTRETMA NA I VODENE DESTILACIJE PO CLEVENGERU	24
4.3.1. U VODENOM OSTATKU BOSILJKA	24
4.3.2. U HIDROLATU BOSILJKA	26
5.ZAKLJUČCI	27
6. POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice Lamiaceae. Poznata je kao začinte je danas rasprostranjena na širempodručju Mediterana, a porijeklom je iz Indije. Biljke iz porodice Lamiaceae aromatične su vrste koje se najčešće koriste kao začini. Bosiljak sadrži vitamine, minerale i bioaktivne spojeve koji doprinose njegovoj aromi i okusu te im se pripisuju snažna antioksidacijska svojstva. U proizvodnji eteričnih ulja ostaju značajne količine nusprodukata kao što su vodeni ostatak koji je bogat polifenolnim spojevima te hidrolat koji je sličnog kemijskog sastava kao i eterično ulje bosiljka. Eterično ulje bosiljka sadrži alkohole (linalol), okside (1,8-cineol), polifenole (eugenol, metil eugenol, metil izoeugenol, timol), estere (metil cinamat), aldehide (cital) i kamfor. 1,8-cineol, metil cinamat, estragol i linalol sastojci su odgovorni za izrazitu aromu biljaka bosiljka (Klimankova i sur., 2007).

Cilj ovog rada bio je izolirati eterično ulje bosiljka metodom vodene destilacije po Clevengeru. Vodenom destilacijom po Clevengeru dobiveni su niski prinosi eteričnog ulja bosiljka te su ispitani predtretmani ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, predtretman enzimima (ksilanaza:pektinaza:celulaza, 1:1:1), te kombinacija predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, a zatim enzimima na prinos eteričnog ulja. Predtretman ultrazvučnom ekstrakcijom proveden je pri različitom vremenu ekstrakcije (5, 10, 20, 30 i 40 minuta) kako bi se utvrdilo optimalno vrijeme ekstrakcije koje je zatim korišteno kod kombinacije s predtretmanom enzimima. Prilikom izolacije eteričnog ulja bosiljka ostaju značajne količine nusprodukata, vodeni ostatak i hidrolat koji su bogati biološki aktivnim spojevima. U vodenom ostatku i hidrolatu određeni su ukupni polifenolni spojevi te je određena antioksidacijska aktivnost FRAP metodom. Cilj provedenih predtretmanana bio je utvrditi utječu li na povećanje prinosa eteričnog ulja te na masene udjele polifenolnih spojeva vodenog ostatka i hidrolata te na njihovu antioksidacijsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BOSILJAK

Bosiljak (*Ocimum basilicum* L.) je je jednogodišnja zeljasta biljka iz porodice metvica Lamiaceae. Bosiljak ima četvrtaste stabljike s lišćem koje raste na suprotnim stranama, a lišće je zaobljeno, blago čašasto i zakrivljeno na vrhu. Lišće je općenito svijetlozeleno, iako neke sorte imaju crvenkasto ili ljubičasto lišće. Stabljike mogu narasti između 30,5 do 125 centimetara, ovisno o sorti i uvjetima. Cvjetovi su mali, obično bijele boje i raspoređeni duž klasa koji raste s vrha stabljike. Bosiljak raste kao trajnica u tropskoj klimi, a sadi se kao jednogodišnja biljka u umjerenim regijama, gdje se može sijati izravno iz sjemena ili presađivati. Budući da je bosiljak vrlo osjetljiv na mraz, biljka mora biti zaštićena od temperatura blizu smrzavanja. Preferira rast na izravnom suncu, ali može rasti i u djelomičnoj sjeni.

Bosiljak ima široku primjenu, posebice kao izvor aroma u prehrambenoj industriji. Koristi se kao začinsko, kulinarsko te ukrasno bilje. U kulinarske svrhe mogu se koristiti svježi i osušeni listovi, međutim sušenjem se gube njihovi prevladavajući okusi. Upotreba bosiljka je raznolika i obilna; koristi se uz povrće, meso, ribu, umake, variva, preljeve, biljne čajeve, likere i miješana pića. Nadalje, brojna istraživanja zabilježila su da bosiljak ima i bogata farmakološka svojstva, pokazujući protuupalno (Raina i sur., 2016) i antioksidacijsko djelovanje (Pandey i sur., 2016) te mnoga druga.

2.2. ETERIČNO ULJE BOSILJKA

Eterično ulje koncentrirana je hidrofobna tekućina koja sadrži hlapljive kemijske spojeve iz biljaka. Mogu se ekstrahirati iz različitih dijelova biljaka; lišća, latica, stabljike, sjemenke, pa čak i korijenja. Tamo su prisutna u specijaliziranim stanicama ili žlijezdama, a biljke ih koriste kako bi se zaštitile od predatora i štetočina, ali i za privlačenje oprašivača. Drugim riječima, eterična ulja bitan su dio imunološkog sustava biljke (Butnariu i Sarac, 2018).

Najvažnija karakteristika eteričnih ulja, koja im daje i posebnu ekonomsku vrijednost, je njihov specifičan miris. To je osnova za njihovu primjenu u parfumeriji, kozmetici i prehrambenoj industriji. Nadalje, farmakološka i terapijska svojstva biljaka pripisuju se upravo eteričnim uljima, a povezana su s njihovim kemijskim sastavom (Raut i Karuppaiyil,

2014). Nizom provedenih istraživanja, dokazana su njihova antioksidativna, antikancerogena, antimikrobna, protuupalna i dr. djelovanja (Wang i sur., 2013).

Poznato je da različite sorte bosiljka imaju genetsku sposobnost stvaranja i zadržavanja različitih skupina kemijskih spojeva, što dovodi do velike raznolikosti kemotipova unutar iste vrste bosiljka.

Lawrence (1998) je imenovao četiri glavna kemotipa bosiljka prema zastupljenosti određenih kemijskih spojeva u eteričnom ulju: bogat estragolom, bogat linaloolom, bogat metil eugenolom i bogat metil cinamatom. Marotti i sur. (1996) navode da je europski bosiljak uglavnom linalool i estragol tipa, dok tropski bosiljak ima metil cinamat kao glavni sastojak. Bosiljak kemotipa u kojem prevladava eugenol može se naći kako raste u sjevernoj Africi, istočnoj Europi i dijelovima Azije.

2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi su sekundarni metaboliti široko rasprostranjeni u biljnom carstvu s oko 8000 različitih fenolnih struktura. Uključeni su u procese prilagodbe biljaka tijekom stresnih stanja kao što su ranjavanje, infekcija ili izlaganje UV zračenju (Ansari i sur., 2013).

S obzirom na njihovu kemijsku strukturu, fenolni spojevi sadrže najmanje jednu fenolnu skupinu (Peñarrieta, 2014). Iako fenolni spojevi mogu biti prisutni u slobodnom obliku u biljkama, uglavnom su prisutni vezani za šećere ili proteine (Giada, 2013).

Zanimanje za fenolne spojeve poraslo je tijekom posljednjeg desetljeća zbog njihove dokazane antioksidativne aktivnosti. Njihova svojstva hvatanja slobodnih radikala pomažu u prevenciji kroničnih poremećaja i poremećaja povezanih s oksidativnim stresom kao što su rak, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Bhuyan i Basu, 2017).

Fenolni spojevi mogu se klasificirati u fenolne kiseline, flavonoide i tanine. Jedan od načina jednostavne podjele fenolnih spojeva temelji se na broju fenolnih prstena i na strukturnim elementima koji povezuju takve prstene, tako da su fenolni spojevi kategorizirani kao flavonoidi i neflavonoidi.

Flavonoidi čine glavnu skupinu fenolnih spojeva. Oni su, zajedno s karotenoidima i klorofilima, odgovorni za plavu, ljubičastu, žutu, narančastu i crvenu boju biljaka. Imaju kostur C6-C3-C6 s dva aromatska prstena povezana vezom od tri ugljika (Vuolo, 2018). Njihovo antioksidativno djelovanje ovisi o prisutnosti, broju i položaju hidroksilnih skupina u kemijskoj strukturi ovih spojeva. Flavonoidi se mogu podijeliti u šest podrazreda: flavoni,

izoflavoni, flavonoli, antocijanini, flavanoli i flavanoni. Razlike između njih su zbog varijacija u broju i položajima hidroksilnih skupina kao i u njihovom rasponu alkilacije i glikozilacije (Caleja i sur., 2017).

Neflavonoidi su spojevi s manjom i jednostavnijom kemijskom strukturom od flavonoida. Međutim, postoje i neflavonoidi složene strukture i velike molarne mase. Ovu skupinu uglavnom čine fenolne kiseline, kumarini, stilbeni i lignani.

