

Utjecaj odabira otapala i metoda ekstrakcije na lipidnu frakciju izoliranu iz algi Jadranskog mora

Cvitković, Daniela

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:159:116392>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Daniela Cvitković, 1082/PI

**UTJECAJ ODABIRA OTAPALA I
METODA EKSTRAKCIJE NA
LIPIDNU FRAKCIJU IZOLIRANU
IZ ALGI JADRANSKOG MORA**

Ovo istraživanje je provedeno u okviru projekta “Bioprospecting Jadranskog mora” (KK.01.1.1.01.0002) financiranog od strane Europskog fonda za regionalni razvoj.

Rad je izrađen u Kabinetu za tehnološko projektiranje Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Balbino Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Veliko hvala izv. prof. dr. sc. Sandri Balbino što je pristala biti moja mentorica, na njenim stručnim i prijateljskim savjetima, izrazitoj susretljivosti kao i odvojenom vremenu. Također, zahvaljujem se svim ljudima na fakultetu koji su mi pomagali u izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Hvala prijateljima i kolegama dobre volje koji su obilježili moje studentske dane.

Ovu zahvalu ne bih pisala bez ljudi koji su od početka vjerovali u mene, bezuvjetno mi pružali svaki oblik podrške i omogućili da zajedno zaokružimo ovu priču. Najviše se zahvaljujem svojoj obitelji, dečku kao i četveronožnom prijatelju koji mi je ispunjavao slobodne trenutke. Stoga ovaj rad posvećujem svojoj obitelji, prvenstveno roditeljima i bratu!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Kabinet za tehnološko projektiranje

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ODABIRA OTAPALA I METODA EKSTRAKCIJE NA LIPIDNU FRAKCIJU IZOLIRANU IZ ALGI JADRANSKOG MORA

Daniela Cvitković, 1082 PI

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih otapala (heksan (H) i etil acetat:etanol=1:1 (E-E)) te metoda ekstrakcije (klasična ekstrakcija na sobnoj temperaturi (K) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ASE) na udio lipida i pigmenata kod različitih vrsta morskih algi (*Cystoseira barbata*, *Codium bursa*, *Cystoseira compressa* te *Fucus virsoides*). U svim dobivenim lipidnim ekstraktima je određen sastav masnih kiselina, a sastav sterola je određen u heksanskim ekstraktima s najvećim udjelom ulja. Nadalje, spektrofotometrijski je određen sastav pigmenata; klorofili (*a* i *c*), karotenodi te protoklorofili. Najbolji omjer ω -6/ ω -3 masnih kiselina, bogat izvor sterola i pigmenata te gotovo najviše ulja je ekstrahirano iz makroalge *Cystoseira barbata*. Dobiveni podaci su statistički analizirani te je u većini slučajeva vrsta alge imala značajan utjecaj, a tretmani i otapala su pokazala značajan utjecaj samo u pojedinim slučajevima. Najveći udio ulja je ekstrahiran konvencionalnom metodom korištenjem oba otapala, a pigmenata primjenom ASE pri 100 °C s otapalom E-E.

Ključne riječi: makroalge, masne kiseline, pigmenti, steroli, ASE

Rad sadrži: 49 stranica, 19 slika, 8 tablica, 86 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Verica Dragović-Uzelac*
2. Izv. prof. dr. sc. *Sandra Balbino*
3. Doc. dr. sc. *Zoran Zorić*
4. Doc. dr. sc. *Marko Obranović* (zamjena)

Datum obrane: 19. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Section for Food Plant Design

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific filed: Food Technology

THE EFFECT OF SOLVENT AND EXTRACTION METHOD SELECTION ON THE LIPID FRACTION ISOLATED FROM ADRIATIC SEA ALGAE

Daniela Cvitković, 1082 PI

Abstract: The aim of this research was to investigate the impact of solvents (hexane (H) and ethyl acetate:ethanol=1:1 (E-E)) and extraction methods (classis extraction and accelerated solvent extraction, ASE) on the lipid and pigment content of different types of seaweed (*Cystoseira barbata*, *Codium bursa*, *Cystoseira compressa* and *Fucus virsoides*). The fatty acid composition was determined in all the lipid extracts and the sterol composition was determined in the hexane extracts with the highest oil content. Furthermore, the composition of the pigments was determined spectrophotometrically; chlorophylls (*a* and *c*), carotenoids and protochlorophylls. The best ratio of ω -6/ ω -3 fatty acids, a rich source of sterols and pigments and almost the higher content of oil was extracted from macroalgae *Cystoseira barbata*. The data obtained were statistically analyzed and in most cases the type of algae had more significant impact than treatments and solvents that showed a significant impact only in some cases. The highest oil content was extracted by conventional method using both solvents as well as pigments collected with E-E_ASE 100.

Keywords: macroalgae, fatty acids, pigments, sterols, ASE

Thesis contains: 49 pages, 19 figures, 8 tables, 86 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. *Sandra Balbino*, Associate professor

Reviewers:

1. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full professor
2. PhD. *Sandra Balbino*, Associate professor
3. PhD. *Zoran Zorić*, Assistant professor
4. PhD. *Marko Obranović*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 19th September 2019

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Alge	2
2.2. Podjela algi i pigmenti	4
2.2.1. Smeđe alge	6
2.2.2. Zelene alge	8
2.2.3. Crvene alge	9
2.3. Lipidi	10
2.3.1. Masne kiseline.....	11
2.3.2. Steroli	11
2.4. Izolacija i ekstrakcija lipidnih komponenti	13
2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Alge.....	15
3.1.2. Standardi i reagensi	15
3.2. Metode	16
3.2.1. Konvencionalna ekstrakcija	16
3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)	17
3.2.3. Izolacija pigmenata	17
3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom	18
3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila, karotenoida i protoklorofila.....	19
3.2.6. Određivanje udjela i sastava sterola	21
3.2.7. Statistička analiza.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. Utjecaj različitih otapala i tehnika ekstrakcije na ekstrakciju ulja makroalgi	27
4.2. Utjecaj različitih otapala i tehnika ekstrakcije na udio i sastav pigmenata makroalgi	29
4.3. Sastav masnih kiselina	32
4.4. Sastav sterola	39
5. ZAKLJUČCI	41
6. LITERATURA.....	42

1. UVOD

Unatoč velikoj raznolikosti flore jadranske obale te bogatog sadržaja morskih organizama i algi, njihova farmakološka i biološka svojstva još nisu dovoljno istražena (Kosanić i sur., 2015). Morski organizmi su potencijalni izvori bioaktivnih spojeva kao sekundarnih metabolita koji bi se mogli koristiti u razvoju novih ljekovitih tvari. Dobar primjer takvih organizama su alge, jednostavni organizmi koji sadrže klorofil (Bold i Wynne, 1985). Sastoje se od jedne samostalne stanice ili stanica grupiranih u kolonije, a mogu biti i organizmi s mnogo stanica koje često surađuju zajedno poput tkiva. Glavna podjela algi je na makroalge odnosno morske alge koje uključuju zelene (*Chlorophyta*), smeđe (*Phaeophyta*) i crvene alge (*Rhodophyta*) te mikroalge. Morske alge su korištene kao hrana osobito u Kini i Japanu te u lijekovima za liječenje mnogih bolesti kao što je nedostatak joda (gušavost, Basedowljeva bolest i hipertireoidizam). Alge su posebno zanimljive zbog visoke produktivnosti, raznolikosti, kao i zbog široke palete bioaktivnih spojeva koje sadrže. Neke morske alge koriste se kao izvor dodatnih vitamina, za liječenje različitih crijevnih poremećaja te kao hipokolesterolemična i hipoglikemijska sredstva (Trease i Evanes, 1996; Kim, 2012).

Porastom svijesti potrošača i industrije o povezanosti zdravlja i izbora namirnica koje unosimo u organizam, proporcionalno raste broj znanstveno-istraživačkih radova s ciljem razvitka funkcionalnih namirnica koje će imati povoljan utjecaj na ljudsko zdravlje. Upravo su alge primjer takve namirnice te su, sa svojim izolatima, dobar izvor esencijalnih masnih kiselina i sterola. Stoga je posljednjih nekoliko godina stavljen naglasak na razumijevanje mehanizama akumulacije ulja i masnih kiselina u algama, njihovog sastava, ali i na razvitak metoda za njihovu uspješnu analizu. Detaljne studije makroalgi i mikroalgi kao novih izvora polinezasićenih masnih kiselina su pokazale da je većina vrsta bogata polinezasićenim masnim kiselinama s povoljnim omjerom n-6/n-3 masnih kiselina.

S obzirom da tradicionalne tehnike ekstrakcije željenih komponenti zahtijevaju velike količine otapala te su dugotrajne, razvijaju se nove, alternativne metode ekstrakcije a jedna od njih je ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE), korištena u ovom radu. Cilj ovog rada je usporediti uspješnost klasične ekstrakcije pri sobnoj temperaturi i alternativne metode ekstrakcije ulja iz morskih algi korištenjem ekstrakcijskog otapala heksana i etil-acetat:etanola (1:1), a u dobivenim ekstraktima odrediti sastav masnih kiselina, sterola te pigmenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Alge su stelnjače (talofiti) odnosno biljke kojima nedostaje korijen, stabljika i list te kao primarni fotosintetski pigment sadrže klorofil *a*. Najčešće se javljaju u vodi, bilo da se radi o slatkoj vodi, morskoj ili bočatoj. Međutim, također se mogu naći u gotovo svakom drugom okruženju na zemlji, od algi koje rastu u snijegu neke američke planine preko algi koje rastu u lišajnoj zajednici na golim stijenkama do jednostaničnih pustinskih algi, tj. gdje god postoji izvor svjetla kako bi mogle vršiti fotosintezu. Djeluju kao primarni proizvođači u prehrambenom lancu, proizvodeći organski materijal od sunčeve svjetlosti, ugljikovog dioksida i vode. Isto tako, proizvode i kisik koji je neophodan mnogim organizmima za metabolizam (Lee, 2008).

Makroalge poznate i kao morske alge glavni su biotički resursi koji spadaju u resurse obalnog područja, vrlo vrijedni za ljudsku prehranu a konzumiraju se u obliku salata, juha, kolačića i začina (Vizetto-Duarte, 2016). Trenutno se makroalge (zelene, smeđe i crvene morske alge) sve više koriste kao alternativni resursi za proizvodnju biogoriva, biokemijskih i prehrambenih proizvoda (Sudhakar i sur., 2018). Morske alge se također koriste kao dodatci prehrani životinja, kao gnojiva i sredstva za poboljšavanje tla. Također, jedan su od najvećih proizvođača biomase u morskom okolišu. Neke vrste morskih makro i mikro algi proizvode širok raspon kemijski aktivnih metabolita u svojoj okolini, poznatih kao biogeni spojevi koji imaju antibakterijska, antialgalna, antifungalna svojstva te imaju druge moguće primjene, npr. u terapiji. Takve izolirane tvari pripadaju skupinama masnih kiselina, lipopeptida, amida, alkaloida, terpenoida, laktona, pirola i steroida (Bhadury i Wright, 2004). Isto tako, gotovo da je nemoguće zamisliti današnju prehrambenu industriju bez uporabe prehrambenih boja i to s naglaskom na boje iz prirodnih izvora budući da je takva preferencija potrošača. Upravo iz tog razloga posvećuje se pažnja uvođenju makroalgi i mikroalgi u prehrambenu industriju kako bi se iskoristili njihovi vrijedni prirodni sastojci u formuliranju inovativnih proizvoda (Pina-Pérez i sur., 2017).

Morske alge su rasprostranjene u svim oceanima svijeta te su se stoljećima koristile kao hrana, a njihova industrijska primjena je relativno novija inovacija koja se uglavnom ograničava na razvijenija područja svijeta. Uzgoj makroalgi u Europi nije dobro razvijen osim akvakulture u Francuskoj (Bretanja), Španjolskoj (Galicija) te eksperimentalno u Irskoj, Asturiji (Španjolska), Norveškoj, Portugalu i u Ujedinjenom Kraljevstvu (Pereira, 2016). Postoji malo vrsta od industrijske važnosti koje se javljaju u crvenim (*Rhodophyta*) i smeđim (*Phaeophyta*) algama. Dva su osnovna pristupa uzgoju makroalgi, a to su uzgoj u spremnicima ili ribnjacima te, češći, u priobalnom ili otvorenom moru. Uzgoj algi u priobalnom moru je ograničenih mogućnosti što se tiče same optimizacije rasta algi kao i kvalitete vode te sukobljenih mišljenja vezanih za uporabu obale. U novije vrijeme sve je veća integracija uzgoja makroalgi u postojeće sustave akvakulture (npr. riba ili dagnji), ali samo je nekoliko farmi koje su u potpunosti komercijalne ponajviše zbog njihove složenosti, stoga je većina farmi u pilot fazi (Stengel i Connan, 2015).

Kako bi se bolje iskoristio potencijal makroalgi, potrebna su dodatna istraživanja u pogledu novih, ekološki prihvatljivih tehnologija kojima bi se smanjila upotreba toksičnih organskih otapala i koje bi efikasno ekstrahirale željene komponente. Međutim, istraživanja i izolacija mnogih biogenih spojeva su još uvijek u ranim fazama a sama izolacija ovih potencijalno važnih biogenih spojeva iz morskih algi trenutno je vrlo skupa (Bhadury i Wright, 2004).

2.2. PODJELA ALGI I PIGMENTI

Morske alge ili makroalge se tradicionalno klasificiraju prema kemijskim i morfološkim karakteristikama s posebnim naglaskom na sastav pigmenata, a tri glavne skupine su: smeđe alge ili *Phaeophyta*, crvene alge ili *Rhodophyta* i zelene alge ili *Chlorophyta* (Dominguez, 2013).

Pigmenti se komercijalno koriste kao bojila za hranu te u dodacima prehrani. U prehrambenoj industriji velika je potražnja za β -karotenom zbog njegove narančasto-žućkaste boje te uporabe u funkcionalnoj hrani kao provitamina A. Globalno tržište proizvodnje prirodnih boja je u sve većem porastu pa je tako primjerice od 2005.-2009. godine proizvodnja porasla za 35% a daljni rast se očekuje. Zelene morske alge sadržavaju β -karoten, lutein, violaksantin, neoksantin i zeaksantin, crvene morske alge sadržavaju α -karoten, β -karoten, lutein i zeaksantin dok smeđe morske alge karakterizira prisustvo β -karotena, violaksantina te fukoksantina. Tri su glavne vrste pigmenata direktno uključene u fotosintezu algi: klorofili, fikobiliproteini i karotenoidi. Klorofili su zeleni pigmenti topljivi u lipidima koji se nalaze u svim algama, višim biljkama i cijanobakterijama koje provode fotosintezu. Klorofil *a* je esencijalan za reakcijski centar i nalazi se u tilakoidima, membranskim strukturama koje prikupljaju svjetlost te su zaslužne za odvijanje fotosinteze (Dominguez, 2013). Ostali pigmenti skupa sa glavninom klorofila *a* poput lijevka prikupljaju energiju svjetla i predaju ju reakcijskom centru. Klorofil *b* je nađen kod *Ulvophyceae* (razred zelenih algi) kao i kod drugih zelenih algi te u viših biljaka a klorofili *c1* i *c2* su karakteristični za smeđe alge. Klorofil *c* apsorbira plavi dio spektra puno jače, a crveni dio spektra slabije u odnosu na klorofile *a* i *b*.

Protoklorofilid i protoklorofil su porfirini koji se mogu naći u biljkama u unutarnjoj membrani etioplasta a razlikuju se po tome što je protoklorofil hidrofobniji od protoklorofilida zbog dugog fitolnog lanca. Protoklorofilidi su prekursori klorofila koji prelaze u klorofil prilikom izlaganja svjetlosti odnosno njihova transformacija je inhibirana u tami kod kritosjemenjača. Najvažnije svojstvo takvih sadnica koje rastu u tami jest nedostatak fotosintetskih struktura koje su odgovorne za autotrofiju biljke, akumulira se protoklorofilid odnosno ne dolazi do nastajanja klorofila kao i razvoja određenih plastida. Fiziološka uloga protoklorofilida kao intermedijera u biosintezi klorofila već je duže vrijeme poznata te se intenzivno ispituje za razliku od protoklorofila koji je sporedni produkt u biosintezi klorofila o kojem se znatno manje zna. Protoklorofil je pronađen u velikim količinama u sjemenkama porodice *Cucurbitaceae* (hrv. Tikvovke) posebice u bundevi (Mysliwa-Kurdziel i sur., 2013).

