

Optimiranje mikrovalovima potpomognute ekstrakcije polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata*

Vrančić, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:159:893320>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2021.

Ema Vrančić

1285/USH

OPTIMIRANJE
MIKROVALOVIMA
POTPOMOGNUTE EKSTRAKCIJE
POLISAHARIDA IZ SMEĐE ALGE
Cystoseira barbata

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

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanom povjerenju, suradnji i uloženom vremenu. Posebno se zahvaljujem mag.ing. Ani Dobrinčić na prenesenom znanju, velikoj podršci i pomoći koju mi je pružila te strpljenju i dostupnosti tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na vjeri u mene te velikom strpljenju i potpori koju su mi pružili. Hvala Franku te svim prijateljima i kolegama koji su mi bili oslonac tijekom studiranja i pružali mi podršku.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

OPTIMIRANJE MIKROVALOVIMA POTPOMOŠNE EKSTRAKCIJE POLISAHARIDA IZ SMEĐE ALGE *Cystoseira barbata*

Ema Vrančić, 1285/USH

Sažetak: Morske alge bogat su izvor biološki aktivnih spojeva i to posebno sulfatiranih polisaharida, koji pokazuju antiviralna, antitumorska i antioksidativna svojstva. Cilj rada bio je optimirati mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata*. Mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija provedena je pri temperaturama 40, 60 i 80 °C te vremenu ekstrakcije 10, 15 i 20 min, dok je konvencionalna ekstrakcija provedena pri 80 °C kroz 3 h. U obje metode, kao ekstrakcijsko otapalo su korištene destilirana voda i 0,1 M HCl. Utvrđen je utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze. Konvencionalnom ekstrakcijom postignut je veći prinos polisaharida (8,09 %) u odnosu na mikrovalovima potpomognutu ekstrakciju (3,88 %). Najveći prinos polisaharida i najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata dobiveni su uz 0,1 M HCl, pri 10 min i 80 °C, najveći udio sulfatnih grupa dobiven je uz 0,1 M HCl, pri 40 °C i 10 min, a najveći udio fukoze dobiven je uz 0,1 M HCl, pri 80 °C i 20 min.

Ključne riječi: *smeđe alge, Cystoseira barbata, mikrovalovi, ekstrakcija, sulfatirani polisaharidi*

Rad sadrži: 57 stranica, 5 slika, 5 tablica, 105 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc.dr.sc. *Ivona Elez Garofulić*
2. Prof.dr.sc. *Verica Dragović-Uzelac*
3. Izv.prof.dr.sc. *Sandra Balbino*
4. Prof.dr.sc. *Zoran Herceg* (zamjena)

Datum obrane: 29. siječnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for drying Technologies and monitoring of biologically active compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

OPTIMIZATION OF MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE *Cystoseira barbata*

Ema Vrančić, 1285/USH

Abstract: Marine algae are rich source of biologically active compounds, especially sulfated polysaccharides, which show antiviral, antitumor and antioxidant properties. The aim of this study was to optimize microwave-assisted extraction of polysaccharides from the brown alga *Cystoseira barbata*. Microwave-assisted extraction was performed at temperatures of 40, 60 and 80 °C and extraction times of 10, 15 and 20 min, while conventional extraction was performed at 80 °C for 3 h. In both methods, distilled water and 0.1 M HCl were used as the extraction solvent. The influence of solvent, temperature and extraction time on polysaccharide yield, total carbohydrates, sulfate group content and fucose content was determined. Conventional extraction achieved a higher yield of polysaccharides (8.09 %) compared to microwave-assisted extraction (3.88 %). Highest yield of polysaccharides and the highest concentration of total carbohydrates were obtained with 0.1 M HCl, at 10 min and 80 °C, the highest content of sulfate groups was obtained with 0.1 M HCl, at 40 °C and 10 min, and the highest content of fucose was obtained with 0.1 M HCl, at 80 °C and 20 min.

Keywords: *brown algae, Cystoseira barbata, microwaves, extraction, sulfated polysaccharides*

Thesis contains: 57 pages, 5 figures, 5 tables, 105 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: *Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full Professor*

Technical support and assistance: *Ana Dobrinčić, MSc*

Reviewers:

1. PhD. *Ivona Elez Garofulić*, Assistant Professor
2. PhD. *Verica Dragović-Uzelac*, Full Professor
3. PhD. *Sandra Balbino*, Associate Professor
4. PhD. *Zoran Herceg*, Full Professor (substitute)

Thesis defended: January 29th, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALGE	2
2.1.1. <i>Cystoseira barbata</i>	4
2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA.....	5
2.2.1. Karagenan – crvene alge	6
2.2.2. Ulvan – zelene alge.....	7
2.2.3. Alginat – smeđe alge.....	8
2.2.4. Laminarin – smeđe alge	9
2.2.5. Fukoidan – smeđe alge.....	9
2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI	11
2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)	15
2.4. PRIMJENA FUKOIDANA.....	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. MATERIJALI.....	19
3.1.1. Smeđa alga <i>Cystoseira barbata</i>	19
3.1.2. Kemikalije	19
3.1.3. Aparatura.....	20
3.1.4. Pribor.....	20
3.2. METODE	21
3.2.1. Predtretman	21
3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida.....	21
3.2.3. Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE)	21
3.2.4. Postupci nakon ekstrakcije	22
3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata	23
3.2.6. Određivanje koncentracije fukoze	24
3.2.7. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa	25
3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	26
3.2.9. Određivanje klorofila a, klorofila b i karotenoida UV/Vis spektrofotometrijom.....	27
3.2.10. Statistička obrada rezultata.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. USPOREDBA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE I EKSTRAKCIJE POTPOMOGRNUTE MIKROVALOVIMA	32
4.2. UTJECAJ OTAPALA NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE.....	34
4.2.1. Utjecaj otapala na prinos polisaharida	34
4.2.2. Utjecaj otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata	35
4.2.3. Utjecaj otapala na udio sulfatnih grupa.....	36
4.2.4. Utjecaj otapala na udio fukoze	36

4.3. UTJECAJ TEMPERATURE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE.....	37
4.3.1. Utjecaj temperature na prinos polisaharida.....	37
4.3.2. Utjecaj temperature na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	38
4.3.3. Utjecaj temperature na udio sulfatnih grupa.....	39
4.3.4. Utjecaj temperature na udio fukoze.....	39
4.4. UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE.....	39
4.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos polisaharida.....	39
4.4.2. Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	40
4.4.3. Utjecaj vremena ekstrakcije na udio sulfatnih grupa.....	40
4.4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na udio fukoze.....	41
4.5. UTJECAJ KOMBINACIJE UVJETA EKSTRAKCIJE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE....	41
4.6. ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA.....	43
4.6.1. Koncentracija ukupnih fenola.....	43
4.6.2. Koncentracija klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida.....	44
5. ZAKLJUČCI.....	46
6. LITERATURA.....	47

1. UVOD

Morske alge su već godinama neizostavan dio prehrane Azijskih zemalja, a danas se sve više proučava njihov sastav i moguća primjena u različitim područjima. Predstavljaju izvor različitih biološki aktivnih spojeva poput polifenola, vitamina, minerala, proteina i polisaharida različitih struktura i fizikalno-kemijskih svojstava te zanimljivih funkcionalnih karakteristika (Hentati i sur., 2020). Posebno su bogate sulfatiranim polisaharidima koji privlače veliku pozornost u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji te se pokazalo da posjeduju veliku biološku aktivnost, uključujući antitumorska, imunomodulirajuća, antivirusna, antikoagulativna i antioksidativna svojstva (Barbosa i sur., 2019). Najznačajniji predstavnici sulfatiranih polisaharida su karagenan iz crvenih algi, ulvan iz zelenih te laminarin, alginat i fukoidan iz smeđih algi (Ngo i Kim, 2013).

Fukoidan i ostali sulfatirani polisaharidi se najčešće izoliraju konvencionalnim metodama ekstrakcije koje uključuju korištenje otapala poput vode, razrijeđenih kiselina i soli pri višim temperaturama uz vrijeme trajanja od nekoliko sati (Lim i Wan Aida, 2017). Takve metode su pokazale slabu učinkovitost, dugotrajnost te potrebu za velikim količinama otapala što je dovelo do potrebe za razvojem novih metoda ekstrakcije (Nguyen i sur., 2020). Nove, nekonvencionalne metode su ekološki prihvatljivije te pokazuju određene prednosti nad konvencionalnima, a najčešće se koriste enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE), ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE), ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE) te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) (Dobrinčić i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze u uzorku smeđe alge *Cystoseira barbata* te utvrditi optimalne parametre ekstrakcije za dobivanje najvećeg prinosa. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provedena je uz predtretman acetonom i etanolom, a sama ekstrakcija se odvijala pri temperaturama od 40, 60 i 80 °C, vremenu trajanja od 10, 15 i 20 min te pomoću otapala destilirane vode i 0,1 M HCl-a. Konvencionalna ekstrakcija je provedena uz kontinuirano miješanje s otapalom (voda i 0,1 M HCl) pri temperaturi od 80 °C i vremenu od 3 h te je uspoređena s ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima. Određena je i koncentracija ukupnih fenola i pigmentata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) u acetonskim i etanolnim ekstraktima iz predtretmana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Termin „alge“ predstavlja skupinu autotrofnih i fotosintetskih organizama koji nemaju zajedničkog pretka i prema tome ne mogu biti svrstane u istu taksonomsku jedinicu, ali dijele određene karakteristike koje ih povezuju (Barsanti i Gualtieri, 2014). Većinom su vodenog podrijetla, no mogu biti i kopnene, a postoji i određeni broj vrsta koje mogu rasti u ekstremnim uvjetima (Sahoo i Baweja, 2015). Procijenjeno je da postoji između 350 000 i 1 000 000 vrsta algi (Lee, 2016), no prema globalnoj bazi podataka o algama, postoji tek 158.822 različitih vrsta i podvrsta koje su istražene (Guiry i Guiry, 2020). Prema svojoj građi mogu biti jednostanične ili višestanične. Jednostanične alge se mogu podijeliti na pokretne i nepokretne, ovisno o prisutnosti ili odsutnosti izdanaka za pokretljivost, dok se višestanične alge dijele na alge koje tvore kolonije i alge koje tvore nitaste oblike (Sahoo i Baweja, 2015). Alge svojim izgledom nalikuju na biljke, ali nemaju pravo korijenje, stabljiku i listove, već se njihovo tijelo naziva talus (Barsanti i Gualtieri, 2014).

Alge se strukturno mogu podijeliti na mikroalge i makroalge (Griffiths i sur., 2016). Mikroalge obuhvaćaju raznoliku skupinu prokariotskih i eukariotskih organizama koji mogu rasti na različitim prirodnim staništima. Mnoge proučavane vrste su fotoautotrofne, no postoji i mali broj mikroalgi koje mogu biti miksotrofne i heterotrofne (Lee, 2016). Osim načina na koji osiguravaju nutrijente za prehranu, neka od obilježja koja karakteriziraju mikroalge su ta da sadrže različite fotosintetske pigmente koji im daju obojenje te su pretežno jednostanične, iako mogu tvoriti i kolonije nediferenciranih stanica (Olaizola i Grewe, 2019). Za razliku od mikroalgi, makroalge su višestanični organizmi koji brzo rastu te mogu tvoriti strukture dugačke i do 60 metara, a najčešće se koriste za proizvodnju hrane i ekstrakciju hidrokoloida (Rajkumar i sur., 2014). Od vodenih algi, morske alge predstavljaju najmnogobrojnije organizme u morima i oceanima te se na temelju kemijskog sastava i izraženih fotosintetskih pigmentata mogu svrstati u tri glavne skupine: zelene, smeđe i crvene alge (Xu i sur. 2017).

Zelene alge (Chlorophyta) su fotosintetski organizmi jednostavne građe, a karakterizira ih prisutnost kloroplasta s dvostrukom membranom, a pigmenti koje najčešće sadrže su klorofil a i b (Arora i Sahoo, 2015). Prema građi talusa mogu biti jednostanične, nitaste, listolike, cjevaste, sifonokladalne i sifonalne (Antolić i sur., 2011). Smatraju se najraznovrsnijom skupinom algi s više od 7500 vrsta koje većinom rastu u slatkoj vodi, dok mali broj raste i u morskoj vodi te na kopnu (Arora i Sahoo, 2015).

Smeđe alge (Phaeophyta) su organizmi različite morfologije talusa. Postoje oblici koji imaju sitno razgranati nitasti talus te oblici složenije građe, listolikog talusa dugog više od 10 metara. Neke vrste imaju diferencirani talus kod kojeg se razlikuju dijelovi koji nalikuju na korijen, stabljiku i listove (rod *Sargassum*). Većina ovih algi nastanjuje stjenovito, šljunčano i pješčano morsko dno, no mogu živjeti u talusu drugih algi ili na životinjama poput morskih puževa ili spužvi (Antolić i sur., 2011). Karakterizira ih boja koja potječe od karotenoidnog pigmenta, fukoksantina, koji se nalazi u kloroplastima. Najpoznatiji predstavnici su različite vrste iz rodova *Dictyota*, *Laminaria* i *Sargassum* (Verma i sur., 2015).

Crvene alge (Rhodophyta) dobile su naziv prema dominantnim pigmentima fikocijanu i fikoeritrinu koji daju plavkasto i crveno obojenje. Općenito se smatraju najvažnijim izvorom mnogih biološki aktivnih metabolita kada se usporede s drugim algama. Najčešće rastu u morskoj vodi i slatkovodnim staništima, ali postoje i kopnene vrste (Mayanglambam i Sahoo, 2015). Karakterizira ih nedostatak bičeva koji omogućuju kretanje, a od klorofila sadrže samo klorofil a (Barsanti i Gualtieri, 2014). Vrste iz rodova *Gracilaria*, *Gelidium* i *Pterocladia* koriste se u proizvodnji agara, medija koji služi kao hranjiva podloga za mikroorganizme te je u širokoj laboratorijskoj i biotehnološkoj upotrebi (El Gamal, 2010).

Osim tri navedene podjele algi, značajnije su i cijanobakterije (Cyanobacteria), kremene alge ili dijatomeje (Chrysophyceae), euglenoidi (Euglenozoa) i dinoflagelati (Dinophyceae) (Guiry, 2012).

Morske alge bogate su polisaharidima, mineralima i određenim vitaminima te drugim bioaktivnim spojevima poput proteina, lipida i polifenola koji pokazuju antibakterijska, antiviralna i antifungalna svojstva (Holdt i Stefan, 2011). Također, sadrže spojeve koji se ne mogu pronaći u biljkama, a pokazali su se vrlo djelotvornima u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji te kao suplementi prehrani. Smeđe alge sadrže polisaharide kao što su fukoidan, alginat i laminarin, crvene alge sadrže agar i karagenan, a zelene alge karakterizira ulvan (Khotimchenko i sur., 2020). Spojevi izolirani iz određenih algi roda *Dictyota* sp. pokazali su citotoksičnu te antimalarijsku aktivnost, dok su vodeni ekstrakti vrsta *Gracilaria corticata* i *Sargassum oligocystum* pokazali biološku aktivnost protiv ljudskih kancerogenih stanica leukemije (Gallimore, 2017).

Morske alge su važan izvor svakodnevne prehrane u Kini i Japanu, a Koreja ima najraznolikiju industriju uzgoja morskih algi na svijetu. Morske alge se pripremaju i konzumiraju na različite načine: sirove, pržene, kuhane na pari ili u vodi (Hafting i sur., 2015).

Također, agar i karagenan iz crvenih algi te alginati iz smeđih algi se koriste u prehrambenoj industriji kao sredstva za želiranje, a pigmenti izolirani iz različitih algi, koriste se kao bojila i aditivi u hrani (Griffiths i sur., 2016). Zbog svojih svojstava, smeđe alge se koriste kao gnojivo i mogu poslužiti u različitim aspektima medicine te predstavljaju koristan i isplativ izvor za proizvodnju biogoriva (Verma i sur., 2015). Od zelenih algi, vrsta koja se najčešće koristi u prehrani je *Chlorella* sp. Osim za prehranu, široko je korištena kao suplement u prehrani, u kozmetičkoj industriji te za proizvodnju antibiotika, a brojne druge vrste mogu poslužiti u procesima za smanjenje emisije ugljikovog dioksida te kao izvor obnovljive energije (Arora i Sahoo, 2015).

U Jadranskom moru obitava oko 170 vrsta smeđih algi koje zauzimaju većinu stjenovite površine na dubini 20 – 30 metara, a vrste roda *Cystoseira* su najraširenije. Od zelenih algi poznato je oko 118 vrsta, od kojih najveći značaj imaju vrste iz rodova: *Ulva*, *Enteromorpha*, *Cladophora* i *Ulothrix*. Crvenih algi u Jadranskom moru ima oko 350 vrsta, a najznačajniji predstavnici su *Phymatolithon lenormandii*, *Lithophyllum incrustans*, *Tenarea undulosa* i *Lithothamnium fruticulosum* (Antolić i sur., 2011).

2.1.1. *Cystoseira barbata*

Cystoseira je rod smeđih algi koji obuhvaća oko 294 vrsta algi i najznačajniji je predstavnik obitelji Sargassaceae, sastavljene od nekadašnjih dviju porodica Sargassaceae i Cystoseiraceae (Gouveia i sur., 2013) koja pripada redu Fucales (Sousa i sur., 2019). U globalnoj bazi podataka o algama trenutno se nalazi 165 opisanih vrsta roda *Cystoseira* i 129 podvrsta, kultivara i varijeteta (Guiry i Guiry, 2020), a u Jadranskom moru ih se nalazi oko 56 (Rožić i sur., 2012). Neke od najraširenijih vrsta Jadranskog mora su *C. barbata*, *C. compressa*, *C. corniculata*, *C. crinita* i *C. spinosa* (Antolić i sur., 2010).

C. barbata (Slika 1.) je višegodišnja alga grmolikog izgleda, građena od razgranatog talusa koji je cilindričnog oblika i raste iz drvenaste strukture konusnog oblika. Iz centralnog dijela alge uzdižu se osnovne grane koje se dijele u vlaknaste grane i grančice koje se ponekad ne razvijaju i ne šire daleko. Na malim grančicama se nalaze redovi malih vezikula (Chapman i Chapman, 1973). Pripada endemskim vrstama Sredozemnog mora, a najbujnije raste tijekom travnja i svibnja te se morfološki može razlikovati ovisno o staništu i uvjetima okoline (Falace i Bressan, 2006).



Slika 1. *Cystoseira barbata* (Razred: Phaepohyta; Red: Fucales; Rod: Cystoseira)

(ukrb.in.com, pristupljeno 29. srpnja 2020.)

Prirodno stanište ove vrste je morsko dno otvorenih i zaklonjenih stjenovitih obala te obalna područja laguna. Obično raste u gornjoj sublitoralnoj zoni dubine do 0,2 metra (Guiry i Guiry, 2020), no može rasti i na dubinama od 20 – 30 metara, pri čemu ovisi o propusnosti morske vode za svjetlost (Antolić i sur., 2011). *C. barbata* obitava u Jadranskom moru, pri čemu najviše raste u obalnom području sjevernog Jadrana (Antolić i sur., 2010). Njena rasprostranjenost se također može primijetiti kroz cijelo obalno područje Sredozemnog mora (Antolić i sur., 2011), a široko je rasprostranjena i na obalama Crnog mora (Trica i sur., 2019; Falace i Bressan, 2006).

