

Izolacija eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) vodenom destilacijom uz primjenu predtretmana ultrazvukom i enzimima

Nikin, Lucija

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:159:318152>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



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

Lucija Nikin
0058215467

Izolacija eteričnog ulja ružmarina (*Rosmarinus officinalis* 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 ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.) vodenom destilacijom uz primenu predtretmana ultrazvukom i enzimima

Lucija Nikin, 0058215467

Sažetak:

Cilj rada bio je ispitati utjecaj predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom, enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1) te kombinaciju ova dva predtretmana na prinos eteričnog ulja ružmarina dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru. Utvrđeno je da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (5 i 10 minuta) povećava prinos eteričnoga ulja do 50 %, dok kombinacija predtretmana ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom uz dodatak enzima doprinosi povećanju do 25 %. Nadalje, ispitivao se utjecaj navedenih predtretmana na maseni udio ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost vodenih ostataka i hidrolata ružmarina. Primijenjeni predtretmani nisu značajno doprinijeli povećanju masenog udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti u vodenim ostacima. Nusprodukti vodene destilacije dobar su izvor fenolnih spojeva s dokazanom antioksidacijskom aktivnosti. U hidrolatima, predtretman ultrazvukom povećao je maseni udio ukupnih fenola, dok je predtretman ultrazvukom uz dodatak enzima povećao antioksidacijsku aktivnost. Primjena predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom rezultira povećanjem prinosa eteričnog ulja već nakon 5 minuta te predstavlja ekonomski i ekološki prihvatljivi predtretman vodenoj destilaciji eteričnog ulja ružmarina.

Ključne riječi: ekstrakcija, enzimi, ultrazvuk, ružmarin, ulje

Rad sadrži: 33 stranica, 4 slika, 8 tablica, 59 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Maja Dent

Datum obrane: 19. 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 rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) by hydrodistillation with the use
of ultrasound and enzyme pretreatment

Lucija Nikin, 0058215467

Abstract:

The aim of the study was to examine the influence of ultrasound-assisted extraction, enzyme-assisted extraction (xylanase, pectinase, cellulase, 1:1:1) and the combination of these two pretreatments on the yield of rosemary essential oil after Clevenger hydrodistillation. It was found that ultrasound-assisted extraction (5 and 10 minutes) increases yield of essential oil up to 50 %, while the combination of pretreatment with extraction assisted by ultrasound with the addition of enzymes contributes to an increase of up to 25%. Furthermore, the influence of the mentioned pretreatments on the total phenolic content and antioxidant activity of aqueous residues and hydrolates was examined. The applied pretreatments did not significantly contribute to the increase in the total phenolic content and antioxidant activity in the samples of aqueous residues. Byproducts of hydrodistillation are a good source of phenolic compounds with proven antioxidant activity. In hydrolates, ultrasound pretreatment increased the total phenolic content, while ultrasound pretreatment with the addition of enzymes increased the antioxidant activity. The use of ultrasound-assisted extraction pretreatment results in an increase in the yield of essential oil after only 5 minutes and represents an economically and environmentally acceptable method of extracting rosemary essential oil.

Keywords: extraction, enzymes, ultrasound, rosemary, oil

Thesis contains: 33 pages, 4 figures, 8 tables, 59 references

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, Assistant Professor

Thesis defended: September 19, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. RUŽMARIN.....	2
2.2. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	3
2.3. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA	3
2.3.1. KEMIJSKI SASTAV	3
2.4. METODE IZOLACIJE ETERIČNOG ULJA	4
2.4.1. CLEVENGER VODENA DESTILACIJA.....	4
2.4.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ENZIMIMA	5
2.4.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ULTRAZVUKOM	5
2.4.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA ULTRAZVUKOM I ENZIMIMA.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	7
3.1. MATERIJALI.....	7
3.2. METODE	10
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
5. ZAKLJUČCI	28
6. POPIS LITERATURE	29

1. UVOD

Ružmarin (*Rosmarinus officinalis* L.) je grmolika, samonikla, zimzelena biljka koju odlikuju igličasti listovi i ljubičasto-plavi cvjetovi. Ova biljka karakteristična je za područje Mediterana te se koristi u kulinarstvu kao začim, a ekstrakti i eterična ulja ružmarina također se koriste u narodnoj medicini, prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, uglavnom zbog svojih antioksidacijskih i protuupalnih svojstava koja se pripisuju prisutnosti karnozola, karnozne i ružmarinske kiseline (De Macedo i sur., 2020).

Najčešći način izolacije eteričnog ulja ružmarina je vodena destilacija listova, no u zadnje vrijeme istražuju se metode izolacije koje će skratiti vrijeme ekstrakcije uz smanjenje troškova pripreme uzoraka s ciljem dobivanja većih prinosa eteričnog ulja. Kako bi se povećao prinos eteričnog ulja koriste se i različiti predtretmani neposredno prije vodene destilacije biljke. Neke od novijih metoda predtretmana koje se sve češće koriste su ekstrakcija potpomognuta enzimima te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Ekstrakcija potpomognuta enzimima koristi se kako bi se olakšalo izdvajanje eteričnog ulja iz stanica biljke što se postiže djelomičnom ili potpunom hidrolizom strukture stanica biljke. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na kavitaciji zbog koje dolazi do narušavanja i razgradnje strukture stanične stijenke te do lakšeg izdvajanja eteričnog ulja. Na prinos eteričnog ulja i na sastav ulja utječu procesni parametri primijenjene metode ekstrakcije koja prethodi vodenoj destilaciji.

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj različitih predtretmana (ultrazvučni, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima) neposredno prije vodene destilacije po Clevengeru na prinos izoliranog eteričnog ulja iz osušenih listića ružmarina. Predtretmani koji su korišteni su predtretman enzimima (ksilanaza, celulaza i pektinaza, 1:1:1) te predtretman ultrazvukom u različitim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30 i 40 minuta) sa ili bez enzimske predobrade. Navedeni predtretmani provedeni su u različitim otapalima: u pročišćenoj vodi i puferu pH vrijednosti 6,5. U proizvodnji eteričnih ulja zaostaju značajne količine vodenog ostatka i hidrolata te je u dobivenim nusproduktima ispitan utjecaj provedenih predtretmana na udio ukupnih fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. RUŽMARIN

Ružmarin je višegodišnja, grmolika, zimzelena biljka iz porodice Lamiaceae. Može narasti do 3 m visine, grane mogu biti uspravne ili polegnute te na njima rastu brojni zeleni, igličasti, kožasti listići. Listići su s gornje strane zeleni, a s donje strane sivkasto-zeleni te sadrže žlijezde ispunjene eteričnim uljem (minimalno 1,2 %). Ljubičasto-plavi cvjetovi cvjetaju od ožujka do listopada formirani u cvatovima u pazušcima listova. Plodovi su duguljasti, glatki i smečkasti te sadrže slobodne sjemenke. Za razliku od drugih biljaka i porodice Lamiaceae, ružmarin se dijeli na samo 3 podvrste: *Rosmarinus officinalis* L. (najrasprostranjenija od tri podvrste, autohtono prisutna u Hrvatskoj, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori, Portugalu, Španjolskoj, Francuskoj, Italiji, Grčkoj, Albaniji, sjeverozapadnoj Africi, Cipru i Turskoj, ali može se naći i po središnjoj Americi), *Rosmarinus eriocalyx* Jord. i Fourr. (sjeverozapadna Afrika i Španjolska) i *Rosmarinus tomentosus* Hub. – Mor. i Maire. (Iberijski endem, porijeklom iz Andaluzije). (Hammer i Junghanns, 2020).

U nekoliko istraživanja utvrđeno je da ekstrakti ružmarina pokazuju različite biološke aktivnosti poput hepaprotektivnog, antifungalnog, antivirusnog, antitumornog, protuupalnog, insekticidnog, antioksidativnog i antibakterijskog djelovanja. Navedene aktivnosti možemo uvelike pripisati fenolnim spojevima te se odnose na eterično ulje ružmarina kao i na ekstrakte. (De Macedo i sur., 2020; Nieto i sur., 2018). Ekstrakt ružmarina također je pokazao snažan antidijabetički učinak zahvaljujući svojim polifenolnim komponentama kao što su ružmarinska kiselina, karnozol i karnozna kiselina. (Abdel Raouf i Mohamed, 2019). Osim antidijabetičkog učinka, ekstrakt ružmarina može biti dobra alternativa pri liječenju neurodegenerativnih bolesti (Alvi i sur., 2019). Karnozna i ružmarinska kiselina u ekstraktu ružmarina mogu se koristiti kao nutraceutici za potencijalno pojačavanje učinka drugih spojeva. Također može koristiti kao alternativni dodatak hrani za odgađanje bakterijskog kvarenja hrane i za inhibiciju patogenih bakterija kao što je *Listeria monocytogenes*. (Munekata i sur., 2020)

Zbog svojih ljekovitih svojstava ružmarin se koristi i u narodnoj medicini kao oralni pripravak za ublažavanje bubrežnih kolika, dismenoreje i grčeva mišića te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kod proizvodnje kozmetičkih proizvoda koji pomažu pri sprječavanju starenja kože, oštećenja nastalih izloženosti UV zračenju te kod celulita (De Macedo i sur., 2020).