Polienolni spojevi nedavno su naširoko proučavani zbog svojih bioloških učinaka koji su korisni za ljudsko zdravlje. Te su prednosti uglavnom povezane s njihovim izravnim i neizravnim antioksidativnim djelovanjem. Naime, fenoli mogu donirati elektrone oksidativnim vrstama, hvatati slobodne radikale i kelirati metalne ione (Quiñones i sur., 2012). Nadalje, mogu neizravno oslabiti proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta, bilo poboljšanjem aktivnosti antioksidativnih enzima ili inhibicijom enzima koji induciraju pro – oksidativno djelovanje (Ballard i Maróstica, 2018). Zahvaljujući tom antioksidativnom djelovanju, fenolni spojevi imaju sposobnost različitih bioloških učinaka kao što su antimikrobni, protuupalni, antikancerogeni i kardioprotektivni (Ballard i Maróstica, 2018).

2.3.1. Fenolni spojevi bosiljka

Bosiljak je bogat izvor fenolnih spojeva. Fenoli uključuju mnogo različitih kemijskih spojeva u rasponu od fenolnih kiselina, jednostavnih ili složenih flavonoida do obojenih antocijana. Za početak, bosiljak sadrži visoke razine fenolnih kiselina koje pridonose njegovom snažnom antioksidativnom kapacitetu (Javanmardi i sur., 2002). Glavne fenolne kiseline određene u bosiljku su ružmarinska i cikorina kiselina (Kwee i Niemeyer, 2011). Ružmarinska kiselina, kao prevladavajuća fenolna kiselina u ekstraktima bosiljka, važna je fitokemikalija zbog svojih antioksidativnih i farmakoloških svojstava. Prinsi i sur. (2019), osim već navedenih fenolnih kiselina, detektirali su i litospermičku kiselinu A, salvianolnu kiselinu B te 4-hidroksibenzojevu kiselinu. Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina uglavnom je posljedica njihovih redoks svojstava, koja mogu igrati važnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, gašenju singletnog i tripletnog kisika ili razgradnji peroksida (Javanmardi i sur., 2002).

Veliki interes posvećen je antioksidativnom djelovanju flavonoida, koje je posljedica njihove sposobnosti redukcije slobodnih radikala. Flavonoidi izolirani iz bosiljka pripadaju podskupini flavona i flavonola koji se javljaju kao glikozilirani derivati. Istraživanje koje su

proveli Grayer i sur. (2002) pokazalo je da su dominantne komponente u bosiljku bile: kvercetin, luteolin, apigenin i kaempferol. Prinsi i sur. (2019) zabilježili su da su glavni flavonoidi akumulirani u bosiljku derivati cijanidina, primjerice antonijanini A, B i C. Antocijanini imaju različite funkcije unutar biljaka, od obrambenih i zaštitnih, do olakšavanja rasta razvoja i reprodukcije.

Sadržaj fenolnih spojeva ovisi o kultivaru bosiljka, kao i o otapalima i metodama ekstrakcije. Teofilović i sur. (2018) su ekstrakcijom diklormetanom (10 min), kloroformom (10 min), n-heksanom (30 min) i infuzijom dobili visok sadržaj ružmarinske kiseline i kvercetina, ali i značajan udio klorogenske kiseline, vanilin kiseline, naringenina, cimetne i ferulinske kiseline u bosiljku.

2.4. VODENA DESTILACIJA

Vodena destilacija postala je standardna metoda izolacije eteričnog ulja iz biljnog materijala. Radi se o konvencionalnoj metodi ekstrakcije, a standardne laboratorijske aparature kojima se ona provodi su aparatura po Ungeru, aparatura po Clevengeru i aparatura po Europskoj farmakopeji. Uređaji se sastoje od izvora grijanja, posude, kondenzatora za pretvaranje pare u tekućinu i dekantera za skupljanje kondenzata i odvajanje eteričnih ulja s vodom. Da bi se ekstrahirala ulja odvija se vrenje, kondenzacija i dekantiranje. Ove razine ekstrakcije ključne su za osiguranje kontrole kvalitete eteričnih ulja.

U procesu vodene destilacije biljni materijal je potpuno uronjen u vodu koja se dovodi do točke vrenja kako bi se razbila citoplazma biljke i oslobodile komponente eteričnih ulja. Ova metoda štiti ekstrahirana ulja do određenog stupnja jer okolna voda djeluje kao barijera za sprječavanje pregrijavanja. Organske tvari koje se s vodom ne miješaju imaju svojstvo isparavanja zajedno s vodenom parom, na temperaturi nižoj od njihova vrelišta. Tu činjenicu objašnjava Daltonov zakon parcijalnih tlakova koji tvrdi kako je tlak smjese plinova jednak zbroju parcijalnih tlakova plinova koji čine smjesu. Vodena para i para uljne faze odlaze u kondenzator gdje dolazi do hlađenja na temperaturi ispod 30 °C i kondenziranja u dvije odvojene tekuće faze; jedna je faza hidrolat koji predstavlja vodenu fazu nastalu kondenziranjem vodene pare i s njom prisutnih tvari; a druga je eterično ulje, koje se uglavnom zadržava iznad hidrolata. S obzirom da su te dvije faze nemiješajuće, uglavnom se odvajaju dekantiranjem.

Neki od nedostataka hidrodestilacije su što je proces spor i zahtijeva energiju za zagrijavanje,

brzine destilacije mogu varirati ako izvor topline nije kontroliran, a izravni izvor topline može uzrokovati pougljenje biljnog materijala u dnu komore (Cook i Lanaras, 2016).

2.5. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM

Ultrazvuk je posebna vrsta zvučnoga vala koji je izvan dosega ljudskoga sluha, u rasponu od 20 kHz do 100 MHz. Ultrazvučni val prolazi kroz krute, plinovite i tekuće medije te uzrokuje pojavu nazvanu kavitacija. Postoji nekoliko mogućih hipoteza za poboljšanje ekstrakcije bioaktivnih spojeva pomoću ultrazvuka, kao što su prekid stanične stijenke, povećanje penetracije i bubrenja te toplinska energija stvorena procesima hidratacije. Pod ultrazvučnim valom, čvrste i tekuće čestice vibriraju i ubrzavaju se, a zatim otopljena tvar iz uzorka brzo izlazi iz čvrste faze u otapalo (Cares i sur., 2010). Intenzitet ultrazvuka smanjuje međumolekularne sile, što rezultira slomom molekularne strukture. Taj se proces naziva kavitacija i uključuje proizvodnju, rast i kolaps mjehurića (Baig i sur., 2010). Kolaps mjehurića uzrokuje prekid staničnih membrana, čime dolazi do olakšanog otpuštanja spojeva koji se mogu ekstrahirati, a također povećava prodor otapala u stanične materijale te pojačava prijenos mase (Cares i sur., 2010).

Općenito, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija dijeli se dalje na izravne i neizravne metode izvedbe. U izravnoj ultrazvukom potpomognutoj ekstrakciji, primjenom sonde koja se uranja u mješavinu uzorka i otapala nakon čega slijedi izravna primjena ultrazvučnog zračenja. Neizravno ultrazvučno zračenje primjenjuje se na mješavinu uzorka i otapala putem ultrazvučne kupke, koja se može koristiti istovremeno za više uzoraka. Oba pristupa zahtijevaju dodatni korak čišćenja. Uobičajeni parametri za optimizaciju ultrazvukom potpomognute ekstrakcije su temperatura, otapalo, snaga, ciklus i amplituda ultrazvučnog vala, promjer sonde, granulacija i stupanj homogenizacije te vrijeme ekstrakcije.

Glavne prednosti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije su smanjeno vrijeme ekstrakcije kao i manja potrošnja energije i otapala. Nadalje, energija ultrazvučnih valova stvara smanjene toplinske gradijente i niže temperature ekstrakcije, čime sprječava degradaciju ekstrakata potaknutu visokim temperaturama (Aires, 2017). Ostale prednosti uključuju brži prijenos energije, selektivnu ekstrakciju, smanjenu veličinu opreme, brzo pokretanje, povećanu proizvodnju i eliminira korake procesa. Naposljetku, ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija daje veće prinose te vrhunsku kvalitetu ekstrakata (Richa i sur., 2020).

2.6. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ENZIMIMA

U enzimski potpomognutoj ekstrakciji, biljni materijal je prethodno tretiran enzimima kao što su proteaza, pektinaza, pektinesteraza, celulaza, hemicelulaza, celobijaza, α -amilaza i fruktoziltransferaza za hidrolizu staničnih stjenki i oslobađanje fitokemikalija vezanih za lipidne i ugljikohidratne lance unutar stanice (Puri i sur., 2012). Ekstrakcija potpomognuta enzimima ovisi o sljedećim čimbenicima: vrsti, dozi i potrebnom stanju enzima; kombinaciji vremena i temperature procesa; svojstvima biljnog materijala kao što su veličina čestica, sadržaj vode i kemijski sastav; i omjeru otapalo-krutina (Azmir i sur., 2013).