Istraživanja su pokazala da *C. barbata* sadrži različite spojeve koji imaju biološku aktivnost. Neki od njih su laminarin, fukoksantin i konjugati polifenola, proteina i polisaharida. Laminarin ima antioksidacijska, antibakterijska i zacjeljujuća svojstva, fukoksantin se koristi kao pojačivač boja i oksidacijske stabilnosti mesnih proizvoda, a konjugati polifenola, proteina i polisaharida se koriste kao konzervansi (Trica i sur., 2019).

2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA

Polisaharidi ili glikani su polimeri velike molekulske mase, sastavljeni od jednostavnih šećera, tj. monosaharida, koji su međusobno povezani glikozidnim vezama (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). U prirodi je više od 90 % ugljikohidrata u obliku polisaharida. Molekule polisaharida mogu biti linearne i razgranate. Obje strukture sadrže jedan reducirajući kraj te jedan ili više nereducirajućih krajeva, ovisno o tome jesu li linearne ili razgranate. Polisaharidi

sastavljeni od istih monosaharida nazivaju se homoglikani, a ako su sastavljeni od dvije ili više različitih monomernih jedinica nazivaju se heteroglikani (BeMiller, 2019).

Za razliku od biljaka, većina algi sadrži sulfatirane, acetilirane ili metilirane polisaharide (Wang i sur., 2014) koji imaju jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva ovisna o vrsti, geografskom području rasta i godišnjem dobu (Dobrinčić i sur., 2020). Koncentracije polisaharida u različitim vrstama algi čine 4 % do 76 % suhe tvari alge, a veće koncentracije se mogu pronaći u vrstama iz rodova *Ascophyllum*, *Porphyra*, *Palmaria* i *Ulva* (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). Mnoga istraživanja su pokazala da sulfatirani polisaharidi imaju poseban fiziološki utjecaj na čovjekov organizam svojom različitom biološkom aktivnošću. Venugopal (2019), Wang i sur. (2014) i Jesus Raposo i sur. (2013) navode kako sulfatirani polisaharidi iz morskih algi pokazuju antikoagulativna, antiviralna, antikancerogena, antioksidativna i imunomodulirajuća svojstva te da njihove strukturne karakteristike pogoduju primjeni u biomedicini. Također, važnost u medicini predstavlja i njihovo svojstvo prepoznavanja stanica te mogućnost stanične adhezije i regulacije funkcije receptora (Wang i sur., 2014), a široko su implementirani i u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Jesus Raposo i sur., 2013). Najvažniji predstavnici sulfatiranih polisaharida su karagenan iz crvenih algi, ulvan iz zelenih (Muhamad i sur., 2019) te alginat, laminarin i fukoidan iz smeđih algi (Dobrinčić i sur., 2020).

2.2.1. Karagenan – crvene alge

Karagenani su skupina sulfatiranih polisaharida koji formiraju gelove i imaju svojstva zgušnjivača, a dobivaju se ekstrakcijom iz određenih vrsta crvenih morskih algi rodova *Chondrus*, *Gigartina* i *Eucheuma* (Necas i Bartosikova, 2013). Predstavljaju glavne komponente staničnih stijenki osiguravajući strukturu te međustaničnu adheziju i signalizaciju (Khotimchenko i sur., 2020). Karagenan se sastoji od naizmjeničnih jedinica D-galaktoze i 3,6-anhidro-galaktoze koje su međusobno povezane α -(1→3) i β -(1→4) glikozidnim vezama (Necas i Bartosikova, 2013). Postoje tri glavne strukture karagenana: Kappa, Iota i Lambda, od kojih svaka posjeduje različita gelirajuća svojstva (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). Sve tri strukture sadrže 22 – 35 % sulfatnih skupina (Necas i Bartosikova, 2013) ugrađenih tako da molekule šećera imaju jednu ili dvije sulfatne skupine esterificirane na hidroksilnu skupinu na ugljikovim atomima C2 ili C6.

Struktura karagenana omogućuje im topljivost u vodi te sposobnost tvorbe vrlo viskoznih pseudoplastičnih otopina. Viskoznost tako nastale otopine je stabilna u širokom

rasponu pH vrijednosti zbog ioniziranih sulfatnih skupina koje molekulama daju negativan naboj. Tvorba gela najvažnije je svojstvo Kappa i Iota karagenana. Gelovi se mogu formirati u vodi ili mlijeku te u prisutnosti kationa poput K^+ , Ca^{2+} ili proteina, tvore gelove koji mogu biti bistri, zamućeni, kruti, elastični, žilavi, mekani, toplinski stabilni i termički reverzibilni (BeMiller, 2019). Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava, karagenani se koriste kao emulgatori i sredstva za želiranje te kao zgušnjivači i stabilizatori u prehrambenoj industriji pri proizvodnji sladoleda, jogurta i drugih proizvoda (Venugopal, 2019).

Kao biološki aktivni spojevi, karagenani su pokazali izrazito povoljan učinak na ljudsko zdravlje. Posjeduju antiviralna i antitumorska (Løvstad Holdt i Kraan, 2011) te antikoagulativna i imunomodulacijska svojstva *in vitro* i *in vivo* te se sve više koriste u medicini kao terapijska sredstva (Muhamad i sur., 2019).

2.2.2. Ulvan – zelene alge

Ulvan je najzastupljeniji sulfatirani polisaharid zelenih morskih algi (Jiao i sur., 2011) koji se nalazi u međustaničnom prostoru i vlaknastim stijenkama talusa te se sastoji od raminoze, ksiloze, glukuronske i iduronske kiseline (Surendhiran i Sirajunnisa, 2019). Topljiv je u vodi i najčešće se dobiva ekstrakcijom iz algi rodova *Ulva* i *Enteromorpha* (Wang i sur., 2014). Može činiti 18 – 29 % suhe tvari alge, ovisno o vrsti, taksonomskom podrijetlu, sezoni, uvjetima rasta i ekstrakcijskim postupcima (Pangestuti i Kurnianto, 2017). Strukturno je vrlo složene građe te pokazuje veliku varijabilnost ponavljajućih disaharidnih i oligosaharidnih građevnih jedinica koje se javljaju u nativnoj i kemijski modificiranoj strukturi ulvana, a povezane su α - ili β -(1→4) glikozidnim vezama. Glavne dvije vrste disaharida koje čine strukturu ulvana su 3-sulfat ulvanobiuronska kiselina koja sadrži glukuronsku kiselinu (tip A) i ulvanobiuronska kiselina koja sadrži iduronsku kiselinu (tip B) (Jiao i sur., 2011).

Zbog svoje kemijske strukture, ulvan tvori viskozne vodene otopine, a u prisutnosti viševalentnih kationa i borata, termoreverzibilne gelove. Pokazalo se da može tvoriti i komplekse s glinama koji mogu biti osnova za nove nanomaterijale (Robic i sur., 2008). Također, pokazuje afinitet prema vezanju iona što može dovesti do vezanja teških metala na ulvan u staničnim stijenkama algi (Lahaye i Robic, 2007).

Kao biološki aktivan spoj, ulvan se učinkovito primjenjuje u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji te kao nutraceutik. Osim antikoagulativnih i imunomodulirajućih svojstava, pokazao je značajnu citotoksičnu aktivnost protiv raka jetre, dojke te grlića

maternice. Novija istraživanja usmjerena su prema tome da ga potpuno implementiraju u postupcima previjanja rana te kao sastojak antimikrobnih premaza (Muhamad i sur., 2019).

2.2.3. Alginat – smeđe alge

Alginat je polisaharid izoliran iz stanične stijenke brojnih vrsta smeđih algi, a proizvode ga i neke vrste bakterija u obliku izvanstaničnog matriksa (Brownlee i sur., 2005). Može biti u obliku kiseline kao linearna poliuronska kiselina koja se naziva alginska kiselina te u obliku soli kao komponenta staničnih stijenki smeđih algi (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). Glavna funkcija alginata je strukturna, jer pruža čvrstoću i fleksibilnost tkivu alge (Skjic-Braek, 1992). Komercijalno dostupan alginat je najčešće ekstrahiran iz algi: *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* i *Macrocystis pyrifera*, a udio alginata u njima varira od 22 – 44 % suhe tvari alge (Lee i Mooney, 2012). Alginat se sastoji od (1→4) linearnih kopolimera α -L guluronske kiseline (G) i β -D manuronske kiseline (M) koji su kovalentno povezani u različitim nizovima ili blokovima. Kopolimeri se kombiniraju tako da strukturno daju područja bogata G, MG i M jedinicama (G blokovi, MG blokovi i M blokovi) (Brownlee i sur., 2005).

Alginati izolirani iz različitih vrsta algi imaju različite udjele G, MG i M blokova, te posljedično i različita biokemijska i biofizička svojstva te molekulske mase (BeMiller, 2019). Otopine alginata bogate G blokovima imaju veću viskoznost, pokazuju pseudoplastično ponašanje i viskoelastična svojstva, a dodatkom Ca^{2+} iona tvore gelove (Hentati i sur., 2020). Alginatni gelovi nisu termoreverzibilni i koriste se u prehrambenoj industriji, ali nemaju svojstvo topljenja u ustima (BeMiller, 2019). Zbog biokompatibilnosti i lakoće geliranja alginati su našli brojne primjene u biomedicini i inženjerstvu. Alginatni hidrogelovi posebno su korisni u zacjeljivanju rana, a koriste se i pri aplikaciji lijekova te u tkivnom inženjerstvu (Muhamad i sur., 2019).

Biološka aktivnost alginata uključuje antibakterijska, prebiotička i antihipertenzivna svojstva te pozitivan učinak na smanjenje pretilosti i pojavu čireva. Alginati s visokim sadržajem M blokova su imunogeni te induciraju proizvodnju citokina, a pokazuju i efekte zgrušavanja krvi te aktiviraju trombocite (Venugopal, 2019). U literaturi se također navodi da alginska kiselina dovodi do smanjenja vrijednosti koncentracije kolesterola, sprječava apsorpciju toksičnih kemijskih tvari i ima veliku ulogu kao prehrambeno vlakno za održavanje zdravlja životinja i ljudi (Løvstad Holdt i Kraan, 2011).

2.2.4. Laminarin – smeđe alge

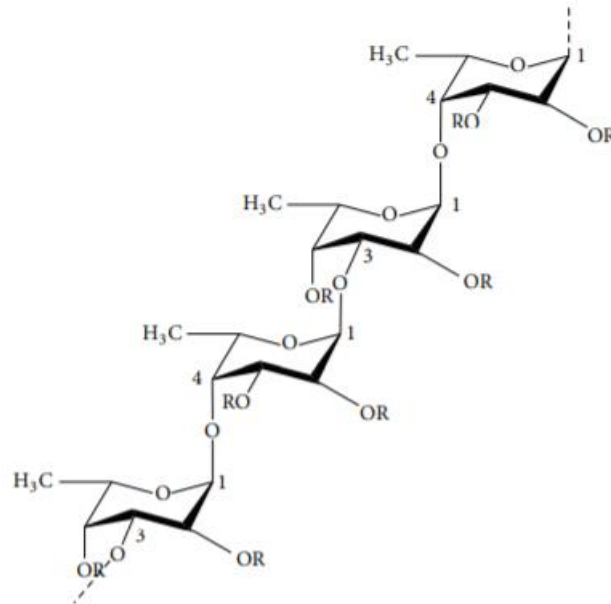
Laminarin je glavni skladišni polisaharid smeđih algi roda *Laminaria* i čini do 36 % suhe tvari alge ovisno o sezoni (Deville i sur., 2004). Neke od vrsta bogatih laminarinom su *Laminaria japonica* i *Laminaria hyperborea* te u manjoj mjeri alge rodova *Ascophyllum*, *Fucus* i *Undaria* (Venugopal, 2019). Laminarin je linearni homopolisaharid molekulske mase oko 5 kD ovisno o stupnju polimerizacije, koji se sastoji od β -(1 \rightarrow 3) i β -(1 \rightarrow 6) glukana u omjeru 3:1 (Dobrinčić i sur., 2020). Sadrži između 50 i 69 % D-glukoze i prosječno oko 1,3 % manitola (Venugopal, 2019). Opisane su dvije vrste laminarina, jedan s M-lancima, gdje lanci laminarina sadrže D-manitol na reducirajućem terminalnom kraju te laminarin s G-lancima gdje se na reducirajućem terminalnom kraju nalazi D-glukoza jedinica. Ovisno o udjelu M-lanaca u strukturi, mogu se razlikovati topljivi laminarin koji ima oko 75 % M-lanaca i netopljivi laminarin koji sadrži manje od 45 % M-lanaca (Hentati i sur., 2020).

Za razliku od do sada opisanih polisaharida, laminarin ne formira viskozne otopine i gelove, ali ima primjenu u razvoju prehrambenih proizvoda jer se koristi kao izvor vlakana i kao prebiotik te pokazuje svojstva povoljna za imunološki sustav čovjeka (Venugopal, 2019). Pokazalo se i da laminarin ima veliki potencijal u medicini i farmaceutici kao prah za kirurške potrebe, sredstvo sa svojstvima inhibicije tumora te ako je u obliku sulfatnog estera kao antikoagulans. Također, pruža zaštitu protiv infekcija uzrokovanih bakterijskim patogenima, pojačava imunološki sustav, smanjuje razinu kolesterola u serumu i sistolički krvni tlak te razinu ukupnog kolesterola, slobodnog kolesterola, triglicerida i fosfolipida u jetri (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). Pokazano je i da laminarin može spriječiti aktivnost virusa HIV, tako što sprječava adsorpciju virusa na limfocite te inaktivira HIV reverznu transkriptazu (Ahmadi i sur., 2015).

2.2.5. Fukoidan – smeđe alge

Fukoidan je termin koji predstavlja sulfatirane polisaharide izolirane iz smeđih algi i nekih morskih beskralješnjaka i prvi put je izoliran 1913. godine (Barbosa i sur., 2019). Odnosi se na polisaharide građene od uglavnom sulfatirane L-fukoze i drugih monosaharida (Ahmadi i sur., 2015) poput manoze, galaktoze, glukoze i ksiloze kojih je manje od 10 %, a mogu sadržavati i uronsku kiselinu, acetilne skupine i proteine (Løvstad Holdt i Kraan, 2011). Struktura fukoidana (Slika 2.) je raznolika te fukoidani dobiveni iz rodova *Fucus*, *Sargassum*, *Pelvetia*, *Ascophyllum* i *Cystoseira* imaju glavnu okosnicu od α -L-fukoze povezane (1 \rightarrow 2), (1 \rightarrow 3) i (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama, dok fukoidani iz rodova *Laminaria*, *Ecklonia* i *Eisenia*

imaju linearni lanac α -L-fukopiranozidnih ostataka povezanih (1 \rightarrow 3) glikozidnim vezama. Sulfati i acetatne skupine vežu se na α -L-fukozne ostatke i smješteni su na položajima C2 i C4, a povremeno i na C3 (Hentati i sur., 2020).



Slika 2. Strukturni prikaz molekule fukoidana s naizmjeničnim α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama (Ahmadi i sur., 2015)

Prosječna relativna molekulska masa fukoidana varira od 7 kDa do 2300 kDa, a udio fukoidana iznosi otprilike 5 do 10 % suhe tvari alge, dok udio sulfatnih skupina varira između 5 i 38 %, ovisno o vrsti alge (Dobrinčić i sur., 2020). Za vrstu smeđe alge *Fucus vesiculosus*, pokazano je da sadrži najveću koncentraciju fukoidana i to do 20 % suhe tvari alge (Løvstad Holdt i Kraan, 2011).

Topljivost fukoidana povezana je sa stupnjem razgranatosti ovisno o sadržaju sulfatnih skupina. Može tvoriti viskozne otopine u vrlo niskim koncentracijama i podložan je raspadanju kada se tretira razrijeđenim kiselinama i bazama. Može tvoriti gelove tako da se u vodenu otopinu fukoidana visoke koncentracije doda glicerol (Venugopal, 2019).

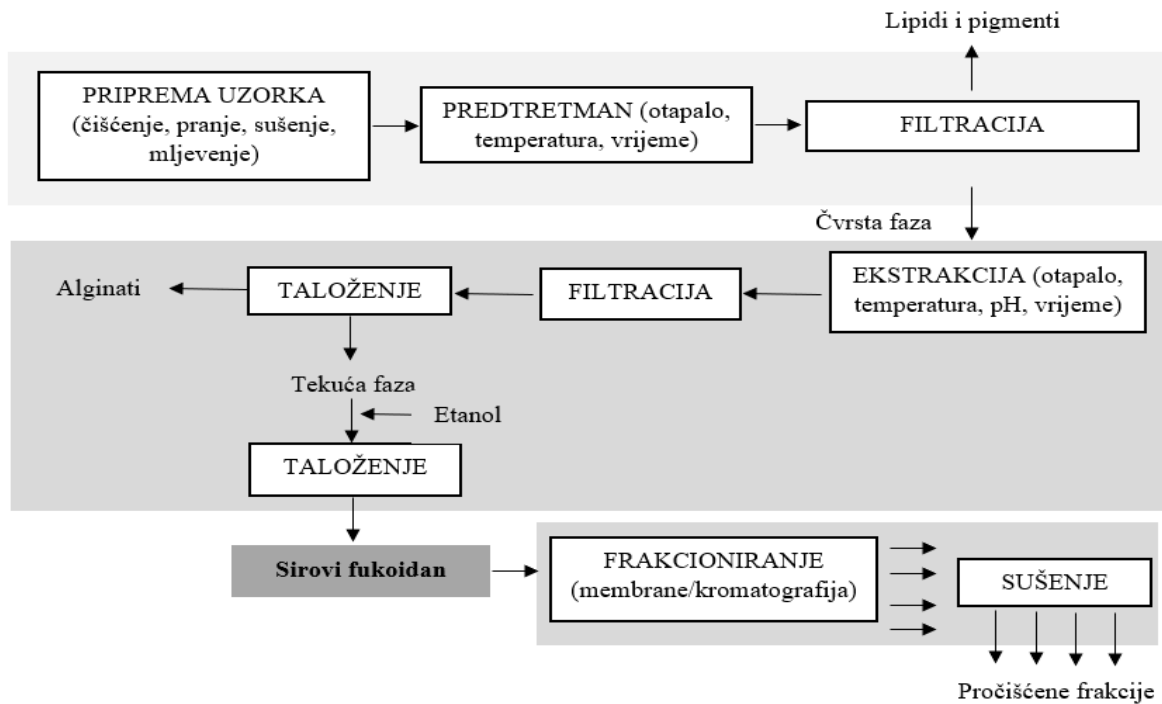
Fukoidan se opsežno istražuje zbog svoje biološke aktivnosti, koja je povezana s molekulskom masom, vrstom i udjelom šećera, stupnjem sulfatacije i molekularnom strukturom koji uvelike ovise o staništu, prinosu i uvjetima ekstrakcije alge (Barbosa i sur., 2019). Dokazane su raznolike biološke funkcije i moguća terapijska svojstva koja uključuju antitumorsko, antivirusno, imunomodulacijsko, protuupalno i antikoagulativno djelovanje (Besednova i sur., 2020; Venugopal, 2019; Ale i Meyer, 2013). Pokazan je izravan

antiproliferativni učinak fukoidana protiv određenih stanica raka, gdje je uočeno znatno smanjenje broja stanica raka pluća i melanoma *in vitro* te je zabilježeno da primjena fukoidana izaziva apoptozu stanica melanoma, raka dojke i raka debelog crijeva (Ale i Meyer, 2013). Također, pokazana je i antiviralna aktivnost protiv mnogih RNA i DNA virusa *in vivo* i *in vitro*, uključujući važne ljudske patogene kao što su HIV, HSV1-2 i virus denge (Ahmadi i sur., 2015). Istraživanje provedeno na smeđoj algi *Turbinaria conoides* pokazalo je da fukoidan ima najveću antioksidacijsku aktivnost, nakon kojeg slijede alginat i laminarin, a također je istražen i antialergijski učinak fukoidana na induciranoj preosjetljivosti mišjih dišnih puteva, gdje je pokazano da fukoidan smanjuje koncentraciju interleukina 4 (IL-4) i 13 (IL-13) u bronhoalveolarnoj tekućini za ispiranje i inhibira porast antigen specifičnog imunoglobulina E (IgE) (Ngo i Kim, 2013).

