

Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira* sp. primjenom različitih tehnika ekstrakcije

Jujnović, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:525152>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2018.

Antonia Jujnović
1001/USH

IZOLACIJA PIGMENATA IZ ALGE

***Cystoseira sp.* PRIMJENOM**

RAZLIČITIH TEHNIKA

EKSTRAKCIJE

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.

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Verici Dragović–Uzelac na trudu i pomoći prilikom izrade diplomskog rada

Zahvaljujem se asistentici Ani Dobrinčić na strpljenju i susretljivosti tijekom provedbe eksperimentalnog dijela i izrade rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, posebno majci na neizmjernoj podršci tijekom cijelog mog studiranja.

Zahvaljujem se Dariu na trudu i poticanju na rad, a najviše na strpljenju i ljubavi.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

IZOLACIJA PIGMENATA IZ ALGE *Cystoseira* sp. PRIMJENOM RAZLIČITIH TEHNIKA EKSTRAKCIJE

Antonia Jujnović, 1001/USH

Sažetak:

Cystoseira je vrsta smeđe alge koja spada u red *Fucales*, te predstavlja najznačajniju i najrasprostranjeniju smeđu algu Jadranskog mora, te je izvor raznih skupina bioaktivnih molekula. U ovom radu ispitan je utjecaj različitih tehnika ekstrakcije (ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje te vrtložno miješanje uz djelovanje centrifugalne sile i ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji), vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 minuta) te otapala (aceton 80%, metanol i etanol) na prinos pigmenata (klorofili, karotenoidi) alge *Cystoseira*. Maseni udjeli pigmenata (klorofila-a, klorofila-b i ukupnih karotenoida) određeni su primjenom spektrofotometrijskih metoda. Najbolji prinosi pigmenata dobiveni su u ekstraktima dobivenim u ultrazvučnoj kupelji, a kao najbolje otapalo za ekstrakciju karotenoida i klorofila-a pokazao se 80% acetom, dok su nešto bolji prinosi klorofila-b dobiveni s etanolom. Optimalno vrijeme ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji je 10 min za karotenoide, 11 min za klorofil-a i 14 min za klorofil-b.

Gljučne riječi: *Cystoseira*, ekstrakcija, pigmenti, otapalo, spektrometrija

Rad sadrži: 35 stranica, 4 slike, 7 tablica, 71 literaturni navod

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, asistent

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Sandra Albino
2. Prof. dr.sc. Verica Dragović-Uzelac
3. Prof.dr.sc. Zoran Herceg
4. Doc.dr.sc. Zoran Zorić

Datum obrane: 08. ožujak, 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ISOLATION OF PIGMENTS FROM ALGAE *Cystoseira* sp. APPLYING OF DIFFERENT EXTRACTION TECHNIQUES

Antonia Jujnović, 1001/USH

Abstract:

Cystoseira is a type of brown alga that belong to the order of Fucales, and represents the most significant and most widespread brown algae of the Adriatic Sea and also a source of various groups of bioactive molecules. In this thesis the influence of different extraction techniques (extraction at room temperature with continuous stirring, vortexing assisted by the centrifugal force and ultrasonic bath extraction), extraction time (5, 10 and 15 minutes) and solvent (acetone 80%, methanol and ethanol) were examined to determine yield of pigments (chlorophylls and carotenoids) from algae *Cystoseira*. Mass fractions of pigments (chlorophyll-a, chlorophyll-b and total carotenoids) were determined by spectrophotometry method. Ultrasonic bath gave biggest yield of pigments, and the most preferred solvent for carotenoid and chlorophyll-a extraction is 80% acetone, although for chlorophyll-b extraction ethanol was better solvent. Optimal extraction time in the ultrasonic bath is 10 min for carotenoids, 11 min for chlorophyll-a and 14 min for chlorophyll-b.

Keywords: *Cystoseira*, extraction, pigments, solvent, spectrophotometry

Thesis contains: 35 pages, 4 figures, 7 tables, 71 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, Research Assistant

Reviewers:

1. PhD. Sandra Albino, Associate professor (substitute)
2. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor
3. PhD. Zoran Herceg, Full professor
4. PhD. Zoran Zorić, Assistant professor

Thesis defended: 08 March, 2019

Sadržaj

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1. | UVOD..... | 1 |
| 2. | TEORIJSKI DIO..... | 3 |
| 2.1 | ALGE..... | 3 |
| 2.1.1 | Smede alge | 4 |
| 2.1.2 | Cystoseira sp..... | 4 |
| 2.2 | BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U ALGAMA..... | 6 |
| 2.2.1 | Polisaharidi..... | 6 |
| 2.2.2 | Proteini..... | 6 |
| 2.2.3 | Lipidi..... | 7 |
| 2.2.4 | Polifenoli..... | 8 |
| 2.2.5 | Minerali..... | 8 |
| 2.2.6 | Biljni hormoni rasta | 9 |
| 2.2.7 | Pigmenti | 9 |
| 2.2.7.1 | <i>Karotenoidi</i> | 9 |
| 2.2.7.2 | <i>Klorofili</i> | 10 |
| 2.3 | TEHNIKE EKSTRAKCIJE PIGMENTA..... | 12 |
| 2.3.1 | Konvencionalne tehnike ekstrakcije..... | 12 |
| 2.3.2 | Nekonvencionalnetehnike ekstrakcije | 13 |
| 2.3.2.1 | <i>Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom</i> | 13 |
| 3. | EKSPERIMENTALNI DIO..... | 15 |
| 3.1 | MATERIJALI | 15 |
| 3.1.1 | Uzorak..... | 15 |
| 3.1.2 | Kemikalije..... | 15 |
| 3.1.3 | Aparatura..... | 15 |
| 3.1.4 | Pribor..... | 16 |
| 3.2 | TEHNIKE EKSTRAKCIJE..... | 16 |
| 3.2.1 | Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje..... | 16 |
| 3.2.2 | Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje | 17 |
| 3.2.3 | Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom..... | 17 |
| 3.2.4 | Spektrofotometrijsko određivanje klorofila-a, klorofila-b i karotenoida | 18 |
| 3.2.5 | Statistička obrada podataka | 19 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA..... | 20 |
| 4.1 | UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA PRINOS PIGMENATA..... | 22 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.1 | Utjecaj tehnike ekstrakcije na prinos pigmenata | 22 |
| 4.1.2 | Utjecaj vrste otapala na prinos pigmenata | 24 |
| 4.1.3 | Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na prinos pigmenata..... | 25 |
| 4.2 | UTJECAJ KOMBINACIJE PARAMETARA NA PRINOS PIGMENATA..... | 26 |
| 4.3 | OPTIMALNI PARAMETRI EKSTRAKCIJE..... | 27 |
| 5. | ZAKLJUČAK..... | 28 |
| 6. | LITERATURA..... | 29 |

1. UVOD

Alge predstavljaju veliku i raznoliku skupinu autotrofnih organizama, te se procjenjuje da postoji više od 50000 vrsta algi (Sathasivam i sur., 2017). Taksonomski alge se smještaju unutar dva carstva, Protista i Prokariota. Unutar carstva Protista izdvajaju se *Bacillariophyceae*, *Chlorophyceae* (zelene alge), *Chrysophyceae* (zlatne alge), *Dinophyceae* (dinoflagelati), *Phaeophyceae* (smeđe alge), *Rhodophyceae* (crvene alge), dok su unutar carstva Prokariota smještene *Cyanophyceae* (modrozelenne alge) (Amico, 1995). U ovom radu analizirana je alga iz roda *Cystoseira*, koja pripada skupini smeđih algi. *Cystoseira* je jedna od najučestalijih algi koje se nalaze u Jadranskom moru, može biti duga do pola metra, te je često bogati izvor hrane kao i sklonište mnogim životinjama.

Zajednička značajka svih algi je obavljanje fotosinteze pri čemu kao primarni proizvod nastaje hrana za njih same, te kao nusproizvod nastaje kisik. Danas se tim čudesnim oblicima života pripisuje do 80 % proizvodnje kisika na Zemlji (Cousins, 1995).

Jednostavnost i raznolikost ovih organizama omogućila je čovjeku da ih upotrebljava u mnogim aspektima života. One su pokazatelj stanja okoliša, pročišćivači voda, predmet različitih istraživanja (testovi toksičnosti, genetički inženjering, populacijska ekologija), koriste se kao hrana, visokovrijedno biognojivo, a naveliko se koriste i u mnogim industrijama (prehrambenoj, farmaceutskoj, kemijskoj, kozmetičkoj, tekstilnoj...). Mogu se sakupljati iz prirodnih izvora, a mnoge od njih se danas već uspješno kultiviraju.

Posljednih godina provedena su brojna istraživanja kojima je dokazano da su alge izvor brojnih skupina biokativnih spojeva koji pokazuju biološku aktivnost, a neki od njih imaju i pozitivan utjecaj na zdravlje ljudi. Jednu od zanimljivijih skupina biološki aktivnih spojeva koje se nalaze u algama čine pigmenti. Osim što su temelj fotosinteze i određuju boju algi, pokazalo se da pigmenti imaju pozitivan učinak na zdravlje jer posjeduju antioksidativna, antimutagena, antikarcinogena svojstva, potiču zaštitu živčanog sustava, sprječavaju osteoporozu itd (Brownlee i sur., 2012).

U prehrambenoj industriji alge se mogu dodavati juhama, salatama pa čak i desertima, te svakom jelu daju poseban okus i aromu. Za njihov je karakterističan okus odgovoran natrijev glutamat, poznatiji kao pojačivač okusa koji se dodaje u začinske mješavine i gotova jela (Kılınç i sur., 2013). Pigmenti izolirani iz algi se koriste kao prirodna bojila hrane. Pigmenti iz algi kao bojila su netoksični i nekancerogeni. Najčešće se dodavaju sladoledu, žvakaćim gumama, negaziranim i alkoholnim pićima, te raznim desertima i mliječnim napitcima.

Cilj ovog istraživanja bio je ekstrahirati pigmente (klorofil-a, klorofil-b i karotenoide) iz smeđe alge *Cystoseira* pomoću tri različite tehnike ekstrakcije: ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje, vrtložno miješanje uz djelovanje centrifugalne sile te ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji. Nadalje, istražen je utjecaj otapala (etanol, metanol i 80% aceton) te vremena ekstrakcije (5, 10 i 15 min) na prinose navedenih pigmenata. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određeni maseni udjeli pojedinih pigmenata, a na temelju dobivenih rezultata određeni su i optimalni parametri ekstrakcije uz koje se postižu najveći prinosi pigmenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 ALGE

Alge pripadaju carstvu Protista, mogu biti jednostanične, poznate kao mikroalge i višestanične, poznate kao makroalge (Ibañez i sur., 2012). To su fotosintetski organizmi koji žive u slatkovodnim i morskim staništima. Morske alge mogu živjeti pričvršćene za morsko dno (bentoske alge) ili živjeti slobodno u vodenom stupcu (planktonske alge). Morske makroalge su većinom višestanični organizmi koji rastu na čvrstoj podlozi od plitkog obalnog pojasa sve do većih dubina; najprilagođenije vrste mogu rasti čak do 200 metara dubine. Glavni ograničavajući ekološki čimbenik njihovog rasta je svjetlost s obzirom da rastu do onih dubina gdje ima dovoljno svjetla za fotosintezu. Kako bi se prilagodile ekstremnim uvjetima (svjetlost, salinitet, temperatura), većina algi proizvodi sekundarne metabolite koji se karakteriziraju kao biološki aktivne tvari (Ibañez i sur., 2012). Neki od izrazito vrijednih proizvoda makroalgi su pigmenti (klorofili, karotenoidi), zasićene masne kiseline, fikobiliproteini, polisaharidi, itd. (Sathasivam i sur., 2017).

