

# Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima iz smeđe alge *Cystoseira compressa*

---

Jurić, Mateja

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:159:551810>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

**EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA**  
**POTPOMOGNUTA**  
**MIKROVALOVIMA IZ SMEĐE**  
**ALGE *Cystoseira compressa***

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

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 doc.dr.sc. Zorana Zorića te uz pomoć asistentice mag. ing. Ane Dobrinčić.

## ZAHVALA

Iskreno zahvaljujem svom mentoru doc.dr.sc. Zoranu Zoriću na ukazanom povjerenju, uloženom vremenu i strpljenju. Zahvaljujem prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na pomoći, podršci i prenesenom znanju. Posebnu i iskrenu zahvalu želim izreći asistentici mag.ing. Ani Dobrinčić na neizmjerne pomoći, strpljenju, konstruktivnim savjetima i prenesenom znanju u svakom trenutku izrade ovog rada. Zahvaljujem i doc.dr.sc. Mojci Čakić Semenčić na pruženoj pomoći i ustupljenim uređajima korištenim pri izradi ovog rada.

Posebno želim zahvaliti svojoj obitelji i roditeljima koji su mi tokom čitavog mog školovanja bili bezuvjetna potpora i najveća podrška. Hvala Hrvoju i svim prijateljima na pomoći 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: Prehrambena tehnologija

### EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA POTPOMOŽNUTA MIKROVALOVIMA IZ SMEĐE ALGE *Cystoseira compressa*

Mateja Jurić, 1134/USH

**Sažetak:** Alga *Cystoseira compressa* poput ostalih smeđih algi izvor je brojnih bioaktivnih molekula. Jednu od značajnijih skupina bioaktivnih molekula čini sulfatirani polisaharid fukoidan, koji nalazi primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji zbog svoje antikoagulacijske, antiupalne i antivirusne aktivnosti. Cilj rada bio je optimizirati metode ekstrakcije fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira compressa*. Korištene su dvije metode, konvencionalna ekstrakcija i ekstrakcija mikrovalovima. Obje metode provedene su s istim otapalom (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) volumena 30 mL. Konvencionalna metoda provedena je primjenom klasičnih postupaka uz kontinuirano miješanje otapala i uzorka primjenom magnetske miješalice. Pri ekstrakciji mikrovalovima ispitivan je utjecaj različitog vremena (5, 10 i 20 min) i temperature ekstrakcije (40, 60, 80 i 100 °C) na prinos fukoidana (%Fuk), degradaciju alge (%DA) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (mg g<sup>-1</sup>). Rezultati su pokazali da je *Cystoseira compressa* dobar izvor fukoidana. Najmanja degradacija alge dobivena je pri 60 °C i 5 min dok se povećanjem temperature degradacija povećavala. Prinos fukoidana bio je najveći pri temperaturi od 100 °C i vremenu od 5 minuta. Najveći prinos ugljikohidrata postignut je pri temperaturi od 100 °C i 20 min te je iznosio 18,28 mg g<sup>-1</sup>.

**Ključne riječi:** mikrovalovi, fukoidan, ekstrakcija, polisaharidi, alga

**Rad sadrži:** 48 stranice, 5 slika, 6 tablica, 97 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** doc.dr.sc. Zoran Zorić

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc.dr.sc. Sandra Pedisić
2. Doc.dr.sc. Zoran Zorić
3. Izv.prof.dr.sc. Sandra Balbino
4. Prof.dr.sc. Božidar Šantek

**Datum obrane:** 19. rujna 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE *Cystoseira compressa*

*Mateja Jurić 1134/USH*

**Abstract:** *Cystoseira compressa* is like other brown algae source of numerous bioactive molecules. Significant bioactive molecule is the sulfated polysaccharide fucoidan, which is used in food and pharmaceutical industry due to its anticoagulatory, antiinflammatory and antiviral activities. The aim of this paper was to optimize the methods of extracting fucoidan from the brown algae *Cystoseira compressa*. Two methods, conventional extraction and microwave assisted extraction, were used. Extractions were carried out with the same solvent (0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) and 30 mL volume. Conventional method was carried out by continuous mixing of solvents and samples using magnetic stirring. In microwave assisted extraction, the effects of different parameters of time (5, 10 and 20 min) and temperature (40, 60, 80 and 100 °C) on the yield of fucoidan (%Fuk), algae degradation (%DA) and total carbohydrate concentrations (mg g<sup>-1</sup>) were studied. The results showed that *Cystoseira compressa* is a good source of fucoidan. Minimum degradation of algae was obtained at 60 °C and 5 min and it increased with temperature rise. The yield of fucoidan was at maximum on temperature of 100 °C and time of 5 minutes. The highest carbohydrate yield of 18,28 mg g<sup>-1</sup> was achieved at 100 °C for 20 minutes.

**Keywords:** microwave, fucoidan, extraction, polysaccharides, algae

**Thesis contains:** 48 pages, 5 figures, 6 tables, 97 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:** *doc.dr.sc. Zoran Zorić*

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

**Reviewers:**

1. Doc.dr.sc. Sandra Pedisić
2. Doc.dr.sc. Zoran Zorić
3. Izv.prof.dr.sc. Sandra Albino
4. Prof.dr.sc. Božidar Šantek

**Thesis defended:** 19 th September 2019.

# SADRŽAJ

1.	UVOD .....	1
2.	TEORIJSKI DIO .....	2
2.1.	ALGE.....	2
2.1.1.	<i>Cystoseira compressa</i> .....	3
2.2.	POLISAHARIDI U ALGAMA.....	5
2.2.1.	Crvene alge - karagenan.....	5
2.2.2.	Zelene alge - ulvan.....	6
2.2.3.	Smeđe alge.....	6
2.3.	EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI .....	8
2.3.1.	Ekstrakcija karagenana.....	9
2.3.2.	Ekstrakcija ulvana.....	9
2.3.3.	Ekstrakcija fukoidana.....	10
2.3.4.	Nove metode za ekstrakciju polisaharida.....	13
2.4.	EKSTRAKCIJA POTPOMOĞNUTA MIKROVALOVIMA .....	14
2.4.1.	Ekstrakcija polisaharida iz algi potpomognuta mikrovalovima.....	15
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1.	MATERIJALI.....	17
3.1.1.	Uzorak smeđe alge <i>Cystoseira compressa</i> .....	17
3.1.2.	Kemikalije.....	17
3.1.3.	Aparatura.....	18
3.1.4.	Pribor.....	18
3.2.	METODE.....	19
3.2.1.	Predtretman.....	19
3.2.2.	Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE).....	19
3.2.3.	Konvencionalna ekstrakcija polisaharida.....	20
3.2.4.	Postupci nakon ekstrakcije.....	20
3.2.5.	Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata.....	23
3.2.6.	Određivanje koncentracije ukupnih fenola.....	24
3.2.7.	Određivanje klorofila a, klorofila b i karotenoida UV/Vis spektrofotometrijom ...	25
3.2.8.	Određivanje udjela suhe tvari.....	26
3.2.9.	Statistička obrada rezultata.....	26
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	27
4.1.	USPOREDBA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE I EKSTRAKCIJE MIKROVALOVIMA.....	29
4.2.	UTJECAJ TEMPERATURE EKSTRAKCIJE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA.....	31



4.2.1.	Utjecaj temperature ekstrakcije na prinos fukoidana (% Fuk).....	31
4.2.2.	Utjecaj temperature ekstrakcije na postotak degradacije alge (% DA).....	32
4.2.3.	Utjecaj temperature ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	32
4.3.	UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA .....	32
4.3.1.	Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos fukoidana (% Fuk) .....	33
4.3.2.	Utjecaj vremena ekstrakcije na postotak degradacije alge (% DA).....	33
4.3.3.	Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata .....	34
4.4.	UTJECAJ KOMBINACIJE VREMENA I TEMPERATURE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA .....	34
4.5.	ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA .....	35
4.5.1.	Koncentracija pigmenata.....	36
4.5.2.	Koncentracija ukupnih fenola .....	36
5.	ZAKLJUČAK .....	39
6.	POPIS LITERATURE .....	40

# 1. UVOD

Uz povećanje svijesti o funkcionalnim sastojcima iz hrane na morske alge se sve više gleda kao na potencijalni izvor bioaktivnih spojeva. Morske alge sadrže velik broj bioaktivnih spojeva među koje se ubrajaju polisaharidi, lipidi, proteini, polifenoli i pigmenti. Alge sintetiziraju velike količine polisaharida koji su poznati po svojoj primjeni u izradi biomaterijala. Stanične stijenke morskih algi bogate su sulfatiranim polisaharidima, uključujući karagenan u crvenim algama, ulvan u zelenim algama i fukoidan u smeđim algama. Navedeni polisaharidi ekstrahiraju se iz algi različitim metodama ekstrakcije, a svoju primjenu nalaze u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Različite studije pokazale su da smeđe alge sadrže biološki aktivne tvari koje pokazuju antikoagulacijsko, protuupalno, antitumorno i antivirusno djelovanje (Synytsya i sur., 2010; Wang i sur., 2010a). Takva svojstva dolaze od sulfatiranog polisaharida fukoidana koji se nalazi u staničnoj stijenci smeđih algi (Berteau i Mulloy, 2003). Fukoidan se najčešće iz smeđih algi ekstrahira konvencionalnim metodama koje uključuju predtretman alge zbog uklanjanja nečistoća, ekstrakciju fukoidana s otapalima poput vruće vode, razrijeđene kiseline ili lužine, izolaciju i pročišćavanje fukoidana frakcijskim taloženjem etanolom, olovnim solima, kalcijevim solima, kvarternim amonijevim solima i konačno sušenje zamrzavanjem ekstrakta fukoidana. Neki od nedostataka konvencionalnih metoda su dugo vrijeme ekstrakcije i korištenje velikog volumena otapala. Danas su razvijene brojne nove metode ekstrakcije s naglaskom na povećanje brzine i učinkovitosti ekstrakcije, a neke od najpoznatijih su upotreba enzima, ultrazvuka i mikrovalova. Ove metode pokazuju učinkovitost izolacije bioaktivnih tvari iz algi uz korištenje manje količine otapala, kraće vrijeme ekstrakcije te uz manji utrošak energije.

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj vremena ekstrakcije i temperature ekstrakcije na prinos fukoidana (% Fuk), postotak degradacije alge (% DA) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u uzorku smeđe alge *Cystoseira compressa*, te utvrditi optimalne parametre ekstrakcije pri kojima se dobivaju najveći prinosi. Konvencionalna ekstrakcija će se provesti uz kontinuirano miješanje otapala ( $0.2\text{M H}_2\text{SO}_4$ ) i uzorka magnetskom miješalicom pri temperaturi od  $60\text{ }^\circ\text{C}$  i vremenu od 4 h. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima provest će se pri temperaturama od  $40, 60, 80$  i  $100\text{ }^\circ\text{C}$  te vremenu od 5, 10 i 20 min. Određene su i količine pigmenta (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) i fenola u filtratu iz postupka predtretmana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ALGE

Alge su raznolika skupina vodenih organizama koji imaju sposobnost provođenja fotosinteze. Izraz "alge" obuhvaća mnogo različitih organizama koji su sposobni stvarati kisik fotosintezom. Ti organizmi nisu nužno usko povezani. Međutim, neke ih značajke spajaju, razlikujući ih od druge velike skupine fotosintetskih organizama: kopnenih biljaka (Vidyasagar, 2016). Svojom veličinom mogu varirati između nekoliko mikrometara u promjeru kao što je slučaj kod jednostaničnih algi, pa sve do preko 30 metara dugih kelpova. Morske alge mogu se razvrstati u tri glavne skupine na temelju izraženih fotosintetskih pigmenta: smeđe, crvene i zelene (Adl i sur., 2005).

1. Smeđe alge ili morska trava (Phaeophyta) - dužine do 60 m, rastu oko 20 cm dnevno. Smeđe morske alge obično su velike i kreću se od divovskih kelpova često duljine i 20 m, debelih morskih trava duljine 2–4 m, do manjih vrsta duljine 30–60 cm. Najpoznatiji predstavnici su: Diktiota (lat. *Dyctiota dichotoma*), Padina (lat. *Padina pavonica*), Jadranski bračić (lat. *Fucus virsoides*), Cistozira (lat. *Cystoseira*). Većina smeđih morskih algi sadrži pigment fukoksantin, koji je odgovoran za izrazitu zelenkasto-smeđu boju po kojoj su dobile ime. Smeđe morske alge također proizvode niz aktivnih komponenti, uključujući jedinstvene sekundarne metabolite kao što su florotanini i mnogi od njih imaju specifične biološke aktivnosti koje daju mogućnosti za njihovo ekonomsko iskorištavanje (McHugh i sur., 2003).
2. Crvene alge (Rhodophyta) - često žive u dubokim oceanima gdje nema ostalih algi. Proizvode agar koji se koristi u mikrobiološkim hranjivim podlogama. Crvene morske alge su obično manje, kreću se od nekoliko centimetara do oko metra duljine. Zanimljivo je da crvene morske alge nisu uvijek crvene, ponekad su ljubičaste, čak smeđe-crvene, ali ipak se klasificiraju kao Rhodophyceae zbog drugih karakteristika (El Gamal, 2010).
3. Zelene alge (Chlorophyta) - prethodnici su današnjih biljaka, produciraju slobodni kisik, imaju klorofil, pohranjuju škrob, u staničnim stijenkama sadrže celulozu. Zelene morske trave su također male, s rasponom veličine sličnim crvenim morskim algama (El Gamal, 2010).

Od ostalih vrsta značajne su :

- Kremene alge (Chrysophyta ili dijatomeje) - su zlatnosmeđe i žutozelene alge. Produciraju kisik te mogu proizvoditi vitamine A i D. Odgovorne su za najveću količinu nafte na

Zemlji. Dijatomejska zemlja koristi se za filtriranje.

- Euglenoidi (Euglenophyta) - zeleni bičaš (Euglen)
- Dinoflagelati (Pyrrophyta) - uzrokuju paralizu nakon hranjenja školjkašima. Cvjetanje dinoflagelata naziva se «crvena plima». Cvjetanje algi indikator je onečišćenja (kontaminacije). Alge cvjetaju u okolišu koji ima visoki sadržaj organske tvari pri čemu se jako smanjuje razina kisika koji je otopljen u vodi.

Kao najraznolikija skupina živih bića na Zemlji, s oko 40 000 vrsta, alge se široko upotrebljavaju u industriji. Zbog svoje velike raznolikosti mogu naseljavati i različite tipove staništa, te ih tako nalazimo većinom u vodi i vlažnim staništima, ali i na zemlji, snijegu, kamenu, drveću i u zraku te u različitim, ponekad i ekstremnim, ekološkim uvjetima. Uzgoj mikrofitskih i makrofitskih algi i cijanobakterija je jeftin i brz proces, a dobit od njih je neusporediva u odnosu na dobiti od ostalih skupina organizama i njihovih derivata. Alge predstavljaju obnovljiv izvor energije, a primarnom produkcijom godišnje proizvedu oko 52 milijarde tona organskog ugljika (Cribb, 1954). Zbog mogućnosti uzgoja u vodi i na kopnu, i to na mjestima neodgovarajućim za uzgoj kultiviranih biljaka, često se koriste u proizvodnji goriva. Kao hrana, alge su popularne u Europi i Aziji, a poznato je da predstavljaju idealan oblik prehrane zbog savršenih omjera hranjivih tvari. Skladištenjem velikih količina lipida, proteina i ugljikohidrata korisne su u proizvodnji mnogih prehrambenih i neprehrambenih artikala. Osim što se same mogu koristiti kao hrana ili dodatak prehrani, u biofertilizaciji se alge koriste kao bogat izvor dušika, fosfora, kalija, joda, željeza, kalcija, silicija te raznih minerala i vitamina (Venkatesan i sur., 2016).