2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI

Švedski botaničar Kylin je 1913. prvi ekstrahirao i okarakterizirao fukoidan iz raznih vrsta algi rodova *Laminaria* i *Fucus* te je od tada do danas razvijen niz različitih tehnika ekstrakcije fukoidana (Lim i Wan Aida, 2017). Postoji nekoliko glavnih koraka koje je potrebno provesti kako bi proces ekstrakcije fukoidana bio uspješan (Slika 3.). Prvi korak je priprema uzorka alge, gdje se alge prikupljene iz mora prvo ispiru vodom kako bi se uklonile nečistoće, zatim se suše na umjerenim temperaturama te na kraju melju kako bi se dobio veći omjer površine i volumena te kako bi se osigurala homogena smjesa. Daljnji koraci su predtretman, ekstrakcija te pročišćavanje i frakcioniranje (García-Vaquero i sur., 2016; Hahn i sur., 2012). Predtretman je korak prije same ekstrakcije i posljednjih je godina postao uobičajen zbog poboljšanja učinkovitosti i olakšanja postupka ekstrakcije te povećanja prinosa željenog ekstrakta (Zayed i Ulber, 2020). Ekstrakcija je nestacionaran, heterogeni postupak za odvajanje spojeva i/ili frakcija iz čvrste tvari, gdje dolazi do prijenosa mase iz čvrste tvari pomoću selektivnog otapala. Najvažnije faze ekstrakcije su: difuzija otapala unutar čvrste matrice, hidroliza i/ili otapanje ciljanih komponenata u otapalu, difuzija otopljenih tvari kroz čvrstu matricu te prijenos mase u završnu otopinu s otapalom (Flórez-Fernández i sur., 2018). Nakon ekstrakcije, provode se postupci frakcioniranja i pročišćavanja kako bi se osigurala izolacija fukoidana maksimalne čistoće, a nakon izolacije, potrebno je osušiti fukoidan kako bi se mogle provoditi daljnje analize. Sušenje se provodi različitim metodama, a neke od njih su sušenje u različitim izvedbama sušionika ili pomoću vakuuma te liofilizacija (Lim i Wan Aida, 2017). Nakon sušenja, za utvrđivanje sastava monosaharida, molekulske mase te odnosa strukture i

funkcije fukoidana mogu se koristiti metode poput masene spektrometrije, nuklearne magnetske rezonance te različitih kromatografskih metoda (Xu i sur., 2017).



Slika 3. Glavni koraci ekstrakcije fukoidana (Torres i sur., 2020)

Predtretman se koristi za uklanjanje spojeva koji predstavljaju nečistoće te kako bi se spriječila ekstrakcija drugih komponenata alge tijekom izolacije fukoidana. Prilikom provođenja predtretmana koriste se organska otapala poput acetona, toluena, heksana, izopropanola i etanola, jer se fukoidan zbog svoje strukture i negativnog naboja neće otapati u njima (Zayed i Ulber, 2020). Predtretman koji se najčešće primjenjuje je ispiranje osušenog i samljevenog uzorka alge smjesom metanola, kloroforma i vode u omjeru (4:2:1) čime se uklanjaju fenoli, lipidi i terpeni te razne druge molekule (García-Vaquero i sur., 2016; Ale i Meyer, 2013; Hahn i sur., 2012; Ale i sur., 2011), a postupak se provodi pri nižim temperaturama da se ne započne prerana ekstrakcija fukoidana zbog njegove topljivosti u vodi (Lim i Wan Aida, 2017). Fenoli imaju visok afinitet za fukoidane i čvrsto se adsorbiraju na njih tijekom ekstrakcije pa ih je u postupku predtretmana potrebno ukloniti, zbog mogućnosti narušavanja antioksidativnih i antitumorskih aktivnosti fukoidana (Zayed i Ulber, 2020). Druge vrste predtretmana koje se mogu koristiti su: upotreba acetona ili etanola pri različitim temperaturama za uklanjanje lipida, proteina, fenola, manitola i klorofila (García-Vaquero i sur., 2016), ispiranje formaldehidom za uklanjanje polifenola i flavina (Hahn i sur., 2012), taloženje i uklanjanje drugih polisaharida poput alginata dodatkom CaCl_2 pri čemu se dobije

netopljivi kompleks kalcija s alginatom (Zayed i Ulber, 2020) te dodatak proteolitičkih enzima za uklanjanje proteina (Ale i Meyer, 2013).

Ekstrakcija sirovog fukoidana treba biti optimirana kako bi se osigurao najveći prinos bez utjecaja na strukturu i biološku aktivnost fukoidana. Parametri koji utječu na prinos i sastav ekstrahiranog fukoidana su temperatura, pH, vrijeme i broj stupnjeva ekstrakcije, a najvažniji parametar predstavlja omjer čvrste tvari i tekućine, odnosno alge i otapala (Flórez-Fernández i sur., 2018). Konvencionalne metode ekstrakcije uključuju korištenje otapala poput vode, razrijeđenih kiselina i soli pri različitim temperaturama (od sobne do 120 °C) uz vrijeme trajanja od nekoliko sati. Od kiselina se najčešće koriste klorovodična i sumporna kiselina, a od soli kalcijev klorid (January i sur., 2019; Flórez-Fernández i sur., 2018; Lim i Wan Aida, 2017; García-Vaquero i sur., 2016). Ekstrakcija vrućom vodom je metoda koja se često koristi za ekstrakciju sulfatiranih polisaharida topljivih u vodi, a za prednost ima to što je za njeno provođenje potrebno vrlo malo kemikalija (Flórez-Fernández i sur., 2018). Ekstrakcija se provodi pri višim temperaturama (70 – 100 °C) uz mehaničko miješanje, ali nije dovoljno selektivna za ekstrakciju određenog polisaharida već dolazi do ekstrakcije i drugih polisaharida prisutnih u staničnoj stijenci alge te je potrebno provesti više koraka kako bi se povećala čistoća i dobila frakcija s ciljanim polisaharidom (Lim i Wan Aida, 2017). Za razliku od ekstrakcije vodom, pokazano je da ekstrakcija kiselinama i solima ima bolji utjecaj na prinos i čistoću ekstrahiranog polisaharida. Upotreba 0,1 M otopine klorovodične kiseline pokazala se učinkovitom jer omogućuje hidrolizu staničnih stijenci i olakšava ekstrakciju fukoidana i laminarina iz matrice (Dobrinčić i sur., 2020). Daljnja prednost upotrebe kiselina prilikom ekstrakcije je u sposobnosti vodikovih iona da ometaju vodikove veze između različitih polisaharida, uzrokujući njihovo taloženje te povećanje prinosa. Također, ponavljanjem ekstrakcije kiselinom te neutralizacijom dobivenih frakcija može se spriječiti razgradnja ciljanog polisaharida, u ovom slučaju fukoidana (Hahn i sur., 2012). Za učinkovito uklanjanje alginata prisutnog u staničnim stijenkama u obliku kalcijevih, magnezijevih i natrijevih soli alginske kiseline, koristi se 2 % otopina kalcijevog klorida. Kalcijevi ioni u kontaktu s natrijevim alginatom zamjenjuju natrijeve ione te nastaje čvrsti kalcijev alginat koji nije topiv u vodi i lako se odvaja (Dobrinčić i sur., 2020). U usporedbi s ekstrakcijom vrućom vodom, upotrebom vodene otopine kalcijevog klorida dobije se sirovi fukoidan s nižim sadržajem laminarina, uronskih kiselina i polifenola (Flórez-Fernández i sur., 2018).

Parametri konvencionalne ekstrakcije mogu se podesiti kako bi se optimirao prinos, sastav i svojstva ekstrakata (Torres i sur., 2020), ali nedostaci poput dugotrajnosti, toksičnosti, slabe

učinkovitosti te mogućnosti utjecaja na strukturu fukoidana što potencijalno može imati štetan učinak na njegovu bioaktivnost, doveli su do potrebe za razvojem novih metoda ekstrakcije (Nguyen i sur., 2020).

Nove, nekonvencionalne, inovativne i ekološki prihvatljivije metode ekstrakcije fukoidana i drugih sulfatiranih polisaharida razvijene su kako bi se unaprijedili nedostaci konvencionalnih metoda. Takve metode su pokazale nekoliko prednosti u odnosu na konvencionalne metode, uključujući smanjenu količinu upotrijebljenog otapala, kraće vrijeme ekstrakcije i rad pri nižim temperaturama. Također, imaju bolju selektivnost za izolaciju željenih spojeva te se njihovom upotrebnom može izbjeći stvaranje nusproizvoda i neželjenih reakcija tijekom ekstrakcije (Cikoš i sur., 2018). Metode koje se najčešće koriste su: enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE), ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE), ekstrakcija tekućinama pri povišenom tlaku (PLE) te ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) (Dobrinčić i sur., 2020)

Enzimima potpomognuta ekstrakcija (EAE) je metoda visoke specifičnosti i katalitičke učinkovitosti te je pogodna za rad u blagim uvjetima reakcije. Uz to, enzimi su ekološki, netoksični te prikladni za rad s prehrambenim proizvodima (García-Vaquero i sur., 2016). Prema definiciji, enzimi predstavljaju katalizatore koji u blagim uvjetima povećavaju brzinu pretvorbe supstrata u produkt. Prilikom izolacije fukoidana iz algi, posreduju u degradaciji stanične stijenke i time omogućavaju lakše izdvajanje fukoidana u blagim uvjetima reakcije uz očuvanje njegove biološke aktivnosti (Hahn i sur., 2012).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE) je zbog svoje jednostavnosti, kratkog vremena ekstrakcije te mogućnosti ostvarenja velikih prinosa željene komponente, najpraktičnija alternativna tehnika za primjenu na industrijskoj razini (Dobrinčić i sur., 2020). Metoda se bazira na upotrebi ultrazvučnih valova pri frekvencijama od 20 do 100 kHz koji uzrokuju stvaranje mjehurića te zona visokog i niskog tlaka. Takva pojava se naziva kavitacija te dovodi do kolapsa i implozije mjehurića koji uzrokuju razgradnju stanične stijenke te povećanje prijenosa mase i oslobađanje bioaktivnih spojeva iz matrice (Cikoš i sur., 2018). Prednosti ultrazvukom potpomognute ekstrakcije uključuju nisku potrošnju otapala, visoku razinu automatizacije, manje troškove te mogućnost kombiniranja s drugim konvencionalnim i nekonvencionalnim tehnikama (García-Vaquero i sur., 2016).

Ekstrakcija tekućinama pri povišenom tlaku (PLE) temelji se na primjeni visokog tlaka za održavanje tekućeg otapala iznad njegove temperature vrelišta te ima utjecaj na bolju topljivost

i bolji prijenos mase željene komponente. Također je pokazano da utječe na brzinu ekstrakcije i povećanje prinosa (Flórez-Fernández i sur., 2018). Ovisno o otapalu koje se koristi za ekstrakciju i parametrima važnim za proces, postoje: ekstrakcija fluidima pri povišenom tlaku (PFE), ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PSE), ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (ASE), ekstrakcija subkritičnom vodom (SWE) i ekstrakcija vrućom vodom (HWE) (Dobrinčić i sur., 2020).

Nakon ekstrakcije, dobije se smjesa polisaharida različite molekulske mase, sastava monosaharida i sadržaja sulfatnih skupina uz proteine i druge spojeve male molekulske mase koji predstavljaju nečistoće. Kako bi se uklonili drugi polisaharidi i dobio fukoidan maksimalne čistoće koriste se procesi pročišćavanja i frakcioniranja (Xu i sur., 2017). Frakcioniranje je postupak klasifikacije analita ili skupine analita iz određenog uzorka prema fizikalnim ili kemijskim svojstvima i provodi se tako da se sirova smjesa spojeva kontinuirano razdvaja u manje frakcije različitih sastava (Templeton i sur., 2000). Membranska filtracija koja uključuje dijafiltraciju, ultrafiltraciju, reverznu osmozu i nanofiltraciju te različite kromatografske metode dobre su tehnike za provođenje frakcioniranja. Iako ne postoji univerzalna metoda za pročišćavanje fukoidana, postoje metode koje su se pokazale učinkovite te se najčešće koriste. Tehnike pročišćavanja uključuju taloženje spojeva dodatkom etanola, membransku filtraciju te kolonsku kromatografiju putem ionske izmjene ili isključivanjem prema veličini ili afinitetu (Xu i sur., 2017). Dodatak etanola je jedan od postupaka koji se najčešće koristi za pročišćavanja ekstrahiranog fukoidana. Dodatkom CaCl_2 talože se alginati koji se potom uklanjaju centrifugiranjem, a fukoidan u supernatantu se dalje može podvrgnuti postupku dijalize ili membranske filtracije kako bi se uklonile zaostale nečistoće male molekulske mase (Lim i Wan Aida, 2017).

2.3.1. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je nova, nekonvencionalna metoda koja se uspješno primjenjuje za ekstrakciju mnogih biološko aktivnih spojeva iz različitih prirodnih resursa (Rodriguez-Jasso i sur., 2011). Pogodna je za ekstrakciju funkcionalnih sastojaka hrane i aktivnih farmaceutskih spojeva iz biomaterijala (Sosa-Hernández i sur., 2018) te je jedna od najčešće korištenih metoda ekstrakcije fenolnih spojeva i sulfatiranih polisaharida iz morskih algi (Xu i sur., 2017). Princip ove metode bazira se na zagrijavanju mikrovalovima. Mikrovalovi nastaju rotacijom dipola, odnosno separacijom pozitivnog i negativnog naboja iste magnitude. Ova pojava uzrokuje obrnuto polje koje stvara inverziju na silu koja djeluje na njega. Daljnjom separacijom naboja dolazi do oscilacija, a oscilacije generiraju električno i

magnetsko polje. Oscilacijom tih dvaju polja nastaje elektromagnetsko zračenje koje se mjeri u frekvencijama. Mikrovalovi se nalaze u rasponu frekvencija od 300 MHz do 300 GHz i pripadaju neionizirajućem zračenju jer ne utječu direktno na molekulsku strukturu (Aguilar-Reynosa i sur., 2017). Uspješno mikrovalno zagrijavanje postiže se pretvorbom elektromagnetske energije u toplinu. Isto tako, učinkovitost mikrovalnog zagrijavanja ovisi o dielektričnim svojstvima materijala i njegovoj sposobnosti da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori ju u toplinu (Flórez-Fernández i sur., 2018).

Prilikom ekstrakcije mikrovalovima, mikrovalni reaktor (Slika 4.) inducira mikrovalove koji simultano zagrijavaju cijeli volumen uzorka te oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola (Blekić i sur., 2011), čime dolazi do vibracije molekula vode koje se nalaze u uzorku alge. Zbog vibracija se povećava temperatura unutarstanične tekućine, voda počinje isparavati te stvara tlak na staničnu stijenku uzorka alge, a zatim dolazi do pucanja stanične stijenke i izljevaju unutarstaničnog sadržaja u okolni medij (Hahn i sur., 2012).

Postoje dvije vrste sustava za mikrovalnu ekstrakciju, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranoj temperaturi i tlaku većem od atmosferskog te ekstrakcija u otvorenim posudama pri atmosferskom tlaku. Zbog rada pod atmosferskim tlakom, ekstrakcija u otvorenim posudama je učinkovitija i sigurnija te je moguće obraditi veće uzorke. Također, procesni uvjeti su pogodni za termolabilne spojeve (Cikoš i sur., 2018). Mikrovalna ekstrakcija u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pri uvjetima niske ili visoke temperature ekstrakcije, a tlak u posudi ovisi o količini i vrelištu otapala (Blekić i sur., 2011).



Slika 4. Mikrovalni reaktor, Ethos Easy (Milestone, Italija) (fotografija: Vrančić, 2020)

Za postizanje većih prinosa ekstrakcije i bolje izolacije željenog spoja bitno je optimirati uvjete ekstrakcije poput snage i frekvencije mikrovalova, omjera otapala i čvrste tvari, temperature i vremena odvijanja ekstrakcije (Cikoš i sur., 2018). Rodriguez-Jasso i sur. (2011) pokazali su da je MAE u reakcijskim uvjetima najvišeg tlaka (8,28 bar) i najkraćeg vremena odvijanja reakcije (1 min) te omjera alge i vode 1g/25 ml, bila učinkovita metoda za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *F. vesiculosus* s najvećim prinosom fukoidana od 18,22 %. Yuan i Macquarrie (2015a) navode da fukoidan dobiven pomoću MAE ima sličan sastav i molekulsku masu kao i fukoidan ekstrahiran konvencionalnim metodama, a antioksidativnim testovima su pokazali da ima veći redukcijski potencijal, dok Okolie i sur. (2019) navode da visoki prinos fukoidana dobivenog pomoću MAE može biti zbog nečistoća prisutnih u tretiranom uzorku.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je učinkovita metoda prihvatljiva za okoliš, a bitno je istaknuti i druge prednosti poput visoke učinkovitosti ekstrakcije, male potrošnje otapala i smanjene potrošnje energije što ju čini isplativom za korištenje (Cao i sur., 2018). Također, ovom metodom je moguće dobiti veće prinose u kraćem vremenu odvijanja ekstrakcije te metoda ima potencijal za industrijsku primjenu. Najveći nedostaci MAE su potencijalna degradacija određenih spojeva uzrokovana temperaturom koja se generira tijekom procesa ekstrakcije (Flórez-Fernández i sur., 2018) te raspodjela mikrovalova kada dođu u kontakt s nehomogenom smjesom gdje može doći do lokalnog pregrijavanja. Također, mikrovalovi neće imati dobar učinak na materijale koji zbog svojih dielektričnih svojstava slabo apsorbiraju energiju (Aguilar-Reynosa i sur., 2017).

2.4. PRIMJENA FUKOIDANA

Posljednjih godina fukoidan je iscrpno istražen u mnogim znanstvenim istraživanjima te se pokazalo da posjeduje veliku biološku aktivnost, uključujući antitumorska, imunomodulirajuća, antivirusna, antikoagulativna, protuupalna i antioksidativna svojstva te da pokazuje pozitivan učinak na različite bubrežne i jetrene poremećaje (Leandro i sur., 2020; Oliveira i sur., 2020; Alboofetileh i sur., 2019; Barbosa i sur., 2019; Cikoš i sur., 2018; García-Vaquero i sur., 2016; Wu i sur., 2016; Wijesinghe i Jeon, 2012; Ale i sur., 2011), što ga čini pogodnim za upotrebu u farmaceutske i biomedicinske svrhe. Isto tako, fukoidan se koristi i u kozmetičkoj industriji zbog svojstva dobrog upijanja i zadržavanja vlage (Leandro i sur., 2020), a novija istraživanja navode kako fukoidan također pokazuje potencijal za implementaciju u medicini za prijenos i kontrolirano otpuštanje lijekova. Zbog svoje biološke aktivnosti, sve više se koristi u prehrambenoj industriji kao dodatak prehrani i kao funkcionalni sastojak hrane (Fitton i sur., 2019).

