

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO – BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Josipa Matanić, 996/N

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

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

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanom povjerenju, susretljivosti, suradnji i vodstvu, kako tijekom izrade završnog, tako i ovog rada. Od srca hvala na razumijevanju te pruženim stručnim, ali i prijateljskim savjetima! Veliko hvala doktorandici Ani Dobrinčić na trudu, savjetima i ugodnoj atmosferi tijekom rada u laboratoriju.

Hvala svim prijateljima i kolegama koji su razdoblje studiranja učinili lakšim, a posebno hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci i vjeri u mene!

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: Nutricionizam

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

Josipa Matanić, 996/N

Sažetak: Cilj ovog istraživanja bio je odrediti masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima liofilizirane smeđe alge *Cystoseira* proizvedenim pomoću ubrzanе ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE). Uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo, ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: (i) statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min); (ii) broj ciklusa ekstrakcije (1 i 2); te (iii) temperatura (100 °C, 130 °C, 160 °C). Maseni udjeli navedenih pigmentata određeni su spektrofotometrijski, a utjecaji parametara ekstrakcije definirani su na temelju provedene statističke analize MANOVA. Maseni udjeli klorofila *a* određeni su u rasponu od 0,86 do 1,92 mg g⁻¹ s.t., klorofila *b* od 0,09 do 1,19 mg g⁻¹ s.t. te karotenoida od 0,36 do 0,70 mg g⁻¹ s.t. Utvrđena je statistički značajna razlika u masenim udjelima svih pigmentata u ovisnosti o svim primjenjenim parametrima ekstrakcije, osim kod klorofila *b*, gdje broj ciklusa ekstrakcije nije statistički značajan parametar. Rezultati istraživanja pokazali su da se najveći prinosi pigmentata dobivaju pri slijedećim uvjetima ekstrakcije: klorofil *a* pri temperaturi ekstrakcije od 160 °C i jedan ciklus od 5 minuta; klorofil *b* i karotenoidi pri temperaturi ekstrakcije od 130 °C te jedan ciklus od 15 minuta.

Ključne riječi: *alge, klorofili, karotenoidi, ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku*

Rad sadrži: 40 stranica, 4 slike, 5 tablica, 56 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: *Ana Dobrinčić, mag.ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. *Izv.prof.dr.sc. Sandra Balbino*
2. *Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*
3. *Doc.dr.sc. Zoran Zorić*
4. *Doc.dr.sc. Danijela Bursać Kovačević*

Datum obrane: 24. rujna 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

ISOLATION OF PIGMENTS FROM ALGAE *Cystoseira* USING PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION

Josipa Matanić, 996/N

Abstract: The aim of this study was to determine mass fractions of chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and carotenoids in extracts of lyophilized brown algae *Cystoseira*, produced by pressurized liquid extraction (PLE). Ethanol was the extraction solvent and the following extraction parameters were investigated: (i) static extraction time (5, 10 and 15 min); (ii) number of extraction cycles (1 and 2); and (iii) temperature (100 °C, 130 °C, 160 °C). Mass fractions of certain pigments in obtained extracts were determined spectrophotometrically and the effect of extraction parameters was defined by statistical analysis MANOVA. Mass fractions of chlorophyll *a* were ranged from 0.86 to 1.92 mg g⁻¹ s.w., chlorophyll *b* from 0.09 to 1.19 mg g⁻¹ s.w. and carotenoids from 0.36 to 0.70 mg g⁻¹ s.w. A statistically significant difference was determined depending on all applied extraction parameters, except for chlorophyll *b*, where the number of extraction cycles was not a statistically significant parameter. The results of the research have shown that the highest pigment yields are obtained under the following extraction conditions: chlorophyll *a* at extraction temperature of 160 °C and one 5 minute cycle; chlorophyll *b* and carotenoids at extraction temperature of 130 °C and one 15 minutes cycle.

Keywords: *algae, chlorophylls, carotenoids, pressurized liquid extraction*

Thesis contains: 40 pages, 4 figures, 5 tables, 56 references

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Verica Dragović – Uzelac, Full Professor*

Technical support and assistance: *Ana Dobrinčić, mag.ing.*

Reviewers:

1. *PhD. Sandra Albino, Associate professor*
2. *PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor*
3. *PhD. Zoran Zorić, Assistant professor*
4. *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Assistant professor*

Thesis defended: 24th September 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ALGE	3
2.1.1.Smeđe alge	3
2.2. KEMIJSKI SASTAV	5
2.2.1.Polisaharidi.....	5
2.2.2.Ulja i masti	6
2.2.3.Proteini	6
2.2.4.Polifenoli	7
2.2.5.Pigmenti	7
2.3. PIGMENTI I UTJECAJ NA ZDRAVLJE	9
2.4. PRIMJENA ALGI U INDUSTRIJI	11
2.5. EKSTRAKCIJA	12
2.5.1.Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE).....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1.Uzorak smeđe alge	16
3.1.2.Kemikalije	16
3.1.3.Aparatura i pribor	16
3.2. METODE	17

3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE).....	17
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila <i>a</i> , klorofila <i>b</i> i karotenoida.....	19
3.2.3. Statistička obrada rezultata.....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. UTJECAJ TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA	24
4.2. UTJECAJ BROJA CIKLUSA NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA	25
4.3. UTJECAJ VREMENA NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA	26
4.4. UTJECAJ KOMBINIRANIH PARAMETARA NA EKSTRAKCIJU	27
4.5. JEDNADŽBE REGRESIJSKIH MODELA	30
4.6. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE	31
5. ZAKLJUČAK	33
6. LITERATURA.....	34

1. UVOD

Iako se ne može mjeriti s tropskim oceanima Jadransko more je prepoznato po svojoj bioraznolikosti i posjeduje velik broj karakteristika Sredozemnog mora, dok mu krška obala daje brojne specifičnosti. Odlikuje ga umjerena produktivnost organske tvari, odnosno fotosintetska aktivnost algi koja je temelj za razvoj svih ostalih organizama. Ta produktivnost nije ista u svim dijelovima Jadrana; raste od juga prema sjeveru te od otvorenog mora prema obali. Sjeverni se Jadran, zbog različitih specifičnih utjecaja, smatra jednim od najproduktivnijih područja u Sredozemnom moru. Iako točan broj vrsta i podvrsta koje doista žive ili se razmnožavaju u Jadranu još uvijek nije poznat, prema grubim procjenama kreće se između 7000 i 8000, a novija saznanja upućuju na to da bi ukupan broj vrsta i podvrsta mogao biti veći od 12000 od kojih oko 600 vrsta čine alge. Biološka raznolikost Jadranskog mora ovisi o više faktora, a najvažniji su: dubina, o kojoj ovisi osvjetljenost, tip morskog dna i obale, valovi, struje itd. *Cystoseira* je među najdominantnijim i ekološki najvažnijim vrstama na Mediteranu i u Jadranskom moru. Rod *Cystoseira* uključuje oko 294 vrste i jedan je od najreprezentativnijih članova obitelji *Sargassaceae* (Kosanić i sur., 2015).

Biološki potencijal morskih algi još uvijek je nedovoljno iskorišten te su alge predmet brojnih istraživanja, posebno u Europi, s ciljem njihovog iskorištavanja te njihove primjene kao sastojka u proizvodnji različitih vrsta proizvoda i funkcionalne hrane. Zbog sve veće svijesti o hrani kao izvoru funkcionalnih sastojaka koji doprinose zdravlju, algama i njihovim ekstraktima posvećuje se sve veća pozornost zbog njihova jedinstvenog sastava i zdravstvenih benefita. Postoje različite metode ekstrakcije kojima se biomasa algi prevodi u ekstrakte. Znanstvenici su se okrenuli novijim metodama ekstrakcije koje omogućuju ekstrakciju biološki aktivnih komponenti bez njihove degradacije. Morske alge na temelju njihove bogate dostupnosti u morskom ekosustavu imaju potencijal da postanu izvrsni izvori bioaktivnih spojeva kao što su prehrambena vlakna, omega-3 masne kiseline, različiti pigmenti, vitamini i minerali (Michalak i Chojnacka, 2014).

Pigmenti algi su predmet brojnih istraživanja zbog njihovog potencijala i iskorištavanja u komercijalne i industrijske svrhe. Pigmenti, osobito karotenoidi, poznati su po svojim industrijskim primjenama kao bojila za hranu i antioksidansi. Postoje dokazi o njihovim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje, naročito u prevenciji kroničnih bolesti. Globalna

potražnja za karotenoidima i ostalim pigmentima algi znatno raste te se očekuje da će na svjetskom tržištu do 2021. dosegnuti 1,53 milijardi dolara. Komercijalno se karotenoidi proizvode kemijskom sintezom, a zbog pojačane svijesti potrošača o zdravlju, sigurnost i ekološku prihvatljivost proizvoda sve je veća potražnja za prirodnim proizvodima. Morske alge služe kao jedinstveni, održiv i alternativni prirodni izvor pigmenata, ali i ostalih bioaktivnih komponenti (Poojary i sur., 2016).

Cilj ovog istraživanja bio je izolirati pigmente (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoide) iz liofilizirane smeđe alge *Cystoseira* pomoću ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE). Uz etanol kao ekstrakcijsko otapalo, ispitivani su sljedeći parametri ekstrakcije: (i) statičko vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min); (ii) broj ciklusa ekstrakcije (1 i 2); te (iii) temperatura (100 °C, 130 °C, 160 °C). U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli pojedinih pigmenata, a na temelju dobivenih rezultata određeni su i optimalni parametri PLE ekstrakcije uz koje se postižu najveći prinosi istih.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Morski okoliš, koji sadrži širok raspon organizama sa jedinstvenim biološkim svojstvima, jedan je od neponovljivih bioloških resursa čiji veliki dio čine alge. One su vrlo raznolika i složena skupina pretežito vodenih, fotosintetskih, autotrofnih organizama koji mogu biti jednostanični, višestanični ili kolonijalni, a zaslužne su za oko 50 % fotosintetskih procesa koji se odvijaju na Zemlji (Moroney i Ynalvez, 2009). Alge su biljni organizmi koji su nastali i razvijali se u vodi pa se i danas najveći broj nalazi u vodenoj sredini; žive pričvršćene na stijene ili neke druge tvrde podloge u obalnim područjima, a one koje su se tijekom evolucije prilagodile životu izvan vode mogu se naći na vlažnim i osvijetljenim staništima. Njihova podjela u skupine temelji se na različitim svojstvima, kao što su npr. pigmentacija, kemijski sastav, veličina te druge morfološke značajke. Široka paleta pigmenata daje im različite boje pa tako razlikujemo: modrozeleno alge (rod: *Cyanophyta*, oko 1500 vrsta), crvene alge (rod: *Rhodophyta*, oko 6000 vrsta), smeđe alge (rod: *Ochrophyta*, oko 1750 vrsta) i zelene alge (rod: *Chlorophyta*, oko 1200 vrsta). Rastu i razvijaju se u oceanima i morima diljem svijeta (Kılınç i sur., 2013). Prema njihovoj veličini, alge se mogu podijeliti na mikroalge (jednostanični organizmi) i makroalge (višestanični organizmi). Alge često žive u ekstremnim uvjetima svjetlosti, slanosti i temperature te da bi se prilagodile tim ekstremnim uvjetima, većina njih proizvodi različite sekundarne metabolite koji pokazuju izražena biološka svojstva i aktivnost (Ibañez i sur., 2012).

2.1.1. Smeđe alge

Na globalnoj razini postoji 1500 do 2000 vrsta smeđih algi, a većina ih je morska (Kadam i sur., 2013). Jadransko more obiluje brojnim vrstama među kojima su neke u opadanju, a neke čak i kritično ugrožene. Glavne endemske vrste na Mediteranu su: *Cystoseira zosteroides*, *Cystoseira spinosa* i *Cystoseira funkii* koje se nalaze na 25 do 47 metara dubine (Hereu i sur., 2008).

Općenito, smeđe alge su veće, mogu narasti do duljine 45 m ili više i većina ih se nalazi u hladnijim vodama. Ukupna veleprodajna vrijednost suhih smeđih algi u svijetu, prikupljenih ili kultiviranih, iznosi oko 300 milijuna dolara. Rezerve hrane čine složeni polisaharidi, šećeri i viši alkoholi. Glavna rezerva ugljikohidrata je laminarin, a pravi škrob nije prisutan. Nema poznatih jednostaničnih ili kolonijalnih predstavnika. *Laminariales* (kelp) je najveća (do 70 m duga) i

možda najkompleksnija smeđa alga; jedina za koju je poznato da ima diferencijaciju unutarnjeg tkiva u provodno tkiva, međutim, nema pravi ksilem koji se nalazi u višim biljkama (Anonimus 1, 2018).