2.2. FENOLNI SPOJEVI I ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Biljke sintetiziraju razne sekundarne metabolite kao što su fenolni spojevi, koji sudjeluju u zaštitnom mehanizmu biljke te služe za sprječavanje oksidativnog stresa. Fenolni spojevi predstavljaju jednu od najbitnijih skupina prirodnih antioksidansa te su usko povezani s antioksidacijskom aktivnošću biljnih tkiva. Antioksidacijska aktivnost fenolnih spojeva kombinacija je različitih mehanizama kao što su hvatanje slobodnih radikala, donaciju atoma vodika i keliranje metalnih iona (Chrysargyris i sur., 2020).

Ružmarin je bogat izvor fenolnih spojeva koji se mogu naći u biljnim ekstraktima te u manjoj mjeri u eteričnom ulju. U biljnim ekstraktima ružmarina su glavni polifenolni spojevi fenolne kiseline među kojima su: karnozna kiselina, karnozol, ružmarinska kiselina (Nieto i sur., 2018), te flavonoidi.

2.3. ETERIČNO ULJE RUŽMARINA

Eterično ulje nalazi se u žlijezdama za izlučivanje koje se nalaze u cvjetovima ili listovima ružmarina. Može se ekstrahirati iz oba izvora te je eterično ulje iz listova češće bolje kvalitete (Anh i sur., 2019; Lo Presti i sur., 2005).

Eterično ulje ružmarina ima sposobnost ublažavanja simptoma uzrokovanih respiratornim poremećajima, stimulira rast kose, smanjuje stres i koristi se za liječenje reumatoidnih bolesti (Anh i sur., 2019). Također se koristi kao začim u mesnim jelima, salamama i umacima te se zbog svojih aromatičnih svojstava koristi u proizvodnji parfema i kao komponenta dezinfekcijskih sredstava i insekticida (Lo Presti i sur., 2005).

2.3.1. KEMIJSKI SASTAV

Na kemijski sastav eteričnog ulja ružmarina utječu mnogi čimbenici uzgoja biljke poput klimatskih uvjeta, geografskog položaja, nadmorske visine te pedoloških svojstava, a najviše utječu srednja mjesečna i godišnja temperatura, odnosno njihov raspon (Lakušić i sur., 2012). Na kemijski sastav i prinos eteričnog ulja utječe i primijenjena metoda ekstrakcije, dio biljke iz kojeg se izolira eterično ulje, razdoblje kada je biljka ubrana, starost biljke i genetički sastav (Anh i sur., 2019; Lo Presti i sur., 2005).

Anh i sur. (2019) ukazali su na to da je prinos eteričnog ulja znatno niži za ekstrakciju eteričnog ulja iz osušenih listova ružmarina (1,2 mL/g), u odnosu na svježe listove (3,16 mL/g), ali da to ne mijenja krajnji sastav eteričnog ulja, niti njegovu antioksidacijsku aktivnost.

U eteričnom ulju ružmarina su najzastupljeniji oksigenirani monoterpeni i seskviterpeni. Glavni spojevi koji se nalaze u eteričnom ulju ružmarina su 1,8-cineol, kamfor, α -pinen, β -pinen, limonen, verbenon, kamfen te borneol (Miljanović i sur., 2020, De Macedo i sur., 2020).

Postoje tri glavna kemotipa eteričnog ulja ružmarina koji su zbog svojih kemijskih svojstava bitni za tržište: kamfor-borneol ulja s približno jednakim omjerima (20-30 %) 1,8-cineola, α -pinena i kamfora, cineol ulja s preko 40 % 1,8-cineola te verbenon ulja koja sadrže do 15 % verbenona. (Hammer i Junghanns, 2020)

2.4. METODE IZOLACIJE ETERIČNOG ULJA

Eterično ulje ružmarina najčešće se dobiva vodenom destilacijom u aparaturi po Clevengeru koja spada u skupinu klasičnih metoda uz maceraciju, ekstrakciju organskim otapalima, Soxhlet ekstrakciju i druge. Nedostaci klasičnih metoda su dugotrajnost metode, moguća niska selektivnost ekstrakcije, razgradnja termolabilnih spojeva zbog nepovoljnih temperatura i upotreba otapala visoke čistoće. U novije vrijeme zbog potrebe za ekološki i ekonomski prihvatljivijim metodama sve češće se istražuju i primjenjuju suvremene metode ekstrakcije eteričnih ulja poput ekstrakcije ultrazvukom, mikrovalovima, enzimima, ionskim tekućinama ili superkritičnim fluidima (Gligor i sur., 2019).

2.4.1. CLEVINGER VODENA DESTILACIJA

Vodena destilacija po Clevengeru je tradicionalna metoda koja se koristi za izolaciju hlapljivih spojeva kao što su eterična ulja iz biljnog materijala. Metoda se zasniva na destilaciji i vrenju aromatične smjese biljke u rekondenziranoj vodenoj pari pri čemu se koriste velike količine vode i energije. Tijekom destilacije biljke otpuštaju eterična ulja isparavanjem zbog izloženosti kipućoj vodi ili pari. Isparavanje ulja temelji se na načelu da su tlakovi pare jednaki tlaku okoline pri temperaturi vrenja pa tako sastojci eteričnog ulja isparavaju na temperaturi bliskoj temperaturi vode, dok su njihova vrelišta inače u rasponu od 200 do 300 °C. Izdvajanje eteričnog ulja olakšano je, jer destilacijom dobivamo dvije tekućine koje se ne miješaju, vodu (hidrolat) i eterično ulje koje pluta na površini vode zbog manje gustoće (Khadhraoui i sur., 2021). Hidrolati koji nastaje kao nusprodukt u proizvodnji eteričnog ulja sličnog je kemijskog sastava kao i eterično ulje. U proizvodnji eteričnog ulja zaostaju značajne količine vodenog ostatka (Aćimović i sur., 2020) koji sadrži značajne količine polifenolnih spojeva (Wollinger i sur., 2016).

2.4.2. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ENZIMIMA

Ekstrakcija potpomognuta enzimima ili EAE (eng. enzyme-assisted extraction) koristi se kako bi se olakšalo izdvajanje eteričnog ulja iz stanica biljke što se postiže hidrolizom strukture stanica biljke i oslobađanjem bioaktivnih spojeva. Temelji se na razgradnji komponenti stanične stijenke biljaka, otpuštanju vezanih fenolnih spojeva ili otpuštanju fenolnih spojeva iz vakuola difuzijom. (Cascaes Teles i sur., 2020; Gligor i sur., 2019)

Hidrolitička svojstva enzimske smjese ovise o sastavu smjese, vrsti enzimske aktivnosti sastojaka smjese te o njihovom omjeru. Efikasnost enzimske ekstrakcije uvelike ovisi o vremenu ekstrakcije, koncentraciji enzima, temperaturi i pH vrijednosti. Vrijeme i koncentracija enzima usko su povezani te će povećanjem koncentracije doći do smanjenja vremena potrebnog za ekstrakciju. Produženo trajanje ekstrakcije enzimima može uzrokovati razgradnju bioaktivnih spojeva zbog dugotrajnog izlaganja pri povišenim temperaturama ili oksidativnim procesima. Enzimska aktivnost se većinom proporcionalno povećava povišenjem temperature te dolazi i do smanjenja viskoznosti što omogućuje bolju topljivost bioaktivnih spojeva. S druge strane izrazito povećane vrijednosti temperature mogu utjecati na enzimsku strukturu, zaustavljanje procesa hidrolize i na razgradnju bioaktivnih spojeva. PH vrijednost je također bitna jer utječe na efikasnost enzima i na staničnu stijenku biljaka.

EAE može se koristiti u kombinaciji s drugim metodama (ionske tekućine, ultrazvuk, mikrovalovi, superkritični fluidi) koje se mogu provesti prije, tijekom ili nakon EAE. Kombinacija metoda dovodi do kraćeg vremena ekstrakcije, korištenja netoksičnih i nezapaljivih otapala koja se često mogu reciklirati, sveukupno pojednostavljenih koraka i prilagodljivih procesnih parametara. U kombinaciji EAE s drugim metodama, omogućuje se bolji kontakt između enzima i supstrata, povećano razbijanje stanica i brži prijenos mase (Gligor i sur., 2019).

2.4.3. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ili UAE (eng. Ultrasound-assisted extraction) temelji se na akustičnoj kavitaciji, dolazi do formiranja, rasta i implozivnog urušavanja mjehurića unutar tekućine te se oslobađa velika količina lokalizirane energije. Rezultat kavitacije su kemijske ili fizičke promjene i miješanje koji potiču procese transporta i smanjuju otpor prijenosu mase u heterogenim sustavima (Nadar i Rathod, 2017). Dolazi do razgradnje stanične stijenke biljaka te do oslobađanja sadržaja stanica i bioaktivnih molekula. Munekata i

sur. (2020) navode kako promjene uzrokovane kavitacijom mogu potaknuti ekstrakciju polifenola zbog povećanja topljivosti i difuzije.