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) dodijelila je ekstraktima fukoidana iz smeđih algi *Undaria pinnatifida* i *Fucus vesiculosus* status „Općenito prepoznati kao sigurni“, odnosno (GRAS) status, a Europska unija je 2017. godine iste ekstrakte odobrila Uredbom (EU) 2017/2470 o utvrđivanju Unijina popisa nove hrane u skladu s Uredbom (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i Vijeća o novoj hrani, pri čemu je propisana najveća dopuštena količina za dnevnu konzumaciju od 250 mg (Fitton i sur., 2019). U SAD-u i Velikoj Britaniji, fukoidan je dostupan u prodaji kao suplement prehrani u obliku napitaka i tableta. U Japanu je proizvodnja fukoidana visoko zastupljena, a najvažniji izvori su smeđe morske alge *Cladosiphon okamuranus* (Mozuku), *Undaria pinnatifida* (Mekabu) i *Laminaria japonica* (Kombu). Mnoge Japanske tvrtke proizvode fukoidan kao dodatak prehrani u obliku praha, kapsula i napitaka za poboljšanje imunološkog sustava ili kao protuupalni sastojak koji se dodaje napitcima i funkcionalnoj hrani (Ale i Meyer, 2013).

Na globalnoj razini, Azija je najveći potrošač fukoidana, s Kinom i Japanom na prvom i drugom mjestu. U 2017. godini u Aziji je potrošeno 6751 kg fukoidana, od kojih se 38,54 % odnosi samo na Kinu. Nakon Azije slijede Sjedinjene Američke Države kao drugi najveći potrošač fukoidana na svijetu, s potrošenih 5248 kg fukoidana u 2017. godini. Profit na svjetskom tržištu fukoidana u 2019. godini iznosio je 30 milijuna američkih dolara, a u sljedećih 5 godina, očekuje se da će porasti za 3,8 % i doseći 37 milijuna američkih dolara (Fior Market Research, 2020).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Smeđa alga *Cystoseira barbata*

Za istraživanje su korišteni uzorci smeđe alge *Cystoseira barbata* izronjene u prosincu 2018. godine s obalnog područja Zadra (44°12'42" N; 15°09'23" E). Vrstu alge identificirao je biolog Donat Petricioli. Svježi uzorci alge isprani su u slatkoj i destiliranoj vodi te odmah zamrznuti na -60 °C u zamrzivaču ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska) te je proveden proces liofilizacije 24 sata na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO, (Labogene, Danska). Masa od oko 500 g smrznute alge u jednom je sloju raspoređena na 6 plitica nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao ukupno 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130 – 0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0 °C/18 sati, a izotermna desorpcija pri 20 °C/6 sati. Osušena alga samljevena je električnim mlincem (CM 3260, Grundig, Njemačka), a prah je skladišten na -20 °C do provođenja ekstrakcije.

3.1.2. Kemikalije

- aceton (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 96 %-tni etanol (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- destilirana voda
- klorovodična kiselina (TKI Hrastnik, Slovenija)
- apsolutni etanol (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- natrijev karbonat 20 %-tni

PRIPREMA: 200 g anhidrida natrijeva karbonata (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska) otopi se u 800 mL vruće destilirane vode u odmjernu tikvicu volumena 1000 mL, a zatim ohladi na sobnu temperaturu. Doda se nekoliko kristalića natrijeva karbonata i tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Nakon 24 sata pripremljena otopina se filtrira.

- Folin-Ciocalteu reagens (Merck KGaA, Njemačka)
- sumporna kiselina, 95 % (Scharlab S.L., Španjolska)
- D (+)-glukoza (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- fenol, 5 %-tna otopina

PRIPREMA: 5 g kristala fenola (nestabiliziranog, pročišćenog redestilacijom) (Sigma-Aldrich, SAD) otopi se u 100 mL destilirane vode

- kalijev sulfat (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- želatina, 3 %-tna otopina
PRIPREMA: 0,3 g želatine (Acros Organics, Belgija) otopi se u 100 mL vode temperature 70 °C i pohrani preko noći u hladnjak na 4°C.
- otopina želatine (3 %)-barijev klorid
PRIPREMA: 2 g barijeva klorida (GmbH, Njemačka) otopi se u prethodno pripremljenoj otopini želatine i ostavi mirovati 2 – 3 h na 25 °C.
- trikloroctena kiselina (TCA)
PRIPREMA: 3 g TCA (Fisher Scientific, UK) otopi se u 100 mL destilirane vode
- L-cistein, 3 %-tni
PRIPREMA: 3 g L-cisteina (Sigma-Aldrich, SAD) otopi se u 100 mL destilirane vode

3.1.3. Aparatura

- analitička vaga, AX224 (Ohaus, New Jersey)
- analitička vaga, ABT 220-4M (Kern, Njemačka)
- centrifuga, Rotofix 32 (HETTICH, Njemačka)
- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- magnetna miješalica, RT 5 (IKA, Njemačka)
- mikrovalni reaktor, Ethos Easy (Milestone, Italija)
- spektrofotometar, UV-1600PC (VWR International, SAD)
- sterilizator, ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)
- vodena kupelj, Rotavapor R-205 (Büchi, Švicarska)
- vortex miješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- zamrzivač ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska)

3.1.4. Pribor

- Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 200 mL, 500 mL)
- filter papir
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL)
- mikropipete (100 µL, 1000 µL i 5000 µL)
- magnetni štapić
- menzure (50 mL, 100 mL)

- odmjerne tikvice (50 mL, 100 mL, 250 mL, 1000 mL)
- petrijeve zdjelice
- plastične kivete (15 mL, 50 mL)
- plastične žlice
- staklene epruvete
- stakleni lijevak
- špatula

3.2. METODE

3.2.1. Predtretman

Postupak koji prethodi ekstrakciji polisaharida provodi se na način da se u Erlenmeyerovu tikvicu od 500 mL izvaže 10 g uzorka alge *C. barbata*, potom se dodaje 250 mL acetona te magnetni štapić. Tikvica se zatim prekriva parafilmom te stavlja na magnetnu miješalicu (brzina miješanja – 5). Nakon 18 sati, sadržaj tikvice se filtrira te se filtrat prenosi u odmjernu tikvicu od 250 mL, nadopuni se do oznake acetonom i čuva pri 4 °C do provođenja analiza (određivanje koncentracije ukupnih fenola i pigmenata). Na talog se ponovo stavlja magnetni štapić te se dodaje 250 mL etanola koji je prethodno zagrijan na 70 °C. Tikvica se zatvori vatom te stavi na magnetnu miješalicu uz grijanje na 70 °C. Nakon 4 sata sadržaj tikvice se filtrira, filtrat se prenosi u odmjernu tikvicu od 250 mL, nadopuni do oznake etanolom i čuva u hladnjaku do provođenja analiza. Talog se prebaci u Petrijevu zdjelicu te se suši na zraku 3 dana. Osušeni talog čuva se u plastičnoj posudi do provođenja postupka ekstrakcije polisaharida.

3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida

Za provođenje postupka ekstrakcije polisaharida na analitičkoj vagi izvaže se 1 g predtretiranog i osušenog uzorka alge *C. barbata* u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL. Zatim se u tikvicu dodaje 30 mL odgovarajućeg ekstrakcijskog otapala (voda ili 0,1 M HCl) zagrijanog na 80 °C i magnetni štapić. Tikvica se zatvori vatom i postavlja 3 sata na magnetnu miješalicu uz zagrijavanje na 80 °C (brzina miješanja – 5).

3.2.3. Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE) odvija se u mikrovalnom reaktoru Ethos Easy (Milestone, Italija). Uzorak se priprema tako da se u ekstrakcijsku ćeliju odvaže 1 g predtretiranog i osušenog uzorka te se dodaju magnetni štapić i

30 mL odgovarajućeg otapala. Čelija se zatvara i postavlja na postolje mikrovalnog reaktora na kojem se zatim postavljaju temperatura i vrijeme ekstrakcije prema planu eksperimenta prikazanom u tablici 1. Maksimalna snaga uređaja je 1900 W, a primijenjena snaga ovisi o postavljenoj temperaturi. Vrijeme potrebno za zagrijavanje na željenu temperaturu postavi se na 5 min, a vrijeme hlađenja nakon ekstrakcije također na 5 min.

Tablica 1. Uvjeti provođenja ekstrakcije polisaharida potpomognute mikrovalovima iz alge *Cystoseira barbata*

Oznaka	Otapalo	Vrijeme (min)	Temperatura (°C)
V1	H ₂ O	10	40
V2	H ₂ O	10	60
V3	H ₂ O	10	80
V4	H ₂ O	15	40
V5	H ₂ O	15	60
V6	H ₂ O	15	80
V7	H ₂ O	20	40
V8	H ₂ O	20	60
V9	H ₂ O	20	80
C1	0,1 M HCl	10	40
C2	0,1 M HCl	10	60
C3	0,1 M HCl	10	80
C4	0,1 M HCl	15	40
C5	0,1 M HCl	15	60
C6	0,1 M HCl	15	80
C7	0,1 M HCl	20	40
C8	0,1 M HCl	20	60
C9	0,1 M HCl	20	80

3.2.4. Postupci nakon ekstrakcije

Nakon provedbe konvencionalne ekstrakcije polisaharida i ekstrakcije polisaharida potpomognuta mikrovalovima, ekstrakt se profiltrira kroz filter papir u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL u koju se zatim dodaje 60 mL apsolutnog etanola. Sadržaj tikvice se promiješa, zatvori parafilmom te stavlja u hladnjak na 4 °C preko noći kako bi se istaložili polisaharidi. Idućeg dana, sadržaj tikvice se prebacuje u plastične kivete i centrifugira 20 minuta na 5000 okretaja/min. Nakon filtracije, filtrat se prebacuje u odmjernu tikvicu od 100 mL, nadopuni do oznake ekstrakcijskim otapalom i čuva u hladnjaku na 4 °C do provođenja analize (određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata). Talog se metalnom špatulom prenosi na prethodno

izvagane i označene Petrijeve zdjelice te se suši do konstantne mase nakon čega se tučkom dodatno usitnjava. Prenosi se u plastične kivete od 15 mL i čuva u hladnjaku do provođenja analiza (određivanje koncentracije fukoze i sulfatnih grupa). Iz dobivenih masa računa se prinos polisaharida (% PS) prema formuli [1] (Rodriguez-Jasso i sur., 2011):

$$\% \text{ PS} = \frac{M_T}{M_0} \times 100 \quad [1]$$

gdje su:

% PS – prinos polisaharida

M_T – masa (g) nakon taloženja etanolom

M_0 – masa alge (g) korištena za eksperiment

3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata

Princip metode:

Za određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata korištena je fenol-sumporna metoda (Dubois i sur., 1956). Metoda se temelji na reakciji ugljikohidrata poput jednostavnih šećera, oligosaharida, polisaharida i njihovih derivata u prisutnosti jake kiseline i topline, pri čemu se stvaraju derivati furana koji se kondenziraju s fenolom te nastaju stabilni žuto-zlatni spojevi. Takvi spojevi se mjere spektrofotometrijski na valnoj duljini od 490 nm (Nielsen, 2010).

Postupak rada:

U staklenu epruvetu otpipetira se 400 μL uzorka i 400 μL 5 %-tne otopine fenola. Zatim se dodaje 2 mL koncentrirane H_2SO_4 pri čemu je potrebno paziti da se kiselina dodaje u jednom mlazu direktno u epruvetu, bez diranja stjenki. Na isti način se priprema i slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima voda ili 0,1 M HCl, ovisno o tome koje otapalo je korišteno pri ekstrakciji. Svako mjerenje provodi se u paraleli. Sadržaj epruveta se promiješa na vortexu te se epruveta stavlja 20 minuta u vodenu kupelj na 25 °C. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji, mjeri se apsorbancija pri 490 nm na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD) (Li i sur., 2012).

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 10 mg glukoze koja se otopi u 100 mL vode u odmjerneju tikvici od 100 mL. Iz tako pripremljene otopine glukoze (100 mg L^{-1}) rade se

razrjeđenja koncentracija 20, 40, 60 i 80 mg L⁻¹. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 400 μL i postupa po propisu za određivanje ukupnih ugljikohidrata. Iz izmjerenih vrijednost apsorbancija nacrtana se baždarni pravac čija jednačba [2] glasi:

$$y = 0,0092x + 0,0149 \quad [2]$$

$$R^2 = 0,9938$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 490 nm

x – koncentracija otopine glukoze (mg L⁻¹)

3.2.6. Određivanje koncentracije fukoze

Princip metode:

Određivanje koncentracije fukoze se provodi spektrofotometrijskom metodom koju su razvili Dische i Shettles (1948). Ekstraktu polisaharida dodaje se razrijeđena sumporna kiselina, a nakon zagrijavanja na 100 °C nastaje obojeni produkt te se potom dodaje L-cistein koji se veže s kromoforom. Nastali obojeni produkt ima maksimum apsorpcije na 396 nm te gotovo ne apsorbira na 427 nm. Drugi šećeri također stvaraju obojeni produkt s L-cisteinom i imaju maksimum apsorpcije na 396 nm, ali i na 427 nm. Zbog toga je razlika u apsorpciji na te dvije valne duljine apsorpcija same fukoze.

Postupak rada:

U staklenu epruvetu se odvaže 5 mg uzorka polisaharida, doda 5 mL destilirane vode te se uzorak dobro promiješa na vortex miješalici. Nakon toga se u novu staklenu epruvetu otpipetira 1 mL tako pripremljenog uzorka te se u epruvetu, koja je uronjena u ledenu kupelj, zatim dodaje 4,5 mL razrijeđene sumporne kiseline (1:6, H₂O:H₂SO₄). Uzorak se potom stavlja u vodenu kupelj (Rotavapor R-205, Büchi, Švicarska) 10 minuta na 100 °C, a zatim se u ledenoj kupelji hladi na sobnu temperaturu. Nakon hlađenja dodaje se 0,1 mL otopine 3 %-tnog L-cisteina, ostavlja se 30 minuta na sobnoj temperaturi te se mjeri apsorbancija pri 396 i 427 nm (Baba i sur., 2018) na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD). Slijepa proba priprema se na isti način, ali se ne dodaje L-cistein. Sva mjerenja se provode u paraleli.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za pripremu baždarnog pravca odvažuje se 5 mg standarda fukoidana koji se otopi u 5 mL destilirane vode. Iz tako pripremljene otopine fukoidana rade se razrjeđenja u rasponu od 0,05 do 0,2 mg mL⁻¹. Od svakog razrjeđenja otpipetira se po 1 mL i postupa po propisu za određivanje koncentracije fukoze. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana se baždarni pravac čija jednažba [3] glasi:

$$y = 3,5584x - 0,0769 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9945$$

gdje je:

y – razlika apsorbancija pri 396 nm i 427 nm

x – koncentracija otopine fukoidana (mg L⁻¹)

3.2.7. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa

Princip metode:

Određivanje koncentracije sulfatnih grupa provodi se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na taloženju sulfatnih grupa dodatkom BaCl₂-želatine, standardne otopine K₂SO₄ te trikloroctene kiseline u otopinu polisaharida. Oslobođeni BaSO₄ mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 360 nm (Dodgson, 1961).

Postupak rada:

U staklenu epruvetu s navojem odvažuje se 8 mg uzorka polisaharida te se dodaje 3 mL 1 M HCl. Epruveta se zatvori čepom, promiješa na vortexu i stavlja u ultrazvučnu kupelj na 3 minute. Nakon toga, uzorak se stavlja u pećnicu ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska) na 5 sati pri 105 °C. Nakon hidrolize, 0,2 mL uzorka se pomiješa s 3,8 mL trikloroctene kiseline i 1 mL otopine BaCl₂-želatine. Nakon 15 minuta termostatiranja na sobnoj temperaturi, na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD) se mjeri apsorbancija pri 360 nm (Song i sur., 2018). Na isti način se priprema i slijepa proba, samo što se umjesto standardne otopine K₂SO₄ dodaje destilirana voda. Sva mjerenja su napravljena u paraleli.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti otopinu standarda K₂SO₄ na način da se prah K₂SO₄ osuši pri 105 °C i zatim se izvažuje točno 181,4 mg te se otopi u 100 mL 1 mol L⁻¹ HCl. Iz tako pripremljene otopine K₂SO₄, koja sadrži 1 g L⁻¹ sulfatnih grupa, radi se niz od 5

razrjeđenja. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 200 μL i postupa po propisu za određivanje koncentracije sulfatnih grupa. Dobivene vrijednosti apsorbancije služe za izradu baždarnog pravca s jednadžbom [4]:

$$y = 0,265x - 0,0161 \quad [4]$$

$$R^2 = 0,989$$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 360 nm

x – koncentracija sulfata (g L^{-1})

3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Princip metode:

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodi se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanjem obojenog produkta. Folin-Ciocalteu reagens, odnosno smjesa fosfomolibdenove i fosfomolibden kiseline, reagira s fenoksid ionom iz uzorka pri čemu se fenoksid-ion oksidira, a Folin-Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Izmjereni intenzitet nastalog obojenja pri valnoj duljini 765 nm je direktno proporcionalan koncentraciji fenola (Shortle i sur., 2014).

Postupak rada:

U staklenu epruvetu se otpipetira 100 μL razrijeđenog ekstrakta, 200 μL Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL 20 %-tne zasićene otopine natrijeva karbonata i promiješa pomoću vortexa. Uzorak se termostatira u vodenoj kupelji 25 min na 50 $^{\circ}\text{C}$, a zatim se na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD) mjeri apsorbancija pri 765 nm. Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto uzorka dodaje destilirana voda. Sva mjerenja su provedena u paraleli.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 %-tnog etanola u odmjernoj tikvici od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Iz tako pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja koncentracija 50, 100, 150, 250 i

500 mg L⁻¹. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 100 μL i postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola. Iz izmjerenih vrijednost apsorbancija nacrtana se baždarni pravac čija jednadžba [5] glasi:

$$y = 0,0035 \times x \quad [5]$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

Dobivene masene koncentracije (mg L⁻¹) preračunate su i izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline na gram suhe tvari praha (mg GAE/g s.tv.).

3.2.9. Određivanje klorofila a, klorofila b i karotenoida UV/Vis spektrofotometrijom

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje udjela klorofila a, klorofila b i karotenoida temelji se na jakim apsorpcijskim spektrima tih pigmenta. Apsorpcijski maksimumi ekstrahiranih pigmenta uvelike ovise o vrsti otapala te u određenoj mjeri o tipu spektrofotometra koji se koristi (Lichtenthaler i Buschmann, 2005).

