

# Izolacija pigmenata iz alge *Chlorella vulgaris* primjenom ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku

---

Simonović, Niki

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:195623>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 24. rujna 2018.

Niki Simonović, 964/USH

**IZOLACIJA PIGMENATA IZ**  
**ALGE *Chlorella vulgaris***  
**PRIMJENOM UBRZANE**  
**EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI**  
**POVIŠENOM TLAKU**

**Ovaj rad izrađen je u okviru znanstvenog centra izvrsnosti BioProspecting mora (BioProCro) na projektu BioProspecting Jadranskog mora (KK.01.1.1.01.0002) financiranog sredstvima Europske unije.**

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo pod mentorstvom prof.dr.sc. Verice Dragović-Uzelac te uz pomoć doktorandice mag. ing. Ane Dobrinčić.

## ZAHVALA

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanom povjerenju, susretljivosti i suradnji. Veliko hvala doktorandici Ani Dobrinčić na velikom trudu i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.*

*Hvala svim prijateljima, momku i kolegama na razumijevanju i velikoj potpori tijekom studiranja.*

*Najveće hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene u sretnim i teškim trenucima.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Zavod za prehrambeno – tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Upravljanje sigurnošću hrane

### IZOLACIJA PIGMENATA IZ ALGE *Chlorella vulgaris* PRIMJENOM UBRZANE EKSTRAKCIJE OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU

*Niki Simonović, 964/USH*

#### Sažetak:

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj broja ciklusa (1, 2), temperature (100, 130, 180 °C) i vremena (5, 10, 15 min) na prinos klorofila i karotenoida ekstrahiranih iz zelene alge *Chlorella vulgaris* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (PLE), uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Nadalje, cilj je bio optimirati parametre PLE pri kojima će se ostvariti najveći prinosi klorofila i karotenoida. Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a postignuti su pri temperaturi 160 °C, vremenu ekstrakcije 12 minuta kroz 2 ekstrakcijska ciklusa, a za klorofil b pri 130 °C, 9 minuta i 1 ekstrakcijski ciklus. Optimalni uvjeti pri kojima se dobivaju veći prinosi karotenoida su temperatura 140 °C, vrijeme ekstrakcije 5 minuta i 2 ekstrakcijska ciklusa. Masena koncentracija klorofila a pri optimalnim uvjetima iznosi 14,11 mg g<sup>-1</sup> s.t., klorofila b 5,69 mg g<sup>-1</sup> s.t., a karotenoida 2,15 mg g<sup>-1</sup> s.t. Na temelju statističke analize MANOVA utvrđeno je da svi istraživani parametri imaju značajan utjecaj na prinose istraživanih pigmentata. Pomoću regresijskih modela određene su predviđene vrijednosti pigmentata u ekstraktu koje su eksperimentalno potvrđene.

**Ključne riječi:** alge, pigmenti, klorofili, karotenoidi, ekstrakcija, PLE

**Rad sadrži:** 43 stranica, 13 slika, 5 tablica, 50 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

**Pomoć pri izradi:** Mag. ing. Ana Dobrinčić

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Zoran Zorić
2. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (mentorica)
3. Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević
4. Prof.dr.sc. Anet Režek Jambrak

**Datum obrane:** 24. rujna 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Department of Food Engineering  
Laboratory for Technology of Fruits and Vegetables Preservation and Processing

**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Safety Management

### ISOLATION OF PIGMENTS FROM ALGAE *Chlorella vulgaris* USING ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION

*Niki Simonović, 964/USH*

**Abstract:** The aim of this study was to determine the influence of number of cycles (1, 2), temperature (100, 130, 180 ° C) and time (5, 10, 15 min) on the yield of chlorophyll and carotenoid extracted from green algae *Chlorella vulgaris* by accelerated extraction with elevated pressure (PLE), with ethanol as an extraction solvent. Furthermore, the aim was to optimize PLE parameters, with the highest yields of chlorophyll and carotenoid. Optimal conditions of chlorophyll extraction were achieved at 160 ° C, 12 min extraction time for 2 extraction cycles and for chlorophyll b at 130 ° C for 9 minutes and 1 extraction cycle. The optimal conditions for obtaining higher carotenoid yields are 140 ° C, 5 min extraction time and 2 extraction cycles. The mass concentration of chlorophyll a at optimal conditions was 14.11 mg g<sup>-1</sup> d.m., chlorophyll b 5.69 mg g<sup>-1</sup> d.m., and carotenoid 2.15 mg g<sup>-1</sup> d.m. Based on the MANOVA statistical analysis, all the parameters investigated have a significant effect on the yields of the investigated pigments. Regression models provided predicted values of pigments in the extract that were experimentally verified.

**Keywords:** algae, pigments, chlorophylls, carotenoids, extraction, PLE

**Thesis contains:** 43 pages, 13 figures, 5 tables, 50 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor

**Technical support and assistance:** Bcs. Ana Dobrinčić

#### **Reviewers:**

1. PhD. Zoran Zorić, Assistant professor
2. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor (mentor)
3. PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor
4. PhD. Anet Režek Jambrak Full professor

**Thesis defended:** 24th September 2018

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1.MORSKE ALGE.....	2
2.1.1.Zelene alge .....	4
2.1.2. <i>Chlorella vulgaris</i> .....	5
2.2.FUNKCIONALNA SVOJSTVA ZELENIH ALGI .....	7
2.2.1.Pigmenti zelenih algi .....	8
2.2.1.1. <i>Karotenoidi</i> .....	9
2.2.1.2. <i>Klorofili</i> .....	12
2.2.1.3. <i>Fikobiliproteini</i> .....	13
2.2.2.Ostali biološki aktivni spojevi zelenih algi.....	14
2.2.2.1. <i>Fenolni spojevi</i> .....	14
2.2.2.2. <i>Omega-3 masne kiseline</i> .....	15
2.2.2.3. <i>Polisaharidi</i> .....	15
2.2.2.4. <i>Bioaktivni peptidi i proteini</i> .....	15
2.3.UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU (PLE).....	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	19
3.1.MATERIJALI .....	19
3.1.1.Uzorak zelene alge <i>Chlorella vulgaris</i> .....	19
3.1.2.Kemikalije .....	19
3.1.3.Aparatura .....	19
3.1.4.Pribor .....	20
3.2.METODE .....	21
3.2.1.Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE).....	21
3.2.2.Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije pigmenata (klorofil a, klorofil b i karotenoidi) .....	22
3.2.3. Statistička obrada podataka .....	23
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	24
4.1.PIGMENATA U EKSTRAKTU.....	24
4.2.UTJECAJ EKSTRAKCIJSKIH PARAMETARA NA MASENE UDJELE PIGMENATA U EKSTRAKTU .....	25
4.2.1.Utjecaj broja ciklusa na ekstrakciju.....	27
4.2.2.Utjecaj temperature na ekstrakciju .....	27
4.2.3.Utjecaj vremena ekstrakcije .....	28
4.2.4.Utjecaj broja ciklusa ekstrakcije i temperature ekstrakcije .....	29



4.2.5.	Utjecaj broja ciklusa i vremena ekstrakcije .....	30
4.2.6.	Utjecaj temperature i vremena ekstrakcije .....	31
4.2.7.	Regresijski modeli za predviđanje masenih udjela pigmenata .....	33
<b>5.</b>	<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>38</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>39</b>

## **1. UVOD**

Alge su heterogena skupina uglavnom vodenih, fotosintetskih, autotrofnih, nevaskularnih organizama koji mogu biti jednostanični, kolonijalni i složeni, a podsjećaju na kopnene biljne organizme. Imaju važnu ulogu u kružnom ciklusu ugljika uklanjajući višak ugljičnog dioksida iz okoliša te su najveći proizvođači kisika na Zemlji (Moroney i Ynalvez, 2009). Kako bi mogle održati svoj životni ciklus, potrebna im je svjetlost za proces fotosinteze te optimalna vlažnost. Tijelo eukariotskih algi nazivamo steljka (*talus*) na kojoj se nalaze vegetativni organi: korijenčići (*rizoid*), stabalce (*kauloid*), listići (*filoid*) (Castro i Huber, 2005). Smatra se da postoji od 25 000 do 30 000 vrsta algi velike raznolikosti oblika i dimenzija. Međusobno se razlikuju prema vrstama pigmenata u stanici, skladišnim molekulama, broju i izgledu bičeva te načinu razmnožavanja. S obzirom na veličinu i oblik talusa morskih algi razlikuju se makroalge (morske trave) koje nastanjuju litoralnu zonu, a uključuju smeđe (*Phaeophyceae*), crvene (*Rhodophyceae*) i zelene alge (*Chlorophyceae*). Mikroalge uključuju cijanobakterije (*Cyanobacteria*), dinoflagelate (*Dinoflagellata*), dijatomeje (*Bacillariophyceae*), zelene alge (*Chlorophyceae*) i neke vrste drugih skupina (Kılınç i sur., 2013).

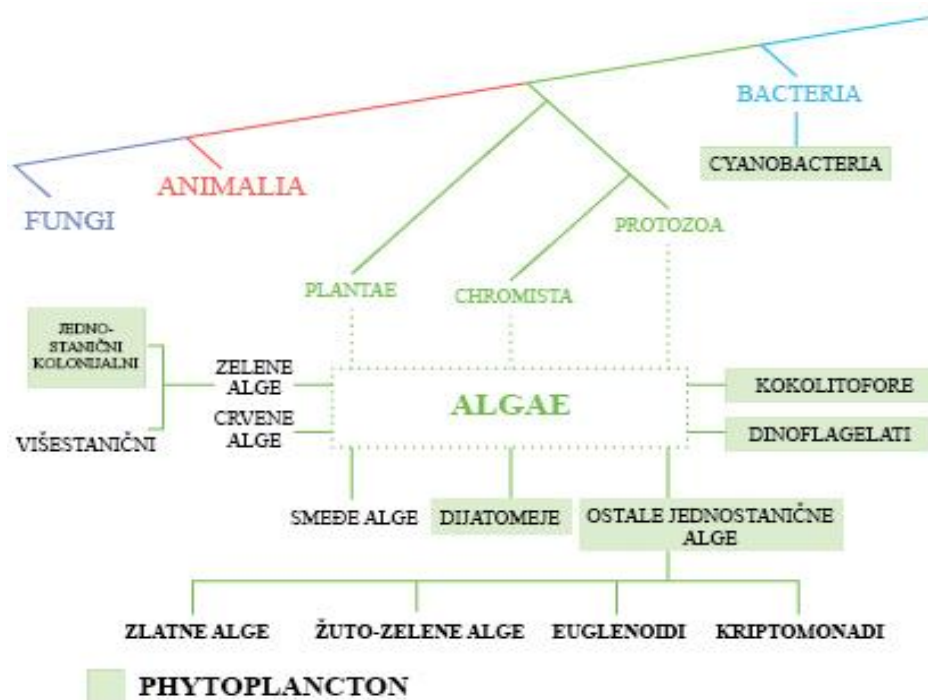
Zelene alge sadrže razne skupine biološki aktivnih spojeva poput fenolnih spojeva, omega-3-masnih kiselina, bioaktivnih peptida i proteina, polisaharida i raznih pigmenata. Zelene alge su sve češće predmet znanstvenih istraživanja zbog toga što biološki aktivni spojevi koje sadrže pokazuju niz pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje. Raznim se istraživanjima traže načini kako bi se svojstva tih biološki aktivnih spojeva očuvala prilikom procesa prerade algi kao funkcionalne hrane. *Chlorella vulgaris* spada u zelene alge porodice *Chlorophyceae*, a od pigmenata najzastupljeniji su klorofili te karotenoidi. Osim specifične boje, pigmenti imaju značajna antioksidativna, protuupalna i druga svojstva. Najznačajniji predstavnici karotenoida, osim  $\beta$ -karotena, su lutein, fikeoritrin i fikocijanin (Kitada i sur., 2009). Kako bi se pigmenti zadržali izvorna funkcionalna svojstva kao sastojak hrane, potrebno ih je ekstrahirati metodom koja ne uzrokuje njihovu degradaciju. Ubrzana ekstrakcija pri povišenom tlaku (PLE) pokazala se kao uspješna metoda za izolaciju osjetljivih spojeva zbog primjene niske temperature i tlaka te kratkog trajanja procesa.

Stoga je cilj ovog rada bio istražiti utjecaj broja ciklusa (1, 2), temperature (100, 130, 180 °C) i vremena (5, 10, 15 min) na prinos klorofila i karotenoida ekstrahiranih iz zelene alge *Chlorella vulgaris* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima uz povišeni tlak (PLE), uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo. Također, cilj je bio optimirati parametre PLE pri kojima će se ostvariti najveći prinosi klorofila i karotenoida.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1.MORSKE ALGE

Morske alge preteča su carstva *Plantae* te se mogu klasificirati u tri velike skupine s obzirom na pigmente i kemijski sastav (slika 1.) Dijele se na smeđe alge (*Phaeophyceae*), crvene alge (*Rhodophyceae*) i zelene alge (*Chlorophyceae*), (slika 2). Odličan su izvor hranjivih sastojaka te su iznimno zastupljene u prehrani azijskih zemalja kao sastojci juha, salata i začina. U azijskim zemljama visok udio vlakana u morskim algama povezuje se s niskom stopom kroničnih bolesti poput tumora i kardiovaskularnih bolesti (Shu-Ying i sur., 2017). S obzirom da se alge nalaze u velikim količinama diljem oceana i mora, mogu biti ključan izvor funkcionalnih spojeva poput polisaharida, proteina, peptida, lipida, aminokiselina, pigmentata, polifenola i minerala (Shu-Ying i sur., 2017).