Dok su crvene i zelene vrste algi bogate polisaharidima, smeđe su bogate topljivim prehranbenim vlaknima i jodom. Između sve tri navedene vrste algi, najveći fitokemijski sadržaj zabilježen je kod smeđih. Boja morskih algi pripisuje se pigmentima kao što je fikobilin za crvene, klorofil za zelene i fukoksantin za smeđe alge. Glavni pigmenti u smeđim algama su, uz fukoksantin, klorofil *a* i klorofil *c*, koji daju zelenkasto-smeđu boju algama (Kadam i sur., 2013). Dominantnost ksantofilnog pigmenta fukoksantina, odgovornog za boju smeđih algi maskira druge pigmente kao klorofil *a* i *c* te druge ksantofile (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

Smeđe alge roda *Cystoseira* (Slika 1.) su među najdominantnijim i ekološki najvažnijim vrstama iz obitelji *Cystoseiraceae* na Mediteranu i u Jadranskom moru. Rod *Cystoseira* sastoji se od 45 vrsta, od kojih je većina endemična u Sredozemnom moru, čak 19 od 29 zastupljenih vrsta (Amico, 1995). To je rod sa svjetskom distribucijom od oko 80 % vrsta koje se javljaju duž mediteranske i susjedne atlantske obale, a nalazi se uglavnom u subtropskim područjima, s najvećom koncentracijom na Mediteranu (Amico, 1995). One predstavljaju najvišu razinu složenosti mediteranskih algi, dugovječne su, mogu doseći visoke vrijednosti biomase i dominirati u nekoliko zajednica, stoga ih se općenito smatra "mediteranskim kelpima" (Mangialajo i sur., 2008). Ovaj rod živi na stjenovitim podlogama infralitoralne zone gdje imaju važnu ekološku ulogu u pružanju staništa, hrane i skloništa za razne organizme. Međutim, posljednjih godina, alge iz roda *Cystoseira* su značajno smanjene ili nestale zbog uništavanja staništa i eutrofikacije u Sredozemnom moru. Čini se da su vrste *Cystoseira* osjetljive na razne ekološke stresove, zbog čega se koriste u procjeni ekološkog stanja. Usprkos ekološkoj važnosti, taksonomija vrsta unutar ovog roda još uvijek je slabo razjašnjena i nema dovoljno studija koje istražuju genetsku raznolikost vrsta *Cystoseira* u Jadranskom moru (Rožić i sur., 2012).



a) b)
Slika 1. Smeđa alga *Cystoseira*: a) (Anonymous 2, 2015), b) (Anonymous 3, 2008)

2.2. KEMIJSKI SASTAV

Ekstrakti algi predmetom su brojnih istraživanja zbog raznolikog kemijskog sastava i potencijalne primjene u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Morske su alge dobar izvor antioksidacijskih spojeva. Svježa biomasa algi sadrži askorbat (vitamin C) i glutation (GSH). Bogate su ugljikohidratima, proteinima, mineralima, uljima i mastima, polinezasićenim masnim kiselinama (eikozapentaenska kiselina, dokozaheksenska kiselina i γ -linolenska kiselina) kao i bioaktivnim komponentama (polifenoli, tokoferoli-vitamin E, vitamin C) te pigmentima kao što su karotenoidi (karoten i ksantofil), klorofili i fikobilini (fikocijanin i fikoeritrin). Navedene skupine bioaktivnih spojeva imaju antibakterijska, antivirusna, antifungalna, antioksidativna, protuupalna i anti-tumorska svojstva (Michalak i Chojnacka, 2014). Biomasa algi smatra se višekomponentnim antioksidacijskim sustavom, koji je općenito učinkovitiji zbog interakcije između različitih antioksidativnih komponenti (Sathasivam i sur., 2017).

2.2.1. Polisaharidi

Morske alge sadrže visoku razinu polisaharida, od kojih većinu čine prehrambena vlakna. Stanična stjenka i skladišni polisaharidi iz morskih algi specifični su ovisno o svakoj pojedinoj vrsti. Mnoga biološka svojstva polisaharida iz algi pripisuju se sulfatnim polisaharidima bogatim fukozom koji su prisutni u staničnim matricama. Smeđe morske alge osobito su bogate sulfatnim polisaharidima, kao što su fukoidani i alginska kiselina, koji se mogu potencijalno iskoristiti kao funkcionalni sastojci sa pozitivnim učinkom na zdravlje (Wijesinghe i Jeon, 2013). Njihov sadržaj u algama varira ovisno o sezoni, dobi, vrstama algi te geografskom položaju (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

S ekonomskog stajališta, polisaharidi algi su najznačajniji proizvodi od algi. Njihova ekstrakcija i daljnja identifikacija omogućuju pronalaženje potencijalne primjene u medicini, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (kozmetici, nutraceutici), uključujući antikoagulativnu, protuupalnu, imunomodulatornu i antitumorsku aktivnost. Osim toga, polisaharidi algi također se mogu koristiti u hrani kao sredstva za zgušnjavanje, kao stabilizatori, punila i slično. Agar, karagenan ili alginati obično se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao funkcionalni sastojci ili stabilizatori. Također je uočeno da polisaharidi iz morskih algi imaju prebiotička svojstva. Najznačajniji polisaharidi algi su ulvan iz zelenih algi; alginati, fukani i laminarin iz smeđih algi; te karageneni i porfirin iz crvenih algi (Michalak i Chojnacka, 2014).

2.2.2. Ulja i masti

Poznato je da alge sadrže značajne lipide i predstavljaju vrijedan izvor istih. Mikroalge su važan izvor komercijalno proizvedenih visokovrijednih komponenti, uključujući polinezasićene masne kiseline. Frakcija lipida sastoji se prvenstveno od polinezasićenih masnih kiselina, npr. omega-3 masnih kiselina: eikozapentaenska kiselina (EPA) i dokozaheksenska kiselina (DHA) te omega-6 masnih kiselina: γ -linolenska kiselina (GLA) i arahidonska kiselina (AA) (Michalak i Chojnacka, 2014). Dokazano je da su polinezasićene masne kiseline neophodne za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma i njegovo zdravlje zbog antibakterijskih, antifungalnih i antioksidativnih svojstva (Michalak i Chojnacka, 2014). Njihova primjena je široko rasprostranjena u obliku dodataka prehrani, funkcionalne hrane, ali i u farmaceutskoj industriji. Steroli su druga značajna skupina lipida ekstrahiranih iz biomase algi. Fitosteroli izolirani iz algi mogu se primjenjivati u nekoliko područja: lijekovi (proizvodnja terapijskih steroida), nutraceutici, prehrana (antikolesterolski aditivi u funkcionalnoj hrani te potencijalna antikancerogena svojstva) i kozmetika. Značajno područje za primjenu lipida algi je proizvodnja biodizela te to postaje globalna, brzo rastuća industrija (Michalak i Chojnacka, 2014).

2.2.3. Proteini

Alge se smatraju alternativnim izvorom proteina zbog visokog proteinskog sadržaja i aminokiselina. Među mikroalgama, *Spirulina* je najpoznatiji izvor proteina jednostaničnih organizama te ima vrijedna nutritivna svojstva. Proteini izolirani iz algi privlače sve veću pažnju zbog svog bioaktivnog potencijala i funkcionalnih svojstava. Najznačajnija skupina su

fikobiloproteini dobiveni iz algi, koji su karakterizirani hepatoprotektivnim, protuupalnim i antioksidativnim aktivnostima. Fikobilin se ekstrahira uglavnom iz *Cyanobacteria* i *Rhodophyta* koje imaju nutritivni i farmaceutski potencijal. Druga primjena ekstrahiranih fikobilina odnosi se na bojila u hrani i kozmetici (Michalak i Chojnacka, 2014). Prisutnost polisaharidnih stjenki u velikim količinama jako smanjuje efikasnost ekstrakcije proteina iz morskih algi. To bi moglo ograničiti potencijalnu upotrebu alginskih proteina i peptida u komercijalne svrhe (Wijesinghe i Jeon, 2013).

2.2.4. Polifenoli

Važnu skupinu sekundarnih metabolita algi čine polifenoli; najviše su zastupljene: fenolne kiseline, tanini, flavonoidi, katehini i florotanini. Florotanini su polimeri floroglucinolnih jedinica (1,3,5-trihidroksibenzena). Sadržaj florotanina može varirati od 1 do 14 % u različitim vrstama morskih algi. Imaju važne biološke aktivnosti kao što su antioksidativne, antiproliferativne, antibiotske, antidijabetičke, antialergijske i protuupalne (Kadam i sur., 2013). Uočeno je da među svim morskim algama, smeđe alge sadrže najveće koncentracije florotanina (Michalak i Chojnacka, 2014).

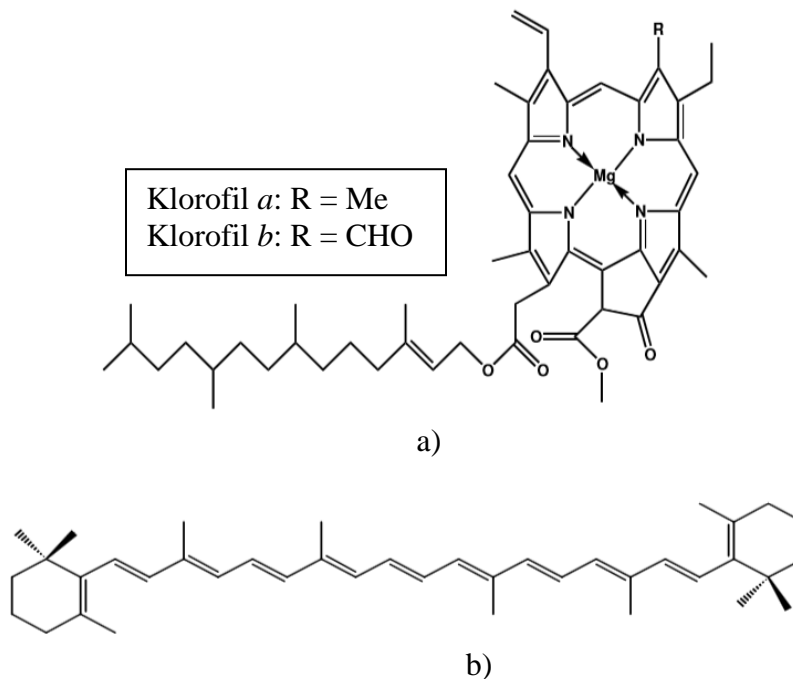
2.2.5. Pigmenti

Alge sadrže različite vrste pigmenata, a tri osnovne vrste pigmenata u algama su klorofili i karotenoidi, čije su strukturne formule prikazane na slici 2. te fikobiloproteini (Pangestuti i Kim, 2011). Prirodni pigmenti mogu se smatrati potencijalnim zamjenama za sintetska bojila u hrani. Štoviše, biološke aktivnosti prirodnih pigmenata koje se odnose na prevenciju brojnih degenerativnih bolesti pružaju dodatne koristi za hranu i različite nutritivne proizvode u kojima se ti spojevi koriste. Ta prirodna bojila su stoga važna i sa industrijske, ali i prehrambene točke gledišta, a izolacija pigmenata iz prirodnih izvora postala je sve učestalija. Industrijska vrijednost morskih algi kao prirodnih izvora aktivnih sastojaka dodatno se povećava zbog prisutnosti različitih pigmenata (Wijesinghe i Jeon, 2013). Alge imaju prednost nad drugim izvorima biološki aktivnih spojeva zbog jeftinog, jednostavnog i ekološki prihvatljivog proizvodnog procesa, visokih prinosa ekstrakcije i najvažnije, dostupnosti biomase (Michalak i Chojnacka, 2014).

Klorofili su zeleni pigmenti koji sadrže porfirinski prsten i pronađeni su u svim algama, višim biljkama i cijanobakterijama. Strukturno, klorofili su supstituirani tetrapiroлом s centralno vezanim atomom magnezija; porfirin tetrapiról je dalje esterificiran u diterpenski alkohol, fitol, da se dobije klorofil (Pangestuti i Kim, 2011). Postoje četiri vrste klorofila pronađene u morskim algama; prvi i najvažniji je klorofil *a* koji apsorbira većinu energije iz valne duljine od ljubičaste, plave i narančasto-crvene svjetlosti. Druga i treća vrsta klorofila su klorofil *b* i *c* te četvrti otkriveni tip klorofila, klorofil *d*, koji je pronađen u crvenim algama (Pangestuti i Kim, 2011). Istraživanja pokazuju da je sadržaj klorofila u algama iz uzgoja tri puta veći nego u algama u otvorenim morima. Klorofil *a* neophodan je za proces fotosinteze budući da je sastavni dio tilakoida-membranskih nakupina u kloroplastima gdje se odvija taj proces. Prilikom procesiranja hrane klorofili se pretvaraju u feofitin, pirofeofitin i feoforbid, a nastali derivati pokazuju antimutageno i antikancerogeno djelovanje (Holdt i Kraan, 2011). Podaci o biološkoj raspoloživosti derivata klorofila djelomično su ograničeni zbog opće pretpostavke da ljudi ne mogu apsorbirati klorofile (Pangestuti i Kim, 2011).