Nadalje, istraživanje Ellis i Timson (1980) je pokazalo da iako je ponekad proizvodnja pigmenata u nekih algi usporena, alge su sposobne dovršiti sintezu klorofila što je potvrdilo prethodnu pretpostavku da se protoklorofilidi/protoklorofili ne akumuliraju u znatnim količinama čak i onda kada su alge uzgojene u uvjetima smanjene sinteze klorofila. Valja naglasiti da se u literaturi često ne radi razlika između protoklorofilida i protoklorofila. Stoga će se u radu, osim klorofila, spektrofotometrijski odrediti i udio protoklorofila kako bi se uvidjele potencijalne razlike u njihovim udjelima imajući na umu rast makroalgi na različitim dubinama mora odnosno različitoj izloženosti svjetlosti.

Morske alge sadržavaju i široku paletu karotenoida koji također sudjeluju u apsorpciji svjetlosti (Lobban i Harrison, 1997). Karotenoidi su pomoćni pigmenti fotosintetskog sustava a α -karoten, β -karoten i lutein služe i kao inhibitori slobodnih radikala nastalih kao posljedica predugog izlaganja svjetlosti odnosno sprečavaju oksidativna oštećenja stanica. Nadalje, mogu smanjiti rizik od nastanka raka i usporiti njegov razvoj, usporiti razvoj kardiovaskularnih bolesti vezanih za aterosklerozu kao i starenje kože (Galasso i sur., 2017). Spadaju u najrasprostranjenije pigmente u prirodi crvene, žute i narančaste boje te su prisutni u svim algama, višim biljkama kao i mnogim fotosintetskim bakterijama. Karotenoidni pigmenti su različite kemijske stabilnosti, topljivosti i polarnosti stoga je potrebno izabrati odgovarajući sustav otapala kako bi se što selektivnije ekstrahirali sa što većom čistoćom (Poojary i sur., 2016). S obzirom da je u novije vrijeme stavljen naglasak na zelena otapala poput etanola, limonena, smjese vode i organskog otapala, istraživanje Castro-Puyana i sur. (2013) pokazalo je da upotreba navedenih otapala ima veliki potencijal ekstrakcije karotenoida iz mikroalge *N. Oleoabundans* pomoću ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (ASE).

Fikobiliproteini se koriste kao prirodna bojila u žvakaćim gumama, mliječnim proizvodima te u kozmetičkim proizvodima kao što su ruževi za usne. Za razliku od klorofila i karotenoida, fikobiliproteini su topljivi u vodi te na površini tilakoida stvaraju granule tkz. fikobilisome. Fikobiliproteini se sastoje od fikobilina a različite kombinacije dvaju glavnih fikobilina, fikoeritrina (crveni) i fikocijana (plavi) daju različiti apsorpcijski spektar budući da apsorbiraju različite valne duljine svjetlosti. Fikobiliproteini a osobito fikoeritrin mogu sadržavati najveći udio proteina crvenih algi. Istraživanja su pokazala da fikobiliproteini imaju antioksidacijska svojstva koja bi se mogla iskoristiti za prevenciju i liječenje bolesti povezanih sa oksidativnim stresom te čine od 1% do 10% suhe tvari algi (Lordan i sur., 2011; Barbosa i sur., 2014).

2.2.1. Smeđe alge

Phaeophyceae ili smeđe alge posjeduju karakterističnu smeđu boju zahvaljujući dominantnim ksantofilnim pigmentima i fukoksantinu koji maskiraju druge pigmente kao što su klorofil *a* i *c*, β karoten te druge ksantofile (Bold i Wynne, 1985). Količina anorganskog ugljika dostupnog iz okoliša značajno utječe na fotosintetske procese u smeđim algama (Nygård i Dring, 2008; Dos Santos i sur., 2019) Nalaze se gotovo isključivo u morskom staništu, a postoje samo četiri vrste koje su slatkovodne, to su: *Heribaudiella*, *Pleurocladia*, *Bodanella* i *Sphacelaria*. Najveći broj smeđih algi živi u litoralnoj zoni gdje dobivaju veliku količinu svjetlosti (Lee, 2008).

U hladnijem, sjevernom dijelu Jadrana u mediolitoralu na stijenama živi endemska smeđa alga jadranski bračić, *Fucus virsoides* (Slika 1). Jadranski bračić pripada višim, morfološki i anatomske vrlo diferenciranim algama, a talus mu se može podijeliti u tri morfološki različita dijela. Ono što karakterizira jadranski bračić je lučenje sluzi koja štiti epidermu te unutrašnje tkivo od prevelikog isparavanja i isušivanja za vrijeme oseke, samim time čineći površinu talusa glatkom čime se smanjuje trenje talusa sa morskom vodom (Linardić, 1949).



Slika 1. *Fucus virsoides* (Anonymous 1, 2016)

Rod *Cystoseira* je karakterističan za mediteransku floru te je vrlo dominantan na stjenovitom dnu. Prema mnogim studijama, *Cystoseira* vrste su izuzetno osjetljive na antropogeni utjecaj te je u urbanim područjima uočeno smanjenje njihove populacije (Mačić i Antolić, 2015). Za mediteranski bentoski ekosustav osobito su važne dugovječne smeđe makroalge roda *Cystoseira* jer njihove bentoske zajednice sa svojom trodimenzionalnom strukturom pružaju stanište i sklonište manjim algama, beskralješnjacima i ribama (Orlando-

Bonaca i Rotter, 2018). Rod *Cystoseira* slovi za jednog od najperspektivnijih rodova algi zbog izuzetnog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (eng. Polyunsaturated fatty acids, PUFA) u usporedbi s ostalim rodovima (Oucif, 2018).

Cystoseira barbata (Slika 2) kao i *Cystoseira crinita* su pronađene na morskim dubinama od 12 m pa i dublje. *Cystoseira barbata* je karakteristična po svom velikom grmovitom talusu koji je bogato razgranat te je svijetlo maslinaste do tamno smeđe boje. Koristi se kao dodatak prehrani u liječenju onkoloških bolesnika u Ukrajini i Bugarskoj, u kozmetičkoj industriji te kao stočna hrana za domaće životinje kao i kod uzgoja riba, kozica i rakova (Milchakova, 2011).

Cystoseira compressa (Slika 3) je uobičajena smeđa morska alga koja nastanjuje stjenovite mediteranske obale na dubini od 0 do 1 m. Talus je vrlo promjenjiv veličinom i izgledom budući da ovisi o parametrima okoliša a posebno ovisi o izloženosti valovima (Falace i sur., 2005). Unutar roda *Cystoseira*, spada u najrasprostranjenije vrste koje se mogu naći u sjevernoistočnom dijelu Atlantskog oceana (od juga Španjolske do Kanarskih otoka), u Sredozemnom i Crnom moru (Oucif, 2018).



Slika 2. *Cystoseira barbata*
(Anonymous 2, 2019)



Slika 3. *Cystoseira compressa*
(Anonymous 3, 2016)

2.2.2. Zelene alge

Karakteristična boja zelenih algi uglavnom je posljedica prisutnosti klorofila *a* i *b* u istom odnosu kao kod viših biljaka (Bold i Wynne, 1985). Zelena boja varira od travnato zelene do tamno zelene. Ove morske alge imaju različitu morfologiju, tj. pokazuju bogatstvo oblika od jednostaničnih, filamentoznih pa sve do algi sa složenijom građom koja nalikuje građi razvijenijih biljaka.

Zelene alge (*Chlorophyta*) su prvenstveno slatkovodne; 10% algi su morske, dok je 90% slatkovodnih (Smith, 1955). Slatkovodne vrste su uglavnom kozmopoliti sa nekoliko endemskih vrsta, kao i u morskom okruženju gdje su zelene alge u toplijim tropskim i polutropskim vodama slične svugdje u svijetu. Hladnije morske vode sadrže vrlo različite vrste zelenih algi. Glavni razlog tome je što su toplije vode u blizini ekvatora djelovale kao geografska barijera za evoluciju novih vrsta i rodova. Neki od primjera su *Ulva*, *Enteromorpha*, *Ascorsiphonia*, *Cladophora*, *Codium* i *Prasiola*.

Primjer vrste zelene alge je *Codium bursa* (Slika 4) koja spada u rod *Codium*, porodicu *Codiaceae*, red *Bryopsidales*, razred *Ulvophyceae* te koljeno *Chlorophyta*. *Codium* se javlja na dubinama i do 70 m u tropskim i umjerenim morskim vodama. Rod je izvorno bio odsutan iz velikog dijela istočne obale Sjeverne Amerike, a 1957. godine *Codium fragile* je pronađena duž središnje obale Atlantika (Bouck i Morgan, 1957.) te se kasnije proširila i na sjever. Često se zbog svoje teksture može zamijeniti sa spužvom jer su spužvastog, kuglastog i šupljeg talusa. Mlade jedinke su savršeno okruglog oblika dok starije jedinke u sredini talusa imaju ulegnuće. U promjeru dosežu i do 40 cm (Rusconi, 2010).



Slika 4. *Codium bursa* (Anonymous 4, 2016)

2.2.3. Crvene alge

Crvena boja ovih algi proizlazi zahvaljujući dominantnim pigmentima fikoeritrinu i fikocijaninu koji maskiraju druge pigmente kao što su klorofil *a* (bez klorofila *b*), β -karoten te ksantofile (Bold i Wynne, 1985). Crvene alge *Kappaphycus* i *Betaphycus* najvažniji su izvori karagenana koji se koristi kao sastojak u namirnicama poput jogurta, čokoladnog mlijeka i pudinga. *Gracilaria*, *Gelidium*, *Pterocladia* i druge crvene alge koriste se u proizvodnji agara koji služi kao medij za rast mikroorganizama. Uglavnom žive u bentosu litoralne zone, osobito toplijih mora budući da su mnoge vrste osjetljive na temperaturne oscilacije (Šolić, 2005). Postoji oko 8000 vrsta crvenih algi, većina su morske te žive na dubinama do 40 m a ponekad i do 250 m. Crvene alge se smatraju najvažnijim izvorom mnogih biološki aktivnih metabolita u usporedbi s drugim algama (Kim, 2012).

Mnoge crvene alge u svoje taluse često ugrađuju kalcijev karbonat (porodica *Corallinaceae*) čineći osnovu koraligenske biocenoze na područjima smanjene količine svjetlosti (Prvan i sur., 2016). Za koraligensku biocenozu su karakteristične crvene alge poput *Pseudolithophyllum expansum* (Slika 5) te nekalcificirane crvene alge kao što su *Vidalia volubilis* (Slika 6). To su scijafilne alge koje nastanjuju ona područja gdje je smanjen intenzitet svjetlosti, gibanja vode te kolebanje saliniteta i temperature (Šolić, 2005).



Slika 5. *Pseudolithophyllum expansum* (Anonymous 5, 2018)



Slika 6. *Vidalia volubilis* (Anonymous 6, 2004)

2.3. LIPIDI

Lipidi i lipofilne komponente su neophodne za funkcioniranje živih organizama. Predstavljaju veliku skupinu organskih spojeva koje proizvode mikroorganizmi, gljive, biljke, morski organizmi i životinje. U skupinu masti ili lipida spadaju brojni kemijski spojevi kao što su monogliceridi, digliceridi, trigliceridi, fosfatidi, cerebrozidi, steroli, terpeni, masni alkoholi te masne kiseline (Chow, 2007). Lipidi su netopljivi u vodi i spadaju u glavne strukturne elemente protoplazme. Kao sastavni dio membrana, lipidi sudjeluju u procesu aktivnog transporta iona i molekula kroz membrane (Azimova i sur., 2011). Lipidi algi se sastoje od fosfolipida, glikolipida, neutralnih lipida svojstvenih višim biljkama kao i nekih netipičnih lipida koji se mogu naći samo kod određenih vrsta. Jedna od karakteristika lipida morskih organizama jest prisutnost polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) posebno omega-3 masnih kiselina za koje je utvrđeno da imaju pozitivan učinak na zdravlje. Za razliku od životinja koje žive u moru, morske alge se u puno manjoj mjeri koriste kao izvor omega-3 masnih kiselina. Iako se ribe koriste kao glavni izvor polinezasićenih masnih kiselina, zbog problema smanjenja ribljeg fonda, potrebno je pronaći alternativne izvore za primjenu u prehrani ljudi i životinja (Caf i sur. 2019). Sastav masnih kiselina u algama uvelike je povezan s okolišnim čimbenicima koji utječu na razlike između algi iz različitih dijelova svijeta.

U zadnje vrijeme je povećan interes za lipide algi, posebno smeđih algi zbog zdravstvenih benefita omega-3 polinezasićenih masnih kiselina i fukoksantina, karotenoida pronađenog u smeđim algama. Eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA) su omega-3 masne kiseline koje se nalaze u lipidima morskih organizama te uzrokuju značajne biokemijske i fiziološke promjene u tijelu odnosno pozitivno utječu na ljudsko zdravlje. Poznato je da ateroskleroza pogađa koronarne arterije a upravo EPA i DHA sprječavaju aterosklerozu na način da smanjuju udio triglicerida u plazmi i krvni tlak te imaju antiaritmička svojstva.

Sastav lipida u algama varira s obzirom na vrstu, geografsku lokaciju, godišnje doba, temperaturu vode, salinitet, intenzitet svjetlosti ili njihovu kombinaciju (Kim, 2012). Tako su, primjerice, Sanchez-Machado i sur. (2004) izvijestili da tropske vrste imaju znatno manje lipida od vrsta iz hladnih voda.

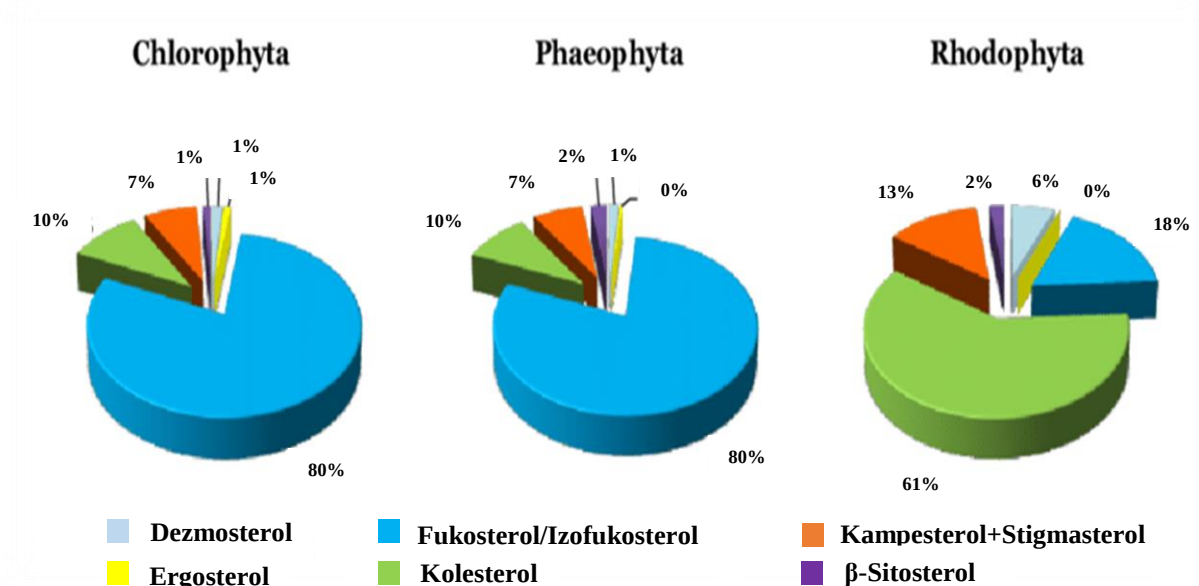
2.3.1. Masne kiseline

Masne kiseline mogu biti zasićene (bez dvostruke veze), mononezasićene (jedna dvostruka veza) ili polinezasićene (dvije ili više dvostrukih veza) te su neophodne zbog svoje energetske, metaboličke i strukturne uloge. Zasićene masne kiseline su funkcionalno podijeljene na kratkolančane i dugolančane masne kiseline te su najčešće poznate po svojim trivijalnim imenima kao što su laurinska, stearinska, palmitinska i miristinska masna kiselina. Zasićene masne kiseline kratkog lanca (4:0-10:0) se nalaze u mliječnim mastima te u određenim sjemenkama. Laurinska (12:0) i miristinska (14:0) su karakteristične masne kiseline sjemenki porodice *Lauraceae* i *Myristiceae*. Palmitinska masna kiselina je najistaknutija zasićena masna kiselina biljnih i mliječnih masnoća te spremišnog tkiva sisavaca, a stearinska masna kiselina je najzastupljenija u loju preživača te se nalazi i u nekim biljnim masnoćama. Što se tiče dugolančanih zasićenih masnih kiselina, nalaze se samo u pojedinim uljima. Nadalje, što se tiče mononezasićenih masnih kiselina, najraširenija je oleinska masna kiselina karakteristična za maslinovo ulje. Polinezasićene masne kiseline se kategoriziraju ovisno o relativnim položajima dvostrukih veza a najvažnije su omega-3, omega-6 i omega-9 masne kiseline. Jedna od najpoznatijih polinezasićenih masnih kiselina iz skupine omega-6 masnih kiselina je linolna masna kiselina koja je ujedno i esencijalna. Prisutna je u gotovo svakoj biljnoj masnoći, pogotovo u kukuruzu, sjemenkama pamuka, suncokretovom i sojinom ulju. Karakteristična omega-3 masna kiselina lanenog ulja je alfa-linolenska a nalazi se i u mnogim fotosintetskim organizmima (Chow, 2007). Poznato je da alge i mikroalge sintetiziraju velike količine dugolančanih polinezasićenih masnih kiselina kao što su eikozapentaenska (EPA, C20:5 n-3) i dokozaheksaenska masna kiselina (DHA, C22:6 n-3).