Korištenje ultrazvuka kao predtretmana može smanjiti vrijeme i poboljšati učinkovitost ekstrakcije, povisiti razinu automatizacije, smanjiti potrošnju energije, doprinosi očuvanju okoliša smanjenjem potrošnje vode i otapala, uklanjanjem energije fosilnih goriva i otpadnih voda. (Yu i sur., 2021; Chekoual i sur., 2018)

2.4.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM I ENZIMIMA

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i enzimima ili UAEE (eng. Ultrasound-assisted enzyme extraction) je učinkovita i ekološki prihvatljiva metoda koja daje visoke prinose uz nisku potrošnju energije. Važno je odabrati najbolje radne uvjete kako bi se postigli izvrsni prinosi i smanjila degradacija bioaktivnih spojeva (Khadhraoui i sur., 2021).

Prinos biomolekula nakon UAEE ovisi o parametrima kao što su koncentracija enzima, jakost ultrazvuka, omjer otapala, frekvencija ultrazvuka, radni ciklus te vrijeme ekstrakcije. Proces ekstrakcije biomolekula također se može poboljšati optimiziranjem uvjeta ultrazvučne obrade što dovodi do povećanja enzimske aktivnosti zbog povoljnih promjena konformacije te promjene strukturnog integriteta stanica tretirane biljke (Nadar i sur., 2018), ali se mora paziti na jakost ultrazvuka jer kod velikih snaga dolazi do depolimerizacije, degradacije i smanjenja viskoznosti spojeva zbog čega dolazi do smanjenja prinosa ekstrakcije (Gligor i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Za izolaciju eteričnog ulja koristili su se osušeni listići ružmarina (*Rosmarinus officinalis* L.), ubrani u lipnju 2021. godine u Zagrebu, čuvani na suhom i tamnom mjestu, koji su odvojeni od grančica prije same analize.

3.1.1. KEMIKALIJE I STANDARDI

Enzimi korišteni za ekstrakciju

- Ksilanaza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- Pektinaza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- Celulaza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)

Kemikalije za postupak vodene destilacije

- deionizirana 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 pufera: U čistu laboratorijsku čašu volumena 500 mL odvaži se 4,80 g limunske kiseline, zatim se doda 400 mL pročišćene vode te se miješa na magnetskoj miješalici. Sonda pH-metra uroni se u otopinu te se uz postupnim dodavanjem 2 M otopine natrijeva hidroksida podešava pH-vrijednost otopine do 6,5. Pripremljeni pufer prebaci se u bocu volumena 500 mL te se čuva na hladnom i tamnom mjestu.

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola

- Folin-Ciocalteu reagens
 - Priprema: FC reagens razrijedi se deioniziranom vodom u omjeru 1:2.
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %, w/v)

- 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, $\gamma = 5 \text{ g/L}$
 - Priprema: na analitičkoj vagi ($\pm 0,0001 \text{ g}$) odvaži se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se 10 %-tnim etanolom kvalitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL, otopi i nadopuni do oznake deioniziranom vodom.

Kemikalije i standardi za spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti

- koncentrirana klorovodična kiselina, 37 %, v/v
- klorovodična kiselina, $c = 40 \text{ mM}$
 - Priprema: U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetira se 330 μL 37 %-tne klorovodične kiseline i dopuni deioniziranom vodom do oznake.
- 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ), $c = 10 \text{ mM}$
 - Priprema: Odvaži se 0,0312 g TPTZ-a u plastičnoj čašici i kvantitativno se prenese u odmjernu tikvicu volumena 10 mL te nadopuni do oznake 40 mM klorovodičnom kiselinom.
- željezov (III) klorid heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $c = 20 \text{ mM}$
 - Priprema: U plastičnu čašicu za vaganje odvaži se 0,541 g željezov (III) klorid heksahidrata i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu volumena 100 mL te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- ledena octena kiselina, 99-100 %, v/v
- acetatni pufer ($c = 0,3 \text{ M}$, pH 3,6)
 - Priprema: U plastičnu čašicu za vaganje odvaži se 3,1 g natrij-acetat trihidrata i kvantitativno se prenese pomoću deionizirane vode u odmjernu tikvicu od 1 L, u koju se potom otpipetira 16 mL ledene octene kiseline te se nadopuni deioniziranom vodom do oznake.
- FRAP reagens
 - Priprema: U staklenoj čaši pripremi se FRAP reagens miješanjem acetatnog pufera (0,3 M), TPTZ reagensa i željezo (III)-klorida u omjeru 10:1:1.
- standardna otopina askorbinske kiseline, $\gamma = 100 \text{ mg/L}$

- Priprema: U plastičnoj čašici za vaganje odvaž se 0,100 g askorbinske kiseline i kvantitativno se prenese deioniziranom vodom o odmjernu tikvicu volumena 100 mL, te nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

3.1.2. APARATURA I PRIBOR

- Clevenger aparatura
- analitička vaga (GR-200-EC, A&D Instruments Ltd., Tokyo, Japan)
- tehnička vaga (MK-500C, Chyo, Kyoto, Japan)
- automatske pipete volumena 2 – 1000 μ L (KemoLab d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- 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
- menzura volumena 100 mL
- odmjerne tikvice volumena 10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL i 1000 mL
- propipete
- laboratorijske čaše volumena 250 mL, 500 mL, 800 mL
- plastične laboratorijske čaše volumena 50 mL
- staklene laboratorijske čaše volumena 250 mL i 500 mL
- staklene epruvete
- stakleni lijevak
- stakleni štapići
- termometar
- vodena kupelj

- ultrazvučna sonda (UP200Ht, Hielscher, Njemačka)
- magnetska miješalica (MS-H-S, DLAB Scientific, Peking, Kina)
- vorteks tresilica (VTX, Labo Moderne, Pariz, Francuska)
- spektrofotometar (Lambda 1, Perkin-Elmer, Waltham, SAD)
- pH-metar (LAB 860, SCHOTT Instruments, Mainz, Njemačka)
- viala
- staklene falkonice od 15 mL
- plastične falkonice od 15 mL i 50 mL

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija eteričnog ulja iz biljnog materijala

Za izolaciju eteričnog ulja korišteni su suhi listići biljke te se njihova destilacija provodila metodom po Clevengeru u trajanju od 2 sata, bez predtretmana i nakon provedenih predtretmana.

Tretmani biljnog materijala koji su prethodili destilaciji po Clevengeru:

1. predtretman enzimom

- a) smjesa enzima: ksilanaza, celulaza, pektinaza (1:1:1)
- b) koncentracija enzima: $\gamma = 0,2$ g/L
- c) vrijeme ekstrakcije: 4 h
- d) temperatura ekstrakcije: 40 °C
- e) otapalo: pufer pH 6,5

2. predtretman ultrazvukom

- a) ultrazvučna sonda promjera 14 mm
- b) snaga ultrazvuka: 200 W
- c) vrijeme ekstrakcije: 5, 10, 20, 30 i 40 minuta
- d) otapalo: pročišćena voda

3. predtretman ultrazvukom i enzimom

- a) smjesa enzima: ksilanaza, celulaza, pektinaza (1:1:1)

- b) koncentracija enzima: $\gamma = 0,2$ g/L
- c) vrijeme enzimske ekstrakcije: 4 h
- d) temperatura enzimske ekstrakcije: 40 °C
- e) ultrazvučna sonda promjera 14 mm
- f) snaga ultrazvuka: 200 W
- g) vrijeme ultrazvučne ekstrakcije: 5 minuta
- h) otapalo: pročišćena pufer pH 6,5

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

Za daljnju analizu ulje je izdvojeno u viala, hidrolati su sakupljeni u falkonice od 15 mL, a vodeni ostaci sakupljeni su u falkonice od 50 mL.

3.2.1.1. Ekstrakcija potpomognuta enzimima

U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 250 mL odvaži se 20 g uzorka biljke te se doda 250 mL pufera pH 6,5. Odvaži se 50 mg enzima ksilanaze, 50 mg enzima celulaze i 50 mg enzima pektinaze ($\gamma = 0,2$ mg/L) i doda u Erlenmeyerovu tikvicu sa uzorkom. Sadržaj tikvice dobro se promiješa, tikvica se stavi na magnetsku miješalicu, doda se magnet i uključi se miješanje. Temperatura na miješalici podesi se na 40 °C te se uzorak ostavi 4 sata na miješalici. Na tikvicu se stavi vodeno hladilo i uključi se voda. Po završetku enzimske ekstrakcije sadržaj Erlenmeyerove tikvice kvantitativno se prenese u okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL te se započinje vodena destilacija po Clevengeru. Kao negativna kontrola na magnetsku miješalicu stavlja se uzorak biljke od 20 g u 250 mL pročišćene vode, na 40°C, 4h.

3.2.1.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Predtretman ekstrakcije potpomognute ultrazvukom provodi se primjenom ultrazvučne sonde snage 200 W u trajanju od 5, 10, 20, 30 i 40 minuta. U laboratorijsku čašu od 250 mL odvaži se 20 g biljke i doda se 250 mL pročišćene vode. Sadržaj čaše dobro se promiješa pomoću staklenog štapića te se nakon toga u čašu uroni ultrazvučna sonda. Nakon provedene ekstrakcije sadržaj čaše se kvantitativno prenese u okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL te se započinje vodena destilacija po Clevengeru.