Karotenoidi su najrašireniji pigmenti u prirodi i prisutni su u gotovo svim algama. Poznato je da karotenoidi iz hrane, kao što su voće i povrće, mogu pridonijeti zdravlju i nižoj smrtnosti od brojnih kroničnih bolesti. To su linearni polieni (sadrže velik broj dvostrukih veza) koji djeluju kao „sakupljači“ svjetlosne energije i kao antioksidansi koji inaktiviraju reaktivne kisikove vrste (ROS). Mogu se klasificirati u dvije skupine: karoteni, koji su nezasićeni ugljikovodici; i ksantofili, koji su oksidirani oblici karotena te sadrže kisik u svojoj strukturi. Među karotenoidima, fukoksantin je glavni predstavnik ksantofila u smeđim algama (Wijesinghe i Jeon, 2013). Njegova količina u algama varira ovisno o godišnjem dobu i životnom ciklusu alge (Holdt i Kraan, 2011). Jedan je od najzastupljenijih karotenoida koji pridonosi sa oko 10 % od ukupne proizvodnje karotenoida u prirodi. U našem tijelu, apsorpcija fukoksantina snažno ovisi o brojnim čimbenicima koji još uvijek nisu u potpunosti razjašnjeni, npr. količina i vrsta konzumiranih lipida, stabilnost matrice u kojoj je karotenoid bio vezan i dodatni prehrambeni čimbenici kao što su prehrambena vlakna (Pangestuti i Kim, 2011). U živim je organizmima identificirano više od 400 vrsta karotenoida; među njima, β -karoten i astaksantin su široko komercijalizirani, a lutein, zeaksantin i likopen se koriste u manjoj mjeri (Sathasivam i sur., 2017). U smeđim algama najzastupljeniji su β -karoten, violaksantin i fukoksantin (Holdt i Kraan, 2011).

Ostali pigmenti koji se nalaze u morskim algama su fikobiliproteini, koji su fluorescentni proteini topljivi u vodi. U mnogim algama, raspoređeni su u substanične strukture zvane fikobilosomi. Boja fikobiloproteina proizlazi iz prisutnosti kovalentno pričvršćene prostetske skupine, koji su linearni tetrapiroli dobiveni biosintetski iz hema. Postoje tri glavne vrste fikobiloproteina: fikocijanini, alofikocijanini i fikoeritrini koji su zastupljeniji u crvenim algama (Pangestuti i Kim, 2011).



Slika 2. Shematski prikaz struktura: a) klorofila *a* i *b*; b) karotenida (Sumanta i sur., 2014)

2.3. PIGMENTI I UTJECAJ NA ZDRAVLJE

Morske alge se zbog niskog sadržaja lipida, visoke koncentracije polisaharida, visokih udjela polinezasićenih masnih kiselina, vitamina i minerala te ostalih bioaktivnih molekula (klorofili, karotenoidi, polifenoli i sl.), potencijalno mogu iskoristiti kao funkcionalni sastojci za primjenu kod ljudi, ali i životinja. Bez obzira na veliki broj istraživanja koja se provode s ciljem izolacije i identifikacije novih spojeva s potencijalnim medicinskim, zdravstvenim ili farmaceutskim djelovanjem, i dalje je dostupno malo spojeva sa stvarnim pozitivnim učinkom (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

Antioksidativno djelovanje. Prirodni pigmenti algi, ne samo da funkcioniraju kao bojila, nego također pridonose antioksidativnoj aktivnosti morskih algi. Antioksidativna aktivnost pigmenata ovisi o njihovim strukturnim značajkama kao što su: prsteni porfirina, fitilni lanac i produženi sustav konjugiranih dvostrukih veza (Pangestuti i Kim, 2011). Fernando i sur. (2016) zaključili su da su za antioksidativna svojstva algi zaslužni florotanini. *Ecklonia cava* jedan je od najboljih izvora polifenolnih spojeva, uključujući florotanine koji su pokazali sposobnost uklanjanja superoksidnih i DPPH radikala te inhibicijsko djelovanje pri lipidnoj peroksidaciji. Sličnu aktivnost pokazale su i druge smeđe alge, *Eisenia bicyclis* te *Ecklonia kurome*.

Antikancerogeno djelovanje. Prirodni pigmenti morskih algi kao nove antikancerogene tvari imaju snažna svojstva za pozitivne učinke u terapiji protiv karcinoma te primjenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Pangestuti i Kim, 2011). Abu-Ghannam i Shannon (2017) pretpostavljaju da je antikancerogeno djelovanje fukoksantina, kao jednog od najzastupljenijih pigmenata u smeđim algama, rezultat njegove sposobnosti da inducira apoptozu u tumorskim stanicama.

Protuupalno djelovanje. Smatra se da sekundarni metaboliti izolirani iz morskih algi imaju protuupalnodjelovanje. Međutim, malo je znanstvenih istraživanja o protuupalnom djelovanju pigmenata iz morskih algi i do sada se tek nekoliko studija bavilo tom problematikom. Ipak, inhibicija protuupalnih posrednika prirodnim pigmentima ističe potencijal bioaktivnih molekula algi u prevenciju i/ili liječenje upalnih i drugih srodnih bolesti (Pangestuti i Kim, 2011).

Utjecaj na pretilost. Kombinacija prirodnih pigmenata ima potencijal da se koristi kao funkcionalni sastojak u hrani i lijekovima u liječenju ili prevenciji pretilosti jer i pigmenti mogu djelovati kao regulator metabolizma lipida u masnim tkivima. Pigmenti izolirani iz morskih algi, osobito fukoksantin, mogu se smatrati obećavajućim dodatcima prehrani i lijekovima u prevenciji i reguliranju pretilosti (Pangestuti i Kim, 2011). U liječenju pretilosti, pokazalo se da fukoksantin posreduje u indukciji mitohondrijskog nevezanog proteina tip 1 u abdominalnom adipoznom tkivu mitohondrija i tako dovodi do oksidacije masnih kiselina i proizvodnje topline, što rezultira smanjenjem bijelog masnog tkiva (Abu-Ghannam i Shannon, 2017).

Neuroprotektivno djelovanje. Pigmenti su izvor neuroprotektivnih tvari i mogu biti funkcionalni sastojci u hrani i lijekovima te na taj način sudjelovati u liječenju ili sprječavanju

neurodegenerativnih bolesti. Do sada je neuroprotektivni učinak pigmenata uočen *in vitro*, stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se taj učinak pigmenata potvrdio *in vivo* i na ljudima (Pangestuti i Kim, 2011).

2.4. PRIMJENA ALGI U INDUSTRIJI

Posljednjih godina povećao se interes za razvoj procesa proizvodnje ili ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz prirodnih izvora, zbog potencijalne primjene u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Slika 4.). Morske alge su tradicionalni dio prehrane u azijskim zemljama poput Kine, Japana i Koreje. Osim toga, upotrebljavaju se kao izvor fitokemikalija za industrijsku primjenu kao što su lijekovi, nutraceutici, kozmeceutici, funkcionalna hrana, u zapadnim zemljama. Također, sve više se naglašava morske alge kao izvor bioaktivnih spojeva, što će vjerojatno olakšati otkrivanje i razvoj funkcionalnih sastojaka (Wijesinghe i Jeon, 2013). Interes za funkcionalnom hranom raste, budući da dodatno, uz prehrambene i energetske, može pružiti određene fiziološke pogodnosti, kao što su npr. antihipertenzivno, antioksidativno ili protuupalno djelovanje (Herrero i sur., 2006). Nadalje, razvijeni su i nutraceutici, proizvodi koji se obično koriste kao dodaci prehrani, prodaju se kao tablete i kapsule, a mogu pružiti važne zdravstvene prednosti. Potrošači najčešće prednost daju proizvodima prirodnog podrijetla (tj. ne-sintetskog) čiji se sastojci obično ekstrahiraju iz prirodnih izvora, kao što su biljke, nusproizvodi hrane ili alge i mikroalge. Ove vrste morskih izvora dobivaju sve više pozornosti, uglavnom zbog njihovog sadržaja funkcionalnih sastojaka, kao što su polinezasićene masne kiseline, β -karoten i drugi pigmenti (antioksidansi), sulfatirani polisaharidi (antivirusno djelovanje) i steroli (antimikrobno djelovanje).

Komercijalna proizvodnja mikroalgi iznosi približno 5000 tona suhe tvari godišnje. Postoji oko 110 komercijalnih proizvođača mikroalgi prisutnih u regiji Azija-Pacifik, s kapacitetom od 3 do 500 tona godišnje. Oko devet desetina uzgoja algi nalazi se u Aziji, od kojih je većina u Kini, Tajvanu i Indiji. Vrlo malo vrsta mikroalgi ima komercijalnu važnost: *Spirulina*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Dunaliella*, *Botryococcus*, *Phaeodactylum*, *Porphyridium*, *Chaetoceros*, *Cryptocodinium*, *Isochrysis*, *Nannochloris*, *Nitzschia*, *Schizochytrium*, *Tetraselmis* i *Skeletonema*. Tržišna cijena biomase algi varira i kreće se u rasponu od 100 €/kg za ljudsku potrošnju, 1-5 €/kg za kemikalije i 0,40 €/kg za biogorivo. Trenutno, većina komercijaliziranih proizvoda od algi dostupna je na tržištima kao zdrava hrana, u obliku tableta, kapsula i tekućina,

a njihovi se proizvodi miješaju sa tijestima, grickalicama, bombonima, gumama, rezancima, vinom, pićima i žitaricama za doručak. *Aphanizomenon flos-aquae*, *Chlorella* sp., *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta* i *Spirulina plantensis* su neke od vrsta mikroalgi koje se široko koriste kao izvor hrane za ljude jer su bogate proteinima i vrijedan su izvor raznih drugih nutrijenata. Među tim mikroalgama, *Spirulina* i *Chlorella* trenutno dominiraju na tržištu (Sathasivam i sur., 2017).

2.5. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je brza i učinkovita metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Odnosi se na prijenos jedne ili više tvari, iz materijala u kojem se nalaze, u tekuću fazu, a nakon toga slijedi separacija i izdvajanje tvari iz tekuće faze. Sve metode ekstrakcije otapalima baziraju se na miješanju uzorka s prikladnim otapalom i/ili prevođenje uzorka u dvofazni sustav sastavljen od dva ili više otapala koja su međusobno slabo topljiva. Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti otapala s obzirom na polarnost, vremenu ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Conde i sur., 2010).

Većina bioaktivnih spojeva više ili manje su osjetljivi na tehnike ekstrakcije koje se temelje na toplini ili korištenju otapala. Osim toga, ove su tehnike dugotrajne, zahtjevne, slabo selektivne te imaju niske prinose ekstrakcije, a uz to, koriste velike količine (ponekad štetnih) otapala (Herrero i sur., 2006). Stoga je potrebno identificirati i razviti nove učinkovite postupke ekstrakcije koji se, između ostaloga, koriste i za ekstrakciju bioaktivnih spojeva iz algi. To su novije tehnike ekstrakcije: enzimska ekstrakcija (EAE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE), ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), ekstrakcija superkričnim tekućinama (SFE) i ubrzana ekstrakcija otapalima uz povišeni tlak (PLE). Prednosti spomenutih tehnika, u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije otapalima, uključuju: veće prinose, smanjeno vrijeme trajanja procesa, niže troškove, bolju selektivnost, smanjenu upotrebu otapala te su ekološki prihvatljivije (Kadam i sur., 2013).