#### 2.1.1. *Cystoseira compressa*

Rod *Cystoseira* uključuje otprilike 294 vrsta i jedan je od najreprezentativnijih u obitelji Sargassaceae (sastavljena nedavnim spajanjem dvije bivše obitelji Sargassaceae i Cystoseiraceae). Alge tog roda rasprostranjene su po cijelome svijetu s oko 80 % vrsta koje se javljaju duž Sredozemlja i susjedne Atlantske obale. Kemijski sastav roda *Cystoseira*, posebno mediteranskih vrsta, intenzivno se proučavao uglavnom do 1995. Važnost vrsta *Cystoseira*, zbog njihove prehrambene vrijednosti i njihove farmakološke primjene dovele su do pojave opsežnog broja publikacija (Gouveia i sur., 2013).



**Slika 1.** *Cystoseira compressa* alga (Razred: Phaepohyta; Red: Fucales; Rod: *Cystoseira*)  
(blue-ecosystems.com, pristupljeno 25. Kolovoza 2019)

*Cystoseira* znači "lanac vezikula" dok se *compressa* odnosi na spljoštene oblik grana. *Cystoseira compressa* (Slika 1.) je smeđa grmolika alga, koja se sastoji od jedinstvene (kompaktne) jedinice iz koje proizlazi nekoliko kratkih grana. Alga ima dva oblika grana od kojih su neke neke spljoštene, koje vrsti daju ime, a neke su više cilindrične. Flotacijski vezikuli su unutar bočnih grana. Većina pronađenih algi je duljine od 15-30 cm, ali mogu se naći i veće. *Cystoseira compressa* dolazi u nijansama svijetlosmeđe i krem boje, ponekad je jednolike boje, a ponekad je pjegava. Kad se osuši, dobiva tamniju nijansu. *Cystoseira compressa* se može naći na mjestima koja nisu izložena zraku i gdje struja nije jaka. Raste na kamenitim i pješčanim podlogama u plitkim bazenima. *Cystoseira compressa* je višegodišnja vrsta, uobičajena za našu obalu gdje raste tijekom cijele godine, iako se u nekim sezonama grane razgrađuju i dolazi do smanjenja populacije.

Ekstrakti i podfrakcije *C. compressa* korišteni su za ispitivanje *in vivo* protuupalnog i *in vitro* antiproliferativnog učinka na tri ljudske stanice karcinoma (Gouveia i sur., 2013). Rezultati su pokazali da protuupalno djelovanje frakcija s kloroformom i etil acetatom ovisi o korištenoj dozi. Obje su aktivnosti bile povezane sa sadržajem fenolnih spojeva alge. Isti su autori također otkrili da ekstrakt *C. sedoides* pokazuje najveću antioksidativnu aktivnost i važna antiproliferativna svojstva prema proučavanim stanicama raka.

Ekološki zahtjevi rezultiraju proizvodnjom bioaktivnih tvari iz algi koje mogu postati potencijalno korisne ljudima, na primjer kao izvor ekoloških pesticida, agrokemijskih spojeva i lijekova. Posljedično dolazi do upotrebe prirodnih proizvoda od morskih algi u proizvodnji novih farmaceutskih proizvoda. Ipak razumijevanje kemijskih sastojaka makroalgi važno je ne samo za otkriće novih terapijskih supstanci, nego i za one koji su zainteresirani za znanstvene osnove

tradicionalne medicine (Gouveia i sur., 2013).

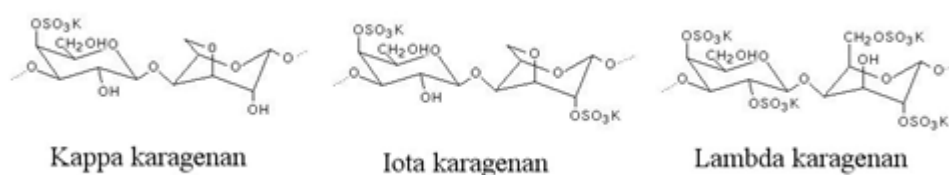
## 2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA

Polisaharidi su ugljikohidrati veće molekularne mase i složenije građe, koji se sastoje od velikog broja monosaharida tj. jednostavnih šećera, međusobno povezanih glikozidnom vezom. Posebni enzimi povezuju male monomere zajedno, stvarajući velike polimere šećera, ili polisaharide koji se nazivaju i glikani. Polisaharidi mogu biti u obliku homopolisaharida, u kojima su svi monosaharidi isti, ili heteropolisaharida u kojima su monomerne jedinice različite. Ovisno o tome koji su monosaharidi povezani, i koji ih ugljik u monosaharidima povezuje, polisaharidi poprimaju različite oblike. Molekula s ravnim lancem monosaharida naziva se linearni polisaharid, dok je lanac koji ima razgranati lanac poznat kao razgranati polisaharid (BeMiller, 2019).

Morske alge vrijedan su izvor strukturno raznolikih bioaktivnih spojeva. Stanične stijenke morskih algi bogate su sulfatiranim polisaharidima, uključujući karagenan u crvenim algama, ulvan u zelenim algama te fukoidan i laminarin u smeđim algama.

### 2.2.1. Crvene alge - karagenan

Karagenan je opće ime za obitelj galaktana, najčešćih i najobilnijih sastojaka staničnih stjenki koji se nalaze u crvenim algama. Struktura okosnice ovog polisaharida temelji se na linearnim lancima ponavljajućih galaktoznih jedinica u D konfiguraciji (D-šećer) i 3,6-anhidro-galaktozni kopolimer, spojenih naizmjeničnim  $\alpha$ -(1→3) i  $\beta$ -(1→4) vezama. Crvene morske alge proizvode ekstrakte koji čine veliku obitelj hidrokoloida, uključujući agar, furcelaran i tri vrste karagenana - Kappa, Iota i Lambda (Slika 2.) (Cunha i sur., 2016).



**Slika 2.** Struktura Kappa, Iota i Lambda karagenana (Simon, pristupljeno 2. Rujna 2019.)

Svima im je okosnica galaktoza, ali se razlikuju po položaju i količini ester sulfatnih skupina i anhidro-galaktoza, što rezultira time da su gelovi agara vrlo krhki, Kappa i Iota karagenani manje, dok Lambda karagenani ne tvore gel (Cunha i sur., 2016). Karagenani ekstrahirani iz crvenih morskih algi ne asimiliraju se u ljudsko tijelo, te doprinose samo masi, a ne sadrže hranjive tvari. S prehrambenog aspekta, karagenani su klasificirani kao topljiva vlakna.

Ipak, karagenani pružaju izvanredna funkcionalna svojstva, koja se mogu koristiti za kontrolu vlage i teksture te za stabilizaciju raznih prehrambenih proizvoda. Kao što je već spomenuto karagenani imaju nekoliko primjena u hrani i unutar podskupina ovog prirodnog hidrokoloida se može razviti vrlo širok raspon tekstura koristeći se njihovim različitim svojstvima i koristeći sinergizam s nekim drugim hidrokoloidima kao i s mliječnim proteinima. Kappa karagenan formira gel u prisutnosti kalijevih iona, te se to svojstvo uvelike iskorištava u industriji mesa, u desertnom gelu i glazurama za kolače.

### 2.2.2. Zelene alge - ulvan

Zelene morske alge rasprostranjene su širom svijeta i smatraju se važnim izvorom hrane. *Ulva* spp. (uobičajeno poznata kao morska salata) je bogat prirodni izvor ugljikohidrata (polisaharid ulvan), vitamina, esencijalnih aminokiselina, minerala i prehrambenih vlakana. Brading i sur., (1954) i Percival i sur., (1964) ustanovili su da su sulfat, ksiloza, ramnoza i glukuronska kiselina glavni dijelovi ulvana. Ramnozni ostaci se sulfatiraju uglavnom na položaju C-3 ili na oba položaja C-2 i C-3. U nekim ekstraktima ulvana mogu se pojaviti ostaci ksiloze ili sulfatirane ksiloze na oba položaja C-2 i C-3 umjesto uronskih kiselina. Ulvanu se trenutno pridaje velika pažnja zahvaljujući njegovim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima i potencijalnoj primjeni u poljoprivredi i farmaceutskoj industriji. Svojstva ulvana ovise o kemijskom sastavu, gustoći električnog naboja i molekularnoj težini ulvana što je uobičajeno i za ostale polisaharide. Nadalje, kao što je primijećeno i kod drugih vrsta morskih algi, prinos i specifičan sastav polisaharida iz zelenih algi ovisi o okolišnim čimbenicima, kao što su vrste algi, godišnjem dobu u kojem se alge sakupljaju te korištenoj metodi ekstrakcije. (Alves i sur., 2013).

Ulvan pokazuje antioksidativno djelovanje koje uvelike ovisi o njegovoj molekularnoj težini, budući da ulvan s niskom molekularnom težinom pokazuje jače antioksidacijsko djelovanje u odnosu na veće frakcije. U literaturi se navodi da smanjuje ukupni serumski kolesterol, trigliceride i LDL kolesterol, dok povisuje razinu HDL kolesterola (Qia i sur., 2012). Proučavano je njegovo antivirusno djelovanje *in vitro* protiv virusa gripe. Ivanova i sur., (1994) navode da ulvan koji su izolirani iz zelene alge ima dobar inhibitorni učinak na virus gripe A, a učinak inhibicije ovisan je o dozi i specifičan za sojeve. Pokazalo se da ulvan ima visoku i specifičnu aktivnost protiv herpesa simplex virusa (Cunha i sur., 2016).

### 2.2.3. Smeđe alge

Značajne količine polisaharida iz smeđih algi koriste se u prehrani, farmaceutskoj industriji

i drugim proizvodima za ljudsku konzumaciju (Renn, 1997). U posljednjem desetljeću bioaktivni sulfatirani polisaharidi iz smeđih morskih algi privukli su puno pažnje u području farmakologije i biokemije. Fukoidan je prisutan samo u smeđim morskim algama (Lim i sur., 2014; Usov i sur., 2001). Osim fukoidana, smeđe morske alge sadrže i dva druga polisaharida laminaran i alginat. Ovi polisaharidi nalaze se u staničnoj stijenci smeđih algi, a na njihov sastav kao i na njihova fizikalno-kemijska svojstva utječu vrsta i starost alge, godišnja doba, te geografski položaj (Rioux i sur., 2007; Zvyagintseva i sur., 2003). Sva tri polisaharida imaju jedinstvena fizikalno kemijska svojstva koja su bitna za proces njihovog izlučivanja iz stanica algi.

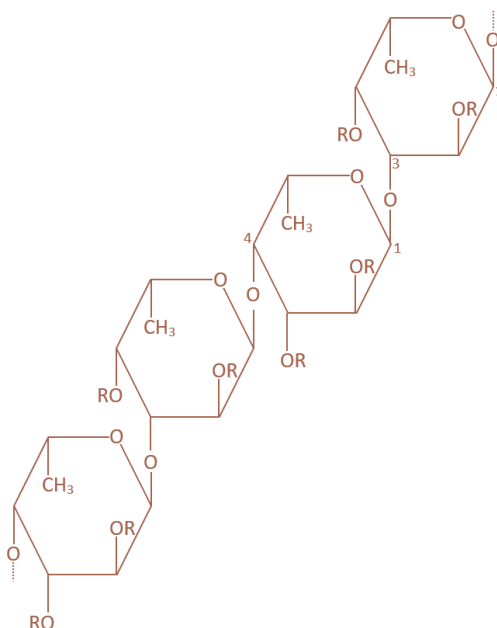
#### 2.2.3.1. *Laminarin i alginat*

Laminarin također poznat kao laminaran ili leukozin, prvi je izolirao Schmiedeberg 1885. godine iz *Laminariaceae*. To je je polisaharid sastavljen od 20-25 jedinica glukoze s tragovima manitola, relativno niske molekularne mase od približno 5 kDa te služi kao rezerva hrane u smeđim algama. Objavljeno je da laminarin pokazuje antibakterijske, antitumorske i prebiotičke aktivnosti (Gupta i Abu-Ghannam, 2011; Rioux i sur., 2009). S druge strane, alginat je linearni polisaharid sastavljen od  $\beta$ -D-manuronske kiseline i  $\alpha$ -L-guronske kiseline. Ova dva monomera spojena su u konfiguraciji 1 $\rightarrow$ 4 i nepravilno raspoređeni. Molekularna masa alginata iznosi uglavnom između 500 i 1000 kDa. Zanimljivo svojstvo alginata je to da je u vodi u kalcijevom obliku netopljiv, a u natrijevom obliku je topljiv.

#### 2.2.3.2. *Fukoidan*

Fukoidan je pojam koji se koristi za sulfatirane, fukozom bogate polisaharide koji se nalaze u fibrilarnom tkivu stanične stijenske i međustaničnom prostoru smeđih algi. To je sulfatirani polisaharid koji se sastoji uglavnom od fukoza povezanih  $\alpha$ -(1,3) vezama ili naizmjeničnim  $\alpha$ -(1,3) i  $\alpha$ -(1,4) vezama, a jako rijetko  $\alpha$ -(1,2) vezama. Sadrži i druge monosaharide, uključujući galaktozu, glukozu, manozu, ksilozu, ramnozu i uronske kiseline (Lim i sur., 2016; Zvyagintseva i sur., 2003). Fukoidan, ovisno o vrsti alge čini otprilike 5 % do 10 % suhe tvari alge. Ima veliki raspon molekulske mase, od 7 kDa (Zvyagintseva i sur., 2003), do čak 2379 kDa (Rioux i sur., 2009). Dok sadržaj sulfata varira između 5 % (Lim i sur., 2016) i 38 % (Bilan i sur., 2004). Razna istraživanja utvrdila su različite biološki važne aktivnosti fukoidana, uključujući antioksidacijsku, antibakterijsku, antivirusnu, antitumorsku, antikoagulacijsku i protuupalnu aktivnost (Ale i sur., 2011; Li i sur., 2008; Lim i sur., 2014) kao i specifične aktivnosti protiv bolesti bubrega, jetre i mokraćnog sustava.