**Slika 1.** Pojednostavljeni prikaz klasifikacije morskih alga (Anonymous 1, 2016)

Morske alge imaju široku primjenu u prehrambenoj industriji. Mogu se koristiti u pripremi juha, salata, deserata i drugih prehrambenih proizvoda, dajući specifičan okus. Za njihov karakterističan okus odgovoran je natrijev glutamat, poznat kao pojačivač okusa koji se dodaje u začinske mješavine i gotova jela te je karakteriziran kao novi, ugodan okus koji se u Japanu naziva umami. Vrste koje se mogu naći na policama mnogih trgovina hranom u obliku dodataka prehrani su *Spirulina* sp. i *Chlorella* sp. *Spirulina* je alga izuzetno bogata hranjivim sastojcima. Sadrži znatno lako apsorbirajućeg željeza te gama-linolenske kiseline, a bogat je izvor fitonutrijenata i antioksidanasa. Najpoznatija je upotreba crvene alge *Nori* koja se uzgaja zbog potreba japanskog kulinarstva. Suši se, preša u listove i koristi u pripremi tradicionalnog japanskog sushi-ja (Moroney i Ynalvez, 2009).

Pigmenti osim što određuju boju algi, imaju i razna funkcionalna svojstva u organizmu. Alge sadrže klorofile, karotenoide i fikobiliproteine. Pokazuju antimutagena, antikancerogena, antiviralna i antioksidacijska svojstva te neuroprotektivno djelovanje (Holdt i Kraan, 2011).

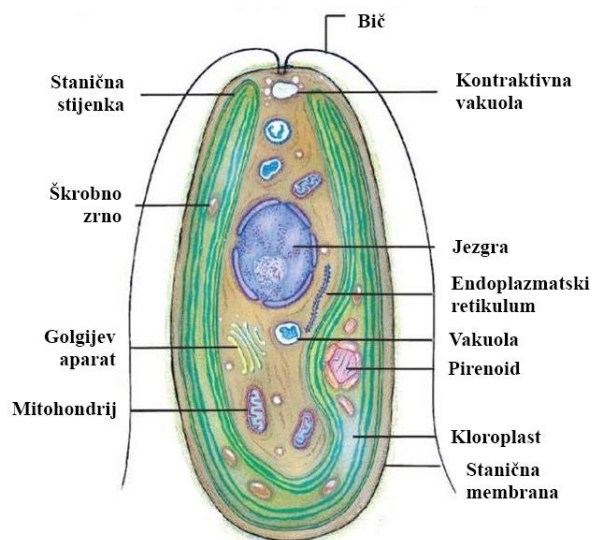


**Slika 2.** Zelena, crvena i smeđa alga (Anonymous 2, 2016)

### 2.1.1. Zelene alge

Zelene alge su najveća skupina algi koje se razlikuju prema obliku i veličini, a uključuju jednostanične oblike manje od 1  $\mu\text{m}$  (*Chlamydomonas*, *Chlorella*), kolonijalne (*Hydrodictyon*, *Volvox*), nitaste (*Spirogyra*, *Cladophora*) i tubaste oblike (*Acetabularia*, *Caulerpa*, *Ulva*), a neke makroalge mogu biti veće od 50 m (Takaichi, 2011). Najraznovrsnija su skupina algi u kojoj razlikujemo od 9000 do 12 000 različitih vrsta koje nastanjuju različita staništa. Sadrže dva oblika klorofila provodeći fotosintezu poput viših biljaka. Fotosintetski pigmenti (klorofil a, klorofil b, karoteni, ksantofili) nalaze se u jednakim omjerima kao u višim biljkama. Za razliku od viših biljaka, obitavaju primarno u vodenom okolišu (Schroeder i sur., 2015).

Tipična stanica alge prikazana je na slici 3, a može biti pokretna ili nepokretna, sadrži središnju vakuolu, a pigmenti se nalaze u plastidima što varira s obzirom na vrstu. Stanica ima karakterističnu dvoslojnu staničnu stjenku koja se sastoji od sloja celuloze i sloja pektina. Hranjive tvari su pohranjene u pirenoidima (proteinske jezgre unutar plastida). Uporaba biomase ili ekstrakata algi treba početi od istraživanja namijenjenih identifikaciji vrste ili genoma. Takva istraživanja su ključna osobito za alge koje nisu uzgajane nego su izuzete iz prirodnog okoliša jer se mogu pojaviti u homogenim ili heterogenim zajednicama. Distribucija pojedinih spojeva u stanici, a posljedično i metoda ekstrakcije bioaktivnih spojeva, ovisi o strukturi stanica. Stoga je izuzetno važno poznavati strukturu kako bi se mogla ekstrahirati maksimalna količina bioaktivnih spojeva (Schroeder i sur., 2015).



**Slika 3.** Prikaz stanice zelene alge (Anonymous 3, 2016)

### 2.1.2. *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* (Slika 4.) je zelena eukariotiska mikroalga koja se pretežno koristi u medicinske svrhe no ima izniman potencijal za proizvodnju biogoriva i hrane. Otkrivena je 1890. godine, a početkom devedesetih godina 20. stoljeća njemački znanstvenici utvrdili su visok sadržaj proteina i pretpostavili da bi *Chlorella vulgaris* mogla biti novi izvor hrane. Japan je trenutno najveći potrošač ove alge pretežno u medicinske svrhe (Kitada i sur., 2009).



**Slika 4.** Stanica alge *Chlorella vulgaris* (Anonymous 4, 2011)

Godišnje se proizvodi oko 2000 tona suhe mase zelenih algi roda *Chlorella*, a glavni proizvođači su Njemačka, Japan i Tajvan. *Chlorella vulgaris* je odlična za industrijsku proizvodnju jer je otporna na razne nepogodne uvjete i druge organizme. Može proizvesti razne organske makromolekule koje su, u industrijskom smislu, značajne poput proteina, lipida i škroba, a proizvodnja se razlikuje ovisno o tehnici koja se koristi za stvaranje biomase (Safi i sur., 2014).

U nepovoljnim uvjetima biomasa se smanjuje, ali povećava se udio lipida i škroba. U povoljnijim uvjetima, sadržaj biomase se povećava (Chisti, 2007). Razvijene su različite tehnike rasta koje iskorištavaju autotrofna, heterotrofna ili miksotrofna svojstva *Chlorella vulgaris*. Uzgoj *Chlorella vulgaris* vrši se autotrofno u zatvorenim foto-bioreaktorom. Sakupljanje biomase se obično vrši centrifugiranjem zbog visoke učinkovitosti procesa. Postoje i druge tehnike kao što su flokulacija, filtracija, flotacija (Lee i sur., 2012).



Sadržaj proteina varira u rasponu od 42% do 58% suhe biomase (Safi i sur., 2013). Imaju poželjna nutritivna svojstva usporedno sa standardima ljudske prehrane koje su dali Svjetska zdravstvena organizacija (eng. *World Health Organisation*, WHO) i Organizacija za hranu i poljoprivredu (eng. *Food and Agricultural Organisation*, FAO). Nadalje, alge proizvode i esencijalne aminokiseline (Safi i sur., 2014).



**Slika 5.** *Chlorella vulgaris* u obliku tableta, granula i praha (Anonymous 5, 2017)

Sadržaj lipida varira u rasponu od 5% do 40% suhe biomase (Becker, 1994), sadržaj polisaharida varira u rasponu od 12% do 55% suhe biomase (Choix i sur., 2012) dok sadržaj pigmenata iznosi oko 2% suhe biomase (Gonzalez i Bashan, 2000). *Chlorella vulgaris* sadrži minerale i vitamine koji su od izuzetne važnosti za ljudsku prehranu. Ova alga se može koristiti kao dodatak prehrani ili aditiv kao bojilo i emulgator. Slika 5 prikazuje proizvode alge u obliku kapsula, granula, ekstrakata, tableta i prahova (Liang i sur., 2004).

Dioba stanica mikroalge *Chlorella vulgaris* traje 8 sati u temperaturnom rasponu od 20 °C do 35 °C uz autotrofne uvjete rasta. Akumulacija karotenoida u *Chlorella vulgaris* ovisi o nizu okolišnih uvjeta poput saliniteta vode, sadržaja dušika i fosfora. *Chlorella vulgaris* raste u fotobiorekatoru s ravnim pločama, tubularnom fotobiorekatoru i fotobiorekatoru s kolonama za biomasu, lipide, masne kiseline i pigmente (Ambati i sur., 2018). Ambati i sur. (2018) u svojem radu navode da je proizvodnja biomase 0,11 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> kada se *C. vulgaris* uzgaja u fotobiorekatoru s ravnim pločama pod jakim intenzitetom svjetlosti.

*Chlorella vulgaris* pokazala je antitumorska i imunomodulacijska svojstva, no unatoč visokovrijednim proteinima i dobrim zdravstvenim učincima, njen potencijal za industrijsku proizvodnju nije još u potpunosti iskorišten zbog intenzivne tamnozeleno boje i snažnog mirisa

(Becker, 2007). Nadalje, ova alga pomaže u otklanjanju toksina iz organizma, pozitivno utječe na probavu, pomaže pri održavanju acido-bazne ravnoteže organizma svojim baznim svojstvima te se pokazalo da pomaže u održavanju normalne razine šećera u krvi u slučaju hipoglikemije i krvnoga tlaka (Peng i sur., 2011).

## 2.2.FUNKCIONALNA SVOJSTVA ZELENIH ALGI

Kemijski spojevi morskih algi koriste se u proizvodnji hrane kao agensi za geliranje, zgrušavanje i emulgiranje. Posljednja istraživanja pokazuju da su morske alge izvrstan izvor hranjivih tvari s raznim biološkim učincima na organizam (Kadam i sur., 2013). Iako su morske alge izložene raznim nepovoljnim uvjetima poput UV zračenja ili promjenjive koncentracije kisika što dovodi do formiranja slobodnih radikala, ne pokazuju značajnu razinu fotodimamičkih oštećenja. Razlog tome jest aktivnost biološki aktivnih spojeva morskih algi koji ih štite od UV oštećenja, stresa i nepogodnih okolišnih uvjeta te biljojeda. Razni uvjeti rasta poput temperature vode, koncentracije soli i hranjivih tvari te svjetlosti utječu na sadržaj biološki aktivnih spojeva (Kadam i sur., 2013).

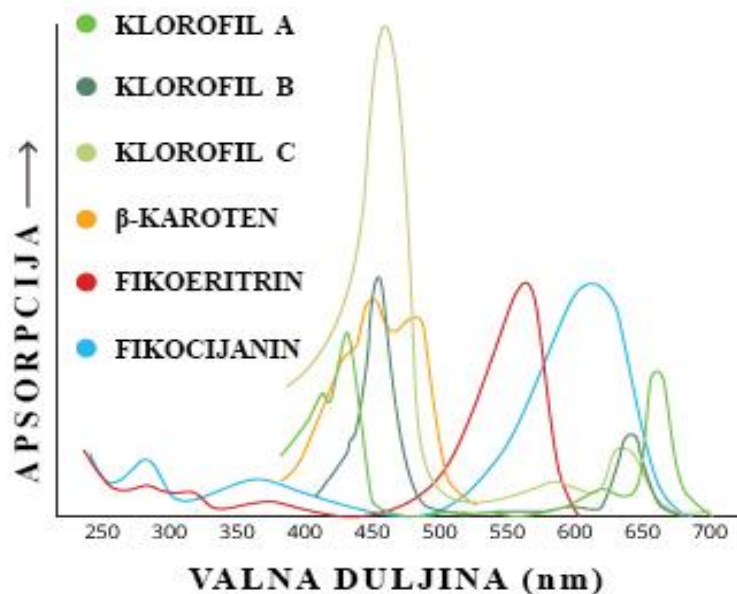
Zelene alge sadrže visok sadržaj polisaharida, pigmenata, minerala i pojedinih vitamina, a sadrže i bioaktivne spojeve poput raznih proteina, lipida, fenola i polisaharida koji imaju antibakterijsko, antivirusno i antifungalno djelovanje. Također, imaju visok udio vode, čak 94% biomase. Pepeo morskih algi sadrži makroelemente i mikroelemente slične višim biljkama što ih čini izvrsnim sirovinama u proizvodnji funkcionalne hrane. Fiziološki aktivni spojevi morskih algi razvrstani su u dvije skupine prema razlici u mehanizmu djelovanja i to absorbirajući visokomolekularni spojevi poput dijetalnih vlakana i niskomolekularni spojevi koji se absorbiraju te direktno utječu na homeostazu organizma (Holdt i Kraan, 2011).

Funkcionalna hrana i njeni sastojci općenito mogu poticati rast i razvoj, utjecati na smanjenje rizika od bolesti te poboljšati opće zdravstveno stanje svakog pojedinca. Navedena svojstva posjeduju fenolni spojevi, omega-3 masne kiseline, bioaktivni peptidi i proteini, karotenoidi te polisaharidi morskih algi (Holdt i Kraan, 2011).

Morske alge danas imaju široku primjenu, a najčešće su to upravo makroalge koje su bogati izvor biološki aktivnih spojeva. Imaju izniman potencijal kao funkcionalni sastojak hrane jer su bogate vlaknima, omega-3 masnih kiselinama, amino spojevima, bioaktivnim peptidima, pigmentima, vitaminima, mineralima i polisaharidima. Mikroalge se najčešće uzgajaju u slatkim vodama te su također zastupljene u ljudskoj prehrani i to najčešće u vidu dodataka prehrani u obliku tableta ili prahova koji se dobivaju sušenjem biomase algi. Morske alge imaju veliki ekonomski značaj jer ih se svake godine uzgaja 18 milijuna tona. Osim navedenoga, koriste se za proizvodnju agara, karagenana i alginata. Bioaktivni potencijal morskih algi još nije u potpunosti iskorišten jer su ti funkcionalni spojevi osjetljivi na tehnike ekstrakcije na bazi topline ili uporabe organskih otapala poput polisaharida i pigmenata za koje se smatra da imaju niz pozitivnih učinaka na zdravlje. Danas su sve učestaliji predmet istraživanja, a koriste se u prehrani ljudi, kao gnojivo su visoke vrijednosti te u raznim granama industrije poput prehrambene, farmaceutske, kozmetičke i kemijske industrije (Kadam i sur., 2013).

### 2.2.1. Pigmenti zelenih algi

*Chlorella vulgaris* je zelena mikroalga koja sadrži različite pigmente poput karotenoida i klorofila. Osim specifične boje, pigmenti imaju i antioksidativna, protuupalna i antikancerogena svojstva. Najznačajniji predstavnici karotenoida, osim  $\beta$ -karotena, su lutein, fikeoritrin i fikocijanin (Kitada i sur., 2009). Na Slici 6 vidljiv je prikaz spektrofotograma koji prikazuje valne duljine pri kojima pojedini pigmenti apsorbiraju svjetlost ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra (UV/VIS spektar), a na osnovu njihove apsorbancije određuje se koncentracija pigmenata u uzorku.