2.5.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE)

Korištenje ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (PLE) za izolaciju bioaktivnih komponenti prvi put je zabilježeno 1996. godine. To je moderna metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995. godine. Riječ je o automatiziranoj tehnici

kod koje se ekstrakcija provodi otapalom uz povišenu temperaturu i povišeni tlak, a naročito je pogodna za ekstrakciju spojeva osjetljivih na povišenu koncentraciju kisika i termolabilnih spojeva. Automatizacija omogućuje visoku propusnost uzoraka i bržu provedbu tehnike. Ova metoda primjenjuje se za izolaciju širokog spektra bioaktivnih spojeva. Uvjeti temperature i tlaka koji se koriste u ovoj metodi ekstrakcije su u rasponu od 50 do 200 °C i 3,5 do 20 MPa. Iako ovaj tip ekstrakcije zahtjeva više temperature u odnosu na neke druge ekstrakcijske metode, visoki tlakovi otapalo zadržavaju u tekućem stanju pri visokim temperaturama, čime se značajno povećava brzina difuzije, topljivost analita i ubrzava sama ekstrakcija. Visoki tlak olakšava prodor otapala kroz biljni materijal, ubrzava proces ekstrakcije te istovremeno smanjuje količinu otapala potrebnog za ekstrakciju. Automatizirana oprema (Slika 3.) osigurava savršeno preciznu kontrolu tlaka, temperature, vremena ekstrakcije i sastava otapala tijekom čitavog procesa. Moguće je programirati ekstrakciju 24 uzorka u jednoj seriji, gdje su uzorci smješteni u posudice od nehrđajućeg čelika u kojima su zaštićeni od svjetlosti i kisika (Mottaleb i Sarker, 2012). Ekstrakcijsko otapalo, temperatura, tlak, vrijeme trajanja ekstrakcije kao i broj ciklusa, utječu na iskorištenje, brzinu te uspješnost procesa, a održavanjem visoke temperature i tlaka postiže se brža ekstrakcija (Kadam i sur., 2013). U procesu PLE koriste se i adsorbenti koji se stavljaju u ćelije zajedno s uzorkom i tako povećavaju selektivnost postupka. Adsorbent se u ćeliju stavlja prvi, a na njega se zatim stavlja uzorak i na taj se način tijekom ekstrakcije neželjene komponente zadržavaju u ćeliji (Mottaleb i Sarker, 2012).

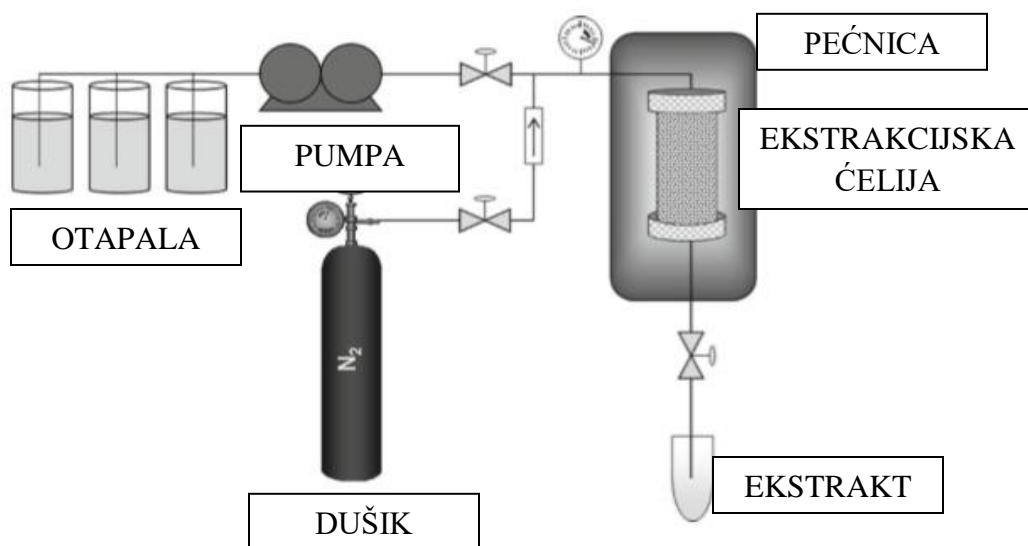
PLE koristi konvencionalna otapala, kao i vodu i etanol za izolaciju polarnih do srednje polarnih spojeva zadržavajući time ekološka svojstva ekstrakcije (Mustafa i Turner, 2011). Osim toga, PLE znatno smanjuje potrošnju otapala budući da pri povišenoj temperaturi i tlaku otapala učinkovitije prodiru u (čvrste) uzorke. PLE je mnogo brža tehnika od ostalih tehnika za ekstrakciju otapalima. Također, u usporedbi sa ekstrakcijom superkričnim tekućinama, za PLE ekstrakciju može se koristiti širi raspon otapala. Prednost ove ekstrakcijske tehnike je i u mogućnosti provođenja ekstrakcije u više stupnjeva (ili ciklusa) što je važno jer se tim postupkom učinkovitost same ekstrakcije značajno povećava. Postoji značajan potencijal za primjenu ove tehnike za ekstrakciju bioaktivnih komponenti iz morskih algi i mikroalgi. Za sada je ograničen broj studija koje su istražile primjenu PLE kod smeđih makroalgi (Kadam i sur., 2013).



Slika 3. Sustav za ubrzanu ekstrakciju otapalima (Dionex ASE 350) (Thermo Scientific Application Note 1108, 2014)

Različite tehnike ekstrakcije koriste se za proizvodnju ekstrakata algi, a razne studije proučavale su učinkovitost ubrzanu ekstrakciju otapalima u odnosu na tradicionalne tehnike ekstrakcije. Glavna prednost PLE i sličnih, novijih, tehnika ekstrakcije jest izolacija biološki aktivnih komponenti bez da se naruši ili izgubi njihova aktivnost. S druge strane, glavni nedostatak tradicionalnih tehnika ekstrakcije je upotreba velikih količina otapala (koja su često toksična) te vremenski dugo trajanje procesa ekstrakcije (Michalak i Chojnacka, 2015). Denery i sur. (2004) provodili su ekstrakciju karotenoida iz algi *Haematococcus pluvialis* i *Dunaliella salina* te se PLE pokazala jednako dobrom ili učinkovitijom metodom u odnosu na tradicionalnu ekstrakciju otapalima. Gilbert-López i sur. (2016) su prilikom izolacije biološki aktivnih komponenti iz *Phaeodactylum tricorutum* uspoređivali dvije tehnike ekstrakcije, PLE i MAE (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima). Ukupni sadržaj fenola i karotenoida te antioksidacijska aktivnost, bili su veći primjenom MAE, međutim, s obje metode dobili su fukoksantin kao glavni spoj, a veći prinosi ekstrakcije ovog pigmenta postignuti su sa PLE (32,29 mg g⁻¹ ekstrakta). Zaključak ove studije bio je da obje tehnike zadovoljavaju načela “zelene” ekstrakcije, a osim toga, nusprodukti nastali ovim procesima bogati su proteinima i šećerima, također vrijednim komponentama. Slično istraživanje proveli su Xiao i sur. (2012) koji su također pomoću MAE ekstrahirali fukoksantin iz smeđih algi *Laminaria japonica*, *Undaria pinnatifida* i *Sargassum fusiforme* te pri optimalnim uvjetima dobili koncentracije manje od 1 mg g⁻¹ alge, dok je u prethodnoj studiji prosječna koncentracija fukoksantina bila 4,59 mg g⁻¹. Za razliku od snage mikrovalova, omjer otapala i uzorka te vrijeme zračenja su se pokazali kao statistički značajni parametri. Plaza i sur. (2012) uspoređivalisu PLE i ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE) biološki aktivnih spojeva iz alge *Chlorella vulgaris*. Utvrdili su da je PLE bolja od UAE

zbog automatiziranosti, brzine i učinkovitosti metode. Golmakani i sur. (2014) predložili su PLE u kojoj se kao ekstrakcijsko otapalo koristi limonen (ciklički monoterpen zastupljen u citrusnom voću) i etanol (1:1), pri 200 °C tijekom 15 minuta. Ova metoda je selektivan process za dobivanje lipidnih ekstrakata bogatih vrijednim masnim kiselinama. U navedenim uvjetima izolirali su lipide iz različitih mikroalgi (*Spirulina*, *Phormidium*, *Anabaena* i *Stigeoclonium*) te su najveće prinose ekstrakcije dobili za *Spirulinu* dok je najveći sadržaj omega-3 masnih kiselina bio u *Stigeoclonium*.



Slika 4. Shematski prikaz procesa ubrzane ekstrakcije otapalima (prema Ibanez i sur., 2012)

Razvoj jedinstvene, standardne metode za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti i dalje ostaje izazov za znanstvenike. Teži se primjeni „zelene“ ekstrakcije koja se bazira na pronalasku i dizajnu učinkovitijeg i ekonomičnijeg ekstrakcijskog procesa koji će biti ekološki prihvatljiv. Prednosti PLE u odnosu na konvencionalne tehnike su: učinkovita ekstrakcija iz čvrstih materijala, bolje prodiranje otapala u uzorak, smanjena viskoznost otapala pri povišenom tlaku i temperaturi što rezultira boljom topljivosti, uspješniji prijenos mase, smanjene količine otapala i vrijeme trajanja ekstrakcije te automatizacija procesa. Međutim, postoje ograničenja s ekonomske strane budući da automatizacija zahtijeva sofisticiranu i specijaliziranu opremu (shematski prikaz na slici 4.) te kontinuirano poboljšanje s ciljem minimalnog utjecaja analitičara zaduženih za ekstrakciju. Nadalje, ekstrakcija može biti nepotpuna zbog ograničenog volumena otapala te može doći do nižih prinosa ekstrakcije termolabilnih komponenti zbog povišenih temperatura (Ameer i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak smeđe alge

Istraživanje je provedeno na uzorku smeđe alge *Cystoseira* koja je izronjena u veljači 2018. godine. Uzorci alge najprije su ispirani u slatkoj i destiliranoj vodi te odmah zamrznuti na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ u zamrzivaču ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska) do trenutka provođenja postupka liofilizacije. Postupak liofilizacije prethodno smrznutih uzoraka alge proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO, (Labogene, Danska). Na 6 plitica je u jednom sloju raspoređena masa od oko 500 g smrznute alge nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je ukupno trajao 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130-0,155 hPa i temperaturi od -30 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}/18$ sati, a izotermna desorpcija pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}/6$ sati.

Osušena alga je pomoću električnog mlinca samljevena u prah, a prah je pohranjen u staklenu posudu i čuvan u mraku na sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcije.

3.1.2. Kemikalije

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

3.1.3. Aparatura i pribor

- liofilizator, CoolSafe, model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- ASE ekstraktor, Thermo Scientific™ Dionex™ ASE™ 350 (Thermo Fisher Scientific, California, SAD)
- analitička vaga, ABT 220 – 4M (Kern, Njemačka)
- analitička vaga, AX224 (OHAUS Corporation, SAD)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- celulozni filteri (Thermo Scientific, Dionex™ 350/150 Extraction Cell Filters)
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)

- odmjerne tikvice (50 i 100 mL)
- mikropipete (200 i 1000 μ L)
- plastična žličica
- stakleni štapić
- staklene kivete
- plastična sisaljka

3.2. METODE

3.2.1. Ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (PLE)

Na analitičkoj vagi, u staklenoj čašici, odvažuje se 1 g (\pm 0,01) uzorka praha liofilizirane smeđe alge. Proces ekstrakcije *Cystoseira* sp. provodi se uz pomoć uređaja za ubranu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku (ASE 350, Dionex, Sunnyvale, CA, SAD). Ekstrakcijske ćelije od nehrđajućeg čelika napune se u uzastopnim slojevima s 2 celulozna filtera na dnu (veličine pora 20 μ m), potom slijedi dijatomejska zemlja (sloj od oko 2 cm), zatim 1 g praha *Cystoseira* sp. pomiješanog s 2 g dijatomejske zemlje te ponovno sloj dijatomejske zemlje na vrhu koja kao adsorbens sprječava agregaciju čestica uzoraka, što bi inače dovelo do začepjenja ekstrakcijske ćelije. Za sve analize korišten je etanol kao ekstrakcijsko otapalo i tlak od 1500 psi.

Ekstrakcije su provedene na različitim ekstrakcijskim temperaturama (100, 130 i 160 °C) u 1 ili 2 ciklusa ekstrakcije tijekom 5, 10 i 15 minuta. Vrijeme zagrijavanja mijenja se ovisno o temperaturi ekstrakcije (5 min, ako je temperatura ekstrakcije bila 100 °C; 7 min, ako je temperatura ekstrakcije bila 130 °C; a 8 min, ako je temperatura ekstrakcije bila 160 °C).

Po završetku ekstrakcije, ekstrakti su skupljeni u staklene bočice za skupljanje i nakon toga preneseni u odmjernu tikvicu od 50 ili 100 mL te su one do oznake dopunjene etanolom. Ekstrakti su potom pohranjeni na +4 °C u mraku do provođenja spektrofotometrijske analize.