Makrobentoske alge se svrstavaju u tri skupine: zelene alge (*Chlorophyceae*), smeđe alge (*Phaeophyceae*) i crvene alge (*Rhodophyceae*) (Kadam i sur., 2013). Fotosintetski pigmenti koji određuju boju algi imaju važnu ulogu u klasifikaciji istih (Van Den Hoek i sur., 1995). U tropskim područjima dominiraju crvene i zelene morske alge, dok su smeđe zastupljenije u hladnijim regijama.



Zelene alge - *Chlorophyceae*

Crvene alge - *Rhodophyceae*

Smeđe alge - *Phaeophyceae*

Slika 1. Prikaz građe različitih skupina algi (prema Anonymous 1, Anonymous 2 i Anonymous 3, 2018)

Zelene alge predstavljaju opsežnu skupinu koja obuhvaća mikroskopski sitne, jednostanične oblike, nitnaste alge koje tvore busenčice, te one složenije građe čije tijelo nalikuju na građu razvijenijih biljaka. Uz karotenoide i ksantofile sadrže veće količine klorofila-a i klorofila-b zbog čega su izrazito zelene boje. Zelene alge sadrže 9 redova s oko 10 000 vrsta od kojih većina živi u slatkim vodama, a samo mali broj živi u moru. Skupina smeđih algi sadrži 6 redova s oko 2000 višestaničnih vrsta. Različitih su oblika te mogu doseći duljinu do 100 metara. Od pigmenata sadrže karotenoide i ksantofile te manje količine klorofila-a i klorofila-c. Crvene alge su većinom višestanične, obojene svjetlocrveno do ljubičasto, te je poznato oko 6500 vrsta. Klorofil-a i karotenoidi prekriveni su fikoeritriinom. Fikoeritriin je crveni pigment, koji je izrazito topljiv u vodi i upravo on daje crvenim algama svjetlocrvenu i ljubičastu nijansu (prema Anonymous 7, 2018).

2.1.1 Smeđe alge

Smeđe alge (*Phaeophyceae*) su poznate po svojoj kompleksnoj, makroskopskoj građi za čiju su smeđu boju zaslužni fukoksantin, te kod nekih vrsta razni tanini, koji maskira druge prisutne pigmente, uključujući klorofila-a i klorofila-c te karotenoide. Danas je u svijetu poznato oko 2 000 različitih vrsta smeđih algi koje uglavnom nastanjuju morske predjele i dijelom umjereno hladne dijelove oceana. Poznato je da manje od 1% smeđih algi nastanjuju slatkovodna staništa (Wilce, 1966). S obzirom na veličinu, građu i stanište, vrste smeđih algi se međusobno značajno razlikuju. Smeđe morske alge obično su dugačke, dok su slatkovodne smeđe alge dosta manje, a pravi primjer predstavljaju morske trave koje mogu doseći visinu i do 45 m, dok s druge strane postoje manje vrste duge 30 do 60 cm (McHugh, 2003).

Smeđe alge najbrojnija su skupina algi u Jadranskom moru. Zauzimaju veliki dio morskog dna te pružaju sklonište i izvor hrane mnogim morskim beskralježnjacima zahvaljujući velikim količinama škroba, šećera i vitamina.

2.1.2 *Cystoseira* sp.

Cystoseira (Slika 2.) je vrsta smeđe alge koja pripada redu *Fucales* (Tablica 1.). Najznačajnija je i najrasprostranjenija smeđa alga Jadranskog mora. Predstavlja stanište za mnoge mikroorganizme, beskralježnjake i ribe. Osim na Jadranskom moru, *Cystoseira* se pronalazi na

području Indijskog i Pacifičkog oceana sjeverne hemisfere. *Cystoseira* naseljava područja koja se odlukuju čistom vodom, stoga se može koristiti kao bioindikator, te mogu doseći visinu i do pola metra.

Tablica 1. Klasifikacija smeđe alge *Cystoseira* (Amico, 1995)

| | |
|-------------|-----------------------|
| Carstvo | <i>Eukariyota</i> |
| Kraljevstvo | <i>Chromista</i> |
| Red | <i>Ochrophyta</i> |
| Razred | <i>Phaeophyceae</i> |
| Podrazred | <i>Fucales</i> |
| Obitelj | <i>Sargassaceae</i> |
| Vrsta | <i>Cystoseira sp.</i> |



Slika 2. Smeđa alga *Cystoseira sp.* (prema Anonymous 4, 2018)

2.2 BIOLOŠKI AKTIVNE TVARI U ALGAMA

Alge žive u staništima izloženim ekstremnim uvjetima kojima se moraju brzo i učinkovito prilagoditi, a kao posljedica toga, proizvode veliki broj biološki aktivnih sekundarnih metabolita koji sudjeluju u prirodnim obrambenim mehanizmima (Rodríguez-Meizoso i sur., 2010). Od različitih skupina bioaktivnih tvari alge su dokazano bogat izvor biološki aktivnih enzima kao što su superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza i katalaza, ali također i pigmenata, polisaharida, proteina, askorbinske kiseline, fenolnih spojeva, florotanina, tokoferola, bromfenola, terpena (Dhara i sur., 2017). Mnogi od ovih spojeva posjeduju antioksidativno, antimikrobno i antivirusno djelovanje (Gil-Chavez i sur., 2013), a dosadašnja istraživanja biološki aktivnim spojevima iz algi pripisuju brojna pozitivna djelovanja na zdravlje ljudi.

2.2.1 Polisaharidi

Polisaharidi čine sastavni dio stanične stijenke algi te im daju fleksibilnost i sprječavaju isušivanje algi. Alge u svom sastavu sadrže razne vrste polisaharida, čija je kemijska struktura povezana sa odgovarajućom taksonomskom klasifikacijom algi i njihovom staničnom strukturom (Ferreira i sur., 2012). Među mnogim različitim polisaharidima koje nalazimo kod algi najznačajniji su galaktani, fukoidan, laminarin i alginati, gdje su fukoidan i laminarin karakteristični upravo za smeđe alge (Ferreira i sur., 2012). Količina polisaharida ovisi o godišnjem dobu, a može doseći udio od 76% suhe mase alge (Holdt i Kraan, 2011). Sulfatirani polisaharidi su kompleksne makromolekule koje reguliraju aktivnost biofaktora rasta kao što su fibroblasti i interferoni te mogu spriječiti djelovanje mnogih bakterija i virusa (Leonard i sur., 2010). Polisaharidi mogu djelovati kao prebiotici (tvari koje potiču rast korisnih bakterija na probavnom tragu) i djeluju na promicanje rasta i poboljšavaju zdravlje (Vidanarachchi i sur., 2009). Mnogi od njih su topljiva dijetalna vlakna koja imaju pozitivan učinak na probavni trakt životinja (Li i Kim, 2011; Souza i sur., 2012.). Također, polisaharidi izolirani iz algi su učinkoviti i netoksični antioksidansi (Li i Kim, 2011; Souza i sur., 2012.).

2.2.2 Proteini

Količina proteina koja se nalazi u samom sastavu algi razlikuje se ovisno o vrsti. Općenito, smeđe alge sadrže najmanje količine proteina. Kod smeđe alge *Undaria* 24% suhe mase čine proteini. Kod alge *Cystoseira* taj postotak ovisi o rodu i može biti između 12% i 26% suhe mase. Veća količina proteina je zabilježena u zelenim i crvenim algama, oko 40%, što je usporedivo sa količinom proteina koja se nalazi u soji (Holdt i Kraan, 2011). Najznačajniji protein koji se nalazi u algama je lektin, koji se veže sa ugljikohidratima i sudjeluje u raznim biološkim procesima kao što je npr. međustanična komunikacija. Proteini pronađeni u algama imaju antibakterijska, antivirusna i protuupalna djelovanja (Cunningham i Joshi, 2010).

2.2.3 Lipidi

Fosfolipidi i glikolipidi su najčešće vrste lipida pronađene kod algi. Kad se smanji temperatura okoline, alge akumuliraju višestruko nezasićene masne kiseline. Sukladno tome, alge koje rastu i razvijaju se u hladnim regijama akumuliraju veće količine višestruko nezasićenih masnih kiselina (Holdt i Kraan, 2011). Višestruko nezasićene masne kiseline dugih lanaca su iznimno bitne za održavanje ljudskog zdravlja i proizvode ih samo biljke. Uz ribu, orašaste plodove, sjemenke i plodove mora alge predstavljaju jedan od izvora omega-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina.

Najznačajnije esencijalne višestruko nezasićene masne kiseline pronađene kod algi su dokozaheksaenska (DHA) i eikozapentaenska (EPA) kiselina. Esencijalne masne kiseline čine strukturne komponente svih tkiva te su neophodne za sintezu staničnih membrana. Mozak, retina i ostala živčana tkiva posebno su bogata dugolančanim višestruko nezasićenim masnim kiselinama, a DHA se smatra uvjetno esencijalnim nutrijentom za pravilan razvoj neurološkog sustava čovjeka. EPA je prekursor u nastanku tvari sličnih hormonima – eikozanoida, koji djeluju u stanicama koje ih sintetiziraju ili u susjednim stanicama. Procesi na koje eikozanoidi djeluju uključuju: migraciju kalcija i ostalih tvari unutar i izvan stanica, opuštanje i kontrakciju mišića, sprječavanje i poticanje zgrušavanja, regulaciju lučenja probavnih sokova i hormona, kontrolu plodnosti, diobu i rast stanica (Riediger i sur., 2009).

Dominantni sterol u smeđim algama je fukosterol koji ima dokazane blagotvorne učinke na apsorpciju kolesterola te su mu dokazana i brojna antiseptička, antibakterijska i protuupalna djelovanja (Balboa i sur., 2013).

2.2.4 Polifenoli

Polifenoli su sveprisutni u biljkama koje se koriste u ljudskoj prehrani. Posljednjih 15-ak godina detaljno se istražuju zbog svojih antioksidativnih svojstava i potencijalno blagotvornog učinka na zdravlje (Shahidi i Ambigaipalan, 2015). Polifenoli su velika skupina fitokemikalija koje nastaju kao produkti sekundarnog metabolizma biljaka i imaju bitan učinak na normalne fiziološke procese u biljci poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene, zaštite od UV zračenja i drugo (Escarpa i Gonzalez, 2001).