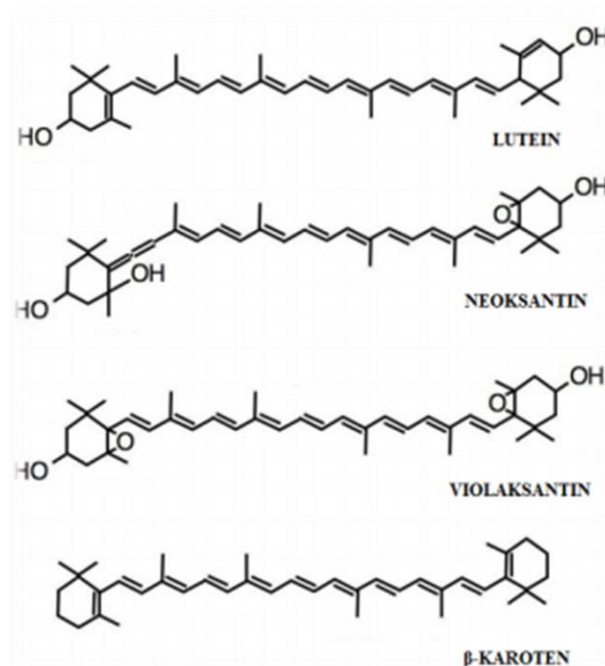


**Slika 6.** Prikaz valnih duljina apsorpcije svjetlosti pigmenata zelenih algi (Colombo-Pallotta i sur., 2006)

### 2.2.1.1. Karotenoidi

Karotenoidi su prirodno najrašireniji pigmenti i prisutni su u svim algama, višim biljkama i raznim bakterijama, a daju crveno, narančasto i žuto obojenje te imaju snažno antioksidacijsko djelovanje te su topljivi u mastima. Po kemijskoj strukturi su tetraterpeni, ugljikovodici, sastavljeni od 8 molekula izoprena (C40), kondenziranih u dugački niz s više dvostrukih veza (alkeni) i s jononskim prstenovima na oba kraja (Holdt i Kraan, 2011). C40 atomi ugljika smatraju se okosnicom karotenoidne molekule. Sadržaj i sastav karotenoidnih pigmenata koje proizvode mikroalge variraju ovisno o okolišnim uvjetima. Dijelev se na karotene i ksantofile temeljem njihove kemijske strukture. Oksigenirani karotenoidi nazivaju se ksantofilima dok su drugi karotenoidi ugljikovodični karotenoidi (Ambati i sur., 2018).

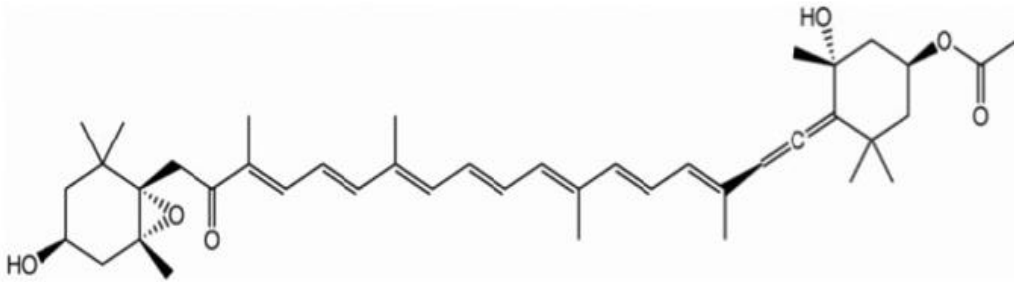
Zelene alge od karotenoida sadrže β-karoten, lutein, violaksantin, neoksantin i zeaksantin čije kemijske strukture su prikazane na Slici 7. Neki karotenoidi su ujedno i funkcionalni vitamini prema svojoj biološkoj i kemijskoj aktivnosti. Fukoksantin je ksantofil koji ima jedinstvenu strukturu i zastupljen u prirodi u značajnim količinama, a njegov udio u algama varira ovisno o životnom ciklusu alga. Stabilan u nepovoljnim uvjetima poput povišene temperature (Holdt i Kraan, 2011).



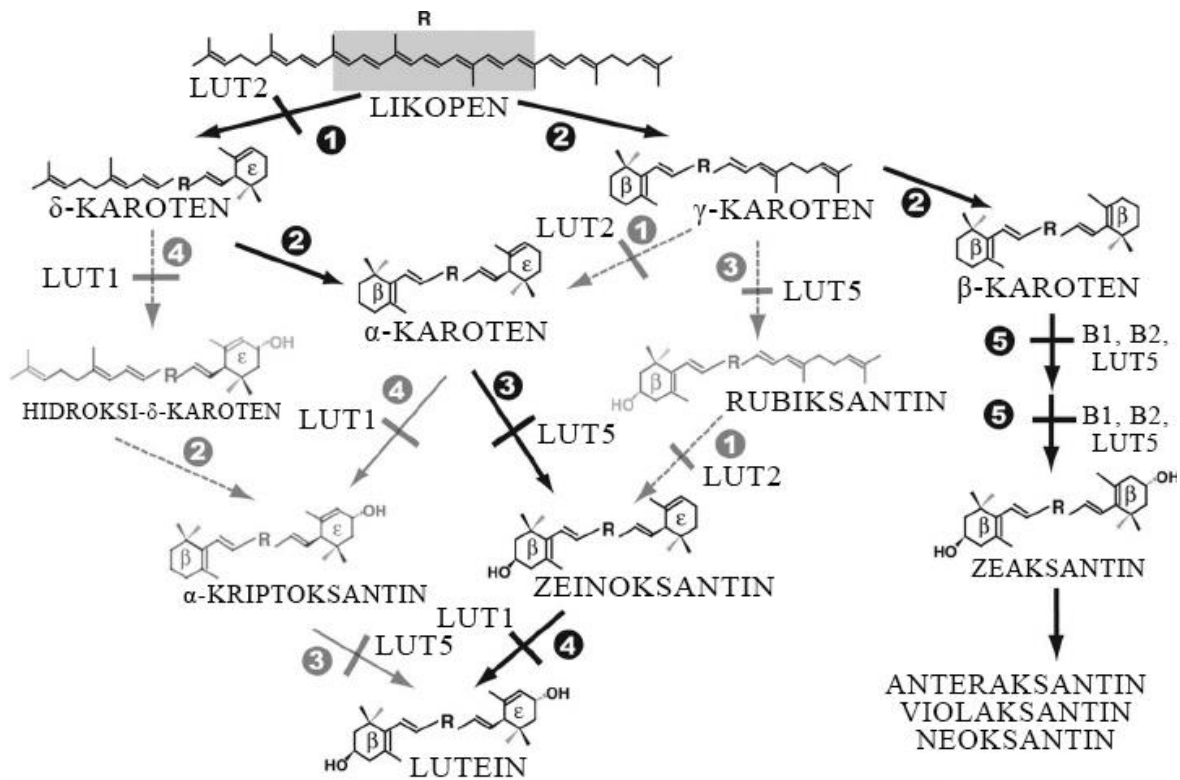
**Slika 7.** Prikaz struktura karotenoida (Kiokias i sur., 2015)

Poznato je više od 750 struktura karotenoida u kopnenim biljkama, bakterijama i u životinjama, a razne studije navode niz različitih struktura u algama. Moguće je da oko 30 tipova karotenoida mogu imati funkciju u fotosintezi, a ostali tipovi su produkti karotenogeneze prikazane na Slici 9 i akumuliraju se u tkivima. Neki karotenoidi pronađeni su samo u određenim rodovima alga te zajedno s klorofilima mogu poslužiti kao kemotaksonomski markeri. Karotenogeneza u algama nije u potpunosti razjašnjena, no postoje pretpostavke na osnovi kemijske strukture karotenoida. Određeni enzimi su potvrđeni u *Chlorophyceae* uključujući *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Dunaliella* i *Haematococcus*, a to su CrtB, CrtP, CrtL-b, CrtR-b, Zep, Vde i CrtW (Takaichi, 2011).

Prema kemijskim strukturama, svi *trans* neoksantini mogu se transformirati u fukoksantine, važne biološki aktivne spojeve čija je struktura prikazana na Slici 8 te dinoksantine, peridinine i diadinoksantine ali većina puteva sinteze je i dalje nepoznata kao i enzimi koji sudjeluju u tim biotransformacijama. U stresnim okolišnim uvjetima kao što je puno svjetlosti, UV zračenje i manjak hranjivih tvari, neke vrse poput *Haematococcus*, *Chlorella* i *Scenedesmus* akumuliraju ketokarotenoide, kantaksantine i astaksantine koji se sintetiziraju kombiniranom aktivnošću enzima CrtR-b i  $\beta$ -karoten ketolaze (CrtW, BKT) (Takaichi, 2011).



**Slika 8.** Prikaz strukture fukoksantina (Peng i sur., 2011)

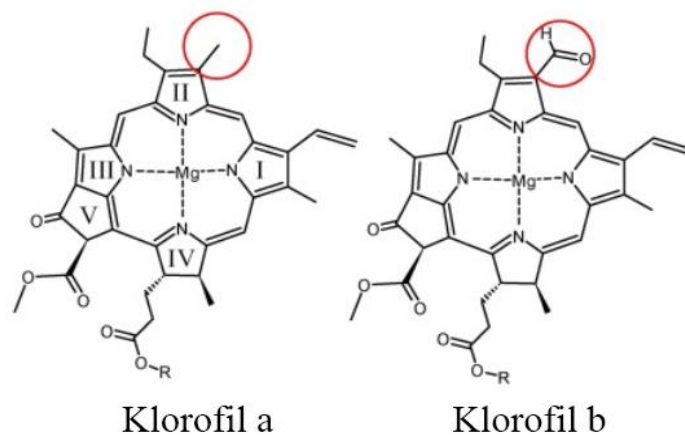


**Slika 9.** Shema nastajanja karotenoida (Anonymous 6, 2018)

Crvene i zelene alge sadrže uglavnom  $\alpha$ -karoten i  $\beta$ -karoten te lutein i zeaksantin, dok smeđe alge sadrže violaksantin i fukoksantin. Karotenoidi imaju niz pozitivnih učinaka na organizam, a ekstrahiraju se pretežno heksanom i drugim nepolarnim otapalima. Novije tehnologije koriste superkritične tekućine, biljna ulja ili visoki tlak pri ekstrakciji (Kadam i sur., 2013).

### 2.2.1.2. Klorofili

Klorofili su zeleni pigmenti topljivi u mastima i glavni su nositelji procesa fotosinteze smješteni u kromoplastima, a sadrže ih alge i više biljke. Postoji 6 tipova klorofila, a to su klorofil a, klorofil b, klorofil c, klorofil d, klorofil e i klorofil f. Klorofili a i klorofili b su kemijski esteri dikarbonske kiseline klorofilina gdje je vodik u jednoj karboksilnoj grupi esterificiran metanolom, a u drugoj fitolom a njihova struktura je prikazana na Slici 10. Klorofil a glavni je klorofil zelenih biljaka i apsorbira svjetlost pri 420 i 670 nm, a između ovih vrijednosti ne apsorbira svjetlost a pronađen je u kopnenim biljkama, algama i fitoplanktonima. Klorofil a se nalazi u svim organizmima koji fotosintiziraju i odgovoran je proces fotosinteze, uključujući alge. Razlog zbog kojeg je klorofil a od izuzetne važnosti je zato što apsorbira svjetlosne valne duljine koje spadaju u spektar sunčeve svjetlosti. Klorofil a je zeleni pigment, što daje biljkama i mnogim algama zelenu boju jer apsorbira sve druge valne duljine osim valne duljine zelene boje koju reflektira. Klorofil b, koji se od klorofila a razlikuje za jednu formilnu skupinu (-CHO) umjesto metilne skupine, apsorbira svjetlost od 460 i 630 nm, a nalazi se u kopnenim biljkama i zelenim algama, a odnos klorofila a i klorofila b je obično 3:1. Klorofil a je manje stabilan na toplinu nego što je to klorofil b, što znači da se klorofil a brže razgrađuje pod utjecajem topline. Klorofil prelazi u feofitin, pirofeofitin i feoforbid prilikom procesiranja hrane, a nastali derivati pokazuju antimutagena i antikancerogena svojstva (Holdt i Kraan, 2011).



**Slika 10.** Prikaz kemijske strukture klorofila a i klorofila b (Saito i sur., 2018)

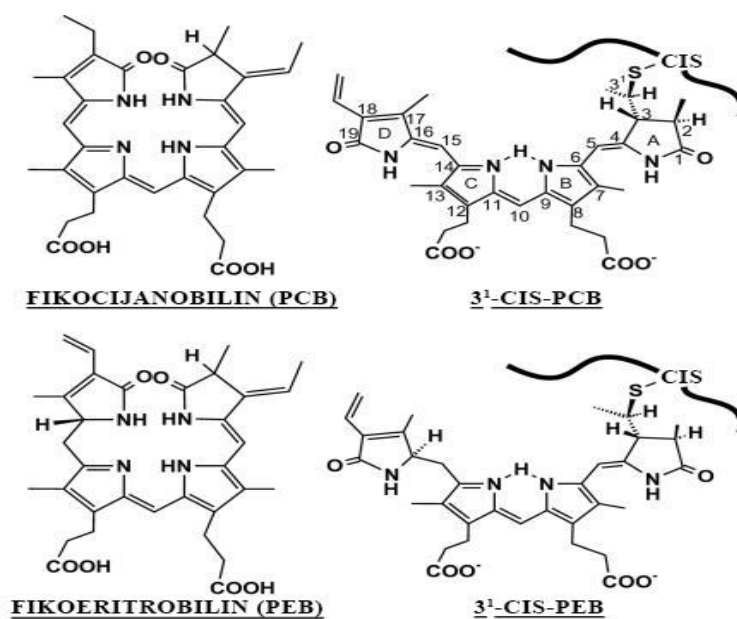
Klorofil c se javlja u određenim vrstama smeđih algi. Sličan je klorofilu b, a pomaže pri apsorpciji sunčeve svjetlosti, ali ne sudjeluje u fotosintezi izvan početne faze. Klorofil c je crvenkasto-smeđi pigment i daje dinoflagelatima njihovu prepoznatljivu boju. Klorofil d je važan pigment crvenih algi, dok je klorofil e nađen u žuto-zelenim algama. Klorofil f je nedavno otkriven u cijanobakterijama u blizini Australije (Holdt i Kraan, 2011).