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

UZORAK	TEMPERATURA (°C)	BROJ CIKLUSA	VRIJEME (min)
S1	100	1	5
S2	100	1	10
S3	100	1	15
S4	100	2	5
S5	100	2	10
S6	100	2	15
S7	130	1	5
S8	130	1	10
S9	130	1	15
S10	130	2	5
S11	130	2	10
S12	130	2	15
S13	160	1	5
S14	160	1	10
S15	160	1	15
S16	160	2	5
S17	160	2	10
S18	160	2	15

Aparatura za ekstrakciju sastoji se od: (i) ekstrakcijske ćelije koja ima automatski sustav zatvaranja da bi mogla izdržati povišeni radni tlak; (ii) pumpe koja služi za ostvarivanje radnog tlaka i transport ekstrakcijskih otapala; (iii) pećnice koja zagrijava uzorak; (iv) tekućeg dušika koji suši ekstrahirani analit po završetku ekstrakcije; i (v) staklene posude za prihvatanje ekstrakata. Učinkovita ekstrakcija zahtijeva čestice manje od 1 mm, jer što je veća površina čestice, to će ekstrakcija biti brža. Za učinkovitu ekstrakciju otapalima pri povišenom tlaku svi uzorci ne moraju biti potpuno suhi, već to ovisi o analitu, uzorku i otapalima upotrebljenim za ekstrakciju. Visoke razine vode u uzorku sprječavaju nepolarna organska otapala da dođu do analita, međutim upotreba polarnijih otapala kao što su aceton, metanol, ili smjese otapala heksan-aceton, diklormetan-aceton ili etilacetat-metanol omogućavaju ekstrakciju iz vlažnih uzoraka (Mottaleb i Sarker, 2012).

Jednom kad je uzorak stavljen u ekstrakcijsku ćeliju cijeli je proces automatiziran i programiran. Ova ekstrakcija omogućuje automatiziranu ekstrakciju maksimalno 24 uzorka (Zaghdoudi i sur., 2015). Ekstrakcijska ćelija napunjena uzorkom stavlja se u rotirajuće utore koji vrte ekstrakcijsku ćeliju do položaja koji omogućuje njen prijenos do pećnice. U pećnici se ćelija puni otapalom, zagrijava i nalazi pod tlakom. Nakon što se u ćeliji postigne zadana temperatura, ćelija se za vrijeme statičke ekstrakcije zadržava u pećnici pod konstantnom temperaturom i tlakom. Uzorak i otapalo sakupljaju se u staklenoj posudi, a ćelija se ispiri i suši s dušikom. Nakon završetka ekstrakcije, ćelija se vraća u početnu poziciju i slijedi nova ekstrakcija u ćeliji koja je unaprijed već postavljena na slijedeću poziciju (Mottaleb i Sarker, 2012).

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida

Princip metode

Određivanje klorofila i karotenoida bazira se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama. Klorofili najbolje apsorbiraju svjetlost u plavom i crvenom dijelu vidljivog spektra pri čemu je apsorpcijski maksimum za klorofil *a*(Ch-*a*) u plavom dijelu (~430 nm) te u crvenom dijelu spektra (~ 660 nm) dok se apsorpcijski maksimumi za klorofil *b*(Ch-*b*) nalaze između dvaju maksimuma Ch-*a*, i to na oko 450 i 640 nm. Apsorpcijski spektar svih fotosintetski aktivnih karotenoida pokazuje tri karakteristična apsorpcijska maksimuma u plavom dijelu spektra. Među karotenoidima je najzastupljeniji fukoksantin koji ouhvaća širi spektar, 450-540 nm (Abou-Arab i sur., 2010; Barba i sur., 2014).

Postupak određivanja

Dobiveni ekstrakti prebace se u odmjernu tikvicu od 50 mL te se tikvice nadopune 96 %-tnim etanolom do oznake. Potom se mjeri apsorbancija na 470 nm, 649 nm i 664 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, gdje se umjesto uzorka uzima 96 %-tni etanol. Kvantifikacija Ch-*a*, Ch-*b* i karotenoida provedene je prema jednadžbama koje su prethodno definirali Sumanta i sur. (2014).

Izračun

$$\text{Ch-a (mg L}^{-1}\text{)} = (13,36 \times A_{664}) - (5,19 \times A_{649}) \quad [1]$$

$$\text{Ch-b (mg L}^{-1}\text{)} = (27,43 \times A_{649}) - (8,12 \times A_{664}) \quad [2]$$

$$\text{Karotenoidi (mg L}^{-1}\text{)} = (1000 \times A_{470} - 2,13 \times \text{Ch-a} - 97,63 \times \text{Ch-b}) / 209 \quad [3]$$

Dobivene vrijednosti masenih koncentracija (mg L⁻¹) potom su preračunate i izražene kao mg g⁻¹ suhe tvari (mg g⁻¹ s.t.).

3.2.3. Statistička obrada rezultata

Eksperimentalni dizajn (Tablica 1.) te statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u mg g⁻¹ suhe tvari te je ispitivan utjecaj neovisnih varijabli: a) temperatura (100, 130 i 160 °C), b) broj ciklusa (jedan i dva) te c) vrijeme (5, 10 i 15 minuta). Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multivarijantne analize varijance (MANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$. U svrhu optimizacije korišten je alat za predviđanje i profiliranje. Čimbenici su postavljeni na optimalne vrijednosti te promatrani slijedom: temperatura kroz 7 koraka, vrijeme kroz 10 koraka i broj ciklusa kroz 2 koraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija pigmentata (klorofil *a*, klorofil *b* i karotenoidi) iz smeđe alge *Cystoseira* primjenom PLE uz upotrebu etanola kao otapala, pri različitim temperaturama (100, 130 i 160 °C), kroz različito vrijeme trajanja ekstrakcije (5, 10 i 15 min) u jedan i dva ciklusa. U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela pigmentata, a rezultati su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Maseni udjeli klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima smeđe alge *Cystoseira* proizvedenim primjenom PLE

UZORAK	Ch - a (mg g ⁻¹ s.t.)	Ch - b (mg g ⁻¹ s.t.)	Karotenoidi (mg g ⁻¹ s.t.)
S1	1,1199 ± 0,1191	0,0937 ± 0,0174	0,4602 ± 0,0473
S2	1,2022 ± 0,0303	0,0960 ± 0,0715	0,4718 ± 0,0195
S3	1,4598 ± 0,0671	0,0797 ± 0,0768	0,5999 ± 0,0706
S4	0,5995 ± 0,0380	0,6672 ± 0,0309	0,4955 ± 0,0420
S5	1,6467 ± 0,0402	0,2082 ± 0,0656	0,6410 ± 0,0062
S6	1,9906 ± 0,0485	0,3703 ± 0,1147	0,8064 ± 0,0185
S7	1,5860 ± 0,0410	0,3160 ± 0,1561	0,5477 ± 0,0448
S8	1,7533 ± 0,0411	0,3680 ± 0,0788	0,5704 ± 0,0223
S9	0,7456 ± 0,0083	1,4919 ± 0,0489	0,7663 ± 0,0407
S10	1,4544 ± 0,1688	0,1083 ± 0,1532	0,5378 ± 0,0120
S11	1,4615 ± 0,1037	0,2848 0,0091±	0,5005 ± 0,0160
S12	2,1895 ± 0,1355	0,8851 ± 0,0257	0,5732 ± 0,0363
S13	1,8713 ± 0,0160	0,5302 ± 0,0083	0,5512 ± 0,0031
S14	1,7935 ± 0,0358	0,4744 ± 0,0037	0,5398 ± 0,0191
S15	2,0211 ± 0,0826	0,2997 ± 0,1659	0,6526 ± 0,0144
S16	1,9630 ± 0,0793	0,6409 ± 0,0482	0,5190 ± 0,0572
S17	0,7908 ± 0,0188	0,0744 ± 0,1053	0,2688 ± 0,0209
S18	0,8207 ± 0,0534	0,0296 ± 0,0418	0,2816 ± 0,0225

Tablica 3. Utjecaj različitih parametara PLE na masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima smeđe alge *Cystoseira*

	N	Ch-a	Ch-b	Karotenoidi
Temperatura (°C)		$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †
100	12	$1,34 \pm 0,02^a$	$0,25 \pm 0,02^a$	$0,58 \pm 0,01^b$
130	12	$1,53 \pm 0,02^b$	$0,58 \pm 0,02^c$	$0,58 \pm 0,01^b$
160	12	$1,54 \pm 0,02^b$	$0,34 \pm 0,02^b$	$0,47 \pm 0,01^a$
Broj ciklusa		$p \leq 0,05$ †	$p = 0,75$ ‡	$p \leq 0,00$ †
1	18	$1,51 \pm 0,02^b$	$0,42 \pm 0,02^a$	$0,57 \pm 0,01^b$
2	18	$1,44 \pm 0,02^a$	$0,36 \pm 0,02^a$	$0,51 \pm 0,01^a$
Vrijeme (min)		$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †
5	12	$1,43 \pm 0,02^a$	$0,39 \pm 0,02^b$	$0,52 \pm 0,01^a$
10	12	$1,44 \pm 0,02^a$	$0,25 \pm 0,02^a$	$0,50 \pm 0,01^a$
15	12	$1,54 \pm 0,02^b$	$0,53 \pm 0,02^c$	$0,61 \pm 0,01^b$
Temperatura (°C), broj ciklusa		$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †
100, 1	6	$1,26 \pm 0,03^{a,b}$	$0,09 \pm 0,03^a$	$0,51 \pm 0,01^b$
100, 2	6	$1,41 \pm 0,03^c$	$0,42 \pm 0,03^c$	$0,65 \pm 0,01^e$
130, 1	6	$1,36 \pm 0,03^{b,c}$	$0,73 \pm 0,03^d$	$0,63 \pm 0,01^{d,e}$
130, 2	6	$1,70 \pm 0,03^d$	$0,43 \pm 0,03^c$	$0,54 \pm 0,01^{b,c}$
160, 1	6	$1,90 \pm 0,03^e$	$0,43 \pm 0,03^c$	$0,58 \pm 0,01^{c,d}$
160, 2	6	$1,19 \pm 0,03^a$	$0,25 \pm 0,03^b$	$0,36 \pm 0,01^a$
Temperatura (°C), vrijeme (min)		$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †
100, 5	4	$0,86 \pm 0,04^a$	$0,38 \pm 0,04^{b,c}$	$0,48 \pm 0,02^{a,b,c}$
100, 10	4	$1,42 \pm 0,04^{b,c}$	$0,15 \pm 0,04^a$	$0,56 \pm 0,02^c$
100, 15	4	$1,73 \pm 0,04^d$	$0,23 \pm 0,04^{a,b}$	$0,70 \pm 0,02^d$
130, 5	4	$1,52 \pm 0,04^c$	$0,21 \pm 0,04^{a,b}$	$0,54 \pm 0,02^{b,c}$
130, 10	4	$1,61 \pm 0,04^{c,d}$	$0,33 \pm 0,04^{a,b}$	$0,54 \pm 0,02^{b,c}$
130, 15	4	$1,47 \pm 0,04^{b,c}$	$1,19 \pm 0,04^d$	$0,67 \pm 0,02^d$
160, 5	4	$1,92 \pm 0,04^e$	$0,59 \pm 0,04^c$	$0,54 \pm 0,02^{b,c}$
160, 10	4	$1,29 \pm 0,04^b$	$0,27 \pm 0,04^{a,b}$	$0,40 \pm 0,02^{a,b}$
160, 15	4	$1,42 \pm 0,04^{b,c}$	$0,16 \pm 0,04^a$	$0,47 \pm 0,02^a$
Broj ciklusa, vrijeme (min)		$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †	$p \leq 0,00$ †
1, 5	6	$1,53 \pm 0,03^{b,c}$	$0,31 \pm 0,03^{a,b}$	$0,52 \pm 0,01^{a,b}$
1, 10	6	$1,58 \pm 0,03^{c,d}$	$0,31 \pm 0,03^{a,b}$	$0,53 \pm 0,01^{a,b}$
1, 15	6	$1,41 \pm 0,03^{a,b}$	$0,62 \pm 0,03^d$	$0,67 \pm 0,01^c$
2, 5	6	$1,34 \pm 0,03^a$	$0,47 \pm 0,03^{c,d}$	$0,52 \pm 0,01^{a,b}$
2, 10	6	$1,30 \pm 0,03^a$	$0,19 \pm 0,03^a$	$0,47 \pm 0,01^a$
2, 15	6	$1,67 \pm 0,03^d$	$0,43 \pm 0,03^{b,c}$	$0,55 \pm 0,01^b$
Prosječna vrijednost	36	1,47	0,39	0,54