Ekstrakcija potpomognuta enzimima temelji se na sposobnosti enzima da hidroliziraju komponente stanične stjenke i remete njezin strukturni integritet, i to pod blagim procesnim uvjetima, čime se omogućuje učinkovita ekstrakcija i oslobađanje bioaktivnih tvari (Gardossi i sur., 2010). Kada se enzimi i supstrati povežu zajedno, oblik molekule enzima mijenja se u optimalni oblik za interakciju sa supstratom. Promjena oblika može rezultirati naprezanjem supstrata, uzrokujući prekid njegovih veza te promicanje reakcije. Tehnologija potpomognuta enzimima pobudila je istraživački interes posebice zbog nekoliko prednosti. Enzimi su vrlo učinkoviti i specifični. Ekstrakcija uz pomoć enzima može biti alternativna metoda zbog blagih uvjeta okoline, općenito bez velike količine neželjenih proizvoda, time i manjim utjecajem na okoliš. Uz navedene prednosti, enzimski potpomognuta ekstrakcija prirodnog proizvoda iz biljaka dovodi i do smanjenog vremena ekstrakcije i potrošnje organskog otapala te manjeg utroška energije uz povećan prinos i kvalitetu proizvoda (Puri i sur., 2012). S druge strane, ima i potencijalna komercijalna i tehnička ograničenja. Za početak, enzimi su relativno skupi za veliku industrijsku proizvodnju te ekstrakcija potpomognuta enzimima nije uvijek izvediva u industrijskim razmjerima jer ponašanje enzima je strogo ograničeno okolišnim uvjetima.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U provedbi eksperimenta za izradu završnog rada korišteni su osušeni i usitnjeni listići bosiljka (*Ocimum basilicum* L.) (Suban, Strmec Samoborski, 2022).

3.2. KEMIKALIJE I STANDARDI

Enzimi korišteni za ekstrakciju

- Enzim ksilanaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)
- Enzim pektinaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)
- Enzim celulaza; Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka)

Kemikalije za postupak ekstrakcije

- Pročišćena voda
- Citratni pufer pH= 6,5

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)

Priprema: u čistu laboratorijsku čašu volumena 500 mL odvaži se 4,80 g limunske kiseline, zatim doda 400 mL pročišćene vode te miješa na magnetskoj mješalici. Sonda pH-metra uroni se u otopinu te uz postupno dodavanje 2M otopine NaOH podešava pH-vrijednost otopine do 6,5.

Reagensi za određivanje ukupnih polifenola

- Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))

Priprema: F.C. reagens razrijedi se deioniziranom vodom u omjeru 1:2

- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))

Priprema: 200 g anhidrida natrijeva karbonata otopi se u 800 mL vruće destilirane vode u odmjerne tikvici volumena 1 L. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu doda se nekoliko

kristalića natrijeva karbonata te se odmjerne tikvica nadopuni do oznake. Zasićena otopina natrijeva karbonata filtrira se nakon 24 sata.

- standardna otopina galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))

Priprema: na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001 \text{ g}$) odvažuje se 500 mg galne kiseline u plastičnoj lađici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvalitativno prenese u odmjernu tikvicu 100 mL i otopi u datom volumenu, a potom se do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Reagensi za određivanje antioksidacijskog kapaciteta

- Klorovodična kiselina, 37%-tna (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))
- Klorovodična kiselina, 40mM

Priprema: otpipetira se 339 μL 37%-tne klorovodične kiseline i nadopuni destiliranom vodom u odmjerne tikvici od 100 mL.

- TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), 10 mM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))

Priprema: odvažuje se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake s 40 mM klorovodičnom kiselinom

- Željezo (III)-klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 20 mM otopina
- Priprema: odvažuje se 0,541 g željezo (III)-klorid heksahidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake destiliranom vodom.
- Ledena octena kiselina, 99%-tna (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))
- Acetatni puffer. 0,3 M, pH=3,6

Priprema: odvažuje se 3,1 g natrij-acetat trihidrata u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese pomoću destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL glacijalne octene kiseline i nadopuni destiliranom vodom do oznake

- FRAP reagens

Priprema: u staklenoj čaši volumena 50 mL pripremi se FRAP reagens tako da se pomiješa 25 mL 0,3 M acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ reagensa i 2,5 mL željezo (III)- klorida u omjeru 10:1:1

- Standard askorbinske kiseline (100 mgL^{-1}) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Njemačka))

Priprema: potrebno je prirediti otopinu askorbinske kiseline koncentracije 100 mgL^{-1} . Odvažuje

se 0,100 g askorbinske kiseline u plastičnoj lađici za vaganje i kvantitativno prenese s destiliranom vodom u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te nadopuni do oznake.

3.3. APARATURA I PRIBOR

- Analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan)
- Automatske pipete volumena 2 – 1000 μ l (kemolab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- UV/VIS Spektrofotometar (Lambda 1, perkinelmer, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Clavenger aparatura za vodenu destilaciju
- Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL i 500 mL
- Falcon epruvete za čuvanje uzoraka volumena: 5, 15 i 50 mL
- Filter papir
- Graduirane pipete volumena 1, 2, 5 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, 50 i 100 mL
- Ph-metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- Plastične epruvete volumena 1,5 mL
- Propipete
- Staklene laboratorijske čaše volumena 250 i 500 mL
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapići
- Stalak za epruvete
- Tehnička vaga (MK-500C, Chyo, Kyoto, Japan)
- Termometar
- Ultrazvučna sonda (UP200Ht, Hielscher, Njemačka)

- UV/VIS Spektrofotometar (Lambda 1, perkinelmer, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Vodena kupelj
- Vorteks tresilica (VTX, Labo Moderne, Pariz, Francuska)

3.4. METODE

3.4.1. Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala

Za izolaciju eteričnog ulja korišteni su usitnjeni i osušeni listovi biljke. Uzorak je nakon provedenih predtretmana podvrgnut vodenoj destilaciji po Clevengeru u trajanju od dva sata. Tretmani biljnih materijala koji su prethodili vodenoj destilaciji su:

- a) predtretman enzimom (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1)
- b) predtretman ultrazvukom (ultrazvučna sonda promjera 14 mm, izlazna snaga ultrazvuka 200 W, vrijeme trajanja 5, 10, 20, 30, 40 min)
- c) predtretman kombinacijom enzima i ultrazvuka

Vodena destilacija po Clevengeru provedena je u svrhu dobivanja eteričnog ulja bosiljka te su dobiveni i nusprodukti: hidrolat, vodeni ostatak i biljni ostatak. Eterično ulje bosiljka i hidrolat odvojeni su za daljnje GC/MS analize, a vodeni ostatak za HPLC analizu. Vodeni ekstrakt odvojen je od biljnog ostatka filtriranjem. U izdvojenim vodenim ekstraktima i hidrolatima, spektrofotometrijskim su metodama određeni maseni udjeli ukupnih polifenola te je određena antioksidacijska aktivnost.

3.4.2. Predtretman enzimima

Odvagano je 50 mg svakog od enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza; 1:1:1) i prebačeno u tikvicu te otopljeno u 250 mL pufera pH=6,5. Posebno je odvagano 20 g prethodno osušeni i usitnjeni listića bosiljka te su prebačeni u tikvicu s puferom i enzimima. Predtretman enzimima proveden je na magnetskoj miješalici, uz konstantno miješanje pri 40 °C kroz 4 sata. Nakon provedenog predtretmana, sadržaj tikvice prenesen je na aparaturu po Clevengeru i započeta je vodena destilacija u trajanju od 2 sata.

3.4.3. Predtretman ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom

Predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom proveden je primjenom ultrazvučne sonde promjera 14 mm, izlazne snage ultrazvuka 200W u trajanju od 5, 10, 20, 30 i 40 minuta. U suhu laboratorijsku čašu odvagano je 20 g listića bosiljka i dodano 250 mL

pročišćene vode. Sadržaj čaše dobro je promiješan pomoću staklenog štapića nakon čega je u čašu uronjena ultrazvučna sonda. Po završetku ekstrakcije sadržaj čaše prenesen je u okruglu tikvicu od 500 mL i sve zajedno stavljeno je na vodenu destilaciju po Clevengeru u svrhu dobivanja eteričnog ulja.

3.4.4. Kombinacija predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i dodatkom enzima

U suhu laboratorijsku čašu odvagano je 20 g listića bosiljka i dodano 250 mL pufera pH=6,5. Prvo je provedena ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri prethodno određenom optimalnom vremenu ekstrakcije ($t=5$ min), primjenom ultrazvučne sonde promjera 14 mm, izlazne snage ultrazvuka 200W. Nakon završenog ultrazvučnog predtretmana, sadržaj u čaši je ohlađen na sobnu temperaturu, dodano je 50 mg svakog od enzima (pektinaza, celulaza, ksilanaza; 1:1:1) i sve zajedno dobro je promiješano. Predtretman enzimima provoden je na magnetskoj miješalici, uz konstantno miješanje pri 40 °C kroz 4 sata. Nakon provedenog predtretmana, sadržaj tikvice prenesen je na aparaturu po Clevengeru i započeta je vodena destilacija u trajanju od 2 sata.