**Slika 3.** Shematski prikaz molekule fukoidana s naizmjeničnim  $\alpha$ -(1→3) i  $\alpha$ -(1→4) glikozidnim vezama (prema Lim i Wan Aida, 2017)

Različiti profili monosaharida fukoidana mogu se dobiti iz različitih vrsta smeđih morskih algi. U svim tim fukoidanima iz različitih vrsta smeđih algi, glavni monosaharid je fukoza i sastav monosaharida varira ovisno o vrstama algi i godišnjim dobima. Pored toga, glavna karakteristika fukoidana je da sadrži sulfat estersku skupinu (Bilan i sur., 2010; Li i sur., 2008; Lim i sur., 2016). Sulfatne grupe se mogu smjestiti u ekvatorijalnoj ravnini, na C2 i/ili C3 položajima, i/ili u aksijalnoj ravnini, to jest položaju C4 fukoze (Ale i sur., 2011). Sulfatne skupine u fukoidanu igraju važnu ulogu u njegovim biološkim aktivnostima te je ustanovljeno da se povećanjem udjela sulfatnih skupina u fukoidanu povećava i njegova antikoagulacijska (Chevolot i sur., 1999) i antioksidativna aktivnost (Wang i sur., 2010a). Wang i sur. (2010a) objasnili su da sulfatne skupine djeluju na način da privlače elektrone u polisaharidu i na taj način se povećava antioksidacijska aktivnost fukoidana i njegov učinak čišćenja slobodnih radikala.

### 2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI

Ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Ekstrakcija tvari iz homogenih smjesa provodi se na osnovi njihove različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Pri čemu se dobije tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu otpariti ili kristalizirati (Lianfu i Zelong, 2008). Za ekstrakciju se koriste različite konvencionalne metode kao što su destilacija, ekstrakcija otapalima, hladno prešanje, kao i nekonvencionalne tehnike: ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija s električnom

energijom, ekstrakcija mikrovalovima i ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom. Općenito za ekstrakciju vrijedi sljedeće: Kod ekstrakcije čvrstih tvari treba povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama (usitnjavanjem), u sredini treba povećati brzinu gibanja faza, a za povećanje količine tvari treba produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

Polisaharidi smeđih algi općenito se ekstrahiraju vrućom vodom, što je popularna i prikladna metoda te se može koristiti za lako izvlačenje polisaharida iz algi, ali nedostaci ove metode su u tome što je dugotrajna, potrebne su visoke temperature i ima malu učinkovitost ekstrakcije. Prema Wang i sur., (2010b) nedostaci konvencionalne ekstrakcije su, osim visoke temperature ekstrakcije, dugo vrijeme ekstrakcije kao i veliku potrošnja otapala i energije.

### 2.3.1. Ekstrakcija karagenana

Proizvodnja karagenana sastoji se od ekstrakcije, pročišćavanja, koncentriranja, taloženja i sušenja, iako se osnovni postupak može razlikovati ovisno o obitelji crvenih algi iz koje se ekstrahira polisaharid. Postoje dvije glavne metode proizvodnje karagenana temeljene na različitim principima. Ukratko, u prvoj i originalnoj metodi karagenan se ekstrahira iz morskih algi u vodenoj otopini. Nakon filtriranja uklanjaju se preostali ostaci, i dodatkom alkohola se ubrzava proces taloženja. Na kraju se talog odvoji, osuši i melje, što rezultira pročišćenim karagenanom. U drugoj metodi, karagenan se zapravo ne ekstrahira iz morskih algi već se umjesto toga isperu zaostali minerali, topljive bjelančevine i masnoće iz morskih algi, ostavljajući za sobom karagenan i ostale netopive tvari. Ovaj netopljivi ostatak, koji se uglavnom sastoji od karagenana i celuloze, tada se suši i prodaje kao polu-rafinirani karagenan, koji nije za prehranu. Iako je postupak mnogo kraći i jeftiniji od prvog, čistoća karagenana je manja (McHugh, 2003.; Stanley, 1987).

### 2.3.2. Ekstrakcija ulvana

Ekstrakcija ulvana uglavnom se provodi vrućom vodom i može biti daljnje poboljšana prisutnošću kalcijevih kelatnih sredstava (Hernández-Garibay i sur., 2011), te kiselih ili alkalnih otopina. Pročišćavanje polimera u svrhu uklanjanja pigmenta, lipida, aminokiselina i peptida, provodi se različitim procedurama koristeći organska otapala (Siddhanta i sur., 2001). Općenito, polisaharidi poboljšane čistoće dobivaju se taloženjem organskim otapalima, često etanolom. Vodeni ekstrakt ulvana može se koncentrirati u rotacijskom isparivaču, sušenjem smrzavanjem ili sušenjem vrućim zrakom. Uklanjanje nečistoća, kao i sušenje ekstrakta ulvana, može pogodovati modifikaciji konformacije i svojstava polisaharida. Istraživanja o utjecaju vremena i temperature

na degradaciju ulvana, pokazala su da je temperatura bila glavni faktor koji je utjecao na brzinu depolimerizacije (Cunha i sur., 2016). Osim toga, upotreba različitih otapala za ekstrakciju ulvana rezultirati će ekstraktima različitog sastava i, prema tome, različitim biološkim i fizikalno-kemijskim svojstvima tih ekstrakata (Cunha i sur., 2016).

### 2.3.3. Ekstrakcija fukoidana

Fukoidan je prvi put ekstrahirao i okarakterizirao švedski botaničar Kylin, 1913. godine, iz raznih vrsta algi *Laminaria* i *Fucus*. Sulfatirani polisaharid kojeg je Kylin nazvao "fukoidan", ekstrahiran je razrijeđenom octenom kiselinom i naznačio je da "sadrži fukožu koja se pojavljuje zajedno s manitolom, alginatom i laminarinom" (Ale i sur., 2011). Od tada pa sve do 1952. godine, razvile su se različite tehnike ekstrakcije fukoidana. Većina ekstrakcija koje su tada obavljali znanstvenici bile su u blagim kiselim stanjima i pri visokim temperaturama. Zanimljivo je primijetiti da su Hoagland i Lieb (1915) koristili natrijev karbonat za prethodnu obradu morske trave *Macrocystis pyrifera*, prije ekstrakcije klorovodičnom kiselinom, a za ekstrakt je utvrđeno da se uglavnom sastoji od alginske kiseline i nekih fukoza-sulfata.

Tijekom godina, s poboljšanim razumijevanjem strukture i karakteristika fukoidana i ostalih komponenata u smeđim morskim algama, poboljšane su metode ekstrakcije fukoidana. Glavna ideja u postupcima ekstrakcije je izoliranje fukoidana od drugih komponenti u uzorcima morskih algi. Istraživači nastoje smanjiti koekstrakciju ostalih spojeva iz smeđih morskih algi, poput alginata, mijenjajući prirodne karakteristike fukoidana i drugih spojeva u uzorku. U slučaju koekstrakcije, nekoliko se postupaka može primijeniti za izolaciju fukoidana, čime se povećava čistoća ekstrahiranog fukoidana.

Izolacija i pročišćavanje fukoidana iz morskih algi obično uključuju sljedeće korake: sakupljanje, pranje, sušenje i mljevenje sirovine; prethodno obrađivanje algi; ekstrakcija fukoidana s agensima za ekstrakciju poput vruće vode, razrijeđene kiseline ili lužine; izolacija i pročišćavanje fukoidana frakcijskim taloženjem etanolom, olovnim solima, kalcijevim solima, kvarternim amonijevim solima i konačno sušenje zamrzavanjem ekstrakta fukoidana. Neke metode ekstrakcije mogu promijeniti prirodnu strukturu, a samim time i bioaktivnost i fizikalno-kemijska svojstva fukoidana.

#### 2.3.3.1. Predtretman

Lim i sur., (2016) uspostavili su postupak predtretmana za uklanjanje nečistoća prije potpune ekstrakcije. Prethodno su obradili svoje uzorke morskih algi s MeOH: CHCl<sub>3</sub>: H<sub>2</sub>O (4:2:1)

na sobnoj temperaturi kako bi uklonili lipide, pigmente i komponente niske molekularne mase iz uzorka morske alge. Koristili su mješavinu otapala s različitom polarnošću kako bi uklonili nečistoće različite polarnosti iz svojih uzoraka morskih algi. Na primjer, lipidi se ekstrahiraju u otapalima niske polarnosti, kao što je kloroform, pigmenti u polu-polarnom otapalu, poput metanola, a druge jako polarne komponente, kao što su monosaharidi, proteini i minerali ekstrahiraju se u vodi. U postupku nisu koristili visoke temperature da nebi došlo do prerane ekstrakcije fukoidana koji je topiv u vodi. S druge strane, Ponce i sur. (2003) izveli su postupak predtretmana upotrebom 80 % -tnog etanola na 70 °C tijekom 24 sata. Korištena je viša temperatura kako bi se postupak ubrzao. Budući da se kao otapalo koristio 80% -tni etanol, upotreba veće temperature je prihvatljiva. Ukoliko i dođe do ekstrakcije fukoidana on će se istaložiti, jer kao i bilo koji drugi polisaharid nije topiv u etanolu. Kad se otapalo odfiltrira, uklanjaju se samo nečistoće (pigmenti, lipidi) ali ne i istaloženi fukoidan. Upotrebom mehaničkog miješanja (magnetska miješalica, tresilica inkubatora itd.) povećava se učinkovitost predtretmana, jer dolazi do bolje interakcije između uzoraka čvrstih morskih algi i otapala, povećavajući na taj način brzinu izdvajanja nečistoća. Prethodno obrađeni uzorci morskih algi suše se prije ekstrakcije fukoidana, gdje se mogu primijeniti brojne metode, uključujući sušenje u peći i vakuum sušenje u pećnici ili sušenje zamrzavanjem (Lim i sur., 2016).

#### 2.3.3.2. *Ekstrakcija*

Cilj ovog postupka je ekstrahirati fukoidan iz staničnih stijenki morskih algi u tekući medij, opisan kao ekstrakt fukoidana, nakon što se uklone kruti ostaci. Prethodno obrađeni uzorci morskih algi podvrgnuti su različitim tehnikama ekstrakcije. Postupci ekstrakcije mogu biti namijenjeni za selektivno izdvajanje samo fukoidana, ali ne i alginata, ili za ekstrakciju fukoidana i alginata zajedno, nakon čega slijede daljnji koraci uklanjanja alginata iz fukoidana (Lim i Wan Aida, 2017).

Za ekstrakciju se može koristiti otopina  $\text{CaCl}_2$ , a mehaničko miješanje i visoka temperatura (70–85 °C) koriste se radi povećanja brzine ekstrakcije i otapanja fukoidana. Paralelno s tim, alginat je polisaharid također topiv u vodi te se koekstrahira. U prisutnosti  $\text{CaCl}_2$  alginat se pretvara u kalcijev alginat koji nije topiv u vodi te dolazi do njegovog taloženja (McHugh, 1987). Ovom metodom se fukoidan selektivno ekstrahira iz uzorka morske alge. Nakon uklanjanja krutih ostataka iz ekstrakta dobiva se relativno čist fukoidan. Daljnji postupci izolacije provode se kada postoji potreba za daljnjim povećanjem čistoće fukoidana.

Osim otopine  $\text{CaCl}_2$ , za ekstrakciju se koriste i otopine kiselina. Obično se koristi klorovodična ili sumporna kiselina, s pH ekstrakcijskog otapala u rasponu od 1 do 3, pri visokoj

temperaturi od 80-100 °C uz mehaničko miješanje. Upotreba kiselina u ekstrakciji omogućava hidrolizu staničnih stijenki alge, olakšavajući tako ekstrakciju fukoidana. Istovremeno, kiselina će pretvoriti alginat u smeđoj morskoj algi u alginsku kiselinu, koja je netopljiva u vodi (McHugh, 1987). Alginska kiselina odbacuje se zajedno s čvrstim ostacima morske alge, ostavljajući za sobom relativno čist fukoidan u ekstraktu (Lim i Wan Aida, 2017).

Druga metoda koja se koristi je metoda ekstrakcije s vodom, koju su proveli Duarte i sur. (2001), Li i sur. (2006) i Maruyama i Yamamoto (1984). Visoke temperature (70-100 °C) s mehaničkim miješanjem koriste se za ekstrakciju polisaharida (fukoidan, alginat i laminarin) iz smeđih morskih algi. Ova metoda nije selektivna jer se ekstrahiraju sve vrste polisaharida i drugih sastojaka topivih u vodi u morskim algama. Takav ekstrakt je niske čistoće te je potrebno provesti više koraka izolacije. Bez obzira na tip korištenog otapala, sve ove metode obično zahtijevaju toplinsku obradu, mehaničko miješanje i produljeno vrijeme ekstrakcije (Lim i sur. 2016).

#### 2.3.3.3. *Pročišćavanje fukoidana*

Postupak izolacije može se provesti ili taloženjem fukoidana (pri čemu u supernatantu zaostaju neutralni polisaharidi) ili taloženjem alginata (ostavljanjem fukoidana u supernatantu) nakon čega se druge nečistoće uklanjaju dijalizom (Lim i Wan Aida, 2017). Lim i sur. (2016) i Cumashi i sur. (2007) koristili su katione deterdženta heksadeciltrimetilamonijev bromid („Cetavlon“) za taloženje fukoidana u ekstraktu. Ideja proizlazi iz činjenice da je fukoidan sulfatirani polisaharid zbog čega je negativno nabijen (polianion). Stoga će kationski deterdženti tvoriti soli s fukoidanom, koje su netopljive u vodi i talože se. Ostali prisutni spojevi, poput alginata i laminarina, su neutralni polisaharidi, stoga ne reagiraju s kationskim deterdžentima i ostaju otopljeni u vodi (Scott, 1965).

Nagaoka i sur. (1999) i Hemmingson i sur. (2006) za izolaciju fukoidana iz ekstrakta dobivenog ekstrakcijom pomoću kiseline koristili su NaOH kako bi neutralizirali ekstrakt. Neutralizacijom nastaju soli koje se zatim moraju ukloniti. Ultrafiltraciju i dijalizu proveli su u oba istraživanja, kako bi uklonili sol i druge nečistoće. Nagaoka i sur. (1999) proveli su dodatne korake za izolaciju fukoidana, gdje su koristili CaCl<sub>2</sub> i etanol za taloženje fukoidana, zatim su ponovili dijalizu kako bi postigli veću čistoću.

Nekim drugim istraživačima, kao što su Duarte i sur. (2001) i Li i sur. (2006), koji su ekstrakt fukoidana dobili ekstrakcijom vrućom vodom, bili su neophodni dodatni koraci za izolaciju fukoidana. U njihovom istraživanju, ekstrakti fukoidana pomiješani su etanolom kako bi

dobili 75%-tnu otopinu etanola u kojoj će se polisaharidi istaložiti. Centrifugiranje omogućava uklanjanje supernatanta, koji sadrži ostale ne polisaharidne nečistoće, ostavljajući istaložene polisaharide. Talog je zatim otopljen u vodi i tretiran s  $\text{CaCl}_2$  kako bi se istaložili alginati, koji se mogu ukloniti centrifugiranjem. Izolirani fukoidan u supernatantu prije sušenja prolazi kroz dijalizu kako bi se uklonile ostale nečistoća niske molekularne mase.

#### 2.3.4. Nove metode za ekstrakciju polisaharida

U ovom poglavlju opisani su nedavni postupci i tehnike i alternativne aplikacije koje se mogu koristiti u budućim studijama kako bi se poboljšala kvaliteta i količina ekstrahiranog polisaharida.