3.2.1.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom uz dodatak enzima

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodi se na način da se uzorak prvo obradi primjenom ultrazvučne sonde izlazne snage ultrazvuka od 200 W, 5 minuta. U laboratorijsku čašu od 250 mL odvažuje se 20 g biljke i doda se 250 mL pufera pH 6,5. Sadržaj čaše dobro se promiješa pomoću staklenog štapića te se nakon toga u čašu uroni ultrazvučna sonda. Nakon provedene ekstrakcije ultrazvukom sadržaj čaše se kvantitativno prenese u Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL, doda se mješavina enzima (50 mg enzima ksilanaze, 50 mg enzima celulaze i 50 mg enzima pektinaze, 1:1:1), sadržaj se dobro promiješa i stavi na magnetsku miješalicu 4 sata na 40 °C. Nakon završetka ekstrakcije uzorak se kvantitativno prenese u okruglu tikvicu s okruglim dnom i kreće vodena destilacija po Clevengeru i izdvajanje eteričnog ulja. Kao negativna kontrola radi se pred obrada ultrazvukom, uzorka od 20 g u 250 mL pročišćene vode, te se tako obrađeni uzorak stavlja na magnetsku miješalicu 4 sata na 40 °C, bez enzima.

3.2.1.4. Vodena destilacija po Clevengeru

U okruglu tikvicu s okruglim dnom volumena 500 mL odvažuje se 20 g suhih listića ružmarina te se doda 250 mL pročišćene vode. Sadržaj tikvice zagrijava se na aparaturi po Clevengeru (slika 1) dok ne zavrije te nakon toga destilacija traje 2 sata. Nakon završene vodene destilacije sadržaj tikvice potrebno je ostaviti da se ohladi, nakon čega se izdvaja eterično ulje te hidrolat. Filtracijom biljnog ostatka dobije se vodeni ostatak.

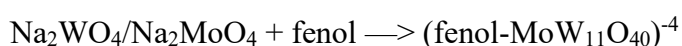


Slika 1. Aparatura za vodenu destilaciju po Clevengeru (vlastita fotografija)

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje masene koncentracije ukupnih fenola

Princip određivanja

Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu nastaje plavo obojenje čiji je apsorpcijski maksimum na 765 nm. Folin-Ciocalteu reagens smjesa je fosfovolframove i fosfomolibdene kiseline koje se oksidacijom fenolnih tvari u alkalnim uvjetima reduciraju u volframov i molibdenov oksid koji su plave boje. Nastali intenzitet plavog obojenja proporcionalan je koncentraciji ukupnih fenola koja se izražava kao ekvivalent galne kiseline.



Priprema uzoraka

Za potrebe određivanja ukupnih fenola uzorci vodenih ostataka dobivenih nakon provedene Clevenger vodene destilacije razrijeđeni su (1:9). Uzorci hidrolata nisu razrijeđeni.

Postupak određivanja ukupnih fenola

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 125 μL ekstrakta ružmarina, kojeg smo prethodno razrijedili po potrebi, 625 μL FC reagensa i 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1,9 mL zasićene otopine natrijevog karbonata, uzorak se miješa pomoću vorteks tresilice te se uzorci zatim termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 $^{\circ}\text{C}$ u kupelji. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju (pročišćena voda, pufer pH 6,5). Iz baždarnog pravca računa se masena koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline mg GAE/100 g suhog lista ružmarina.

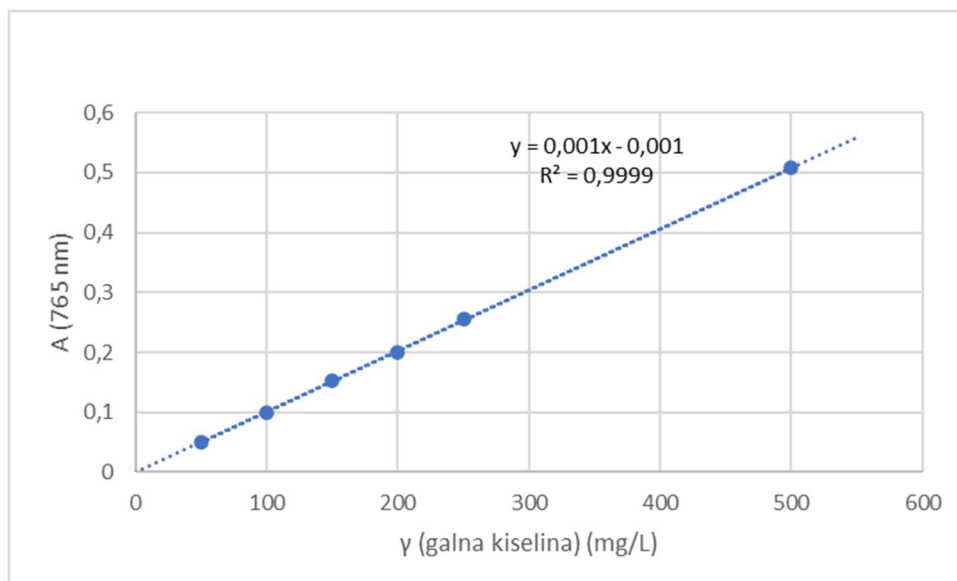
Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti standardnu otopinu galne kiseline, masene koncentracije 5 g/L, otapanjem 250 mg galne kiseline u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 50 mL i nadopunjavanjem deioniziranom vodom do oznake. Od te otopine galne

kiseline rade se razrjeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da koncentracije galne kiseline iznose 50, 100, 150, 200, 250 i 500 mg/L. Iz svake tikvice otpipetira se 125 μ L otopine standarda u staklenu epruvetu te se dodaje 625 μ L FC reagensa i 10 mL deionizirane vode. Nakon 3 minute dodaje se 1,9 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, uzorak se miješa pomoću vorteks tresilice te se uzorci zatim termostatiraju 25 minuta pri temperaturi od 50 °C u kupelji. Za slijepu probu uzima se 100 μ L deionizirane vode. Nakon kupelji mjeri se apsorbancija uzoraka pri valnoj duljini od 765 nm. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 765 nm o masenoj koncentraciji galne kiseline (mg/L), uz pomoć programa Microsoft Excel (tablica 1, slika 2).

Tablica 1. Masene koncentracije standardne otopine galne kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih pri 765 nm

γ (galna kiselina)/ (mg/L)	A (765 nm)
50	0,051
100	0,099
150	0,153
200	0,201
250	0,255
500	0,508



Slika 2. Baždarni pravac standardne otopine galne kisleine

3.2.3. Spektrofotometrijsko određivanje antioksidacijske aktivnosti FRAP metodom

Princip određivanja

FRAP metoda temelji se na reakciji redukcije žuto obojenog kompleksa željezo-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), u prisustvu antioksidansa pri pH 3,6, pri čemu nastaje plavo obojeni kompleks fero-tripiridiltriazin čiji apsorpcijski maksimum iznosi 593 nm. Promjena intenziteta obojenja proporcionalna je koncentraciji antioksidansa, koja se prema tome računa iz vrijednosti izmjerenih apsorpcija. Dobivene FRAP vrijednosti mogu se izraziti preko FeSO₄, askorbinske kiseline ili trolox ekvivalenta. (Benzie i Strain, 1999.; Benzie i Strain, 1996.)

Priprema uzorka

Za potrebe određivanja antioksidacijske aktivnosti vodenih ostataka dobivenih nakon provedene Clevenger vodene destilacije uzorci su razrijeđeni (1:999). Uzorci hidrolata nisu razrijeđeni.

Postupak određivanja antioksidacijske aktivnosti

U staklene epruvete redom se otpipetira 1 mL ekstrakta ružmarina i 7,5 mL FRAP reagensa, dobro se promiješa te se termostatira 10 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. U slijepu probu se umjesto ekstrakta dodaje otapalo za ekstrakciju (pročišćena voda, pufer pH 6,5). Ako izmjerene apsorbancije prelaze vrijednost 1,0 ekstrakte uzoraka potrebno je razrijediti na način da izmjerene apsorbancije razrijeđenih ekstrakata iznose između 0,1 i 0,9. Iz baždarnog pravca izračuna se antioksidacijska aktivnost izražena kao ekvivalent askorbinske kiseline mg AAE/100 g suhog lista biljke.

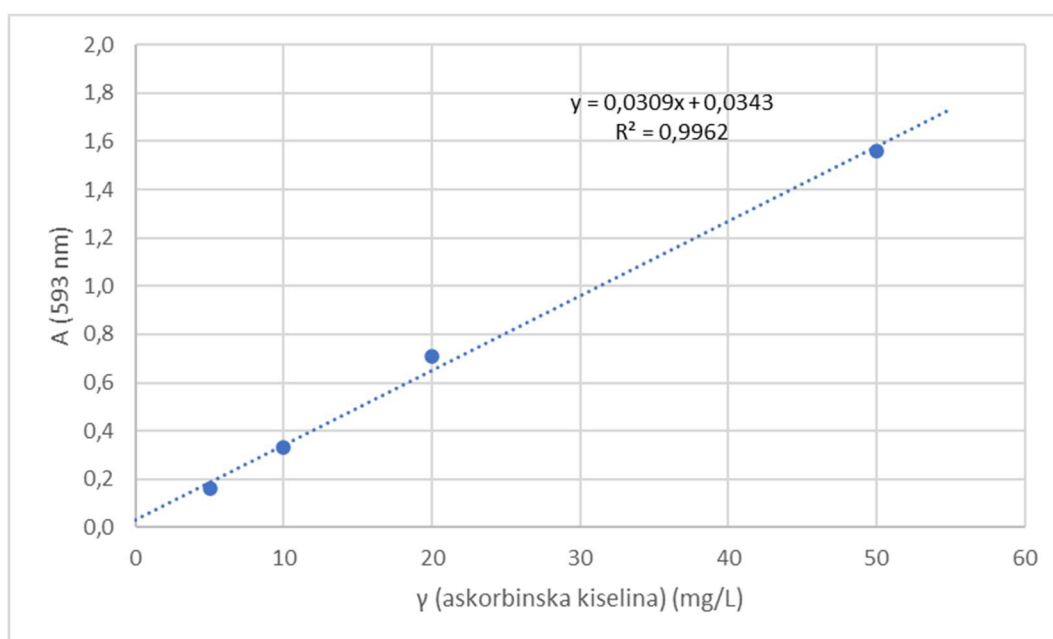
Napomena: Prilikom računanja potrebno je uzeti u obzir da u reakciji askorbinska kiselina može primiti dva elektrona, a za reakciju redukcije željeza Fe^{3+} u Fe^{2+} potreban je jedan elektron. Zbog toga je dobivene ekvivalente askorbinske kiseline (AAE) potrebno pomnožiti sa 2 (Fegredo i sur., 2009).