3.4.5. Clevenger vodena destilacija

Odvagano je 20 g biljnog materijala i dodano u tikvicu, zatim je dodano 250 mL otapala i tikvica je stavljena na vodenu destilaciju u trajanju od 2 sata uz zagrijavanje. Nakonprovedene vodene destilacije, odvojeno je eterično ulje i hidrolat, a biljni ostatak je profiltriran preko lijevka i filter papira. Izdvojeni vodeni ostatak spremljen je za daljnje analize.

3.5. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE

3.5.1. Određivanje masenog udjela ukupnih polifenola u vodenom ostatku bosiljka

Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela ukupnih polifenola provedeno je u vodenim ostacima i hidrolatima bosiljka nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru. Metoda se temelji na kolornoj reakciji polifenola s Folin-Ciocalteu reagensom te mjerenjem nastalog plavog obojenja pri 765 nm (Singleton i Rosi, 1965). Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdenske kiseline, koje se pri oksidaciji fenolnih tvari u blago alkalnim uvjetima reduciraju u volfram oksid i molibden oksid, plave boje. Redukcija ovih

kiselina, odnosno tvorba relativno stabilnog plavo obojenog kompleksa biti će intenzivnija što je prisutan veći broj hidroksilnih skupina ili oksidirajućih grupa u polifenolnim spojevima (Jakopić i sur., 2009).

Priprema uzorka

Za potrebe određivanja ukupnih polifenola uzorke je potrebno prethodno razrijediti. Za potrebe određivanja ukupnih polifenola u vodenom ostatku nakon provedene Clevenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni (1:4). Kod određivanja ukupnih polifenola u hidrolatima uzorci nisu razrijeđeni.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetirano je redom 125 μL prethodno razrijeđenog uzorka, 625 μL Folin-Ciocalteu reagensa i 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute dodano je 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sve zajedno pomiješano je pomoću Vortexa, a potom su uzorci termostatirani 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ u kupelji. Nakon toga je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način pripremljena je i slijepa proba, ali je umjesto uzorka uzeto otapalo za ekstrakciju.

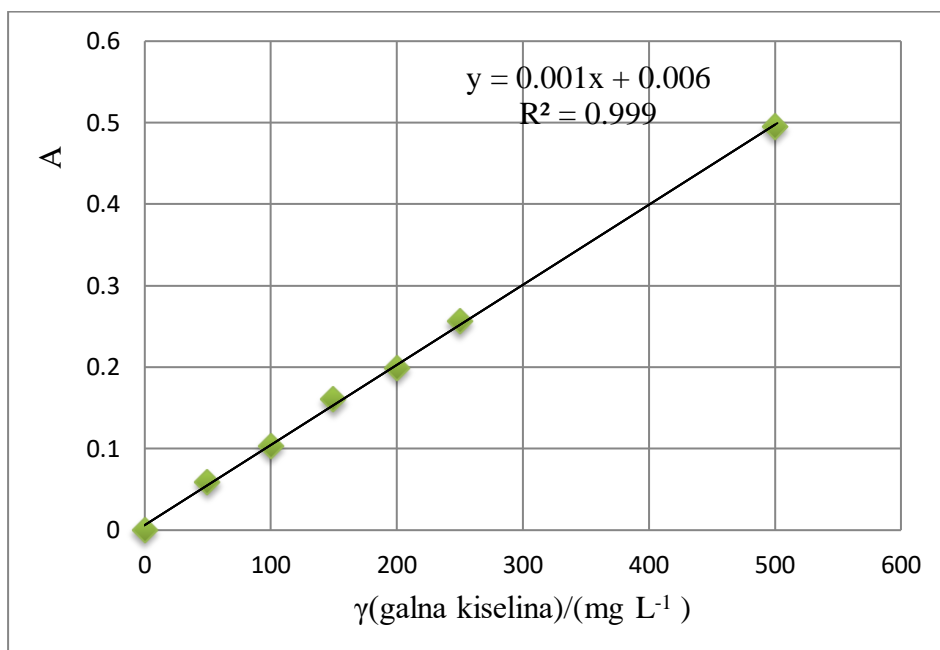
Izrada baždarnog pravca

Za pripremu baždarnog pravca odvagano je 250 mg galne kiseline. Odvaga je otopljena u 10 mL 96%-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 50 mL, koja je nadopunjena deioniziranom vodom do oznake. Od te otopine galne kiseline napravljena su razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da je otpipetirano redom 1, 2, 3, 4, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline. Koncentracije kiseline u tikvicama iznose 50, 100, 150, 200, 250 i 500 mgL^{-1} . Od svakog razrjeđenja otpipetirano je 125 μL standarda u staklene epruvete, 625 μL F.C. reagensa (1:2) i 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute dodano je 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Sadržaj epruvete promiješan je na Vorteks miješalici, a potom su uzorci termostatirani 25 minuta pri $T=50^{\circ}\text{C}$ u kupelji. Za slijepu probu uzeto je 100 μL destilirane vode. Naposljetku je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (tablica 1) nacrtan je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (mgL^{-1}) pomoću programa Microsoft Excel (slika 1). Prema dobivenoj jednadžbi pravca izračunat je maseni udio ukupnih polifenola. Maseni udjeli ukupnih polifenola izraženi su kao ekvivalent galne kiseline ($\text{mg GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ suhe biljke).

Tablica 1. Masene koncentracije standardnih otopina galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 765 nm

γ (mgL ⁻¹)	A (765 nm)
0	0
100	0,103
150	0,160
200	0,199
250	0,256
500	0,495



Slika 1. Baždarni pravac standardne otopine galne kiseline

3.5.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta u ekstraktu bosiljka FRAP metodom
Metoda se temelji na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-
striazina (TPTZ) pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin koji ima

apsorpcijski maksimum pri 593 nm (Shortle i sur., 2014).

FRAP metoda priprada skupini metoda koje se temelje na prijenosu elektrona pri čemu antioksidansi doniraju elektron ne samo slobodnim radikalima, već i metalima i karbonilnim spojevima. Reakcija je popraćena smanjenjem intenziteta obojenja koji je izravno proporcionalan koncentraciji antioksidansa. Reakcija se odvija u kiselom mediju, pri pH 3,6 čime se osigurava dobra topljivost željeza i niži ionizacijski potencijal koji omogućuje prijenos elektrona, a ujedno se povećava i redoks potencijal koji dodatno omogućava pomak reakcije u smjeru prijenosa elektrona (Benzie, 1996; Benzie i Strain, 1996).

Priprema uzorka

Za potrebe određivanja antioksidacijskog kapaciteta uzorke je potrebno prethodno razrijediti. Uzorci vodenog ostatka su razrijeđeni (1:250). Kod određivanja antioksidacijske aktivnosti u hidrolatima dio uzoraka bilo je potrebno razrijediti 10 puta.

Postupak određivanja

U staklene epruvete redom je otpipetirano 1 mL prethodno razrijeđenog ekstrakta i 7,5 mL FRAP reagensa. Sadržaj epruveta dobro je promiješan na Vortex miješalici te je 10 minuta termostatiran na temperaturi od 37 °C. Naposljetku je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini 593 nm. Slijepa proba sadrži sve osim uzorka.

Antioksidacijska aktivnost vodenih ostataka i hidrolata izražena je kao ekvivalent askorbinske kiseline (mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke).

Izrada baždarnog pravca

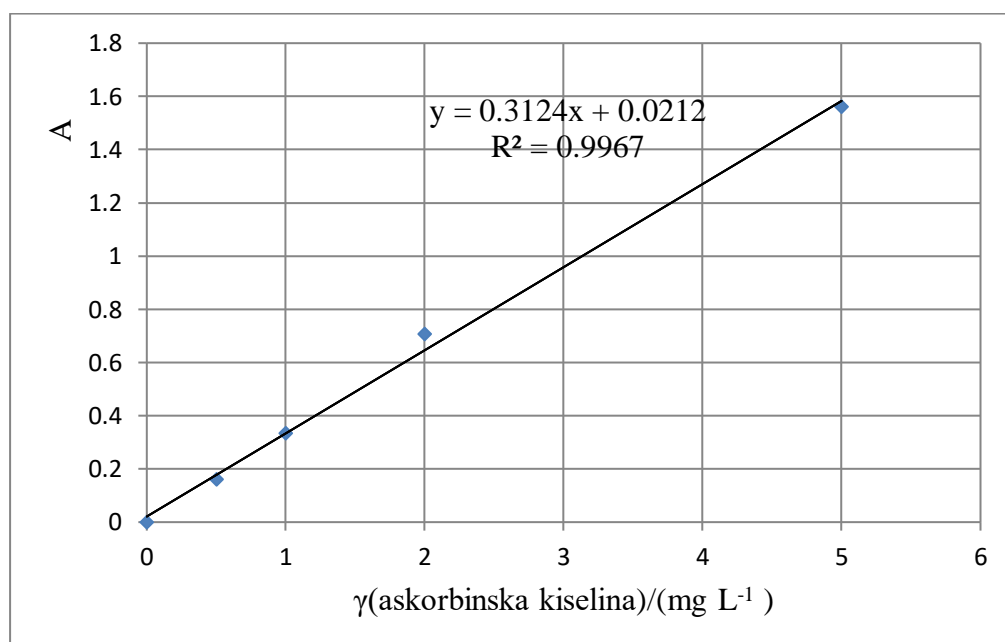
Za pripremu baždarnog pravca pripremljena je otopina askorbinske kiseline u koncentraciji 100 mgL⁻¹ od koje su pripremljena razrjeđenja u koncentracijama 5, 10, 20 i 50 mgL⁻¹ na način da je u odmjerne tikvice redom otpipetirano: 0,5, 1, 2 i 5 mL alikvota otopine askorbinske kiseline te je tikvica do oznake napunjena destiliranom vodom. U staklene epruvete redom je otpipetirano 300 µL otopine standarda i 2250 µL FRAP reagensa. Sadržaj epruveta dobro je promiješan te su 10 minuta termostatirane na temperaturi od 37°C. Zatim je mjerena apsorbancija pri 593 nm. Slijepa proba sadržava sve osim uzorka, umjesto kojeg je dodana destilirana voda. Pomoću programa Microsoft Excel, iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija (tablica 2) nacrtan je baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o masenoj koncentraciji askorbinske kiseline (mgL⁻¹). Iz pripadajuće jednadžbe pravca