Postupak određivanja:

Kvantitativno određivanje provodi se spektrofotometrom UV-1600PC (VWR International, SAD) pri valnim duljinama od: 644,8 nm, 661,6 nm, 664 nm i 649 nm za klorofil a i klorofil b te 470 nm za karotenoide. Svako mjerenje provodi se u paraleli, a kao slijepa proba koriste se otapala korištena za ekstrakciju, tj. aceton i etanol. Udjeli klorofila a i b te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2005):

Aceton:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8} \quad [6]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 20,13 A_{644,8} - 4,19 A_{661,6} \quad [7]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 1,9C_a - 63,14C_b)/214 \quad [8]$$

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad [9]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad [10]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b)/209 \quad [11]$$

gdje je:

A = apsorbancija

C_a = klorofil a

C_b = klorofil b

C_(x+c) = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

3.2.10. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: % PS, koncentracija ukupnih ugljikohidrata (mg g^{-1}), koncentracija sulfatnih grupa (%) i koncentracija fukoze (%) dok su neovisne varijable bile: (a) otapalo (voda i 0,1 M HCl), (b) vrijeme (10, 15 i 20 min), (c) temperatura (40, 60 i 80 °C). Kontinuirane varijable analizirane su uz pomoć multivarijantne analize varijance (multifaktorska ANOVA), a višestruko uspoređivanje provedeno je Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,01$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je konvencionalna ekstrakcija polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata* gdje je kao otapalo korišteno 30 mL destilirane vode i 0,1 M HCl, pri temperaturi od 80 °C i vremenu trajanja od 3 sata te mikrovalovima potpomognuta ekstrakcija (MAE) gdje je kao otapalo korišteno 30 mL destilirane vode i 0,1 M HCl pri različitim temperaturama (40, 60 i 80°C) i vremenu ekstrakcije (10, 15 i 20 min). Napravljena je usporedba konvencionalne ekstrakcije i MAE te je istražen utjecaj uvjeta ekstrakcije i njihovih kombinacija na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati mjerenja prinosa polisaharida (%), koncentracije ukupnih ugljikohidrata (mg g^{-1}), udjela sulfatnih grupa (%) i udjela fukoze (%) iz ekstrakata polisaharida dobivenih ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (V1 – V9 i C1 – C9) te konvencionalnom ekstrakcijom (KV i KC)

Uzorak	Otapalo	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	% Polisaharida	Ukupni ugljikohidrati (mg g^{-1})	Sulfatne grupe (%)	Fukoza (%)
V1	H ₂ O	40	10	3,53 ± 0,00	1,46 ± 0,06	70,31 ± 1,58	5,90 ± 0,04
V2	H ₂ O	60	10	4,37 ± 0,00	1,83 ± 0,02	55,20 ± 1,60	5,63 ± 0,02
V3	H ₂ O	80	10	5,39 ± 0,00	1,94 ± 0,02	52,84 ± 1,58	6,95 ± 0,06
V4	H ₂ O	40	15	3,81 ± 0,00	1,27 ± 0,01	65,89 ± 6,10	5,60 ± 0,06
V5	H ₂ O	60	15	4,78 ± 0,00	1,74 ± 0,02	60,11 ± 0,79	5,18 ± 0,12
V6	H ₂ O	80	15	2,85 ± 0,00	1,64 ± 0,04	26,26 ± 2,10	9,10 ± 0,08
V7	H ₂ O	40	20	0,75 ± 0,00	2,28 ± 0,01	25,20 ± 0,21	7,71 ± 0,22
V8	H ₂ O	60	20	2,12 ± 0,00	1,67 ± 0,01	37,13 ± 1,62	12,11 ± 0,52
V9	H ₂ O	80	20	2,80 ± 0,00	1,18 ± 0,03	25,59 ± 0,30	10,48 ± 0,64
C1	0,1 M HCl	40	10	4,22 ± 0,00	1,40 ± 0,07	92,00 ± 2,20	7,46 ± 0,06
C2	0,1 M HCl	60	10	5,13 ± 0,00	2,50 ± 0,06	75,79 ± 0,70	22,40 ± 1,05
C3	0,1 M HCl	80	10	7,54 ± 0,00	5,87 ± 0,03	35,77 ± 0,20	42,01 ± 0,74
C4	0,1 M HCl	40	15	4,43 ± 0,00	1,70 ± 0,06	74,94 ± 2,90	7,98 ± 0,12
C5	0,1 M HCl	60	15	5,35 ± 0,00	2,42 ± 0,12	62,56 ± 3,06	20,32 ± 0,79
C6	0,1 M HCl	80	15	3,40 ± 0,00	2,14 ± 0,04	36,45 ± 0,70	30,85 ± 2,34
C7	0,1 M HCl	40	20	2,36 ± 0,00	1,64 ± 0,08	68,86 ± 5,10	15,59 ± 1,56
C8	0,1 M HCl	60	20	2,81 ± 0,00	1,39 ± 0,01	54,78 ± 0,20	17,69 ± 1,29
C9	0,1 M HCl	80	20	4,28 ± 0,00	4,64 ± 0,10	39,29 ± 2,17	61,74 ± 3,62
KV	H ₂ O	80	180	6,65 ± 0,00	1,58 ± 0,01	45,30 ± 0,98	8,79 ± 0,68
KC	0,1 M HCl	80	180	9,53 ± 0,00	4,88 ± 0,21	37,72 ± 1,26	20,04 ± 0,14

Tablica 3. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te kombinacije navedenih parametara na prinos polisaharida (%), koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (mg g^{-1}), udio sulfatnih grupa (%) i udio fukoze (%)

	N	% Polisaharida	Ukupni ugljikohidrati (mg g^{-1})	Sulfatne grupe (%)	Fukoza (%)
Otapalo		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
H ₂ O	18	$3,38 \pm 0,01^a$	$1,67 \pm 0,01^a$	$46,51 \pm 0,57^a$	$7,63 \pm 0,28^a$
0,1 M HCl	18	$4,39 \pm 0,01^b$	$2,63 \pm 0,01^b$	$60,05 \pm 0,57^b$	$25,11 \pm 0,28^b$
Temperatura (°C)		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
40	12	$3,18 \pm 0,01^a$	$1,63 \pm 0,02^a$	$66,20 \pm 0,70^c$	$15,06 \pm 0,35^b$
60	12	$4,09 \pm 0,01^b$	$1,92 \pm 0,02^b$	$57,60 \pm 0,70^b$	$13,17 \pm 0,35^a$
80	12	$4,38 \pm 0,01^c$	$2,90 \pm 0,02^c$	$36,04 \pm 0,70^a$	$20,89 \pm 0,35^c$
Vrijeme (min)		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
10	12	$5,03 \pm 0,01^c$	$2,50 \pm 0,02^c$	$63,65 \pm 0,70^c$	$8,37 \pm 0,35^a$
15	12	$4,10 \pm 0,01^b$	$1,82 \pm 0,02^a$	$54,37 \pm 0,70^b$	$13,89 \pm 0,35^b$
20	12	$2,52 \pm 0,01^a$	$2,13 \pm 0,02^b$	$41,81 \pm 0,70^a$	$26,86 \pm 0,35^c$
Otapalo; temperatura (°C)		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
H ₂ O; 40	6	$2,70 \pm 0,01^a$	$1,67 \pm 0,02^{a,b}$	$53,80 \pm 1,00^b$	$6,40 \pm 0,49^a$
H ₂ O; 60	6	$3,76 \pm 0,01^c$	$1,74 \pm 0,02^b$	$50,81 \pm 1,00^b$	$7,64 \pm 0,49^{a,b}$
H ₂ O; 80	6	$3,68 \pm 0,01^b$	$1,59 \pm 0,02^a$	$34,90 \pm 1,00^a$	$8,84 \pm 0,49^{b,c}$
0,1 M HCl; 40	6	$3,67 \pm 0,01^b$	$1,58 \pm 0,02^a$	$78,60 \pm 1,00^d$	$10,34 \pm 0,49^c$
0,1 M HCl; 60	6	$4,43 \pm 0,01^d$	$2,10 \pm 0,02^c$	$64,38 \pm 1,00^c$	$20,13 \pm 0,49^d$
0,1 M HCl; 80	6	$5,07 \pm 0,01^e$	$4,22 \pm 0,02^d$	$37,17 \pm 1,00^a$	$44,87 \pm 0,49^e$
Otapalo; vrijeme (min)		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
H ₂ O; 10	6	$4,43 \pm 0,01^d$	$1,74 \pm 0,02^b$	$59,45 \pm 1,00^d$	$6,16 \pm 0,49^a$
H ₂ O; 15	6	$3,81 \pm 0,01^c$	$1,55 \pm 0,02^a$	$50,75 \pm 1,00^c$	$6,63 \pm 0,49^a$
H ₂ O; 20	6	$1,89 \pm 0,01^a$	$1,71 \pm 0,02^b$	$29,31 \pm 1,00^a$	$10,10 \pm 0,49^b$
0,1 M HCl; 10	6	$5,63 \pm 0,01^e$	$3,25 \pm 0,02^e$	$67,85 \pm 1,00^e$	$23,96 \pm 0,49^d$
0,1 M HCl; 15	6	$4,39 \pm 0,01^d$	$2,09 \pm 0,02^c$	$57,98 \pm 1,00^{c,d}$	$19,72 \pm 0,49^c$
0,1 M HCl; 20	6	$3,15 \pm 0,01^b$	$2,56 \pm 0,02^d$	$54,31 \pm 1,00^{b,c}$	$31,67 \pm 0,49^e$
Vrijeme (min); temperatura (°C)		$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$	$p \leq 0.01^\dagger$
10; 40	4	$3,87 \pm 0,01^e$	$1,43 \pm 0,03^a$	$81,15 \pm 1,22^e$	$6,68 \pm 0,60^a$
10; 60	4	$4,75 \pm 0,01^g$	$2,16 \pm 0,03^d$	$65,50 \pm 1,22^{c,d}$	$14,01 \pm 0,60^{b,c}$
10; 80	4	$6,47 \pm 0,01^i$	$3,91 \pm 0,03^f$	$44,31 \pm 1,22^b$	$24,48 \pm 0,60^e$
15; 40	4	$4,12 \pm 0,01^f$	$1,49 \pm 0,03^a$	$70,42 \pm 1,22^d$	$6,79 \pm 0,60^a$
15; 60	4	$5,07 \pm 0,01^h$	$2,08 \pm 0,03^{c,d}$	$61,33 \pm 1,22^c$	$12,75 \pm 0,60^{b,c}$
15; 80	4	$3,13 \pm 0,01^c$	$1,90 \pm 0,03^b$	$31,36 \pm 1,22^a$	$19,98 \pm 0,60^d$
20; 40	4	$1,56 \pm 0,01^a$	$1,96 \pm 0,03^{b,c}$	$47,03 \pm 1,22^b$	$11,65 \pm 0,60^b$
20; 60	4	$2,47 \pm 0,01^b$	$1,53 \pm 0,03^a$	$45,95 \pm 1,22^b$	$14,90 \pm 0,60^c$
20; 80	4	$3,54 \pm 0,01^d$	$2,91 \pm 0,03^e$	$32,44 \pm 1,22^a$	$36,11 \pm 0,60^f$
Prosječna vrijednost	36	3,88	2,15	53,28	16,37

Bilješka. Vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,01$.

*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardna pogreška.

† Statistički značajni parametar kod $p \leq 0,01$.

Statističkom obradom podataka istražen je utjecaj otapala, temperature i vremena te njihov kombinirani utjecaj na prinos polisaharida (%), koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (mg g^{-1}), udio sulfatnih grupa (%) i udio fukoze (%), a rezultati su prikazani u tablici 3. Dobiveni rezultati ukazuju na to da su svi parametri pojedinačno i kombinirano statistički značajni ($p \leq 0,01$).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je metoda koja se uspješno koristi u ekstrakciji različitih biološki aktivnih spojeva, ali je do sad rijetko korištena za ekstrakciju polisaharida iz smeđih algi, čime je ograničen broj dostupnih istraživanja. Prema tablici 3, dobivena prosječna vrijednost prinosa polisaharida iznosi 3,88 % što odgovara istraživanju koje su proveli Okolie i sur. (2019) uspoređujući MAE s drugim nekonvencionalnim tehnikama ekstrakcije polisaharida iz smeđe alge *Ascophyllum nodosum* gdje su dobili prosječnu vrijednost prinosa od 5,71 %. Proučavajući utjecaj nekonvencionalnih metoda ekstrakcije polisaharida na antibakterijsku i antivirusnu aktivnost polisaharida izoliranog iz smeđe alge *Nizamuddinia zanardinii*, Alboofetileh i sur. (2019) su primjenom MAE dobili malo veću prosječnu vrijednost prinosa polisaharida koja iznosi 6,17 %. U usporedbi s navedenim istraživanjima, gdje prosječne vrijednosti prinosa polisaharida odgovaraju vrijednosti ovog istraživanja, Rodriguez-Jasso i sur. (2011) koristeći MAE za izolaciju fukoidana iz smeđe alge *Fucus vesiculosus* dobili su značajno veću prosječnu vrijednost prinosa koja iznosi 10,30 %, a Yuan i Macquarrie (2015a), izolirajući polisaharide iz smeđe alge *A. nodosum* dobili su vrijednost od 11,97 %. Prinos polisaharida dobiven konvencionalnom ekstrakcijom prikazan u tablici 2 (6,65 % i 9,53 %) veći je od prinosa koji su za algu *C. barbata* dobili Sellimi i sur. (2014) koji iznosi 5,45 % te je veći od prinosa koji su za vrste roda *Cystoseira* dobili Hadj Ammar i sur. (2015) koji iznosi oko 3 %. Razlog različitih vrijednosti prinosa polisaharida može biti zbog toga što alge mogu imati različit sastav ovisno o vrsti alge, godišnjem dobu i geografskom području rasta (Hentati i sur., 2020). Također bitni parametri koji utječu na prinos polisaharida i različiti kemijski sastav alge su vrijeme izrona i metoda kojom se provodi ekstrakcija (Hadj Ammar i sur., 2015).

Prema tablici 3, prosječna vrijednost koncentracije ukupnih ugljikohidrata iznosi 2,15 mg g^{-1} što je značajno manje nego što je dobiveno u drugim istraživanjima gdje je za ekstrakciju polisaharida korištena MAE. Yuan i Macquarrie (2015b) su za smeđu algu *A. nodosum* dobili prosječnu vrijednost ukupnih ugljikohidrata od 10,87 %, a Alboofetileh i sur. (2019) su u svom istraživanju za smeđu algu *N. zanardinii* dobili prosječnu vrijednost ukupnih ugljikohidrata od 51,27 %. Osim vrste i geografskog područja rasta, veliki učinak na udio ugljikohidrata u algi

ima starost alge i godišnje doba u kojem se odvija izron. Odabir neodgovarajućeg godišnjeg doba za izron alge može biti razlog velikom odstupanju rezultata prosječne vrijednosti ugljikohidrata dobivenih u navedenim istraživanjima. Alge u proljeće kreću stvarati rezerve ugljikohidrata kako bi preživjele zimu u kojoj skoro pa i nemaju mogućnost fotosinteze. Zbog toga je poželjno obaviti izron algi početkom zime jer će tada one sadržavati veću količinu polisaharida (Rodriguez-Jasso i sur., 2011). Prosječna vrijednost udjela sulfatnih grupa u ovom istraživanju iznosi 53,28 % što je znatno viša vrijednost u usporedbi s rezultatima Rodriguez-Jasso i sur. (2011) koji su dobili 24,34 %, Alboofetileh i sur. (2019) koji su dobili 24,09 % te Okolie i sur. (2019) s prosječnom vrijednosti udjela sulfatnih grupa od 18,8 %. Prema tablici 3, dobivena prosječna vrijednost udjela fukoze od 16,37 % je manja od prosječne vrijednosti koju su dobili Yuan i Macquarrie (2015b) (41,25 %), Okolie i sur. (2019) (37,0 %) te Alboofetileh i sur. (2019) (36,29 %).

4.1. USPOREDBA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE I EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA

Fukoidan i drugi sulfatirani polisaharidi koji se nalaze u staničnim stijenkama algi najčešće se ekstrahiraju konvencionalnim metodama koje uključuju korištenje vruće vode, razrijeđenih kiselina ili lužina uz dugo vrijeme ekstrakcije i upotrebu velikih volumena otapala (Rodriguez-Jasso i sur., 2011). Općenito, konvencionalna ekstrakcija polisaharida pokazuje nedostatke poput visoke temperature ekstrakcije, dugog vremena ekstrakcije i velike potrošnje otapala i energije (Ren i sur., 2017). Konvencionalne metode ekstrakcije su se pri određenim uvjetima pokazale uspješne u izolaciji polisaharida s izraženom biološkom aktivnosti kao što je citotoksično djelovanje na P388 stanice mišje leukemije (Liu i sur., 2016), inhibitorna aktivnost za herpes virus HSV-2 (Alboofetileh i sur., 2019), antitumorsko djelovanje na ljudske stanice raka debelog crijeva HCT 116 (Foley i sur., 2011) te značajno poboljšanje stope rasta probiotičke bakterije *L. delbruecki* ssp *bulgaricus* (Okolie i sur., 2019).

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) je nova, nekonvencionalna tehnika ekstrakcije koja je razvijena tijekom proteklog desetljeća te je privukla značajnu pozornost zbog svog mehanizma zagrijavanja, umjerenih troškova i dobrih performansi gdje se postižu slični ili bolji prinosi u usporedbi s konvencionalnim metodama ekstrakcije, koristeći manje energije i volumena otapala uz kraće vrijeme ekstrakcije (Mussatto, 2015). Također se pokazala kao jedna od najučinkovitijih i ekološki najprihvatljivijih metoda ekstrakcije različitih prirodnih i biološki aktivnih spojeva te bi mogla prevladati nedostatke tradicionalnih metoda ekstrakcije.

Potrebno je provesti još istraživanja i dodatno optimirati metodu zbog mogućih nedostataka poput narušavanja kemijske strukture i bioaktivnosti fukoidana ili drugih ciljanih spojeva (Ren i sur., 2017) te moguće degradacije spojeva osjetljivih na toplinu (Garcia-Vaquero i sur., 2016). Za sada se MAE pokazala kao obećavajuća metoda za izolaciju biološki aktivnih spojeva iz morskih algi, što su pokazali i Alboofetileh i sur. (2019) ekstrakcijom polisaharida iz alge *N. zanardiinii*, pri čemu ekstrakt polisaharida izoliran pomoću MAE pokazuje snažnu antivirusnu aktivnost protiv virusa herpesa HSV-2 te inhibitorno djelovanje na *E. coli*. Okolie i sur. (2019) su usporedbom različitih metoda ekstrakcije uz pomoć MAE izolirali polisaharide (fukoidan) iz alge *A. nodosum* koji je pri koncentraciji od 0,5 % poboljšao stopu rasta probiotičke bakterije *L. delbruecki* ssp. *bulgaricus* za 24,5 %, što je znatno više od ekstrakata fukoidana dobivenih drugim metodama ekstrakcije. Također, Yuan i Macquarrie (2015a) su utvrdili da polisaharidi iz alge *A. nodosum* izolirani pomoću MAE, pokazuju antioksidacijska svojstva te da bi mogli služiti kao prirodni izvor antioksidansa.

U ovom istraživanju, dobivena prosječna vrijednost prinosa polisaharida konvencionalnom ekstrakcijom iznosi 8,09 %, a MAE 3,88 %. Iz navedenih rezultata je vidljivo da je dvostruko veći prinos polisaharida dobiven upotrebom konvencionalne ekstrakcije u odnosu na MAE, što je i u skladu s istraživanjem Okolie i sur. (2019) gdje je prinos polisaharida iz alge *A. nodosum* izoliranog konvencionalnom ekstrakcijom iznosio 11,9 %, a prinos polisaharida upotrebom MAE iznosio je 5,71 %. Yuan i Macquarrie (2015a) su za istu algu također dobili veći prinos polisaharida konvencionalnom ekstrakcijom (20,08 %), nego primjenom MAE (11,97 %). Razlog smanjenog prinosa djelovanjem MAE bi mogla biti velika razlika između vremena trajanja konvencionalne ekstrakcije (3 h) i MAE (10 – 20 min) te je potrebno provesti daljnja istraživanja u kojima bi vrijeme trajanja MAE bilo duže od vremena postavljenih u ovom istraživanju.