Većina biljaka, uključujući alge proizvodi polifenole (Antonisamy i Raj, 2011). Najznačajniji polifenoli kod algi su fenolne kiseline, flavonoidi, izoflavoni, cimetna kiselina, benzojeva kiselina, kvercetin i ligani (Keyrouz i sur., 2011). Zelene i crvene alge imaju niske koncentracije fenola u odnosu na smeđe alge koje imaju visoke koncentracije kloro-tanina. Koncentracija fenola varira od 1% do 14% suhe mase, gdje alge vrste *Ascophyllum* i *Fucus* imaju najveće količine fenola. Koncentracija polifenola se mijenja ovisno o godišnjem dobu, ali i o dijelu biljke s kojeg se uzorak uzima (Holdt i Kraan, 2011).

Florotanini su skupina taninskih spojeva, koji pripadaju polifenolima. Iako su tanini prisutni i kod zemaljskih i kod kopnenih biljaka, florotanini, npr. eckol ili dieckol, pronađeni su samo kod smeđih alga (Antonisamy i Raj, 2011.; Gupta i Abu-Ghannam, 2011). Florotanini su polifenoli koji nastaju polimerizacijom floroglucinola. Ti polimeri imaju mnoge biološke aktivnosti u organizmima, npr. uključeni su u mehanizme obrane domaćina. Sadržaj florotanina varira od 1 do 10% suhe mase algi (Swanson i Druehl, 2002).

2.2.5 Minerali

Alge predstavljaju bogat izvor minerala (Nwosu i sur., 2011) zbog čega su često korištene kao dodatci prehrani u svrhu nadopune unosa minerala. Alge mogu sadržavati 10-100 puta veću količinu minerala nego kopnene biljke (Holdt i Kraan, 2011). Mineralni sastav algi je promjenjiv te osim o sezoni branja, ovisi o ekološkim, zemljopisnim i fiziološkim čimbenicima. Alge akumuliraju metalne ione iz slane vode i spremaju ih u obliku karbonatne soli u svojim listovima. Smeđe alge bogat su izvor joda koji je potreban za normalnu funkciju štitne žlijezde (Aslam i sur., 2010). Alge sadrže Se, Zn, Mn i Cu, koje su strukturne komponente nekih antioksidacijskih enzima, te mogu doprinijeti njihovoj aktivnosti (Batista González i sur., 2012).

2.2.6 Biljni hormoni rasta

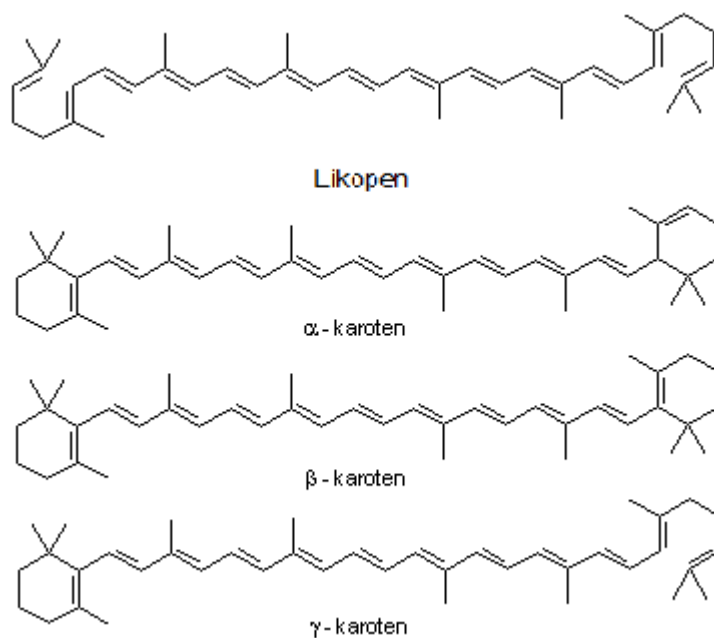
Biljni hormoni rasta koji se nalaze u ekstraktima morskih algi uglavnom su odgovorni za stimulaciju rasta biljaka i povećanje intenziteta fotosinteze. Citokinini (regulatori rasta biljaka) štite biljke od posljedica promjena temperature (Zhang i sur., 2010). Oni su sintetizirani biokemijskom modifikacijom adenina. Najvažnija funkcija im je kontrola raspodjele pupova i stanica u strukturi algi. Unutar ove skupine hormona najznačajniji su zetai i indol-3-propionska kiselina (Stirk i Van Staden, 1997).

2.2.7 Pigmenti

Pigmenti pronađeni kod algi se mogu podijeliti na tri glavne skupine: klorofili, karotenoidi i fikobiliproteini. Osim fotosintetskih i pigmentacijskih učinaka, ti spojevi pokazuju razne korisne učinke na zdravlje. Pigmenti se također koriste kao prirodna bojila hrane, pića i kozmetičkih preparata, kako bi navedeni proizvodi izgledali privlačnije ljudskom oku. Problem sintetičkih bojila je što su često kancerogeni i izazivaju alergijske reakcije, stoga danas postoji sve veća potreba za prirodnim bojilima. Alge sadrže velike količine raznih vrsta pigmenata, te predstavljaju vrijedan izvor prirodnih bojila (Khattar i sur., 2009).

2.2.7.1 Karotenoidi

Karotenoidi su klasa terpenoidnih pigmenata s tetraterpenom (C₄₀) kao bazom, koji je odgovoran za raznolik raspon boja poput jarko žute, narančaste i crvene u raznom voću i povrću (Lorenz i Cysewski, 2000). Građeni su od konjugiranih polienskih lanaca, na temelju kojih ih ujedno i dijelimo na dvije strukturne skupine: (i) karoteni, koji sadrže hidrokarboksilnu skupinu (α -karoten, β -karoten, γ -karotente likopen) i (ii) ksantofili, koji su dosta slični karotenima, ali sadrže hidroksilnu skupinu, tj. kisik (lutein, zeaksantin, kriptoksantin, neoksantin i fluksatin) (Liaaen-Jensen, 2004), čija je kemijska struktura prikazana na Slici 3.. Karotenoide većinom nalazimo u biljkama, s tim da su prisutni i u mnogim algama, bakterijama te gljivama. Karotenoidi imaju značajnu ulogu u procesu fotosinteze. Do danas je identificirano više od 600 različitih karotenoida (Ritz i sur., 2000).



Slika 3. Kemijska struktura različitih vrsta karotenoida (prema Anonymous 5, 2018)

Posljednjih desetljeća, brojna istraživanja su potvrdila razna svojstva i učinke karotenoida. Koriste se kao bojila hrane, odlikuju antioksidativnim svojstvima i raznim drugim blagotvornim svojstvima u svrhu prevencije kroničnih bolesti, određenih vrsta raka te kardiovaskularnih bolesti (Krinsky i Johnson, 2004).

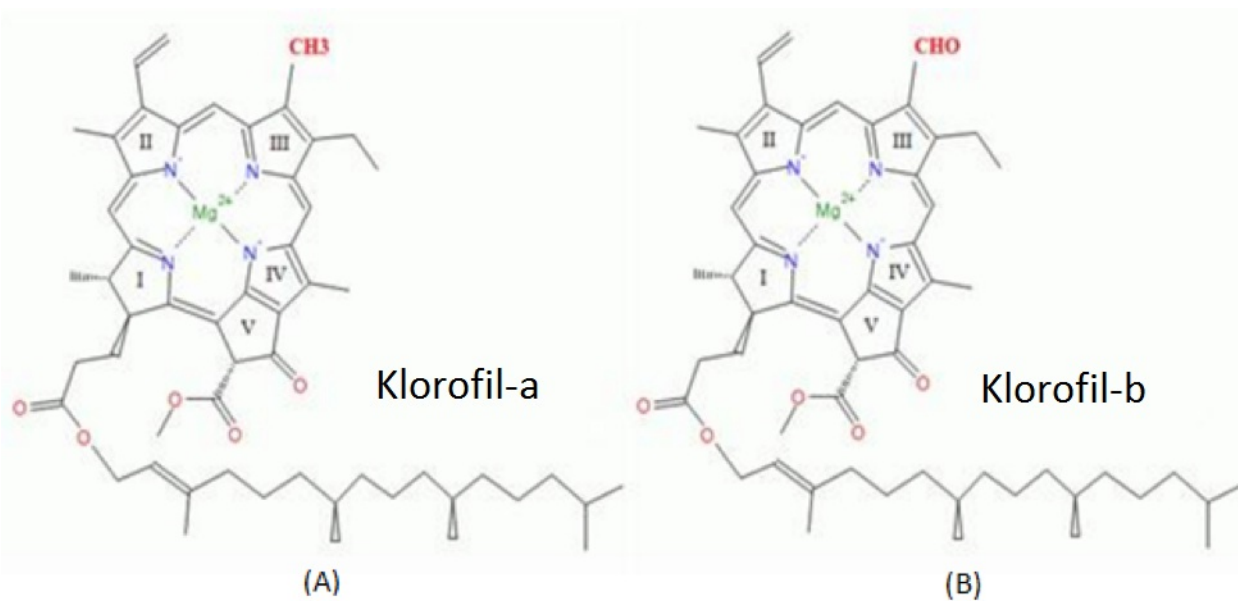
Mikroalge i makroalge predstavljaju jedinstven i održiv izvor karotenoida. Upravo iz tog razloga raste interes industrija za njima kao sirovinama (Safar i sur., 2015). Makroalge služe kao važan izvor karotenoida kao što su fukoksatin, lutein, β -karoten i sifinoksantin. Karotenoidi koje proizvode alge većinom su smješteni u kloroplastu ili se nakupljaju u vezikuli i citoplazmi. Stanična stjenka i plazmatska membrana koje okružuju stanicu djeluju kao prepreka, te uvelike ograničavaju brzinu prijenosa karotenoida i drugih unutarstaničnih komponenti tijekom uobičajenih tj. konvencijalnih postupaka ekstrakcije (Siegel i Siegel, 2013).

2.2.7.2 Klorofili

Klorofil je jedna od izrazito važnih biološki aktivnih tvari koje nalazimo kod algi. S obzirom na strukturu, postoji nekoliko različitih vrsta klorofila – klorofil a, b, c i d te

bakterioklorofili koji su nađeni u određenim vrstama bakterija. Klorofili c i d pronađeni su u nekih protista i cijanobakterija (Taiz i Zeiger, 2010).

Osnovnu strukturu klorofila (Slika 4.) čini porfirinski prsten sastavljen od četiri povezana pirolova prstena označena oznakama od I do IV te peti prsten (V) koji nastaje reakcijom ciklizacije bočnog lanca (propionska kiselina) na prstenu III. U sredini molekule se nalazi magnezijev ion (Mg^{2+}) koji je vezan na atome dušika pirolovih prstena s četiri koordinacijske veze. Na četvrtom (IV) prstenu je esterskom vezom vezan fitol (Von Wettstein i sur., 1995). Fitol nastaje spajanjem četiri izoprenske jedinice i ovaj dugački, hidrofobni lanac čini klorofile vrlo topljivima u lipidima te omogućuje njihovo smještanje u hidrofobno okruženje tilakoidne membrane (González, 2001). Razlika u strukturi klorofila a i b vidljiva je na trećem (III) pirolnom prstenu. Klorofil a na toj poziciji ima metilnu skupinu ($-CH_3$) (Slika 4A), dok je kod klorofila b to aldehidna skupina ($-CHO$) (Slika 4B) (Von Wettstein i sur., 1995).