izračunata je antioksidacijska aktivnost uzoraka (slika 2).

S obzirom da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} je potreban jedan elektron, dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) potrebno je pomnožiti sa dva.

Tablica 2. Masene koncentracije standardnih otopina askorbinske kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 593 nm

γ (mgL^{-1})	A (593 nm)
0	0
1	0,333
2	0,708
5	1,560



Slika 2. Baždarni pravac standardne otopine askorbinske kiseline

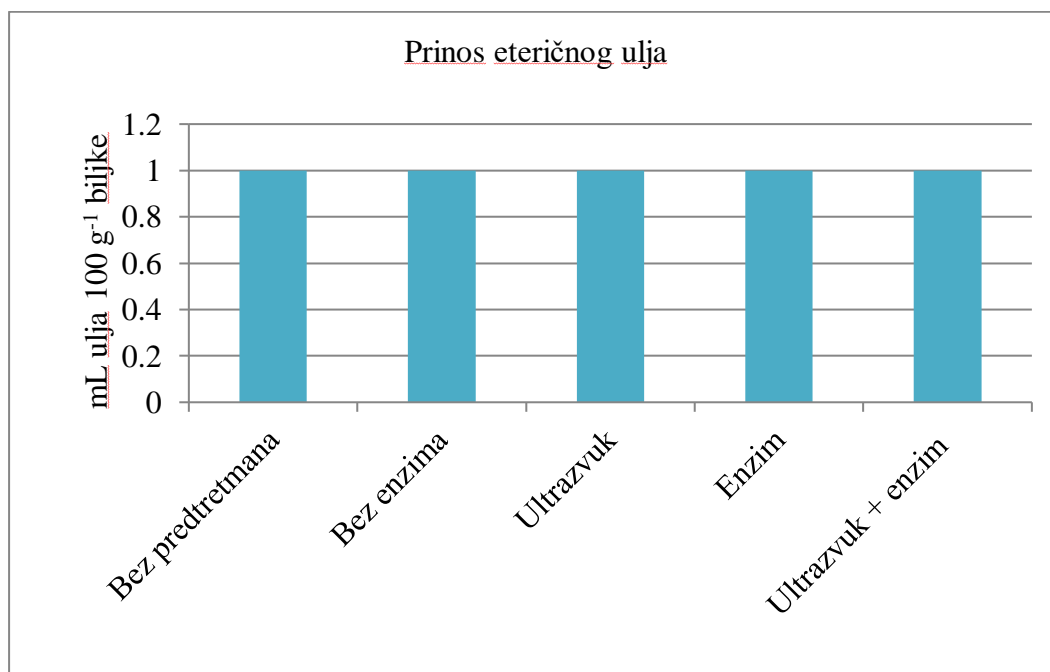
4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti utječu li provedeni predtretmani ultrazvučnom ekstrakcijom, enzimima te kombinacijom oba predtretmana na prinos eteričnog ulja bosiljka. U nusproduktima vodene destilacije, hidrolatima i vodenim ostacima, spektrofotometrijskim su metodama određeni udjeli ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom. Dobivene vrijednosti uspoređene su s negativnim kontrolama koje nisu uključivale predtretman (bez enzima i bez predtretmana). Provedeni su predtretmani:

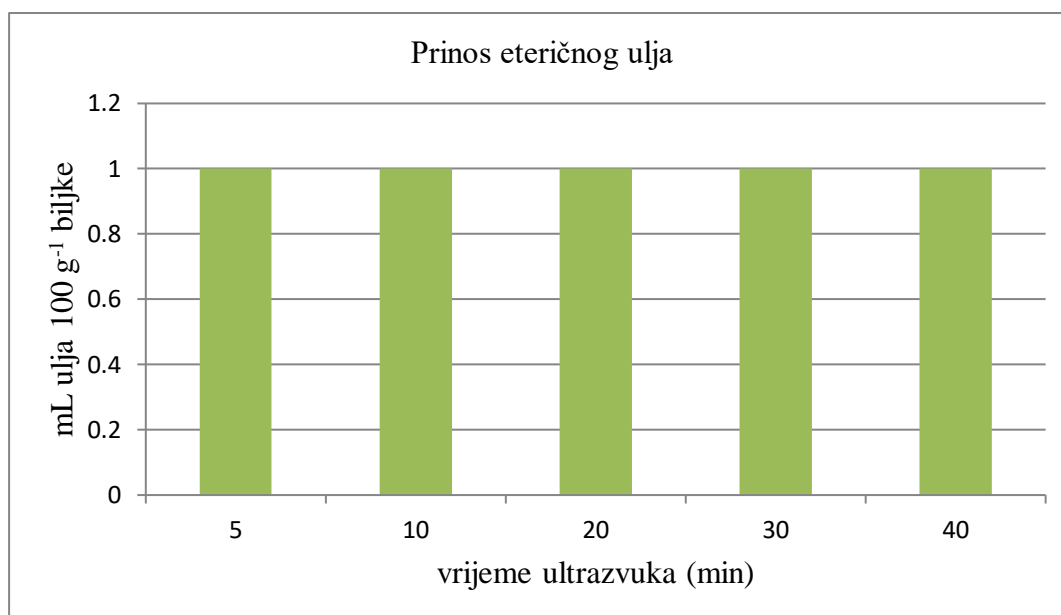
- ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri vremenu trajanja ekstrakcije (5, 10, 20, 30 i 40 min)
- Predtretman enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1) u puferu pH=6,5
- kombinacija predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom od 5 min i predtretman enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1.1) u puferu pH=6,5

4.1. ETERIČNO ULJE

4.1.1. Prinos eteričnog ulja



Slika 3. Prinos eteričnog ulja bosiljka nakon različitih predtretmana (bez predtretmana; bez enzima; ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; predtretman enzimima, predtretman kombinacije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i enzimima)



Slika 4. Prinos eteričnog ulja bosiljka nakon predtretmana ultrazvukom

Na slici 3 prikazani su rezultati udjela eteričnog ulja bosiljka nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru kojoj su prethodili predtretmani (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija enzimima te kombinacija predtretmana ultrazvukom i enzimima) kao i negativne kontrole. Može se zaključiti da neovisno o primjenjenom predtretmanu vodenoj destilaciji po Clevengeru ne dolazi do povećanja prinosa eteričnog ulja bosiljka. Prinos svih uzoraka, uključujući i onog koji nije podvrgnut predtretmanu iznosio je 1 mL 100 g⁻¹ suhe biljke. Dobiveni je rezultat u skladu s literaturom Miljanović i sur. (2020) koji nisu postigli značajnije povećanje prinosa nakon predtretmana enzimima (ksilanaza, celulaza, pektinaza) u odnosu na negativnu kontrolu (bez enzima) u provedenom istraživanju izolacije eteričnog ulja kadulje, lovora i ružmarina. S druge strane, Mahmoudi i sur. (2020) u svojem su istraživanju povećali prinos eteričnog ulja bosiljka koristeći predtretman enzimima za čak 478 %. Slični rezultati zabilježeni su i u prinosu eteričnog ulja sjemenki korijandera (*Coriandrum sativum* L.), gdje je primjenom enzima poboljšana ekstrakcija eteričnih ulja za 44,2 i 40 % (Abbassi i sur., 2018).