Prosječna vrijednost koncentracije ukupnih ugljikohidrata u ovom istraživanju je nešto veća pri korištenju konvencionalne ekstrakcije (3,21 mg g⁻¹) nego MAE (2,15 mg g⁻¹), što odgovara istraživanju Alboofetileh i sur. (2019) gdje je za algu *N. zanardiinii* konvencionalnom ekstrakcijom dobiveno 58,13 %, dok je korištenjem MAE dobiveno 51,27 % ukupnih ugljikohidrata. Također, u istom istraživanju, dobivena prosječna vrijednost udjela sulfatnih grupa veća je kod ekstrakata dobivenih MAE (24,09 %) u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju (18,44 %), što odgovara ovom istraživanju gdje je konvencionalnom ekstrakcijom dobiveno 41,51 % sulfatnih grupa, a djelovanjem MAE 53,28 %. S druge strane, Okolie i sur. (2019) te Yuan i Macquarrie (2015a) dobili su veći udio sulfatnih grupa upotrebom

konvencionalne ekstrakcije u odnosu na MAE. Prosječna vrijednost udjela fukoze u ovom istraživanju upotrebom konvencionalne ekstrakcije je nešto manja (14,42 %) nego upotrebom MAE (16,37 %), što se slaže s istraživanjem Alboofetileh i sur. (2019), gdje je pomoću MAE dobivena malo veća vrijednost udjela fukoze (36,29 %) u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju (31,29 %), dok su Yuan i Macquarrie (2015a) dobili dvostruko veći udio fukoze upotrebom konvencionalne ekstrakcije u odnosu na MAE.

4.2. UTJECAJ OTAPALA NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata* primjenom MAE. Korištena otapala su destilirana voda i 0,1 M HCl te je istražen njihov utjecaj na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze. Statističkom obradom podataka (Tablica 3.) pokazano je da je otapalo statistički značajan parametar za sve promatrane varijable.

4.2.1. Utjecaj otapala na prinos polisaharida

Otapala koja se najčešće koriste pri ekstrakciji polisaharida iz algi su voda, razrijeđene kiseline (najčešće klorovodična i sumporna kiselina) i soli od kojih se najčešće koristi kalcijev klorid (Flórez-Fernández i sur., 2018). Ekstrakcija vrućom vodom je jednostavna metoda koja je prikladna za industrijsku upotrebu te pruža relativno visok prinos polisaharida. Pokazuje nisku stopu ekstrakcije te je veoma dugotrajna, no njenom primjenom se može izbjeći promjena strukture fukoidana i drugih spojeva, ako se ne koriste jako visoke temperature (Zhang i sur., 2020). Korištenje razrijeđenih kiselina u ekstrakciji omogućuje hidrolizu staničnih stijenki, olakšavajući ekstrakciju fukoidana iz matrice povećavajući prinos fukoidana uz istovremeno prevođenje alginata u alginsku kiselinu, koja nije topljiva u vodi i može se jednostavno izdvojiti ostavljajući relativno čisti fukoidan u ekstraktu (Lim i Wan Aida, 2017). Iako korištenje razrijeđenih kiselina povećava brzinu i prinos ekstrakcije polisaharida, također dovodi i do razgradnje sulfatnih grupa što utječe na aktivnost polisaharida, dok je za ekstrakciju vrućom vodom pokazano da neće uzrokovati promjenu strukture (Zhang i sur., 2020). Prema tablici 3, upotrebom 0,1 M HCl u MAE dobiven je prinos polisaharida od 4,39 %, što je više od 3,38 % dobivenih upotrebom destilirane vode. I primjenom konvencionalne ekstrakcije veći prinos polisaharida dobiven je primjenom 0,1 M HCl (9,53 %) nego vodom (6,65 %) što je prikazano u tablici 2. Također, veće prinose polisaharida upotrebom HCl-a kao otapala za algu *L. japonica* dobili su Zhang i Row (2015) gdje su ekstrakcijom 0,1 M HCl-om pri 4 h i 80 °C dobili prinos

polisaharida od 16,92 %, dok su primjenom destilirane vode pri istoj temperaturi i vremenu trajanja dobili puno manji prinos od oko 2 %. Istraživanje koje su na algi *S. fusiforme* proveli Liu i sur. (2020) pokazalo je da primjena kiseline također dovodi do većeg prinosa polisaharida. Upotrebom 1 M HCl-a, pri 25 °C i 6 h dobili su prinos polisaharida od 11,24 %, dok su primjenom destilirane vode dobili prinos od 4,63 %.

Na slici 5 su prikazani ekstrakti polisaharida dobiveni MAE neposredno nakon taloženja i centrifugiranja, a prije sušenja. Vidljivo je da su ekstrakti dobiveni destiliranom vodom smeđe boje, a ekstrakti dobiveni 0,1 M HCl-om svjetlije, gotovo bijele boje. Iz navedenog, možemo zaključiti da otapalo ima utjecaj i na boju ekstrakata, a time i čistoću koja se može vizualno odrediti. Tamnija boja ekstrakta ukazuje na to da ekstrakt ima nisku čistoću, dok svjetlija boja ukazuje na veću čistoću, a time i kvalitetu (Baba i sur., 2018). Smeđa boja polisaharida ekstrahiranih u destiliranoj vodi potječe iz pigmenata smeđih algi kao što su fukoksantin, β -karoten te klorofil a i c koji zaostaju u polisaharidima prilikom procesa ekstrakcije (Saepudin i sur., 2017). Iz navedenog se može zaključiti da upotreba 0,1 M HCl-a kao otapala za ekstrakciju polisaharida rezultira ekstraktima s manje nečistoća.



Slika 5. Ekstrakti polisaharida dobiveni upotrebom destilirane vode (smeđi) i 0,1 M HCl-a (bijeli), (fotografija: Vrančić, 2020)

4.2.2. Utjecaj otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

U ovom istraživanju, prema tablici 3, koristeći 0,1 M HCl kao otapalo dobiveno je 2,63 mg g⁻¹ ukupnih ugljikohidrata, što je više od koncentracije od 1,67 mg g⁻¹ dobivene upotrebom

destilirane vode kao otapala. Konvencionalnom ekstrakcijom je isto dobivena veća koncentracija ukupnih ugljikohidrata upotrebom 0,1 M HCl-a ($4,88 \text{ mg g}^{-1}$), nego vode ($1,58 \text{ mg g}^{-1}$) (Tablica 2.). Također, u istraživanju Ahmada (2015) za algu *L. hyperborea* u istim uvjetima temperature i trajanja ekstrakcije, upotrebom 0,1 M HCl-a dobiveno je 7,0 % ukupnih ugljikohidrata, a ekstrakcijom destiliranom vodom dobiveno je 4,2 % ukupnih ugljikohidrata. U istraživanju Liu i sur. (2020) na algi *S. fusiforme*, također je pokazano da upotreba kiseline rezultira većom koncentracijom ukupnih ugljikohidrata. Ekstrakciju vrućom vodom su proveli pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$ i 3 h te dobili 63,53 % ukupnih ugljikohidrata, dok su upotrebom 1,0 M HCl-a pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i 6 h dobili 67,43 %.

4.2.3. Utjecaj otapala na udio sulfatnih grupa

Sulfatirani polisaharidi imaju poseban fiziološki utjecaj na čovjekov organizam, a razlog njihove velike biološke aktivnosti je upravo prisutnost sulfatnih grupa. Za polisaharide koji nisu podrijetlom iz algi i nemaju sulfatne grupe, provodi se sulfatacija, odnosno hidroksilne skupine se supstituiraju sulfatima i takav postupak se često koristi za promjenu sastava, molekulske mase, naboja, topljivosti i konformacije polisaharida kako bi se povećala biološka aktivnost takvih polisaharida (Flórez-Fernández i sur., 2018). Upotreba razrijeđenih kiselina ili lužina prilikom ekstrakcije povećava brzinu ekstrakcije polisaharida, ali dovodi do desulfatacije, što utječe na njihovu biološku aktivnost, dok ekstrakcija vodom neće izazvati promjenu strukture (Zhang i sur. 2020). U ovom istraživanju, prema tablici 3, ekstrakcijom polisaharida destiliranom vodom dobiveno je 46,51 % sulfatnih grupa, dok je ekstrakcijom sa 0,1 M HCl-om dobiven veći udio sulfatnih grupa koji iznosi 60,05 %. Konvencionalnom ekstrakcijom, također je veći udio sulfatnih grupa dobiven upotrebom 0,1 M HCl-a (45,39 %), dok je upotrebom vode dobiveno 37,72 % sulfatnih grupa, što je vidljivo iz tablice 2. Dobiveni rezultati se slažu s istraživanjem January i sur. (2019) koji su za algu *E. maxima*, ekstrakcijom 0,15 M HCl-om pri 2 h i $65 \text{ }^\circ\text{C}$ dobili koncentraciju sulfatnih grupa od 136 mg g^{-1} , što je više od koncentracije koju su dobili ekstrakcijom vrućom vodom pri 24 h i $70 \text{ }^\circ\text{C}$ koja je iznosila 44 mg g^{-1} . Fawzy i Gomaa (2020) su također u svom istraživanju za algu *C. trinodis* dobili veću koncentraciju sulfatnih grupa upotrebom 1 M HCl-a pri 8 h i $100 \text{ }^\circ\text{C}$ koja je iznosila $1,60 \text{ mg g}^{-1}$, dok su upotrebom destilirane vode pri istim uvjetima dobili $0,98 \text{ mg g}^{-1}$. Takvi rezultati su očekivani jer polisaharidi (fukoidan) u svojoj strukturi sadrže jako puno sulfatnih grupa, koje se ekstrakcijom s kiselinom hidroliziraju s molekule (January i sur., 2019).

4.2.4. Utjecaj otapala na udio fukoze

Iz tablice 3, može se primijetiti da udio fukoze dobiven primjenom destilirane vode kao otapala iznosi 7,63 %, dok je veći udio (25,11 %) dobiven primjenom 0,1 M HCl-a. Također, kod konvencionalne ekstrakcije, prema tablici 2, veći udio fukoze dobiven je upotrebom HCl-a (20,04 %), nego vode (8,79 %). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Ponce i sur. (2003) koji su za algu *A. utricularis* također dobili veći udio L-fukoze primjenom HCl-a razrijeđenog do pH 2 pri sobnoj temperaturi i vremenu od 7 sati, koji iznosi 84 %, dok su upotrebom destilirane vode dobili udio od 74 % pri istim uvjetima. Ale i sur. (2012) su u svom istraživanju proveli ekstrakciju polisaharida pri različitim koncentracijama HCl-a korištenog za otapalo. Zaključili su da je struktura polisaharida bila očuvana pri ekstrakciji HCl-om niske koncentracije (0,03 – 0,1 M) dok je već koncentracija od 0,2 M narušila strukturu polisaharida što je rezultiralo smanjenjem udjela fukoze, ali pri povišenoj temperaturi i vremenu trajanja. January i sur. (2019) su usporedbom 0,15 M HCl-a i destilirane vode kao otapala, izolirajući polisaharide iz alge *E. maxima*, dobili veću vrijednost koncentracije L-fukoze korištenjem destilirane vode (63 mg g⁻¹) nego 0,15 M HCl-a (26 mg g⁻¹) s time da se ekstrakcija vodom odvijala pri temperaturi od 70 °C i 24 h, dok je ekstrakcija kiselinom bila pri 65 °C i 2 h pa pri tome treba uzeti u obzir vrijeme trajanja koje je kod ekstrakcije vodom puno duže nego kod ekstrakcije 0,15 M HCl-om, što je mogući razlog veće koncentracije fukoze pri ekstrakciji vodom.

4.3. UTJECAJ TEMPERATURE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE

Ekstrakcija pomoću MAE provedena je pri temperaturama od 40, 60 i 80 °C te je istražen utjecaj temperature na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze. Statističkom obradom podataka pokazano je da temperatura predstavlja statistički značajan parametar za sve promatrane varijable.

4.3.1. Utjecaj temperature na prinos polisaharida

Povišenje temperature ekstrakcije smanjuje viskoznost otapala i ubrzava kretanje molekula, ubrzavajući prijenos mase unutarstaničnih tvari iz stanica. Međutim, viša temperatura može uzrokovati razgradnju termolabilnih spojeva, što može rezultirati smanjenim prinosom (Ren i sur., 2017). Prema tablici 3, najveća vrijednost prinosa polisaharida iznosi 4,38 % pri temperaturi od 80 °C, dok je nešto manji prinos od 4,09 % dobiven pri temperaturi od 60 °C, a najmanji prinos od 3,18 % dobiven je pri najnižoj temperaturi od 40 °C. Yuan i Macquarrie (2015a) su proveli istraživanje na algi *A. nodosum* gdje su koristili MAE pri temperaturama od

90, 120 i 150 °C te su dobili najmanji prinos polisaharida (7,5 %) pri najvišoj temperaturi (150 °C), dok su najveći prinos (14,86 %) dobili pri temperaturi od 120 °C, a najniži prinos (13,54 %) pri najnižoj temperaturi (90 °C). Ovdje se u obzir treba uzeti razlika u temperaturama pošto su temperature od 90, 120 i 150 °C puno veće od temperatura korištenih u ovom istraživanju te je temperatura od 150 °C pri kojoj dolazi do naglog pada prinosa previsoka za ekstrakciju polisaharida jer uzrokuje degradaciju. Slično, Cao i sur. (2018) su u svom istraživanju na algi *S. pallidum*, koristeći MAE pri temperaturama 70, 90 i 110 °C dobili najveći prinos polisaharida pri 90 °C, a najmanji prinos od 5,60 % su dobili pri najnižoj temperaturi, odnosno pri 70 °C. Prema navedenim istraživanjima te literaturi, može se zaključiti da porastom temperature raste i prinos polisaharida, sve do određene temperature gdje započinje degradacija te je potrebno pronaći optimalnu temperaturu za postizanje najboljih rezultata (Tsubaki i sur., 2016).

4.3.2. Utjecaj temperature na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Povišenje temperature ekstrakcije izravno je proporcionalno porastu tlaka te ubrzava prijenos mase ciljanih spojeva iz matrice, zbog povećanja topljivosti i brzine difuzije te smanjenja viskoznosti i površinske napetosti. Također uzrokuje i pucanje veza između analita i matrice što rezultira olakšanom ekstrakcijom (Morais, 2013). U ovom istraživanju, prema rezultatima iz tablice 3, najmanja koncentracija ukupnih ugljikohidrata (1,63 mg g⁻¹) dobivena je pri najnižoj temperaturi, odnosno pri 40 °C. Nešto veća koncentracija, koja iznosi 1,92 mg g⁻¹ dobivena je pri temperaturi od 60 °C, dok je pri najvećoj temperaturi od 80 °C dobivena najveća koncentracija koja iznosi 2,90 mg g⁻¹. Yuan i Macquarrie (2015a) su također povećanjem temperature primijetili porast koncentracije ukupnih ugljikohidrata. Pri 90 °C su dobili oko 13 % ukupnih ugljikohidrata, pri 120 °C oko 27 %, a pri temperaturi od 150 °C su dobili oko 59 % ukupnih ugljikohidrata što ukazuje na to da temperatura od 150 °C koja je uzrokovala nagli pad prinosa polisaharida, nije dovoljno visoka da bi smanjila koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Zha i sur. (2012) su u svom istraživanju na algi *L. japonica* htjeli utvrditi utjecaj temperature na ekstrakciju polisaharida te su proveli ekstrakciju pri različitim temperaturama od 4 – 100 °C uz vrijeme trajanja od 2 h. Rezultati su pokazali da je pri nižim temperaturama (4 – 40 °C) koncentracija ukupnih ugljikohidrata manja, ali raste s porastom temperature. Između 40 i 60 °C dolazi do najvećeg porasta koncentracije, a pri 60 °C je dobivena najveća koncentracija. Daljnjim porastom temperature dolazi do blagog pada koncentracije. Prema navedenim rezultatima zaključili su da je temperatura bila važan čimbenik za ekstrakciju jer ima utjecaj na topljivost ugljikohidrata te da se povećanjem temperature olakšava ekstrakcija što rezultira većim prinosom polisaharida i većom koncentracijom ukupnih

ugljikohidrata. Također su zaključili da previsoka temperatura može uzrokovati razgradnju polisaharida na ugljikohidrate malih molekulskih masa. Tsubaki i sur. (2016) su proveli istraživanje na zelenim algama i primijetili da su se neutralni ugljikohidrati počeli raspadati iznad 160 °C, a pri toj temperaturi se i prinos polisaharida počeo smanjivati.

4.3.3. Utjecaj temperature na udio sulfatnih grupa

Najveći udio sulfatnih grupa dobiven u ovom istraživanju je pri 40 °C i iznosi 66,20 %. Pri 60 °C je dobiven nešto manji udio od 57,60 %, a pri 80 °C je dobiven najmanji udio od 36,04 %, što upućuje na to da povećanjem temperature dolazi do pada koncentracije sulfatnih grupa (Tablica 3.). Rezultati istraživanja Yuan i Macquarrie (2015a) u skladu su s ovim istraživanjem jer je također povećanjem temperature uočen pad koncentracije sulfatnih grupa. Pri najnižoj temperaturi koja je iznosila 90 °C dobili su 27,85 % sulfatnih grupa, pri temperaturi od 120 °C dobili su 15,60 %, dok su pri najvišoj temperaturi od 150 °C dobili značajno manji udio sulfatnih grupa (7,72 %).

4.3.4. Utjecaj temperature na udio fukoze

Prema tablici 3, najveći udio fukoze dobiven je pri temperaturi od 80 °C i iznosi 20,89 %, pri 60 °C je dobiven udio od 13,17 %, a najmanji udio od 15,06 % dobiven je pri najnižoj temperaturi, odnosno 40 °C. Može se primijetiti da za razliku od udjela sulfatnih grupa, udio fukoze raste s povećanjem temperature, što su zaključili i Ale i sur. (2012) koji su u svom istraživanju pri temperaturi od 30 °C dobili koncentraciju fukoze od oko 8 mg g⁻¹, pri temperaturi od 60 °C su dobili koncentraciju oko 12 mg g⁻¹, a pri najvišoj temperaturi od 90 °C su dobili najveću koncentraciju fukoze koja je iznosila oko 15,8 mg g⁻¹.

4.4. UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE

Ekstrakcija pomoću MAE provedena je pri vremenu trajanja od 10, 15 i 20 min te je istražen utjecaj vremena ekstrakcije na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze. Statističkom obradom podataka pokazano je da je vrijeme trajanja ekstrakcije statistički značajan parametar za sve promatrane varijable.

4.4.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos polisaharida

Za razliku od dugotrajne konvencionalne ekstrakcije, primjenom MAE može se postići vrijeme trajanja ekstrakcije od 10 – 30 minuta, što predstavlja veliku uštedu vremena i energije.