2.3.2. Steroli

Steroidi čine veliku skupinu spojeva sa širokim rasponom bioloških aktivnosti i fizikalnih svojstava (Nes, 1989). U steroide se ubrajaju osim sterola (steroidni alkoholi) i žučne kiseline, spolni hormoni, hormoni nadbubrežnih žlijezda i srčani aglikoni. Zajednička strukturna karakteristika svih steroida je tetraciklički prstenasti sustav a sastoje se od fenantrenske skupine (3 prstena cikloheksana i 1 prsten ciklopentana) (Škevin, 2016). Glavni sterol kralježnjaka je kolesterol, gljiva ergosterol a biljke obično posjeduju složeniji sastav sterola. Stigmasterol i β -sitosterol su najčešći steroli biljnih vrsta te su uključeni u embrionalni

rast biljaka. Općenito, steroli se smatraju ključnim molekulama za održavanje stanja fluidnosti membrane prikladnog za njenu funkciju (Dufourc, 2008). U ranijim istraživanjima je uočeno da su steroli često karakteristični za pojedine razrede, porodice, a ponekad i za obitelji, stoga informacija o sastavu sterola može biti korisna u filogenetskim usporedbama. Od samog početka prepoznat je fukosterol kao glavni sterol smeđih algi, no razvitkom sofisticiranijih analitičkih metoda, posebno plinske kromatografije, uočena je i prisutnost kolesterola kao i 24-metilen kolesterola. Fukosterol je sterol koji se može izolirati iz morskih algi i dijatomeja te ima antikancerogeni, antidijabetski, antioksidativni, antifungalni, hepatoprotektivni, antihistaminčki učinak kao i mnoge druge, djelujući na redukciju kolesterola u krvi, preventivno na trombozu krvnih žila kao i na inhibiciju aktivnosti butirilkolinesteraze (Abdul i sur., 2016) (Slika 7). Nadalje, u istraživanju Glenn i sur. (1991) kod gotovo svih ispitanih crvenih algi je $\Delta 5$ -sterol bio najzastupljeniji sterol, s kolesterolom koji je dominirao u približno 85% vrsta. Što se tiče zelenih algi, one imaju najširi raspon sterola koji se mogu naći kao najdominantniji steroli neke vrste. Mnoge vrste primitivnijih redova zelenih algi kao što su *Volvocales* i *Chlorococcales* sadrže ergosterol ili druge $\Delta 5,7$ -sterole. Isto tako, zanimljivo je da niti jedna vrsta u višim redovima zelenih algi ili viših biljaka ne sadrži $\Delta 5,7$ -sterole kao dominantne sterole. Nadalje, vrlo visok postotak složenijih i razvijenijih zelenih algi sadrži 24-etiliden kolesterol i 24-etil kolesterol kao glavne sterole (Glenn i sur., 1991).



Slika 7. Udio glavnih sterola (%) zelenih, smeđih i crvenih morskih algi sa zapadne obale Portugala (Lopes i sur., 2014; Lopes i sur., 2011)

2.4. IZOLACIJA I EKSTRAKCIJA LIPIDNIH KOMPONENTI

Općenito, ekstrakcija je tehnološka operacija odjeljivanja tvari različite topljivosti iz smjese pomoću otapala i temelji se na empirijskom zakonu „slično se otapa u sličnom“. Kruto-tekuće i tekuće-tekuće su dva glavna tipa ekstrakcije. Za ekstrakciju kruto-tekuće koriste se tradicionalne metode od davnina koje uključuju ekstrakciju po Soxhletu, hidrodestilaciju, maceraciju, perkolaciju itd. Veliki nedostatak navedenih metoda je duljina trajanja metoda te potrošnja velike količine otapala koja zagađuju okoliš. Upravo zbog toga, mnoge od metoda su zamijenjene alternativnim koje su brže, učinkovitije te troše manje otapala a neke od njih su: ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, enzimski potpomognuta ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem i dr. (Grosso i sur., 2015).

2.4.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

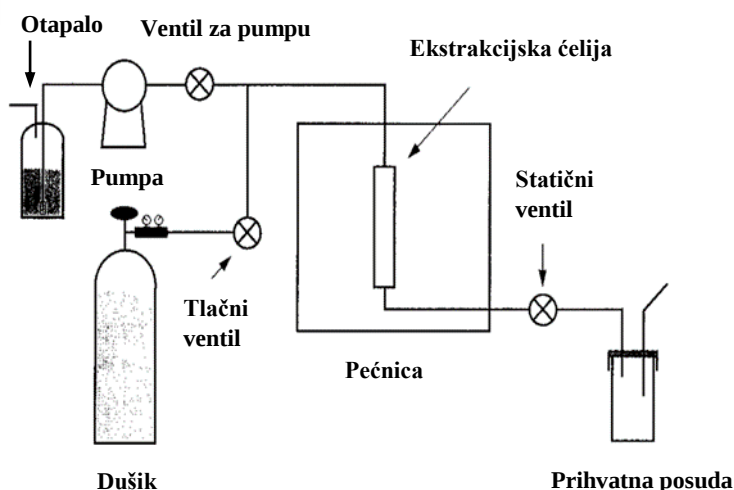
Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku je automatizirana tehnika ekstrakcije koja osigurava brz i učinkovit postupak ekstrakcije. Korištenje ASE (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE) je sigurnije jer smanjuje mogućnost kontakta s kemijskim otapalima. Nadalje, neke studije su pokazale da je ekstrakcija pomoću ASE rezultirala povećanim ili usporedivim količinama ulja u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije (Ahmad, 2018). Karakterizira ju primjena visoke temperature i visokog tlaka a upravo je visoka temperatura parametar koji najviše utječe na svojstva otapala za vrijeme ekstrakcije. Porastom temperature u ekstrakcijskoj ćeliji dolazi do pucanja jake veze matrica-analit nastale kao rezultat vodikovih veza, van der Waalsovih sila te dipol-dipolnih interakcija. Također, porastom temperature se smanjuje viskoznost i površinska napetost otapala čime je osiguran lakši prodor otapala u matriks uzorka (Dean, 2010). Glavni razlog primjene visokog tlaka tijekom postupka ekstrakcije je zadržavanje otapala u tekućem stanju na povišenim temperaturama iznad točke vrenja. ASE metoda omogućava korištenje različitih vrsta otapala, čak i onih koja nisu učinkovita u konvencionalnim metodama. To se postiže podešavanjem parametara temperature i tlaka tijekom postupka koji utječu na bolje otapanje tvari. No, iako ASE omogućuje upotrebu otapala koja se ne koriste u konvencionalnim tehnikama, može doći do otapanja komponenata matriksa koje bi inače ostale netopljive u uvjetima konvencionalne ekstrakcije što čini nedostatak ove tehnike (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001). Osim toga, primjena visoke temperature i

visokog tlaka povećava operativne troškove. Voda se najčešće koristi kao otapalo za ASE ali može se koristiti i n-heksan, diklormetan, aceton, etil acetat i mnoga druga (Poojary i sur., 2016).

Dijelovi ASE sustava su: izvor otapala, pumpa, ekstrakcijska ćelija, pećnica za zagrijavanje uzorka i praćenje temperature, niz ventila, prihvatna posuda te boca s dušikom (Slika 8 i Slika 9). Sustav za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku uključuje ASE 100, ASE 200 i ASE 300 modele. ASE 100 sustav karakterizira jedna ekstrakcijska ćelija dok su ASE 200 i ASE 300 automatizirani sustavi s mogućnošću obrade 24 uzorka (Dean, 2010). Izvagani kruti uzorak se postavlja u ekstrakcijsku ćeliju te se puni odabranim otapalom koje će provesti ekstrakciju pod povišenom temperaturom (50-200 °C) i tlakom (500-3000 psi) u kratkom vremenskom razdoblju od 5-10 min. Pročišćavanje ekstrakta se provodi pomoću komprimiranog plina koji se odvodi u bočicu za prikupljanje (Richter, 1996).



Slika 8. Sustav za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (Dionex ASE 350) (Yang i sur., 2014)



Slika 9. Shematski prikaz procesa ubrane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (prilagođeno prema referenci iz Richter i sur., 1996)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Alge

U istraživačkom dijelu rada korišteni su liofilizirani uzorci smeđih algi *Cystoseira barbata*, *Cystoseira compressa* te *Fucus virsoides* i zelene alge *Codium bursa*. Sve četiri vrste su izronjene iz Jadranskog mora i to na području Zadra u razdoblju od svibnja do prosinca 2018. godine. Alge su potom podvrgnute liofilizaciji kako bi njihov kemijski sastav ostao nenarušen i u potpunosti sačuvan te su transportirane u Zagreb. Uzorci algi su skladišteni u zamrzivaču do početka samih analiza.

3.1.2. Standardi i reagensi

Sve kemikalije i otapala korištena u ovom radu bila su najmanje *p.a.* stupnja čistoće. Korišteni standardi bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

- Aluminijski oksid (Merck)
- Bezvodni etanol (Carlo Erba)
- Dietileter (Carlo Erba)
- Destilirana voda
- Etanol (96%) (J. T. Baker)
- Etil-acetat (Carlo Erba)
- Heksan (J. T. Baker)
- Izooktan (J. T. Baker)
- Kalijev hidroksid (J. T. Baker)
- Metanol (Carlo Erba)
- Natrijev hidrogensulfat monohidrat (Merck)
- Natrijeva lužina (Merck)
- 40% NaCl (Merck)
- α -kolestanol (Fluka)
- reagens za sililiranje (mješavina piridina, heksametildisilazana trimetilklorosilana) (Sigma Aldrich)

Aparatura

- ASE ekstraktor Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extraction System, Thermo Scientific (Sunnyvale, CA, SAD)
- Centrifuga model Rotina 35, Hettich Zentrifugen (Njemačka)
- Električni mlin Sencor (Ričany, Republika Češka)
- Laboratorijska vaga model ALS 220-4N, Kern (Njemačka)
- Liofilizator ALPHA 1-2 LDplus Package, Martin Christ (Osterode am Harz, Njemačka)
- Plinski kromatograf Agilent Technologies 6890N Network GC System s plameno-ionizacijskim detektorom (Santa Clara, SAD)
- Rotavapor Buchi (Flawil, Švicarska)
- Spektrofotometar Perkin Elmer Lambda (Waltham, Massachusetts, SAD)
- Tresilica LLG-Vortex UnitEXER (Meckenheim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj Bandelin Sonorex (Ettenheim, Njemačka)

3.2. METODE

3.2.1. Konvencionalna ekstrakcija

Liofilizirani uzorak algi podvrgnut je konvencionalnoj ekstrakciji na tresilici tj. ekstrakciji pri sobnoj temperaturi (Slika 10). Korištena otapala su heksan i etil acetat:etanol u volumnom odnosu 1:1. Ovisno o dostupnoj količini, u pravilu je izvagano 4,5 g uzorka koji je prenesen u plastičnu falkonicu volumena 50 mL, a na masu uzorka alge dodano je 10x više otapala, tj. u pravilu 45 mL. Pokus je proveden u dva paralelna ispitivanja. Pripremljene paralele su postavljene na tresilicu na 2000 okretaja u minuti u trajanju od 30 minuta. Zatim su falkonice s ekstrahiranim uzorcima postavljene na centrifugu na 5000 okretaja u minuti u trajanju od 15 minuta te je nakon završetka centrifugiranja izdvojen gornji bistri sloj odnosno supernatant od taloga. Tekući sloj koji je sadržavao i ekstrahirano ulje je podvrgnut filtriranju te je dobiveni filtrat skupljan u okrugle tikvice. Postupak ekstrakcije je s talogom iz 1. ekstrakcije ponovljen još dva puta s 22,5 mL otapala. Sva 3 skupljena ekstrakta u tikvici s okruglim dnom su podvrgnuta uparavanju na rotavaporu kako bi se uklonio višak otapala. Uparavanje je provedeno pri 250-300 Pa u slučaju heksana te pri 175-200 Pa u slučaju etil acetat:etanol=1:1, pri temperaturi od 40 °C na 90 okretaja u minuti.



Slika 10. Konvencionalna ekstrakcija na tresilici (Vlastita fotografija)

3.2.2. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE)

Na analitičkoj vagi, u staklenoj čašici, odvažuje se, ovisno o nasipnoj masi, određena masa (2 - 8 g) praha liofilizirane alge te se uzorak dobro pomiješa staklenim štapićem s otprilike 1,5 g dijatomejske zemlje. Proces ekstrakcije provodi se uz pomoć uređaja za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (ASE 350, Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). U ekstrakcijsku ćeliju od nehrđajućeg čelika volumena 22 mL stavljaju se 2 celulozna filtera (veličine pora 20 μm), a potom se dodaje uzorak pomiješan s dijatomejskom zemljom. Ekstrakcijska ćelija se zatvori ručno i postavi u ASE uređaj. Prije početka same ekstrakcije, potrebno je na zaslonu uređaja ručno unijeti zadane parametre ekstrakcije (temperatura, vrijeme ekstrakcije te broj ciklusa ekstrakcije). Kao otapalo korišten je heksan te smjesa etil acetata i etanola (1:1). Za sve analize korišten je tlak od 1500 psi i temperatura od 25 i 100 °C te 3 ciklusa od 15 minuta. Po završetku ekstrakcije, ekstrakti su skupljeni u staklene bočice za skupljanje i nakon toga kvantitativno prenešeni u tikvice s okruglim dnom kako bi se uklonio višak otapala na rotavaporu. Uparavanje je provedeno pri 250-300 Pa u slučaju heksana te pri 175-200 Pa u slučaju etil acetat:etanol=1:1, pri temperaturi od 40 °C na 90 okretaja u minuti.