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

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

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

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

Maseni udjeli Ch-a, Ch-b i karotenoida svih uzoraka prikazani su u tablici 2. dok su u tablici 3. prikazane njihove prosječne vrijednosti te utjecaji različitih parametara PLE na njihove masene udjele. Prosječne vrijednosti pigmenata u svih 36 uzoraka iznosile su: 1,47 mg g⁻¹ s.t. (Ch-a), 0,39 mg g⁻¹ s.t. (Ch-b) te 0,54 mg g⁻¹ s.t. (karotenoidi). Ch-a i Ch-b se uobičajeno u biljkama nalaze u odnosu 3:1 (Gaur i sur., 2006), a rezultati ovog istraživanja u skladu su s time. Dobiveni prosječni maseni udjeli nešto su niži od vrijednosti zabilježenih u sličnim istraživanjima primjene PLE na raznim vrstama algi. Plaza i sur. (2010) proveli su ekstrakciju karotenoida iz smeđe makroalge *Himanthalia elongata* primjenom PLE. Pri 100 °C uz etanol kao otapalo postigli su koncentraciju fukoksantina od 0,82 mg g⁻¹, zeaksantina od 0,13 mg g⁻¹ te violaksantina od 0,05 mg g⁻¹. Istraživanje provedeno na smeđoj algi *Eisenia bicyclis* u kojem je PLE ekstrakcija primijenjena na 2 g svježeg uzorka alge, rezultiralo je prinosom fukoksantina od 0,39 mg g⁻¹ što je u skladu sa predviđenim vrijednostima. Stoga su Shang i sur. (2011) istaknuli PLE kao učinkovitu metodu za optimizaciju procesa ekstrakcije budući da kroz kratko vrijeme trajanja ekstrakcije rezultira velikim prinosima te su predložili ovu metodu za primjenu na svim ostalim smeđim algama. Cha i sur. (2010) su primjenom PLE iz zelene mikroalge *Chlorella vulgaris* ekstrahirali 3,70 mg g⁻¹ luteina, 10,83 mg g⁻¹ Ch-a i 6,81 mg g⁻¹ Ch-b. Istraživanje Castro-Puyana i sur. (2016) na mikroalgi *Neochloris oleoabundans* rezultiralo je velikim prinosim karotenoida (45,2-142,8 mg g⁻¹) i klorofila (2,3-42,7 mg g⁻¹). Ovako veliki maseni udjeli, osim razlike u vrsti algi, posljedica su tri ciklusa kriogenog mljevenja kojem su podvrgnuti liofilizirani uzorci kako bi se razorile stanične stjenke te poboljšali prinosi ekstrakcije. Nadalje, svi analizirani uzorci sadržavali su 3-19 puta veće masene udjele karotenoida u odnosu na klorofile. Gilbert-López i sur. (2016) su primjenom PLE ekstrahirali karotenoide i klorofile iz smeđe mikroalge *Phaeodactylum tricornerutum*, pri tri različite temperature (50, 110 i 170 °C), koristeći etanol različitih koncentracija (0, 50 i 100 %) kao ekstrakcijsko otapalo. Pri 170 °C i 97 %tnoj otopini etanola prinosi fukoksantina iznosili su 5,81 mg g⁻¹, a pri 50 °C i 100 %tnoj otopini etanola čak 7,73 mg g⁻¹, što ide u prilog činjenici da je fukoksantin pigment osjetljiv na visoke temperature. Također, konačni zaključak ove studije bio je da su mikroalge, u odnosu na makroalge, bolji izvor fukoksantina.

Alge proizvode različite sekundarne metabolite, u različitim koncentracijama. Sadržaj metabolita (koji uključuje i pigmente) varira ovisno o različitim fizikalnim (svjetlost, temperatura itd.) i biološkim (sastav zajednice, biološko okruženje itd.) čimbenicima, godišnjem dobu te geografskom položaju (Frikha i sur., 2011) pa ih je vrlo teško međusobno uspoređivati.

4.1. UTJECAJ TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA

Ukoliko se obrati pozornost na utjecaj svakog pojedinog parametra na prinose ekstrakcije, vidljivo je kako su na temperaturi od 100 °C ekstrahirane najmanje količine Ch-a i Ch-b, dok je pri temperaturi od 130 i 160 °C ekstrakcija Ch-a podjednako uspješna (1,53 mg g⁻¹) odnosno bez statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$) između te dvije temperature. Najveći prinosi Ch-b dobiveni su pri 130 °C (0,58 mg g⁻¹) dok se daljnjim povećanjem temperature prinos smanjuje. Najmanji maseni udjeli karotenoida ekstrahirani su na 160 °C, a potencijalan razlog tome može biti degradacija ovih spojeva pri visokim temperaturama.

Povišena temperatura može imati dvojaki utjecaj na ekstrakciju – s jedne strane ubrzava ekstrakciju povećanjem topljivosti uzorka i brzine prijenosa mase. Nadalje, povećana temperatura smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala olakšavajući tako da se otapalo ravnomjerno raspodijeli preko biološkog materijala te se na taj način poboljša brzina ekstrakcije (Kadam i sur., 2013). Osim toga, porast temperature poboljšava kontakt analita s otapalom što također doprinosi uspješnosti ekstrakcije povećanjem brzine difuzije (Shang i sur., 2011). S druge strane visoka temperatura može dovesti do izomerizacije i razgradnje termolabilnih spojeva kao što su pigmenti (Plaza i sur., 2010). Zbog toga je iznimno važno precizno definirati najvišu temperaturu ekstrakcije koja omogućava brzu ekstrakciju s visokim prinosima, ali bez narušavanja termolabilnih pigmenata (Pasquet i sur. 2011). Temperatura je bila ključan parametar PLE pigmenata iz *Chlorella vulgaris* (Cha i sur., 2010). U navedenom istraživanju došlo je do značajnijeg povećanja učinkovitosti procesa ekstrakcije klorofila pri višim temperaturama, u odnosu na kemijske reakcije degradacije. Maksimalni prinosi ekstrakcije Ch-a i Ch-b ostvareni su pri temperaturama od 150 do 160 °C. S druge strane, β -karoten bio je najosjetljiviji na povišenu temperaturu te je do smanjenja njegove koncentracije došlo u temperaturnom intervalu od 120 do 160 °C. Cha i sur. (2010) navode da *Chlorella* akumulira velike količine klorofila samo u

kloroplastima koji su okruženi debelom staničnom stjenkom što može otežati njihovu ekstrakciju. Velika energija pri visokim temperaturama PLE smanjuje tu zaštitnu barijeru te povećava učinkovitost procesa. Sličan trend uočili su i Denery i sur. (2004) prilikom PLE karotenoida iz algi *Haematococcus pluvialis* i *Dunaliella salina*. Porastom temperature ekstrakcije s 20 na 100 °C došlo je do smanjenja koncentracije ekstrahiranog luteina i ukupnih karotenoida, što su objasnili kao moguću posljedicu degradacije karotenoida pri višim temperaturama. Navedeni rezultati u skladu su s rezultatima ovog istraživanja budući da su veće količine klorofila ekstrahirane na visokoj temperaturi (160 °C) dok je količina karotenoida na navedenoj temperaturi značajno manja. Temperatura se pokazala ključnim parametrom PLE ekstrakcije u istraživanju koje su proveli Shang i sur. (2011). Fukoksantin se pokazao stabilnim pri temperaturi od 100 °C, ali dolazi do značajne degradacije porastom temperature iznad optimalne (110 °C), a brzina degradacije vrlo brzo poništi pozitivan učinak porasta temperature na uspješnost procesa ekstrakcije. Kim i sur. (2011) također su provodili PLE fukoksantina pri različitim temperaturama (30, 50 i 70 °C) uz 50 %tni i 100 %tni etanol kao otapalo. Prvotni zaključak bio je da prinosi ekstrakcije rastu porastom temperature, međutim pri maksimalnoj temperaturi od 70 °C i uz 50 %tni etanol kao otapalo, ekstrahirano je 8,40 mg g⁻¹ s.t., što je otprilike 50 % prinosa dobivenih primjenom 100 %tnog etanola tako da je učinak temperature prikriven visokom koncentracijom otapala. Budući da je fukoksantin vezan za nekoliko proteina i Ch-a kako bi se formirao kompleks fukoksantin-klorofil-protein, povećana temperatura doprinosi kidanju tih veza i povećanju prinosa ekstrakcije. Ovaj efekt je u najvećoj mjeri zamijećen kod smeđe makroalge *L. japonica* te su zaključili da je za uspješnu ekstrakciju fukoksantina i visoke prinose u kratkom vremenskom periodu, koncentracija otapala kritičniji faktor nego što je to temperatura.

4.2. UTJECAJ BROJA CIKLUSA NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA

Broj ciklusa je još jedan od važnih parametara za uspješnu ekstrakciju. Prinosi Ch-a i karotenoida statistički su značajno veći ($p \leq 0.05$) primjenom jednog ciklusa od 10 minuta (Ch-a), odnosno 15 minuta za karotenoide nego primjenom dva ciklusa, dok kod Ch-b broj ciklusa nije statistički značajan parametar ($p \geq 0.05$). Povećanjem broja ciklusa koncentracija Ch-a smanjila se s 1,51 na 1,44 mg g⁻¹ s.t., a koncentracija karotenoida s 0,57 na 0,51 mg g⁻¹ s.t.

U nekim slučajevima, jedan ciklus ekstrakcije ne može kvantitativno izdvojiti analite iz matrice pa se mora uvesti svježe otapalo tijekom postupka ekstrakcije kako bi se povećala učinkovitost procesa. Međutim Delgado-Zamarreño i sur. (2012) u svom radu nisu zabilježili značajne razlike prilikom povećanja broja ciklusa, iako je dobivena bolja reproducibilnost kada su korištena tri ili četiri ciklusa. Sličan trend zabilježili su i Taucher i sur. (2016) koji su primjenjivali PLE za ekstrakciju karotenoida iz mikroalgi *Haemotococcus pluvialis*, *Chromochloris zofingiensis* i *Chlorella sorokiniana*. Uočili su kako provedba dodatnih ciklusa ekstrakcije ne utječe na veće prinose karotenoida tijekom ekstrakcije, jer je 99 % karotenoida ekstrahirano unutar prvog ciklusa. Prinos karotenoida u ekstraktima trećeg i četvrtog ciklusa bio je ispod granice detekcije. S druge strane, Kanazawa i sur. (2008) su najveće prinose fukoksantina, ekstrakcijom iz smeđe alge *Laminalia japonica* (19,1 mg/100 g), dobili provodeći dva ciklusa ekstrakcije sa tri volumena apsolutnog etanola.

Dakle, ponekad se provode višestruki koraci ekstrakcije što uvelike ovisi o vrsti otapala i korištenoj matrici. Mustafa i Turner (2011) također su uvidjeli da provođenje više ciklusa ekstrakcije može biti strategija u situacijama kada ekstrakcija nije potpuna zbog ograničenog volumena ekstrakcijskog otapala.

4.3. UTJECAJ VREMENA NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA

Ekstrakcija u trajanju od 15 minuta rezultirala je najvećom koncentracijom svih istraživanih pigmenata. Produljenjem ekstrakcije s 5 na 15 min koncentracija Ch-a porasla je s 1,43 na 1,54 mg g⁻¹ s.t., Ch-b s 0,39 na 0,53 mg g⁻¹ s.t. te karotenoida s 0,52 na 0,61 mg g⁻¹ s.t.

U PLE vrijeme ekstrakcije definirano je kao period tijekom kojeg uzorak reagira s ekstrakcijskim otapalom po ciklusu u ekstrakcijskoj stanici (Bozan i Altinay, 2014). Vrijeme trajanja ekstrakcije je jedan od ključnih parametara. Učinkovitost i trajanje procesa ovisi o topljivosti analita u ekstrakcijskom otapalu i raspodjeli željenih komponenti između vode i ekstrakcijskog otapala. Iznimno dugo trajanje ekstrakcije najčešće se skraćuje porastom temperature i/ili smanjenjem veličine čestica (Mustafa i Turner, 2011). Optimiranje vremena ekstrakcije ključno je za smanjenje energije i troškova procesa ekstrakcije. Optimalno trajanje procesa ekstrakcije ovisi o vremenu potrebnom za stvaranje ravnoteže između koncentracije analita u uzorku i otapala. Pet

minuta se pokazalo nedovoljnim za ekstrakciju karotenoida iz mikroalgi *Haemotococcus pluvialis*, *Chromochloris zofingiensis* i *Chlorella sorokiniana*, budući da je ekstrahirano samo 79 % od maksimalnog ukupnog prinosa karotenoida (3,74 umjesto 4,72 $\mu\text{g mg}^{-1}$ s.t.) (Taucher i sur., 2016). U navedenom istraživanju, gotovo potpuna ekstrakcija karotenoida postignuta je ekstrakcijom u trajanju od minimalno 10 minuta. U istraživanju PLE antioksidansa iz mikroalge *Spirulina platensis*, koje su proveli Herrero i sur. (2005), optimalnim vremenom ekstrakcije pokazala se najveća ispitivana vrijednost (15 minuta). Međutim njihov krajnji zaključak je kako utjecaj trajanja ekstrakcije na konačne prinose nije toliko značajan koliko je to temperatura ekstrakcije.