Slika 4. Kemijska struktura klorofila-a (A) i klorofila-b (B) (prema Anonymous 6, 2018)

Klorofili imaju anti-mutagenu i antioksidacijsku aktivnost zbog mogućnosti prekidanja reakcije radikala uzrokovane autooksidacijom putem mehanizma kojemu je vodik donor (Ferruzzi i sur., 2002). Djelovanjem vidljivog i ultraljubičastog zračenja klorofil prelazi u feofitine gubitkom magnezija, čime dolazi do promjene boje hrane.

2.3 TEHNIKE EKSTRAKCIJE PIGMENTA

2.3.1 Konvencionalne tehnike ekstrakcije

Ekstrakcija je postupak potpunog ili djelomičnog izdvajanja neke tvari iz uzorka pomoću otapala pri čemu dolazi do prijenosa tvari iz krute ili tekuće faze u otapalo, a tvar koja se ekstrahira mora u otapalu biti topljivija nego u polaznoj fazi (Wang i Weller, 2006). Za ekstrakciju je važno odabrati učinkovito otapalo, pri čemu se moraju pratiti određeni parametri i značajke samog otapala poput polarnosti, temperature vrelišta, viskoznosti, stabilnosti na toplinu, kisik i svjetlo, sigurnost pri upotrebi, ali i cijenu koštanja (Albu i sur., 2004).

Općenito, pigmenti iz algi se dobivaju konvencionalnim tehnikama ekstrakcije koristeći organska otapala (npr. Soxhletova ekstrakcija). Osim ekstrakcije po Soxhletu poznate su ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija čvrsto-tekuće, ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje, te ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje. Problem je što korištenje ovih tehnika zahtijeva mnogo vremena, a nerijetko i velike količine otapala, što je skupo i ekološki neprihvatljivo (Fernández-Sevilla i sur., 2010).

Od konvencionalnih tehnika u ovom radu su korišteni različiti oblici konvencionalne ekstrakcije uz konstantno miješanje pri sobnoj temperaturi te vrtložna ekstrakcija pri sobnoj temperaturi. Konstantno miješanje je provedeno korištenjem centrifugalne mješalice koja služi za miješanje dvaju materijala, gdje je prvi materijal u većini slučajeva tekući, a drugi može biti u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Nad uzorkom se primjenjuje centrifugalna sila koja je uzrok razdvajanja ekstrakata. Sila koja se primjenjuje nad uzorkom korištenjem ove tehnike može biti par tisuća puta veća od gravitacijske. Iako se ekstrakcijom potpomognutom centrifugalnom mješalicom dobiju dobri konačni rezultati prinosa, ekstrakcija uz konstantno miješanje pri sobnoj temperaturi smanjuje količinu potrebnog otapala, poboljšava učinkovitost ekstrakcije, a većim dijelom se bazira na maceraciji. Konvencionalne tehnike ekstrakcije unutar staničnih elemenata algi obično se provode iz suhe biomase i temelje se na maceraciji i termičkoj ekstrakciji korištenjem organskih i vodenih otapala, ovisno o polaritetu spojeva koje želimo izdvojiti. Pigmenti se razlikuju s obzirom na polaritet, topljivost i kemijsku stabilnost. Stoga, već u početnoj fazi potrebno je odabrati odgovarajuće otapalo koje bi selektivno i učinkovito izdvojilo ciljani pigment. Budući da je većina pigmenta izrazito hidrofobna, ekstrakcija se često provodi raznim nepolarnim otapalima kao što su: n-heksan, diklormetan, dimetil eter, dietil eter itd. (Kanda i sur.,

2014). U svrhu ekstrakcije je moguće koristiti smjesu otapala i vode. Međutim, učinkovitost ekstrakcije, selektivnost i velika potrošnja otapala još uvijek ostaju ograničavajući faktor u konvencionalnim postupcima ekstrakcije pigmenta.

2.3.2 Nekonvencionalne tehnike ekstrakcije

Zbog svih navedenih nedostataka konvencionalnih tehnika posljednjih godina raste interes za korištenjem inovativnih i nekonvencionalnih tehnika. Cilj nekonvencionalnih tehnika je selektivno povećanje brzine prijenosa pigmenta iz unutarstaničnog prostora algi. Neke od njih su ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (eng. Pulse Electric Field, PEF), ekstrakcija potpomognuta visokonaponskim električnim pražnjenjem (eng. High Voltage Electrical Discharge, HVED), ekstrakcija superkritičnim fluidom (eng. Supercritical Fluid Extraction, SFE), ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku (eng. Accelerated Solvent Extraction, ASE), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. Accelerated solvent extraction, MAE) i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (eng. Ultrasound Assisted Extraction, UAE). Navedene alternativne tehnologije imaju nekoliko prednosti, uključujući brzu ekstrakciju, nisku potrošnju otapala, upotrebu ekološki prihvatljivih otapala i veću selektivnost.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, kao moderna tehnika ekstrakcije, korištena je u ovom radu u svrhu ekstrakcije klorofila-a, klorofila-b i karotenoida. U nastavku je opisan način na koji se ekstrakcija provodi.

2.3.2.1 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom je nadolazeća ekstrakcijska tehnika koja može ponuditi visoku reproducibilnost u kratkom vremenu, veće prinose bioaktivnih sastojaka, jednostavniju manipulaciju, smanjenje temperature tijekom procesa, smanjenje količine otapala i manji unos energije (Wang i Weller, 2006; Virost i sur., 2010). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se provodi na dva načina, u ultrazvučnim kupeljima ili uređajima određene snage i frekvencije ultrazvuka primjenom sonde direktno uronjene u medij koji želimo ekstrahirati.

Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno su jeftine. Elementi pretvornika su smješteni na dnu spremnika i većina ultrazvučnih kupelji radi na

frekvenciji od 20-40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur. 2009).

Ekstrakcija s direktno uronjenom sondom provodi se na način da se u uzorak, koji se nalazi u tekućem agregatnom stanju uroni ultrazvučna sonda. Uzorak se tretira ultrazvukom uz miješanje kako bi se temperatura koja nastaje tijekom kolapsa kavitacijskih mjehurića ravnomjerno prenijela na čitav uzorak. Potrebno je pratiti temperaturu uzorka, te isti po potrebi hladiti ili zagrijavati (LuqueDe Castro i Capote, 2007).

Usljed djelovanja ultrazvuka dolazi do boljeg prodiranja otapala u stanični materijal i boljeg prijenosa mase te olakšanog oslobađanja sadržaja koji se treba izdvojiti (Chemat i sur., 2004). Također, djelovanje ultrazvuka doprinosi većem gibanju molekula čime dolazi do boljeg kontakta između otapala i materijala koji se ekstrahira te prodiranja u unutrašnjost. Princip ultrazvuka očituje se u zvučnim valovima frekvencije više od 20 kHz koji stvaraju mehaničke vibracije u krutom, tekućem ili plinovitom stanju. Za razliku od elektromagnetskih valova, zvučni valovi putuju kroz sustav i izazivaju ekspanziju i kompresiju uslijed čega dolazi do boljeg kontakta molekula. Usljed ekspanzije dolazi do stvaranja mjehurića u tekućem stanju te nastanka negativnog tlaka. Mjehurići nastaju, rastu i na kraju pucaju uslijed pojave kavitacije kada dolazi do bržeg prijenosa na krutu fazu unutar tekućeg medija (Luque-Garcia i Luque de Castro, 2003).

Posljednjih godina ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom se uspješno koristi za ekstrakciju fukoksantina, luteina, β -karotena, astaksantina i drugih spojeva iz algi. Macías-Sánchez i sur. (2009) ekstrahirali su karotenoide iz alge *Dunaliella salina*, pri čemu su koristili metanol i N, N-dimetilformamid kao otapalo. Utvrđeno je da je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom značajno učinkovitija u odnosu na ekstrakciju superkritičnim fluidom. Pasquet i sur. (2011) su uspoređivali učinkovitost ekstrakcije fukoksantina iz alge *Cylindrotheca closterium* tehnikom ekstrakcije potpomognute ultrazvukom i mikrovalovima u odnosu na konvencionalne tehnike. Analizom rezultata zaključili su da je količina prinosa slična bez obzira na korištenu tehniku, uz naglasak na činjenicu da se korištenjem ekstrakcije potpomognute ultrazvukom znatno skratilo vrijeme ekstrakcije.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Uzorak

Smeđa alga *Cystoseira* sp. izronjena je iz Jadranskog mora u veljači 2018. godine. Uzorci alge odmah su ispirani u slatkoj i destiliranoj vodi te zatim zamrznuti na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ u zamrzivaču ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska) do trenutka provođenja postupka liofilizacije. Prethodno smrznuti uzorci alge podvrgnuti su postupku liofilizacije 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

- Metanol (Avantor, Gliwice, Poljska)
- 96 %-tni etanol, p.a. (T.T.T. d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Aceton, p.a. (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska),
- Destilirana voda

3.1.3 Aparatura

- liofilizator, CoolSafe, model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- magnetna miješalica, RT 5 (IKA, Njemačka)
- uređaj za tretiranje ultrazvukom, (Bandelin Sonorex, Njemačka)
- centrifuga, Rotofix 32 A (Hettich Zentrifugen, Njemačka)
- analitička vaga, AX224 (OHAUS Corporation, SAD)
- vortex mješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)

- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)

3.1.4 Pribor

- plastična žličica
- Erlenmeyerove tikvice
- odmjerne tikvice (50 mL)
- laboratorijske čaše (50 mL)
- mikropipete (1000 μ L i 5000 μ L)
- stakleni štapić
- stakleni lijevci
- plastične kivete
- staklene kivete
- menzure (50 mL)
- štoperica
- magnetni mješači
- aluminijska folija
- vata
- filter papir

3.2 TEHNIKE EKSTRAKCIJE

3.2.1 Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje

Izvaže se 1g uzorka s točnošću $\pm 0,01$ g u centrifugalnu kivetu i prelije s 40 mL otapala. Uzorci se zatim postavljaju u centrifugalnu mješalicu na 5500 rpm/min te se ekstrakcija provodi prema parametrima prikazanim u Tablici 2. Nakon ekstrakcije uzorci se filtriraju u odmjernu tikvicu od 50 mL i nadopune otapalom do oznake. Uzorci se skladište u mraku, na temperaturi od +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

Tablica 2. Uvjeti ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje

| <u>UZORAK</u> | <u>OTAPALO</u> | <u>VRIJEME (min)</u> |
|---------------|----------------|----------------------|
|---------------|----------------|----------------------|

| | | |
|------|------------|----|
| CE5 | etanol | 5 |
| CE10 | etanol | 10 |
| CE15 | etanol | 15 |
| CM5 | metanol | 5 |
| CM10 | metanol | 10 |
| CM15 | metanol | 15 |
| CA5 | 80% aceton | 5 |
| CA5 | 80% aceton | 10 |
| CA15 | 80% aceton | 15 |

3.2.2 Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje

Na analitičkoj vagi, u Erlenmeyerovu tikvicu odvažuje se 1 g ($\pm 0,01$) uzorka. Neposredno prije ekstrakcije u tikvicu je dodano 40 mL otapala i magnetni mješač. Tikvica je zatim obložena folijom, zatvorena vatom te stavljena na magnetnu mješalicu na 500 rpm. Varirani parametri ekstrakcije (Tablica 3.) su otapalo (etanol, metanol i 80% aceton) i vrijeme ekstrakcije (5, 10 i 15 min). Nakon provedene ekstrakcije dobiveni ekstrakti se filtriraju u odmjernu tikvicu od 50 mL nadopune otapalom do oznake i skladišti u mraku, na +4 °C do provođenja analize.