3.2.3. Izolacija pigmenata

Upareni ekstrakti dobiveni konvencionalnom ekstrakcijom te ubranom ekstrakcijom otapalima uz visoki tlak (ASE) propuštani su kroz kolonu ispunjenu silikagelom kako bi se uklonili pigmenti iz ekstrakta, a koji su se kasnije isto tako određivali. Kolona je pripremljena tako što je propušteno 2 mL heksana koji je aktivirao stacionarnu fazu. Zatim je propuštán ekstrakt koji je obavezno kvantitativno prenešen pomoću heksana na kolonu. Protok je reguliran

s vakuum bocom kao na slici 11. Sakupljeni uzorak bez pigmenata je zatim kvantitativno pomoću heksana prebačen u izvaganu staklenu bočicu (20 mL) te je propuhivan s dušikom do suha kako bi se u potpunosti uklonilo otapalo. Tako dobiveni ekstrakt je skupa sa staklenom bočicom izvagan te je dobivena razlika u masama predstavljala udio lipida u pojedinoj vrsti alge. Iz lipida je određen i sastav masnih kiselina plinskom kromatografijom. Isto tako, pigmente zadržane na kolonama je bilo potrebno eluirati s kolone pomoću etanola kako bi se mogle vršiti daljnje analize (Slika 12).



Slika 11. Uklanjanje pigmenata pomoću kolone (Vlastita fotografija)



Slika 12. Primjer kolone s pigmentima (Vlastita fotografija)

Pigmenti su skupljani u tikvice s okruglim dnom te su upareni na rotavaporu. Upareni uzorci su kvantitativno iz tikvica preneseni pomoću etanola u staklene bočice (20 mL) koje su prethodno izvagane na analitičkoj vagi te su otpareni dušikom do suha odnosno otapalo je u potpunosti otpareno.

3.2.4. Određivanje sastava masnih kiselina plinskom kromatografijom

Sastav masnih kiselina uobičajeno se određuje plinskom kromatografijom (GC) prije koje se masne kiseline prevode u njihove metilne estere. Metilni esteri pripremljeni su prema metodi ISO 12966-2:2017.

Priprema metilnih estera masnih kiselina (ISO 12966, 2017)

Odvaže se 60 mg uzorka ulja i otopi u 2 mL izooktana u epruveti volumena 10 mL s čepom. U slučaju manje količine uzorka volumen izooktana i svih ostalih reagenasa se prilagodi. Zatim se u epruvetu doda 100 μ L metanolne otopine KOH ($c=2 \text{ mol L}^{-1}$) i snažno protrese 1 minutu. Ostavi se na sobnoj temperaturi da reagira. Nakon 2 minute u reakcijsku smjesu se doda 2 mL otopine NaCl (40 g NaCl-a u 100 mL vode) te kratko protrese. Odvoji se

izooktaski sloj i u njega se doda 1 g natrijeva hidrogensulfata (bezvodnog) kako bi se uklonili mogući ostaci vode te se smjesa protrese. Bistra otopina se prebaci u vijalicu.

Analiza metilnih estera masnih kiselina plinskom kromatografijom (ISO 12966, 2015)

Pripremljen uzorak analizira se na plinskom kromatografu Agilent Technologies 6890N Network GC System (Santa Clara, SAD) opremljenom s plamenoionizacijskim detektorom (FID) koji je preko kanala spojen na računalo. Nakon provedenih preliminarnih ispitivanja prema kojima su odabrani optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora i injektora, protok plina te količina injektiranog uzorka) (Tablica 1), zadani su uvjeti analize. Masne kiseline identificirane su usporedbom vremena zadržavanja metilnih estera pojedine masne kiseline s vremenima zadržavanja metilnih estera standardne smjese 37 masnih kiselina (F.A.M.E. C4-C24, Supelco) poznatog sastava.

Tablica 1. Uvjeti rada plinskog kromatografa

Kolona	kapilarna TR-FAME (Thermo), 30 m x 0,22 mm, debljina filma 0,25 µm
Stacionarna faza	stacionarna faza- 70% cijanopropil-polisilfenilen siloksan
Temperaturni program kolone	120 °C do 160 °C – 4 °C min ⁻¹ , 160 °C do 190 °C-10 min ⁻¹ , na 190 °C 10 min
Trajanje analize	23 min
Plin nosioc	Helij
Protok plina nosioca	0,7 mL min ⁻¹
Temperatura injektora	250 °C
Split	1 : 75
Temperatura detektora	280 °C
Količina injektiranog uzorka	1,0 µL

3.2.5. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila, karotenoida i protoklorofila

Princip metode

Određivanje klorofila i karotenoida temelji se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama (Abou-Arab i sur., 2010). Svaki ekstrakt pigmenata, uparen do suha, se otopio u 10 mL bezvodnog etanola te se smjesa snažno protresla na vorteksu 1 minutu. U slučaju da se pigmenti nisu uspjeli u potpunosti odvojiti od stijenke staklene bočice, stavljani su na 10 minuta

u ultrazvučnu kupelj. Zatim je otpipetirano 400 μL dobivene otopine u koju je dodano 4 mL bezvodnog etanola.



Slika 13. Otopljeni pigmenti u bezvodnom etanolu (Vlastita fotografija)

Postupak određivanja

U staklenu kivetu otpipetira se 1 mL uzorka i 2 mL odgovarajućeg otapala nakon čega se mjeri apsorbancija na spektrofotometru (Perkin Elmer Lambda, SAD) pri valnim duljinama od 470 nm, 649 nm i 664 nm za uzorke s etanolom. Na isti način se pripremi i slijepa proba, no umjesto ekstrakta se uzima isti volumen ekstrakcijskog otapala. Svi su uzorci analizirani u paraleli.

Na osnovu dobivenih rezultata apsorbancije (A), određene su koncentracije klorofila a (C_a), klorofila b (C_b) i karotenoida (C_{x+c}) prema jednadžbama Lichtenthaler i Buschmann (2001). Udio protoklorofila određuje se pri 626, 645 i 663 nm uz bezvodni etanol kao slijepu probu. Iz dobivenih vrijednosti apsorbancije izračuna se koncentracija klorofila preko zadanih formula Andersona i Boardmana (1964).

Određivanje klorofila a [1]:

$$C_a = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [1]$$

Određivanje klorofila b [2]:

$$C_b = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [2]$$

Određivanje karotenoida [3]:

$$C_{x+c} = (1000 A_{470} - 2,13 C_a - 97,63 C_b) / 209 \quad [3]$$

Određivanje protoklorofila [4]:

$$P = -3,99 A_{663} - 6,76 A_{645} + 29,60 A_{626} \quad [4]$$

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

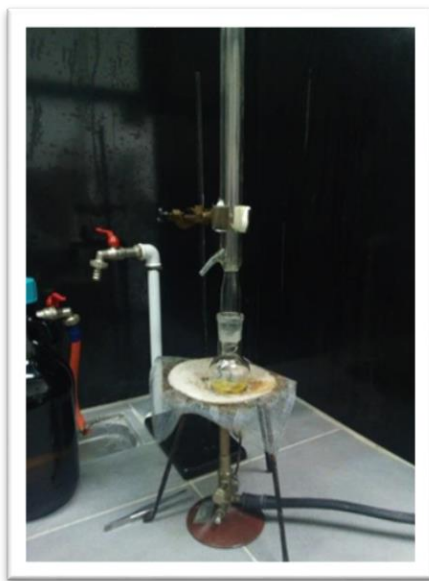
3.2.6. Određivanje udjela i sastava sterola

Za određivanje udjela i sastava sterola u uzorcima lipidnog ekstrakta algi korištena je metoda HRN EN ISO 12228:2004.

Temelj metode je dodatak unutarnjeg standarda α -kolestanola lipidnom ekstraktu alge te podvrgavanje saponifikaciji s etanolnom otopinom KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Neosapunjiva frakcija ekstrahira se otapalom dietileterom na koloni ispunjenoj aluminijevim oksidom koji zadržava anione masnih kiselina, a propušta negliceridne komponente. Iz neosapunjive frakcije se, pomoću tankoslojne kromatografije na bazičnom silikagelu, izdvaja sterolna frakcija. Dobivena frakcija se prevodi u trimetilsililestere te analizira plinskim kromatografom s plameno ionizacijskim detektorom.

Priprema neosapunjive frakcije

Izvaže se $0,25 \pm 0,001 \text{ g}$ lipidnog ekstrakta u okruglu tikvicu s ravnim dnom (100 mL) te se doda 1 mL prethodno pripremljenog α -kolestanola ($c=1 \text{ mg mL}^{-1}$), 5 mL KOH ($c=0,5 \text{ mol L}^{-1}$) i dvije do tri kuglice za vrenje. Tikvica se spoji na povratno zračno hladilo i zagrijava na plameniku preko azbestne mrežice do vrenja. Ostavi se da vrije točno 15 minuta (Slika 14). Nakon 15 minuta tikvica se odvoji od zračnog hladila, doda se 5 mL etanola a kada je u potpunosti ohlađena, slijedi kromatografiju na stupcu.



Slika 14. Priprema neosapunjive frakcije (Bosotin, 2016)

Priprema kolone za kromatografiju u stupcu

Kolona za kromatografiju dugačka 25 cm sa sinterom na dnu kolone, unutarnjeg promjera 1,5 cm pričvrsti se za metalni stalak. Na dno kolone stavi se vata i doda malo etanola kako bi vata što bolje prionula uz sinter. Pomoću staklenog štapića istisne se zrak da ne zaostane u vati. Odvaje se 10 g aluminijevog oksida te se uz 20 mL etanola kvantitativno prenese u kolonu za kromatografiju. Punjenje kolone potrebno je provesti što pažljivije radi izbjegavanja mogućih pukotina u stupcu aluminijevog oksida. Višak etanola se ispusti iz kolone tako da nivo etanola bude pola centimetra iznad nivoa vrha stupca aluminijevog oksida.

Ekstrakcija neosapunjive frakcije kromatografijom u stupcu

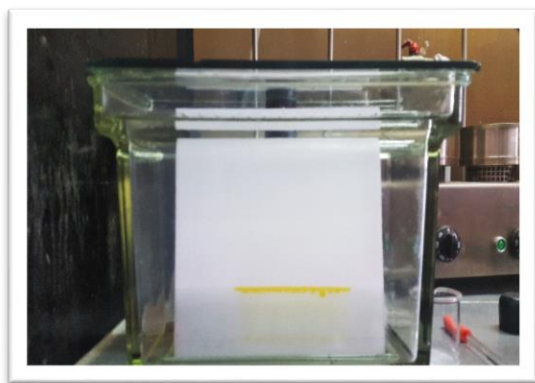
Ohlađeni uzorak iz tikvice se pipetom prenese u pripremljenu kolonu (Slika 15). Eluiranje traje dok otopina ne dosegne vrh sloja aluminijevog oksida a sami eluat se skuplja u tikvicu okruglog dna od 100 mL. Zatim se u kolonu za kromatografiju doda 5 mL etanola te se nastavi proces eluiranja. Tikvica u kojoj se prethodno nalazio uzorak, ispere se s 10 mL dietiletera te se prenese u kolonu. Nakon što dietileter dosegne vrh sloja aluminijevog oksida, u kolonu se dodaje još 20 mL dietiletera iz menzure, kojim se završava proces eluiranja. Dobiveni eluat se otpari do suhog na rotavaporu pri 40 °C.



Slika 15. Ekstrakcija neosapunjive frakcije (Vlastita fotografija)

Izdvajanje sterolne frakcije tankoslojnom kromatografijom

Uzorak neosapunjive frakcije se otopi u 2 mL dietiletera i nanese mikropipetom na gotovu ploču sa silikagelom (Silikagel F254, veličine 20x20 cm, debljine 0,25 mm) u ravnoj liniji 2 cm od donjeg ruba ploče. Na istoj se visini ispred ove linije nanese 2-3 μ L referentne otopine α -kolestanola kako bi se nakon razvitka kromatograma mogli identificirati steroli. Zatim se ploča postavi u kadu za razvijanje koja sadrži 100 mL otopine heksan:dietileter (1:1, V/V) te se zatvori poklopcem (Slika 16). Kromatogram se razvija pri sobnoj temperaturi, do trenutka kad linija otapala dosegne visinu od 1 cm ispod gornjeg ruba ploče. Nakon toga se ploča suši u digestoru a kada se osuši, ravnomjerno se poprsksa metanolom. Traka sterola prepoznaje se po referentnoj mrlji. Olovkom se iscrtaju rubovi mrlje a metalnom špatulicom se sastruže silikagel (Slika 17) unutar označenih rubova, te se prebaci u lijevak s filter papirom. Doda se 0,5 mL 96%tne otopine etanola te se ispire u tri navrata s 5 mL dietiletera (3x5 mL). Sterolna frakcija skuplja se u tikvicu od 50 mL s okruglim dnom a kada se skupi, otparava se na rotavaporu ($T=40\text{ }^{\circ}\text{C}$) do volumena od 1 mL. Koncentrat se prenese u epruvetu te osuši do suha pod strujom dušika. Isto tako, tikvica u kojoj se prethodno skupljala sterolna frakcija se ispere s 0,5 mL dietiletera a sadržaj se prebaci u epruvetu i ponovno suši pod strujom dušika. Dobiveni suhi ostatak predstavlja sterolnu frakciju.



Slika 16. Razvijanje kromatograma u kadi (Vlastita fotografija)



Slika 17. Ostrugana traka sa sterolima (Vlastita fotografija)

Priprema trimetilsililetera

U epruvetu koja sadrži sterolnu frakciju doda se po svakom miligramu frakcije 50 μ L reagensa za sililiranje, koji predstavlja mješavinu piridina, heksametildisilazana i trimetilklorosilana u omjeru 5:2:1 (V:V:V). Epruveta se začepi, protrese na vorteksu do potpunog otapanja sterola i stavi se u sušionik na temperaturu od $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 15 min. Nakon sušenja,

eproveta se ohladi u eksikatoru i centrifugira 10 min na 3000 okretaja u minuti. Bistri supernatant se potom odvoji od taloga te se prenese u vijalice od 2 mL s insertom od 100 μ L.

Analiza sastava sterola plinskom kromatografijom

Pripremljen uzorak analizira se na plinskom kromatografu ATI Unicam 610 (Cambridge, Engleska). Kromatograf je opremljen s injekcionim sustavom i plameno-ionizacijskim detektorom (FID) koji je preko kanala spojen na računalo s instaliranim 4880 softverom (Unicam 4880 Chromatography Data System). Nakon provedenih preliminarnih ispitivanja prema kojima su odabrani optimalni uvjeti (temperatura kolone, detektora i injektora, protok plina te količina injektiranog uzorka) (Tablica 2), zadani su uvjeti analize.

Tablica 2. Uvjeti rada plinskog kromatografa

Kolona	DB-17 (Agilent) 30 m x 0,32 mm, debljina filma 0,25 μ m
Stacionarna faza	(50%-fenil)-metilpolisiloksan
Temperaturni program kolone	180 °C do 270 °C uz 6 °C min ⁻¹ ; 270 °C 30 min
Trajanje analize	45 min
Plin nosioc	Helij
Protok plina nosioca	1,5 mL min ⁻¹
Temperatura injektora	290 °C
Split	13,3:1
Temperatura detektora	250 °C
Količina injektiranog uzorka	1,0 μ L

Identifikacija i kvantifikacija pikova

Pojedinačni pikovi sterola raspoznaju se na osnovu poznatih retencijskih vremena te usporedbom s retencijskih vremenima trimetilsililetera standardnih mješavina sterola analiziranih pod jednakim uvjetima.

Udjel ukupnih sterola izražava se u mg kg⁻¹ i izračunava po formuli [5]:

$$\text{Ukupni steroli} = \frac{\sum A_s \cdot 1000}{A_a \cdot m} \quad [5]$$

gdje je:

A_s = površina svakog pojedinačnog pika sterola

A_α = površina ispod pika α -kolestanola

m = masa uzorka ulja algi

Udjel pojedinačnih sterola izražen je kao % od ukupnih sterola te je izračunat po formuli [6]:

$$\% \text{ od ukupnih sterola} = \frac{A \cdot 100\%}{\sum A_i} \quad [6]$$

gdje je:

A = površina ispod pika određenog sterola (mg kg^{-1})

A_i = površina ispod pika svakog pojedinačnog sterola.

3.2.7. Statistička analiza

Statistička obrada rezultata za iskorištenje ekstrahirane lipidne frakcije, udjela masnih kiselina i pigmenata provedena je metodom analize varijance (ANOVA) pomoću programskog paketa Design Expert 12 (Stat-Ease, Mineapolis, MN, SAD) pri čemu su razmatrani utjecaji 3 faktora (vrsta alge, otapalo i tretman).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitivan je utjecaj različitih otapala i različitih tehnika ekstrakcije na udio/sastav ulja, masnih kiselina i pigmenata kod četiri različite vrste makroalge. Daljnjom analizom iz ulja ekstrahiranog u heksanu se odredio i sastav sterola.