Iz svega navedenoga može se uočiti pozitivan trend povećanja koncentracije pigmenata produljenjem ekstrakcije, što je dokazano i u okviru provedenog istraživanja. Vrijeme ekstrakcije utječe na prinose ekstrakcije, sadržaj, ali i degradaciju pigmenata te ekonomsku isplativost procesa PLE ekstrakcije budući da je povezano s brojem ciklusa. Kraće vrijeme ekstrakcije rezultira slabijom učinkovitosti procesa i nižim prinosima dok, s druge strane, duže vrijeme ekstrakcije može rezultirati uspješnijim procesom zbog dužeg kontakta, ali i dovesti do degradacije pigmenata (Santos i sur., 2012). Posebnu pozornost na vrijeme ekstrakcije treba obratiti ukoliko se izoliraju karotenoidi, budući da produljenje procesa može dovesti do oksidacije ovih pigmenata (Esquivel-Hernández i sur., 2016).

4.4. UTJECAJ KOMBINIRANIH PARAMETARA NA EKSTRAKCIJU PIGMENATA

Ukoliko promotrimo utjecaj kombinacije temperature i broja ciklusa na ekstrakciju pojedinih pigmenata, može se uočiti povećana koncentracija Ch-a na 100 °C i 130 °C ukoliko se provedu 2 ciklusa, što znači da povećanje broja ciklusa ekstrakcije omogućuje veće iskorištenje procesa ekstrakcije, dok je na 160 °C veći prinos ostvaren primjenom jednog ciklusa. Razlog tome jest da jedan ekstrakcijski ciklus nije dovoljan za ekstrakciju Ch-a iz uzorka pa je pri nižim temperaturama poželjno provesti dva ciklusa. S druge strane, pri višoj temperaturi dolazi do degradacije pigmenta te je tada bolje provesti samo jedan ciklus ekstrakcije. Kod Ch-b i karotenoida ovaj efekt smanjenja prinosa ekstrakcije zamijećen je već na 130 °C te je već pri toj temperaturi bolje provesti samo 1 ciklus. Potencijalan razlog tome može biti nestabilnost

pigmenta pri povišenim temperaturama, budući da visoka temperatura u PLE, kao što je ranije navedeno, osim što smanjuje viskoznost tekućeg otapala omogućujući bolji prodor u matricu (Koo i sur., 2012), također može uzrokovati i degradaciju termolabilnih bioaktivnih komponenti. Može se reći da je maseni udio Ch-b i karotenoida obrnuto proporcionalan porastu temperature. Mustafa i Turner (2011) su također svojim istraživanjem potvrdili da je veći broj ciklusa povoljan s ciljem postizanja većih prinosa ekstrakcije te u sinergiji s temperaturom može utjecati povoljno, ali samo do određene granice gdje onda nastupa degradacija termolabilnih komponenti poput karotenoida

Kombinirani utjecaj temperature i vremena pokazuje da je ekstrakcija Ch-a pri 100 °C poboljšana produljenjem vremena ekstrakcije od 5 do 15 minuta, budući da je temperatura od 100 °C preniska za uspješnu difuziju analita u ekstrakcijsko otapalo te je u ovom slučaju ključan parameter vrijeme trajanja ekstrakcije jer produljenjem trajanja raste učinak i prinosi Ch-a. Pri 130 °C ne postoji statistički značajna razlika ($p \geq 0,05$) između različitih vremena, dok je pri najvišoj temperaturi od 160 °C 15 min predugo za uspješnu ekstrakciju te je najveća koncentracija ostvarena ukoliko ekstrakcija traje samo 5 minuta, a daljnim produljenjem vremena trajanja ekstrakcije sve je očitiji utjecaj visoke temperature na degradaciju pigmenta. Ekstrakcija karotenoida pokazala je sličan utjecaj temperature i vremena. Ukoliko ekstrakciju provodimo 5 minuta, veći prinosi karotenoida ostvareni su na 130 i 160 °C, bez statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$) između njih. S druge strane, prilikom ekstrakcije od 15 minuta, najveći prinosi su zabilježeni pri 100 °C i 130 °C, bez statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$) između njih. Damergi i sur. (2017) proveli su PLE iz *Chlorella vulgaris* te su pri temperaturi od 110 °C, nakon 30 minuta ekstrakcije izolirali ksantofile koji su činili više od 80 % ekstrahiranih karotenoida (u najvećoj mjeri astaksantin i lutein, zatim kantaksantin i violaksantin) dok su karoteni predstavljali manje od 20 % prinosa karotenoida (β -karoten i likopen). Zaključili su da ekstrakciji karotenoida pogoduju temperature do 110 °C i ekstrakcijsko otapalo koje čine etanol i 2-metiltetrahidrofur (MTHF) budući da etanol kao ekstrakcijsko otapalo brzo prodire kroz staničnu membranu alge te smanjuje potrebu za višim temperaturama koje bi mogle dovesti do degradacije pigmenta. Također, ističu kako maseni udio ekstrahiranih komponenti značajno varira u ovisnosti o različitim uvjetima, ali i o vrsti karotenoida jer nemaju sve vrste algi iste količine pigmenta niti su sve stanice jednako složene.

Posljednja od proučavanih kombinacija su broj ciklusa i vrijeme trajanja ekstrakcije. Ovi parametri pokazuju različit utjecaj na uspješnost procesa ekstrakcije kod klorofila i karotenoida. Promatrajući Ch-a, ukoliko ekstrakcija traje 5 ili 10 minuta, bolje je provesti samo 1 ciklus ekstrakcije dok je na 15 minuta bolje provesti 2 ciklusa. Ovakvi rezultati su kontradiktorni ukoliko ih usporedimo s prinosima ekstrakcije Ch-bi karotenoida gdje je za ekstrakciju Ch-b u trajanju od 5 minuta bolje provesti 2 ciklusa jer se inače ne postiže zadovoljavajući prijenos mase analita u otapalo dok je u dva ciklusa vidljiv efekt vremena gdje koncentracija Ch-b raste proporcionalno s trajanjem ekstrakcije. U slučaju trajanja ekstrakcije 10 i 15 minuta, bolji rezultati su sa samo 1 ciklusom. Kod karotenoida je zabilježen sličan trend – ukoliko ekstrakcija traje 5 minuta nije važno koliko će ciklusa će biti provedeno budući da nema statistički značajne razlike ($p \leq 0,05$), dok je u ekstrakciji od 10 i 15 minuta bolje provesti samo 1 ciklus. Može se zaključiti da predugo trajanje procesa ekstrakcije negativno utječe na koncentraciju karotenoida budući da su termolabilni te dolazi do njihove degradacije. Mustafa i Turner (2011) ističu kako je PLE uspješna metoda za ekstrakciju karotenoida jer se u više ciklusa kroz kratko vrijeme trajanja ekstrakcije postižu bolji prinosi procesa zbog kraćeg izlaganja pigmenta nepovoljnim uvjetima ekstrakcije.

4.5. JEDNADŽBE REGRESIJSKIH MODELA

Tablica 4. Jednadžbe regresijskih modela i koeficijenti determinacije (R^2) za ekstrakciju klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida iz smeđe alge *Cystoseira* proizvedenim primjenom PLE

	MODEL	R^2	R_{adj}
Ch – a	$15,86 - 0,32X_1 + 0,00X_1^2 - 8,76X_2 - 1,52X_3 + 0,11X_3^2 + 0,16X_1X_2 - 0,00X_1^2X_2 + 0,04X_1X_3 - 0,00X_1X_3^2 - 0,00X_1^2X_3 + 0,00X_1^2X_3^2 - 0,21X_2X_3 + 0,01 X_2X_3^2$	0,626	0,405
Ch – b	$- 9,25 + 0,13X_1 - 0,00X_1^2 + 8,44X_2 + 1,30X_3 - 0,17X_3^2 - 0,12X_1X_2 + 0,00X_1^2X_2 - 0,02X_1X_3 - 0,00X_1X_3^2 + 0,00X_1^2X_3 - 0,00X_1^2X_3^2 - 0,12X_2X_3 + 0,00X_2X_3^2$	0,932	0,891
Karotenoidi	$- 3,21 + 0,04X_1 - 0,00X_1^2 + 1,68X_2 + 0,13X_3 - 0,01X_3^2 + 0,00X_1X_2 - 0,00X_1^2X_2 + 0,00X_1X_3 - 0,00X_1X_3^2 - 0,00X_1^2X_3 - 0,00X_1^2X_3^2 - 0,01X_2X_3 - 0,00X_2X_3^2$	0,851	0,763

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

Tablica 4. prikazuje jednadžbe regresijskih modela i koeficijente determinacije (R^2) za ekstrakciju Ch-a, Ch-b i karotenoida iz liofiliziranog uzorka smeđe alge *Cystoseira* primjenom PLE. U ovim modelima, proučavani parametri ekstrakcije (temperatura, broj ciklusa i vrijeme) su kombinirani u linearne, kvadratne i koeficijente interakcija, omogućujući predviđanje odziva promjenjive varijable (koncentracije pigmenata) za bilo koju željenu temperaturu, vrijeme ili broj ciklusa. Prikladnost ovih modela provjerena je računanjem koeficijenta determinacije (R^2), koji je omjer protumačenih i ukupnih odstupanja i prepisuje se modelu radije nego slučajnoj pogrešci. Smatra se da dobro prilagođeni model ne bi trebao imati R^2 manji od 0,8. Kao što se može vidjeti iz tablice 3. modeli koji predviđaju koncentracije Ch-b i karotenoida imaju R^2 veći od 0,8 što upućuje na njihovu prikladnost u predviđanju koncentracije ovih pigmenata, dok model koji predviđa koncentraciju Ch-a nije prikladan budući da ima R^2 manji od 0,8 (0,626).

4.6. OPTIMALNI UVJETI EKSTRAKCIJE

Tablica 5. Optimalni uvjeti ekstrakcije klorofila a, klorofila b i karotenoida iz smeđe alge *Cystoseira* proizvedenim primjenom PLE te njihove predviđene i eksperimentalne vrijednosti

	Temperatura (°C)	Broj ciklusa	Vrijeme (min)	Predviđene vrijednosti (mg g ⁻¹ s.t.)	Eksperimentalne vrijednosti (mg g ⁻¹ s.t.)
Ch – a	160	1	5	2,33	0,83
Ch – b	130	1	15	1,41	0,14
Karotenoidi	130	1	15	0,75	0,45

Prema statističkim podacima, kao što je vidljivo u tablici 5., optimalnim uvjetima za PLE Ch-a može se smatrati temperatura ekstrakcije od 160 °C i jedan ciklus od 5 minuta. Za ekstrakciju Ch-b i karotenoida, optimalna temperatura ekstrakcije je 130 °C te jedan ciklus od 15 minuta. Navedeni optimalni uvjeti pokazuju da je za ekstrakciju Ch-a bolje provesti kratku ekstrakciju pri visokoj temperaturi, dok je za ekstrakciju Ch-b i karotenoida bolje provesti dužu ekstrakciju pri nešto nižim temperaturama. U ranijim istraživanjima potvrđeno je da zbog strukturnih razlika između Ch-a i Ch-b posljedično postoji i razlika u njihovoj toplinskoj stabilnosti. Naime, uočeno je da je Ch-b toplinski stabilniji od Ch-a što se pripisuje elektron-privlačenju C-3 formilne skupine (Gaur i sur., 2006). Shang i sur. (2011) su primjenom PLE na smeđoj algi *Eisenia bicyclis* kao optimalnu temperaturu ekstrakcije odredili 110 °C i optimalno vrijeme od 5 min. Teorijski predviđene vrijednosti u tim uvjetima (0,42 mg g⁻¹) poklapale su im se s eksperimentalnim vrijednostima (0,39 mg g⁻¹). Koo i sur. (2012) primijenili su PLE na *Chlorella ellipsoidea* te su kao optimalnu temperaturu za ekstrakciju zeaksantina odredili 115,4 °C i optimalno vrijeme ekstrakcije od 23,3 min. Teorijski maksimalni prinos ekstrakcije zeaksantina u tim uvjetima bio je 4,28 mg g⁻¹, što se izvrsno slaže s eksperimentalnim vrijednostima od 4,26 mg g⁻¹. Castro-Puyana i sur. (2013) su primijenili PLE na mikroalgi *Neochloris oleoabundans* te su kao optimalnu temperaturu ekstrakcije odredili 112 °C pri čemu su ostvarili prinose karotenoida od 29 mg g⁻¹ s.t.