### 2.2.1.3. Fikobiliproteini

Fikobiliproteini su pigmenti topivi u vodi za razliku od karotenoida i klorofila, a prikazani su na Slici 11. Tvore organele fikobilisome na površini tilakoida. Fikobiliproteini sadrže pigmentirane fikobiline koji su linearni tetrapiroli. Različiti udjeli crvenih fikobilina poput fikoeritrotobilina i plavih fikocijanobilina daju različita obojenja kompleksa s obzirom da apsorbiraju svjetlost pri različitim valnim duljinama (Lobban i sur., 2014).

Fikobiliproteini dijele se na alofikocijanine i fikoeritrocijanine, a unutar fikobilisoma imaju važnu ulogu u procesu fotosinteze, a prikazani su na Slici 11. Nalaze se u algama rodova *Rodophyta*, *Cyanophyta* i *Cyptophyta*. Ovi pigmenti omogućuju fotosintezu na dubinama većim od 10 m gdje bi fotosinteza uz pomoć klorofila bila gotovo nemoguća. Fikobiliproteini se koriste kao prirodna bojila u hrani i u kozmetičkim preparatima. Što se tiče zdravstvenih učinaka pokazuju antioksidacijsko, protuupalno i antiviralno djelovanje te djeluju zaštitno na razna tkiva poput jetre (Sekar i Chandramohan, 2008). Najznačajniji predstavnik fikobiliproteina je fikoeritrin (Sekar i Chandramohan, 2008).





**Slika 11.** Prikaz struktura fikobiliproteina (Zhao i sur., 2007)

## 2.2.2. Ostali biološki aktivni spojevi zelenih algi

### 2.2.2.1. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su grupa spojeva koji sadrže hidroksilnu (-OH) grupu na aromatskom ugljikovodičnom prstenu. Od polifenolnih spojeva u algama su zastupljene fenolne kiseline, tanini, flavanoidi i florotanini. Florotanini su polimeri floroglucinolnih jedinica (1,3,5-trihidroksibenzen), a pronađeni su u visokorefraktivnim bezbojnim vezikulama. Udio florotanina može varirati od 1% do 14% u različitim vrstama morskih algi s time da ih je više u smeđim, nego u zelenim algama. Imaju antioksidacijska, antibiotska, antidiabetička, antiproliferacijska, antiupalna, antialergijska te anti-HIV svojstva (Kadam i sur., 2013). Sadržaj ukupnih fenola i antioksidacijska svojstva morskih algi, pored brojnih čimbenika, značajno ovise i o ekstrakcijskoj metodi. Nadalje, florotanini se ekstrahiraju etanolom ili metanolom kao otapalom, a pročišćavanje se može provoditi semipreparativnom tekućinskom kromatografijom, dok se identifikacija i kvantifikacija provode primjenom HPLC ili UPLC metoda. Tehnika nuklearne magnetne rezonancije (NMR metoda) također se koristi pri karakterizaciji polifenola (Kadam i sur., 2013).

#### 2.2.2.2. *Omega-3 masne kiseline*

Omega-3 masne kiseline imaju važnu ulogu s obzirom na njihov pozitivan učinak pri prevenciji kardiovaskularnih oboljenja, a osobito eikosapentaenska (EPA; 20:5 n-3) i dokozaheksaenska (DHA; 22:6 n-3) masna kiselina (Kadam i sur., 2013). Ove masne kiseline pretežno se nalaze u jednostaničnim morskim algama. Nadalje, EPA i DHA akumuliraju se duž hranidbenog lanca. Omega-3 masne kiseline pozitivno utječu na centralni živčani sustav. Ekstrahiraju se kloroformom kao ekstrakcijskim otapalom, a profiliraju se pomoću plinske kromatografije (GC metoda) ili tankoslojnom kromatografijom. U novije vrijeme proučava se učinak ekstrakcije superkritičnom tekućinom i ultrazvukom (Kadam i sur., 2013).

#### 2.2.2.3. *Polisaharidi*

Polisaharidi su polimeri jednostavnih šećera, odnosno, monosaharida. Alge proizvode fikokoloide, kompleksne polisaharidne molekule, poput alginata i karagenana. Neki od tih polisaharida imaju funkcionalna svojstva. Sulfitirani polisaharidi kao fukoidani, forfirani i fulkularani pokazali su biološku aktivnost kao i nesulfitirani laminarin. Polisaharidi se ekstrahiraju pomoću kiselog ili vodenog otapala, a za razdvajanje polisaharida koristi se kalcijev klorid (Kadam i sur., 2013).

#### 2.2.2.4. *Bioaktivni peptidi i proteini*

Udio proteina u morskim algama razlikuje se s obzirom na vrstu. Generalno, smeđe alge imaju niži udio proteina (3-15% suhe tvari) s obzirom na zelene i crvene alge (10-47% suhe tvari). Esencijalne aminokiseline poput histidina, izoleucina, leucina i valina prisutne su u većini morskim algama. Udio izoleucina i treonina u *Palmaria palmata* je 3,5-3,7 g i 3,6-4,1 g aminokiselina u 100 g proteina, a taj udio je određen u leguminozama. Histidin je nađen u *Ulva pertusa* udjela 4,0 g aminokiselina u 100 g proteina, a taj udio je određen u kokošjim jajima (Kadam i sur., 2013). Nadalje, pojedine aminokiseline poput taurina imaju antioksidacijsko djelovanje. Do sada se ekstrakcija i frakcioniranje proteina makroalgi, peptida i aminokiselina provodi u laboratorijskom mjerilu. Spektrofotometrijske metode poput tekućinske kromatografije s masenom spektrometrijom (LC-MS metoda) i ultrafiltracija koriste se za razdvajanje proteina i peptida na frakcije različite molekulske mase i strukture (Kadam i sur., 2013).

### 2.3. UBRZANA EKSTRAKCIJA OTAPALIMA PRI POVIŠENOM TLAKU (PLE)

Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku je novija metoda ekstrakcije organskih spojeva u kratkom vremenu pri visokoj temperaturi. Ova metoda omogućuje brzu ekstrakciju u trajanju od 2 do 20 minuta pri visokoj temperaturi u rasponu od 40 do 200 °C te visokom tlaku u rasponu od 3,5 do 20,4 MPa, a masa uzorka treba biti u rasponu od 1 do 100 g.

Povišeni tlak i temperatura kao parametri PLE ekstrakcije imaju značajan utjecaj na otapalo, uzorak te utječu na interakcije uzorka i otapala. Povišeni tlak omogućuje bolje prodiranje otapala u matricu uzorka te u konačnici poboljšava ekstrakciju analita iz matrice. Visoka temperatura povećava topljivost analita i time se ostvaruje bolji i brži prijenos mase iz matrice u otapalo. Nadalje, visoka temperatura oslabljuje međumolekulske veze poput dipol-dipol, vodikovih i Van der Waalsovih veza te se smanjuje viskoznost i površinska napetost čime se dodatno pospješuje ekstrakcijska učinkovitost (Fontana i sur., 2015).

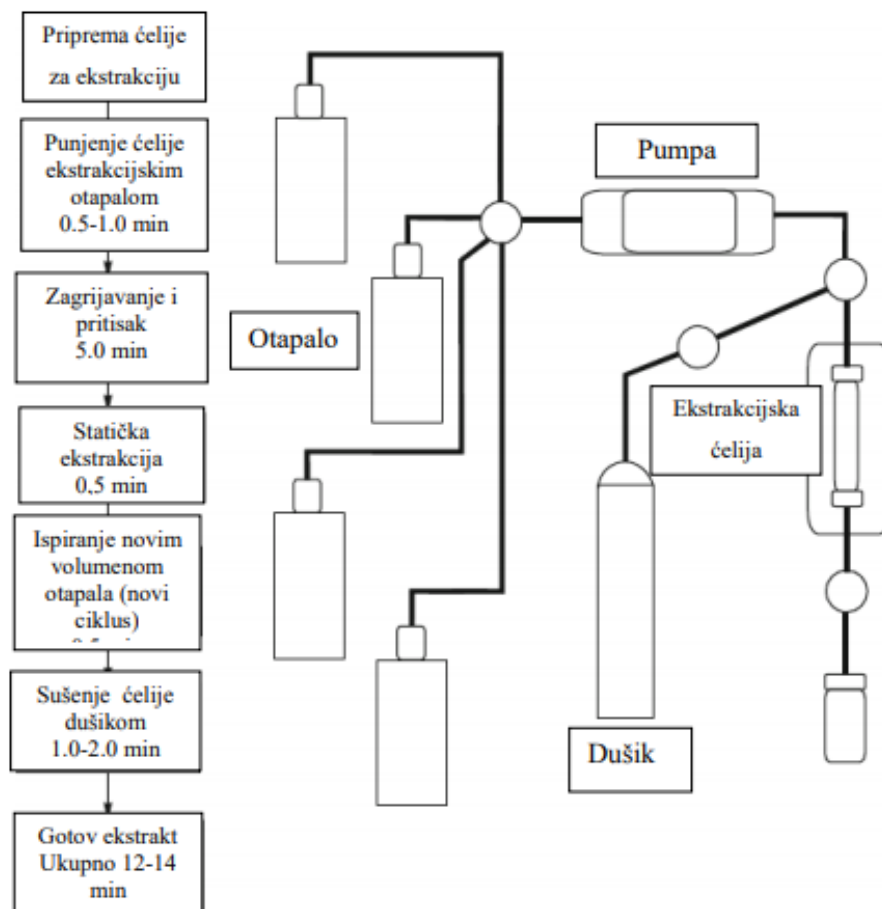


**Slika 12.** Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalima, Dionex PLE ® 350 (vlastita fotografija)

Uređaj za ubrzanu ekstrakciju otapalom 1995. godine predstavila je američka tvrtka Dionex prikazan na Slici 12. Dionex PLE® 350 je sustav za ubrzanu ekstrakciju otapalima kao sekvencijski sustav koji može vršiti proces ekstrakcije na 24 uzorka u jednoj ekstrakcijskoj šarži. Ekstrakcijske ćelije su napravljene od nehrđajućeg čelika, a mogu biti volumena od 5, 10, 22, 34, 66 i 100 mL. Ova tehnika omogućava korištenje otapala raznih polarnosti od heksana do vode i metanola. Vrsta uzorka je bitna pri izboru otapala kojim će se vršiti ekstrakcija. Otapalo se može postaviti i u ekstrakcijsku ćeliju s uzorkom kako bi se pospješila selektivnost procesa (Mottaleb i Sarker, 2012).

Razne studije su istraživale učinkovitost ubrzane ekstrakcije otapalima biljnih materijala naspram tradicionalnih tehnika ekstrakcije različitih uzoraka. Jentzer i sur. (2015) su provodili ekstrakciju glikozida iz lišća stevije (*S. rebaudiana*) PLE metodom kao nekonvencionalnom metodom i drugim konvencionalnim metodama. Parametri poput vremena, temperature, tlaka i broja ciklusa značajno su utjecali na uspješnost ekstrakcije. Zaključili su da je PLE metoda brza, učinkovita, ponovljiva i ekološki prihvatljiva metoda. Zaghdoudi i sur. (2015) su izolirali karotenoide iz uzoraka plodova kaki, breskve i marelice gdje su eksperimentalno utvrđeni optimalni uvjeti ekstrakcije (temperatura od 40 °C, 30 mL organskih otapala (MeOH:THF) (20:80, v/v, tlak od 103 bara i vrijeme statičke ekstrakcije od 5 min). Uspješno su ekstrahirani ksantofili poput luteina,  $\beta$ -zeaksantina i karotenoidi poput  $\beta$ -karotena. Chuang i sur. (2015) su provodili izolaciju 11 lijekova akumuliranih u povrću. QuEChERS ("Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe") metoda pokazala je bolje rezultate od PLE metode jer je jeftinija metoda, brža je priprema uzoraka i potrebne su manje količine organskih otapala. Plaza i sur. (2012) su istraživali ekstrakciju pod visokim tlakom i ultrazvučnu ekstrakciju biološki aktivnih spojeva iz alge *Chlorella vulgaris*. Ustanovili su da je ekstrakcija pri visokim tlaku bolja od ultrazvučne ekstrakcije zbog automatiziranosti, brzine i učinkovitosti metode, a njena shema prikazana je na Slici 13. Putnik i sur. (2017) u svom radu su pomoću PLE metode ekstrahirali biološki aktivne spojeve iz lista masline uz 50%-tni etanol kao otapalo. Zaključili su da PLE učinkovita metoda za ekstrakciju fenolnih spojeva iz lista masline. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se optimiranjem PLE parametara mogu uspješno izolirati različite grupe fenolnih spojeva iz lista masline, pa su tako optimalni uvjeti za ekstrakciju: (i) ukupnih fenola - 2 ciklusa ekstrakcije u trajanju od 5 min pri 80 °C, (ii) ukupnih flavonoida - 1 ciklus ekstrakcije u trajanju od 15 min pri 100 °C; (iii) ukupnih hidroksicimetnih kiselina - 2 ciklusa ekstrakcije u trajanju od 15 min pri 91 °C; te (iv) ukupnih flavonola - 1 ciklus ekstrakcije u trajanju od 5 min pri 87 °C.