Tablica 3. Uvjeti ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje

| UZORAK | OTAPALO | VRIJEME (min) |
|--------|------------|---------------|
| ME5 | etanol | 5 |
| ME10 | etanol | 10 |
| ME15 | etanol | 15 |
| MM5 | metanol | 5 |
| MM10 | metanol | 10 |
| MM15 | metanol | 15 |
| MA5 | 80% aceton | 5 |
| MA5 | 80% aceton | 10 |
| MA15 | 80% aceton | 15 |

3.2.3 Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

U Erlenmeyerovu tikvicu odvažuje se 1g uzorka s točnošću $\pm 0,01$ g, te se neposredno prije ekstrakcije doda 40 mL otapala. Tikvice se zatvore vatom i postavljaju u ultrazvučnu kupelj koja se zatim prekriva aluminijskom folijom kako bi se zaštitile od svjetla. Uzorci su izloženi djelovanju ultrazvuka 5, 10 ili 15 minuta prema parametrima prikazanim u Tablici 4. Nakon provedene

ekstrakcije, ekstrakti se filtriraju u odmjerne tikvice volumena 50 mL te nadopune odgovarajućim otapalom do oznake. Svi ekstrakti se skladište na temperaturi od +4 °C do provođenja daljnjih analiza.

Tablica 4. Uvjeti ekstrakcije potpomognute ultrazvukom

| UZORAK | OTAPALO | VRIJEME (min) |
|--------|------------|---------------|
| UE5 | etanol | 5 |
| UE10 | etanol | 10 |
| UE15 | etanol | 15 |
| UM5 | metanol | 5 |
| UM10 | metanol | 10 |
| UM15 | metanol | 15 |
| UA5 | 80% aceton | 5 |
| UA5 | 80% aceton | 10 |
| UA15 | 80% aceton | 15 |

3.2.4 Spektrofotometrijsko određivanje klorofila-a, klorofila-b i karotenoida

Princip metode

Određivanje klorofila i karotenoida temelji se na principu da svaki fotosintetski pigment ima svoj jedinstveni apsorpcijski spektar s apsorpcijskim maksimumima pri određenim valnim duljinama (Abou-Arab i sur., 2010).

Postupak određivanja

U staklenu kivetu otpipetira se 1 mL uzorka i 2 mL odgovarajućeg otapala nakon čega se mjeri apsorpcija pri valnim duljinama od 470 nm, 649 nm i 664 nm za uzorke s etanolom, 470 nm, 652,4 nm i 665,2 nm za uzorke s metanolom te 470 nm, 646,8 nm i 663,2 nm za uzorke s 80% acetonom. Na isti način se pripremi i slijepa proba, no umjesto ekstrakta uzima se isti volumen ekstrakcijskog otapala. Svi uzorci su paralelno analizirani.

Na osnovu dobivenih rezultata apsorpcije (A), određene su koncentracije klorofila-a (C_a), klorofila-b (C_b) i karotenoida (C_{x+c}) prema jednadžbama u Tablici 5 (Lichtenthaler i Buschmann, 2001).

Tablica 5. Jednadžbe za određivanje koncentracije pigmentata uz primjenu različitih otapala

| OTAPALO | JEDNADŽBA |
|-------------------|---|
| Metanol | $C_a = 16.72A_{665,2} - 9.16A_{652,4}$ |
| | $C_b = 34.09A_{652,4} - 15.28A_{665,2}$ |
| | $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.63C_a - 104.96C_b)/221$ |
| Etanol | $C_a = 13.36A_{664} - 5.19A_{649}$ |
| | $C_b = 27.43A_{649} - 8.12A_{664}$ |
| | $C_{x+c} = (1000A_{470} - 2.13C_a - 97.63C_b)/209$ |
| 80% aceton | $C_a = 12.25A_{663,2} - 297A_{646,8}$ |
| | $C_b = 21.5A_{646,8} - 5.1A_{663,2}$ |
| | $C_{x+c} = (1000A_{470} - 1.82C_a - 85.02C_b)/198$ |

Dobivene vrijednosti koncentracija izražene su u $\mu\text{g mL}^{-1}$ te su preračunate u maseni udio koji je izražen u mg g^{-1} suhe tvari (Tablica 6.)

3.2.5 Statistička obrada podataka

Eksperimentalni dizajn (Tablice 1 – 3) 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) tehnika ekstrakcije (ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje, magnetnom mješalicom i ultrazvukom), b) otapalo (etanol, metanol, 80% aceton) 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 $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U sklopu ovog rada provedena je ekstrakcija pigmenata (klorofil-a, klorofil-b i karotenoidi) iz smeđe alge *Cystoseira* primjenom tri različite tehnike ekstrakcije (ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje te vrtložno miješanje uz djelovanje centrifugalne sile i ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji) uz upotrebu tri različita otapala (etanol, metanol i 80% aceton) te kroz različito vrijeme trajanja ekstrakcije (5, 10 i 15 min). U dobivenim ekstraktima provedeno je spektrofotometrijsko određivanje masenih udjela pigmenata, a rezultati su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracije klorofila-a, klorofila-b i ukupnih karotenoida u ekstraktima alge *Cystoseira sp.*

| | Klorofil – a (mg g ⁻¹ s.t.) | Klorofil – b (mg g ⁻¹ s.t.) | Karotenoidi (mg g ⁻¹ s.t.) |
|------|--|--|---------------------------------------|
| CE5 | 0,67 ± 0,01 | 0,10 ± 0,02 | 0,29 ± 0,02 |
| CE10 | 0,63± 0,04 | 0,06± 0,02 | 0,28± 0,02 |
| CE15 | 1,00± 0,03 | 0,14± 0,01 | 0,42± 0,01 |
| CM5 | 0,55± 0,01 | 0,07± 0,00 | 0,23± 0,01 |
| CM10 | 0,85± 0,00 | 0,12± 0,02 | 0,36± 0,02 |
| CM15 | 0,96± 0,00 | 0,13± 0,00 | 0,39± 0,00 |
| CA5 | 1,03± 0,03 | 0,06± 0,02 | 0,56± 0,01 |
| CA5 | 0,97± 0,01 | 0,04± 0,03 | 0,53± 0,02 |
| CA15 | 1,12± 0,02 | 0,05± 0,00 | 0,62± 0,01 |
| ME5 | 0,97± 0,07 | 0,06± 0,02 | 0,40± 0,01 |
| ME10 | 1,03± 0,04 | 0,14± 0,00 | 0,44± 0,01 |
| ME15 | 1,01± 0,00 | 0,18± 0,01 | 0,42± 0,00 |
| MM5 | 0,94± 0,03 | 0,17± 0,05 | 0,37± 0,02 |
| MM10 | 0,96± 0,00 | 0,17± 0,03 | 0,37± 0,01 |
| MM15 | 1,01± 0,00 | 0,14± 0,00 | 0,41± 0,00 |
| MA5 | 1,07± 0,10 | 0,04± 0,02 | 0,60± 0,06 |
| MA5 | 1,22± 0,01 | 0,08± 0,04 | 0,67± 0,01 |
| MA15 | 0,44± 0,07 | 0,04± 0,01 | 0,17± 0,00 |
| UE5 | 0,30± 0,00 | 0,47± 0,06 | 0,05± 0,02 |

| | | | |
|------|------------|------------|------------|
| UE10 | 0,50± 0,09 | 1,25± 0,23 | 0,03± 0,01 |
| UE15 | 0,54± 0,05 | 1,31± 0,11 | 0,07± 0,02 |
| UM5 | 1,10± 0,01 | 0,18± 0,02 | 0,44± 0,01 |
| UM10 | 1,09± 0,01 | 0,14± 0,00 | 0,44± 0,00 |
| UM15 | 1,16± 0,02 | 0,19± 0,00 | 0,46± 0,01 |
| UA5 | 1,40± 0,06 | 0,8± 0,03 | 0,74± 0,04 |
| UA5 | 1,57± 0,01 | 0,10± 0,01 | 0,83± 0,01 |
| UA15 | 1,37± 0,06 | 0,06± 0,00 | 0,72± 0,03 |

Tablica 7. Utjecaj različitih parametara ekstrakcije na koncentraciju klorofila-a, klorofila-b i karotenoida*