##### 2.3.4.1. *Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE)*

Ova metoda zasniva se na zvučnim valovima koji migriraju kroz srednje inducirajuće promjene tlaka. U tom se procesu stvaraju kavitacije koje rastu i propadaju, pretvarajući zvučne valove u mehaničku energiju, koja uzrokuje raspad stanice i stanične stijenke. Metoda je obećavajuća ne samo za ekstrakciju, već i za smanjenje degradacije fukoidana. Jer unos energije kod UAE i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) može premašiti razinu energije koja je potrebna za cijepanje sulfatnih estera, zbog čega se preporučuje da unos potrebne energije bude kontroliran tijekom ekstrakcije kako bi se izbjegle bilo kakve strukturne promjene na sulfatiranom polisaharidu (Vilkhu i sur., 2008). Kadam i sur. (2015) proveli su istraživanje u kojem ispituju učinkovitost ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u usporedbi s konvencionalnim postupcima ekstrakcije laminarina. Izvijestili su da je primjena postupka UAE dala veći prinos laminarina u usporedbi s konvencionalnim postupcima.

##### 2.3.4.2. *Ekstrakcija potpomognuta enzimima*

Enzimi su definirani kao katalizatori koji povećavaju brzinu prevođenja supstrata do produkta u blagim uvjetima. Za izolaciju fukoidana iz morskih trava i algi, enzimi posreduju degradaciji stanične stijenke. Enzimi omogućuju ekstrakciju u umjerenim uvjetima što omogućava očuvanje bioaktivnosti fukoidana (Lim i sur., 2017). Stanična stijenka morske alge je kemijski i strukturno heterogenija nego u ostalim stanicama, zbog čega je za ekstrakciju potrebna primjena dobro definirane enzimske smjese. Ugljikohidrati predstavljaju glavnu komponentu alge, čineći 47% suhe mase alge. Međutim, ove se vrijednosti mogu razlikovati ovisno o sezoni branja, mjestu sakupljanja, kao i ostalim okolišnim utjecajima. Prema Hahn i sur., (2012) za ekstrakciju fukoidana iz *F. vesiculosus*, preporuča se upotreba enzima kao što su alginat liaza, celulaza i laminarinaza.

Tijekom procesa ekstrakcije, oslobađaju se komponente koje imaju antioksidativno djelovanje, poput polifenola, pa su i istraživanja usredotočena na izolaciju takvih spojeva. Važna prednost metode ekstrakcije enzimima je jednostavno odvajanje fukoidana od produkata enzimske obrade upotrebom poprečnog filtriranja ili membrana. Enzimi i sulfatirani polisaharidi se zadržavaju na membrani, dok se manji fragmenti stanične stijenke, koje enzimi mogu inhibirati, uklanjaju tijekom lize stanice.

#### **2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA**

U novije vrijeme razvijeni su procesi potpomognuti mikrovalovima za ekstrakciju i obnavljanje prirodnih komponenti. Za razliku od konvencionalnih procesa potpomognutih grijanjem, očekuje se da mikrovalno zagrijavanje smanjuje vrijeme ekstrakcije i potrošnju energije za ekstrakciju. Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima, koristeći mikrovalove započela je kasnih 70-tih, te je prvo upotrijebljena u prehrambenoj industriji. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu (Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000). Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje (Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000). Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku (Slika 4.) (Kaufmann i Christen, 2002). Sistem mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pri uvjetima niske ili visoke temperature ekstrakcije.

Tijekom konvencionalnog postupka ekstrakcije, toplinsko zračenje se vrši izvana prema unutra, što olakšava ekstrakciju. Kod ekstrakcije mikrovalovima se koristi drugačiji mehanizam prijenosa topline, gdje energiju apsorbiraju polarne molekule. To olakšava unutarnje grijanje i može omogućiti selektivno grijanje prema polaritetu komponenata u sustavu. Tijekom obrade mikrovalovima elektromagnetski valovi se prenose kroz ekstrakcijski medij u unutrašnjost. Polarne molekule, poput vode unutar stanica, apsorbiraju energiju i brzo se zagrijavaju uzrokujući porast tlaka unutar stanice. Tlak unutar stanice brzo premašuje maksimalni tlak koji stanice mogu izdržati, što dovodi do rupture stanice i oslobađanja staničnih spojeva, poput lipida u ekstrakcijskom otapalu (Lim i sur., 2017). Sposobnost neke tvari da apsorbira mikrovalove povezana je s polarnošću, tj. materijal jače polarnosti ima bolji potencijal apsorbiranja energije mikrovalova. Zbog toga, polaritet otapala ima velik utjecaj na učinkovitost ekstrakcije (Bousbia i sur., 2009).



**Slika 4.** Mikrovalni reaktor, Start S Microwave Labstation for Synthesis (Milestone, Italija)  
(foto: Jurić, 2019)

Veličina čestica i raspodjela veličina obično imaju značajan utjecaj na učinkovitost mikrovalne ekstrakcije. Veličine čestica ekstrahiranih tvari su obično u rasponu od 100  $\mu\text{m}$  - 2 mm (Spar Eskilsson i Björklund, 2000). Izbor otapala je u mikrovalnoj ekstrakciji jako važan i ovisi o topljivosti željenog ekstrakta, o interakciji između otapala i matriksa te o svojstvima otapala određenim dielektričnom konstantom, da upijaju mikrovalove. Obično, izabrano otapalo treba posjedovati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Otapala poput etanola, metanola i vode dovoljno su polarna da bi se mogli zagrijati mikrovalnom energijom (Font, 1998; Brachet i sur., 2002). Temperatura je još jedan važan faktor za mikrovalnu ekstrakciju tako da, povišenje temperature rezultira boljim ekstrakcijskim učinkom. Međutim, za ekstrakciju termolabilnih spojeva, visoke temperature mogu uzrokovati razgradnju ekstrakata.

#### 2.4.1. Ekstrakcija polisaharida iz algi potpomognuta mikrovalovima

Istraživanja su pokazala da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima obećavajuća metoda za ekstrakciju aktivnih komponenti iz prirodnih resursa, uključujući i morske alge (Vazquez-Delfin i sur., 2014; Bagherian i sur., 2011; Pan i sur., 2003; Shu i sur., 2003;). Međutim, nedovoljno je informacija o ekstrakciji fukoidana pomoću mikrovalova. Jedno od istraživanja (Rodriguez-Jasso i sur., 2011) gdje su ekstrahirali fukoidan pomoću mikrovalova je pokazalo da je MAE učinkovita metoda za ekstrakciju fukoidana visokog prinosa (18,22 %) iz *F. vesiculosus*,



ali ključna svojstva kao što su molekulska masa i biološke aktivnosti nisu proučavane. Yuan i Macquarrie (2015a) u svom istraživanju dokazuju da fukoidan može biti uspješno ekstrahiran iz *Ascophyllum nodosum* djelovanjem mikrovalova te da je proces puno brži usporedno s konvencionalnom ekstrakcijom. Karakterizacija fukoidana pokazala je da ima sličnu strukturu i molekularnu masu kao i fukoidan dobiven konvencionalnom ekstrakcijom. Antioksidativni testovi pokazuju da ima jače antioksidativno djelovanje nego fukoidan dobiven konvencionalnim putem. Dobiveni rezultati potvrđuju korisnost tehnologije ekstrakcije potpomognute mikrovalovima za uspješnu ekstrakciju fukoidana iz smeđih algi.

Nedostatak tradicionalnih metoda ekstrakcije je dugo vrijeme ekstrakcije, obično u rasponu od sata do dana, što može rezultirati promjenom svojstava materijala. Ekstrakcija mikrovalovima se posebno bavi ovim nedostatkom s očekivanim bržim vremenima ekstrakcije. Dodatne prednosti ekstrakcije potpomognute mikrovalovima su visoka učinkovitost, mala doza otapala, dobra selektivnost ciljnih ekstrakata i niska potrošnja energije. Stoga ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pokazuje izraziti potencijal za industrijsku primjenu (Yang i sur., 2019).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Uzorak smeđe alge *Cystoseira compressa*

Istraživanje je provedeno na uzorku smeđe alge *Cystoseira compressa* koja je izronjena na području Zadarskog arhipelaga (44° 06' 26" geografske širine i 15° 13' 54" geografske dužine) u veljači 2018. godine. Uzorci alge najprije su isprani u slatkoj i destiliranoj vodi te odmah zamrznuti na -60 °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 °C/18 sati, a izotermna desorpcija pri 20 °C/6 sati. Osušena alga je pomoću električnog mlinca (CM 3260, Grundig, Njemačka) samljevena u prah, te je prah pohranjen u staklenu posudu i čuvan u mraku na sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcije.

##### 3.1.2. Kemikalije

- aceton, p.a. (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 96 %-tni etanol (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- apsolutni etanol (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- destilirana voda
- Folin - Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, UK)
- bezvodni kalcijev klorid (1%-tna otopina) (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

- 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

PRIPREMA: 1110 µL koncentrirane 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(CARLO ERBA Reagents, Italija) otpipetira se

u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake.

- fenol (5%-tna otopina)

PRIPREMA: 5 g kristala fenola (ne stabiliziranog, pročišćenog redestilacijom) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) otopi se u 100 mL destilirane vode, u odmjernoj tikvici volumena 100 mL.

### 3.1.3. Aparatura

- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- analitička vaga, ABT 220 – 4M (Kern, Njemačka)
- vortex miješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- magnetna miješalica, RT 5 (IKA, Njemačka)
- mikrovalni reaktor, Start S Microwave Labstation for Synthesis (Milestone, Italija)
- vakuum koncentrador, Savant SPD2010 (ThermoScientific, SAD)
- vodena kupelj, Rotavapor R-205 (Büchi, Švicarska)
- centrifuga, Rotofix 32A (HETTICH, Njemačka)
- liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)

### 3.1.4. Pribor

- plastična žličica
- filter papir
- stakleni lijevak
- Erlenmeyerova tikvica (250 mL)
- odmjerne tikvice (100 mL)
- tikvica s okruglim dnom (50 mL)

- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)
- mikropipete (100  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L i 5000  $\mu$ L)
- stakleni štapić
- staklene kivete
- plastične kivete
- petrijeva zdjelica
- menzure (10 mL)
- magnetni štapići

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Predtretman

Postupku ekstrakcije polisaharida prethodio je postupak predtretmana uzorka alge *Cystoseira compressa*, na način da se izvaže 2 puta po 15 g uzorka u 2 Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL. Nakon toga se izmjeri 2 puta po 200 mL acetona te se prelije preko uzorka. U tikvicu se stavi magnetni štapić, zatvori se vatom i postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 24 h. Nakon 24 h sadržaj tikvice se profiltrira, a na talog se doda 200 mL 80%-tnog etanola. Zatim se stavi magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i ponovo postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 24 h. Nakon 24 h sadržaj tikvice se filtrira i preko taloga se prelije 200 mL zagrijanog (60 °C) 80%-tnog etanola. Stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 4 h. Nakon 4 h sadržaj tikvice se filtrira i talog se stavi na sušenje do konstantne mase.

#### 3.2.2. Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Na analitičkoj vagi odvaži se 1 g predtretiranog uzorka u tikvicu okruglog dna (100 mL). Neposredno prije mjerenja doda se 30 mL 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i magnetni štapić. Tikvica se stavi na postolje u ekstraktoru, spoji na zračno hladilo, na koje se spoji i vodeno hladilo. Na uređaju se postave temperatura i vrijeme ekstrakcije prema planu eksperimenta prikazanom u Tablici 1. Zatim se namjeste i ostali parametri - vrijeme za postizanje temperature ekstrakcije (5 minuta), miješanje (75 %) te ventilacija nakon ekstrakcije (1 minuta).

**Tablica 1.** Uvjeti provođenja MAE polisaharida iz alge *Cystoseira compressa*

<b>UZORAK</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VRIJEME (min)</b>
M1	40	5
M2	40	10
M3	40	20
M4	60	5
M5	60	10
M6	60	20
M7	80	5
M8	80	10
M9	80	20
M10	100	5
M11	100	10
M12	100	20

### 3.2.3. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida

Konvencionalna ekstrakcija provedena je na magnetnoj miješalici RT 5 (IKA, Njemačka) prema parametrima prikazanim u Tablici 2. Na analitičkoj vagi izvažuje se 1 g predtretiranog uzorka smeđe alge *Cystoseira compressa* u Erlenmeyerovu tikvicu. U tikvicu se doda 30 mL zagrijanog (60 °C) 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 4 h.

**Tablica 2.** Uvjeti provođenja konvencionalne ekstrakcije polisaharida iz alge *Cystoseira compressa*

<b>OZNAKA</b>	<b>TEMPERATURA (°C)</b>	<b>VRIJEME (h)</b>
K	60	4

### 3.2.4. Postupci nakon ekstrakcije

Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti dobiveni konvencionalnom ekstrakcijom i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima filtriraju se pod vakuumom, a talog se stavlja na sušenje na prethodno izvaganom filter papiru (M<sub>1</sub>). Supernatant se prebaci u plastične kivete koje

se potom stavljaju u vakuum koncentrator (50 °C; tlak 25 torra) kako bi se koncentrirao na otprilike 10 mL. U koncentrirani ekstrakt dodaje se 20 mL 1%-tne otopine CaCl<sub>2</sub> te se smjesa ostavi u hladnjaku 24 sata da se istalože alginati. Nakon taloženja ekstrakti se filtriraju, ponovo koncentriraju na otprilike 10 mL te im se dodaje dupli volumen (20 mL) apsolutnog etanola. Promućkaju se i stavljaju u hladnjak na 4 °C preko noći. Nakon centrifugiranja 15 minuta na 5500 okretaja, ekstrakti se filtriraju te se talog prebaci u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelicu i stavlja na sušenje do konstantne mase (M<sub>T</sub>). Filtrat se koncentrira na vakuum koncentratoru do 10 mL. Iz izmjerenih masa, prema formulama [1] i [2] (Rodriguez-Jasso i sur., 2011) izračuna se prinos fukoidana (% Fuk) i postotak degradacije alge (% DA):

$$\% \text{ Fuk} = \frac{M_T}{M_0} * 100 \quad [1]$$

$$\% \text{ DA} = \left( \frac{M_0 - M_1}{M_0} \right) * 100 \quad [2]$$

gdje su:

