

# Predtretman ultrazvukom u ekstrakciji polisaharida iz smeđih algi *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*

---

**Novak, Jelena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:159:061579>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-16**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Jelena Novak

1231/PI

**PREDTRETMAN ULTRAZVUKOM  
U EKSTRAKCIJI POLISAHARIDA  
IZ SMEĐIH ALGI *Cystoseira barbata*  
I *Fucus virsoides***

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

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

## **ZAHVALA**

*Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanom povjerenju, suradnji i susretljivosti. Najljepša hvala mag.ing. Ani Dobrinčić na velikom trudu, strpljenju, prijateljskom pristupu i prenesenom znanju tijekom izrade cijelog rada.*

*Zahvaljujem se svojoj obitelji, posebno svojim roditeljima, na bezuvjetnoj potpori, velikom razumijevanju i vjeri u mene. Hvala i svim mojim prijateljima i kolegama koji su mi bili oslonac i uljepšali mi studiranje.*

*Na kraju, zahvaljujem se i onima koji ne mogu podijeliti ove sretne trenutke sa mnom, a borili su se uz mene čitavo ovo vrijeme.*

## 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

### PREDTRETMAN ULTRAZVUKOM U EKSTRAKCIJI POLISAHARIDA IZ SMEĐIH ALGI *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*

Jelena Novak, 1231/PI

**Sažetak:** Smeđe alge *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* bogat su izvor bioaktivnih komponenata koje između ostalog čine i sulfatirani polisaharidi koji imaju pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj tretmana ultrazvukom na prinos ekstrakcije, koncentraciju sulfatnih grupa i ukupnih ugljikohidrata iz algi *C. barbata* i *F. virsoides*. Prije ekstrakcije polisaharida, predtretmanom acetonom i etanolom uklanjaju se interferirajući spojevi poput fenola i pigmenata čija je koncentracija određena. Za ekstrakciju polisaharida korištena su dva otapala (voda i 0,1 M HCl) i četiri metode ekstrakcije koje uključuju konvencionalnu ekstrakciju u trajanju od 3 sata, ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom u trajanju od 30 minuta te konvencionalnu ekstrakciju uz predtretman ultrazvukom od 5 i 15 minuta. Dobiveni rezultati upućuju da predtretman ultrazvukom daje niži prinos polisaharida, veći stupanj degradacije alge, najveću koncentraciju sulfatnih grupa te najmanju koncentraciju ukupnih ugljikohidrata u usporedbi s konvencionalnom ekstrakcijom.

**Ključne riječi:** predtretman, ultrazvuk, ekstrakcija, polisaharidi, alge

**Rad sadrži:** 57 stranica, 9 slika, 6 tablica, 156 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

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

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

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 16. srpnja 2020.

## 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

### ULTRASOUND PRETREATMENT IN EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM BROWN ALGAE *Cystoseira barbata* AND *Fucus virsoides*

*Jelena Novak, 1231/PI*

**Abstract:** Brown algae *Cystoseira barbata* and *Fucus virsoides* are a rich source of bioactive components, which include sulfated polysaccharides that have a positive impact on human health. The aim of this study was to determine the effect of ultrasound treatment on extraction yield, concentration of sulfate groups and total carbohydrates from *C. barbata* and *F. virsoides*. Prior to polysaccharide extraction, interfering compounds such as phenols and pigments whose concentration has been determined are removed by the pretreatment with acetone and ethanol. Two solvents (water and 0.1 M HCl) and four extraction methods were used for polysaccharide extraction, including conventional extraction for 3 hours, ultrasound assisted extraction for 30 minutes and conventional extraction with ultrasound pretreatment for 5 and 15 minutes. The results indicate that ultrasound pretreatment gives lower polysaccharide yields, a higher algae degradation, the highest concentration of sulfate groups and the lowest total carbohydrates compared to conventional extraction.