| | N | Klorofil – a (mg g ⁻¹ s.t.) | Klorofil – b (mg g ⁻¹ s.t.) | Karotenoidi (mg g ⁻¹ s.t.) |
|---|----|---|---|--|
| Tehnika ekstrakcije | | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ |
| vrtložno miješanje | 18 | 0,86 ± 0,01 ^a | 0,09 ± 0,01 ^a | 0,41 ± 0,00 ^a |
| kontinuirano miješanje | 18 | 1,09 ± 0,01 ^c | 0,10 ± 0,01 ^a | 0,49 ± 0,00 ^b |
| ultrazvučna kupelj | 18 | 1,00 ± 0,01 ^b | 0,42 ± 0,01 ^b | 0,42 ± 0,00 ^a |
| Otapalo | | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ |
| Etanol | 18 | 0,74 ± 0,01 ^a | 0,41 ± 0,01 ^c | 0,27 ± 0,00 ^a |
| Metanol | 18 | 0,96 ± 0,01 ^b | 0,14 ± 0,01 ^b | 0,38 ± 0,00 ^b |
| 80% aceton | 18 | 1,26 ± 0,01 ^c | 0,06 ± 0,01 ^a | 0,67 ± 0,00 ^c |
| Vrijeme (min) | | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ |
| 5 | 18 | 0,89 ± 0,01 ^a | 0,14 ± 0,01 ^a | 0,41 ± 0,00 ^a |
| 10 | 18 | 0,98 ± 0,01 ^b | 0,23 ± 0,01 ^b | 0,44 ± 0,00 ^b |
| 15 | 18 | 1,08 ± 0,01 ^c | 0,24 ± 0,01 ^b | 0,47 ± 0,00 ^c |
| Tehnika ekstrakcije; otapalo | | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ |
| vrtložno miješanje; etanol | 6 | 0,77 ± 0,02 ^b | 0,10 ± 0,02 ^{a,b} | 0,33 ± 0,01 ^b |
| vrtložno miješanje; metanol | 6 | 0,78 ± 0,02 ^b | 0,10 ± 0,02 ^{a,b} | 0,33 ± 0,01 ^b |
| vrtložno miješanje; 80% aceton | 6 | 1,04 ± 0,02 ^{c,d} | 0,05 ± 0,02 ^a | 0,57 ± 0,01 ^e |
| kontinuirano miješanje; etanol | 6 | 1,00 ± 0,02 ^c | 0,13 ± 0,02 ^{a,b} | 0,42 ± 0,01 ^{c,d} |
| kontinuirano miješanje;; metanol | 6 | 0,97 ± 0,02 ^c | 0,16 ± 0,02 ^b | 0,38 ± 0,01 ^c |
| kontinuirano miješanje;; 80% aceton | 6 | 1,30 ± 0,02 ^e | 0,04 ± 0,02 ^a | 0,68 ± 0,01 ^f |
| ultrazvučna kupelj; etanol | 6 | 0,45 ± 0,02 ^a | 1,01 ± 0,02 ^c | 0,05 ± 0,01 ^a |
| ultrazvučna kupelj; metanol | 6 | 1,12 ± 0,02 ^d | 0,17 ± 0,02 ^b | 0,44 ± 0,01 ^d |
| ultrazvučna kupelj; 80% aceton | 6 | 1,45 ± 0,02 ^f | 0,08 ± 0,02 ^{a,b} | 0,76 ± 0,01 ^g |
| Tehnika ekstrakcije; vrijeme (min) | | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ | $p \leq 0,00^{\dagger}$ |
| vrtložno miješanje; 5 | 6 | 0,75 ± 0,02 ^a | 0,08 ± 0,02 ^a | 0,36 ± 0,01 ^a |
| vrtložno miješanje; 10 | 6 | 0,81 ± 0,02 ^a | 0,07 ± 0,02 ^a | 0,39 ± 0,01 ^{a,b} |
| vrtložno miješanje; 15 | 6 | 1,03 ± 0,02 ^c | 0,11 ± 0,02 ^a | 0,47 ± 0,01 ^{e,f} |

| | | | | |
|-------------------------------|----|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| kontinuirano miješanje; 5 | 6 | 0,99 ± 0,02 ^{b,c} | 0,09 ± 0,02 ^a | 0,46 ± 0,01 ^{d,e} |
| kontinuirano miješanje; 10 | 6 | 1,07 ± 0,02 ^c | 0,13 ± 0,02 ^a | 0,50 ± 0,01 ^{f,g} |
| kontinuirano miješanje 15 | 6 | 1,20 ± 0,02 ^d | 0,11 ± 0,02 ^a | 0,53 ± 0,01 ^g |
| ultrazvučna kupelj; 5 | 6 | 0,93 ± 0,02 ^b | 0,25 ± 0,02 ^b | 0,41 ± 0,01 ^{b,c} |
| ultrazvučna kupelj; 10 | 6 | 1,06 ± 0,02 ^c | 0,49 ± 0,02 ^c | 0,43 ± 0,01 ^{c,d} |
| ultrazvučna kupelj; 15 | 6 | 1,02 ± 0,02 ^c | 0,52 ± 0,02 ^c | 0,42 ± 0,01 ^{b,c} |
| Otapalo; vrijeme (min) | | p = 0,61 [‡] | p ≤ 0,00 [†] | p = 0,91 [‡] |
| etanol; 5 | 6 | 0,65 ± 0,02 ^a | 0,21 ± 0,02 ^c | 0,25 ± 0,01 ^a |
| etanol; 10 | 6 | 0,72 ± 0,02 ^a | 0,48 ± 0,02 ^d | 0,25 ± 0,01 ^a |
| etanol; 15 | 6 | 0,85 ± 0,02 ^b | 0,54 ± 0,02 ^d | 0,30 ± 0,01 ^b |
| metanol; 5 | 6 | 0,86 ± 0,02 ^b | 0,14 ± 0,02 ^{a,b,c} | 0,34 ± 0,01 ^c |
| metanol; 10 | 6 | 0,97 ± 0,02 ^c | 0,14 ± 0,02 ^{a,b,c} | 0,39 ± 0,01 ^d |
| metanol; 15 | 6 | 1,04 ± 0,02 ^c | 0,15 ± 0,02 ^{b,c} | 0,42 ± 0,01 ^d |
| 80% aceton; 5 | 6 | 1,17 ± 0,02 ^d | 0,06 ± 0,02 ^{a,b} | 0,63 ± 0,01 ^e |
| 80% aceton; 10 | 6 | 1,26 ± 0,02 ^e | 0,07 ± 0,02 ^{a,b} | 0,68 ± 0,01 ^f |
| 80% aceton; 15 | 6 | 1,36 ± 0,02 ^f | 0,03 ± 0,02 ^a | 0,70 ± 0,01 ^f |
| Prosječna vrijednost | 54 | 0,99 ± 0,04 | 0,20 ± 0,04 | 0,44 ± 0,03 |

Bilješka.

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

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

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

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

Maseni udjeli klorofila-a, klorofila-b i karotenoida svih uzoraka prikazani su u Tablici 6. dok su u Tablici 7. prikazane njihove prosječne vrijednosti te utjecaji različitih parametara ekstrakcije na njihove masene udjele. Prosječne vrijednosti pigmenata u svih 36 uzoraka iznosile su: 0,99 mg g^{-1} s.t. (klorofil-a), 0,20 mg g^{-1} s.t. (klorofil-b) te 0,44 mg g^{-1} s.t. (karotenoidi). Prema literaturnim podacima kod složenijih biljaka klorofil-a i klorofil-b se obično nalaze u omjeru 3:1 (Belitz i Grosch, 1987). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je taj omjer kod alge *Cystoseira* nešto veći u korist klorofila-a, otprilike 5:1. Prema drugim istraživanjima količina dobivenog klorofila-b je manja kod smeđih algi u odnosu na ostale biljke (Lee, 2008).

Betancor i suradnici (2014) su analizom smeđe alge *Cystoseieae humilis* dobili slične rezultate kao u ovom radu. Količina ekstrahiranog klorofila-a iznosi 0,89 mg g^{-1} s.t., dok je u ovom radu dobiveno 0,86 mg g^{-1} s.t..

4.1 UTJECAJ PARAMETARA EKSTRAKCIJE NA PRINOS PIGMENATA

4.1.1 Utjecaj tehnike ekstrakcije na prinos pigmenata

Promatrajući utjecaj ekstrakcijske tehnike na prinos pigmenata ekstrahiranih iz alge *Cystoseira* možemo primjetiti da je najveća količina ekstrahiranog klorofila-a i ukupnih karotenoida postignuta ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje. Prosječna količina ekstrahiranog klorofila-a u tako dobivenim ekstraktima iznosi 1,09 mg g⁻¹ s.t., a ukupnih karotenoida 0,49 mg g⁻¹ s.t.. Ekstrakcija kontinuiranim miješanjem rezultirala je najmanjom koncentracijom ekstrahiranog klorofila-a. Kod ekstrakcije karotenoida nije bilo statistički značajne razlike ($p \geq 0,05$) između ekstrakata dobivenih vrtložnim miješanjem uz djelovanje centrifugalne sile te ekstrakata dobivenih primjenom ultrazvučne kupelji. Promatrajući količinu ekstrahiranog klorofila-b može se primjetiti da je primjenom ultrazvučne kupelji postignuta koncentracija od 0,42 mg g⁻¹ s.t. što je značajno više od 0,09 mg g⁻¹ s.t. i 0,10 mg g⁻¹ s.t. koliko je postignuto ekstrakcijom vrtložnim miješanjem uz djelovanje centrifugalne sile odnosno ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje.

U istraživanju Sudhakara i suradnika(2013) analizirana je količina pigmenata kod 5 različitih vrsta smeđih algi (*Sargassum wightii*, *Sargassum ilicifolium*, *Sargassum longifolium*, *Padina gymnospora*, *Turbinaria ornate*), gdje se ekstrakcija provodila vrtložnim miješanjem uz djelovanje centrifugalne sile. Količina ekstrahiranog klorofila-a iznosila je između 0,19 mg g⁻¹ s.t. i 1,13 mg g⁻¹ s.t., što je usporedivo za rezultatima dobivenim prilikom izrade ovog rada.

U istraživanju koje su proveli Betancor i suradnici (2014) analizirane su fotosintetske karakteristike smeđe alge *Cystoseieae humilis*. Istraživao se utjecaj dubine nalazišta alge na količinu pigmenata u njihovom sastavu. Korištena je ekstrakcija vrtložnim miješanjem uz djelovanje centrifugalne sile. Pokazalo se da je kod algi izronjenih na većim dubinama količina klorofila-a i ukupnih karotenoida veća u odnosu na one izronjene u plićim nalazištima. Na dubini od 5 metara količina ekstrahiranog klorofila-a iznosi 0,89 mg g⁻¹ s.t., što je usporedivo sa rezultatima dobivenim u ovom radu (vrtložno miješanje 0,86 mg g⁻¹ s.t.). Betancor i suradnici (2014) su u svom istraživanju dobili malo veće količine ukupnih karotenoida (0,97 mg g⁻¹ s.t.) u odnosu rezultate dobivene ovim istraživanjem (vrtložno miješanje, 0,94 mg g⁻¹ s.t., kontinuirano miješanje, 0,49 mg g⁻¹ s.t.).

Ekstrakcija pomoću ultrazvučne kupelji se pokazala kao suvremena nekonvencionalna tehnika koja daje značajne rezultate prinosa. Razlog je taj što ultrazvuk ne zagrijava uzorak na temperaturu od 15±5 °C, čime se omogućava bolja ekstrakcija temperaturno osjetljivih pigmenata kao što su neki karotenoidi.

Glavna prednost ekstrakcije pomoću ultrazvučne kupelji je skraćivanje vremena ekstrakcije, povećanje količine prinosa pigmenata te smanjenje količine korištenog otapala. Sve navedene prednosti korištene tehnike osiguravaju postizanje maksimalnog učinka ekstrakcije u minimalnom vremenu, što je s ekonomskog i industrijsku stajališta ključan faktor za daljnu primjenu i razvoj.

4.1.2 Utjecaj vrste otapala na prinos pigmenata

Promatrajući utjecaj vrste otapala na prinos pigmenata ekstrahiranih iz smeđe alge *Cystoseira* može se opaziti da je upotrebom 80% acetona postignut najveći prinos klorofila-a i ukupnih karotenoida. Prosječna vrijednost koncentracije klorofila-a svih uzoraka ekstrahiranih etanolom iznosi 1,26 mg g⁻¹ s.t., a ukupnih karotenoida 0,67 mg g⁻¹ s.t.. S druge strane, upotrebom etanola za ekstrakciju klorofila-a i karotenoida postignute su najniže vrijednosti od 0,74 mg g⁻¹ s.t. i 0,27 mg g⁻¹ s.t. Potpuno suprotan trend uočavamo u ekstrakciji klorofila-b gdje je upotrebom etanola postignuta koncentracija od 0,41 mg g⁻¹ s.t., a upotrebom 80% acetona koncentracija od samo 0,06 mg g⁻¹ s.t..