Izrada baždarnog pravca

Za izradu baždarnog pravca pripremi se otopina askorbinske kiseline koncentracije 100 mg/L od koje se pripreme razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL tako da koncentracije askorbinske kiseline iznose 5, 10, 20 i 50 mg/L. U staklene epruvete redom se otpipetira 600 μL otopine standarda i 4500 μL FRAP reagensa, dobro se promiješa te se termostatira 10 minuta na temperaturi od 37 °C. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 593 nm. U slijepu probu se umjesto standarda dodaje deionizirana voda. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac ovisnosti apsorbancije pri 593 nm o masenoj koncentraciji askorbinske kiseline (mg/L) (tablica 2, slika 3).

Tablica 2. Masene koncentracije standardne otopine askorbinske kiseline i pripadajuće vrijednosti apsorbancija izmjerenih pri 593 nm

γ (askorbinska kiselina)/ (mg/L)	A (593 nm)
5	0,160
10	0,333
20	0,708
50	1,560



Slika 3. Baždarni pravac standardne otopine askorbinske kiseline

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provodila se izolacija eteričnog ulja iz listića ružmarina destilacijom po Clevengeru te je ispitan utjecaj različitih predtretmana na prinos izoliranog eteričnog ulja. Tretmani koji su provedeni prije vodene destilacije bili su ekstrakcija potpomognuta enzimima (ksilanaza, celulaza, pektinaza, 1:1:1) u puferu pH 6,5, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (5, 10, 20, 30 i 40 min) te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom od 5 minuta uz dodatak enzima (ksilanaza, celulaza, pektinaza, 1:1:1) u puferu pH 6,5. Ovi predtretmani provedeni su u svrhu utvrđivanja metode koja će pospješiti postupak izolacije i povećati prinos izoliranog eteričnog ulja. Također su provedene vodene destilacije uzoraka koji su služili kao negativna kontrola, bez enzima i bez predtretmana.

Nakon provedenih predtretmana uzorci su podvrgnuti vodenoj destilaciji u aparaturi po Clevengeru u svrhu izdvajanja eteričnog ulja. Osim izdvojenog ulja dobiveni su i nusprodukti: hidrolati i vodeni ostaci. U uzorcima hidrolata i vodenih ostataka određivani su ukupni fenoli te antioksidacijska aktivnost, a dobiveno eterično ulje spremljeno je za daljnju analizu.

4.1. IZOLACIJA ETERIČNOG ULJA

Izolacija eteričnog ulja provodila se vodenom destilacijom po Clevengeru za koju su korišteni suhi listići ružmarina. Nakon destilacije očitani su volumeni izoliranog eteričnog ulja. Rezultati prinosa eteričnog ulja prikazani su u tablici 3 i izraženi kao mililitar eteričnog ulja izoliranog iz 100 g suhe biljke te su se kretali u rasponu od 0,75 do 1,50 mL ulja na 100 g suhe biljke. Na slici 4 grafički su prikazani udjeli eteričnog ulja izraženi u postocima ovisno o primijenjenoj metodi.

Rezultat prinosa eteričnog ulja nakon enzimskog predtretmana poklapao se sa ne-enzimskom kontrolom pri čemu je uzorak podvrgnut istom tretmanu kao i uzorci s enzimom (obrada na magnetskoj miješalici 4h, na 40 °C). Ulje dobiveno enzimskim predtretmanom pokazalo je 25 % veći prinos u odnosu na kontrolu bez predtretmana.

Povećanje prinosa eteričnog ulja ružmarina nakon enzimske predobrade podudara se s rezultatima dobivenim u radu Hosni i sur. (2013) iako su korišteni drugi enzimi. Koristili su enzime celulazu, hemicelulazu i mješavinu oba enzima što je rezultiralo povećanjem prinosa ulja ružmarina za 5, 50 i 20 % u odnosu na kontrolu koja nije tretirana enzimima. Koristeći iste enzime za predobradu timijana, u radu Hosni i sur. (2013), povećanje prinosa iznosilo je 63,55, 23,72 i 109,32 %, iz čega možemo vidjeti da isti enzimi ne djeluju jednako na različite biljke

zbog različite strukture i svojstava biljnog materijala te da su celulaza i/ili kombinacija enzima koji sadrže celulazu nedovoljno učinkoviti za poboljšanje prinosa eteričnog ulja ružmarina. Nadalje, Hosni i sur. (2013) objašnjavaju kako relativno manji prinos eteričnog ulja ružmarina dobiven tretiranjem celulazom u odnosu na hemicelulazu može biti objašnjen nedostupnošću celulaze supstratu ili njegovom inhibicijom vlastitim produktima.

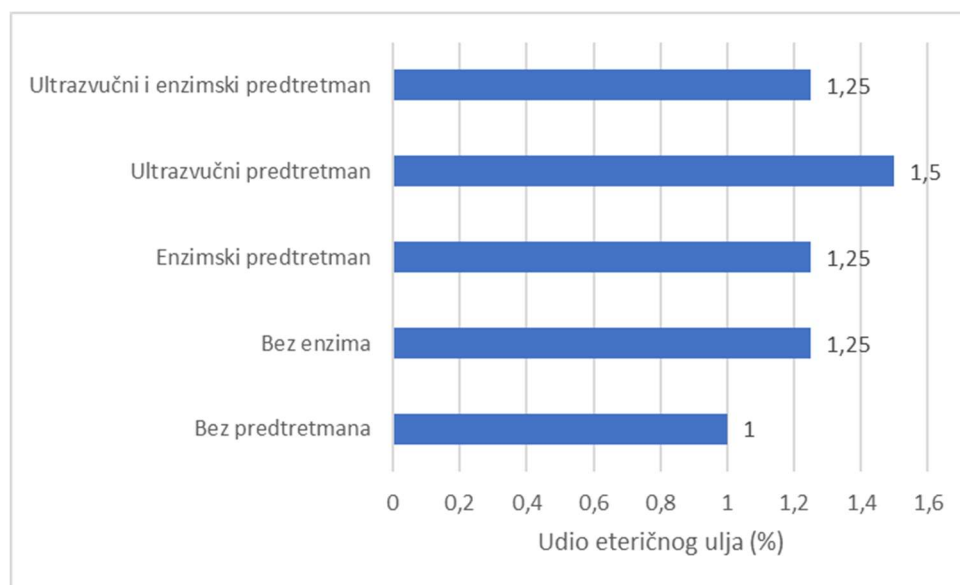
Predtretman ultrazvukom proveden je pri različitim vremenima izlaganja ultrazvuku te su dobiveni prinosi bili u rasponu od 0,75 do 1,50 mililitara ulja na 100 grama suhe biljke. Ultrazvučnim predtretmanom nakon 5 i 10 minuta došlo je do povećanja prinosa eteričnog ulja ružmarina do 50%. Daljnjim povećanjem vremena trajanja ultrazvuka nije došlo do povećanja prinosa eteričnog ulja već je došlo do smanjenja, a najveći prinos pokazali su uzorci dobiveni nakon 5 i 10 minuta izlaganja ultrazvuku. Sukladno tome, daljnji predtretman ultrazvukom i enzimom provodio se pri 5 minuta trajanja ultrazvuka. Ovi rezultat su 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 %.

Yu i sur. (2021) navode kako snaga i trajanje ultrazvuka uvelike utječe na prinos eteričnog ulja te povećanjem oba parametra prvo dolazi do povećanja, a zatim do pada prinosa ulja, što se podudara s dobivenim rezultatima, te da prekomjerno izlaganje jakom ultrazvuku tijekom dužeg perioda negativno utječe na prinos. Negativan utjecaj može se pripisati pucanju većeg broja staničnih stijenki što dovodi do suspendiranja nečistoća te smanjenja propusnosti otapala u stanične strukture i prijenosa otopljenog ulja izvan stanične strukture. Yu i sur. (2021) iz svojih rezultata zaključili su da je optimalna snaga ultrazvuka 210 W te da je optimalno vrijeme 30 minuta. Njihovo istraživanje provedeno je na kori kumkvata te je zbog različite strukture i svojstava biljnog materijala moguće da je bilo potrebno dulje trajanja predtretmana ultrazvukom, u usporedbi s ružmarinom pri čemu je optimalno vrijeme iznosilo 5 minuta.