**Keywords:** *pretreatment, ultrasound, extraction, polysaccharides, algae*

**Thesis contains:** 57 pages, 9 figures, 6 tables, 156 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:** *prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac*

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

#### **Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 16th July 2020

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1. ALGE</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. <i>Cystoseira barbata</i> .....	4
2.1.2. <i>Fucus virsoides</i> .....	5
<b>2.2. POLISAHARIDI</b> .....	<b>6</b>
2.2.1. Karagenan.....	6
2.2.2. Ulvan .....	7
2.2.3. Alginat.....	8
2.2.4. Laminarin .....	8
2.2.5. Fukoidan.....	9
<b>2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI</b> .....	<b>10</b>
2.3.1. Ekstrakcija fukoidana .....	12
2.3.2. Predtretman .....	13
2.3.3. Ekstrakcija.....	13
2.3.4. Pročišćavanje.....	14
<b>2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM</b> .....	<b>15</b>
<b>2.5. PRIMJENA FUKOIDANA</b> .....	<b>17</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b> .....	<b>19</b>
3.1.1. Uzorci alga <i>Cystoseira barbata</i> i <i>Fucus virsoides</i> .....	19
3.1.2. Kemikalije .....	19
3.1.3. Aparatura.....	20
3.1.4. Pribor.....	20
<b>3.2. METODE</b> .....	<b>21</b>
3.2.1. Predtretman .....	22
3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida.....	22
3.2.3. Konvencionalna ekstrakcija uz predtretman ultrazvukom .....	22
3.2.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom.....	22
3.2.5. Postupci nakon ekstrakcije .....	23
3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata .....	23
3.2.7. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa .....	24
3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenola .....	25
3.2.9. Određivanje koncentracije klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida .....	26
3.2.10. Statistička obrada rezultata .....	27



<b>4. REZULTATI I RASPRAVA.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA PRINOS POLISAHARIDA... 31</b>	
<b>4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA STUPANJ DEGRADACIJE ALGE.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU SULFATNIH GRUPA .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5. ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA .....</b>	<b>38</b>
4.5.1. Koncentracija ukupnih fenola .....	38
4.5.2. Koncentracija pigmenata.....	39
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>41</b>
<b>6. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>42</b>

# 1. UVOD

Proizvodnja bioaktivnih spojeva iz algi u posljednje je vrijeme značajno porasla zbog povećanja svijesti o njihovoj nutritivnoj i terapijskoj vrijednosti. Alge su bogate hranjivim tvarima i bioaktivnim komponentama (proteinima, polisaharidima, lipidima, vitaminima, mineralima, polifenolima, peptidima, aminokiselinama, pigmentima i sekundarnim metabolitima) s raznolikom primjenom u prehrambenoj, kozmetičkoj i tekstilnoj industriji (Okolie i sur., 2019). Njihovi pigmenti temelj su fotosinteze i određuju boju alge pa ih prema tome dijelimo na zelene, smeđe i crvene alge. Smeđe alge nalaze se na drugom mjestu po brojnosti vrsta, a polisaharidi koje one sadrže (fukoidan, laminarin, alginat, manitol) od iznimne su važnosti zbog njihovog antitumornog, antiupalnog, antivirusnog i antikoagulacijskog djelovanja. Bioaktivni spojevi smeđih algi sve se više izoliraju i upotrebljavaju kao funkcionalna hrana. Upravo zbog njihovog pozitivnog djelovanja na ljudsko zdravlje, istražuju se procesi kojima bi se očuvala vrijednost navedenih spojeva tijekom prerade algi.

Ekstrakcija je jedan od kritičnih koraka u procesu prerade algi, budući da može ograničiti razvoj ekonomski održivih metoda (Morais, 2013). Obzirom na određene nedostatke konvencionalnih metoda ekstrakcije (dugotrajnost, niski prinosi, visoka temperatura), pribjegava se razvoju novih metoda ekstrakcije poput upotrebe visokog tlaka, superkritičnih plinova, pulsirajućeg električnog polja, enzima, ultrazvuka te mikrovalova. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom smatra se efikasnom metodom ekstrakcije u prehrambenoj industriji, budući da smanjuje vrijeme samog procesa, kao i upotrebe otapala. Također, upotrebom ultrazvuka primjenjuju se niže temperature što smanjuje mogućnost termičkih oštećenja funkcionalnih komponenata ili gubitka hlapljivih komponenti tijekom zagrijavanja (Dong i sur., 2011).