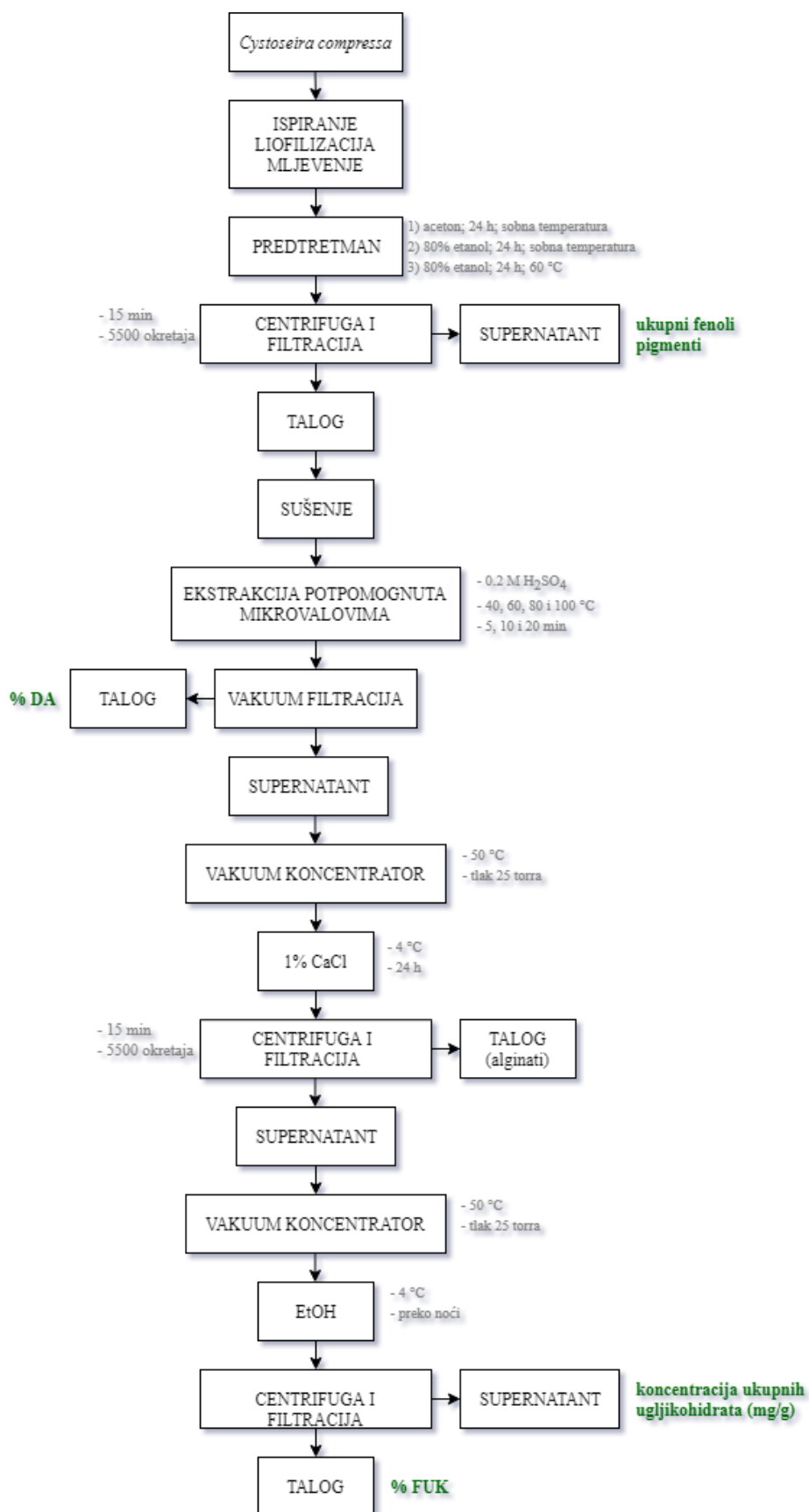
% Fuk – prinos fukoidana

M<sub>T</sub> – masa (g) nakon taloženja etanolom

M<sub>0</sub> – masa alge (g) korištena u svakom eksperimentu

% DA – postotak degradacije alge

M<sub>1</sub> – masa alge (g) nakon ekstrakcije



Slika 5. Shematski prikaz eksperimenta



### 3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata

#### *Princip metode:*

Za određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata korištena je fenol – sumporna metoda prema Dubois i sur. (1956). Princip metode je da ugljikohidrati (jednostavni šećeri, oligosaharidi, polisaharidi i njihovi derivati) reagiraju u prisutnosti jake kiseline i topline, stvaraju derivate furana koji se kondenziraju s fenolom te nastaju stabilni žuto-zlatni spojevi koji se mogu mjeriti spektrofotometrijski na valnoj duljini od 490 nm (Nielsen, 2010).

#### *Postupak rada:*

U staklenu epruvetu otpipetira se 400  $\mu\text{L}$  uzorka i 400  $\mu\text{L}$  5% otopine fenola te se zatim dodaje 2 mL koncentrirane 95%-tne  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Važno je paziti da se kiselina dodaje direktno u epruvetu, bez diranja stijenki kako bi se postiglo dobro miješanje. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima 0,2 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Svako mjerenje provodi se u paraleli. Sadržaj epruvete se promiješa na vorteksu te se epruvete stavljaju 20 minuta u vodenu kupelj na 25 °C. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji, mjeri se apsorbancija pri 490 nm na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD) (Li, 2012).

#### *Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:*

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 10 mg glukoze koja se otopi u 100 mL vode u odmjernoj tikvici od 100 mL. Iz tako pripremljene otopine glukoze ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) rade se razrjeđenja koncentracija 20, 40, 60 i 80  $\text{mg L}^{-1}$ . Od svakog razrjeđenja otpipetira se 400  $\mu\text{L}$  i postupa po propisu za određivanje ukupnih ugljikohidrata. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrti se baždarni pravac čija jednadžba [3] glasi:

$$y = 0,0092x + 0,0149 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9938$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 490 nm

x – koncentracija otopine glukoze ( $\text{mg L}^{-1}$ )

### 3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

#### *Princip metode:*

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

#### *Postupak rada:*

U staklenu epruvetu otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta, 200  $\mu\text{L}$  Folin Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 minute doda se 1 mL 20 % – tne zasićene otopine natrijeva karbonata i promiješa pomoću vortexa. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji 25 min na 50 °C, na spektrofotometru (UV–1600PC, VWR International, SAD) se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima otapalo. Sva mjerenja su provedena u paraleli.

#### *Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:*

Za pripremu baždarnog pravca odvaži se 0,5 g galne kiseline koja se otopi u 10 mL 96 % – tneg etanola u odmjerne tikvici od 100 mL i nadopuni se destiliranom vodom do oznake. Iz tako pripremljene otopine galne kiseline rade se razrjeđenja koncentracija 50, 100, 150, 250 i 500  $\text{mg L}^{-1}$ . Od svakog razrjeđenja otpipetira se 100  $\mu\text{L}$  i postupa po propisu za određivanje ukupnih fenola. Iz izmjerenih vrijednost apsorbancija nacrti se baždarni pravac čija jednadžba [4] glasi:

$$y = 0,0035 * x \quad [4]$$

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

Dobivene masene koncentracije ( $\text{mg L}^{-1}$ ) preračunate su i izražene kao mg ekvivalenta galne kiseline na gram suhe tvari praha ( $\text{mg GAE g s.tv}^{-1}$ ).

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

#### *Princip metode:*

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

#### *Postupak određivanja:*

Kvantitativno određivanje pigmenata u acetonskom ekstraktu provedeno je spektrofotometrom pri sljedećim valnim duljinama: 644,8 i 661,6 nm za klorofil a i b te 470 nm za karotenoide. Pripremljene ekstrakte potrebno je razrijediti direktno u kivetama pomoću acetona. Svako mjerenje provedeno je u paraleli. Kao slijepa proba upotrijebljen je aceton. Apsorbanciju slijepa probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata. Udjeli klorofila a i b te ukupnih karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2005; Sumanta i sur., 2014):

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11,24 A_{661,6} - 2,04A_{644,8} \quad [5]$$

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

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 1,9C_a - 63,14C_b)/214 \quad [7]$$

gdje je:

A = apsorbancija

$C_a$  = klorofil a

$C_b$  = klorofil b

$C_{(x+c)}$  = karotenoidi (ksantofili + karotenoidi)

### 3.2.8. Određivanje udjela suhe tvari

#### *Postupak određivanja:*

U osušenu aluminijsku posudicu stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić, te se suši u sušioniku na 105°C u trajanju od 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja posudica se s polu poklopljenim poklopcem hladi u eksikatoru a zatim se izvaže s točnošću od ± 0,0002 g. U ovako pripremljenu posudicu izvaže se 2,5 g uzorka alge s točnošću ± 0,0002 g i pomoću staklenog štapića dobro se izmiješa s kvarcnim pijeskom. Zatim se posudica s uzorkom stavi u sušionik zagrijan na 105°C ± 0.5 °C i zagrijava 60 minuta sa skinutim poklopcem. Nakon hlađenja u eksikatoru i vaganja, sušenje se nastavlja sve dok razlika nakon dva uzastopna sušenja u razmaku od pola sata ne bude manja od 0,001 g. Važe se s točnošću 0,0002 g.

#### *Izračunavanje*

Nakon hlađenja u eksikatoru, posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar pomoću sljedeće formule:

$$\text{Suha tvar (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100 \quad [8]$$

### 3.2.9. 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: % DA, % Fuk i koncentracija ukupnih ugljikohidrata (mg g<sup>-1</sup>) te je ispitan utjecaj neovisnih varijabli: a) temperatura (40, 60, 80 i 100 °C), b) vrijeme (5, 10 i 20 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

Sulfatirani polisaharidi iz smeđih algi mogu se ekstrahirati vrućom vodom, razrijeđenom kiselinom ili razrijeđenom lužinom, koristeći veliku količinu otapala i dugo vrijeme ekstrakcije. U ovom istraživanju provedena je konvencionalna ekstrakcija polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira compressa* na magnetnoj miješalici gdje je kao otapalo korišteno 30 mL 0,2 M sumporne kiseline, na temperaturi od 60 °C i vremenu od 4h te ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima (MAE) gdje je korišteno isto otapalo pri različitim temperaturama (40-100 °C) i vremenima ekstrakcije (5-20 min). Na temelju prethodno provedenog istraživanja u kojem je istražen utjecaj različitih otapala (H<sub>2</sub>O, 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i različitih volumena (15 i 30 mL) navedenih otapala, na ekstrakciju polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira compressa*, odabrani su parametri za ovo istraživanje. Primjenom 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i volumena od 30 mL dobiveni su najveći prinosi fukoidana neovisno o metodi ekstrakcije (konvencionalna metoda i MAE) te je iz tog razloga kao otapalo u ovom radu odabrana 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> u volumenu od 30 mL.

**Tablica 3.** Rezultati mjerenja % DA, % Fuk i koncentracije ukupnih ugljikohidrata ekstrakata polisaharida dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom (K) i MAE (M1-M12) pri različitim temperaturama i vremenima ekstrakcije

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	% DA	% Fuk	Ukupni ugljikohidrati (mg g <sup>-1</sup> )
M1	40	5	19,28 ± 0,06	9,23 ± 0,01	7,73 ± 0,35
M2	40	10	19,54 ± 0,03	8,63 ± 0,04	7,66 ± 0,21
M3	40	20	18,98 ± 0,07	6,48 ± 0,03	9,72 ± 0,11
M4	60	5	14,00 ± 0,07	6,65 ± 0,03	8,74 ± 0,38
M5	60	10	18,59 ± 0,04	5,63 ± 0,03	13,02 ± 0,31
M6	60	20	17,40 ± 0,06	10,75 ± 0,06	14,86 ± 0,95
M7	80	5	20,76 ± 0,01	13,19 ± 0,03	10,79 ± 0,28
M8	80	10	21,57 ± 0,07	11,86 ± 0,04	9,94 ± 0,12
M9	80	20	21,74 ± 0,03	13,79 ± 0,03	9,89 ± 0,23
M10	100	5	21,59 ± 0,06	16,19 ± 0,04	16,07 ± 0,23
M11	100	10	27,74 ± 0,06	15,06 ± 0,06	14,35 ± 0,34
M12	100	20	31,57 ± 0,07	14,22 ± 0,01	18,28 ± 0,09
K	60	4 h	39,03 ± 0,03	24,47 ± 0,03	73,15 ± 1,97

Određen je stupanj degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk) i koncentracija ukupnih ugljikohidrata ( $\text{mg g}^{-1}$ ) te su navedeni rezultati prikazani u Tablici 3. U Tablici 4. prikazan je utjecaj vremena i temperature mikrovalne ekstrakcije, te njihov kombinirani utjecaj, na % DA, % Fuk i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Svi parametri su pojedinačno i kombinirano statistički značajni ( $p \leq 0,05$ ).

**Tablica 4.** Utjecaj temperature i vremena ekstrakcije na % Fuk, % DA i prinos ugljikohidrata

	N	% DA	% Fuk	Ugljikohidrati ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
40	6	$19,27 \pm 0,02^c$	$08,11 \pm 0,02^b$	$08,37 \pm 0,15^a$
60	6	$16,66 \pm 0,02^d$	$07,68 \pm 0,02^a$	$12,21 \pm 0,15^b$
80	6	$21,36 \pm 0,02^b$	$12,95 \pm 0,02^c$	$10,21 \pm 0,15^a$
100	6	$26,97 \pm 0,02^a$	$15,16 \pm 0,02^d$	$16,23 \pm 0,15^c$
Vrijeme (min)		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
5	8	$18,91 \pm 0,02^c$	$11,32 \pm 0,01^b$	$10,83 \pm 0,13^a$
10	8	$21,86 \pm 0,02^b$	$10,30 \pm 0,01^a$	$11,24 \pm 0,13^a$
20	8	$22,42 \pm 0,02^a$	$11,31 \pm 0,01^b$	$13,19 \pm 0,13^b$
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); vrijeme (min)		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
40; 5	2	$19,28 \pm 0,04^f$	$09,23 \pm 0,03^e$	$07,73 \pm 0,26^a$
40; 10	2	$19,54 \pm 0,04^e$	$08,63 \pm 0,03^d$	$07,66 \pm 0,26^a$
40; 20	2	$18,98 \pm 0,04^g$	$06,48 \pm 0,03^b$	$09,72 \pm 0,26^{a,b}$
60; 5	2	$14,00 \pm 0,04^j$	$06,65 \pm 0,03^c$	$08,74 \pm 0,26^a$
60; 10	2	$18,59 \pm 0,04^h$	$05,63 \pm 0,03^a$	$13,02 \pm 0,26^{b,c,d}$
60; 20	2	$17,40 \pm 0,04^i$	$10,75 \pm 0,03^f$	$14,86 \pm 0,26^{d,e}$
80; 5	2	$20,76 \pm 0,04^d$	$13,19 \pm 0,03^h$	$10,79 \pm 0,26^{a,b,c}$
80; 10	2	$21,57 \pm 0,04^c$	$11,86 \pm 0,03^g$	$09,94 \pm 0,26^a$
80; 20	2	$21,74 \pm 0,04^c$	$13,79 \pm 0,03^i$	$09,89 \pm 0,26^{a,b}$
100; 5	2	$21,59 \pm 0,04^c$	$16,19 \pm 0,03^l$	$16,07 \pm 0,26^{d,e}$
100; 10	2	$27,74 \pm 0,04^b$	$15,06 \pm 0,03^k$	$14,35 \pm 0,26^{c,d}$
100; 20	2	$31,57 \pm 0,04^a$	$14,22 \pm 0,03^j$	$18,28 \pm 0,26^e$
Prosječna vrijednost	24	21,06	10,97	11,75

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

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

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

Iz Tablice 4. je vidljivo da je prosječna vrijednost degradacije alge iznosila 21,06 % a prinos fukoidana 10,97 %. Ovi rezultati u suglasju su i s rezultatima koje su objavili Yuan i Macquarrie (2015a) koji su određivali udio fukoidana, alginata i ukupnih ugljikohidrata u smeđoj algi *Ascophyllum nodosum* kojima je prosječna vrijednost za degradaciju alge iznosila 21,44 %, a prinos fukoidana bio je 14,09 %. Prosječna vrijednost ukupnih ugljikohidrata u ovom istraživanju iznosila je 11,75 mg g<sup>-1</sup>. Međutim, Yuan i Macquarrie (2015a) dobili su puno veću prosječnu vrijednost koncentracije ukupnih ugljikohidrata od 39,64 mg g<sup>-1</sup>. Navedena razlika može biti posljedica korištenja različite vrste alge i različite metode ekstrakcije. Yuan i Macquarrie (2015b) u svom drugom istraživanju na istoj algi *Ascophyllum nodosum* proveli su ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima pri temperaturi ekstrakcije u rasponu od 90 °C do 150 °C te vremenu ekstrakcije od 5 do 30 min. Prosječna vrijednost prinosa fukoidana iznosila je 11,97 %, dok je prosječna vrijednost ostatka alge nakon ekstrakcije iznosila 39,47 %, što znači da je degradacija alge iznosila oko 60 %. Prinos fukoidana u skladu je s našim rezultatima dok je degradacija alge puno veća u njihovom istraživanju, što može biti rezultat korištenja puno više temperature ekstrakcije koja doseže i do 150 °C dok je naša maksimalna temperatura 100 °C.