Prinos izoliranog eteričnog ulja nakon predtretmana ultrazvukom i enzimom jednak je prinosima dobivenim enzimskim predtretmanom. Kombinirani predtretman nije se pokazao kao bolja metoda pri izolaciji eteričnog ulja što nije u skladu s očekivanjima jer se očekivalo da će se primjenom dvije različite metode predtretmana dobiti veći udio eteričnog ulja u odnosu na primjenu samo jednog predtretmana ili bez predtretmana, jer se primjenom ultrazvuka prije enzimske obrade omogućuje bolji kontakt između enzima i supstrata te korištenje obje metode dovodi do povećanog razbijanja stanica zbog čega se oslobađaju sastojci biljke.

Tablica 3. Rezultati prinosa eteričnog ulja (izraženo kao mililitar ulja na 100 grama suhe biljke) dobivenog vodenom destilacijom po Clevengeru nakon provedenih predtretmana ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima

Prinos ulja (mL ulja/100 g suhe biljke)		
Bez predtretmana	1	
Bez enzima	1,25	
Enzimski predtretman	1,25	
Ultrazvučni predtretman	5 min	1,5
	10 min	1,5
	20 min	1
	30 min	0,75
	40 min	1
Ultrazvučni i enzimski predtretman	1,25	



Slika 4. Grafički prikaz udjela eteričnog ulja izraženog u postocima ovisno o primijenjenoj metodi ekstrakcije koja je prethodila vodenoj destilaciji: ekstrakcija potpomognuta enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pri optimalnom vremenu ekstrakcije (5 minuta) te kombinaciji predtretmana ekstrakcije potpomognute ultrazvukom pri optimalnom vremenu ekstrakcije (5 minuta) i ekstrakcije potpomognute enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1)

4.2. VODENI OSTACI

U uzorcima vodenih ostataka određivan je maseni udio ukupnih fenola te antioksidacijska aktivnost FRAP metodom. Uzorke vodenih ostataka bilo je potrebno razrijediti prije provođenja samih metoda određivanja masenog udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama 4 i 5. Vrijednosti masenih udjela izražene su kao miligram ekvivalenta galne kiseline na 100 grama osušene biljke, dok su vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izražene kao miligram ekvivalenta askorbinske kiseline na 100 grama osušene biljke.

Iz dobivenih rezultata može se vidjeti da vodeni ostaci sadrže puno veći maseni udio ukupnih fenola i veću antioksidacijsku aktivnost, u odnosu na hidrolate. Dobivene vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola za uzroke vodenih ostataka kretale su se u rasponu od 3175,00 do 4268,75 mg GAE/100 grama biljke (Tablica 4). Uzorak vodenog ostatka tretiranog enzimom imao je nešto nižu vrijednosti ukupnih fenola u odnosu na kontrolni uzorak na kojem se nije provodila predobrada. Za uzorke tretirane ultrazvukom 5, 10 i 30 minuta dobivene vrijednosti masenih udjela ukupnih fenola bile su najbliže vrijednosti kontrolnog uzorka, dok je rezultat masenog udjela za uzorak tretiran ultrazvukom i enzimom bio nešto manji od kontrolne vrijednosti.

Tablica 4. Rezultati masenog udjela ukupnih fenola u uzorcima vodenih ostataka

$w(\text{ukupni fenoli}) \pm \text{SD (mg GAE/100 g suhe biljke)}$		
Bez predtretmana	4268,75 \pm 247,00	
Bez enzima	3175,00 \pm 123,74	
Enzimski predtretman	3656,25 \pm 97,23	
Ultrazvučni predtretman	5 min	4150,00 \pm 17,68
	10 min	4231,25 \pm 132,58
	20 min	3881,25 \pm 26,52
	30 min	4237,50 \pm 35,36
	40 min	3537,50 \pm 106,07
Ultrazvučni i enzimski predtretman	3850,00 \pm 106,07	

Antioksidacijska aktivnost uzoraka vodenih ostataka kretala se u rasponu od 6205,50 do 65226,54 mg AAE/ 100 g suhe biljke, pri čemu je najveća antioksidacijska aktivnost dobivena u uzorku koji nije tretiran predtretmanima (Tablica 5). U odnosu na kontrolni uzorak koji je imao najveću antioksidacijsku aktivnost, svi ostali uzorci tretirani predtretmanima imali su relativno nisku antioksidacijsku aktivnost. Unatoč niskim vrijednostima, najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti imao je uzorak vodenog ostatka tretiran predtretmanom ultrazvukom u trajanju od 30 minuta ($32944,98 \pm 629,30$ mg AAE/ 100 g suhe biljke). Isti uzorak pokazao je i najveći maseni udio ukupnih fenola ($4237,50 \pm 35,36$ mg GAE/ 100 g suhe biljke). Uzorak vodenog ostatka tretiranog ultrazvukom i enzimom pokazao je najnižu vrijednost antioksidacijske aktivnosti ($6205,50 \pm 228,84$ mg AAE/ 100 g suhe biljke), što je relativno nisko s obzirom na masenu koncentraciju ukupnih fenola tog uzorka ($3850,00 \pm 106,07$ mg GAE/ 100 g suhe biljke) prema kojoj bi antioksidacijska aktivnost trebala biti sličnija uzorku tretiranom enzimom.

Tablica 5. Rezultati antioksidacijske aktivnosti u uzorcima vodenih ostataka

Antioksidacijska aktivnost \pm SD (mg AAE/ 100 g suhe biljke)		
Bez predtretmana	$65226,54 \pm 629,30$	
Bez enzima	$19312,29 \pm 114,42$	
Enzimski predtretman	$21254,05 \pm 228,84$	
Ultrazvučni predtretman	5 min	$20242,72 \pm 400,47$
	10 min	$26715,21 \pm 514,88$
	20 min	$31326,86 \pm 514,88$
	30 min	$32944,98 \pm 629,30$
	40 min	$19797,73 \pm 800,93$
Ultrazvučni i enzimski predtretman	$6205,50 \pm 228,84$	

U svom radu Munekata i sur. (2020) navode kako ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom ne dolazi do povećanja masene koncentracije ukupnih fenola i vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u ekstraktu, što se podudara s dobivenim vrijednostima koje su nešto niže od masenih udjela ukupnih fenola u uzorku bez predtretmana. Iako ekstrakcija u radu Munekata i sur. (2020) nije provedena vodenom destilacijom, već ekstrakcijom vodom, odnosno mješavinom vode i etanola, dobiveni su slični rezultati gledajući utjecaj ultrazvuka. Calderón-Oliver i Ponce-Alquicira (2021) također navode kako je metoda ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

manje efikasna od konvencionalne metode kod ekstrakcije polifenolnih spojeva zbog intenziteta kavitacije, što također utječe na antioksidacijsku aktivnost.

Dobiveni rezultati ukupnih fenola u vodenom ostatku ružmarina dobivenog nakon enzimske predobrade nisu se podudarali s rezultatima dobivenim u radu Pontillo i sur. (2021). Pontillo i sur. (2021) provodili su konvencionalnu ekstrakciju otapalima (mješavina etanola i vode) kojoj je prethodila enzimska predobrada pektinazom te je dobivena koncentracija ukupnih fenola u dobivenom ekstraktu ružmarina bila veća nego nakon ekstrakcije kojoj nije prethodila enzimska obrada. Duže trajanje enzimske obrade (5 sati) rezultiralo je manjom koncentracijom ukupnih fenola u odnosu na kraću enzimsku obradu u trajanju od jednoga sata. Suprotno tome, duže trajanje enzimske predobrade rezultiralo je većom antioksidacijskom aktivnošću, ali su dobivene vrijednosti bile niže u odnosu na uzorak bez enzimskog predtretmana, što se podudara s dobivenim rezultatima. Rezultati se razlikuju od onih dobivenih u radu Pontillo i sur. (2021) zbog vremena trajanja enzimske predobrade, korištenih otapala te korištenja različitih enzima.

Görgüç i sur. (2019) ispitivali su utjecaj predtretmana ultrazvukom i enzimom na prinos proteina, ukupnih fenola i antioksidacijsku aktivnost ekstraktima mekinja sezama. Vrijednosti masene koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti bile su najveće nakon obrade ultrazvukom i enzimom, u odnosu na zasebno provedene predtretmane ultrazvuka i enzima. Ovo nije u skladu s dobivenim rezultatima u kojima je antioksidacijska aktivnost dobivena u uzorku vodenog ekstrakta ultrazvukom i enzimom bila najniža od svih dobivenih vrijednosti ($6205,50 \pm 228,84$ mg AAE/100 g suhe biljke). Maseni udio ukupnih fenola uzorka tretiranog ultrazvukom i enzimom bila je nešto veća od vrijednosti dobivenih za uzorak tretiran samo enzimom i uzorak tretiran ultrazvukom u trajanju od 40 minuta, dok je bila nešto manja u odnosu na ostale uzorke tretirane ultrazvukom. Do razlike u rezultatima dolazi zbog analize različitih biljnih materijala te zbog potencijalno različitih parametara obrade ultrazvukom i enzimom, kao što su vrsta i koncentracija enzima te trajanje i intenzitet ultrazvuka.