Otapala koja su korištena su heksan (H) i etil acetat:etanol=1:1 (v/v) (EE), a korištene tehnike su konvencionalna tehnika ekstrakcije na tresilici (K) i ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE).

Prije eksperimentalnog dijela, temeljem pregleda literature izabrana su otapala heksan i etil acetat:etanol=1:1 (Lin i sur., 2004). Razlog korištenja navedenih otapala jest njihova manja toksičnost kako za okoliš tako i za zdravlje ljudi u odnosu na npr. klorirana otapala koja su vrlo toksična i opasna.

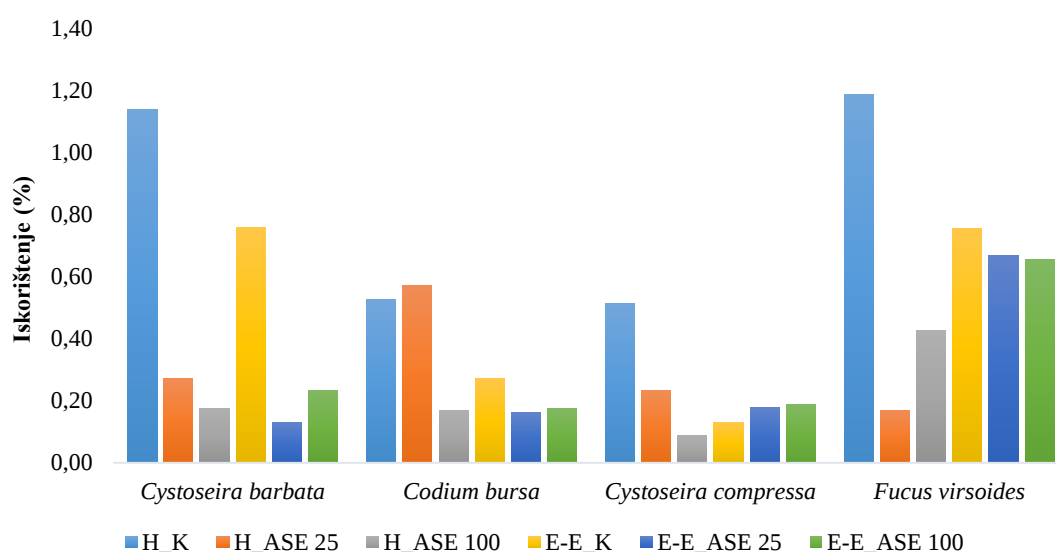
ASE ekstrakcija se provodila na temperaturama od 25 i 100 °C (ASE_25 i ASE_100). Ispitivane su sljedeće vrste kao i njihove međusobne razlike: *Cystoseira barbata* (CYBA), *Codium bursa* (COBU), *Cystoseira compressa* (CYCO) i *Fucus virsoides* (FUVI).

Budući da u literaturi ne postoje objavljeni podaci (ili ih je jako malo) koji kombiniraju različite vrste algi, otapala i tretmane pri različitim temperaturama kao i njihov kumulativan učinak na udio/sastav ulja, pigmenata i masnih kiselina, u radu će se uglavnom promatrati njihovi pojedinačni utjecaji. Što se tiče ispitivanih vrsta, najmanje istraživanja je provedeno na smeđoj makroalgi *Cystoseira compressa* i zelenoj *Codium bursa*.

Dobiveni rezultati prikazani slikovito i tablično su statistički obrađeni temeljem kojih su određeni signifikantni utjecaji ispitivanih parametara.

4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH OTAPALA I TEHNIKA EKSTRAKCIJE NA EKSTRAKCIJU ULJA MAKROALGI

Morske alge imaju nizak sadržaj lipida u rasponu od 1 do 5% suhe tvari (Khotimchenko, 2005; Belattmania i sur., 2016). Neutralni lipidi i glikolipidi glavna su vrsta lipida zastupljena u morskim algama s udjelom esencijalnih masnih kiselina većim nego u kopnenih biljaka (Rajapakse i Kim, 2011) pa unatoč tome što je ukupni sadržaj lipida uglavnom nizak, u kombinaciji s drugim zanimljivim sekundarnim metabolitima kao što su vitamini mogu direktno utjecati na ljudsko zdravlje (Panayotova, 2017).



Slika 18. Udio ekstrahiranog ulja (%) ovisno o korištenom otapalu/tehnici

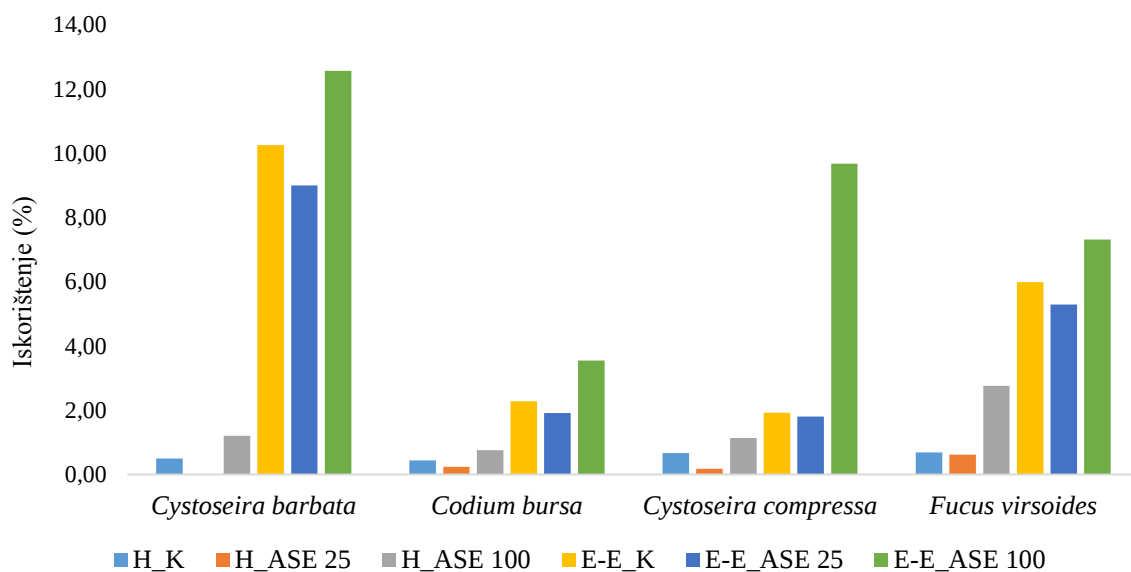
Iz slike 18 se može vidjeti da je najveća količina ekstrahirane lipidne frakcije, kod obje vrste otapala u gotovo svim uzorcima, dobivena konvencionalnom metodom ekstrakcije na tresilici. Shodno tome, statistička analiza je pokazala da je upravo tretman imao značajan utjecaj na udio ekstrahiranog ulja ($p=0,0047$). *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* su dvije smeđe makroalge koje su dale najveće količine ulja $>1\%$ konvencionalnom metodom ekstrakcije kod oba otapala. Slične rezultate za udjel ulja u *F. virsoides* su dobili Najdek i sur. (2014) homogenizacijom i ultrazvukom sa smjesom otapala diklormetan/metanol (2:1). U njihovom istraživanju ukupni lipidi činili su 1,1-3,7% suhe tvari ove alge. Nadalje, kada se kumulativno gledaju svi uzorci, iz *C. barbata* i *F. virsoides* su ekstrahirane veće količine ulja od preostale dvije vrste što potvrđuje statistička analiza koja pokazuje značajan utjecaj vrste alge ($p=0,0171$).

ASE metoda je, suprotno očekivanome, pokazala puno manju učinkovitost od konvencionalne ekstrakcije čak i pri temperaturi od 100 °C primjenom obje vrste otapala. Naime, korištenjem heksana dobiven je višestruko manji % ulja primjenom ASE metode pri 25 °C i 100 °C u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju. Korištenjem E-E kao otapala udjeli su nešto viši pa je tako kod čak 3 vrste makroalge vrijednost udjela ulja ekstrahiranog konvencionalnom metodom bila gotovo jednaka ASE metodi pri 25 °C i 100 °C. Iznimka je *C. barbata* kod koje je ekstrahirano znatno manje ulja u uzorcima E-E_ASE 25 i E-E_ASE 100 u odnosu na E-E_K. Razlog tome može biti velika količina sluznih tvari dobivenih ekstrakcijom uzoraka E-E_ASE 25 i E-E_ASE 100 koje su stvarale problem za vrijeme provedbe postupka uklanjanja pigmenata iz uzoraka. Moglo bi se reći da ASE metoda ima prednost isključivo kod *F. virsoides* korištenjem E-E budući da se ekstrahiraju zadovoljavajuće količine ulja u usporedbi sa E-E_K te H_K (najveći % ulja) ukoliko su vrijeme trajanja ekstrakcije i količina korištenog otapala prioritet. Općenito, povišenje temperature ubrzava kinetiku ekstrakcije, a povišeni tlak zadržava otapalo u tekućem stanju čime je omogućena veća brzina ekstrakcije (Giergielewicz-Možajska i sur., 2001).

Prilikom ispitivanja utjecaja otapala na ekstrakciju lipida iz mikroalgi imajući na umu ekološki prihvatljivo otapalo, Balasubramanian i sur. (2013) su upotrebom heksana dobili prinos lipida od 16%, a dodatkom polarnog otapala heksanu prinos se povećao. Sustavom otapala heksan:izopropanol=3:2 ukupno iskorištenje je iznosilo 19% dok dodatak acetona nije imao nikakav značajan utjecaj. Smjesa heksana i metanola je znatno povećala iskorištenje koje je iznosilo 26% te je bilo slično iskorištenju u slučaju korištenja smjese etil acetat:etanol=3:2. Iz navedenog se jasno vidi da je dodatkom određenog polarnog otapala heksanu moguće povećati iskorištenje koje je u slučaju ispitivanih vrsta nužno. Po mnogim literaturnim podacima je moguće ekstrahirati i do 5% ulja iz makroalgi, stoga je potrebna daljnja optimizacija uvjeta ekstrakcije lipida iz makroalgi ispitivanjem utjecaja raznih kombinacija polarnih i nepolarnih otapala, vodeći se principima zelene kemije.

4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH OTAPALA I TEHNIKA EKSTRAKCIJE NA UDIO I SASTAV PIGMENATA MAKROALGI

Kako bi se optimizirao proces fotosinteze na različitim dubinama i kako bi uspješno prikupile dovoljno svjetlosti, alge se moraju prilagoditi okolišu, što ima za posljedicu različit sastav pigmenata u pojedinim algama. Mnoge studije su pokazale dobrobiti pigmenata u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao dobre zamjene za potencijalno kancerogena umjetna bojila. Pigmenti klorofili i karotenoidi su prepoznati kao snažni antioksidansi, a karotenoid β -karoten je i prekursor vitamina A (Haryatfrehni i sur., 2015). Klorofil je ključan sastojak u mnogim proizvodima, koristi se kao aditiv u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima, kao prirodno sredstvo za bojanje hrane te je pokazao antioksidacijska i antimutagena svojstva. Selektivno apsorbira svjetlost u crvenom i plavom području spektra a posljedično emitira zelenu boju (Hosikian i sur., 2010). Klorofil se kao glavni pigment fotosintetskih organizama dijeli na četiri glavne skupine: klorofil *a*, klorofil *b*, klorofil *c* i klorofil *d* od kojih je najdominantniji klorofil *a* (Haryatfrehni, 2015; Pardilhó, 2019).



Slika 19. Udio ekstrahiranih pigmenata (%) ovisno o korištenom otapalu/tehnici

Tablica 3. Udio (mg kg⁻¹) pojedinih pigmenata određenih spektrofotometrijski izražen na liofiliziranu masu alge

	$Ca^{*\Theta}$	Cb^{Θ}	$Cx+c^{*\Phi}$	P^{Θ}
CYBA H_K	238,84	3,84	94,93	0,00
CYBA H_ASE 25	116,37	36,62	21,18	0,00
CYBA H_ASE 100	317,70	0,00	151,79	0,00
CYBA EE_K	305,48	43,44	164,17	30,34
CYBA EE_ASE 25	370,46	95,15	187,26	70,72
CYBA EE_ASE 100	444,85	105,99	266,67	55,85
COBU H_K	15,75	11,03	19,95	8,42
COBU H_ASE 25	0,00	0,00	29,65	0,00
COBU H_ASE 100	159,15	77,77	240,14	0,00
COBU EE_K	203,79	221,98	67,43	40,99
COBU EE_ASE 25	1040,32	1137,88	0,00	269,94
COBU EE_ASE 100	741,49	1360,84	0,00	132,65
CYCO H_K	802,44	0,00	371,46	0,00
CYCO H_ASE 25	64,47	13,79	8,56	0,00
CYCO H_ASE 100	1234,64	0,00	466,19	0,00
CYCO EE_K	1068,01	459,40	360,70	47,73
CYCO EE_ASE 25	1121,71	273,80	439,49	61,51
CYCO EE_ASE 100	2146,95	50,97	1009,11	0,00
FUVI H_K	116,51	17,31	217,94	6,19
FUVI H_ASE 25	141,73	7,15	229,56	4,09
FUVI H_ASE 100	2869,20	0,00	1668,59	0,00
FUVI EE_K	3242,09	300,61	199,25	289,60
FUVI EE_ASE 25	2684,56	218,98	228,14	250,83
FUVI EE_ASE 100	3482,22	199,38	848,19	110,06

* vrsta alge ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); Θ otapalo ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); Φ tretman ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Na slici 19 prikazan je utjecaj dvaju otapala (H i E-E) i dviju tehnika (ekstrakcija na sobnoj temperaturi i ASE (25 i 100 °C)) na ekstrakciju pigmenata. Generalno je najmanji udio ekstrahiranih pigmenata dobiven iz alge *Codium bursa*, a najveći iz alge *Cystoseira barbata*. Otapalo E-E je pokazalo znatno bolju ekstrakcijsku moć u odnosu na H u svim slučajevima, a što se tiče tehnike, generalno je veći postotak ekstrahiranih pigmenata postignut korištenjem ASE. Ono što je posebno zanimljivo jest sličan ili veći udio ekstrahiranih pigmenata dobiven konvencionalnom ekstrakcijom u odnosu na ASE ekstrakciju pri 25 °C upotrebom heksana. Studija Denery i sur. (2004) je također pokazala da je upotreba ASE kao metode za ekstrakciju karotenoida iz mikroalgi i makroalgi relativno ograničena. U studiji je dokazano da ASE doista zahtijeva manju količinu otapala i kraće vrijeme ekstrakcije u usporedbi s tradicionalnim

metodama ekstrakcije no udio astaksantina, β -karotena, luteina i ukupnih pigmenata je bio isti kao kod tradicionalnih metoda (Poojary, 2016). S druge strane, studija autora Cha (2010) u kojoj je ASE metode ekstrakcije karotenoida iz *C. vulgaris* optimizirana pokazuje da su β -karoten i lutein izolirani u puno većem udjelu nego što su dobiveni klasičnom Soxhlet ekstrakcijom i maceracijom. U istraživanju Poojary (2016) etanol je bio najbolji izbor otapala za ASE ekstrakciju karotenoida iz *C. vulgaris* u usporedbi s acetonom, n-heksanom i vodom. Pardilho i sur. (2019) su koristeći šest različitih otapala podvrgnuli biomasu smeđe morske alge *Saccorhiza polyschides* ekstrakciji pigmenata te se najboljim otapalom pokazao aceton, a slijedi ga metanol. Etanol je pokazao manju sposobnost ekstrakcije. Sartory i Grobbelaar (1984) su pak dobili suprotne rezultate; 90 %-tni aceton je bio puno neučinkovitiji u usporedbi s metanolom i 95 %-tnim etanolom. Nadalje, korištenjem obje vrste otapala temperatura je imala vidljiv utjecaj budući da je došlo do porasta udjela ekstrahiranih pigmenata primjenom više temperature odnosno 100 °C.