#### **4.1. USPOREDBA KONVENCIONALNE EKSTRAKCIJE I EKSTRAKCIJE MIKROVALOVIMA**

Metode ekstrakcije utječu na kemijsku strukturu i biološku aktivnost polisaharida (Dong i sur., 2016; Zhu i sur., 2016). Konvencionalna ekstrakcija kao otapala najčešće koristi vodu ili kiseline. Međutim, ova metoda pokazala je i brojne nedostatke kao što su: visoka temperatura ekstrakcije, dugo vrijeme ekstrakcije i velika potrošnja otapala i energije. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, kao jedna od najučinkovitijih i "najzelenijih" metoda bi mogla prevladati nedostatke konvencionalnih metoda (Cheng i sur., 2015; Felkai-Haddache i sur., 2016; Zhu i sur., 2016). Zagrijavanje mikrovalovima je brža i učinkovitija metoda za obradu biomase, jer ima dobre performanse pri ekstrakciji biomase te procesima hidrolize i pirolize (Macquarrie i sur., 2012; Rodriguez-Jasso i sur., 2011). Ekstrakcija mikrovalovima se pokazala kao obećavajuća metoda za izoliranje aktivnih sastojaka iz morskih algi (Tsubaki i sur., 2016; Yuan & Macquarrie, 2015).

Usporedbom rezultata konvencionalne ekstrakcije polisaharida i prosječnih vrijednosti ekstrakcije polisaharida potpomognute mikrovalovima možemo primijetiti da su primjenom mikrovalova postignuti bolji rezultati za degradaciju alge. Degradacija alge manja je pri ekstrakciji mikrovalovima gdje prosječna vrijednost iznosi 21,06 % dok je znatno veća pri ekstrakciji konvencionalnom metodom gdje iznosi 39,03 %. Prinos fukoidana ekstrakcijom mikrovalovima

iznosi 10,97 % dok je s konvencionalnom ekstrakcijom dobiven viši prinos od 24,47 %. Konvencionalnom ekstrakcijom postignuta je koncentracija ukupnih ugljikohidrata od 73,15 mg g<sup>-1</sup> koja je znatno veća nego kod ekstrakcije potpomognute mikrovalovima gdje iznosi samo 11,75 mg g<sup>-1</sup>. Glavna razlika u parametrima između ovih dviju metoda je razlika u vremenu ekstrakcije, koje kod konvencionalne metode iznosi 4 sata, dok je vrijeme kod ekstrakcije mikrovalovima u rasponu od 5 do 20 min. Iz rezultata se može zaključiti da kraće vrijeme ekstrakcije kod metode mikrovalovima pogoduje manjoj degradaciji alge, dok duže vrijeme kod konvencionalne metode osigurava bolji prinos ukupnih ugljikohidrata i fukoidana. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima uspješno se primjenjuje za ekstrakciju biološki aktivnih komponenti iz širokog spektra prirodnih resursa. Ekstrakcija komponenti je selektivnija i brža, sa sličnim ili boljim prinosima u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom, koristeći manju količinu energije i otapala, zbog čega je ekološki prihvatljivija metoda (Bélanger i Paré, 2006; Aguilar i Teixeira, 2010). Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima za ekstrakciju polisaharida iz algi je do sada korištena u samo nekoliko istraživanja (Ren i sur., 2017; Yuan i Macquarrie, 2015; Rodriguez-Jasso i sur., 2011;).

S obzirom na prinos fukoidana rezultati ovog istraživanja razlikuju se od rezultata koje su dobili Yuan i Macquarrie (2015a) usporedbom konvencionalne ekstrakcije i MAE na algi *Ascophyllum nodosum*. U spomenutom istraživanju, prinos fukoidana konvencionalnom ekstrakcijom iznosio je 20,98 % (3 · 3h pri 70 °C), što je više od metode potpomognute mikrovalovima gdje je prinos od 16,08 % dobiven nakon 15 minuta na 120 °C. No u obzir se treba uzeti vrijeme ekstrakcije, koje je kod ekstrakcije mikrovalovima iznosilo 15 min dok je konvencionalna ekstrakcija trajala 9 h. Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da se fukoidan može ekstrahirati iz *Ascophyllum nodosum* tehnikom MAE u puno kraćem vremenskom periodu u usporedbi s konvencionalnom metodom ekstrakcije no prinos ekstrahiranog fukoidana je ipak nešto niži. Karakterizacija fukoidana pokazala je da su fukoidani dobiveni MAE na 90 °C imali sličan sastav i molekularnu težinu kao i oni dobiveni konvencionalnom metodom. Štoviše, antioksidativni testovi pokazali su da fukoidani dobiveni mikrovalovima imaju jače reducirajuće djelovanje i veću antioksidativnu aktivnost od onih dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom. Takvi rezultati dokazuju kako je MAE dobar izbor za uspješnu ekstrakciju fukoidana. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) u svom istraživanju željeli su utvrditi najbolje uvjete za MAE kako bi dobili optimalne rezultate za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *Fucus vesiculosus*. Kao optimalne uvjete navode vrijeme od 1 min i volumen otapala 25 mL, kada je prinos fukoidana iznosio 18,22 % što je puno veća vrijednost u usporedbi s vrijednostima za konvencionalnu ekstrakciju pri



temperaturama između 25 i 70 °C i vremena od 2 do 6 h koje su dobili u svojim istraživanjima Navarro i sur., (2007); Duarte i sur., (2001); Zvyagintseva i sur., (1999).

#### **4.2. UTJECAJ TEMPERATURE EKSTRAKCIJE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA**

Povećanje temperature ekstrakcije smanjuje viskozitet otapala i ubrzava kretanje molekula, ubrzavajući prijenos mase unutarstaničnih tvari iz stanice (Tsubaki i sur., 2016). Međutim, viša temperatura može uzrokovati degradaciju nekih temperaturno osjetljivih komponenti, što rezultira smanjenim prinosom (Chen i sur., 2015). Polisaharidi se većinom ekstrahiraju na visokim temperaturama, jer nisu izrazito temperaturno osjetljivi, a prinos je znatno bolji. Long i sur., (2019) zaključili su da veće temperature ekstrakcije povećavaju otapanje polisaharida, što rezultira većim prinosom te da temperatura ekstrakcije utječe na strukturu i sadržaj vlage frakcijskih polisaharida.

U ovom istraživanju za ekstrakciju polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira compressa* primjenom MAE korištene su temperature od 40, 60, 80 i 100 °C te je istražen njihov utjecaj na % Fuk, % DA i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Prema rezultatima iz Tablice 2. možemo vidjeti da je temperatura bila statistički značajan parametar za % Fuk, % DA i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.

##### **4.2.1. Utjecaj temperature ekstrakcije na prinos fukoidana (% Fuk)**

Iz Tablice 2. primjećujemo da se prinos fukoidana značajno povećava s povećanjem temperature od 40 do 100 °C. Najviši prinos fukoidana dobiven je pri 100 °C i iznosi 15,16 %, a najniža vrijednost od 7,68 % dobivena je pri temperaturi od 60 °C. Ren i sur. (2017) istraživali su utjecaj temperature ekstrakcije na prinos polisaharida iz smeđe alge *Sargassum thunbergii*. Prinos polisaharida se povećao s povećanjem temperature ekstrakcije od 10 do 70 °C. Kada se temperatura ekstrakcije povećala iznad 70 °C došlo je do neznatnog smanjenja prinosa polisaharida. Rezultati istraživanja Yuan i Macquarrie (2015a) pokazuju porast prinosa fukoidana s 14,09 % na 16,08 %, porastom temperature od 90 °C do 120 °C, no povećanjem temperature na 150 °C, prinos fukoidana pada na 6,98 %. Viša temperatura poboljšava difuziju otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanje željenih komponenata čime se postiže bolji ekstrakcijski učinak. Međutim svaka tvar ima svoju gornju temperaturnu granicu iznad koje dolazi do razgradnje (Veggi i sur., 2013). Hu i sur., (2019) koristili su MAE za ekstrakciju polisaharida iz *Camptotheca acuminata* voća te je prinos polisaharida porastao na maksimalno 8,50 % na 70 °C. Kada se temperatura povećala iznad 70 °C, prinos se lagano smanjio na 8,11 % pri 90 °C. Stoga su zaključili da je optimalan temperaturni raspon za ekstrakciju od 60 do 80 °C.

#### 4.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije na postotak degradacije alge (% DA)

Poželjna je što manja degradacija alge pri ekstrakciji, stoga je najveća vrijednost % DA ujedno i najmanje poželjna. Pri temperaturi od 100 °C degradacija alge bila je najveća i iznosila je 26,97 % dok je najmanja degradacija alge bila pri 60 °C i iznosila je 16,66 %. Dobiveni rezultati su u skladu s onima koje su dobili Yuan i Macquarrie (2015a) kod kojih je na nižoj temperaturi od 90 °C degradacija alge bila 50%, na 120 °C oko 60 % i na 150 °C oko 70 % što pokazuje da što je veća temperatura ekstrakcije, više alge je degradirano. S obzirom na ovaj aspekt te strukturnu i kemijsku složenost sulfatiranih polisaharida. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) u svom istraživanju su koristili MAE za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *Fucus vesiculosus* te su očekivali da će doći do degradacije alge. U navedenom radu energija mikrovalova bila je kontrolirana parametrom tlaka, jer je jedan od najčešćih problema zagrijavanja mikrovalnim poljima mjerenje temperature koje je često komplicirano zbog prisustva elektromagnetskog polja visokog intenziteta. Prikazali su strukturu algi prije i poslije ekstrakcije potpomognute mikrovalovima pri optimalnim uvjetima. Na slici s neobrađenim uzorkom prikazane su zatvorene stanice i grube površine, koje su nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (tlak 120 psi, vrijeme 1 min, temperatura 70 °C) uglavnom uništene. Pri blažim uvjetima tlaka od 30 psi uočena je manja degradacija strukture alge. Struktura alge nakon ekstrakcije pod visokim tlakom i temperaturom od 70 °C bila je vrlo hrapava površina s puno šupljina, što sugerira da je mikrovalno zračenje utjecalo na uništavanje kutikularnog sloja, što su primijetili i drugi autori (Chen i sur., 2005).

#### 4.2.3. Utjecaj temperature ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Najniža koncentracija ukupnih ugljikohidrata zabilježena je pri 40 °C te iznosi 8,37 mg g<sup>-1</sup>. Najviša koncentracija ugljikohidrata od 16,23 mg g<sup>-1</sup> dobivena je pri najvišoj temperaturi od 100 °C. Da prinos ugljikohidrata raste s povećanjem temperature zaključili su u svom istraživanju i Yuan i Macquarrie (2015a) koji su primjenom ekstrakcije potpomognute mikrovalovima u trajanju od 5,15 i 30 min dobili koncentracije ukupnih ugljikohidrata od 20 mg mL<sup>-1</sup> pri 90 °C, oko 30 mg mL<sup>-1</sup> na 120 °C te 40-75 mg mL<sup>-1</sup> na 150 °C.

### **4.3. UTJECAJ VREMENA EKSTRAKCIJE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA**

Duža ekstrakcija znači i veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje bioaktivnih spojeva zbog čega je izrazito važno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije (Favretto, 2004). Osim interakcije s temperaturom, snaga mikrovalova može djelovati i na vrijeme ekstrakcije. Preveliko izlaganje mikrovalovima, čak i na niskoj snazi, rezultirat će smanjenim učinkom ekstrakcije zbog gubitka kemijske strukture aktivnih sastojaka. Kako bi se izbjegao rizik

od temperaturne degradacije i oksidacije, ekstrakcijsko vrijeme ekstrakcije mikrovalovima obično varira od nekoliko minuta do pola sata (Chan i sur., 2011). Korištena su vremena od 5, 10 i 20 minuta, te se pratio utjecaj vremena na prinos fukoidana, degradaciju alge te koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Pokazalo se da je parametar vremena značajan za sve tri varijable.

#### 4.3.1. Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos fukoidana (% Fuk)

Vrijeme ekstrakcije, uz temperaturu, drugi je parametar koristan pri optimizaciji ekstrakcije polisaharida mikrovalovima. Vrijeme od 10 min rezultiralo je najmanjim prinosom fukoidana od 10,30 %. Prinosi fukoidana dobiveni ekstrakcijom od 5 i 20 min statistički su značajno veći nego ekstrakcijom od 10 min, ali se njihove međusobne vrijednosti (11,32 % i 11,31 %) statistički ne razlikuju. Ren i sur. (2017) istraživali su utjecaj vremena ekstrakcije na prinos polisaharida iz alge *Sargassum thunbergii*. Ustanovili su da se prinos polisaharida značajno povećao s povećanjem vremena ekstrakcije od 10 do 20 min. Kada se vrijeme ekstrakcije povećalo iznad 20 min., prinos nije značajno porastao. Takvi rezultati podrazumijevaju da prekomjerno vrijeme ekstrakcije dovodi do degradacije polisaharida (Cheng i sur., 2015), te je kao optimalno vrijeme za ekstrakciju odabrano 20 min. Hu i sur. (2019) koristili su MAE za ekstrakciju polisaharida iz *Camptotheca acuminata* voća, te su ustanovili da je vrijeme ekstrakcije bitan čimbenik u ekstrakciji polisaharida. Prinos polisaharida rastao je rapidno u prvih 15 min, s maksimumom na 15 min, te ostao na 8,53 % i 8,55 % na 20 i 25 min. Prema dobivenim rezultatima vremenski raspon od 10 do 20 min odabran je kao najbolji za naknadne eksperimente. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) su kao parametre za ekstrakciju fukoidana koristili različite uvjete tlaka (30-120 psi), vrijeme ekstrakcije (1–31 min) i omjer alge/otapala ( $1/25$  do  $5/25$  g mL<sup>-1</sup>). U njihovom istraživanju vrijeme nije imalo značajan utjecaj na prinos fukoidana.