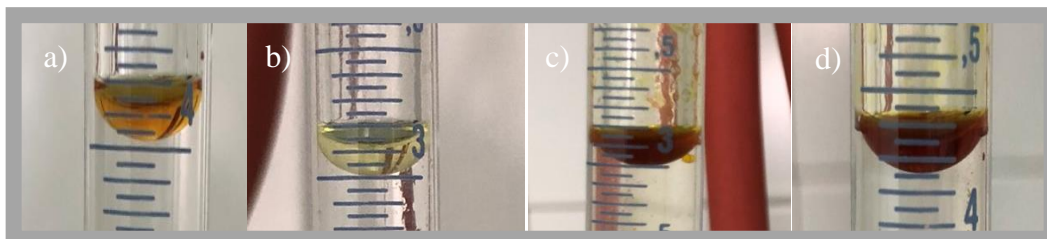
Na slici 4 prikazani su rezultati udjela eteričnog ulja bosiljka nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru kojoj su prethodili predtretmani (ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija u trajanju 5, 10, 20, 30 i 40 min). Predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom nije doprinio povećanju prinosa eteričnog ulja bosiljka bez obzira na produžetak vremena ekstrakcije do 40 minuta. Ovi rezultat nisu u skladu s istraživanjem Miljanović i sur.

(2020), koji su predtretmanom ultrazvukom povećali prinos eteričnog ulja kadulje i lovora za 50 %, a ružmarina za 60 %. Isto tako, predtretman ultrazvukom povećao je prinos eteričnih ulja peperminta, mažurana i rimske kamilice za 12 % (Kowalski i sur., 2015).

Kombinacija predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i enzimima nije rezultirala povećanjem prinosa eteričnog ulja bosiljka. Suprotno tome, ultrazvučno potpomognuta enzimsko ekstrakcija ulja sjemenki perile pokazala se vrlo učinkovitom, sa prinosom od 81.74 %, dok je negativna kontrola koja je uključivala samo ultrazvuk rezultirala prinosom od 50.56 % (Li i sur., 2013).

Na temelju postignutih rezultata nakon provedenih predtretmana ultrazvukom potpomognute ekstrakcije, ekstrakcije enzimima te kombinacije predtretmana ultrazvukom i enzimima, može se zaključiti da u provedenim uvjetima ovi predtretmani nemaju ekonomsku opravdanost jer, osim što zahtijevaju dodatnu potrošnju energije i vremena, cijena enzima je relativno visoka, a djelovanje predtretmana na prinos eteričnog ulja bosiljka nezadovoljavajuće.

4.1.2. Boja eteričnog ulja bosiljka



Slika 5. Boja eteričnog ulja bosiljka nakon provedenih predtretmana: a) bez predtretmana; b) ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija; c) predtretman enzimima; d) ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija uz dodatak enzima

Na slici 5 prikazana je promjena boje eteričnog ulja bosiljka nakon provedenog predtretmana ultrazvukom te enzimima. Na slici 5a je prikazano eterično ulje bosiljka izolirano bez predtretmana koje je svjetlo narančaste boje. Nakon predtretmana ultrazvukom od 5 minuta, boja se promijenila te je prozirno žute boje (5b). Na slici 5c je prikazano eterično ulje nakon predtretmana enzimima te je uočljiva prilično drastična promjena boje ulja u neprozirno smeđu. Ista boja zapažena je kod predtretmana kombinacije ultrazvuka i enzima (5d). Dakle, iako primjenom predtretmana ne dolazi do povećanja prinosa eteričnog ulja bosiljka, različiti

predtretmani rezultiraju promjenom boje eteričnog ulja, što su uočili i Yoswathana i sur. (2012) u istraživanju utjecaja predtretmana na prinos eteričnog ulja agara (*Aquilaria Crassna*). Kada je uzorak agara prije vodene destilacije namočen u različita otapala, nije došlo do promjene boje, već je ona ostala prozirno žuta. Predtretmanom enzimima dobiveno je smeđe-žuto ulje, a predtretmanom ultrazvukom neprozirno žuto ulje. S obzirom da metoda ekstrakcije može utjecati na kemijski sastav eteričnog ulja (Messaoudi i sur., 2021), može se zaključiti da su određeni predtretmani pogodovali oslobađanju nekih kemijskih komponenti koje dovode do različitog obojenja.

Ovo svojstvo promjene boje moglo bi se iskoristiti u prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji, gdje su eterična ulja široko korištena. Dodaju se različitim proizvodima kao izvori prirodnih aroma i boja, a zbog svojih aktivnih sastojaka pridonose i antimikrobnom djelovanju te konzerviranju hrane.

4.2. ODREĐIVANJE MASENOG UDJELA UKUPNIH POLIFENOLA NAKON PROVEDENIH PREDTRETMANA I VODENE DESTILACIJE PO CLEVENGERU

4.2.1. Vodeni ostatak bosiljka

Tablica 4. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela polifenolnih spojeva u vodenom ostatku bosiljka nakon provedenih predtretmana te Clevenger vodene destilacije

w ± SD (mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke)		
Bez predtretmana		1418,75 ± 97,23
Predtretman ultrazvukom	5 min	2118,75 ± 22,10
	10 min	2750,00 ± 291,681
	20 min	2621,88 ± 212,13
	30 min	3062,50 ± 114,91
	40 min	3018,75 ± 662,913
Bez enzima (negativna kontrola)		1718,75 ± 106,07
Predtretman enzimom		3565,63 ± 137,00
Predtretman ultrazvukom i enzimom		3965,63 ± 384,50

U tablici 4 prikazani su rezultati masenog udjela ukupnih polifenola u vodenim ostacima nakon vodene destilacije koji se kreću od 1418,75 do 3965,63 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke. Mahmoudi i sur. (2020) u svojem su istraživanju postigli nešto više vrijednosti masenih udjela ukupnih polifenola u vodenim ostacima bosiljka. Ispitali su utjecaj predtretmana različitih enzima, a najviša vrijednost ukupnih polifenola postignuta je predtretmanom celulazom i iznosila je 47090,00 ± 28,16 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke. Povećane vrijednosti ukupnih polifenola u uzorcima tretiranim enzimima vjerojatno su posljedica pojačane degradacije struktura stanične stjenke, posebno glikozidne veze između fenolnih spojeva i polisaharida stanične stjenke, što u konačnici pridonosi pojačanom razaranju komponenti

stanične stjenke te rezultira boljim otpuštanjem fenolnih spojeva (Ennigrou i sur., 2017). S obzirom da su Mahmoudi i sur. (2020) također provodili ekstrakciju vodenom destilacijom, razlike u vrijednostima mogle su proizaći iz različitih uvjeta provedbe ekstrakcije i predtretmana, različite provedbe analitičkih metoda te razlika u sorti biljke.

Najmanji maseni udio polifenola (1418,75 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke) određen je u uzorku koji nije podvrgnut ni jednoj od metoda predtretmana, predtretman kombinacije ultrazvuka i enzima rezultira najvećim masenim udjelom ukupnih polifenola (3965,63 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke). U istraživanju Tchabo i sur. (2015) kombinacija ultrazvučno-enzimske ekstrakcije također je rezultirala povećanim udjelom polifenolnih spojeva (flavonoida, polifenola, antocijana itd.) u odnosu na samo ultrazvučnu ekstrakciju. Isto su zapazili Nag i Sit (2018), zaključujući da ultrazvučna obrada pomaže u razgradnji staničnih stjenki kore nara, čime supstrat postaje pristupačnijim za enzime što pridonosi lakšem oslobađanju polifenola.

Predtretman ultrazvukom od samo 5 minuta rezultirao je povećanjem masenog udjela ukupnih polifenola, a što je vrijeme ultrazvuka bilo dulje, to je maseni udio ukupnih polifenola bio veći, iako uz blaga odstupanja. Kod ultrazvučnog predtretmana u trajanju 40 minuta postignut je najveći ekstrakcijski kapacitet izolacije ukupnih polifenola (3018,75 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke). Razumljivo je da produženo vrijeme ekstrakcije pogoduje ekstrakciji polifenolnih spojeva (Santos-Buelgai sur., 2012). Međutim, produljenje vremena ultrazvuka ne rezultira uvijek povećanjem udjela ukupnih polifenola kao npr. u provedenom istraživanju u crnom kimu (Moghimii sur., 2018).

Predtretman enzimom je također pokazao značajno povećanje masenog udjela ukupnih polifenola (3565,63 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke) te se pokazao učinkovitijim od predtretmana ultrazvukom u bilo kojem vremenskom intervalu. Nusprodukti vodene destilacije sjemenki korijandera, tretirani enzimima, također su pokazali značajne vrijednosti ukupnih polifenola (Abbassi i sur., 2018).

4.2.2. Hidrolati bosiljka

Tablica 5. Spektrofotometrijsko određivanje masenog udjela polifenolnih spojeva u hidrolatu bosiljka nakon provedenih predtretmana te Clevenger vodene destilacije

w ± SD (mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke)		
Bez predtretmana		37,50 ± 3,54
Predtretman ultrazvukom	5 min	71,25 ± 3,54
	10 min	32,50 ± 1,77
	20 min	46,25 ± 3,54
	30 min	105,00 ± 6,19
	40 min	152,50 ± 4,42
Bez enzima (negativna kontrola)		35,63 ± 0,88
Predtretman enzimom		101,88 ± 0,88
Predtretman ultrazvukom i enzimom		130,62 ± 4,42

U Tablici 5 prikazani su maseni udjeli ukupnih polifenola hidrolata bosiljka koji se kreću od $32,50 \pm 1,77$ do $152,50 \pm 4,42$ mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke. Ove vrijednosti značajno su niže od udjela ukupnih polifenola u vodenim ekstraktima bosiljka. Turrini i sur. (2021) su također zabilježili vrlo niske vrijednosti udjela ukupnih polifenola u hidrolatima lavande.