Pojedinačno gledajući (Tablica 3), značajan utjecaj na udjel klorofila *a* je imala vrsta otapala ($p=0,0058$). Taj utjecaj je posebno vidljiv iz rezultata za smeđu algu *Fucus virsoides* iz koje je konvencionalno ekstrahirana puno veća količina navedenog pigmenta korištenjem otapala E-E. Vrsta alge je također imala značajan utjecaj; najveća količina klorofila *a* određena je kod *Fucus virsoides* ($p=0,0033$), pogotovo u slučaju ASE 100_E-E (3482,22 mg kg⁻¹) a najmanji udio je imala *Cystoseira barbata* (svega 116,37 mg kg⁻¹ pri ASE 25_H). Na udio klorofila *b* značajno je utjecalo isključivo otapalo, a najveća količina ekstrahiranog pigmenta dobivena je konvencionalnom ekstrakcijom iz alge *Cystoseira compressa* sa E-E (459,40 mg kg⁻¹). Jedina vrsta pigmenata na koju je tretman signifikantno utjecao su karotenoidi, pri čemu je najviši rezultat zabilježen u ekstraktu ASE 100_H iz *F. virsoides* (1668,59 mg kg⁻¹). U nedavnoj studiji su Taucher i sur. (2016) pokazali da se upotrebom diklormetana kao otapala u ASE metodi dobivaju zamjetno veće količine karotenoida iz *H. pluvialis* u odnosu na korištenje acetona, etanola, etil acetata i n-heksana. Stoga bi se u daljnjim istraživanjima pažnja dodatno mogla posvetiti izboru otapala koje bi moglo dodatno povećati stupanj ekstrakcije karotenoida.

U istraživanju Ozgun i sur. (2015) prilikom određivanja sastava pigmenata osam smeđih algi prikupljenih u mediteranskom dijelu obale Turske kao uzorci korištene su i *Cystoseira barbata* i *Cystoseira compressa*. Ekstrakcija pigmenata je provedena upotrebom metanola. Iz rezultata tog istraživanja vidljivo je da je sastav pojedinih pigmenata vrlo sličan sastavu dobivenom u sklopu ovog istraživanja; udio klorofila *a* je kod *C. barbata* iznosio $1,056 \pm 0,20$ mg g⁻¹, a udio karotena $0,180 \pm 0,06$ mg g⁻¹. Iz tablice se može vidjeti da vrlo sličan udio

karotenoida ($0,187 \text{ mg g}^{-1}$) dobiven s EE_ASE 25. Kod *C. compressa* je udio klorofila *a* iznosio $1,297 \pm 0,35 \text{ mg g}^{-1}$ a udio karotena $0,234 \pm 0,07 \text{ mg g}^{-1}$. Iz tablice se može vidjeti da vrlo sličan udio klorofila *a* ($1,234 \text{ mg g}^{-1}$) dobiven s H_ASE 100. Što se tiče sastava pigmenata *Codium bursa*, njihov udio se povećava puno sporije porastom veličine makroalge, stoga odrasla alga sadrži manje pigmenata i hranjivih sastojaka od manjih jedinki (Geertz-Hansen i sur., 1994).

Udjel protoklorofila u uzorcima određivanim u ovom radu kretao se u rasponu od 0,00 do $289,60 \text{ mg kg}^{-1}$. Signifikantan utjecaj na ekstrakciju protoklorofila je pokazalo otapalo ($p = 0,0018$) pa je tako značajno više protoklorofila konvencionalno ekstrahirano s otapalom EE u odnosu na H što se najbolje vidi kod alge *F. virsoides*.

4.3. SASTAV MASNIH KISELINA

S obzirom da u posljednje vrijeme raste komercijalni interes za polinezasićene masne kiseline čiji je glavni izvor riblje ulje, potrebni su alternativni izvori istih, a upravo su morske alge organizmi s velikim potencijalom.

Najviše zastupljene masne kiseline (MK) u svim ispitivanim vrstama su palmitinska (C16:0), oleinska (C18:1), arahidonska (C20:4), linolna (C18:2) i linolenska (C18:3). Ostale masne kiseline koje su se nalazile u značajnim količinama kod pojedinih vrsta su: miristinska (C14:0), palmitoleinska (C16:1), eikozapentaenska (C20:5) te dokozaheksaenska (C22:6). Gotovo identične rezultate su dobili i Caf i sur. (2019) prema kojima su najzastupljenije masne kiseline dobivene iz morskih algi bile: C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4 i C22:6. Sve ispitane vrste algi su pokazale dominaciju nezasićenih masnih kiselina ($>50\%$) u odnosu na zasićene masne kiseline, pogotovo smeđa alga *C. compressa* kod koje je taj udio bio veći u usporedbi s ostalim algama, gotovo 80%.

Statističkom analizom ANOVA su razmatrani utjecaji 3 faktora (vrsta alge, otapalo i tretman) na ekstrakciju pojedinih masnih kiselina iz liofiliziranih uzoraka algi. Rezultati su pokazali da je na udio većine masnih kiselina značajno utjecala ($p \leq 0,05$) vrsta alge, a otapalo i tretman su imali signifikantan utjecaj samo u pojedinačnim slučajevima. Jedina masna kiselina na koju je značajno utjecao isključivo tip otapala i to E-E kod konvencionalne ekstrakcije jest C20:1 ($p=0,0128$), ponajviše kod alge *Cystoseira barbata*. Nadalje, izbor tretmana, vrsta alge kao i njihova kombinacija su značajno utjecali na masnu kiselinu C23:0.

Tablica 4. Udjel (%) (srednja vrijednost i standardna devijacija) pojedinačnih masnih kiselina u različitim ekstraktima alge *Cystoseira barbata* - CYBA

Masna kiselina	CYBA K_H	CYBA ASE25_H	CYBA ASE100_H	CYBA K_EE	CYBA ASE25_EE	CYBA ASE100_EE
C4:0	0.0 ± 0.0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C6:0*	0.0 ± 0.0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C8:0	0.0 ± 0.0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C10:0	0.0 ± 0.0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C11:0*	0.1 ± 0.0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C12:0*	1.8 ± 0.0	1,8 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,2
C13:0*	0.1 ± 0.0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C14:0*	5.1 ± 0.0	5,2 ± 0,0	7,4 ± 1,0	3,9 ± 0,0	4,8 ± 0,1	0,2 ± 0,0
C14:1	0.2 ± 0.0	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,5 ± 0,5
C15:0	0.5 ± 0.0	0,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,4
C15:1	0.1 ± 0.0	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1
C16:0*	25.5 ± 0.4	25,6 ± 0,0	39,5 ± 0,1	28,4 ± 0,0	24,8 ± 0,4	34,4 ± 0,3
C16:1	12.4 ± 0.1	12,5 ± 0,0	2,4 ± 0,1	6,0 ± 0,0	11,1 ± 0,2	0,4 ± 0,3
C17:0	0.3 ± 0.0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,2
C17:1*	0.1 ± 0.0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C18:0*	3.0 ± 0.1	3,1 ± 0,0	4,8 ± 0,0	1,7 ± 0,0	3,0 ± 0,0	4,2 ± 0,0
C18:1t	2.1 ± 0.2	2,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C18:1c*	17.1 ± 0.5	16,8 ± 0,0	15,5 ± 0,1	17,2 ± 0,0	12,4 ± 0,1	15,1 ± 0,2
C18:2t	0.2 ± 0.0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,9 ± 1,0	0,2 ± 0,0
C18:2c*	6.1 ± 0.0	6,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	5,0 ± 0,0	5,9 ± 0,5	7,5 ± 0,4
C18:3n6	0.3 ± 0.0	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
C18:3n3*	4.1 ± 0.1	3,9 ± 0,0	5,5 ± 0,0	4,0 ± 0,0	4,4 ± 0,7	4,8 ± 0,2
C20:0*	1.4 ± 0.2	1,1 ± 0,0	2,7 ± 0,1	1,2 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C20:1 ^o	0.4 ± 0.0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,2 ± 0,2
C20:2*	1.0 ± 0.0	0,9 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,6 ± 0,5
C20:3n6*	0.6 ± 0.0	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,9	0,8 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,3
C20:4n6*	10.1 ± 0.1	10,1 ± 0,0	5,6 ± 0,0	14,6 ± 0,0	13,0 ± 0,2	16,2 ± 0,1
C22:0*	0.4 ± 0.0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:5n3*	2.5 ± 0.0	2,7 ± 0,2	1,2 ± 0,1	3,2 ± 0,0	3,4 ± 0,1	4,4 ± 0,2
C22:1	0.4 ± 0.0	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,5 ± 0,3
C23:0* ^φ	0.0 ± 0.0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,2
C24:0	0.3 ± 0.0	0,1 ± 0,2	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,2
C24:1	0.0 ± 0.0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:6n3*	3.7 ± 0.1	3,6 ± 0,0	6,9 ± 0,1	2,2 ± 0,0	6,3 ± 0,2	7,0 ± 0,2

* vrsta alge ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^o otapalo ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^φ tretman ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Na temelju tablice 4 najzastupljenija zasićena masna kiselina smeđe alge *Cystoseira barbata* u svim slučajevima je palmitinska masna kiselina (C16:0) čiji se udio kretao od 24,8 pa sve do 39,5% prilikom korištenja heksana i ASE ekstrakcije na 100 °C. Nadalje, sljedeća najzastupljenija masna kiselina je oleinska (C18:1) (ω -9) s prosječnim udjelom od 15,7% a slijedi ju arahidonska masna kiselina (C20:4) (ω -6) u udjelu od 11,6%. Slične rezultate s najdominantnijom palmitinskom masnom kiselinom u udjelu od 40,9% i oleinskom masnom kiselinom u udjelu od 10,8% su dobili i Heiba i sur. (1997) određivanjem sastava masnih kiselina 9 različitih smeđih makroalgi među kojima i alge roda *Cystoseira* i to *Cystoseira*

trinodis. Rezultati koji su bili najbliži dobivenim vrijednostima udjela masnih kiselina *C. barbata* su dobili Akgül i sur. (2015): palmitinska MK u udjelu od 33,16%, oleinska MK 23,98%, eikozapentaenska (EPA) 12,01% te arahidonska MK 8,82%. Prema tablici 4, prosječno dobiveni udio EPA iznosi 2,9%, dok je dokozaheksaenske (DHA) dobiveno prosječno 5% (6,9% pri H_ASE 100). Usporedbom s drugim ispitivanim vrstama vidljivo je da *C. barbata* sadrži značajno ($p=0,0002$) više udjele DHA. Još jedna MK koja se našla isključivo kod *C. barbata* jest C16:1 u udjelu od 7,5% čije su prisustvo u ulju ove vrste potvrdili Caf i sur. (2019).

Tablica 5. Udjel (%) (srednja vrijednost i standardna devijacija) pojedinačnih masnih kiselina u različitim ekstraktima alge *Codium bursa* - COBU

Masna kiselina	COBU K_H	COBU ASE25_H	COBU ASE100_H	COBU K_EE	COBU ASE25_EE	COBU ASE100_EE
C4:0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,1
C6:0*	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,4 ± 1,6	1,9 ± 0,0
C8:0	0,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0
C10:0	0,3 ± 0,3	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,1
C11:0*	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,6 ± 0,1	3,3 ± 0,1
C12:0*	0,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	2,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	3,4 ± 0,4	3,1 ± 0,1
C13:0*	0,5 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,6 ± 0,0
C14:0*	2,4 ± 0,1	1,9 ± 0,0	6,0 ± 0,0	2,1 ± 0,0	10,4 ± 0,1	8,5 ± 0,2
C14:1	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	2,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	5,8 ± 0,1	4,6 ± 0,0
C15:0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,0
C15:1	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,0
C16:0*	10,1 ± 0,1	8,9 ± 0,0	22,2 ± 0,2	14,4 ± 0,0	16,0 ± 0,8	12,5 ± 0,0
C16:1	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,6 ± 0,0	2,0 ± 0,2
C17:0	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,6 ± 0,1	2,2 ± 0,3
C17:1*	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	2,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0
C18:0*	1,9 ± 0,0	1,8 ± 0,0	2,8 ± 0,0	3,5 ± 0,0	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,1
C18:1t	3,0 ± 0,0	2,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0
C18:1c*	45,7 ± 0,3	52,1 ± 0,0	24,2 ± 0,2	24,2 ± 0,0	20,5 ± 0,4	13,6 ± 0,2
C18:2t	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,1 ± 0,0
C18:2c*	14,5 ± 0,1	18,5 ± 0,0	11,5 ± 0,1	35,4 ± 0,0	10,6 ± 0,3	4,1 ± 0,0
C18:3n6	0,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,1 ± 0,0	2,0 ± 0,0
C18:3n3*	6,9 ± 0,2	6,9 ± 0,0	5,8 ± 0,0	8,3 ± 0,0	6,7 ± 0,1	4,0 ± 0,1
C20:0*	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:1 ^o	0,6 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:2*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:3n6*	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:4n6*	3,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:0*	1,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	4,0 ± 0,0	0,3 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:5n3*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,0 ± 0,0
C23:0* ^φ	3,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0	11,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	6,1 ± 0,1	20,0 ± 0,4
C24:0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C24:1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:6n3*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

* vrsta alge ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^o otapalo ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^φ tretman ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Heksanski ekstrakti (K i ASE 25) jedine zelene makroalge korištene u istraživanju, *Codium bursa*, su pokazali da je ona bogat izvor oleinske masne kiseline pogotovo u uzorku ASE 25 u kojem je prisutna u udjelu od 52,1% (Tablica 5). Prosječno gledano, udio oleinske MK iznosi 30% što je u skladu s rezultatima istraživanja Jerković i sur. (2019) kod kojih se kao najzastupljenija masna kiselina *Codium bursa* pokazala oleinska masna kiselina (36,53%), a slijede ju palmitinska (25,44%) te linolna (11,62%) masna kiselina. Još jedno istraživanje Milović i sur. (2017) je potvrdilo dobivene rezultate; palmitinska MK 32,07%, oleinska MK 21,23%, linolna MK 15,32% te linolenska (ω -3) MK u udjelu od 9,72%.

Tretman, vrsta alge kao i njihova kombinacija su pokazali signifikantan utjecaj na MK C23:0 pa se tako može vidjeti da je najveći postotak C23:0 dobiven iz *C. bursa* na ASE 100_E-E u iznosu od 20%. Prosječni udio C23:0 iznosi 7,2% što je ujedno i najveći udio te masne kiseline u usporedbi s ostalim algama.

Iako je istog roda *Codium*, *Codium fragile* sadržava drugačiji sastav masnih kiselina u odnosu na *C. bursa*. Masna kiselina koja prevladava kod *C. fragile* je palmitinska u udjelu od 49,15% a nakon nje oleinska MK u udjelu od 16,80% iz čega se može zaključiti da je sastav masnih kiselina karakterističan za pojedinu vrstu, ali ne i rod morske alge (Akgül i sur. 2015).