Sve eksperimentalne vrijednosti koncentracija pigmenata, dobivene ponavljanjem ekstrakcije pri navedenim optimalnim uvjetima, u određenoj mjeri odstupaju od vrijednosti predviđenih statističkim programom. Kao što su zaključili Frikha i sur. (2011), do razlika između predviđenih i eksperimentalnih vrijednosti može doći uslijed utjecaja različitih čimbenika – sezonske varijacije, vremensko razdoblje i geografski položaj uzorkovanja, protokol pripreme uzorka alge i procesa ekstrakcije (suhe ili svježe alge, vrsta otapala te drugi uvjeti ekstrakcije). Različita otapala za ekstrakciju, ovisno o njihovoj polarnosti, mogu izdvojiti različite sekundarne metabolite, uključujući pigmente pa to može dovesti do ne poklapanja u rezultatima. Ta činjenica je Kosanić i sur. (2015) u njihovom istraživanju provedenom na tri smeđe makroalge (*Cystoseira amentacea*, *Cystoseira barbata* and *Cystoseira compressa*) dovela do zaključka o sinergističkom djelovanju tih različitih biološki aktivnih metabolita. Marechal i sur. (2004) su u svom istraživanju na smeđoj algi *Bifurcaria bifurcata* potvrdili da sezonske varijacije utječu na sadržaj sekundarnih metabolita u ekstraktima algi kao i na njihovu aktivnost. Najviša razina aktivnosti zabilježena je na uzorcima koji su sakupljeni u periodu između travnja i rujna.

Uz sve navedeno, učinkovitost ekstrakcije ovisi i o: prirodi uzorka, analitu koji se ekstrahira te o smještaju/dostupnosti tog analita unutar uzorka (Mustafa i Turner, 2011).

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja utjecaja različitih PLE parametara (statičko vrijeme ekstrakcije, broj ciklusa i temperatura ekstrakcije) na masene udjele klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida u ekstraktima smeđe alge *Cystoseira* te prezentiranih rezultata i rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Ekstrakti smeđe alge *Cystoseira* bogat su izvor klorofila i karotenoida, a u najvećem masenom udjelu određeni su klorofil *a* (od 0,86 do 1,92 mg g⁻¹ s.t.), te u padajućem nizu karotenoidi (od 0,36 do 0,70 mg g⁻¹) te klorofil *b* (od 0,09 do 1,19 mg g⁻¹ s.t.).
2. PLE je učinkovita metoda za izolaciju klorofila i karotenoida iz smeđe alge *Cystoseira* pri čemu je utvrđeno da se kroz kratko vrijeme ekstrakcije postižu visoki prinosi istraživanih pigmenta.
3. Više temperature pridonose boljem prijenosu mase i učinkovitijoj ekstrakciji klorofila iz smeđe alge *Cystoseira*, te su najviši maseni udjeli klorofila *a* dobiveni pri 160 °C, a klorofila *b* pri 130 °C. Istovremeno, pokazalo se da su karotenoidi nestabilniji pigmenti u usporedbi s klorofilima te da se bolji prinosi postižu pri temperaturi od 100 odnosno 130 °C, bez statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$) između te dvije temperature.
4. Broj ciklusa značajno utječe na prinose klorofila *a* i karotenoida te su njihovi maseni udjeli statistički značajno veći ($p \leq 0,05$) ukoliko se PLE provodi primjenom jednog ciklusa od 10 (klorofil *a*), odnosno 15 minuta (karotenoidi) dok se povećanjem broja ciklusa prinosi smanjuju. Istovremeno je utvrđeno da na masene udjele klorofila *b* broj ciklusa nema statistički značajan utjecaj ($p \geq 0,05$).
5. Uočen je pozitivan trend povećanja koncentracije pigmenta produljenjem vremena trajanja ekstrakcije te je ekstrakcija u trajanju od 15 minuta rezultirala najvećim masenim udjelima svih istraživanih pigmenta. Međutim, ako se ekstrakcija provodi pri većoj temperaturi, viši prinosi ostvaruju se ukoliko ekstrakcija traje kraće te ako se provodi samo jedan ciklus.
6. Najveći prinosi pigmenta dobiveni su pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: klorofil *a* pri temperaturi ekstrakcije od 160 °C i jedan ciklus od 5 minuta; klorofil *b* i karotenoidi pri temperaturi ekstrakcije od 130 °C te jedan ciklus od 15 minuta.

6. LITERATURA

Abou-Arab, A. E., Abou-Arab, A. A., Abu-Salem, M. F. (2010) Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana* bertonii plant. *Afr. J. Food Sci.* **4**(5), 269- 281.

Abu-Ghannam, N., Shannon, E. (2017) Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as functional food. U: *Microbial Functional Foods and Nutraceuticals* (Gupta, V. K., Treichel, H., Shapaval, V., Oliveira, L. A., Tuohy, M., ured.), John Wiley & Sons Ltd, UK, str. 39-64.

Ameer, K., Shahbaz, H. M., Kwon, J. H. (2017) Green extraction methods for polyphenols from plant matrices and their byproducts: a review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* **16**(2), 295-315.

Amico, V. (1995) Marine brown algae of family *Cystoseiraceae*: chemistry and chemotaxonomy. *Phytochemistry.* **39**, 1257-1279.

Anonymous 1 (2018) *Phaeophyceae: Brown Algae*. <<http://www.seaweed.ie/algae/phaeophyta.php>>. Pristupljeno 01. srpnja 2018.

Anonymous 2 (2015) Monitoraggio delle macroalghe lungo le coste rocciose della Sardegna. <<http://www.sardegnaambiente.it/index.php?xsl=612&s=280422&v=2&c=5011&idsito=21>>. Pristupljeno 03. srpnja 2018.

Anonymous 3 (2008) <https://it.wikipedia.org/wiki/File:Cystoseira_0001.JPG>. Pristupljeno 03. srpnja 2018.

Barba, F. J., Grimi, N., Vorobiev, E. (2014) Evaluating the potential of cell disruption technologies for green selective extraction of antioxidant compounds from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *J. Food Eng.* **149**, 222–228.

Bozan, B., Altinay, R.C. (2014) Accelerated Solvent Extraction of Flavan-3-OL Derivatives from Grape Seeds. *Food Sci. Technol. Res.* **20** (2), 409-414.

Castro-Puyana, M., Herrero, M., Urreta, I., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Suárez-Álvarez, S. (2013) Optimization of clean extraction methods to isolate carotenoids from the *microalga Neochloris oleoabundans* and subsequent chemical characterization using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 4607-4616.

Castro-Puyana, M., Pérez-Sánchez, A., Valdés, A., Ibrahimd, O. H. M., Suarez-Álvarez, S., Ferragut, J. A., Micol, V., Cifuentes, A., Ibáñez, E., García-Cañas, V. (2016) Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Res. Int.* **99**, 1048-1055.

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

Conde, E., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2010) Extraction of natural antioxidants from plant foods. U: Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries (Syed S.H. Rizvi, ured.), str. 506-594.

Damergi, E., Schwitzguébel, J. P., Refardt, D., Sharma, S., Holliger, C., Ludwig, C. (2017) Extraction of carotenoids from *Chlorella vulgaris* using green solvents and syngas production from residual biomass. *Algal Res.* **25**, 488-495.

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

Denery, J., R., Dragull, K., Tang, C.S., X. Li, Q. X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta*, **501**, 175-181.

Esquivel-Hernández, D. A., Ibarra-Garza, I. P., Rodríguez-Rodríguez, J., Cuéllar-Bermúdez, S. P., Rostro-Alanis, M. D. J., Alemán-Nava, G. S., Parra-Saldívar, R. (2016) Green extraction technologies for high-value metabolites from algae: a review. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **11**(1), 215-231.

Fernando, I. S., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y., Jeon, Y. J. (2016) Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. *J. Med. Food*, **19**(7), 615-628.

Frikha, F., Kammoun, M., Hammami, N., Mchirgui, R. A., Belbahri, L., Gargouri, Y., Miled, N., Ben-Rebah, F. (2011) Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. *Cienc. Mar.* **37** (2), 113-124.

Gaur, S., Shivhare, U. S., Ahmed, J. (2006) Degradation of chlorophyll during processing of green vegetables: a review. *Stewart Postharvest Review*, **5**, 1-8.

Gilbert-López, B., Barranco, A., Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2016) Development of new green processes for the recovery of bioactives from *Phaeodactylumtricornutum*. *Food Res. Int.* 1-41.

Golmakani, M. T., Mendiola, J. A., Rezaei, K., Ibáñez, E. (2014) Pressurized limonene as an alternative bio-solvent for the extraction of lipids from marine microorganisms. *J. Supercrit. Fluid.* **92**, 1-7.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci. Tech.* **22**, 315-326.

Hereu, B., Mangialajo, L., Ballesteros, E., Thibaut, T. (2008) On the occurrence, structure and distribution of deep-water *Cystoseira* (*Phaeophyceae*) populations in the Port-Cros National Park (north-western Mediterranean). *Eur. J. Phycol.* **43**(3), 263-273.

Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* **98**, 136-148.

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

Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: Functional food application and legislation. *J. Appl. Phycol.* **23**, 543-597.

Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., Castro-Puyana, M. (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. U: *Marine Bioactive Compounds* (Hayes M., ured.), Springer, Boston, MA, str.55-98.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. (2013) Application of novel extraction technologies for extraction of bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.* **61** (20), 4667-4675.

Kanazawa, K., Ozaki, Y., Hashimoto, T., Das, S. K., Matsushita, S., Hirano, M., Okada, T., Komoto, A., Mori, N., and Nakatsuka, M. (2008) Commercial-scale preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica*. *Food Sci. Technol. Res.* **14**, 573–582.

Kılınç, B., Cirik, S., Turan, G., Tekogul, H., Koru, E. (2013) Seaweeds for food and industrial applications. U: *Food Industry* (Muzzalupo, I., ured.), InTech., str. 735-748.

Kim, S. M., Jung, Y.-J., Cha, K. H., Um, B.-H., Pan, C.-H. (2012) A Potential Commercial Source of Fucoxanthin Extracted from the Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 1843-1855.

Koo, S. Y., Cha, K. H., Song, D. G., Chung, D., Pan, C. H. (2012) Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. *J. Appl. Phycol.* **24**, 725-730.

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

Mangialajo, L., Chiantore, M., Cattaneo-Vietti, R. (2008) Loss of furoid algae along a gradient of urbanisation, and structure of benthic assemblages. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **358**, 63–74.

Marechal, J. P., Culioli, G., Hellio, C., Thomas-Guyon, H., Callow, M. E., Clare, A. S., Ortalo-Magne, A. (2004) Seasonal variation in antifouling activity of crude extracts of the brown alga *Bifurcariabifurcata* (*Cystoseiraceae*) against cyprids of *Balanus amphitrite* and the marine bacteria *Cobetiamarina* and *Pseudoalteromonashaloplanktis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **313**, 47-62.

Michalak, I. i Chojnacka, K. (2015) Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* **15**(2), 160-176.

Michalak, I., Chojnacka, K. (2014) Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* **15**, 160-176.

Moroney, J. V., Ynalvez, R. A., (2009) Algal Photosynthesis. U: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, str. 1-7.

Mottaleb, M.A. and Sarker, S.D. (2012) Accelerated Solvent Extraction for Natural Products Isolation, U: Natural Products Isolation, Methods in Molecular Biology (Sarker, S. D., Nahar, L., ured.). Springer, New Jersey, str. 75-87.

Mustafa, A., Turner, C. (2011) Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. *Anal. Chim. Acta*, **703**, 8-18.

Pangestuti, R., Kim, S. (2011) Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *J. Funct. Foods.* **3**, 255-266.

Pasquet, V., Chérouvriera, J. R., Farhata, F., Thiérya, V., Piota, J. M., Bérardb, J. B., Kaasb, R., Seriveb, B., Patricec, T., Cadoretb, J. P., Picota, L. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* **46**, 59-67.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., Avalo, B., Cifuentes, A., Reglero, G., Reina, G.G.B., Señoráns, F.J., Ibáñez, E. (2012) Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extraracts from *Chlorella vulgaris*. *J. Food Sci. Technol.* **46**, 245-253.

Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., Ibáñez, E. (2010) Screening for bioactive compounds from algae. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**(2), 450-455.

Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsi, F., Pataro, G., Dias, D. A., Juliano, P. (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Mar drugs*, **14**, 1-34.

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.

Santos, D. T., Veggi, P. C., Angela, M., Meireles, A. (2012) Optimization and economic evaluation of pressurized liquid extraction of phenolic compounds from jabuticaba skins. *J. Food Eng.* **108**, 444-452.

Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd Allah, E. F. (2017) Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* (objavljeno online) DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.11.003

Shang, Y. F., Kim, S. M., Lee, W. J., Um, B. H. (2011) Pressurized liquid method for fucoxanthin extraction from *Eisenia bicyclis* (Kjellman) Setchel. *J. Biosci. Bioeng.* **111**, 237-241.

Sumanta, N., Haque, C. I., Nishika, J., Suprakash, R. (2014) Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**(9), 63-69.

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

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

Wijesinghe, W. A. J. P., Jeon, Y. J. (2013) Enzymatic extraction of bioactives from algae. U: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals* (Domínguez, H., ured.), Woodhead Publishing Limited, str. 517-533.

Xiao, X., Si, X., Yuan, Z., Xu, X., Li, G. (2012) Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography. *J. Sep. Sci.* **35**(17), 2313-2317.

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