Kako se u novije vrijeme sve više primjenjuju načela „zelene kemije“ i ispituje primjena vode kao otapala, Bursać Kovačević i sur. (2018) su istražili utjecaj inovativne ekstrakcije vrućom vodom pod tlakom (PHWE) na osjetljive polarne i nepolarne biološki aktivne spojeva lista stevije (*Stevia rebaudiana* Bertoni) varirajući parametre temperature (100, 130 i 160 °C), statičkog vremena ekstrakcije (5 i 10 min) i broja ekstrakcijskih ciklusa (1, 2 i 3). Rezultati i ovog istraživanja upućuju na selektivnost izolacije ciljanih skupina spojeva obzirom na zadane parametre ekstrakcije. Temperatura se izdvojila kao najznačajniji parametar ekstrakcije, pa su tako najveća iskorištenja zabilježena za gotovo sve skupine istraživanih spojeva pri 160 °C. Nadalje, dulje statičko vrijeme ekstrakcije pogoduje boljoj ekstrakciji steviol glikozida, kondenziranih tanina i klorofila a, dok je veći broj ciklusa ekstrakcije pogodovao boljoj ekstrakciji ukupnih fenola. Za izolaciju karotenoida, niti jedan od ispitivanih parametara ekstrakcije nije pokazao značajan utjecaj ( $p=0.48$ ).



**Slika 13.** Shema sustava ubrzane ekstrakcije otapalima (Mottaleb i Sarker, 2012)

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1.MATERIJALI

#### 3.1.1.Uzorak zelene alge *Chlorella vulgaris*

Za istraživanje je korišten prah zelene alge *Chlorella vulgaris* proizvođača Nature's Finest by NutriSlim porijeklom iz Kine. Prah je proizveden prema HACCP standardima kvalitete bez uporabe genetski modificiranih organizama (GMO) te je certificiran kao organski proizvod od strane akreditiranog instituta Kon-Cert. Prah je pohranjen u originalnoj ambalaži u mraku na sobnoj temperaturi do ekstrakcije.

#### 3.1.2.Kemikalije

- 96 %-tni etanol, p.a. (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- destilirana voda
- dijatomejska zemlja, 6/60 mesh, 26033 (Restek Corporation, SAD)

#### 3.1.3.Aparatura

- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- PLE ekstraktor, Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- analitička vaga, ABT 220 – 4M (Kern, Njemačka)
- analitička vaga, AX224 (OHAUS Corporation, SAD)
- vortex mješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)



#### 3.1.4.Pribor

- plastična žličica
- celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL)
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)
- mikropipete (100  $\mu$ L i 1000  $\mu$ L)
- metalna špatula
- stakleni štapić
- staklene kivete
- plastična sisaljka

## 3.2.METODE

### 3.2.1.Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE)

#### *Postupak ekstrakcije:*

Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika volumena 22 mL pune se uzastopnim slojevima praškastog materijala. Prvo se na dnu ćelije postavljaju 2 celulozna filtera veličine pora 20 µm, zatim se dodaje oko 2 cm sloja dijatomejske zemlje mase 2 g, potom se dodaje 1 g ( $\pm 0,01$ ) g praha alge *Chlorella vulgaris* pomiješan s 2 g dijatomejske zemlje te se na kraju dodaje ponovno još jedan sloj dijatomejske zemlje kako bi se ekstrakcijska ćelija potpuno napunila. Pripremljeni uzorci se postavljaju u ekstrakcijski uređaj PLE Dionex 350@. Otapalo je etanol, a ekstrakcija se provodila pri povišenim temperaturama od 100 °C, 130 °C i 160 °C, tijekom 1 ili 2 ciklusa, a vrijeme trajanja ciklusa je bilo 5 min, 10 min i 15 min. Po završenoj ekstrakciji, dobiveni ekstrakti se prenose u odmjernu tikvicu od 50 mL i 100 mL i nadopunjuju se vodom te se pohranjuju u hladnjaku na 4 °C do provođenja spektrofotometrijske analize. Plan provođenja ekstrakcije prikazan je u Tablici 1.

**Tablica 1.** Plan provođenja ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE)

<b>UZORAK</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>BROJ CIKLUSA</b>	<b>VRIJEME (min)</b>
C1	100	1	5
C2	100	1	10
C3	100	1	15
C4	100	2	5
C5	100	2	10
C6	100	2	15
C7	130	1	5
C8	130	1	10
C9	130	1	15
C10	130	2	5
C11	130	2	10
C12	130	2	15
C13	160	1	5
C14	160	1	10
C15	160	1	15
C16	160	2	5
C17	160	2	10
C18	160	2	15

Uređaj omogućuje ekstrakciju organskih spojeva iz krutih i polukrutih uzoraka uz primjenu različitih otapala ili smjesa otapala uz doziranje različitih količina otapala. U ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika se postavlja uzorak sa sredstvom za homogenizaciju i sušenje. Ćelije su pod utjecajem visokog tlaka tijekom zadanog vremena ekstrakcije te se zagrijavaju. Otapalo se transportira iz rezervoara cjevčicama do ekstrakcijske ćelije i ispunjava ju. Preostali organski spojevi se otapaju svježim otapalom, a sušenje se provodi završnim čišćenjem plinovitim dušikom. Ćelija se s uzorkom zagrijava direktnim putem, a ekstrakcija se provodi neposrednim kontaktom s otapalom visoke temperature statički i dinamički. Na kraju ekstrakcije komprimirani dušik uklanja otapalo iz uzorka u bočice za analizu. Filtrirani ekstrakt koji je na taj način prikupljen je spreman za daljnje analize (Mottaleb i Sarker, 2012).

### 3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije pigmenta (klorofil a, klorofil b i karotenoidi)

Određivanje pigmenta provodi se u etanolnom ekstraktu uzorka primjenom spektrofotometrijske metode. Mjerenje intenziteta obojenja provelo se pri valnim duljinama od 470nm (za karotenoide) te 649 nm i 664 nm (za klorofile) na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD).

#### *Postupak određivanja:*

U staklenu kivetu otpipetira se 150  $\mu\text{L}$  uzorka i 3000  $\mu\text{L}$  etanola. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnim duljinama od 470 nm (za karotenoide), 649 nm i 664 nm (za klorofile). Na isti način se pripremi i slijepa proba, no umjesto ekstrakta uzima se isti volumen ekstrakcijskog otapala. Svi uzorci su analizirani u paraleli

Na osnovu dobivenih rezultata apsorbancije (A), određene su koncentracije klorofila a (Ch-a), klorofila b (Ch-b) i karotenoida (Cx+c) prema sljedećim jednadžbama (Sumanta i sur., 2014):

$$\text{Ch - a} = 13,36A_{664} - 5,19A_{649} \quad \text{JEDN. 1}$$

$$\text{Ch-b} = 27,43A_{649} - 8,12A_{664} \quad \text{JEDN. 2}$$

$$\text{Cx + c} = (1000A_{470} - 2,13Ca - 97,63Cb) / 209 \quad \text{JEDN. 3}$$

Dobivene vrijednosti koncentracija izražene su u  $\mu\text{g mL}^{-1}$  te su preračunate u maseni udio koji je izražen u  $\text{mg g}^{-1}$  suhe tvari (Tablica 2.)

### 3.2.3. Statistička obrada podataka

Eksperimentalni dizajn i statistička analiza napravljeni su pomoću softvera STATISTICA v. 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Parametri analize su (a) broj ciklusa (1 i 2), (b) temperatura (100, 130 i 160 ° C), (c) vrijeme (5, 10 i 15 min). Kontinuirane varijable analizirane su multivarijantnom analizom varijance (MANOVA). Granične srednje vrijednosti uspoređene su s Tukeyovim LSD višestrukim usporednim testovima. Razine značajnosti za sva ispitivanja bile su  $\alpha \leq 0,05$ . Prednost za promatranim odgovorom postavljena je na visok (1.0). Čimbenici su postavljeni na optimalnu vrijednost i promatrani su kako slijedi: temperatura na 7 koraka, vrijeme na 10 koraka i broj ciklusa u 2 koraka.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1.PIGMENATA U EKSTRAKTU

Nakon provedenih analiza, rezultati su izraženi tablično, komentirani su i uspoređeni s dosadašnjim istraživanjima iste ili slične problematike.

**Tablica 2.** Koncentracije klorofila a, klorofila b i karotenoida u ekstraktima zelene alge *Chlorella vulgaris* dobivenih primjenom PLE

	Ch-a ( mg g <sup>-1</sup> s.t.)	Ch-b ( mg g <sup>-1</sup> s.t.)	Cx+c ( mg g <sup>-1</sup> s.t.)
<b>C1</b>	5,866 ± 0,008	2,081 ± 0,372	1,324 ± 0,010
<b>C2</b>	7,441 ± 0,052	2,397 ± 0,094	1,954 ± 0,066
<b>C3</b>	7,054 ± 0,216	2,192 ± 0,012	1,621 ± 0,059
<b>C4</b>	1,138 ± 0,024	0,544 ± 0,032	0,302 ± 0,029
<b>C5</b>	8,320 ± 0,004	3,098 ± 0,255	1,743 ± 0,048
<b>C6</b>	10,222 ± 0,147	3,447 ± 0,125	2,016 ± 0,025
<b>C7</b>	10,451 ± 0,148	3,626 ± 0,054	2,068 ± 0,009
<b>C8</b>	11,017 ± 0,199	3,916 ± 0,355	2,023 ± 0,217
<b>C9</b>	0,797 ± 0,044	0,635 ± 0,045	0,209 ± 0,010
<b>C10</b>	11,749 ± 0,144	4,399 ± 0,164	2,214 ± 0,007
<b>C11</b>	9,300 ± 0,077	3,364 ± 0,241	1,486 ± 0,113
<b>C12</b>	13,964 ± 0,335	5,581 ± 0,085	2,093 ± 0,056
<b>C13</b>	12,405 ± 0,225	4,725 ± 0,263	1,876 ± 0,152
<b>C14</b>	14,498 ± 0,035	5,702 ± 0,093	1,934 ± 0,033
<b>C15</b>	1,368 ± 0,000	2,150 ± 0,000	0,273 ± 0,014
<b>C16</b>	12,328 ± 0,032	4,937 ± 0,017	1,828 ± 0,012
<b>C17</b>	14,227 ± 0,011	5,514 ± 0,151	2,229 ± 0,028
<b>C18</b>	13,901 ± 0,179	4,591 ± 0,071	1,481 ± 0,036

Bilješka. Ch-a označava koncentraciju klorofila a, Ch-b označava koncentraciju klorofila b, a Cx+c označava koncentraciju karotenoida.

#### 4.2. UTJECAJ EKSTRAKCIJSKIH PARAMETARA NA MASENE UDJELE PIGMENATA U EKSTRAKTU

**Tablica 3.** Utjecaj različitih PLE parametara na masene udjele klorofila a, klorofila b i karotenoida u ekstraktima zelene alge *Chlorella vulgaris* dobivenih primjenom PLE

	N	Ch-a	Ch-b	Cx+c
<b>Broj ciklusa</b>		$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
1	18	$7,88 \pm 0,03^a$	$3,05 \pm 0,04^a$	$1,48 \pm 0,02^a$
2	18	$10,57 \pm 0,03^b$	$3,94 \pm 0,04^b$	$1,71 \pm 0,02^b$
<b>Temperatura (°C)</b>		$p \leq ,00 \dagger$	$p \leq ,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
100	12	$6,67 \pm 0,04^a$	$2,29 \pm 0,05^a$	$1,49 \pm 0,02^a$
130	12	$9,55 \pm 0,04^b$	$3,59 \pm 0,05^b$	$1,68 \pm 0,02^c$
160	12	$11,45 \pm 0,04^c$	$4,60 \pm 0,05^c$	$1,60 \pm 0,02^b$
<b>Vrijeme (min)</b>		$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
5	12	$8,99 \pm 0,04^b$	$3,39 \pm 0,05^b$	$1,60 \pm 0,02^b$
10	12	$10,80 \pm 0,04^c$	$3,99 \pm 0,05^c$	$1,89 \pm 0,02^c$
15	12	$7,88 \pm 0,04^a$	$3,10 \pm 0,05^a$	$1,28 \pm 0,02^a$
<b>Broj ciklusa, temperatura (°C)</b>		$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
1, 100	6	$6,79 \pm 0,06^a$	$2,22 \pm 0,07^a$	$1,63 \pm 0,03^b$
1, 130	6	$7,42 \pm 0,06^b$	$2,73 \pm 0,07^b$	$1,43 \pm 0,03^a$
1, 160	6	$9,42 \pm 0,06^c$	$4,19 \pm 0,07^c$	$1,36 \pm 0,03^a$
2, 100	6	$6,56 \pm 0,06^a$	$2,36 \pm 0,07^a$	$1,35 \pm 0,03^a$
2, 130	6	$11,67 \pm 0,06^d$	$4,45 \pm 0,07^c$	$1,93 \pm 0,03^c$
2, 160	6	$13,49 \pm 0,06^e$	$5,01 \pm 0,07^d$	$1,85 \pm 0,03^c$
<b>Broj ciklusa, vrijeme (min)</b>		$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
1, 5	6	$9,57 \pm 0,06^c$	$3,48 \pm 0,07^b$	$1,76 \pm 0,03^c$
1, 10	6	$10,99 \pm 0,06^f$	$4,00 \pm 0,07^c$	$1,97 \pm 0,03^d$
1, 15	6	$3,07 \pm 0,06^a$	$1,66 \pm 0,07^a$	$0,70 \pm 0,03^a$
2, 5	6	$8,40 \pm 0,06^b$	$3,29 \pm 0,07^b$	$1,45 \pm 0,03^b$
2, 10	6	$10,62 \pm 0,06^d$	$3,99 \pm 0,07^c$	$1,82 \pm 0,03^c$
2, 15	6	$12,70 \pm 0,06^g$	$4,54 \pm 0,07^d$	$1,86 \pm 0,03^{c,d}$
<b>Temperatura (°C), vrijeme (min)</b>		$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$	$p \leq 0,00 \dagger$
100, 5	4	$3,50 \pm 0,07^a$	$1,31 \pm 0,09^a$	$0,81 \pm 0,04^a$
100, 10	4	$7,88 \pm 0,07^c$	$2,75 \pm 0,09^b$	$1,84 \pm 0,04^c$
100, 15	4	$8,64 \pm 0,07^d$	$2,82 \pm 0,09^b$	$1,82 \pm 0,04^c$
130, 5	4	$11,10 \pm 0,07^f$	$4,01 \pm 0,09^e$	$2,14 \pm 0,04^d$
130, 10	4	$10,16 \pm 0,07^e$	$3,64 \pm 0,09^{d,e}$	$1,75 \pm 0,04^c$
130, 15	4	$7,38 \pm 0,07^b$	$3,11 \pm 0,09^{b,c}$	$1,15 \pm 0,04^b$
160, 5	4	$12,37 \pm 0,07^g$	$4,83 \pm 0,09^f$	$1,85 \pm 0,04^c$
160, 10	4	$14,36 \pm 0,07^h$	$5,61 \pm 0,09^g$	$2,08 \pm 0,04^d$
160, 15	4	$7,63 \pm 0,07^{b,c}$	$3,37 \pm 0,09^{c,d}$	$0,88 \pm 0,04^a$
<b>Prosječna vrijednost</b>	<b>36</b>	<b>9,22</b>	<b>3,49</b>	<b>1,59</b>

Bilješka. Vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod  $p \leq 0,05$ .