Vrijeme ekstrakcije također je moguće optimirati kako bi se dobio najveći prinos polisaharida. Prema tablici 3, najveći prinos polisaharida dobiven je pri vremenu trajanja od 10 min i iznosi 5,03 %, a dužim odvijanjem ekstrakcije dolazi do pada prinosa. Pri vremenu trajanja od 15 min, prinos polisaharida iznosi 4,10 %, a pri 20 min, prinos polisaharida je najmanji i iznosi 2,52 %. Yuan i Macquarrie (2015a) su u svom istraživanju dobili najmanji prinos polisaharida (11,68 %) pri najdužem vremenu trajanja ekstrakcije (30 min), dok su pri 15 min dobili najveći prinos (12,38 %), a pri 5 min su dobili prinos polisaharida od 11,85 %. Cao i sur. (2018) su također dobili slične rezultate i primijetili da se prinos polisaharida značajno povećao povećanjem vremena trajanja s 5 na 10 min, a kada je vrijeme ekstrakcije prešlo 10 min, prinos se postupno smanjivao. Zaključili su da je vrijeme ekstrakcije važan čimbenik koji utječe na prinos polisaharida te da dugo vrijeme ekstrakcije potpomognute mikrovalovima može oštetiti strukturu polisaharida i utjecati na prinos.

4.4.2. Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Dobiveni rezultati prikazani u tablici 3 pokazuju da je najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata od 2,50 mg g⁻¹ dobivena je pri najkraćem vremenu trajanja od 10 min. Najmanja koncentracija dobivena je pri vremenu trajanja od 15 min i iznosi 1,82 mg g⁻¹, dok je pri 20 min dobivena koncentracija ukupnih ugljikohidrata od 2,13 mg g⁻¹. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) u svom su istraživanju upotrebom MAE pri različitim tlakovima i vremenu trajanja ekstrakcije dobili najveću koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (14,33 %) pri najduljem vremenu trajanja od 31 min. Pri vremenu trajanja od 16 min dobili su 9,90 % ukupnih ugljikohidrata, a pri najkraćem vremenu trajanja od 1 min dobili su 10,71 % ukupnih ugljikohidrata.

4.4.3. Utjecaj vremena ekstrakcije na udio sulfatnih grupa

Udio sulfatnih grupa u uzorku ovisi o sulfatiranosti prisutnih polisaharida. U tablici 3, može se primijetiti da je najmanji udio sulfatnih grupa od 41,81 % dobiven pri najdužem vremenu trajanja, odnosno pri 20 min. Pri vremenu trajanja od 15 min dobiven je udio od 54,37 %, a pri najkraćem vremenu trajanja (10 min) dobiven je najveći udio sulfatnih grupa od 63,65 %. Slično, Lorbeer i sur. (2014) su u svom istraživanju proveli MAE pri različitom vremenu trajanja ekstrakcije fukoidana iz alge *E. radiata* te su primijetili da se sadržaj sulfatnih grupa u ekstraktima bogatim fukoidanom također smanjio s duljim vremenom ekstrakcije te su zaključili da je razlog tome vjerojatno postupno odvajanje sulfatnih grupa iz strukture fukoidana. Yuan i Macquarrie (2015a) u svom istraživanju nisu dobili značajnu razliku u udjelu

sulfatnih grupa primjenom različitog vremena trajanja ekstrakcije. Pri 5 min su dobili 17,06 % sulfatnih grupa, pri 15 min su dobili 17,02 %, a pri 30 min su dobili 17,76 % sulfatnih grupa.

4.4.4. Utjecaj vremena ekstrakcije na udio fukoze

Prema Lorbeer i sur. (2014) sadržaj fukoze u ekstraktima bogatim fukoidanom, predstavlja odraz čistoće fukoidana te njegov sadržaj. U ovom istraživanju, najmanji udio fukoze dobiven je pri najkraćem vremenu trajanja, odnosno pri 10 min i iznosi 8,37 %, a duljim odvijanjem ekstrakcije dolazi do porasta udjela fukoze. Pri 15 min dobiven je udio od 13,89 %, a pri 20 min dobiven je udio fukoze od 26,86 % (Tablica 3.). Yuan i Macquarrie (2015a) su dobili suprotne rezultate, odnosno povećanjem vremena trajanja ekstrakcije udio fukoze se smanjivao. Pri 5 min su dobili udio fukoze od 21,73 %, pri 15 min su dobili 20,54 %, a pri 30 min dobiven udio fukoze iznosio je 15,74 %. Ovdje treba uzeti u obzir i temperature pri kojima se odvijala MAE, pošto su korištene temperature puno više (90, 120 i 150 °C) od temperatura koje su se koristile u ovom istraživanju. Ale i sur. (2012) su također primijetili da se uz kraće vrijeme ekstrakcije dobije veći sadržaj fukoze, ali uz niži prinos polisaharida, dok duljim vremenom ekstrakcije dolazi do pada udjela fukoze, a Lorbeer i sur. (2014) su u svom istraživanju dobili da je tijekom prvih 6 min ekstrakcije sadržaj fukoze ostao stabilan ili se povećavao, a nakon 6 min postupno padao.

4.5. UTJECAJ KOMBINACIJE UVJETA EKSTRAKCIJE NA PRINOS POLISAHARIDA, KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA, UDIO SULFATNIH GRUPA I UDIO FUKOZE

Proučavanjem kombiniranog utjecaja uvjeta ekstrakcije (otapalo, temperatura, vrijeme) na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, udio sulfatnih grupa i udio fukoze vidi se (Tablica 3.) da su sve kombinacije imale statistički značajan utjecaj na sve promatrane varijable ($p \leq 0,01$).

Iz kombiniranog utjecaja otapala i temperature na prinos polisaharida, prikazanog u tablici 3, može se vidjeti da je statistički značajno veći prinos postignut primjenom 0,1 M HCl-a kod svake od korištenih temperatura. Upotrebom 0,1 M HCl-a, povećanjem temperature povećava se i prinos polisaharida dok je upotrebom vode povećanjem temperature sa 60 na 80 °C došlo do laganog pada prinosa. Koncentracija ukupnih ugljikohidrata nešto je veća primjenom 0,1 M HCl-a pri 60 i 80 °C nego pri ostalim kombinacijama i raste s porastom temperature. Udio sulfatnih grupa smanjuje se s porastom temperature te je kod oba otapala

najniži na 80 °C bez statističke razlike ($p \geq 0,01$) između otapala. Veći udio fukoze dobiven je upotrebom 0,1 M HCl-a neovisno o korištenoj temperaturi te se kod primijene oba otapala može primijetiti porast koncentracije fukoze s porastom temperature. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da 0,1 M HCl pri temperaturi od 80 °C daje najveći prinos polisaharida, najveću koncentraciju ukupnih ugljikohidrata i fukoze, ali najmanju koncentraciju sulfatnih grupa. U odnosu na destiliranu vodu, 0,1 M HCl lakše razara staničnu stijenku alge i olakšava ekstrakciju čime se povećava prinos i koncentracija ukupnih ugljikohidrata te fukoze, ali uzrokuje hidrolizu sulfatnih grupa s molekula polisaharida čemu dodatno pogoduje i visoka temperatura, što potencijalno može imati negativan utjecaj na biološku aktivnost polisaharida.

Iz kombiniranog utjecaja otapala i vremena trajanja na prinos polisaharida može se vidjeti da je statistički značajno veći prinos postignut primjenom 0,1 M HCl-a kod svakog vremena trajanja. Za oba otapala, primjećuje se smanjenje prinosa polisaharida duljim trajanjem ekstrakcije. Koncentracija ukupnih ugljikohidrata veća je primjenom 0,1 M HCl-a. Pri 10 min je postignuta najveća koncentracija, pri 15 min dolazi do blagog pada koncentracije, a zatim pri 20 min do ponovnog rasta. Isti trend je uočen i kod korištenja vode kao otapala. Veći udio sulfatnih grupa dobiven je upotrebom HCl-a u odnosu na vodu. Kod primijene oba otapala uočeno je da se udio sulfatnih grupa smanjuje s vremenom trajanja ekstrakcije. Veći udio fukoze dobiven je upotrebom HCl-a, gdje je primijećeno da udio fukoze pada od 10 do 15 min, a zatim raste i doseže najveću vrijednost pri 20 min. Promatrajući oba otapala, najveći udio fukoze dobiven je pri najduljem vremenu trajanja. Iz navedenih rezultata vidljivo je da su najveći prinos polisaharida, najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata i najveća koncentracija sulfatnih grupa dobiveni upotrebom 0,1 M HCl-a pri najkraćem vremenu trajanja (10 min), dok je koncentracija fukoze najveća upotrebom 0,1 M HCl-a pri 20 min. Prema tome, dulje vrijeme trajanja ekstrakcije negativno utječe na prinos i strukturu polisaharida te je za bolje rezultate ekstrakciju potrebno provesti pri kraćem vremenu.

Iz kombiniranog utjecaja vremena trajanja i temperature može se primijetiti da pri najkraćem i najdužem vremenu trajanja, povećanjem temperature raste prinos polisaharida. Pri vremenu trajanja od 15 min, prinos raste porastom temperature s 40 na 60 °C, a zatim pada pri 80 °C. Koncentracija ukupnih ugljikohidrata pri 10 min raste povećanjem temperature, dok se za vrijeme trajanja od 15 min može primijetiti da porastom temperature od 40 do 60 °C dolazi do rasta, a zatim pada koncentracije pri 80 °C. Pri vremenu trajanja od 20 min vidljivo je da koncentracija ukupnih ugljikohidrata pada od 40 do 60 °C, a zatim raste pri 80 °C. Udio sulfatnih grupa je najveći pri najnižoj temperaturi i najkraćem vremenu trajanja te pada

porastom temperature neovisno o vremenu trajanja. Udio fukoze je najveći pri 20 min i 80 °C te se može primijetiti da raste porastom temperature, neovisno o vremenu trajanja, a primijećeno je i da pri 40 °C nema statistički značajne razlike između vremena trajanja od 10 i 15 min. Prema rezultatima je vidljivo da su najveći prinos polisaharida i koncentracija ukupnih ugljikohidrata dobiveni pri najkraćem vremenu trajanja i najvećoj temperaturi, a najveća koncentracija sulfatnih grupa pri najkraćem vremenu trajanja i najnižoj temperaturi. Prema tome, ekstrakciju je bolje provoditi kraće vrijeme, pri čemu će više temperature doprinijeti boljem prinosu polisaharida, s manjim udjelom sulfatnih grupa, a ako se želi proučavati biološka aktivnost polisaharida bez potrebe za većim prinosom, onda je povoljnije provesti ekstrakciju na nižim temperaturama kako bi se očuvale sulfatne grupe u strukturi polisaharida.

4.6. ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA

Predtretman je postupak koji se izvodi prije same ekstrakcije kako bi se iz uzorka alge uklonili spojevi poput fenola, pigmenata i lipida koji smetaju pri ekstrakciji polisaharida. Uklanjanjem takvih spojeva olakšava se ekstrakcija polisaharida i omogućuju čišće frakcije dobivenih polisaharida. Predtretman je proveden s acetonom i etanolom, a dobiveni filtrat je iskorišten za određivanje koncentracije ukupnih fenola i pigmenata alge. Koncentracija ukupnih fenola te klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida određena je UV/Vis spektrofotometrijom, a dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 4 i 5.

4.6.1. Koncentracija ukupnih fenola

Fenoli su sekundarni metaboliti koji se definiraju kao aromatski spojevi koji u svojoj strukturi imaju benzenski prsten na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Mogu biti veoma različitih struktura, od jednostavnih molekula do polimera velike molekulske mase, a pokazalo se i da posjeduju antioksidacijska svojstva (Generalić Mekinić i sur., 2019). U ovom istraživanju, proveden je postupak predtretmana uz otapala aceton i etanol te je određena koncentracija ukupnih fenola u ekstraktima. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih fenola nalaze se u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih fenola (mg g⁻¹)

Otapalo	Ukupni fenoli (mg g ⁻¹)
Aceton	15,84 ± 1,34
Etanol	11,14 ± 0,40

Prema tablici 4, korištenjem acetona dobivena je koncentracija ukupnih fenola od 15,84 mg g⁻¹, a korištenjem etanola dobivena je koncentracija od 11,14 mg g⁻¹. Neto i sur. (2018) su u svom istraživanju za smeđu algu *S. latissima* primjenom acetona kao otapala dobili koncentraciju ukupnih fenola od 0,52 g GAE/100 g ekstrakta, dok su upotrebom etanola dobili 0,19 g GAE/100 g ekstrakta. Airanthi i sur. (2011) su za smeđu algu *E. bicyclis* dobili koncentraciju ukupnih fenola od 4,11 mg PCE/g ekstrakta upotrebom acetona, a upotrebom etanola su dobili koncentraciju od 1,87 mg PCE/g ekstrakta. Prema navedenim istraživanjima, veće koncentracije ukupnih fenola dobivene su upotrebom acetona kao otapala, ali se koncentracija ukupnih fenola razlikuje među vrstama. Pretpostavka je da aceton ima sposobnost inhibicije formiranja kompleksa između proteina i polifenola tijekom ekstrakcije te da cijepa vodikove veze nastale između fenolnih skupina i karboksilnih grupa proteina (Wang i sur., 2009) te je zato pogodnije otapalo od etanola koji je polarniji. Razlog veće koncentracije fenola u acetonskim ekstraktima može biti i to što je aceton korišten u prvom koraku predtretmana pa je i dostupna količina fenola veća nego u drugom koraku kad je dio fenola već ekstrahiran. Različiti čimbenici poput starosti alge, staništa, saliniteta, veličine i izloženosti svjetlu mogu utjecati na koncentraciju fenola u algi, a bitni faktori su i vrsta alge te vrijeme izrona (Generalić Mekinić i sur., 2019).

4.6.2. Koncentracija klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida

U posljednjih nekoliko godina interes za prirodnim pigmentima sve više raste, zbog njihovog farmaceutskog i biomedicinskog potencijala te zbog toga što se mogu koristiti u prehrambenoj industriji kao zamjena za umjetna bojila. Najčešći pigmenti koji se nalaze u smeđim algama su klorofili i karotenoidi (Osório i sur., 2020). U ovom istraživanju, proveden je postupak predtretmana uz otapala aceton i etanol te je određena koncentracija klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida, a rezultati se nalaze u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida (mg g⁻¹)

Otapalo	Klorofil a (mg g ⁻¹)	Klorofil b (mg g ⁻¹)	Ukupni karotenoidi (mg g ⁻¹)
Aceton	0,38	0,05	0,22
Etanol	0,24	0,07	0,13

Upotrebom acetona dobiveno je 0,38 mg g⁻¹ klorofila a, 0,05 mg g⁻¹ klorofila b te 0,22 mg g⁻¹ ukupnih karotenoida. Primjenom etanola kao otapala dobiveno je 0,24 mg g⁻¹ klorofila

a, 0,07 mg g⁻¹ klorofila b te 0,13 mg g⁻¹ ukupnih karotenoida. Iz rezultata je vidljivo da ovisno o otapalu nema velike razlike između koncentracija pigmenata. Nešto veće koncentracije dobivene su za klorofil a i ukupne karotenoide primjenom acetona, dok je neznatno veća koncentracija klorofila b dobivena upotrebom etanola. Koncentracija klorofila b dobivena korištenjem oba otapala je znatno manja od koncentracija klorofila a i ukupnih karotenoida. Navedene razlike također mogu biti posljedica upotrebe acetona u prvom koraku predtretmana, a etanola u drugom koraku. Durmaz i sur. (2008) su upotrebom acetona kao otapala odredili koncentraciju klorofila a i ukupnih karotenoida iz vrsta roda *Cystoseira* te su dobili koncentraciju klorofila od 0,36 mg g⁻¹ što odgovara koncentraciji klorofila a dobivenoj u ovom istraživanju, dok su za ukupne karotenoide dobili veću vrijednost koncentracije koja je iznosila 0,81 mg g⁻¹. Pardilhó i sur. (2020) u svom su istraživanju na smeđoj algi *S. polyschides* koristili različita otapala za određivanje pigmenata i zaključili su da je aceton najpovoljnije otapalo za ekstrakciju klorofila a. Osório i sur. (2020) su u svom istraživanju na smeđoj algi *L. ochroleuca* koristili različita otapala za određivanje pigmenata te su acetonom i etanolom dobili koncentraciju klorofila a i b, a za ukupne karotenoide su koristili metanol. Upotrebom acetona koncentracija klorofila a je iznosila 183,5 µg g⁻¹, a koncentracija klorofila b je iznosila 14,1 µg g⁻¹, dok je upotrebom etanola dobivena koncentracija klorofila a od 114 µg g⁻¹, a koncentracija klorofila b nije detektirana. U ovom istraživanju, primjena acetona rezultirala je malo većom koncentracijom pigmenata od koncentracija dobivenih primjenom etanola. Prema Osório i sur. (2020) utvrđeno je da aceton predstavlja uobičajeno otapalo za određivanje klorofila jer je moguće postići vrlo različite pikove apsorpcije klorofila, ali se također pokazalo da nije toliko učinkovit kao otapalo za ekstrakciju klorofila iz zelenih algi.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Konvencionalnom ekstrakcijom se postiže veći prinos polisaharida (8,09 %) i veća koncentracija ukupnih ugljikohidrata ($3,21 \text{ mg g}^{-1}$) u odnosu na prinos polisaharida (3,88 %) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata ($2,15 \text{ mg g}^{-1}$) dobivenu mikrovalovima potpomognutom ekstrakcijom. Dobiveni udio sulfatnih grupa te udio fukoze veći su upotrebom mikrovalovima potpomognute ekstrakcije.
2. Primjena 0,1 M HCl-a kao ekstrakcijskog otapala rezultirala je većim prinosom polisaharida, većom koncentracijom ukupnih ugljikohidrata, većim udjelom sumpornih grupa te većim udjelom fukoze u odnosu na rezultate dobivene upotrebom destilirane vode.
3. Najveći prinos polisaharida (4,38 %) te najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata ($2,90 \text{ mg g}^{-1}$) i udio fukoze (20,89 %) dobiveni su pri najvišoj temperaturi ($80 \text{ }^\circ\text{C}$), dok je najveći udio sulfatnih grupa (66,20 %) dobiven pri najnižoj temperaturi, odnosno pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$, što ukazuje na to da porast temperature pozitivno utječe na prinos polisaharida, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata i udio fukoze, ali negativno utječe na udio sulfatnih grupa.
4. Pri najkraćem vremenu trajanja ekstrakcije (10 min) dobivene su najveće vrijednosti prinosa polisaharida (5,03 %), koncentracije ukupnih ugljikohidrata ($2,50 \text{ mg g}^{-1}$) i udjela sulfatnih grupa (63,65 %). Dužim vremenom trajanja dolazi do pada prinosa polisaharida, smanjenja koncentracije ukupnih ugljikohidrata te smanjenja sulfatnih grupa, ali dolazi do porasta udjela fukoze koji je najveći nakon 20 min (26,86 %).
5. Optimalni ekstrakcijski uvjeti pri kojima je dobiven najveći prinos polisaharida te najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata su 0,1 M HCl, vrijeme trajanja od 10 min i temperatura od $80 \text{ }^\circ\text{C}$, najveći udio sulfatnih grupa dobiven je upotrebom 0,1 M HCl-a pri $40 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 10 min, a najveći udio fukoze dobiven je upotrebom 0,1 M HCl-a pri $80 \text{ }^\circ\text{C}$ u trajanju od 20 min.
6. Analizom acetonskih i etanolnih ekstrakata iz predtretmana određene su koncentracije klorofila a i b, ukupnih karotenoida te ukupnih fenola te je vidljivo da su upotrebom acetona dobivene neznatno veće koncentracije u odnosu na etanol.