Može se zaključiti da vodeni ostaci sadrže značajne količine fenolnih spojeva što je u skladu s literaturom (Wollinger i sur., 2016), u vodenim ostacima su najvećoj mjeri zastupljene fenolne kiseline s najvećim udjelom ružmarinske kiseline. Određeni su visoki maseni udjeli ukupnih fenola bez obzira na primijenjeni predtretman obrade ružmarina neposredno prije vodene destilacije po Clevengeru. Ultrazvučnim predtretmanom, produljenjem vremena ekstrakcije od 5

do 40 minuta ne dolazi do povećanja masenog udjela ukupnih fenola u vodenim ostacima ružmarina. Također, primijenjeni predtretmani ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima ne doprinose povećanju masenih udjela izoliranih fenolnih spojeva u vodenim ostacima ružmarina. Antioksidacijska aktivnost vodenih ostataka ružmarina najveća je u ne tretiranom uzorku, što znači da primijenjeni predtretmani ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima ne doprinose povećanju antioksidacijske aktivnosti vodenih ostataka ružmarina. Vodeni ostaci, dobiveni kao nusprodukt u izolaciji eteričnog ulja ružmarina predstavljaju vrijedan izvor fenolnih spojeva te se ne bi trebali smatrati otpadom već naći primjenu u prehrambenoj industriji zbog dokazane antioksidacijske aktivnosti.

4.3. HIDROLATI

Osim eteričnog ulja i vodenog ostatka, vodenom destilacijom po Clevengeru dobiveni su i hidrolati. U uzorcima hidrolata određivan je maseni udio ukupnih fenola, izražena kao miligram ekvivalenta galne kiseline na 100 grama osušene biljke te antioksidacijska aktivnost FRAP metodom, izražena kao miligram ekvivalenta askorbinske kiseline na 100 grama osušene biljke. Dobivene vrijednosti prikazane su u tablicama 6 i 7.

Vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola kretale su se u rasponu od 15 do 95 mg GAE/100 grama suhe biljke (Tablica 6.). Uzorak hidrolata tretiranog enzimom imao je nešto nižu vrijednosti ukupnih fenola u odnosu na kontrolni uzorak na kojem se nije provodila predobrada, ujedno ima i najniži maseni udio ukupnih fenola u odnosu na sve analizirane uzorke ($15,00 \pm 0,00$ mg GAE/ 100 g suhe biljke). Uzorci tretirani ultrazvukom 10, 20 i 40 minuta te uzorak tretiran ultrazvukom 5 minuta i enzimom imali su veći maseni udio ukupnih fenola u odnosu na kontrolni uzorak, pri čemu je uzorak tretiran ultrazvukom 40 minuta imao najveći maseni udio ($95,00 \pm 26,52$ mg GAE/100 g suhe biljke).

Tablica 6. Rezultati masenog udjela ukupnih fenola u uzorcima hidrolata

$w(\text{ukupni fenoli}) \pm \text{SD (mg GAE/100 g suhe biljke)}$		
Bez predtretmana		
18,13 ± 4,42		
Bez enzima		
18,13 ± 0,88		
Enzimski predtretman		
15,00 ± 0,00		
Ultrazvučni predtretman	5 min	17,50 ± 0,00
	10 min	35,00 ± 0,00
	20 min	23,75 ± 3,54
	30 min	15,63 ± 0,88
	40 min	95,00 ± 26,52
Ultrazvučni i enzimski predtretman		
23,13 ± 0,88		

Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti kretale su se u rasponu od 10,33 do 19,59 mg AAE/100 g suhe biljke (Tablica 7.). Najnižu vrijednost antioksidacijske aktivnosti imao je kontrolni uzorak (10,33 ± 0,57 mg AAE/100 g suhe biljke), dok je najvišu vrijednost imao uzorak obrađen ultrazvukom i enzimom (19,59 ± 1,20 mg AAE/100 g suhe biljke). Među uzorcima tretiranim ultrazvukom, najveću antioksidacijsku aktivnost pokazao je uzorak tretiran ultrazvukom u trajanju od 5 minuta (14,34 ± 0,74 mg AAE/100 g suhe biljke). Svi uzorci tretirani predtretmanima imali u antioksidacijsku aktivnost veću od kontrolnog uzorka, isto ne možemo reći za maseni udio ukupnih fenola.

Tablica 7. Rezultati antioksidacijske aktivnosti u uzorcima hidrolata

Antioksidacijska aktivnost ± SD (mg AAE/ 100 g suhe biljke)		
Bez predtretmana		
10,33 ± 0,57		
Bez enzima		
14,13 ± 0,34		
Enzimski predtretman		
15,67 ± 0,11		
Ultrazvučni predtretman	5 min	14,34 ± 0,74
	10 min	13,73 ± 0,23
	20 min	11,79 ± 0,00
	30 min	13,97 ± 0,11
	40 min	13,65 ± 0,00
Ultrazvučni i enzimski predtretman		
19,59 ± 1,20		

Može se zaključiti da su u hidrolatima ružmarina ukupni fenoli zastupljeni u nižim udjelima nego u vodenim ostacima što se slaže s literaturom (Aćimović i sur., 2020), u hidrolatima su u najvećoj mjeri su zastupljeni monoterpeni (1,8-cineole, borneol, kamfor) i seskviterpeni s najvećim udjelom verbenona (Miljanović i sur., 2020). Hidrolati ružmarina su po svome kemijskom sastavu slični njihovim eteričnim uljima (Aćimović i sur., 2020). Ipak, provedenim predtretmanima postižu se nešto veći maseni udjeli izoliranih fenolnih spojeva, predtretman ultrazvukom pridonosi povećanju masenog udjela ukupnih fenola u većoj mjeri nego primjena enzima. Primijenjeni predtretmani ultrazvukom, enzimima te kombinacijom ultrazvuka i enzima doprinose povećanju antioksidacijske aktivnosti hidrolata ružmarina. Hidrolati kao i vodeni ostaci, dobiveni kao nusprodukti u izolaciji eteričnog ulja ružmarina predstavljaju vrijedan izvor fenolnih spojeva te se ne bi trebali smatrati otpadom već naći primjenu u prehrambenoj industriji zbog dokazane antioksidacijske aktivnosti.

4.4. KORELACIJA IZMEĐU MASENOG UDJELA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDACIJSKE AKTIVNOSTI

U nekoliko istraživanja utvrđena je snažna pozitivna korelacija između koncentracije ukupnih fenola (flavonoida i flavonola) i antioksidacijske aktivnosti što upućuje na to da su fenolni spojevi jaki antioksidansi u ispitanim ekstraktima začina, uključujući i ružmarin (Chrysargyris i sur., 2020; Assefa i sur., 2018). Pozitivnu korelaciju između antioksidacijske aktivnosti i sadržaja polifenola otkrili su i Kiselova i sur. (2006) u vodenim ekstraktima bugarskog bilja.

Chrysargyris i sur. (2020) napominju kako ova korelacija varira ovisno o vrsti biljke i o uvjetima rasta (nadmorskoj visini). Također navode kako eterična ulja ružmarina mogu pokazati veću antioksidacijsku aktivnost od izoliranih komponenti zbog prisutnosti sinergističkog djelovanja između komponenti.

U svom istraživanju Joo i sur. (2012) zaključili su da je pojačana antioksidacijska aktivnost rezultat izravnog djelovanja povećanog sadržaja fenolnih spojeva i neizravnog djelovanja pozitivnih agensa kao što se sadržaj aminokiselina, u ekstraktima lista čaja.

U tablici 8. prikazani su koeficijenti korelacije između masenog udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti za uzorke vodenih ostataka i hidrolata koji su izračunati prema Pearsonovoj jednadžbi za koeficijent korelacije:

$$r = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}}$$

Koeficijent korelacije pokazuje nam stupanj povezanosti između dvije varijable čije se vrijednosti nalaze u rasponu od -1 do 1 (Asuero i sur., 2006).

Tablica 8. Koeficijenti korelacije između vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti dobivenih u uzorcima vodenih ostataka i hidrolata

Uzorci	Vodeni ostatci	Hidrolati
Pearsonov koeficijent korelacije, r	0,078	-0,065

Uzimajući u obzir dobivene koeficijente korelacije i rezultate iz tablica 4 i 5 te tablica 6 i 7 vidljivo je da nema striktno korelacije između antioksidacijske aktivnosti i masenog udjela ukupnih fenola, što je u skladu s rezultatima dobivenim u radu Munekata i sur. (2020) koji u svom radu navode kako njihovo istraživanje, u kojem su proučavali utjecaj ultrazvuka na biološki sastav i aktivnost ekstrakata ružmarina i timijana, nije pokazalo značajnu povezanost između masene koncentracije ukupnih fenola i antioksidacijske aktivnosti.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