\*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna pogreška u  $\text{mg g}^{-1}$  s.t.

† Statistički značajni parametar kod  $p \leq 0,05$ .

‡ Statistički neznačajni parametar kod  $p \leq 0,05$ .

Prema rezultatima u Tablici 3 vidljivo je kako različiti parametri ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku i njihovi međusobni odnosi imaju značajan utjecaj na ekstrakciju pigmentata i njihove masene udjele u ekstraktu. Varirajući različite parametre ekstrakcije (vrijeme, temperatura, broj ciklusa), koji su se pokazali statistički značajnima, i spektrofotometrijskom analizom koja je provedena u paraleli analizirano je ukupno 36 uzoraka čije prosječne vrijednosti masenih udjela za pojedine pigmente iznose za Ch-a  $9,22 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., za Ch-b  $3,49 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. te za Cx+c  $1,59 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. Prosječna vrijednost masenog udjela Ch-a u odnosu na Ch-b pokazuje specifičan omjer 3:1 što je u skladu s istraživanjem Holdt i Kraana (2011). Koncentracija karotenoida je bila manja u usporedbi s koncentracijom klorofila što upućuje na njihovu manju zastupljenost u tkivu zelene alge *Chlorella vulgaris* te zbog kemijske strukture i njihovu veću osjetljivost na parametre ove ekstrakcijske metode. Rezultati istraživanja Cha i sur. (2010) također upućuju na manju koncentraciju karotenoida u odnosu na klorofile u tkivu alge *Chlorella vulgaris* te veću koncentraciju Ch-a u odnosu na Ch-b, no omjer ova dva pigmenta u rezultatima njihovog rada jest 5:3. Eksperimentalna vrijednost koncentracije Ch-a u njihovom radu iznosi  $10,83 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., Ch-b  $6,81 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., dok je koncentracija  $\beta$ -karotena  $0,67 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., a luteina  $3,70 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. Prema rezultatima rada Cha i sur. (2010) ovaj tip ekstrakcijske metode pri povišenom tlaku je pogodan za ekstrakciju osjetljivih karotenoida i klorofila te je minimizirano formiranje feoforbida a koji može uzrokovati trovanje hranom.



#### 4.2.1. Utjecaj broja ciklusa na ekstrakciju

Ekstrakcija se sukladno postavljenom planu eksperimenta odvijala u 1 ili 2 ekstrakcijska ciklusa. Primjenom 2 ekstrakcijska ciklusa postigla se veća koncentracija svih analiziranih pigmenta u etanolnom ekstraktu gdje je koncentracija Ch-a iznosila  $10,57 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , Ch-b  $3,94 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  i Cx+c  $1,71 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  Veći broj ciklusa omogućio je potpuniji prijenos mase iz uzorka u ekstrakcijsko otapalo. Prema istraživanju Mustafe i Turner (2011) pokazalo se da veći broj ciklusa utječe na bolje iskorištenje procesa i da se prelazi limit iskorištenja jednog ekstrakcijskog ciklusa. Delgado-Zamarreño i sur. (2012) u svojem radu objašnjavaju da se tijekom jednog ekstrakcijskog ciklusa ne može ekstrahirati analit iz matriksa u otapalo u potpunosti te se otapalo tijekom jednog ekstrakcijskog ciklusa mora uvesti tijekom ekstrakcijskog procesa kako bi ekstrakcija bila uspješnija. Najbolji učinak ekstrakcije dobili su prilikom tri ili četiri ciklusa. Pouralinazar i sur. (2012) su u svojem radu istraživali učinak PLE metode na ekstrakciju ulja *Orthosiphon stamineus*. Pokazalo se da je broj ekstrakcijskih ciklusa dominantan parametar pri konstantnom tlaku i temperaturi te se povećanjem broja ciklusa proporcionalno povećava i koncentracija analita u otapalu. Povećanje broja ciklusa uz uvođenje otapala tijekom procesa ekstrakcije pomaže uspostavu koncentracijske ravnoteže između matriksa i otapala. Ekstrakcija u nekoliko ciklusa koristi se za uzorke koji sadrže visoku koncentraciju analita te za uzorke u kojima otapalo teško penetrira kroz matriks.

#### 4.2.2. Utjecaj temperature na ekstrakciju

Ekstrakcija klorofila i karotenoida provedena je pri temperaturama od  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pokazalo se da varijacija parametra temperature ima različit učinak na ekstrakciju klorofila i karotenoida. Koncentracija klorofila raste proporcionalno s porastom temperature. Porastom temperature sa  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  na  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  koncentracija Ch-a porasla je s  $6,67 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  na  $11,45 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , dok je koncentracija Ch-b porasla s  $2,29 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  na  $5,01 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  Najmanji prinosi Cx+c ( $1,49 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) se dobivaju pri temperaturi ekstrakcije od  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , a najveći ( $1,68 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ ) pri temperaturi ekstrakcije od  $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Na temelju dobivenog može se zaključiti da koncentracija karotenoida u ekstraktu raste proporcionalno porastom temperature do određene granice kada počne opadati. Denery i sur. (2004) u svojem radu objašnjavaju da su  $\beta$ -karoten i luten osjetljivi na povišenu temperaturu i svjetlost te lako oksidiraju uslijed čega dolazi do njihove izomerizacije.

Prema ovim rezultatima može se zaključiti da temperatura pokazuje dvojak utjecaj na ekstrakciju karotenoida. S jedne strane pokazuje da porast temperature ubrzava ekstrakciju karotenoida s obzirom da povećava topljivost ovih pigmenata, dok s druge strane može dovesti do degradacije spojeva osjetljivih na povišenu temperaturu. Dobiveni rezultati upućuju na to da su karotenoidi osjetljivi na povišene temperature te da visoka temperatura dovodi do degradacije ove skupine pigmenata. Temperatura od 100 °C je preniska za uspješnu ekstrakciju klorofila a, klorofila b i karotenoida jer se ne postiže zadovoljavajući prijenos mase iz matriksa uzorka u ekstrakcijsko otapalo pa je time i koncentracija pigmenata niža, nego u slučaju ekstrakcije pri višim temperaturama. Wang i Weller (2006) navode da se bolja i brža difuzija analita u ekstrakcijsko otapalo postiže probijanjem stanične stjenke što se može postići i povišenom temperaturom ekstrakcijskog procesa. Cha i sur. (2010) proveli su ekstrakciju klorofila i karotenoida alge *Chlorella vulgaris* metodom ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku uz 90%-tni etanol kao otapalo. Pokazalo se da su karotenoidi osjetljiviji na povišenu temperaturu, dok su klorofili stabilniji, što je potvrđeno i u okviru našeg istraživanja. Pri parametrima ekstrakcije od 160 °C i trajanju od 30 minuta koncentracija Ch-a iznosila je  $9,63 \pm 0,65 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , koncentracija Ch-b  $5,77 \pm 0,68 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , koncentracija  $\beta$ - karotena iznosila je  $0,50 \pm 0,25 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , a luteina  $3,78 \pm 0,19 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$

#### 4.2.3. Utjecaj vremena ekstrakcije

Ekstrakcija se provodila u vremenima od 5 min, 10 min i 15 min. Sva tri analizirana pigmenta pokazala su istu zakonitost. Vrijeme od 5 minuta pokazalo se prekratko za ekstrakciju klorofila i karotenoida, optimalne vrijednosti koncentracija pigmenata u ekstraktu ostvarile su se u trajanju ekstrakcije od 10 minuta, a dok je duže vrijeme ekstrakcije od 15 minuta utjecalo na degradaciju pigmenata i smanjenje koncentracije. U ekstraktima koji su dobiveni kroz vrijeme ekstrakcije od 10 minuta tj. pri optimalnim uvjetima koncentracija Ch-a iznosila  $10,80 \pm 0,04 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$ , Ch-b  $3,99 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  i Cx+c  $1,89 \pm 0,02 \text{ mg g}^{-1} \text{ s.t.}$  Pokazalo se da dulje vrijeme ekstrakcije tj. 15 minuta uzrokuje degradaciju pigmenata.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su sa zaključcima do kojih su došli Taucher i sur. (2017) prema kojima optimalno trajanje ekstrakcijskog procesa ovisi o vremenu potrebnom za postizanje ravnotežne koncentracije analita u matriksu i otapalu. Ekstrahirajući karotenoide PLE metodom iz alge *Chlorella vulgaris* zaključili su da vrijeme od 5 minuta nije dovoljno za

ekstrakciju jer se ekstrahiralo 79 % od ukupnih karotenoida što iznosi 3,74 mg g<sup>-1</sup> s.t. od ukupnih 4,72 mg g<sup>-1</sup> s.t, dok su se gotovo potpuno ekstrahirali nakon 10 minuta ekstrakcije. Cha i sur. (2010) pokazuju da produljeno vrijeme ekstrakcije negativno utječe na prinos ekstrakcije pigmenata alge *Chlorella vulgaris*. Dugo vrijeme ekstrakcije ima nešto negativniji utjecaj na karotenoide, nego na klorofile jer su karotenoidi termolabilnije molekule i pokazuju veći stupanj degradacije pri duljem trajanju ekstrakcije, ako su temperatura i broj ciklusa konstantni.

#### 4.2.4. Utjecaj broja ciklusa ekstrakcije i temperature ekstrakcije

Sinergija parametara broja ciklusa ekstrakcije i temperature ekstrakcije kod klorofila i karotenoida pokazuje različit utjecaj na uspješnost procesa ekstrakcije. Ch-a i Ch-b pokazuju najlošiju uspješnost ekstrakcije pri temperaturi od 100 °C, neovisno radi li se o 1 ili 2 ekstrakcijska ciklusa gdje su vrijednosti koncentracija pri ovim uvjetima podjednake. Dobiveni rezultati upućuju na to da je temperatura od 100 °C preniska za uspješnu ekstrakciju pigmenata i optimalno iskorištenje ekstrakcijskog procesa neovisno o broju ciklusa. Povećanjem temperature na 130 °C povećava se uspješnost ekstrakcije te je vidljiv utjecaj parametra broja ekstrakcijskih ciklusa gdje je bolje iskorištenje kod 2 ciklusa ekstrakcije. Daljnjim povećanjem temperature na 160 °C uspješnost ekstrakcije je najveća, s time da ekstrakcija u 2 ciklusa pokazuje najbolje iskorištenje procesa. Razlog tome jest da je temperatura od 100 °C preniska za uspješnu ekstrakciju pigmenata i optimalno iskorištenje ekstrakcijskog procesa neovisno o broju ciklusa. Temperatura od 160 °C najpogodnija jer je prijenos mase prilikom ekstrakcije iz uzorka u otapalo najuspješnija pri visokim temperaturama što upućuje na to da dolazi do slabljenja molekularnih veza stanične stijenke koja postaje porozna te se masa analita uspješnije transferira u otapalo. Povećanje broja ciklusa ekstrakcije pospješuje veće iskorištenje procesa ekstrakcije.

Sinergija broja ciklusa i temperature ima nešto drugačiji utjecaj na karotenoide, nego što je to slučaj s klorofilima. Pri 1 ekstrakcijskom ciklusu povećanjem temperature bilježi se pad koncentracije karotenoida u ekstraktu, odnosno, udio karotenoida obrnuto je proporcionalan rastu temperature. Razlog tome jest da 1 ekstrakcijski ciklus nije dovoljan za ekstrakciju karotenoida iz uzorka, a povećanjem temperature dolazi do degradacije karotenoida jer su termolabilni spojevi. Pri 2 ekstrakcijska ciklusa povećanje koncentracije karotenoida raste do temperature od 130 °C, a zatim opada daljnjim povećanjem temperature uslijed degradacije. Pri

temperaturi od 100 °C koncentracija karotenoida iznosi  $1,35 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., pri temperaturi od 130 °C koncentracija iznosi  $1,93 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. te je prinos ekstrakcije ovoga pigmenta najveće, a pri temperaturi od 160 °C koncentracija karotenoida iznosi  $1,85 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. ovi rezultati upućuju na to da da pri 2 ekstrakcijska ciklusa temperatura od 100 °C nije dovoljna za uspješnu ekstrakciju jer ne dolazi do zadovoljavajućeg prijenosa mase analita iz uzorka u otapalo zbog toga što ne dolazi do slabljena molekularnih veza stanične stjenke te ona ne postaje porozna i teža je difuzija analita u otapalo. Povećanjem temperature na 130 °C uspješnost ekstrakcije doseže najveću vrijednost jer povećanje temperature pospješuje difuzija analita u otapalo, dok daljnje povećanje temperature utječe negativno na uspješnost ekstrakcije jer su karotenoidi termolabilni pigmenti te dolazi do njihove degradacije pri previsokim temperaturama iako se povećanjem temperature povećava poroznost stanične stjenke. Mustafa i Turner (2011) svojim istraživanjem potvrđuju da je veći broj ciklusa povoljan u cilju postizanja većeg prinosa ekstrakcije te u sinergiji s temperaturom može utjecati povoljno do određene granice kada nastupa degradacija termolabilnih komponenti poput karotenoida.