Ipak, primjenom predtretmana postignute su nešto više vrijednosti ukupnih polifenola u hidrolatima bosiljka. Najviša vrijednost masenog udjela ukupnih polifenola ($152,50$ mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke) postignuta je ultrazvukom od 40 minuta u odnosu na kraće vrijeme ekstrakcije. Predtretman ultrazvukom od 40 minuta pokazao se boljim i od predtretmana enzimom ($101,88$ mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke). Pregledom literature, ultrazvučna ekstrakcija također se pokazala učinkovitijom od enzimske na ekstrakciju vitamina C i ukupnih

polifenola iz acerole (*Malpighia glabra*L.) (Le, H.V. i Le, V.V.M., 2012). Predtretman enzimom i kombinacije ultrazvuka enzima također su se pokazali uspješni pri ekstrakciji fenolnih spojeva u hidrolatu bosiljka (130,62 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke) što je značajno više od kontrolnog uzorka (37,50 mg GAE 100 g⁻¹ suhe biljke). Može se zaključiti da provedeni predtretmani, naročito ultrazvučnom ekstrakcijom značajno pridonose povećanju masenog udjela ukupnih polifenola u hidrolatu bosiljka.

4.3. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI NAKON PROVEDENIH PREDTRETMANA I VODENE DESTILACIJE PO CLEVENGERU

4.3.1. Vodeni ostatak bosiljka

Tablica 6. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti u vodenom ostatku bosiljka

w ± SD (mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke)		
Bez predtretmana	134,75 ± 0,00	
Predtretman ultrazvukom	5 min	100,39 ± 0,02
	10 min	382,13 ± 0,00
	20 min	516,88 ± 0,03
	30 min	462,58 ± 0,00
	40 min	524,93 ± 0,01
Bez enzima (negativna kontrola)	117,66 ± 0,03	
Predtretman enzimom	701,92 ± 0,00	
Predtretman ultrazvukom i enzimom	852,76 ± 0,06	

U Tablici 6 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti vodenog ostatka zaostalog nakon provedene destilacije po Clevengeru kojoj su prethodili predtretmani biljnog materijala

ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima. Antioksidacijska aktivnost vodenog ostatka bosiljka kreće se u rasponu od 100,39 do 852,76 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da na povećanje antioksidacijske aktivnosti u najvećoj mjeri utječu predtretmani provedeni enzimima. Mahmoudi i sur. (2020) također su zabilježili pozitivan utjecaj enzima na antioksidacijsku aktivnost vodenog ostatka bosiljka, a isto je zabilježeno i u vodenim ostacima sjemenki korijandera (Abbassi i sur., 2018). Nakon predtretmana enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza) dolazi do značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti vodenog ostatka bosiljka (701,92 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke, a priključimo li predtretman ultrazvukom, antioksidacijska aktivnost se još dodatno povećala (852,76 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke) u odnosu na kontrolni uzorak (134,75 AAE 100 g⁻¹ suhe biljke). Uslijed provedenog predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti već nakon 10 minuta u odnosu na negativnu kontrolu (bez predtretmana). Rezultati su skladu s istraživanjem Sandhu i sur. (2021), koji su, koristeći ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, zabilježili značajan porast antioksidacijske aktivnosti u nusproduktima vodene destilacije kore citrusa.

Može se primijetiti da uzorak vodenog ostatka koji je podvrgnut kombinaciji predtretmana ultrazvukom uz dodatak enzima ima najveći maseni udio ukupnih polifenola te najjaču antioksidacijsku aktivnost, a sličan trend uočljiv je i u drugim uzorcima. Brojna istraživanja pokazuju kako je antioksidativna aktivnost biljnih materijala, uključujući voće i povrće, snažno povezana sa sadržajem ukupnih polifenola (Huang i sur., 2012). Snažna korelacija antioksidacijske aktivnosti i fenolnih spojeva uočena je i u nusproduktima vodene destilacije bosiljka, sugerirajući da su upravo fenolni spojevi glavni izvor antioksidacijske aktivnosti (Mahmoudi i sur., 2020).

4.3.2. Hidrolat bosiljka

Tablica 7. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti u hidrolatu bosiljka

$w \pm SD$ (mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke)		
Bez predtretmana		3,15 ± 1,02
Predtretman ultrazvukom	5 min	3,56 ± 0,02
	10 min	4,02 ± 0,01
	20 min	4,04 ± 0,01
	30 min	4,04 ± 0,01
	40 min	4,29 ± 0,08
Bez enzima (negativna kontrola)		3,43 ± 0,05
Predtretman enzimom		10,13 ± 0,07
Predtretman ultrazvukom i enzimom		17,79 ± 0,96

U Tablici 7 prikazani su rezultati antioksidacijske aktivnosti hidrolata bosiljka nakon provedene vodene destilacije po Clevengeru kojoj su prethodili predtretmani biljnog materijala ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima. Antioksidacijska aktivnost hidrolata bosiljka kreće se u rasponu od 3,15 do 17,79 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da na povećanje antioksidacijske aktivnosti u najvećoj mjeri utječu provedeni predtretmani enzimima. Nakon predtretmana enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza) dolazi do značajnog povećanja antioksidacijske aktivnosti hidrolata bosiljka (10,13 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke), a priključimo li predtretman ultrazvukom antioksidacijska aktivnost se još dodatno povećala (17,79 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke) u odnosu na kontrolni uzorak (3,15 mg AAE 100 g⁻¹ suhe biljke). Uslijed provedenog pretretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom ne dolazi do značajnijeg povećanja antioksidacijske aktivnosti hidrolata bosiljka bez obzira na produženje vremena ekstrakcije sa 5 na 40 minuta u odnosu na negativnu kontrolu (bez predtretmana).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Predtretmani koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clevegeru – predtretman ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1) te kombinacijom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i enzimima, nisu doveli do povećanja prinosa eteričnog ulja bosiljka. Udio izoliranog eteričnog ulja bosiljka bez obzira na provedeni predtretman i negativnu kontrolu iznosi 1 mL 100 g⁻¹ suhe biljke.
2. Iako nije došlo do povećanja prinosa eteričnog ulja bosiljka nakon provedenih predtretmana koji su prethodili vodenoj destilaciji po Clevegeru, došlo je do promjene boje eteričnog ulja nakon pretretmana enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1) i predtretmana ultrazvukom u odnosu na kontrolni uzorak.
3. Predtretmani ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom te enzimima (ksilanaza-pektinaza-celulaza, 1:1:1), kao i kombinacija ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i enzimima, nisu imali učinak na povećanje prinosa eteričnog ulja bosiljka, ali pozitivno su utjecali na masene udjele ukupnih polifenola i antioksidacijske aktivnosti vodenih ostataka i hidrolata bosiljka. Najučinkovitijim se pokazao predtretman kombinacije ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i enzimima.
4. Iako nusprodukti u izolaciji eteričnog ulja bosiljka predstavljaju otpad, vodeni ostatak i hidrolat vrijedan su izvor polifenola kojima je dokazana antioksidacijska aktivnost.
5. Nusprodukti vodene destilacije bosiljka, posebice vodeni ostaci, zahvaljujući visokim udjelima ukupnih polifenola i dokazanom antioksidacijskom aktivnosti, imaju značajan farmakološki potencijal koji se može iskoristiti u prehrambenoj ili kozmetičkoj industriji.

6. POPIS LITERATURE

Abbassi A, Mahmoudi H, Zaouali W, M'rabet Y, Casabianca H, Hosni K. (2018). Enzyme-aided release of bioactive compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds and their residue by-products and evaluation of their antioxidant activity. *Journal of food science and technology*, **55**(8), 3065-3076.

Aires A, Dias C, Carvalho R, Saavedra MJ. (2017). Analysis of glycosylated flavonoids extracted from sweet-cherry stems, as antibacterial agents against pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Acta Biochimica Polonica*, **64**(2), 265-271.

Ansari MA, Anurag A, Fatima Z, Hameed S.(2013). Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. Microbial pathogens and strategies for combating them: *Science, technology and education*, **1**, 1189-1195.

Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F i sur. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, **117**(4), 426-436.

Baig S, Farooq R, Rehman F.(2010) Sonochemistry and its industrial applications. *World Applications Sciences Journal*, **10**: 936–944.

Ballard CR, Junior MR. (2019). Health benefits of flavonoids. *Bioactive compounds*, Woodhead Publishing. (str. 185-201). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814774-0.00010-4>.