1. Predtretman ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u trajanju od 5 i 10 minuta, koji je prethodio destilaciji po Clevengeru, pokazao je najveći prinosa eteričnog ulja od 1,5 mL ulja/100 g suhe biljke. Ultrazvučni predtretman može se koristiti samostalno jer daje najveće prinose ulja, već nakon 5 minuta ultrazvučnog predtretmana dolazi do povećanja prinosa eteričnog ulja za 50%.
2. Primjenom predtretmana ekstrakcijom potpomognutom enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1) te ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1) dolazi do nešto manjeg povećanja prinosa eteričnog ulja u odnosu na kontrolu u iznosu od 25 %.
3. Vodeni ostaci kao nusprodukt proizvodnje eteričnih ulja imaju visoke masene udjele ukupnih fenola, čije su vrijednosti varirale ovisno o primijenjenom predtretmanu te su se kretnale u rasponu od 3175 do 4268,75 mg GAE/100 g suhe biljke. Niti jedan od primijenjenih predtretmana nije doveo do povećanja vrijednosti masenog udjela ukupnih fenola kao ni do povećanja antioksidacijske aktivnosti u vodenim ostacima ružmarina u odnosu na kontrolni uzorak. Ipak, uzorci tretirani predtretmanom ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom pokazali su nešto veće masene udjele fenolnih spojeva kao i antioksidacijsku aktivnost u odnosu na ostale tretirane uzorke.
4. Hidrolati kao nusprodukt proizvodnje eteričnih ulja imaju znatno niže masene udjele ukupnih fenola u odnosu na vodene ostatke te sukladno tome i relativno nisku antioksidacijsku aktivnost. Najveći maseni udio ukupnih fenola dobiven je u uzorcima nakon predtretmana ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, dok je najveća antioksidacijska aktivnost određena u uzroku nakon predtretmana ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom i enzimima (ksilanaza, pektinaza, celulaza, 1:1:1).
5. Vodeni ostaci i hidrolati ružmarina, kao nusprodukti u proizvodnji eteričnog ulja su dobar izvor fenolnih spojeva te predstavljaju potencijal primjene u prehrambenoj industriji zbog svoje dokazane antioksidativne aktivnosti.

6. POPIS LITERATURE

Abdel Raoof, G. F., Mohamed, K. Y. (2019). Natural Products for the Management of Diabetes. *Studies in Natural Products Chemistry*, **59**, 323 – 374. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64179-3.00010-4>

Aćimović, M., Tešević, V., Smiljanić, K., Cvetković, M., Stanković, J., Kiproovski, B., Sikora, V. (2020). Hydrolates: By-products of essential oil distillation: Chemical composition, biological activity and potential uses. *Adv. Technol.* **9**(2), 54-57. <https://doi.org/10.5937/savteh2002054a>

Alvi, S.S., Ahmad, P., Ishrat, M., Iqbal, D., Khan, M.S. (2019). Secondary Metabolites from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Structure, Biochemistry and Therapeutic Implications Against Neurodegenerative Diseases. U: Swamy, M., Akhtar, M. (ured.) *Natural Bio-active Compounds*, Springer, Singapore, str. 2. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7205-6_1

Anh, T. T., Thu Ngan, L. T., Lam, T. D. (2019). Essential oil from fresh and dried Rosemary cultivated in Lam Dong province, Vietnam. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, **544**, 012025. doi:10.1088/1757-899x/544/1/012025

Assefa, A. D., Keum, Y.-S., Saini, R. K. (2018). A comprehensive study of polyphenols contents and antioxidant potential of 39 widely used spices and food condiments. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **12**(3), 1548–1555. doi:10.1007/s11694-018-9770-z

Asuero, A. G., Sayago, A., González, A. G. (2006). The Correlation Coefficient: An Overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **36**(1), 41–59. doi:10.1080/10408340500526766

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **239**(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, **299**, 15–27. doi:10.1016/s0076-6879(99)99005-5

Calderón-Oliver, M., Ponce-Alquicira, E. (2021). Environmentally Friendly Techniques and Their Comparison in the Extraction of Natural Antioxidants from Green Tea, Rosemary, Clove, and Oregano. *Molecules*, **26**(7), 1869. doi:10.3390/molecules26071869

Cascaes Teles, A. S., Hidalgo Chavéz, D. W., Zarur Coelho, M. A., Rosenthal, A., Fortes Gottschalk, L. M., Tonon, R. V. (2020). Combination of enzyme-assisted extraction and high hydrostatic pressure for phenolic compounds recovery from grape pomace. *Journal of Food Engineering*, **288**, 110128. doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.110128

Chekoual, L., Aissat, A., Benabdelkader, T., Ait-kaci Aourahoun, K., Boumeridja, S., Lamari, L. (2021). Effect of ultrasound pretreatment on the quality and antimicrobial activity of essential oils from four wild populations of Algerian *Lavandula stoechas* L.: Comparison with conventional hydrodistillation. *Journal of Applied Biological Sciences*, **15**(1), 75–90. <https://jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/799>

Chrysargyris, A., Mikallou, M., Petropoulos, S., Tzortzakis, N. (2020). Profiling of essential oils components and polyphenols for their antioxidant activity of medicinal and aromatic plants grown in different environmental conditions. *Agronomy*, **10** (5), 727.

De Macedo, L. M., Santos, É. M. dos, Militão, L., Tundisi, L. L., Ataide, J. A., Souto, E. B., Mazzola, P. G. (2020). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and Its Topical Applications: A Review. *Plants*, **9**(5), 651. <https://doi.org/10.3390/plants9050651>

Fegredo, J. A., Wong, M. C. Y., Wiseman, H., Preedy, V. R. (2009). Manual and Robotic Methods for Measuring the Total Antioxidant Capacity of Beers. U: Preedy, V.R. (ured.) *Beer in Health and Disease Prevention*, Academic Press, str. 991–1002. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.X0001-6>

Gligor, O., Mocan, A., Moldovan, C., Locatelli, M., Crișan, G., Ferreira, I. C. (2019). Enzyme-assisted extractions of polyphenols – a comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.029

Görgüç, A., Bircan, C., Yılmaz, F. M. (2019). Sesame bran as an unexploited by-product: Effect of enzyme and ultrasound-assisted extraction on the recovery of protein and antioxidant compounds. *Food Chemistry*, **283**, 637–645. doi:10.1016/j.foodchem.2019.01.077

Hammer, M., Junghanns, W. (2020). *Rosmarinus officinalis* L.: Rosemary. U: Novak, J., Blüthner, WD. (ured.) Medicinal, Aromatic and Stimulant Plants. Handbook of Plant Breeding, vol 12. Springer, Cham, str. 501-507. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38792-1_15

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. *Industrial Crops and Products*, **47**, 291–299. doi:10.1016/j.indcrop.2013.03.023

Joo, C. G., Lee, K. H., Park, C., Joo, I. W., Choe, T. B., Lee, B. C. (2012). Correlation of increased antioxidation with the phenolic compound and amino acids contents of *Camellia sinensis* leaf extracts following ultra high pressure extraction. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, **18**(2), 623–628. doi:10.1016/j.jiec.2011.11.106

Khadhraoui, B., Ummat, V., Tiwari, B. K., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F. (2021). Review of ultrasound combinations with hybrid and innovative techniques for extraction and processing of food and natural products. *Ultrasonics Sonochemistry*, **76**, 105625. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105625>

Kiselova, Y., Ivanova, D., Chervenkov, T., Gerova, D., Galunska, B., Yankova, T. (2006). Correlation between the In Vitro antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from bulgarian herbs. *Phytotherapy Research*, **20**(11), 961–965. doi:10.1002/ptr.1985

Lakušić, D. V., Ristić, M. S., Slavkowska, V. N., Šinžar-Sekulić, J. B., Lakušić, B. S. (2012). Environment-Related Variations of the Composition of the Essential Oils of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in the Balkan Peninsula. *Chemistry & Biodiversity*, **9**(7), 1286–1302. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100427>

Lo Presti, M., Ragusa, S., Trozzi, A., Dugo, P., Visinoni, F., Fazio, A., i sur. (2005). A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. *Journal of Separation Science*, **28**(3), 273–280. doi:10.1002/jssc.200400037

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. <https://doi.org/10.3390/molecules25204818>

Munekata, P. E. S., Alcántara, C., Žugčić, T., Abdelkebir, R., Carmen Collado, M., Vicente García-Pérez, i sur. (2020). Impact of ultrasound-assisted extraction and solvent composition on bioactive compounds and in vitro biological activities of thyme and rosemary. *Food Research International*, **109242**. doi:10.1016/j.foodres.2020.109242

Nadar, S. S., Rathod, V. K. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **33**(9). doi:10.1007/s11274-017-2322-6

Nadar, S. S., Rao, P., Rathod, V. K. (2018). Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. *Food Research International*, **108**, 309–330. doi:10.1016/j.foodres.2018.03.006

Nieto, G., Ros, G., Castillo, J. (2018). Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review. *Medicines*, **5**(3), 98. <https://doi.org/10.3390/medicines5030098>

Pontillo, A. R. N., Papakosta-Tsigkri, L., Lyemperopoulou, T., Mamma, D., Kekos, D., Detsi, A. (2021). Conventional and Enzyme-Assisted Extraction of Rosemary Leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Toward a Greener Approach to High Added-Value Extracts. *Applied Sciences*, **11**(8), 3724. doi:10.3390/app11083724

Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698

Yu, F., Wan, N., Zheng, Q., Li, Y., Yang, M., Wu, Z. (2021). Effects of ultrasound and microwave pretreatments on hydrodistillation extraction of essential oils from Kumquat peel. *Food Science & Nutrition*, **9**(5), 2372–2380. doi:10.1002/fsn3.2073

Wollinger, A., Perrin, É., Chahboun, J., Jeannot, V., Touraud, D., Kunz, W. (2016). Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. *Comptes Rendus Chim.* **19**(6), 754 - 765.
<https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.12.014>

Izjava o izvornosti

Ja Lucija Nikin 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