#### 4.2.5. Utjecaj broja ciklusa i vremena ekstrakcije

Sinergija parametara broja ciklusa ekstrakcije i trajanja ekstrakcije kod klorofila i karotenoida pokazuje različit utjecaj na uspješnost procesa ekstrakcije. Ch-a i Ch-b pri analizi u 1 ekstrakcijskom ciklusu najbolji učinak ekstrakcije je pri trajanju analize od 10 minuta, dok je najmanji učinak ekstrakcije pri trajanju od 15 minuta. U 1 ekstrakcijskom ciklusu u trajanju od 15 minuta vrijednosti koncentracija klorofila u ekstraktu su najmanje. Analizom pri 2 ekstrakcijska ciklusa najbolji učinak ekstrakcije je pri trajanju od 15 minuta, dok je najmanji učinak pri trajanju od 5 minuta. U ovim uvjetima ekstrakcije koncentracija klorofila raste proporcionalno s vremenskim periodom ekstrakcije. Prema navedenim rezultatima, najlošiji učinak ekstrakcije je u jednom dugom ciklusu jer se ne postiže zadovoljavajući prijenos mase analita u otapalo dok je u dva ciklusa vidljiv efekt vremena gdje koncentracija klorofila raste proporcionalno s trajanjem ekstrakcije.

Sinergija broja ciklusa i trajanja ekstrakcije ima nešto drugačiji utjecaj na karotenoide, nego što je to slučaj s klorofilima. Prema Tablici 3. vidljivo je da ovisnost koncentracija analita o trajanju ekstrakcije i broju ciklusa pokazuje istu zakonitost, a to je da se najviše karotenoida ekstrahira u vremenu od 10 minuta, zatim 15 minuta, a najmanje u vremenu od 5 minuta. Koncentracija

karotenoida koji su se ekstrahirali PLE metodom pri 1 ciklusu ekstrakcije i trajanju od 10 minuta pokazuje najveću vrijednost od  $1,97 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$  s.t., dok je koncentracija karotenoida pri 2 ciklusa i istom vremenu ekstrakcije nešto niža i iznosi  $1,82 \pm 0,03 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. Prema rezultatima, vidljivo je da predugo trajanje ekstrakcije negativno utječe na koncentraciju karotenoida u ekstraktu jer dolazi do njihove degradacije uslijed procesa. Taucher i sur. (2016) potvrđuju da se najveća koncentracija karotenoida ekstrahira u trajanju ekstrakcije od 10 minuta te da povećavanje broja ciklusa znatno ne utječe na prinos procesa gdje su kao rezultat analize u trajanju od 10 minuta u jednom ekstrakcijskom ciklusu ekstrahirali 99% karotenoida od ukupnih  $4,72 \text{ mg g}^{-1}$  s.t. Prinos karotenoida povećanjem pri 3 ili 4 ciklusa pada ispod granica detekcije uređaja što upućuje na degradaciju ovih spojeva. Taucher i sur. (2016) u ovom radu također navode da prinos ekstrakcije uvelike ovisi i o samom otapalu i analiziranom matriksu, a ne samo o parametrima ekstrakcije kao što su vrijeme i broj ciklusa. Ove rezultate potvrđuje istraživanje Mustafe i Turner (2011) u kojem se navodi da veći broj ekstrakcijskih ciklusa pozitivno utječe na prinos ekstrakcije jer se prelaze ograničena ekstrakcije u jednom ekstrakcijskom ciklusu. Nadalje, u istom radu navode da je metoda ekstrakcije pri povišenom tlaku uspješna za ekstrakciju karotenoida jer se u više ciklusa kraćeg trajanja postiže bolji prinos procesa zbog kraćeg izlaganja analita nepovoljnim uvjetima ekstrakcije. Usporedbom s drugim metodama poput refluksa i ultrazvučne ekstrakcije, metoda ekstrakcije pri povišenom tlaku pokazala se najpovoljnijom za ekstrakciju termolabilnih molekula (Mustafa i Turner, 2011).

#### 4.2.6. Utjecaj temperature i vremena ekstrakcije

Sinergija parametara temperature i trajanja ekstrakcije kod klorofila i karotenoida pokazuje različit utjecaj na uspješnost procesa ekstrakcije. Ekstrakcijom klorofila pri temperaturi od  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  koncentracija klorofila u ekstraktu raste proporcionalno s vremenom ekstrakcije zbog toga što je temperatura od  $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$  preniska za uspješnu difuziju analita u ekstrakcijsko otapalo te je u ovom slučaju ključan parametar trajanja ekstrakcije jer produljenjem trajanja raste učinak ekstrakcije. Ekstrakcijom klorofila pri temperaturi od  $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  koncentracija klorofila u ekstraktu raste obrnuto proporcionalno s vremenom ekstrakcije zbog toga što temperatura od  $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ima utjecaj na degradaciju klorofila što je dulje vrijeme ekstrakcije. Ekstrakcijom klorofila pri  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$  koncentracija klorofila u ekstraktu raste proporcionalno do vremena ekstrakcije od 10 minuta, a zatim počinje opadati zbog toga što predugo izlaganje analita temperaturi od  $160 \text{ }^{\circ}\text{C}$

značajno oštećuje molekule klorofila te dolazi do njihove degradacije te je optimalno trajanje ekstrakcije pri 160 °C 10 minuta. Pri vremenu ekstrakcije od 15 minuta i temperaturi ekstrakcije od 100 °C, 130 °C i 160 °C koncentracija klorofila je gotovo ista što znači da vrijeme ekstrakcije od 15 minuta ima izuzetno veliki utjecaj na degradaciju klorofila.

Sinergija temperature i trajanja ekstrakcije ima nešto drugačiji utjecaj na karotenoide nego što je to slučaj s klorofilima. Ekstrakcijom karotenoida pri temperaturi od 100 °C i 160 °C koncentracija karotenoida u ekstraktu raste proporcionalno s vremenom ekstrakcije, a zatim počinje opadati zbog toga što predugo izlaganje karotenoida, koji su termolabilni pigmenti, visokim temperaturama uzrokuje visoki stupanj degradacije. Temperatura od 100 °C je preniska kako bi degradacija karotenoida počela odmah po početku ekstrakcijskog procesa te degradacija nastupa tek nakon 10 minuta. Temperatura od 160 °C pozitivno utječe na ekstrakciju karotenoida jer dolazi do brze ekstrakcije analita do vremena od 10 minuta, nakon čega nastupa degradacija. Pri uvjetima od 130 °C, situacija je nešto drugačija gdje koncentracija karotenoida raste obrnuto proporcionalno trajanju ekstrakcije. Zbog toga što temperatura od 130 °C nije dovoljno visoka kako bi se koncentracija karotenoida odvila brzo, a dovoljno je visoka kako bi nastupila degradacija. Istraživanje Cha i sur. (2010) potvrđuje rezultate ovoga rada. Temperatura i trajanje ekstrakcije znatno utječu na prinos metode te je potrebno optimizirati uvjete ekstrakcije. Pokazalo se da su karotenoidi,  $\beta$ -karoten i lutein, vrlo osjetljivi na povišene temperature i dugo trajanje ekstrakcije. Cha i sur. (2010) iznose da je mogući razlog tome jer alga *Chlorella vulgaris* akumulira velike količine klorofila samo u organelama kloroplastima koje imaju debelu staničnu stijenku što može ometati ekstrakciju karotenoida i klorofila. Duga izloženost stanične stijenke visokoj temperaturi PLE metodom ekstrakcije smanjuje tu ekstrakcijsku barijeru. Međutim, visoka temperatura osim što smanjuje viskoznost i topljivost analita u otapalu, potiče izomerizaciju i degradaciju termolabilnih molekula, a karotenoidi su jedni od njih te je dobro koristiti niske temperature ekstrakcije i kraće trajanje metode kako bi se postigao zadovoljavajući prinos procesa.

#### 4.2.7. Regresijski modeli za predviđanje masenih udjela pigmenata

Tablica 4. prikazuje jednadžbe regresijskih modela za koncentraciju pigmenata klorofila a, klorofila b i karotenoida dobivenih ubrzanom ekstrakcijom otapalima pri povišenom tlaku (PLE) iz zelene alge *Chlorella vulgaris*. U ovim modelima, proučavani parametri ekstrakcije (broj ciklusa, temperatura i vrijeme) su kombinirane u linearne, kvadratne i koeficijente interakcija, omogućujući predviđanje odziva promjenjive varijable (koncentracija klorofila a, koncentracija klorofila b i koncentracija karotenoida) za bilo koji željeni broj ciklusa, temperaturu i vrijeme. Prikladnost ovih modela potvrđena je izračunom koeficijenta determinacije  $R^2$ , koji je omjer protumačenih i ukupnih odstupanja i prepisuje se modelu prije nego slučajnoj pogrešci. Dobro prilagođeni model ne smije imati  $R^2$  manji od 0,8. Kao što se može vidjeti iz Tablice 4. i 5., svi modeli imaju  $R^2$  veći od 0,9 što upućuje na njihovu prikladnost u predviđanju koncentracije ukupnih fenola.

Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a, klorofila b i karotenoida prikazani su u Tablici 5. Predviđeni optimalni uvjeti za Ch-a su 2 ciklusa ekstrakcije pri 160 °C u trajanju od 12 minuta, a predviđeni optimalni uvjeti za Ch-b su 1 ciklus ekstrakcije pri 160 °C u trajanju od 9 minuta dok su predviđeni optimalni uvjeti za Cx+c 2 ciklusa ekstrakcije pri 140 °C u trajanju od 5 minuta. Predviđena vrijednost koncentracije Ch-a pri optimalnim uvjetima iznosi 14,66 mg g<sup>-1</sup> s.t., Ch-b 5,86 mg g<sup>-1</sup> s.t. te Cx+c 2,24 mg g<sup>-1</sup> s.t.

Cha i sur. (2010) istraživali su utjecaj PLE metode na ekstrakciju klorofila i karotenoida iz alge *C. vulgaris*. U svom radu navode da su optimalne temperature za ekstrakciju klorofila a 173,4 °C, klorofila b 169,9 °C te β- karotena 116,8 °C, što je u skladu s rezultatima ovoga rada. Plaza i sur. (2012) su uspoređivali utjecaj PLE metodu s metodom ekstrakcije ultrazvukom (UAE) na ekstrakt *C. vulgaris*. U radu navode da je optimalna temperatura ekstrakcije PLE metodom za karotenoide i klorofile 50 °C uz etanol kao otapalo, dok su znatno više koncentracije karotenoida ekstrahirane pri istoj temperaturi uz aceton kao otapalo. Castro-Puyana i sur. (2013) su u svom radu istraživali utjecaj PLE metode uz kombinaciju s raznim pripremnim metodama na ekstrakciju karotenoida iz mikroalge *Neochloris oleoabundans*. Ekstrakcija se provodila pri temperaturi od 100 °C uz 100%-tni etanol kao otapalo u trajanju od 20 min. Najbolji učinak pokazala je kombinacija metode kriogenog bušenja s PLE ekstrakcijskom metodom. Cha i sur. (2012) su istraživali optimalne uvjete PLE metode pri ekstrakciji karotenoida zeaksantina iz alge *C. ellipsoidea*. Istraživanje je pokazalo da su optimalni uvjeti ekstrakcije 115,4 °C u

trajanju od 23,3 min. Herrero i sur. (2005) su u svom radu istraživali optimalne uvjete ekstrakcije antioksidanasa iz alge *Spirulina platensis* PLE metodom. Ekstrakcija se provodila u rasponu temperature od 60 do 170 °C u trajanju od 3 do 15 min, a kao otapalo koristili su heksan, petroeter, etanol i vodu. Heksan, petroeter i etanol pokazuju viši udio antioksidanasa u ekstraktu jer su antioksidansi većinom nepolarni spojevi poput karotenoida, dok se voda kao polarno otapalo pokazuje nešto lošija ekstrakcijska svojstva jer se zagrijavanjem vode na više temperature smanjuje dielektrična konstanta što smanjuje polarnost vode. Optimalni uvjeti ekstrakcije uz etanol kao otapalo su 170 °C u trajanju od 3 minute što je u skladu s rezultatima ovoga rada. Taucher i sur. (2016) u ispitivali Ekstrakciju krotenoida mikroalgi *Haemotococcus pluvialis*, *Chromochloris zofingiensis* i *Chlorella sorokiniana*. Došli su do rezultata da su optimalni uvjeti ekstrakcije karotenoida 60 °C, jedan ekstrakcijski ciklus u trajanju od 10 minuta. Međutim, rezultati istraživanja Taucher i sur. (2016) razlikuju se od rezultata ovoga rada jer se kao ekstrakcijsko otapalo koristio diklormetan koji je pokazao bolju ekstrakcijsku učinkovitost od etanola.

Nakon što su određeni optimalni uvjeti ekstrakcije svakog pojedinog pigmenta i predviđene vrijednosti koncentracija što je prikazano u Tablici 5., ponovljena je analiza pri navedenim optimalnim uvjetima te su dobivene vrijednosti koncentracija Ch-a 14,11 mg g<sup>-1</sup> s.t., Ch-b 5,69 mg g<sup>-1</sup> s.t. i Cx+c 2,15 mg g<sup>-1</sup> s.t. Predviđene i eksperimentalne vrijednosti koje su vrlo slične što potvrđuje točnost modela prikazanih u Tablici 4.