Tablica 6. Udjel (srednja vrijednost i standardna devijacija) pojedinačnih masnih kiselina u različitim ekstraktima alge *Cystoseira compressa* - CYCO

Masna kiselina	CYCO K_H	CYCO ASE25_H	CYCO ASE100_H	CYCO K_EE	CYCO ASE25_EE	CYCO ASE100_EE
C4:0	0,6 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C6:0*	0,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C8:0	2,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,4 ± 0,0	0,7 ± 0,0
C10:0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	2,0 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C11:0*	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,2	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0
C12:0*	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C13:0*	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C14:0*	2,5 ± 0,0	1,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C14:1	0,8 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C15:0	0,3 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0
C15:1	0,2 ± 0,0	1,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C16:0*	11,1 ± 0,0	11,2 ± 0,5	12,7 ± 0,1	11,8 ± 0,1	11,6 ± 0,0	13,2 ± 0,0
C16:1	1,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,1 ± 0,0	2,9 ± 0,0	3,3 ± 0,0	1,2 ± 0,0
C17:0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0
C17:1*	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,0	0,2 ± 0,2
C18:0*	2,6 ± 0,1	1,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,0 ± 0,9
C18:1t	1,9 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,2
C18:1c*	37,2 ± 0,0	15,7 ± 0,2	18,5 ± 0,2	18,0 ± 0,1	15,3 ± 0,2	17,4 ± 0,0
C18:2t	1,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,3	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,0
C18:2c*	16,8 ± 0,2	21,9 ± 0,5	13,9 ± 0,1	14,4 ± 0,1	10,8 ± 0,1	11,3 ± 0,1
C18:3n6	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,0	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,6	0,8 ± 0,1
C18:3n3*	4,5 ± 0,0	14,5 ± 0,5	9,4 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,8 ± 0,2	7,2 ± 0,1

C20:0*	0,8 ± 0,0	0,6 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,6 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,0
C20:1^θ	0,6 ± 0,0	0,8 ± 0,5	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C20:2*	0,6 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,0
C20:3n6*	0,6 ± 0,0	1,4 ± 2,0	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	2,8 ± 0,0
C20:4n6*	5,8 ± 0,1	6,3 ± 0,2	25,7 ± 0,3	22,4 ± 0,2	20,4 ± 0,8	25,4 ± 0,0
C22:0*	0,3 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C20:5n3*	2,1 ± 0,0	10,2 ± 0,3	7,9 ± 0,0	7,6 ± 0,1	6,9 ± 0,0	8,3 ± 0,1
C22:1	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,0	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	1,7 ± 0,0	1,3 ± 0,1
C23:0*^φ	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,5 ± 0,4	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,7
C24:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C24:1	0,0 ± 0,0	1,2 ± 0,2	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,2
C22:6n3*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

* vrsta alge ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^θ otapalo ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^φ tretman ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Najzastupljenija masna kiselina alge *Cystoseira compressa* (Tablica 6) s prosječnim udjelom od 20,4% je oleinska koja je u najvećoj količini dobivena klasičnom ekstrakcijom uz heksan. U odnosu na ostale ispitivane makroalge, *C. compressa* sadrži najveći prosječni udio arahidonske (17,7%), linolenske (ω -3) (8,7%) i eikozapentaenske masne kiseline (7,2%). Što se tiče pojedinih slučajeva, najviše arahidonske MK je dobiveno s ASE 100 primjenom heksana (25,7%), a linolenske i eikozapentaenske s ASE 25 primjenom heksana (14,5% odnosno 10,2%). Kao i kod ostalih algi, u visokim udjelima su identificirane palmitinska i linolna MK.

Eikozapentaenska masna kiselina je posebno važna zbog svojih dokazanih zdravstvenih benefita pa je tako još jedna alga roda *Cystoseira* pokazala zadovoljavajući udio te masne kiseline. Riječ je o algi *Cystoseira humilis* koja, prema istraživanju Belattmania i sur. (2016) sadrži 11,79% eikozapentaenske masne kiseline. Arahidonska masna kiselina je bila najzastupljenija polinezasićena masna kiselina (18,1%). Sastav ostalih masnih kiselina je vrlo sličan sastavu alge *C. compressa* no ona masna kiselina koja se nalazila u većem udjelu od gotovo 30% je palmitinska.

Tablica 7. Udjel (srednja vrijednost i standardna devijacija) pojedinačnih masnih kiselina u različitim ekstraktima alge *Fucus virsoides* - FUVI

Masna kiselina	FUVI K_H	FUVI ASE25_H	FUVI ASE100_H	FUVI K_EE	FUVI ASE25_EE	FUVI ASE100_EE
C4:0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C6:0*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C8:0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C10:0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C11:0*	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C12:0*	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C13:0*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C14:0*	13,1 ± 0,1	17,7 ± 0,0	18,0 ± 0,0	15,2 ± 0,1	13,8 ± 0,2	13,8 ± 0,1
C14:1	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0
C15:0	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C15:1	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C16:0*	9,5 ± 0,0	16,3 ± 0,0	16,8 ± 0,0	12,6 ± 0,0	9,3 ± 0,0	9,2 ± 0,0
C16:1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C17:0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C17:1*	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1
C18:0*	1,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,0	1,5 ± 0,0
C18:1t	0,4 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,1
C18:1c*	52,0 ± 0,0	16,3 ± 0,0	16,8 ± 0,0	42,7 ± 0,0	50,9 ± 0,1	51,4 ± 0,2
C18:2t	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,3
C18:2c*	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,1
C18:3n6	0,1 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
C18:3n3*	2,9 ± 0,0	5,4 ± 0,0	7,7 ± 0,0	4,3 ± 0,0	2,6 ± 0,0	2,6 ± 0,0
C20:0*	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,4	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,6 ± 0,0
C20:1 ^o	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
C20:2*	0,8 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,9 ± 0,0
C20:3n6*	2,0 ± 0,0	5,2 ± 0,0	4,7 ± 0,0	2,5 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0
C20:4n6*	12,5 ± 0,0	24,0 ± 0,0	20,9 ± 0,0	12,0 ± 0,0	13,2 ± 0,1	13,3 ± 0,0
C22:0*	1,8 ± 0,0	6,4 ± 0,0	9,1 ± 0,0	4,0 ± 0,0	1,9 ± 0,0	1,9 ± 0,0
C20:5n3*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:1	0,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0
C23:0* ^φ	0,4 ± 0,0	1,9 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,4 ± 0,0
C24:0	0,1 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,4 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
C24:1	0,1 ± 0,0	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,0 ± 0,0
C22:6n3*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

* vrsta alge ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^o otapalo ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$); ^φ tretman ima statistički značajan utjecaj ($p \leq 0,05$)

Iz tablice 7 se može vidjeti da je najzastupljenija MK alge *Fucus virsoides* oleinska i to u viskom udjelu od čak 52% u konvencionalno dobivenom heksanskom ekstraktu. Najbogatiji izvor oleinske kiseline u usporedbi s ostalim ispitivanim vrstama je *F. virsoides*, a njen prosječan udio iznosi 38,3%. Druga po zastupljenosti MK je C20:4 s prosječnim udjelom od 16%. Sljedeća, ujedno i očekivana MK je C16:0 s najvećim udjelom od 16,8% u heksanskom ekstraktu kod ASE 100. Zanimljivo je da je kod gotovo svake ispitivane makroalge najveća vrijednost C16:0 dobivena upravo korištenjem heksana. Istraživanje Najdek i sur. (2014) u kojem je određivan utjecaj podloge na sastav masnih kiselina smeđe alge *Fucus virsoides* u sjevernom dijelu Jadranskog mora je isto tako pokazalo da su dominantne masne kiseline

C14:0, C16:0, C18:1 (n-9) i C20:4 (n-3). Iz rezultata ovog istraživanja vidljivo je da je miristinska MK C14:0 zastupljena u visokom udjelu jedino kod makroalge *Fucus virsoides*. To potvrđuje i rad Khotimchenka (1998) u kojem se navodi da među smeđim algama, porodicu *Fucaceae* karakterizira najveći udio C14:0 kao i najmanje količine n-3 masnih kiselina. Taksonomsko, vrlo bitno, svojstvo porodice *Fucaceae* i roda *Fucus* jest dominacija n-6 nezasićenih masnih kiselina nad n-3 nezasićenim masnim kiselinama. Glavna nezasićena masna kiselina *Fucus virsoides* je oleinska kiselina, ujedno čini najveći udio masnih kiselina u svim smeđim algama.

Usporedbom profila masnih kiselina *Fucus vesiculosus* koji su dobiveni primjenom različitih otapala je uočeno da se razlikuju ovisno o korištenom otapalu a najveći udio masnih kiselina je dobiven sa etil acetatom, etanolom i acetonom dok se upotrebom heksana dobila nešto manja količina istih (Otero i sur., 2018). Shodno tome, pomno odabranim otapalom trebala bi se ciljano ekstrahirati veća količina masnih kiselina od interesa. U ovom slučaju na samo iskorištenje otapalo niti tretman generalno nisu imali značajan utjecaj već samo vrsta alge što se posebno može vidjeti kod masne kiseline C14:0 koja se nalazi u zamjetno većem udjelu (prosječno 15,3%) u odnosu na ostale ispitivane vrste ($p=0,0001$).

Omjer omega 6 i omega 3 masnih kiselina ($\omega-6/\omega-3$) je često korišteni indeks kada je riječ o zdravoj prehrani te daje informaciju o kvaliteti lipida (Schmid i Stengel, 2015; Otero i sur., 2018). Svjetska zdravstvena organizacija SZO (eng. World Health Organization, WHO) preporučuje da omjer $\omega-6/\omega-3$ u ljudskoj prehrani ne smije biti veći od 10, a smanjenje omjera je ključno za prevenciju bolesti srca kao i rizika od nastajanja raka (WHO, 2003; Panayotova i sur., 2017). Napovoljniji omjer $\omega-6/\omega-3$ od četiri ispitivane alge pokazala je smeđa alga *Cystoseira barbata* koji je u prosjeku iznosio 1,46. Iako su sve četiri vrste su imale zadovoljavajuće prosječne vrijednosti $\omega-6/\omega-3$ manje od 10: *Cystoseira compressa* (2,21), *Codium bursa* (2,72) ovaj omjer je bio nešto veći kod *Fucus virsoides* (4,56). Uzimajući u obzir prosječne vrijednosti udjela pojedinih masnih kiselina dobivenih različitim tretmanima i otapalima pri različitim temperaturama, ispitivana alga *Fucus virsoides* je doista pokazala višestruko više n-6 masnih kiselina u odnosu na n-3 masne kiseline.

4.4. SASTAV STEROLA

Zahvaljujući razvoju moderne analitičke tehnike, steroli se mogu identificirati iz jako malih uzoraka algi. Steroli algi su vrlo važni prilikom određivanja podrijetla morskog sedimenta, u taksonomiji, ali i kod zadovoljavanja prehrambenih potreba nekih morskih organizama za sterolima (Patterson i Nes, 1991). Sastav sterola je svojstven za svaku vrstu alge stoga dokazuje i njihovu međusobnu različitost. U ovom istraživanju su heksanski ekstrakti s najvećim udjelom ulja podvrgnuti analizi sterola.

Tablica 8. Udio (mg kg^{-1}) (srednja vrijednost i standardna devijacija) pojedinačnih sterola u heksanskim ekstraktima algi izražen na liofiliziranu masu alge*

Sterol (mg kg^{-1})	CYBA	COBU	CYCO	FUVI
Kolesterol	3,88 $\pm$ 0,10	1,75 $\pm$ 0,03	1,51 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,01
Brasikasterol	62,99 $\pm$ 0,21	1,29 $\pm$ 0,00	1,17 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,01
Kampesterol	20,36 $\pm$ 0,31	3,60 $\pm$ 0,04	6,72 $\pm$ 0,02	3,46 $\pm$ 0,04
Kampestanol	57,84 $\pm$ 0,25	1,37 $\pm$ 0,20	2,13 $\pm$ 0,11	1,72 $\pm$ 0,03
Stigmasterol	20,52 $\pm$ 0,50	23,90 $\pm$ 0,28	0,55 $\pm$ 0,03	0,00 $\pm$ 0,00
Sitosterol	53,93 $\pm$ 0,53	215,91 $\pm$ 0,13	11,99 $\pm$ 0,57	2,76 $\pm$ 0,07
Fucosterol	681,86 $\pm$ 0,21	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	119,00 $\pm$ 0,34
Izofukosterol	18,28 $\pm$ 0,18	0,93 $\pm$ 0,06	0,00 $\pm$ 0,00	4,51 $\pm$ 0,17

* CYBA - *Cystoseira barbata*, COBU - *Codium bursa*, CYCO - *Cystoseira compressa*, FUVI - *Fucus virsoides*

U evolucijski naprednijim, smeđim (*Phaeophyceae*) i zelenim algama (*Chlorophyceae*), glavni steroli su produkti metilacije 24-metilen kolesterola: fukosterol ((E)-stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol) i izofukosterol ((Z)- stigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol), dok je u naprednim zelenim algama reducirana dvostruka veza $\Delta^{24(28)}$ što dovodi do nakupljanja sitosterola ((24R)-stigmast-5-en-3 β -ol) (Kapetanović i sur., 2005). Upravo je takav slučaj kod ispitivane zelene alge *Codium bursa* kod koje se najveći udio ukupnih sterola odnosi na prisustvo sitosterola od 87% (215,91 mg kg^{-1}) a sljedeći po zastupljenosti je stigmasterol (10%) (Tablica 8). Za zelene makroalge je karakteristično da sastav sterola varira unutar redova pa čak i unutar porodica (Aknin i sur., 1992; Kapetanović i sur., 2005). Primjerice, kod alge *Codium dichotomum* roda *Codium* je samo jedan sterol identificiran pomoću plinske kromatografije i NMR spektroskopijom a to je klerosterol ((24R)-stigmasta-5,25-dien-3 β -ol) karakterističan za taj rod iako je u nekim slučajevima u znatnoj količini prisutan i kodisterol (ergosta-5,25-dien-3 β -ol).

Što se tiče sastava sterola smeđih makroalgi, rezultati istraživanja smeđe alge *Cystoseira adriatica*, za koju neki autori smatraju da je podvrsta makroalge *Cystoseira compressa* su pokazali da su glavni identificirani steroli kolesterol (40%) i sitosterol (30%) a fukosterol je pronađen u puno manjoj količini, svega 5% (Kapetanović i sur., 2005). Kod ispitivane *C. compressa*, rezultati se ipak razlikuju po udjelu identificiranog kolesterola (svega 6%), sitosterola (50%), a fukosterol nije detektiran. Među glavnim predstavnicima fitosterola, kod ove vrste kampesterol se našao u udjelu od gotovo 30% ukupnih sterola. Nadalje, *Cystoseira barbata* se pokazala kao najbogatiji izvor široke palete sterola sa dominantnim fukosterolom (74%), a sljedeći zastupljeni u približno jednakim udjelima <10% su brasikasterol, kampestanol i sitosterol. Isto tako, makroalga *F. virsoides* se pokazala kao bogat izvor fukosterola u udjelu od čak 90% ukupnih sterola što je u skladu sa istraživanjem Kapetanović i sur. (2005) koji su u *Fucus virsoides* pronašli samo jedan sterol i to fukosterol (92% ukupnih sterola) koji je, kao što je već i navedeno karakterističan za smeđe makroalge ali i za rod *Fucus* te se kreće u rasponu od 78% do čak 100%.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata doneseni su sljedeći zaključci:

1. Najveći udio ekstrahiranog ulja dobiven je kod smeđih algi *C. barbata* (1,14%) i *F. virsoides* (1,19%) konvencionalnom metodom ekstrakcije uz korištenje heksana. Na udio ekstrahiranog ulja statistički značajan utjecaj imali su tretman i vrsta alge. Konvencionalnom metodom ekstrakcije je kod gotovo sve četiri vrste alge ekstrahirana najveća količina ulja.
2. Najveći udio pigmenata je kod svih vrsta ekstrahiran sa ASE 100 primjenom otapala E-E gdje je vidljiv jasan utjecaj temperature, otapala kao i tretmana na stupanj ekstrakcije. Rod *Cystoseira* je dao najveću količinu pigmenata kod spomenutih uvjeta.
3. Kao najzastupljenije masne kiseline su se pokazale palmitinska, oleinska, arahidonska, linolna i linolenska. Na najveći broj masnih kiselina signifikantnost je pokazala vrsta alge osim kod C20:1 na koju je značajno utjecalo otapalo i C23:0 na koju su utjecali tretman i vrsta alge. Omjer $\omega 6/\omega 3$ je kod sve četiri ispitivane vrste bio zadovoljavajući te se kretao od 1,46 u slučaju *C. barbata* do 4,56 u slučaju *F. virsoides*.
4. Korištenje otapala E-E je značajno utjecalo kod konvencionalne ekstrakcije na udio klorofila *a* i protoklorofila kod alge *F. virsoides* te na udio klorofila *b* kod alge *C. compressa*. Najveći stupanj ekstrakcije karotenoida postignut je primjenom tretmana ASE 100 kod svih algi, posebno kod alge *F. virsoides* uz otapalo heksan.
5. Kod *C. barbata* je identificirana najšira paleta sterola u visokim udjelima a najzastupljeniji sterol je fukosterol sa 681,86 mg na liofiliziranu masu alge. Fukosterol je činio i 90% ukupnih sterola kod *F. virsoides* a izrazito velika količina sitosterola je identificirana kod *C. bursa*, 215,91 mg kg⁻¹.