Aceton se pokazao kao odlično otapalo jer ima veliki dipolni moment, s jedne strane molekula acetona je nepolarna s druge polarna. Upravo zbog toga aceton se može koristiti kao otapalo za polarne i nepolarne tvari. Aceton je blaže polarno otapalo od vode, te mu ta karakteristika osigurava veliku rezoluciju između pigmenata na filter papiru i bolje rezultate kod spektrofotometrije, te se pokazao kao najbolje otapalo za ekstrakciju klorofila-a i ukupnih karotenoida (Sarkar i sur., 2012).

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja koje su proveli Sudhakar i suradnici (2013) prilikom ekstrakcije pigmenata iz 5 različitih vrsta smeđih algi (*Sargassum wightii*, *Sargassum ilicifolium*, *Sargassum longifolium*, *Padina gymnospora*, *Turbinaria ornate*). U navedenom istraživanju autori su primjenili tehniku ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje te su istražili utjecaj 90% aceton, 90% etanol i 100% aceton na količinu ekstrahiranih pigmenata. Sukladno rezultatima ovog istraživanja njihovi rezultati pokazuju da je 90% aceton najbolje otapalo za ekstrakciju klorofila-a čija je koncentracija kod alge *Sargassum wightii* iznosila 0,75mg g⁻¹ s.t., a kod *Padina gymnospora* 1,13mg g⁻¹ s.t. Količina pigmenata ekstrahiranih korištenjem 100% acetona je manja u odnosu na rezultate dobivene korištenjem 90%

acetona, a veća u odnosu na rezultate dobivene korištenjem 90% etanola. U navedenom istraživanju zaključuju da je otapalo ključan faktor pri optimizaciji procesa ekstrakcije.

Warkoyo i Saati (2011) su istraživali utjecaj otapala na količinu ekstrahiranih karotenoida kod *Eucheuma cottonii*, alge koja može biti zelena, crvena ili smeđa. Kao otapala korišteni su aceton, etanol i benzeni (petrolej benzen i heksan petrolej benzen). Utvrdili su da je kod različitih tipova algi prisutna različita količina karotenoida. Kod crvenih algi pronađene su veće količine karotenoida u odnosu na smeđe i zelene. Aceton se pokazao kao najbolje otapalo za ekstrakciju karotenoida kod smeđih i zeleni algi, dok je kod crvenih algi podjednaka količina prinosa karotenoida dobivena korištenjem acetona i etanola. Kod smeđih algi količina ekstrahiranih karotenoida je 1,28 mg/100g. Aceton je zbog svoje izrazite polarnosti pogodan za ekstrakciju karotenoida, pogotovo polarnih karotenoida kao što su lutein i zeaksantin.

4.1.3 Utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na prinos pigmenata

Koncentracija klorofila-a i ukupnih karoteinoida raste s porastom vremena ekstrakcije s 0,89 mg g⁻¹ s.t na 1,08 mg g⁻¹ s.t. odnosno s 0,41 mg g⁻¹ s.t na 0,47 mg g⁻¹ s.t.. Količina ekstrahiranog klorofila-b porasla je s porastom vremena ekstrakcije od 5 do 10 minuta, no ne mijenja se značajno nakon 10 minuta trajanja procesa ekstrakcije.

Vrijeme trajanja ekstrakcije je ovisno o vrsti bioaktivne komponente koju se želi ekstrahirati. Kontaktno vrijeme između uzorka i otapala određuje količinu prinosa. Kada se stanica odupire liziranju (proces raspadanja stanične membrane je teži), a koristi se slabije otapalo (kako se ekstrakti ne bi oštetili), duže vrijeme trajanja ekstrakcije osigurava veći prinos (Henriques i sur., 2007).

Proces trajanja ekstrakcije korištenjem nekonvencionalih tehnika se značajno smanjuje. Pasquet i suradnici (2011) su proveli istraživanje nad mikroalgama *Dunaliella tertiolecta* i *Cylindrotheca closterium*. Za ekstrakciju pigmenata koristili su ekstrakciju pomoću ultrazvučne kupelji i ekstrakciju pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje. Također su pratili utjecaj vremena trajanja ekstrakcije na promjenu ukupne količine prinosa. Ekstrakcija pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje je provedena u periodu od 10 – 20 minuta, dok je prilikom korištenja ultrazvuka vrijeme trajanja ekstrakcije između 3 – 15 minuta. Količina ekstrahiranih pigmenata kod *Cylindrotheca closterium* je vremenski ovisna. Kada se koristi ekstrakcija pri

sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje najveća količina prinosa klorofila-a je utvrđena nakon 10 minuta ($4,60 \text{ mg g}^{-1}$). Maksimalne količine prinosa klorofila-b i karotenoida su utvrđene nedugo nakon početka procesa ekstrakcije ($1,50 \text{ mg g}^{-1}$ i $1,20 \text{ mg g}^{-1}$).

Primjenom ultrazvuka maksimalna količina ekstrahiranog klorofila-a je utvrđena u razdoblju trajanja od 3-10 minuta ($4,95 \pm 0,27 \text{ mg g}^{-1}$), koja je znatno niža u odnosu na količinu prinosa dobivenih ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi uz vrtložno miješanje ($7,48 \pm 0,21 \text{ mg g}^{-1}$).

4.2 UTJECAJ KOMBINACIJE PARAMETARA NA PRINOS PIGMENATA

Promatrajući kombinirani utjecaj tehnike ekstrakcije i otapala možemo primjetiti da je upotrebom ultrazvučne kupelji i etanola koncentracija ekstrahiranih klorofila-a i karotenoida statistički značajno manja ($0,45 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. i $0,05 \text{ mg g}^{-1}$ s.t.). Potpuno suprotan trend uočavamo kod ekstrakcije klorofila-b čija je koncentracija značajno veća ($1,01 \text{ mg g}^{-1}$ s.t.) primjenom ultrazvučne kupelji i etanola. Primjenom ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje i ekstrakcije potpomognute magnetnom mješalicom nema statistički značajne razlike između primjene etanola i metanola u ekstrakciji klorofila-a i karotenoida te je primjenom 80% acetona postignuta najveća ekstrakcija navedenih pigmenata.

Ekstrakcijom pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje i magnetnom mješalicom rezultirale su najvećom koncentracijom ekstrahiranih klorofila-a i karotenoida ukoliko je proces ekstrakcije trajao 15 minuta. Primjenom tih istih tehnika ekstrakcije uočavamo da količina ekstrahiranog klorofila-b ne ovisi o vremenu, odnosno nema statistički značajne razlike ukoliko se ekstrakcija provodi 5, 10 ili 15 minuta. S druge strane, primjenom ultrazvučne kupelji više klorofila-b ekstrahirano je nakon 10 i 15 minuta trajanja ekstrakcije.

Kombinirani utjecaj vrste otapala i vremena trajanja ekstrakcije nije statistički značajan parametar ($p \geq 0,05$) za ekstrakciju klorofila-a i ukupnih karotenoida. U ekstrakciji klorofila-b možemo uočiti da je primjenom etanola postignuta bolja ekstrakcija nego primjenom metanola i 80% acetona neovisno o vremenu. Primjenom etanola statistički najmanja koncentracija klorofila-b postignuta je prilikom ekstrakcije u trajanju od 5 minuta, dok između 10 i 15 minuta nema statistički značajne razlike. Primjenom metanola i 80% acetona koncentracija klorofila-b nije se značajno mijenjala promjenom vremena trajanja ekstrakcije.

4.3 OPTIMALNI PARAMETRI EKSTRAKCIJE

Tablica 8. Optimalni parametri ekstrakcije klorofila-a, klorofila-b i karotenoida te njihove predviđene i eksperimentalne vrijednosti

| | Optimalni parametri | | | Predviđene vrijednosti (mg g ⁻¹ s.t.) | Eksperimentalne vrijednosti (mg g ⁻¹ s.t) |
|--------------|---------------------|------------|---------------|--|--|
| | Tehnika ekstrakcije | Otapalo | Vrijeme (min) | | |
| Klorofil – a | ultrazvučna kupelj | 80% aceton | 11 | 1,51 | 1,41 |
| Klorofil – b | ultrazvučna kupelj | etanol | 14 | 1,21 | 1,23 |
| Karotenoidi | ultrazvučna kupelj | 80% aceton | 10 | 0,78 | 0,81 |

Optimalni parametri ekstrakcije koji će rezultirati najvećom količinom ekstrahiranog klorofila-a, klorofila-b i karotenoida prikazani su u Tablici 8. U svrhu optimizacije korišten je alat za predviđanje i profiliranje. Kao nezavisne varijable postavljenu su: tehnika ekstrakcije, vrsta otapala i vrijeme trajanja ekstrakcije dok su kao zavisne varijable postavljene koncentracije klorofila-a, klorofila-b i karotenoida.

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom pokazala se kao optimalna tehnika ekstrakcije svih istraživanih pigmenta. Za ekstrakciju klorofila-a i karotenoida optimalno otapalo je 80% aceton, dok je za ekstrakciju klorofila-b to etanol. Optimalno vrijeme ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji je 10 min za karotenoide, 11 min za klorofil-a i 14 min za klorofil-b. Provođenjem ekstrakcije pri navedenim parametrima dobivene su vrijednosti približno jednake predviđenima.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i iznesenih rezultata može se zaključiti:

- Prosječne vrijednosti masenih udjela ekstrahiranih pigmenata iznose kako slijedi: klorofila-a $0,99 \text{ mg g}^{-1}$ s.t., klorofila-b $0,20 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. i ukupnih karotenoida $0,44 \text{ mg g}^{-1}$ s.t.
- Najveći prosječni maseni udjeli ekstrahiranog klorofila-a i ukupnih karotenoida postignuti su ekstrakcijom vrtložnim miješanjem uz djelovanje centrifugalne sile ($1,09 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. klorofila-a te $0,49 \text{ mg g}^{-1}$ s.t. ukupnih karotenoida) dok je najveća koncentracija klorofila-b postignuta primjenom ekstrakcije pri sobnoj temperaturi uz kontinuirano miješanje ($0,45 \text{ mg g}^{-1}$ s.t.).
- 80% aceton je u usporedbi s metanolom i etanolom bolje otapalo za ekstrakciju klorofila-a i ukupnih karotenoida, dok je najveći prinos klorofila-b postignut upotrebom etanola.
- Maseni udjeli klorofila-a i ukupnih karotenoida rastu s porastom vremena ekstrakcije te su najveći nakon 15 minuta ekstrakcije. Maseni udjel ekstrahiranog klorofila-b ne mijenja se značajno nakon 10 minuta trajanja procesa ekstrakcije.
- Kao optimalna tehnika ekstrakcije svih istraživanih pigmenata pokazala se ekstrakcija u ultrazvučnoj kupelji. Za ekstrakciju klorofila-a i karotenoida optimalno otapalo je 80% aceton, dok je za ekstrakciju klorofila-b to etanol. Optimalno vrijeme ekstrakcije u ultrazvučnoj kupelji je 10 min za karotenoide, 11 min za klorofil-a i 14 min za klorofil-b.