#### 4.3.2. Utjecaj vremena ekstrakcije na postotak degradacije alge (% DA)

Najveću degradaciju alge od 22,42 % uzrokovala je ekstrakcija u trajanju od 20 min. Vremena od 5 i 10 min rezultirala su vrijednostima od 18,91 % i 21,86 %. Najduže vrijeme uzrokovalo je najveću degradaciju alge dok je najkraće vrijeme najmanje utjecalo na algu. Yuan i Macquarrie (2015a) dobili su slične rezultate, gdje su računali postotak alge koji je ostao nakon ekstrakcije. Vidljivo je da se povećanjem vremena od 5 do 30 minuta postotak alge koja je preostala smanjuje (od 41,29 % do 36,21 %), što znači da se postotak degradacije alge povećava s vremenom ekstrakcije, što je u skladu s našim rezultatima.

Prema Chen i sur., (2005) različite metode ekstrakcije uzrokuju različite fizikalne promjene na uzorcima. Proučavali su utjecaj konvencionalne ekstrakcije na degradaciju strukture začina

*Solanum nigrum* kao i utjecaj ekstrakcije potpomognute mikrovalovima. Neobrađeni uzorak imao je zatvorene stanice i vrlo grubu površinu. Nakon konvencionalne ekstrakcije pri 90 ° C u trajanju od 5 sati, primijetili su da su stanice i stanične stijenke nejednako degradirane. Neke stanice su otvorene i prazne dok su druge netaknute. Rezultati nakon ekstrakcije potpomognute mikrovalovima znatno su se razlikovali od rezultata nakon konvencionalne metode. Nakon tretiranja mikrovalovima u trajanju 3 min stanice izgledaju iznenada šokirane i stanične stijenke su iskrivljene. Također je vidljivo da su gotovo sve stanice otvorene i prazne. Povećanjem vremena ekstrakcije do 15 min stanice se dodatno mijenjaju. Stanične stijenke su potpune razorene i oblik stanice nije usporediv s početnim prije tretiranja. Istovremeno zagrijavanje matriksa i otapala rezultira ubrzanom rastom temperature. Rezultati navedenog istraživanja sugeriraju da mikrovalno zračenje ima moć uništavanja kutikularnog sloja stanice. A kad lokalizirano pregrijavanje premaši kapacitet za širenje stanica, njihovo puknuće je brže od onog kod konvencionalne ekstrakcije i uzrokuje oslobađanje aktivnije komponente.

#### 4.3.3. Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Prema rezultatima iz Tablice 3. možemo vidjeti da nema statističke razlike između koncentracija ugljikohidrata od 10,83 mg g<sup>-1</sup> 11,24 mg g<sup>-1</sup> pri vremenu ekstrakcije od 5 i 10 min. Dok pri vremenu ekstrakcije od 20 min dolazi do određenog povećanja koncentracije ukupnih ugljikohidrata na 13,19 mg g<sup>-1</sup>. Prema istraživanju Yuan i Macquarrie (2015a) razlike u vremenu ekstrakcije imaju utjecaj na prinos ugljikohidrata. Koristili su vremena od 5, 15 i 30 min te su zabilježili da pri vremenu od 5 min koncentracija ukupnih ugljikohidrata ne prelazi 45 mg mL<sup>-1</sup>, dok se pri vremenu ekstrakcije od 30 min prinos povećava i do 80 mg mL<sup>-1</sup>.

#### **4.4. UTJECAJ KOMBINACIJE VREMENA I TEMPERATURE NA % Fuk, % DA I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA**

Kombinacijom parametara vremena i temperature ekstrakcije moguće je utvrditi idealne uvjete za ekstrakciju. Najmanja degradacija alge dobivena je pri 60 °C i 5 min dok se povećanjem temperature degradacija povećavala. Prinos fukoidana bio je najveći pri temperaturi od 100 °C i vremenu od 5 minuta, što je u suglasnosti s rezultatima Rodriguez-Jasso i sur. (2011) koji su najveći prinos fukoidana od 18,22 % dobili pri 70 °C i vremenu od 1 min. Zaključili su da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima pri optimalnim reakcijskim uvjetima učinkovita metoda za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *Fucus Vesiculos* te da je potrebno kratko vrijeme ekstrakcije i upotreba ne korozivnih otapala, što rezultira smanjenjem troškova u usporedbi s konvencionalnom metodom. Koncentracija ukupnih ugljikohidrata najveća je pri najvišim vrijednostima temperature i vremena: 100°C i 20 min. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) su kao

parametre za ekstrakciju fukoidana koristili različite uvjete tlaka (30-120 psi), vrijeme ekstrakcije (1–31 min) i omjer alge/otapala (1/25 do 5/25 g mL<sup>-1</sup>). U svom radu navode kako različite vrijednosti tlaka odgovaraju različitim temperaturama. Tako vrijedi: 30 psi =122 °C, 75 psi =152 °C i 120 psi =172 °C. Njihov zaključak je da tlak i vrijeme ekstrakcije nisu pokazali značajne učinke za prinos fukoidana, ali interakcija tih varijabli bila je vrlo značajna. Kao posljedica, budući da je interakcija između tlaka i vremena reakcije imala negativan učinak na prinos fukoidana, može se zaključiti da upotreba nižih reakcijskih vremena pogoduje ekstrakciji fukoidana. Najveći prinos fukoidana (18,22 %) dobiven je kada je najviši tlak tj. najviša temperatura (120 psi=172 °C) i najkraće vrijeme ekstrakcije (1 min) što se podudara s našim rezultatima. U našem istraživanju najveći postotak degradacije alge bio je pri maksimalnim uvjetima temperature i vremena 100 °C i 20 min te je iznosio 31,57 %, dok je najmanja degradacija alge od samo 14 % bila pri 60 °C i 5 min. Ovi rezultati su u skladu s onima koje su dobili Rodriguez-Jasso i sur. (2011) gdje je najveći postotak degradacije (67,98 %) isto pri maksimalnim uvjetima temperature i vremena od 172 °C i 31 min. Najveći prinos ugljikohidrata isto je postignut pri 100 °C i 20 min. te je iznosio 18,28 mg g<sup>-1</sup> dok su Rodriguez-Jasso i sur. (2011) dobili najveći prinos od 27,62 mg/100 mg alge pri najvišoj temperaturi od 172 °C i najmanjem vremenu od 1 min.

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima podrazumijeva prodiranje energije mikrovalova u uzorak, te nastaje toplina kao posljedica molekularnog trenja nastalog dipolnom rotacijom polarnog otapala. Stoga zagrijavanje u kratkom vremenskom periodu uzrokuje učinkovito raspadanje stanice koja onda otpušta svoj sadržaj otapalu, što najviše pogoduje prinosu fukoidana koji je optimalan pri najvećoj temperaturi i najnižem vremenu. Povećanjem vremena s temperaturom dolazi do sve veće degradacije alge, što nije poželjno, dok s druge strane najviše koncentracije ukupnih ugljikohidrata su upravo pri najvišim uvjetima temperature i vremena jer ugljikohidrati nisu osjetljivi na visoke temperature.

#### **4.5. ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA**

Postupak predtretmana koji je proveden na početku eksperimenta, služi tome da se uklone tvari poput lipida, terpena, fenola i pigmenata. Uklanjanjem takvih komponenti olakšava se sama ekstrakcija polisaharida. Nakon što smo predtretmanom uklonili tvari koje bi mogle smetati ekstrakciji polisaharida, filtrat smo iskoristili kako bi u njemu odredili koncentracije ukupnih fenola i pigmenata koje naša alga sadrži. Proveli smo određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida te ukupnih fenola UV/Vis spektrofotometrijom i dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 5. i 6.

#### 4.5.1. Koncentracija pigmenata

Kvantitativno određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u uzorku biljnih tkiva UV/Vis spektrofotometrijom je dodatno komplicirano izborom odgovarajućeg otapala, uzorka i spektrofotometra. Biljni pigmenti apsorbiraju svjetlost u regijama spektra koje se preklapaju, stoga su u ovoj metodi primijenjene jednadžbe kojima se može točno kvantitativno odrediti koncentracija klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u našoj algi.

Prema rezultatima iz Tablice 5. dobivena koncentracija klorofila a je  $0,55 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofila b  $0,05 \text{ mg g}^{-1}$  te ukupnih karotenoida  $0,24 \text{ mg g}^{-1}$ . Dobivena koncentracija klorofila a je u skladu s rezultatima Seely i sur. (1972) koji su određivali pigmente u smeđoj algi *Laminaria saccharina* gdje je koncentracija klorofila a iznosila  $0,538 \text{ mg g}^{-1}$ . Antonia Jujnović (2019) u svom diplomskom radu uspoređivala je različite metode ekstrakcije pigmenata iz alge *Cystoseira compressa* te utjecaj različitih parametara ekstrakcije na koncentraciju klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida. Korištenjem magnetne mješalice i 80 %-tnog acetona dobila je rezultate za klorofil a  $1,30 \text{ mg g}^{-1}$ , klorofil b  $0,04 \text{ mg g}^{-1}$  i ukupni karotenoidi  $0,68 \text{ mg g}^{-1}$ . Razlika u rezultatima posljedica je 20 % vode koja se nalazila u njenom otapalu, dok je u ovom istraživanju korišten čisti aceton. U sljedeća 2 ciklusa predtretmana 80 %-tnim etanolom se uklonila određena količina pigmenata, ali u tim ekstraktima nije bilo moguće provesti određivanje pigmenata jer na postoje potrebne jednadžbe.

**Tablica 5.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u ekstraktima dobivenim uz aceton kao otapalo

<b>Klorofil – a</b> <b>(mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Klorofil – b</b> <b>(mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ukupni karotenoidi</b> <b>(mg g<sup>-1</sup>)</b>
$0,55 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,24 \pm 0,00$

#### 4.5.2. Koncentracija ukupnih fenola

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodilo se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupila dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanjem obojenog produkta. Rezultati iz Tablice 6. prikazuju da je u ekstraktu dobivenom acetonom zabilježena najmanja prosječna vrijednost fenola od  $2,98 \text{ mg g}^{-1}$ , dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku s 80 %-tnim etanolom na sobnoj temperaturi te ona iznosi  $19,05 \text{ mg g}^{-1}$ . Budući da se veća količina fenola ekstrahirala u drugom ciklusu predtretmana, s 80 %-tnim etanolom na

sobnoj temperaturi, u trećem ciklusu, s 80 %- tnim etanolom na 60 °C, ekstrahirana je značajno manja količina fenola. Vidljiva je velika razlika između prva dva ciklusa, što upućuje na to da je otapalo od iznimne važnosti za ekstrakciju ukupnih fenola. Upotrebom vode kao otapala dobiva se ekstrakt sa visokim sadržajem nečistoća (npr. organskih kiselina, šećera, topivih proteina) koji mogu utjecati na identifikaciju i kvantifikaciju ukupnih fenola, dok čisti alkohol kao otapalo smanjuje učinak ekstrakcije i ne koristi se kao takav. Upotreba vode u kombinaciji s drugim organskim otapalima čini umjereno polarni medij, niže viskoznosti, osiguravajući optimalne uvjete za ekstrakciju polifenola iz različitih biljnih materijala (Rafiee i sur., 2011). Upotreba vode u kombinaciji s alkoholom dovodi do povećanog bubrenja biljnog materijala što omogućuje jače prodiranje otapala u uzorak, povećava se kontaktna površina između uzorka i otapala što poboljšava učinak ekstrakcije (Rafiee i sur., 2011). U takvom sustavu, voda je odgovorna za bubrenje biljnog materijala, a etanol za raspad veza između tvari koju se želi ekstrahirati (polifenoli) i biljnog materijala (Şahin i Şamlı, 2013). Zbog svih navedenih činjenica, u ovom radu se kao otapalo koristio 80 % aceton.

**Tablica 6.** Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih fenola ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u ekstraktima iz različitih faza predtretmana

OTAPALO	UKUPNI FENOLI $\pm$ S.D. ( $\text{mg g}^{-1}$ )
Aceton	$2,98 \pm 0,15$
80 % etanol (sobna temperatura)	$19,05 \pm 0,09$
80 % etanol (60 °C)	$6,06 \pm 0,13$

Chkhikvishvili i Ramazanov (2000) određivali su ukupne fenole iz smeđih algi i njihovu antioksidacijsku aktivnost. Fenolne supstance ekstrahirane su sa 70 % vodenom otopinom metanola. Rezultati za algu *Cystoseira compressa* iznosili su 4,83 % suhe mase. López i sur. (2011) proučavali su učinke otapala na fenolni sadržaj i antioksidativno djelovanje ekstrakta smeđe alge *Stypocaulon scoparium*. Količina ukupnih fenola varirala je od 123,2 do 328,7 mg ekvivalent GA/100 g suhe alge. Uzorak s etanolom imao je najmanju koncentraciju fenola (123,2 mg/100g alge) dok je najviše fenola imao uzorak s vodom (328,7 mg/100g alge). Velika varijabilnost koja je primijećena u fenolnom sadržaju može potjecati od vanjskih čimbenika okoliša kao što su svjetlost, dubina, slanost mora, hranjive tvari, kao i unutarnjih čimbenika kao što su dob, dužina, vrsta tkiva alge. Unatoč brojnim istraživanjima posvećenim sezonskim varijacijama sadržaja fenola u smeđim algama, konsenzus nije postignut zbog nedostatka ponavljajućih rezultata.

Kompleksnost sezonskih varijacija u sadržaju fenola sugerira snažnu povezanost sadržaja fenola i lokalnih okolišnih čimbenika (López i sur., 2011; Chkhikvishvili i Ramazanov, 2000).



## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom istraživanju može se zaključiti sljedeće:

1. Usporedbom rezultata konvencionalne ekstrakcije polisaharida i prosječnih vrijednosti ekstrakcije polisaharida potpomognute mikrovalovima možemo zaključiti da su primjenom mikrovalova postignuti bolji rezultati. Degradacija alge manja je pri ekstrakciji mikrovalovima gdje prosječna vrijednost iznosi 21,06 %, dok je znatno veća pri ekstrakciji konvencionalnom metodom gdje iznosi 39,03 %. Prinos fukoidana ekstrakcijom mikrovalovima iznosi 10,97 %, dok je s konvencionalnom ekstrakcijom dobiven viši prinos od 24,47 %. U obzir se mora uzeti duže vrijeme konvencionalne ekstrakcije u trajanju od 4 h, dok je najduže vrijeme ekstrakcije kod mikrovalova iznosilo 20 min.
2. Promatrajući utjecaj temperature ekstrakcije na prinos fukoidana (%Fuk) prema dobivenim rezultatima primjećujemo da se prinos fukoidana značajno povećava s povećanjem temperature od 40 do 100 °C. Povećanjem temperature, degradacija alge (% DA) bila je sve veća, što potvrđuje tvrdnju da visoka temperatura razara staničnu stijenkku alge. Najniža koncentracija ukupnih ugljikohidrata zabilježena je pri 40 °C te iznosi 8,37 mg g<sup>-1</sup>. Najviša koncentracija ugljikohidrata od 16,23 mg g<sup>-1</sup> dobivena je pri najvišoj temperaturi od 100 °C.
3. Parametar vremena imao je značajan utjecaj na degradaciju alge. Najduže vrijeme uzrokovalo je najveću degradaciju alge, dok je najkraće vrijeme najmanje utjecalo na algu. Različito vrijeme ekstrakcije nije značajno utjecalo na prinos fukoidana, dok je najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata dobivena pri vremenu od 20 min.
4. Statističkom analizom usporedbe kombiniranih utjecaja parametara temperature i vremena bili smo u mogućnosti definirati idealne uvjete ekstrakcije. Najmanja degradacija alge dobivena je pri 60 °C i 5 min, dok se povećanjem temperature degradacija povećavala. Prinos fukoidana bio je najveći pri temperaturi od 100 °C i vremenu od 5 minuta. Najveći prinos ugljikohidrata postignut je pri temperaturi od 100 °C i 20 min te je iznosio 18,28 mg g<sup>-1</sup>.
5. Određivanjem pigmenata u filtratu iz predtretmana koncentracija klorofila a iznosila je 0,55 mg g<sup>-1</sup>, klorofila b 0,05 mg g<sup>-1</sup> te ukupnih karotenoida 0,24 mg g<sup>-1</sup>. Određivanjem koncentracije ukupnih fenola u ekstraktu dobivenom acetonom zabilježena je najmanja prosječna vrijednost fenola od 2,98 mg g<sup>-1</sup>, dok je najveća vrijednost dobivena u uzorku s 80 %-tnim etanolom na sobnoj temperaturi te ona iznosi 19,05 mg g<sup>-1</sup>. Što upućuje na to da je otapalo od iznimne važnosti za ekstrakciju ukupnih fenola.