6. LITERATURA

Akgül, R., Kizilkaya, B., Akgül, F. i Erduğan, H. (2015) Total lipid and fatty acid composition of twelve algae from Canakkale (Turkey).

Aknin, M., Moellet-Nzaou, R., Kornprobst, J. M., Gaydou, E. M., Samb, A., i Miralles, J. (1992) Sterol composition of twelve Chlorophyceae from the Senegalese coast and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, **31**(12), 4167-4169.

Anderson, J. M. i Boardman, N. K. (1964) Studies on the greening of dark-grown bean plants II. Development of photochemical activity. *Australian Journal of Biological Sciences*, **17**(1), 93-101.

Anonymous 1 (2016) *Fucus virsoides*, <http://zastitamora.net/> Pristupljeno 15. lipnja 2019.

Anonymous 2 (2019) *Cystoseira barbata*, <https://radiojadran.com/> Pristupljeno 15. lipnja 2019.

Anonymous 3 (2016) *Cystoseira compressa*, <https://doris.ffessm.fr/> Pristupljeno 18. lipnja 2019.

Anonymous 4 (2016) *Codium bursa*, <http://zastitamora.net/> Pristupljeno 20. lipnja 2019.

Anonymous 5 (2018) *Pseudolithophyllum expansum*, <https://www.wikipedia.org/> Pristupljeno 13. srpnja 2019.

Anonymous 6 (2004) *Vidalia volubilis*, <http://www.plingfactory.de> Pristupljeno 13. srpnja 2019.

Abdul, Q. A., Choi, R. J., Jung, H. A. i Choi, J. S. (2016) Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**(6), 1856-1866.

Ahmad, F. B., Zhang, Z., Doherty, W. O. i O'Hara, I. A. N. M. (2018) Optimising extraction of microalgal oil using accelerated solvent extraction by response surface methodology. *Journal of Engineering Science and Technology*, **13**(4), 964-976.

Balasubramanian, R. K., Doan, T. T. Y. i Obbard, J. P. (2013) Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, **215**, 929-936.

Barbosa, M., Valentão, P. i Andrade, P. (2014) Bioactive compounds from macroalgae in the new millennium: implications for neurodegenerative diseases. *Marine drugs*, **12**(9), 4934-4972.

- Belattmania, Z., Engelen, A. H., Pereira, H., Serrão, E. A., Barakate, M., Elatouani, S., Zrid, R., Bentiss, F., Chahboun, N., Reani, A., Sabour, B. (2016) Potential uses of the brown seaweed *Cystoseira humilis* biomass: 2-Fatty acid composition, antioxidant and antibacterial activities. *J. Mater. Environ. Sci*, **7**(6), 2074–2081.
- Bhadury, P. i Wright, P. C. (2004) Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling applications. *Planta*, **219**(4), 561-578.
- Bold, H. C. i Wynne, M. J. (1985) Introduction to the algae: structure and reproduction, 2.izd., Englewood Cliffs, N.J., Prentice-Hall.
- Bosotin, M. (2016) Utjecaj kultivara na sterole sojinog ulja, završni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
- Bouck, G. B. i Morgan, E. (1957) The occurrence of *Codium* in Long Island waters. *Bull. Torrey Bot. Club* **84** (5), 384-387.
- Caf, F., Özdemir, N. Ş., Yılmaz, Ö., Durucan, F. i Ak, İ. (2019) Fatty acid and lipophilic vitamin composition of seaweeds from Antalya and Çanakkale (Turkey). *Grasas y Aceites*, **70**(3), 312.
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Mendiola, J. A., Suárez-Alvarez, S., Cifuentes, A. i Ibáñez, E. (2013) Extraction of new bioactives from *neochloris oleoabundans* using pressurized technologies and food grade solvents. Caragena
- Cha, K.H., Lee, H.J., Koo, S.Y., Song, D.G., Lee, D.U. i Pan, C.H. (2010) Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *chlorella vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **58**, 793–797.
- Chow, C. K. (2007) Fatty acids in foods and their health implications, 3.izd., Food Science & Technology, CRC press, str. 1-10.
- Dean, J. R. (2010) Extraction techniques in analytical sciences (Vol. 34). John Wiley & Sons. The Graduate School and School of Applied Sciences. Northumbria University, Newcastle, UK, str. 144-146.
- Denery, J.R., Dragull, K., Tang, C. i Li, Q.X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta*, **501**, 175–181

Dominguez, H. (2013) Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals. Elsevier, Woodhead Publishing, str. 209-217.

Dos Santos, M. A. Z., de Freitas, S. C., Berneira, L. M., Mansilla, A., Astorga-España, M. S., Colepicolo, P. i de Pereira, C. M. P. (2019) Pigment concentration, photosynthetic performance, and fatty acid profile of sub-Antarctic brown macroalgae in different phases of development from the Magellan Region, Chile. *Journal of Applied Phycology*, 1–14.

Dufourc, E. J. (2008) Sterols and membrane dynamics. *Journal of chemical biology*, **1**(1-4), 63-77.

Ellis, R. J. i Timson, C. (1980) The absence of protochlorophyll (ide) accumulation in algae with inhibited chlorophyll synthesis. *Plant physiology*, **65**(3), 469-471.

Falace, A., E, Z., & G, B. (2005) Morphological and reproductive phenology of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff i Nizzamuddin (Fucales, Fucophyceae) in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Annales*, 15, 71–78.

Galasso, C., Corinaldesi, C. i Sansone, C. (2017) Carotenoids from marine organisms: Biological functions and industrial applications. *Antioxidants*, **6**(4), 96.

Geertz-Hansen, O., Enríquez, S., Duarte, C. M., Agustí, S., Vaqué, D., i Vidondo, B. (1994) Functional implications of the form of *Codium bursa*, a balloon-like Mediterranean macroalga.

Giergielewicz-Możajska, H., Dąbrowski, Ł. i Namieśnik, J. (2001) Accelerated solvent extraction (ASE) in the analysis of environmental solid samples-some aspects of theory and practice. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **31**(3), 149-165.

Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F. i Andrade, P. (2015) Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. *Marine Drugs*, **13**(5), 3182-3230.

Haryatfrehni, R., Dewi, S. C., Meilianda, A., Rahmawati, S. i Sari, I. Z. R. (2015) Preliminary study the potency of macroalgae in yogyakarta: extraction and analysis of algal pigments from common gunungkidul seaweeds. *Procedia Chemistry*, **14**, 373-380.

Heiba, H. I., Al-Easa, H. S. i Rizk, A. F. M. (1997) Fatty acid composition of twelve algae from the coastal zones of Qatar. *Plant Foods for Human Nutrition*, **51**(1), 27-34.

Hosikian, A., Lim, S., Halim, R. i Danquah, M. K. (2010) Chlorophyll extraction from microalgae: a review on the process engineering aspects. *International journal of chemical engineering*, **2010**.

HR EN ISO 12228:2004, Životinjske i biljne masti i ulja-Određivanje količine pojedinačnih i ukupnih sterola-Metoda plinske kromatografije.

ISO 12966-2:2017, Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl esters.

ISO 12966-4:2015, Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl esters.

Jerković, I., Kranjac, M., Marijanović, Z., Šarkanj, B., Cikoš, A. M., Aladić, K., Pedisić, S i Jokić, S. (2019) Chemical Diversity of *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh Headspace Compounds, Volatiles, Fatty Acids and Insight into Its Antifungal Activity. *Molecules*, **24**(5), 842.

Kapetanović, R., Sladić, D., Popov, S., Zlatović, M., Kljajic, Z., i Gasic, M. J. (2005) Sterol composition of the Adriatic sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **70**(12), 1395-1400.

Khotimchenko, S. V. (1998) Fatty acids of brown algae from the Russian Far East. *Phytochemistry*, **49**(8), 2363-2369.

Kim, S. K. (2012) Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology. John Wiley & Sons. Pukyong National University, str. 15-37.

Kosanić, M., Ranković, B. i Stanojković, T. (2015) Biological potential of marine macroalgae of the genus *Cystoseira*. *Acta Biologica Hungarica*, **66**(4), 374-384.

Khotimchenko, S. V. (2005) Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. *Chemistry of Natural Compounds*, **41**(3), 285-288.

Lee, R. E. (2008) Phycology, 4. izd., Cambridge University Press, Cambridge, str. 3, 180, 429

Lichtenthaler, H. K. I Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, **1**(1), F4-3.

- Lin, J. H., Liu, L. Y., Yang, M. H. i Lee, M. H. (2004). Ethyl acetate/ethyl alcohol mixtures as an alternative to Folch reagent for extracting animal lipids. *Journal of agricultural and food chemistry*, **52**(16), 4984-4986.
- Linardić, J. (1949) Studije o jadranskom fukusu (*Fucus virsoides*). *Acta Botanica Croatica*, **12**(1), 7-131.
- Lobban, C. S. i Harrison, P. J. (1997) Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press, str. 144-150
- Lopes, G. (2014) Seaweeds from the Portuguese coast: Chemistry, antimicrobial and anti-inflammatory capacity.
- Lopes, G., Sousa, C., Bernardo, J., Andrade, P. B., Valentão, P., Ferreres, F., i Mouga, T. (2011) Sterol profiles in 18 macroalgae of the Portuguese coast 1. *Journal of phycology*, **47**(5), 1210-1218.
- Lordan, S., Ross, R. P. i Stanton, C. (2011) Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine drugs*, **9**(6), 1056-1100.
- Mačić, V. i Antolić, B. (2015) Distribution of rare *Cystoseira* species along the Montenegro coast (South-Eastern Adriatic Sea). *Periodicum biologorum*, **117**(3), 441-447.
- Milchakova, N. (2011) Marine plants of the Black Sea. An illustrated field guide. Sevastopol, DigitPrint, str. 62-64
- Milović, S., Kundaković, T., Mačić, V., Stanković, J. A., Grozdanić, N., Đuričić, I., Stanković, I. i Stanojković, T. (2017) Anti α -glucosidase, antitumour, antioxidative, antimicrobial activity, nutritive and health protective potential of some seaweeds from the adriatic coast of montenegro. *Farmacia*, **65**(5), 731-740.
- Mysliwa-Kurdziel, B., Kruk, J. i Strzałka, K. (2013) Protochlorophyllide and protochlorophyll in model membranes—An influence of hydrophobic side chain moiety. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1828**(3), 1075-1082.
- Najdek, M., Iveša, L., Paliaga, P., Blažina, M., i Čelig, A. (2014) Changes in the fatty acid composition of *Fucus virsoides* J. Agardh in response to the type of substratum. *Acta Adriat*, **55**, 19-30.

Nes, W.D. i Parish, E.J. (1989) Analysis of Sterols and Other Biologically Significant Steroids, Academic Press, New York.

Nygård, C. A. i Dring, M. J. (2008) Influence of salinity, temperature, dissolved inorganic carbon and nutrient concentration on the photosynthesis and growth of *Fucus vesiculosus* from the Baltic and Irish Seas. *European Journal of Phycology*, **43**(3), 253-262.

Orlando-Bonaca, M., i Rotter, A. (2018) Any signs of replacement of canopy-forming algae by turf-forming algae in the northern Adriatic Sea?. *Ecological indicators*, **87**, 272-284.

Otero, P., Quintana, S., Reglero, G., Fornari, T., i García-Risco, M. (2018) Pressurized liquid extraction (PLE) as an innovative green technology for the effective enrichment of galician algae extracts with high quality fatty acids and antimicrobial and antioxidant properties. *Marine drugs*, **16**(5), 156.

Oucif, H., Miranda, J. M., Mehidi, S. A., Abi-Ayad, S. M. E. A., Barros-Velázquez, J. i Aubourg, S. P. (2018) Effectiveness of a combined ethanol–aqueous extract of alga *Cystoseira compressa* for the quality enhancement of a chilled fatty fish species. *European Food Research and Technology*, **244**(2), 291-299.

Ozgun, S., Turan, F., Çinar, M. E., Bakir, K., Öztürk, B., Katağan, T. i Bakır, B. B. (2015) Biochemical composition of some brown algae from Iskenderun Bay, the northeastern Mediterranean coast of Turkey. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, **21**(2), 125-134.

Panayotova, V., Merzdhanova, A., Dobрева, D. A., Zlatanov, M. i Makedonski, L. (2017) Lipids of Black Sea algae: unveiling their potential for pharmaceutical and cosmetic applications. *Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers*, **23**(4), 1747-1751.

Pardilhó, S. L., Almeida, M. F., Dias, J. M., Machado, S., Bessada, S. M. F. i Oliveira, M. (2019) Extraction of natural pigments from marine macroalgae waste. *Wastes: Solutions, Treatments and Opportunities III: Selected Papers from the 5th International Conference Wastes 2019*, Lisbon, Portugal, 181. CRC Press.

Patterson, G. W. i Nes, W. D. (1991) Physiology and biochemistry of sterols-American Oil Chemists' Society, Champaign, Illinois, str. 148.

Pereira, L. (2016) Edible seaweeds of the world. CRC Press, str. 38.

- Pina-Pérez, M. C., Rivas, A., Martínez, A., i Rodrigo, D. (2017) Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, **235**, 34-44.
- Poojary, M., Barba, F., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. i Juliano, P. (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Marine Drugs*, **14**(11), 214.
- Prvan, M., Berković, B., Jakl, Z., Žuljević, A., Bitunjac, I., Plepel, I., Dragičević, B., Pleslić G., Holcer, D. (2016) Handbook for Marine protection and identification of Adriatic Marine Species.
- Rajapakse, N. i Kim, S. K. (2011) Nutritional and digestive health benefits of seaweed. In *Advances in food and nutrition research* **64**, 17–28. Elsevier.
- Richter, B. E., Jones, B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., i Pohl, C. (1996) Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, **68**(6), 1033-1039.
- Rusconi, G. (2010). *Codium bursa*, <https://www.sealifebase.ca> Pristupljeno 19. srpnja 2019.
- Sartory, D. P. i Grobbelaar, J. U. (1984) Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. *Hydrobiologia*, **114**(3), 177-187.
- Schmid, M. i Stengel, D. B. (2015) Intra-thallus differentiation of fatty acid and pigment profiles in some temperate Fucales and Laminariales. *Journal of phycology*, **51**(1), 25-36.
- Smith, D. M., i Allen, S. J. (1955) *Cryptogamic botany. Bryophytes and Pteridophytes*, McGraw-Hill Publications in the Botanical Sciences. Citeseer.
- Stengel, D. B. i Connan, S. (2015) *Natural products from marine algae: methods and protocols*. Humana Press, New York, str. 2-18.
- Sudhakar, K., Mamat, R., Samykano, M., Azmi, W. H., Ishak, W. F. W., & Yusaf, T. (2018). An overview of marine macroalgae as bioresource. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **91**, 165-179.
- Škevin, D. (2016) *Kemija i tehnologija ulja i masti*, interna skripta, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb
- Šolić, M. (2005) *Ekologija mora*, interna skripta, Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split

Taucher, J., Baer, S., Schwerna, P., Hofmann, D., Hümmer, M., Buchholz, R., Becker, A. (2016). Cell disruption and pressurized liquid extraction of carotenoids from microalgae. *Thermodyn. Catal.* **7**, 1–7.

Trease, G.E. i Evaness, W.C. (1996) *Pharmacognosy*, 14. izd., W.B Saunders Company Ltd., London, Philadelphia, Toronto, Sydney, Tokyo, str. 18–27.

Vizetto-Duarte, C., Custódio, L., Barreira, L., da Silva, M. M., Rauter, A. P., Albericio, F. i Varela, J. (2016) Proximate biochemical composition and mineral content of edible species from the genus *Cystoseira* in Portugal. *Botanica marina*, **59**(4), 251-257.

World Health Organization (2003) Population nutrient intake goals for preventing diet-related chronic diseases. In *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases; Report of a Joint WHO/FAO Expert Consult*; Geneva, Switzerland

Yang, H., Comstock, K., Lopez, L. (2014) Comparison of Soxhlet and accelerated solvent extraction for leachable and extractable analysis of packing material. Thermo Scientific Application Note, **1108**, 1-9.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Daniela Gritbović

Ime i prezime studenta