6. LITERATURA

Amico V. (1995) Phytochemistry, Elsevier, Italija, str. 1257-1279.

Anonymous1 (2018) Zelene alge <<http://www.ucmp.berkeley.edu/greenalgae/greenalgae.html>> .
Pristupljeno 17. Studenog 2018.

Anonymous2 (2018) Crvene alge <<https://blogs.scientificamerican.com/artful-amoeba/why-red-algae-never-packed-their-bags-for-land/>> . Pristupljeno 17. Studenog 2018.

Anonymous3 (2018) Crvene alge <<https://www.google.hr/search?q=cystoseira+sp&tbm=isch&tbs=rimg:Cd3iYj31pXA>> . Pristupljeno 17. Studenog 2018.

Anonymous4 (2018) Cystoseira sp. <<http://doris.ffessm.fr/Especies/Cystoseira>> . Pristupljeno 19. Studenog 2018.

Anonymous5 (2018) Karotenoidi <https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-selected-carotenoids_fig1_263015634> . Pristupljeno 24. Svibnja 2018.

Anonymous6 (2018) Klorofil-a i klorofil-b <<https://www.emolecules.com/#?click=building-blocks>> . Pristupljeno 26. Studenog 2018.

Anonymous 7 (2018) alge <<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=1687>> . Pristupljeno 13. Kolovoza 2018.

Antonisamy, M.J., Raj, E.D.S. (2011) UV–VIS and HPLC studies on *Amphiroa anceps* (Lamarck) Decaisne. *Arabian J. Chem.* **9**, 907-913.

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**, 269-281.

Albu, S., Joyce, E., Paniwnyk, L., Lorimer, J. P., Mason, T. J. (2004) Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. *Ultrason Sonochem.* **11**, 261-265.

Aslam, M.N., Kreider, J.M., Paruchuri, T. (2010) A mineral-rich extract from the red marine algae *Lithothamnion calcareum* preserves bone structure and function in female mice on a western-style diet. *Calcif. Tissue Int.* **86**, 313-324.

Balboa, E.M, Conde, E., Moure, A., Falqué, E., Domínguez, H. (2013) In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chem.* **138**, 1764-1785.

Batista González, A.E., Silva, A.M.O., Vidal-Novoa, A., Pinto, J.R., Manchini D.A.P., Manchini-Filho, J. (2012) Analysis of in vitro and in vivo antioxidant properties of hydrophilic fractions from the seaweed *Halimeda monile*. *L. J Food Biochem.* **36**, 89-197.

Belitz, H.D., Grosch W. (1987) Food Chemistry, 2.izd., Marcel Dekker, New York., str. 549-584.

Betancor, S., Domínguez, B., Tuya, F., Figueroa, F.L., Haroun, R. (2015) Photosynthetic performance and photoprotection of *Cystoseira humilis* (Phaeophyceae) and *Digenea simplex* (Rhodophyceae) in an intertidal rock pool. *Aquatic Botany.* **121**,16-25.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, B., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri obradi hrane. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition.* **4**, 32-37.

Brownlee, I., Fairclough, A., Hall, A., Paxman, J. (2012) The potential health benefits of seaweed and seaweed extract. U: Seaweed: ecology, nutrient composition and medicinal uses, (Pomin, V.H.,ured.), Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, str. 119-136.

Chemat, S., Lagha, A., Aitamar, H., Bartels, P.V., Chemat, F. (2004) Comparision of conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour Fragr. J.***19**, 188-195.

Cousins G. (1995) Microalgae, First and Finest Superfood. *Body Mind Spirit.***4**, 13.

Cunningham, S., Joshi, L. (2010) U: Transgenic Crop Plants (Kole, C., ured.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 343-357.

Dhara, C.D., Reddy, C.R.K., Balar, N., Suthar, P., Gajaria, T., Gadhavi, D.K. (2017) Assessment of the nutritive, biochemical, antioxidant and antibacterial potential of eight tropical macro algae along Kachchh coast, India as human food supplements. *J. Aquat. Food Prod. T.* **27**, 61-79.

Escarpa, A., Gonzalez, M.C. (2001) An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **31**, 57-139.

Fernández-Sevilla J.M., Acién Fernández F.G., Molina Grima E. (2010) Biotechnological production of lutein and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 27–40.

Ferreira, L.G., Nosedá, M.D., Gonçalves, A.G., Ducatti, D.R.B., Fujii, M.T., Duarte, M.E.R. (2012) Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* **347**, 83-94.

Ferruzzi, M. G., Bohm, V., Courtney, P. D., Schwartz, S. J. (2002) Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial reverse mutagenesis assays. *J. Food Sci.* **67**, 2589-2595.

Gil-Chavez, G.J., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, J.B., Sepulveda, D., Yahia, E.M., Gonzalez-Aguilar, G.A. (2013) Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients. *Comprehen. Rev. Food Sci. Food Safety.* **12**, 5-23.

González, L. (2001) Determination of photosynthetic pigments, U: Handbook of Plant Ecophysiology Techniques (Reigosa Roger, M. J., ured.), 1. izd., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, str. 65-80.

Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., Hamal, A. (2014) What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **3**, 174-179.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011) Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **12**, 600-609.

Henriques M, Silva A, Rocha J (2007) Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method communicating current research and educational topics and trends. *Appl. Microbiol.***2**,586–593.

Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications 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 bioactives from marine algae. *J. Agric. Food Chem.***61**, 4667-4675.

Kanda, H., Kamo, Y., Machmudah, S., Wahyudiono, E.Y., Goto, M. (2014) Extraction of fucoxanthin from raw macroalgae excluding drying and cell wall disruption by liquefied dimethyl ether. *Mar. Drugs.***12**, 2383-2396.

Keyrouz, R., Abasq, M.L., Le Bourvellec, C. (2011) Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chem.* **126**, 831-836.

Khattar, J.I.S., Singh, D.P., Kaur, G. (2009) Algal biology and biotechnology, U: Microalgae: A source of natural colours, 1. izd., I. K. International Publishing House Pvt. Ltd. New Delhi, str. 129-150.

Kılınç, B., Cirik, S., Turan, G., Tekogul, H., Koru, E. (2013) Seaweeds for food and industrial applications. *Intech.***31**, 735-745.

Krinsky, N.I., Johnson, E.J. (2005) Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol. Aspects Med.* **26**, 459-516.

Lee, R.E., (2008) Phycology. 4.izd., Cambridge University press, Cambridge, England.

Leonard, S.G., Sweeney, T., Pierce, K.M., Bahar, B., Lynch, B.P., O'Doherty, J.V. (2010) The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livest. Sci.* **134**, 135-138.

Li, Y.X., Kim, S.K. (2011) Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1461-1466.

Liaaen-Jensen, S. (2004) Basic carotenoid chemistry, U: Carotenoids in health and disease (Krinsky, N.I., Mayne, S.T., Sies, H., ured.), Marcel Dekker, New York, USA, str. 1-30.

Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C. (2001) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. U: Current protocols in food analytical chemistry (Wrolstad, R.E., Acree, T. E., An, H., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Sporns, P., ured.), John Wiley and Sons, New York, SAD, str. F4.3.1-F4.3.8. Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. (2000) Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends Biotechnol.* **18**, 160-167.

Luque De Castro, M. D., Capote, P. F. (2007) Analytical applications of ultrasound, 1. izd., Elsevier Science, Langford Lane, Oxford, Great Britain.

Luque-Garcia, J.L., Luque de Castro, M.D. (2003) Ultrasound: A powerful tool for leaching. *Trends Analyt. Chem.* **22**, 41-47.

Macías-Sánchez, M.D., Mantell, C., Rodríguez, M., De la Ossa, E.J.M., Lubián, L.M., Montero, O. (2009) Comparison of supercritical fluid and ultrasound-assisted extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Dunaliella salina*. *Talanta.* **77**, 948-952.

McHugh, D.J. (2003) A guide to seaweed industry. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome.

Nwosu, F., Morris, J., Lund, V.A., Stewart, D., Ross, H.A., McDougall, G.J. (2011) Anti-proliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine alga. *Food Chem.* **126**, 1006-1012.

- Pasquet, V., Chérouvrier, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* **46**, 59-67.
- Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., Moghadasian, M.H. (2009) A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.* **109**, 668-79.
- Ritz, T., Damjanović, A., Schulten, K. (2000) Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth. Res.* **66**, 125-144.
- Rodríguez-Meizoso, I., Jamie, L. (2010) Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvalis* microalga. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **51**, 456-463.
- Sarkar C. R., Das L., Bhagawati B., Goswami B. C. (2012) A comparative study of carotenoid extraction from algae in different solvent systems. *Asian J. Plant Sci. Res.* **2**, 546-549.
- Safar, H., Van Wageningen, J., Møller, P., Jacobsen, C. (2015) Carotenoids, phenolic compounds and tocopherols contribute to the antioxidative properties of some microalgae species grown on industrial wastewater. *Mar. Drugs.* **13**, 986-1002.
- Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A., Abd_Allah, E.F. (2017) Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi J. Biol. Sci.* **24**, 7339-7356.
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P. (2015) Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects. *J. Funct. Foods.* **18**, 820-897.
- Siegel, B.Z., Siegel, S.M. (2013) The chemical composition of algal cell walls. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **3**, 1-26.
- Wilce, R.T. (1966) *Pleurocladia lacustris* in Arctic America. *J. Phycol.* **2**, 57-66.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Coimbra, M.A., Vicente, A.A. (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocoll.* **27**, 287-292.

- Sudhakar, M.P., Ananthalakshmi, J.S.Beena, B.N. (2013) Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *J. Chem. Pharm. Res.* **5**(7),169-175.
- Stirk, W.A., Van Staden, J. (1997) Isolation and identification of cytokinins in a new commercial seaweed product made from *Fucus serratus* L. *J.App. Phycol.* **9**, 327-330.
- Swanson, A.K., Druehl, L.D. (2002) Induction, exudation and the UV protective role of kelp phlorotannins. *Aquat. Bot.* **73**, 241-253.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2010) Plant Physiology, 5. izd., Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, str. 782.
- Van Den Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. (1995) Algae, an introduction to phycology. *Cambridge University Press, Cambridge*, str. 9-48.
- Vidanarachchi, J.K., Iji, P.A., Mikkelsen, L.L., Sims, I., Choct, M. (2009) Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and New Zealand plants. *Carbohydr. Polym.* **77**, 670-676.
- Viot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.C.G., Chemat, F. (2010) Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 1066-1074.
- Von Wettstein, D., Gough, S., Kannangara, C. (1995) Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell.* **7**, 1039-1057.
- Warkoyo, Saati, E.(2011) The solvent effectiveness on extraction process of seaweed pigment. *Makara Teknologi.* **15**, 5-8.
- Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci.Tech.* **17**, 300-312.
- Zhang, X., Wang, K., Ervin, E.H. (2010) Optimizing dosages of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside for improving creeping bentgrass heat tolerance. *Crop Sci.* **50**, 316-320.

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.

Antonia Jujnović