**Tablica 4.** Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) za ekstrakciju klorofila a, klorofila b i karotenoida iz zelene alge *Chlorella vulgaris* dobivenih primjenom PLE

	<b>MODEL</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>R_{adj}</math></b>
<b>KLOROFIL A</b>	$-155,02 - 44,31X_1 + 2,34X_2 - 0,01 X_2^2 - 41,90X_3 - 1,72X_3^2 + 0,75X_1X_2 - 0,00X_1X_2^2 - 2,60X_1X_3 + 0,18X_1X_3^2 - 0,60X_2X_3 + 0,02X_2X_3^2 + 0,00X_2^2X_3$	0,931	0,890
<b>KLOROFIL B</b>	$-52,43 - 21,59X_1 + 0,77X_2 - 0,00 X_2^2 + 17,35X_3 - 0,78X_3^2 + 0,37X_1X_2 - 0,00X_1X_2^2 - 0,78X_1X_3 + 0,05X_1X_3^2 - 0,26X_2X_3 + 0,01X_2X_3^2 + 0,00X_2^2X_3$	0,912	0,860
<b>KAROTENOIDI</b>	$-42,38 - 8,12X_1 + 0,66X_2 - 0,00 X_2^2 + 10,21X_3 - 0,41X_3^2 + 0,13X_1X_2 - 0,00X_1X_2^2 - 0,32X_1X_3 + 0,02X_1X_3^2 - 0,15X_2X_3 + 0,01X_2X_3^2 + 0,00X_2^2X_3$	0,923	0,877

$X_1$  – broj ciklusa;  $X_2$  – temperatura;  $X_3$  – vrijeme

**Tablica 5.** Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a, klorofila b i karotenoida iz zelene alge *Chlorella vulgaris* dobivenih primjenom PLE

te njihove predviđene i eksperimentalne vrijednosti

	<b>BROJ CIKLUSA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VRIJEME (min)</b>	<b>PREDVIĐENE VRIJEDNOSTI (mg g<sup>-1</sup> s.t.)</b>	<b>EKSPERIMENTALNE VRIJEDNOSTI (mg g<sup>-1</sup> s.t.)</b>
<b>KLOROFIL A</b>	2	160	12	14,66	14,11
<b>KLOROFIL B</b>	1	160	9	5,86	5,69
<b>KAROTENOIDI</b>	2	140	5	2,24	2,15

Cha i sur. (2011) su ekstrahirali pigmente zelene alge *Chlorella vulgaris* metodom ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku te su dobili komplementarne rezultate rezultatima ovoga rada, no ekstrakciju su provodili u jednom ekstrakcijskom ciklusu. Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a su temperatura od 173,4 °C i vrijeme od 14,7 minuta, gdje je predviđena vrijednost koncentracije klorofila a 10,79 mg g<sup>-1</sup> s.t., a eksperimentalna vrijednost iznosi 10,83 mg g<sup>-1</sup> s.t. Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila b su temperatura od 169,9 °C i vrijeme od 3,40 minuta, gdje je predviđena vrijednost koncentracije klorofila b 6,84 mg g<sup>-1</sup> s.t., a eksperimentalna vrijednost iznosi 6,81 mg g<sup>-1</sup> s.t. Optimalni uvjeti ekstrakcije luteina su temperatura od 148,2 °C i vrijeme od 36,6 minuta, gdje je predviđena vrijednost koncentracije luteina 3,65 mg g<sup>-1</sup> s.t., a eksperimentalna vrijednost iznosi 3,70 mg g<sup>-1</sup> s.t. Optimalni uvjeti ekstrakcije β-karotena su temperatura od 116,8 °C i vrijeme od 25,10 minuta, gdje je predviđena vrijednost koncentracije β-karotena 0,75 mg g<sup>-1</sup> s.t., a eksperimentalna vrijednost iznosi 0,67 mg g<sup>-1</sup> s.t.

Usporedbom rezultata Cha i sur. (2011) i rezultata ovoga rada vidljivo je da su optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila i karotenoida zelene alge *Chlorella vulgaris* određeni ovim radom znatno povoljniji jer se pri nižoj temperaturi i pri kraćem vremenu ekstrakcije ekstrahiraju veće količine pigmenata te dolazi do znatno manje degradacije ovih pigmenata uslijed nepovoljnih ekstrakcijskih uvjeta.

## **5. ZAKLJUČAK**

Na temelju provedenog istraživanja, dobivenih rezultata i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE) uz 96%-tni etanol kao otapalo pokazala se kao učinkovita metoda za uspješnu ekstrakciju pigmenata iz praha zelene alge *Chlorella vulgaris*. Učinkovitost ekstrakcijskog procesa i prinosi istraživanih pigmenata značajno ovise o vremenu, temperaturi i broju ciklusa gdje su svi parametri statistički značajni.
2. Optimalni uvjeti ekstrakcije za klorofil a su temperatura od 160 °C, vrijeme od 12 minuta i 2 ciklusa ekstrakcije. Predviđena vrijednost koncentracije klorofila a u ekstraktu iznosi 14,66 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari pri optimalnim uvjetima, dok je određena eksperimentalna vrijednost koncentracije klorofila a u ekstraktu pri optimalnim uvjetima 14,11 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari.
3. Optimalni uvjeti ekstrakcije za klorofil b su temperatura od 160 °C, vrijeme od 9 minuta i 1 ciklus ekstrakcije. Predviđena vrijednost koncentracije klorofila b u ekstraktu iznosi 5,86 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari pri optimalnim uvjetima, dok je određena eksperimentalna vrijednost koncentracije klorofila b u ekstraktu pri optimalnim uvjetima 5,69 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari.
4. Optimalni uvjeti ekstrakcije za karotenoide su temperatura od 140 °C, vrijeme od 5 minuta i 2 ciklusa ekstrakcije. Predviđena vrijednost koncentracije karotenoida u ekstraktu iznosi 2,24 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari pri optimalnim uvjetima, dok je određena eksperimentalna vrijednost koncentracije karotenoida u ekstraktu pri optimalnim uvjetima 2,15 mg g<sup>-1</sup> suhe tvari.

## **6. LITERATURA**

- Anonymous 1 (2016) Fondriest. <<https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/water-quality/algae-phytoplankton-chlorophyll>>. Pristupljeno 16. lipnja 2018
- Anonymous 2 (2016) Netdoctor, <<http://www.netdoctor.co.uk/healthy-eating/advice/a26709/should-we-be-eating-more-seaweed/>>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
- Anonymous 3 (2016) Pant Science 4 U, <<http://http://www.plantscience4u.com>>. Pristupljeno 24. veljače 2018.
- Anonymous 4 (2011) Holisk health, <<http://holistikhealth.com/the-benefits-of-chlorella-chlorella-vulgaris-superfoods-101/>>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
- Anonymous 5 (2017) Sun Chlorella, <<https://www.sunchlorellausa.com/blog/healthy-tips-4/post/how-well-can-you-digest-your-chlorella-supplement-15>>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
- Anonymous 6 (2018) ResearchGate, <[https://www.researchgate.net/figure/Pathway-showing-all-possible-routes-to-xanthophyll-synthesis-in-Arabidopsis-Enzymatic\\_fig1\\_7284010](https://www.researchgate.net/figure/Pathway-showing-all-possible-routes-to-xanthophyll-synthesis-in-Arabidopsis-Enzymatic_fig1_7284010)>. Pristupljeno 20. svibnja 2018.
- Ambati, R.R., Gogisetty, D., Aswathanarayana, R.G., Ravi, S., Bikkina, P.N., Bo, L., Yuepeng, S. (2018) Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* In press.doi: 10.1080/10408398.2018.1432561
- Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnol Adv.* **25**, 207-210.
- Becker, E. W. (1994). Microalgae: biotechnology and microbiology (Vol. 10): Cambridge University Press.
- Bursać Kovačević, D., Barba, F.J., Granato, D., Galanakis, C.M., Herceg, Z., DragovićUzelac, V., Putnik, P. (2018) Pressurized hot water extraction (PHWE) for the green recovery of bioactive compounds and steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chem.* **254**, 150-157.
- Castro, P., Huber, M. E. (2005) Marine Biology, 5. izd., . McGraw-Hill, Higher Education Inc., New York.

Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U., Pan, C.H. (2010) Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*. *J.Agric.Food.Chem.* **58**, 793-797.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* **25**, 294-306.

Choix, F. J., de-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2012). Enhanced accumulation of starch and total carbohydrates in alginate-immobilized *Chlorella* spp. induced by *Azospirillum brasilense*: II. Heterotrophic conditions. *Enzyme Microb Technol.* **51**, 300-309.

Colombo-Pallotta, M.F., García-Mendoza, E., Ladah, L.B. (2006) Photosynthetic performance, light absorption and pigment composition of *Macrocystis pyrifera* (*Laminariales, Phaeophyceae*) blades from different depths. *J. Phycol.* **42**, 1225-1234.

Delgado-Zamarreño, M.D., Pérez-Martín, L., Bustamante-Rangel M., Carabias-Martínez R. (2012) Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses. *Anal Bioanal Chem.* **404**, 361-366.

Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C.S., Li, Q.X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal Chim Acta.* **501**, 171-181.

Chuang, Y.H., Zhanga, Y., Zhanga, W., Boyda S.A., Lia, H. (2015) Comparison of accelerated solvent extraction and quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method for extraction and determination of pharmaceuticals in vegetables. *J Chromatogr A.* **1404**, 1-9.

Fontana A.R., Antonioli A., Bottini R. (2015) Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *J Agric. Food Chem.* **61**, 8987-9003.

Gonzalez, L. E., Bashan, Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl Environ Microbiol.* **66**, 1527-1531.

Herrero, M., Martín-Álvarez, P.J., Javier Señoráns, F., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2005) Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.* **93**, 417-423.



- Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *J. Appl Phycol.* **23**, 543-597.
- Jentzer, J.B., Alignan M., Garcia C.V., Vilarem G. (2015) Response surface methodology to optimise Accelerated Solvent Extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana Bertoni* leaves. *Food Chem.* **166**, 561-567.
- Kiokias, S., Proestos, C., Varzakas, T. (2015) A review of the structure, biosynthesis, absorption of carotenoids-analysis and properties of their common natural extracts. *Curr Res Nutr Food Sci.* **4**, 25-37.
- Kadam, U.S., Tiwari, K.B., O'Donnell, C.P. (2013) Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 4667-4675.
- Kılınç, B., Cirik, S., Turan G., Tekogul, H. and Koru, E. (2013) Seaweeds for Food and Industrial Applications. IntechOpen: 735-745.
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y., Kumamoto, S., Hasegawa, T. (2009) Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J. Chem. Technol Biot.* **84**, 657-661.
- Lee, D. J., Liao, G. Y., Chang, Y. R., Chang, J. S. (2012). Coagulation-membrane filtration of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol.* **108**, 184-189. doi:10.1016/j.biortech.2011.12.098
- Liang S., Liu X., Chen F., Chen Z. (2004) Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia.* **512**, 45-48.
- Lobban, C.S., Harrison, P.J., Hurd, C.L., Bischof, K. (2014) Seaweed ecology and physiology, 2. izd., Cambridge University Press, Cambridge, 384.
- Moroney J.V, Ynalvez R.A, (2009) Algal photosynthesis, Wiley and Sons, DOI: 10.1002/9780470015902.a0000322. pub2
- Mottaleb, M.A., Sarker, S.D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation. *Methods Mol Biol.* **864**, 75-87.

- Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal Chim Acta.* **703**, 8-18.
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Reina, G.G.B., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2012) Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. *J. Food Sci. Technol.* **46**, 245-253.
- Peng, J., Yuan, J.P., Wu, C.F., Wang, J.H. (2011) Fucoxanthin, a Marine Carotenoid Present in Brown Seaweeds and Diatoms: Metabolism and Bioactivities Relevant to Human Health. *Mar. Drugs.* **9**, 1806-1828.
- Pouralinazar, F., Yunus, M.A.C., Zahedi, G. (2012) Pressurized liquid extraction of *Orthosiphon stamineus* oil: Experimental and modelinf studies. *J Supercrit Fluids.* **62**, 88-95.
- Putnik, P., Barba, F.J., Španić, I., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V., Bursać Kovačević, D. (2017) Green Extraction Approach for the Recovery of Polyphenols from Croatiaoan Olive leaves (*Olea europea*). *Food Bioprod Process.* **106**, 19-28.
- Shu-Ying, X. Xuesong, H., Kit-Leong, C. (2017) Recent advances in marine algae polysaccharides: isolation, structure and activities. *Mar. Drugs.* **15**,388-404.
- Safi, C., Charton, M., Pignolet, O., Silvestre, F., Vaca-Garcia, C., Pontalier, P.-Y. (2013) Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. *J. Appl. Phycol.* **25**, 523-529.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., Vaca-Garcia, C. (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: *Renew. Sust. Energ. Rev.* **35**, 265-278.
- Saito, K., Suzuki, T., Ishikita, H. (2018) Absorption-energy calculations of chlorophyll a and b with an explicit solvent model. *J. Photochem. Photobiol.* **358**, 422-431.
- Schroeder, G., Łeska, B., Messyasz, B., Pikosz, M. (2015) Analysis of Green Algae Extracts. U: Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, (Kim, S.W. i Chojnacka, K., ured), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 81-93.
- Sekar, S., Chandramohan, M. (2008) Phycobiliproteins as a commodity: trend sin applied research, patents and commercialization. *J. Appl Phycol.* **20**, 113-136.

Sekar, S., Mottaleb, M.A. (2012) *Methodes in Molecular Biology*, 1. izd., Springer Science+Business Media, Berlin, str. 75-87.

Sumanta, N., Haque, C.I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrofotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.

Takaichi, S. (2011) Carotenoides in *Algae*: Distribution, Biosyntheses and Functions. *Mar Drugs.* **9**, 1101-1118.

Taucher, J., Baer, S., Schwerna, P., Hormann, D., Hümmer, M., Buchholz, R., Becher, A. (2016) Cell Disruption and Pressurized Liquid Extraction of Carotenoids from Microalgae. *J. Thermodyn Catal.* **7**, 1-7.

Wang, L., Weller C.L. (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, *Trends. Food. Sci. Tech.* **17**, 300-312.

Zaghdoudi, K., Pontvianne, S., Framboisier, X., Achard, M., Kudaibergenova, R., Ayadi-Trabelsi, M., Kalthoum-Cherif, J., Vanderesse, R., Frochot, C., Guiavarc'h Y. (2015) Accelerated solvent extraction of carotenoids from: Tunisian Kaki (*Diospyros kaki L.*), Peach (*Prunus persicaL.*) and Apricot (*Prunus armeniacaL.*). *Food Chem.* **184**, 131-139.

Zhao, K.H., Su, P., Tu, J.M., Wang, X., Liu, H., Plöschner, M., Eichacker, L., Yang, B., Zhou, M., Scheer, H. (2007) Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *PNAS.* **104**, 14300-14305.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Niki Simonović

Ime i prezime studenta