## 6. POPIS LITERATURE

Adl, S. M., Simpson, A. G., Farmer, M. A., Anderson, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., McCourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., Taylor, M. F. (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **52**, 399-451.

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2011) Important Determinants for Fucoidan Bioactivity: A Critical Review of Structure-Function Relations and Extraction Methods for Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides from Brown Seaweeds. *Mar. Drugs* **9**, 2106-2130.

Alves, A., Sousa, R. A., Reis, R. L. (2013) A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *J Appl Phycol.* **25**, 407-424.

Bagherian, H., Zokae Ashtiani, F., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011) Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification.* **50**, 1237-1243.

Bélangier, J. M., Paré, J. R. (2006) Applications of microwave-assisted processes (MAP TM) to environmental analysis. *Anal Bioanal Chem.* **386**, 1049-1058.

BeMiller, J. N. (2019) 5 - Polysaccharides: Properties Carbohydrate Chemistry for Food. 2. izd., Scientists, Elsevier Inc., str. 103-157.

Berteau, O., Mulloy, B. (2003) Sulfated fucans, fresh perspectives: Structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology* **13**, 29–40.

Bilan, M. I., Grachev, A. A., Ustuzhanina, N. E., Shashkov, A. S., Nifantiev, N. E., Usov, A. I. (2004) A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus*. *L. Carbohydr. Res.* **339**, 511–517.

blue-ecosystems.com. Phaeophyta, Brown Algae <<https://www.blue-ecosystems.com/racheliSeaWeed/English/Cystoseira-compressa-%28Esper%29-Gerloff-and-Nizamuddin->> Pristupljeno 25. Kolovoza2019

- Bousbia, N., Vian, A. M., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355-362.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J. L. (2002) Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem. Anal.* **13**, 162–169
- Brading, J. W. E., Georg-Plant, M. M. T., Hardy, D. M. (1954) The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*—purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. *J Chem Soc.* 319–324.
- Chan, H. K., Kwok, P. C. L. (2011) Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv Drug Deliv Rev.* **63**, 406–416.
- Cheng, Z., Song, H., Yang, Y., Liu, Y., Liu, Z., Hu, H., Zhang, Y. (2015) Optimization of microwave-assisted enzymatic extraction of polysaccharides from the fruit of *Schisandra chinensis* Baill. *Int J Biol Macromol.* **76**, 161–168.
- Chen, X. Q., Liu, Q., Jiang, X. Y., Zeng, F. (2005) Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Solanum nigrum*. *J Cent South Univ T.* **12**, 556–560.
- Chevolot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Sinquin, C., Fisher, A. M., Boisson-Vidal, C. (1999) Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **319**, 154–165.
- Chkhikvishvili, I. D., Ramazanov, Z. M. (2000) Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl Biochem Microbiol.* **36**, 289.
- Cribb, A. B. (1954) *Macrocystis pyrifera* (L.) Ag. in Tasmanian Waters. *Aust J Mar Fresh Res.* **5**, 1–34.
- Cumashi, A., Ushakova, N. A., Preobrazhenskaya, M. E., D’Incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozovich, G. E., Berman, A. E., Bilan, M. I., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., Nifantiev, N. E. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **5**, 541–552.

- Cunha, L., Grenha, A. (2016) Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs* **14**, 42.
- Dong, H., Lin, S., Zhang, Q., Chen, H., Lan, W., Li, H., Qin, W. (2016) Effect of extraction methods on the properties and antioxidant activities of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides. *Int J Biol Macromol.* **93**, 179–185.
- Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., Cerezo, A. S. (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res.* **333**, 281–293.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal Chem.* **28(3)**, 350-356.
- El-Gamal, A. A. (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.* **18**, 1–25
- Eskilsson, S., Bjorklund, E. (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J Chrom A.* **902**, 227–250.
- Favretto, L. (2004) Basic guidelines for microwave organic chemistry applications. Milestone, Bergamo
- Felkai-Haddache, L., Remini, H., Dulong, V., Mamou-Belhabib, K., Picton, L., Madani, K., Rihouey, C. (2016) Conventional and microwave-assisted extraction of mucilage from *Opuntia ficus-indica* Cladodes: Physico-chemical and rheological properties. *Food Bioprocess Tech.* **9(3)**, 481–492.
- Font, N., Hernandez, F., Hogendoorn, E. A., Baumann, R. A., van Zoonen, P. (1998) Microwave-assisted solvent extraction and reversed-phase liquid chromatography–UV detection for screening soils for sulfonylurea herbicides. *J. Chrom. A.* **798**, 179–186.
- Gouveia, V., Seca, A. M., Barreto, M. C., Pinto, D. C. (2013) Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga *Cystoseira abies-marina*. *Mini-Rev Med Chem.* **13**, 1150.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Tech.* **22**, 315–326.
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., Muffler, K. (2012) Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Proc Biochem.* **47**, 1691–1698.

- Hemmingson, J. A., Falshow, R., Furneaux, R. H., Thompson, K. (2006) Structure and antiviral activity of the galactofucans sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *J Appl Phycol.* **18**, 185–193.
- Hernández-Garibay, E., Zertuche-González, J., Pacheco-Ruíz, I. (2010) Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *J Appl Phycol.* **23**, 537–542
- Hoagland, D. R., Lieb, L. L. (1915) The complex carbohydrates and forms of sulphur in marine algae of the Pacific coast. *J Biol Chem.* **23**, 287–297.
- Hu, W., Zhao, Y., Yang, Y., Zhang, H., Ding, C., Hu, C., Yuan, M. (2019) Microwave-assisted extraction, physicochemical characterization and bioactivity of polysaccharides from *Camptotheca acuminata* fruits. *Int J Biological Macromolecules.* **133**, 127-136.
- Ivanova, V., Rouseva, R., Kolarova, M., Serkedjieva, J., Rachev, R., Manolova, N. (1994) Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. *Prep. Biochem.* **24**, 83–97.
- Jujnović, A. (2019) Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira sp.* primjenom različitih tehnika ekstrakcije. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. (2015) Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int J Food Sci Tech.* **50**, 24–31.
- Kaufmann, B., Christen, P. (2002) Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochem. Anal.* **13**, 105–113.
- Kylin H. (1913) The biochemistry of seaweed. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* **83**, 171–97.
- Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731–737.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R. (2008) Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* **13**, 1671–1695.
- Li, B., Wei, X. J., Sun, J. L., Xu, S. Y. (2006) Structural investigation of a fucoidan containing a fucose free core from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* **341**, 1135–1146.

- Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. U: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components (Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P., ured.), John Wiley & Sons, Inc. 171-178.
- Lim, S. J., Aida, W. M. W. (2017) Chapter 3 - Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. U: Seaweed Polysaccharides (Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., ured.) str. 27-46. Elsevier
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Mamot, S., Ropien, J., Mazita Mohd, D. (2014) Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocoll.* **42**, 280–288.
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Latip, J., Badri, K. H., Hassan, O., Yamin, B. M. (2016) Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chem.* **209**, 267–273.
- Li, S., Zhang, H., Han, D., Row, K. H. (2012) Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology. *Korean J. Chem. Eng.* **29(5)**, 650-656.
- Long, X., Yan, Q., Peng, L., Liu, X., Luo, X. (2019) Effect of Various Temperatures on Bletillae Rhizoma Polysaccharide Extraction and Physicochemical Properties. *Appl. Sci.* **9**, 116
- Lopez, A., Rico, M., Rivero, A., Tangil, M. S. (2011) The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *Food Chem.* **125**, 1104-1109.
- Love, J., Percival, E. (1964) Polysaccharides of green seaweed *Codium fragile*. 2. Water-soluble sulphated polysaccharides. *J Chem Soc.* 3338–3345.
- Macquarrie, D. J., Clark, J. H., Fitzpatrick, E. (2012) The microwave pyrolysis of biomass. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, **6(5)**, 549-560.
- Maruyama, H., Yamamoto, I. (1984) An antitumor fraction from an edible brown seaweed, *Laminaria religiosa*. *Hydrobiologia* **116**, 534–536.

McHugh, D. J. (1987) Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds—FAO Fisheries Technical Paper 288. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

McHugh, D. J. (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, **441**, 1-98.

Nagaoka, M., Shibata, H., Kimura-Takagi, I., Hashimoto, S., Kimura, K., Makino, T., Aiyama, R., Ueyama, S., Yokokura, T. (1999) Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. *Glycocon. J.* **16**, 19–26.

Navarro, D., Flores, M., Stortz, C. (2007) Microwave-assisted desulfation of sulfated polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **69**, 742–747.

Nielsen, S. S. (2010) Food Analysis Laboratory Manual, 4. izd., Springer International Publishing, New York City, SAD.

Pan, X. J., Niu, G. G., Liu, H. Z. (2003) Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. *Chem Eng Processing.* **42(2)**, 129-133.

Ponce, N. M. A., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., Stortz, C. A. (2003) Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis* extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr. Res.* **338**, 153–165.

Qia, H., Huang, L., Liu, X., Liu, D., Zhang, Q., Liu, S. (2012) Antihyperlipidemic activity of high sulfate content derivative of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Carbohydr. Polym.* **87**, 1637–1640.

Rafiee, Z., Jafari, S. M., Alami, M., Khomeiri, M. (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci.* **21**, 738-745.

Ren, B., Chen, C., Li, C., Fu, X., You, L., Liu, R. H. (2017) Optimization of microwave-assisted extraction of *Sargassum thunbergii* polysaccharides and its antioxidant and hypoglycemic activities. *Carbohydr. Polym.* **173**, 192–201.

Renn, D. (1997) Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status, needs and prospects. *Trends Biotechnol.* **15**, 9–14.



Rioux, L. E., Turgeon, S. L., Beaulieu, M. (2007) Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* **69**, 530–537.

Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., Teixeira J. A. (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1137-1144.

Şahin, S., Şamlı, R. (2013) Optimization of olive leaf extract obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* **20**, 595–602.

Schmiedeberg, J. E. O. (1885) Gesellschaft deutscher Naturforscher und Ärzte: Leipzig. *Tageblatt der Versammlung*, **58**, 427.

Scott, J. E. (1965) Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. U: Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistler, R. L., BeMiller, J. N., Wolfrom, M. L., ured.) 5. Izd., Academic Press, New York, 38-44.

Seely, G. R., Vidaver, W. E., Duncan, M. J. (1972) Preparative and Analytical Extraction of Pigments from Brown Algae with Dimethyl Sulfoxide. *Mar. Biol.* **12(3)**, 184-188.

Shortle, E., O'Grady, M. N., Giloroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.

Shu, Y. Y., Ko, M. Y., Chang, Y. S. (2003) Microwave-assisted extraction of ginsenosides from ginseng root. *Microchem J.* **74(2)**, 131-139.

Siddhanta, A. K, Goswami, A. M., Ramavat, B. K., Mody, K. H., Mairh, O. P. (2001) Water soluble polysaccharides of marine algal species of *Ulva* (Ulvales, Chlorophyta) of Indian waters. *Indian J Mar Sci.* **30**, 166–172.

Simon, B. W. Carrageenan. < <https://slideplayer.info/slide/2594698>> Pristupljeno 2. Rujna 2019.

Spar Eskilsson, S., Bjorklund, E. (2000) Analytical scale microwave assisted extraction. *J Chromatogr A.* **902**, 227-250.

Stanley, N. (1987) Production, properties and uses of carrageenan. U: Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds (McHugh, D. J., ured.), Food and Agriculture

Organization of the United Nations, Rome, Italy, 116–146.

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**, 63-69.

Synytsya, A., Kim, W. J., Kim, S. M., Pohl, R., Synytsya, A., Kvasnicka, F., Copikova, J., Park, Y.I. (2010) Structure and antitumor activity of fucoidan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydr. Polym.* **81**, 41–48.

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

Usov, A. I., Smrnova, G. P., Klochkova, N. G. (2001) Polysaccharides of algae: 55. Polysaccharide composition of several brown algae from Kamchatka. *Russian J. Bioorg. Chem.* **27** (6), 395–399.

Vazquez-Delfin, E., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. (2014) Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol.* **26**(2), 901-907.

Veggi, P. C., Martinez, J., Meireles, M. A. A. (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Microwave - assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice (Chemat, F., Cravotto, G., ured.), *Springer Science+Business Media*, str.15-52.

Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., Shim, M. S. (2016) Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery. *Polymers*, **8**(2), 30.

Dong, H., Lin, S., Zhang, Q., Chen, H., Lan, W., Li, H., Qin, W. (2016) Effect of extraction methods on the properties and antioxidant activities of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides. *Int J Biol Macromol*, **93**, 179–185.

Vidyasagar, A. (2016) "What Are Algae?". Live Science. <<https://www.livescience.com/54979-what-are-algae.html>> Pristupljeno 1. Kolovoza 2019.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review. *Innov. Food Sci. Technol.* **9**, 161–169.

Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., Li, P. (2010a) Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **46**, 6–12.

Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., Zhang, Q. (2010b) Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.* **82**, 118–121.

Xu, S. Y., Huang X., Cheong K. L. (2017) Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Mar. Drugs* **15**, 388.

Yang, Y., Hong, T., Zhao, J. (2019) Ecological Effect of the Shelled Treatment on Microwave Heating Uniformity. *Ekoloji* **28(107)**, 4603-4610.

Yuan, Y., Macquarrie, D. (2015a) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* **29**, 101-7.

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

Zhu, Z. Y., Dong, F., Liu, X., Lv, Q., YingYang, L. F., Zhang, Y. (2016) Effects of extraction methods on the yield, chemical structure and anti-tumor activity of polysaccharides from *Cordyceps gunnii* mycelia. *Carbohydr. Polym.* **140**, 461–471.

Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Chizhov, A. O., Krupnova, T. N., Sundukova, E. V., Isakov, V. V. (2003) Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* **294**, 1–13.

Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Popivnich, I. B., Isakov, V. V., Scobun, A. S., Sundukova, E. V. (1999) A new procedure for the separation of water soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* **322**, 32–39.

## Izjava o izvornosti

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

*Matya Juric*

---

ime i prezime studenta