6. LITERATURA

Aguilar-Reynosa, A., Romanić, A., Rodríguez-Jasso, R. M., Aguilar, C. N., Garrote, G., Ruiz, H. A. (2017) Microwave heating processing as alternative of pretreatment in second-generation biorefinery: An overview. *Energ. Convers. Manage.* **136**, 50–65.

Ahmad, T. B. S. (2015) Methods for quantification and extraction of fucoidan, and quantification of the release of total carbohydrate and fucoidan from the brown algae *Laminaria hyperborea*. Diplomski rad. Norveško sveučilište za znanost i tehnologiju, Trondheim.

Ahmadi, A., Moghadamtousi, S. Z., Abubakar, S., Zandi, K. (2015) Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: A review. *Biomed. Res. Int.* 10.1155/2015/825203.

Airanthi, M. K., Hosokawa, M., Miyashita, K. (2011) Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. *J. Food Sci.* **76(1)**, 104–110.

Alboofetileh, M., Rezaeia, M., Tabarsa, M., Rittà, M., Donalisio, M., Mariatti, F., You, S. G., Lembo, D., Cravotto, G. (2019) Effect of different non-conventional extraction methods on the antibacterial and antiviral activity of fucoidans extracted from *Nizamuddinina zanardinii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **124**, 131–137.

Ale, M. T., Meyer, A. S. (2013) Fucoidans from brown seaweeds: an update on structures, extraction techniques and use of enzymes as tools for structural elucidation. *RSC Adv.* **3**, 8131–8141.

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2011) Important determinants for fucoidan bioactivity: A critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar. Drugs* **9**, 2106–2130.

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2012) Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. *J. Appl. Phycol.* **24**, 715–723.

Antolić, B., Nikolić, V., Žuljević, A. (2011) Crveni popis morskih algi i morskih cvjetnica Hrvatske. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split. Izvještaj projekta. 1–61.

- Antolić, B., Špan, A., Žuljević, A., Nikolić, V., Grubelić, I., Despalatović, M., Cvitković, I. (2010) A checklist of the benthic marine macroalgae from the eastern Adriatic coast: II. Heterokontophyta: Phaeophyceae. *Acta Adriat.* **51(1)**, 9–33.
- Arora, M., Sahoo, D. (2015) Green algae. U: The algae world, (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, New York/London, str. 91–120.
- Baba, B. M., Wan Mustapha, W. A., Joe, L. S. (2018) Effect of extraction methods on the yield, fucose content and purity of fucoidan from *Sargassum* sp. obtained from Pulau Langkawi, Malaysia. *Malaysian J. Anal. Sci.* **22(1)**, 87–94.
- Barbosa, A. I., Coutinho, A. J., Costa Lima, S. A., Reis, S. (2019) Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field. *Mar. Drugs* **17**, 654.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. (2014) Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology, 2. izd., Taylor & Francis, Boca Raton, str. 1–48.
- BeMiller, J. N. (2019) Carbohydrate chemistry for food scientists, 3. izd., Elsevier Inc., Duxford, str. 75–101; 279–291; 293–301.
- Besednova, N. N., Zaporozhets, T. S., Kuznetsova, T. A., Makarenkova, I. D., Kryzhanovsky, S. P., Fedyanina, L. N., Ermakova, S. P. (2020) Extracts and marine algae polysaccharides in therapy and prevention of inflammatory diseases of the intestine. *Mar. Drugs* **18**, 289.
- Blekić, M., Režek Jambrak, A., Chemat, F. (2011) Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **3(1)**, 32–47.
- Brownlee, I. A., Allen, A., Pearson, J. P., Dettmar, P. W., Havler, M. E., Atherton, M. R., Onsøyen, E. (2005) Alginate as a source of dietary fiber. *Crit. Rev. Food Sci.* **45**, 497–510.
- Cao, C., Huang, Q., Zhang, B., Li, C., Fu, X. (2018) Physicochemical characterization and in vitro hypoglycemic activities of polysaccharides from *Sargassum pallidum* by microwave-assisted aqueous two-phase extraction. *Int. J. Biol. Macromol.* **109**, 357–368.
- Chapman, V. J., Chapman, D. J. (1973) The Algae, 2. izd., The Macmillan Press, London, str. 220–255.

- Cikoš, A. M., Jokić, S., Šubarić, D., Jerković, I. (2018) Overview on the application of modern methods for the extraction of bioactive compounds from marine macroalgae. *Mar. Drugs* **16(10)**, 348.
- Deville, S., Damas, J., Forget, P., Dandrifosse, G., Peulen, O. (2004) Laminarin in the dietary fibre concept. *J. Sci. Food. Agric.* **84**, 1030–1038.
- Dische, Z., Shettles, L. B. (1948) A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.* **175(2)**, 595–603.
- Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Advanced technologies for the extraction of marine brown algal polysaccharides. *Mar. Drugs* **18**, 168–197.
- Dodgson, K. S. (1961) Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters. *Biochem. J.* **78**, 312–319.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28(3)**, 350–356.
- Durmaz, Y., Duyar, H. A., Gökpınar, S., Taskaya, L., Öğretmen, Y. O., Bandarra, N. M., Nunes, M. L. (2008) Fatty acids, α -tocopherol and total pigment contents of *Cystoseira* spp., *Ulva* spp. and *Zostera* spp. from Sinop Bay (Turkey). *Int. J. Nat. Eng. Sci.* **2(3)**, 111–114.
- El Gamal, A. A. (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.* **18**, 1–25.
- Falace, A., Bressan, G. (2006) Seasonal variations of *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Frond Architecture. *Hydrobiologia* **555(1)**, 193–206.
- Fawzy, M. A., Gomaa, M. (2020) Pretreated fucoidan and alginate from a brown seaweed as a substantial carbon source for promoting biomass, lipid, biochemical constituents and biodiesel quality of *Dunaliella salina*. *Renew. Energ.* **157**, 246–255.
- Fior Market Research (2020), Global fucoidan market 2019 by manufacturers, regions, type and application, forecast to 2024, <<https://www.fiormarkets.com/report/global-fucoidan-market-2019-by-manufacturers-regions-type-385860.html>>. Pristupljeno 11. studenog 2020.

- Fitton, J. H., Stringer, D. N., Park, A. Y., Karpiniec, S. S. (2019) Therapies from fucoidan: New developments. *Mar. Drugs* **17**, 571.
- Flórez-Fernández, N., Torres, M. D., Jesús González-Muñoz, M., Domínguez, H. (2018) Potential of intensification techniques for the extraction and depolymerization of fucoidan. *Algal Res.* **30**, 128–148.
- Foley, S. A., Mulloy, B., Tuohy, M. G. (2011) An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: Extraction, characterization, and apoptotic effects in vitro. *J. Nat. Prod.* **74**, 1851–1861.
- Gallimore, W. (2017) Marine metabolites: Oceans of opportunity. U: Pharmacognosy, fundamentals, applications and strategies, (Badal, S., Delgoda, R., ured.), Elsevier, New York, str. 377–400.
- García-Vaquero, M., Rajauria, G., O'Doherty, J., Sweeney, T. (2016) Polysaccharides from macroalgae: Recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Res. Int.* **99(3)**, 1011–1020.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., Popović Perković, Z. (2019) Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, **9(6)**, 244.
- Griffiths, M., Harrison, S. T. L., Smit, M., Maharajh, D. (2016) Major commercial products from micro- and macroalgae. U: Algae biotechnology; products and processes, (Bux, F., Chisti, Y., ured.), Springer International Publishing, Switzerland, str. 269–300.
- Guiry, M. D. (2012) How many species of algae are there? *J. Phycol.* **48(5)**, 1057–1063.
- Guiry, M. D., Guiry, G. M. (2020) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway, <<https://www.algaebase.org>>. Pristupljeno 15. srpnja 2020.
- Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. (2015) Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *Daru* **23(1)**, 1.

- Hafting, J. T., Cornish, M. L., Deveau, A., Critchley, A. T. (2015) Marine Algae: Gathered Resource to Global Food Industry. U: The algae world, (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, New York/London, str. 403–427.
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., Muffler, K. (2012) Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochem.* **47**, 1691–1698.
- Hentati, F., Tounsi, L., Djomdi, D., Pierre, G., Delattre, C., Ursu, A. V., Fendri, I., Abdelkafi, S., Michaud, P. (2020) Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules* **25**, 3152.
- Holdt, S., Stefan, K. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **23**, 543–597.
- January, G. G., Naidoo, R. K., Kirby-McCullough, B., Bauer, R. (2019) Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Res.* **40**, 101517.
- Jesus Raposo, M. F., Costa de Morais, R. M. S., Bernardo de Morais, A. M. M. (2013) Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Mar. Drugs* **11**, 233–252.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., Ewart, H. S. (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar. Drugs* **9**, 196–223.
- Khotimchenko, M., Tiasto, V., Kalitnik, A., Begun, M., Khotimchenko, R., Leonteva, E., Bryukhovetskiy, I., Khotimchenko, Y. (2020) Antitumor potential of carrageenans from marine red algae. *Carbohydr. Polym.*, 116568.
- Lahaye, M., Robic, A. (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* **8(6)**, 1766–1774.
- Leandro, A., Pereira, L., Gonçalves, A. M. M. (2020) Diverse applications of marine macroalgae. *Mar. Drugs* **18**, 17.
- Lee, Y. K. (2016) Microalgae cultivation fundamentals. U: Algae biotechnology: Products and processes, (Bux, F., Chisti, Y., ured.), Springer International Publishing, Switzerland, str. 1–19.

- Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012) Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 106–126.
- Li, S., Zhang, H., Han, D., Row, K. H. (2012) Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology. *Korean J. Chem. Eng.* **29(5)**, 650–656.
- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. U: Handbook of food analytical chemistry: Pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components, (Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P., ured.), John Wiley & Sons, Hoboken, str. 171–178.
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M. (2017) Extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. U: Seaweed polysaccharides: Isolation, biological, and biomedical applications, (Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 27–46.
- Liu, J., Wu, S.-Y., Chen, L., Li, Q.-J., Shen, Y.-Z., Jin, L., Zhang, X., Chen, P.-C., Wu, M.-J., Choi, J., Tong, H.-B. (2020) Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol.* **155**, 1385–1392.
- Liu, X., Liu, B., Wei, X. L., Sun, Z. L., Wang, C. Y. (2016) Extraction, fractionation, and chemical characterisation of fucoidans from the brown seaweed *Sargassum pallidum*. *Czech J. Food Sci.* **34(5)**, 406–413.
- Løvstad Holdt, S., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **23(3)**, 543–597.
- Mayanglambam, A., Sahoo, D. (2015) Red algae. U: The algae world, (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, New York/London, str. 205–234.
- Morais, S. (2013) Ultrasonic- and microwave-assisted extraction and modification of algal components. U: Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals, (Domínguez, H., ured.), Woodhead Publishing, Cambridge, str. 585–605.

- Muhamad, I. I., Zulkifli, N., Selvakumaran, S., Md Lazim, N. A. (2019) Bioactive algal-derived polysaccharides: Multi-functionalization, therapeutic potential and biomedical applications. *Curr. Pharm. Design* **25(11)**, 1147–1162.
- Mussatto, S. I. (2015) Microwave-assisted extraction of fucoidan from marine algae. U: Natural products from marine algae: Methods and protocols, methods in molecular biology, (Stengel, D. B., Connan, S., ured.), Springer Science + Business Media, New York, str. 151–157.
- Necas, J., Bartosikova, L. (2013) Carrageenan: a review. *Vet. Med.-Czech* **58(4)**, 187–205.
- Neto, R. T., Marçal, C., Queirós, A. S., Abreu, H., Silva, A. M. S., Cardoso, S. M. (2018) Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as functional ingredients. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2987.
- Ngo, D. H., Kim, S. K. (2013) Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *Int. J. Biol. Macromol.* **62**, 70–75.
- Nguyen, T. T., Dalgaard Mikkelsen, M., Nguyen Tran, V. H., Dieu Trang, V. T., Rhein-Knudsen, N., Holck, J., Rasin, A. B., Thuy Cao, H. T., Thanh Van, T. T., Meyer, A. S. (2020) Enzyme-assisted fucoidan extraction from brown macroalgae *Fucus distichus* subsp. *evanescens* and *Saccharina latissima*. *Mar. Drugs* **18(6)**, 296.
- Nielsen, S. S. (2010) Food analysis laboratory manual, 4. izd., Springer, Boston, str. 47–53.
- Okolie, C. L., Mason, B., Mohan, A., Pitts, N., Udenigwe, C. C. (2019) The comparative influence of novel extraction technologies on in vitro prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocolloid.* **90**, 462–471.
- Olaizola, M., Grewe, C. (2019) Commercial microalgal cultivation systems. U: Grand challenges in algae biotechnology, (Hallmann, A., Rampelotto, P. H., ured.), Springer Nature, Switzerland, str. 3–34.
- Oliveira, C., Neves, N. M., Reis, R. L., Martins, A., Silva, T. H. (2020) A review on fucoidan antitumor strategies: From a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems. *Carbohydr. Polym.* **239**, 116131.

- Osório, C., Machado, S., Peixoto, J., Bessada, S., Pimentel, F. B., Alves, R. C., Beatriz, M., Oliveira, P. P. (2020) Pigments content (chlorophylls, fucoxanthin and phycobiliproteins) of different commercial dried algae. *Separations* **7**(2), 33.
- Pangestuti, R., Kurnianto, D. (2017) Green seaweeds-derived polysaccharides ulvan: Occurrence, medicinal value and potential applications. U: Seaweed polysaccharides: Isolation, biological and biomedical applications, (Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S., ured.), Elsevier, Amsterdam, str. 205–221.
- Pardilhó, S. L., Machado, S., Bessada, S. M. F., Almeida, M. F., Oliveira, M. B., Dias, J. M. (2020) Marine macroalgae waste from northern Portugal: A potential source of natural pigments? *Waste Biomass Valori*. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01016-2>.
- Ponce, N. M. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., Stortz, C. A. (2003) Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **338**, 153–165.
- Rajkumar, R., Yaakob, Z., Takriff, M. S. (2014) Potential of the micro and macro algae for biofuel production: A brief review. *BioResources* **9**(1), 1606–1633.
- Ren, B., Chen, C., Li, C., Fu, X., You, L., Liu, R. H. (2017) Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities. *Carbohydr. Polym.* **173**, 192–201.
- Robic, A., Sassi, J. F., Lahaye, M. (2008) Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physico-chemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydr. Polym.* **74**, 344–352.
- Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A. (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1137–1144.
- Rožić, S., Puizina, J., Šamanić, I., Žuljević, A., Antolić, B. (2012) Molecular identification of the brown algae, *Cystoseira* spp. (Phaeophyceae, Fucales) from the Adriatic Sea – preliminary results. *Acta Adriat.* **53**(3), 447–456.

- Saepudin, E., Sinurat, E., Suryabrata, I. (2017). Depigmentation and characterization of fucoidan from brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **299**, 012027.
- Sahoo, D., Baweja, P. (2015) General characteristics of algae. U: The algae world, (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, New York/London, str. 3–29.
- Sellimi, S., Kadri, N., Barragan-Montero, V., Laouer, H., Hajji, M., Nasri, M. (2014) Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: Structural characteristics and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **66**, 281–288.
- Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98(4)**, 828–834.
- Skjik-Braek, G. (1992) Alginates: biosyntheses and some structure-function relationships relevant to biomedical and biotechnological applications. *Biochem. Soc. Trans.* **20(1)**, 27–33.
- Song, H., He, M., Gu, C., Wei, D., Liang, Y., Yan, J., Wang, C. (2018) Extraction, optimization, purification, antioxidant activity, and preliminary structural characterization of crude polysaccharide from an Arctic *Chlorella* sp. *Polymers* **10(3)**, 1–18.
- Sosa-Hernández, J. E., Escobedo-Avellaneda, Z., Iqbal, H. M. N., Welti-Chanes, J. (2018) State-of-the-art extraction methodologies for bioactive compounds from algal biome to meet bio-economy challenges and opportunities. *Molecules* **23**, 2953.
- Sousa, C. B., Cox, D. J., Brito, L., Pavão, M. M., Pereira, H., Ferreira, A., Ginja, C., Campino, L., Bermejo, R., Parente, M., Varela, J. (2019) Improved phylogeny of brown algae *Cystoseira* (Fucales) from the Atlantic-Mediterranean region based on mitochondrial sequences. *PLoS ONE* **14(1)**, e0210143.
- Surendhiran, D., Sirajunnisa, A. R. (2019) Role of genetic engineering in bioethanol production from algae. U: Bioethanol production from food crops: Sustainable sources, interventions and challenges, (Ray, R. C., Ramachandran, S., ured.), Elsevier Inc., London, str. 361–381.
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L. G., Munta, H., Leeuwen, H. P., Lobinski, R. (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of

elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* **72(8)**, 1453–1470.

Torres, M. D., Florez-Fernandez, N., Simon-Vazquez, R., Gimenez-Abian, J. F., Diaz, J. F., Gonzalez-Fernandez, A., Dominguez, H. (2020) Fucoidans: The importance of processing on their anti-tumoral properties. *Algal Res.* **45**, 101748.

Trica, B., Delattre, C., Gros, F., Ursu, A. V., Dobre, T., Djelveh, G., Michaud, P., Oancea, F. (2019) Extraction and characterization of alginate from an edible brown seaweed (*Cystoseira barbata*) harvested in the Romanian Black Sea. *Mar. Drugs* **17**, 405–420.

Tsubaki, S., Oono, K., Hiraoka, M., Onda, A., Mitani, T. (2016) Microwave-assisted hydrothermal extraction of sulfated polysaccharides from *Ulva* spp. and *Monostroma latissimum*. *Food Chem.* **210**, 311–316.

Venugopal, V. (2019) Sulfated and non-sulfated polysaccharides from seaweeds and their uses: An overview. *EC Nutrition* **14(2)**, 126–141.

Verma, P., Arun, A., Sahoo, D. (2015) Brown algae. U: The algae world, (Sahoo, D., Seckbach, J., ured.), Springer, New York/London, str. 177–204.

Wang, L., Wang, X., Wu, H., Liu, R. (2014) Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Mar. Drugs* **12**, 4984–5020.

Wang T., Jonsdottir, R., Ólafsdóttir, G. (2009) Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* **116**, 240–248.

Wijesinghe, W. A. J. P., Jeon, Y. J. (2012) Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym.* **88**, 13–20.

Wu, L., Sun, J., Su, X., Yu, Q., Yu, Q., Zhang, P. (2016) A review about the development of fucoidan in antitumor activity: Progress and challenges. *Carbohydr. Polym.* **154**, 96–111.

Xu, S. Y., Huang, X., Cheong, K. L. (2017) Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Mar. Drugs* **15**, 388.

Yuan, Y., Macquarrie, D. (2015a) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* **129**, 101–107.

Yuan, Y., Macquarrie, D. (2015b) Microwave assisted step-by-step process for the production of fucoidan, alginate sodium, sugars and biochar from *Ascophyllum nodosum* through a biorefinery concept. *Bioresource Technol.* **198**, 819–827.


Zhang, H., Row, K. H. (2015) Extraction and separation of polysaccharides from *Laminaria japonica* by size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **53(4)**, 498–502.

Zhang, R., Zhang, X., Tang, Y., Mao, J. (2020) Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **228**, 115381.

Zayed, A., Ulber, R. (2020) Fucoidans: Downstream processes and recent applications. *Mar. Drugs* **18(3)**, 170.

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Ema Vrančić