Benzie IFF. (1996). Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *International journal of food sciences and nutrition*, **47**(3), 233-261.

Benzie IF, Strain JJ. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, **239**(1), 70-76.

Bhuyan DJ, Basu A. (2017). Phenolic compounds potential health benefits and toxicity. Utilisation of bioactive compounds from agricultural and food waste, CRC Press, str. 27-59.

Butnariu M, Sarac I. (2018). Essential Oils from Plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*. **1**. 35-43. 10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489.

Caleja C, Ribeiro A, FilomenaBarreiro M, Ferreira I. (2017). Phenolic compounds as nutraceuticals or functional food ingredients. *Current pharmaceutical design*, **23**(19), 2787-2806.

Cares MG, Vargas Y, Gaete L, Sainz J, Alarcón J. (2010) Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Physical Procedia*, **3**: 169–178. doi: 10.1016/j.phpro.2010.01.024.

Cook CM, Lanaras T. (2016). Essential Oils: Isolation, Production and Uses. 10.1016/B978-0-12-384947-2.00261-0.

Ennigrou A, Casabianca H, Laarif A, Hanchi B, Hosni K. (2017). Maturation-related changes in phytochemicals and biological activities of the Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) fruits. *South African Journal of Botany*, **108**, 407-415.

Fischer UA, Carle R, Kammerer DR. (2013) Thermal stability of anthocyanins and colourless phenolics in pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and model solutions. *Food Chem.*, **138**, 1800-1809.

Fu Z, Wang H, Hu X, Sun Z, Han C. (2013). The pharmacological properties of Salvia essential oils. *Journal of applied pharmaceutical science*, **3**(7), 122-127.

Gardossi L, Poulsen PB, Ballesteros A, Hult K, Švedas VK, Vasić-Rački Đ. i sur. (2010). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends in biotechnology*, **28**(4), 171-180.

Giada, M. D. L. R. (2013). Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants, 87-112.

Grayer R, Kite JGC, Veitch NC, Eckert MR, Marin PD, Senanayake P. (2002). Leaf flavonoid glycosides as chemosystematic characters in *Ocimum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**:327-342

Gülçin I, Elmastaş M, Aboul-Enein HY. (2007) Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytother Res.* **21**(4):354-61. doi: 10.1002/ptr.2069. PMID: 17221941.

Huang WY, Zhang HC, Liu WX, Li CY. (2012). Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *Journal of Zhejiang University Science B*, **13**(2), 94-102.

Jakopic J, Veberic R. (2009). Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. *Acta Agriculturae Slovenica*, **93**(1), 11.

Javanmardi J, Khalighi A, Kashi A, Bais HP, Vivanio JM. (2002). Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **50**, 5878–5883

Klimánková E, Holadová K, Hajšlová J, Cajka T, Poustka J, Koudela M. (2007). Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*. **107**. 464-472. 10.1016/j.foodchem.2007.07.062.

Kowalski R, Kowalska G, Jamroz J, Nawrocka A, Metyk D. (2015). Effect of the ultrasound-assisted preliminary maceration on the efficiency of the essential oil distillation

from selected herbal raw materials. *Ultrasonics sonochemistry*, **24**, 214-220.

Krüger H, Wetzels SB, Zeiger B (2002) The chemical variability of *Ocimum* species. *J Herbs Spices Med Plants* **9**(4):335–344

Kwee EM, Niemeyer ED. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, **128**(4), 1044-1050.

Lawrence BM. (1998): Basil oil. – *Perfum. Flavor* **23** (6): 35– 48

Le H, Le V. (2012). Comparison of enzyme-assisted and ultrasound-assisted extraction of vitamin C and phenolic compounds from acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. *International Journal of Food Science & Technology*. **47**. 1206-1214. 10.1111/j.1365-2621.2012.02960.x.

Li Y, Zhang Y, Xiaonan S, Zhang Y, Feng H, Jiang L. (2013). Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of oil from perilla (*Perilla frutescens* L.) seeds. *CyTA - Journal of Food*. **12**. 1-6. 10.1080/19476337.2013.782070.

Mahmoudi H, Marzouki M, M'Rabet Y, Mezni M, Ouazzou AA, Hosni K. (2020). Enzyme pretreatment improves the recovery of bioactive phytochemicals from sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves and their hydrodistilled residue by-products, and potentiates their biological activities. *Arabian Journal of Chemistry*, **13**(8), 6451-6460.

Marotti M, Piccaglia R, Giovanelli E (1996). Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**(12), 3926-3929.

Messaoudi M, Rebiai A, Sawicka B, Atanassova M, Ouakouak H, Larkem I i sur. (2021). Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological

Activities of Essential Oil and Extracts of *Mentha pulegium* L. *Molecules*, **27**(1), 11.

Miljanović A, Bielen A, Grbin D, Marijanović Z, Andlar M, Rezić T, i sur.(2020). Effect of enzymatic, ultrasound, and reflux extraction pretreatments on the yield and chemical composition of essential oils. *Molecules*, **25**(20), 4818.

Moghimi M, Farzaneh V, Bakhshabadi H. (2018). The effect of ultrasound pretreatment on some selected physicochemical properties of black cumin (*Nigella Sativa*). *Nutrire*, **43**(1), 1-8.

Nag S, Sit N.(2018) Optimization of ultrasound assisted enzymatic extraction of polyphenols from pomegranate peels based on phytochemical content and antioxidant property. *Food Measure* **12**, 1734–1743 <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9788-2>.

Pandey V, Patel A, Patra D.D.(2016) Integrated nutrient regimes ameliorate crop productivity, nutritive value, antioxidant activity and volatiles in basil (*Ocimum basilicum* L.), *Industrial Crops and Products*, 87. izd., str. 124-131, ISSN 0926-6690,<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.035>

Peñarrieta J. M., Tejeda L, Mollinedo P, Vila J. L., Bravo J. A. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista boliviana de química*, **31**(2), 68-81.

Prasad KN, Yang E, Yi C, Zhao M, Jiang Y. (2009). Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **10** (2), 155-159.

Prinsi B, Morgutti S, Negrini N, Faoro F, Espen, L. (2019). Insight into composition of bioactive phenolic compounds in leaves and flowers of green and purple basil. *Plants*, **9**(1), 22.

Puri M, Sharma D, Barrow C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from

plants. *Trends in biotechnology*, **30**(1), 37-44.

Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A.(2012) Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* **27**, 76–89.

Raina P, Deepak M, Chandrasekaran CV, Agarwal A, Wagh N, Kaul-Ghanekar R.(2016) Comparative analysis of anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Ocimum basilicum* (basil) in RAW264.7, SW1353 and human primary chondrocytes in respect of the management of osteoarthritis, *Journal of Herbal Medicine*, 6 izd., str. 28-36, ISSN 2210-8033, <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.01.002>

Raut JS, Karuppayil SM.(2014) A status review on the medicinal properties of essential oils, *Industrial Crops and Products*, 62. izd., str. 250-264, ISSN 0926-6690, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.055>.

Richa R, Kumar R, Shukla R.M., Khan K. (2020). Ultrasound assisted essential oil extraction technology: New boon in food industry. *SKUAST J. Res*, **22**, 78-85.

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. (1999) Phenolic Compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, **66**, 401-436.

Sandhu HK, Sinha P, Emanuel N, Kumar N, Sami R, Khojah E, Al-Mushhin AA. (2021). Effect of ultrasound-assisted pretreatment on extraction efficiency of essential oil and bioactive compounds from citrus waste by-products. *Separations*, **8**(12), 244.

Santos-Buelga C, Gonzalez-Manzano S, Dueñas M, Gonzalez-Paramas A. M. (2012). Extraction and isolation of phenolic compounds. *Natural products isolation*, 427-464.

Shortle E, O'grady MN, Gilroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP. (2014). Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat science*, **98**(4), 828-834.

Singleton VL, Rossi JA. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, **16**(3), 144-158.

Tchabo W, Ma Y, Engmann FN, Zhang H. (2015). Ultrasound-assisted enzymatic extraction (UAEE) of phytochemical compounds from mulberry (*Morus nigra*) must and optimization study using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, **63**, 214-225.

Teofilović B, Grujić-Letić N, Gligorić E, Mrkonjić Z (2018). Antioxidant profile of basil extracts (*Ocimum basilicum* L.). In *IV International congress Food technology, quality and safety*. Institute of Food Technology, Novi Sad (Serbia).

Turrini F, Beruto M, Mela L, Curir P, Triglia G, Boggia R. i sur. (2021). Ultrasound-assisted extraction of lavender (*Lavandula angustifolia* miller, cultivar rosa) solid by-products remaining after the distillation of the essential oil. *Applied Sciences*, **11**(12), 5495.

Yoswathana, Nuttawan. (2013). Extraction of agarwood (*Aquilaria crassna*) oil by using supercritical carbon dioxide extraction and enzyme pretreatment on hydrodistillation. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. **11**. 1055-1059.

Izjava o izvornosti

Ja Katja Blažević izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.



Vlastoručni potpis