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj primjene ultrazvuka na prinos ekstrakcije, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata i sulfatnih grupa polisaharida iz smeđih algi *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*. Konvencionalna metoda ekstrakcije uspoređena je s ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u trajanju od 30 min i konvencionalnom ekstrakcijom uz prethodno provedeni predtretman ultrazvukom u trajanju od 5 i 15 minuta. Nadalje, istražen je utjecaj vode i 0,1 M HCl kao ekstrakcijskih otapala te je određena koncentracija ukupnih fenola i pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) u acetonskim i etanolnim ekstraktima iz predtretmana.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. ALGE

Alge predstavljaju heterogenu skupinu vodenih, autotrofnih i fotosintetskih organizama koji mogu biti jednostanični (mikroalge), višestanični (makroalge) i kolonijalni (Moroney i Ynalvez, 2009). Pripadaju carstvu Protista, s iznimkom modrozelenih algi koje pripadaju carstvu Prokariota. Budući da sve alge obavljaju fotosintezu u kojoj primarno nastaju hranjive tvari koje same iskorištavaju, kao nusproizvod procesa nastaje kisik pa su one zaslužne za proizvodnju 30 – 50 % kisika na Zemlji kojeg ljudi i kopnene životinje koriste za disanje (Andersen i Lewin, 2019). One mogu živjeti u morskim i slatkovodnim staništima, pri čemu mogu biti pričvršćene za dno ili pak živjeti slobodno kao dio planktona. Na temelju fotosintetskih pigmenata koji određuju i njihovu boju, alge se klasificiraju u tri skupine: zelene alge (*Chlorophyceae*), smeđe alge (*Phaeophyceae*) i crvene alge (*Rhodophyceae*) (Kadam i sur., 2013).

Zelene alge sadrže fotosintetske pigmente klorofil a, klorofil b (koji im daju izrazito zelenu boju) te karotenoide i ksantofile koji su u jednakim omjerima kao u višim biljkama, no zelene se alge od viših biljaka razlikuju po staništu jer se primarno nalaze u vodenom okolišu (Schroeder i sur., 2015). To je najopsežnija skupina algi koju čini između 9000 i 12000 vrsta koje mogu biti u rasponu od mikroskopski sitnih (1  $\mu\text{m}$ ), nitastih algi koje tvore busenčice do makroalgi koje mogu narasti do više od 50 m i čije tijelo nalikuje na građu razvijenijih biljaka (Hrvatska enciklopedija, 2020).

Smeđe alge kao dominantni pigment sadrže fukoksantin koji je odgovoran za njihovu boju te maskira druge pigmente poput klorofila a i c, kao i druge ksantofile (Gupta i Abu-Ghannam, 2011). Većina smeđih algi nalazi se u morskim predjelima i u umjereno hladnim dijelovima oceana, a ukupno postoji između 1500 i 2000 vrsta (Kadam i sur., 2013). Prema građi, veličini i staništu, smeđe se alge međusobno značajno razlikuju. Bogate su topljivim prehrambenim vlaknima i jodom, dok je glavna rezerva ugljikohidrata laminarin (Wells i sur., 2017). One su najbrojnija skupina algi u Jadranskom moru te predstavljaju izvor hrane brojnim morskim beskralježnjacima.

Crvene alge imaju raspon boje od svijetlocrvene do ljubičaste, a za tu je boju zaslužan crveni pigment fikoeritrin. One su uglavnom višestanične, a broje oko 6500 vrsta pri čemu je

najpoznatija vrsta Nori koja se nakon sušenja preša u listove i koristi u japanskoj kuhinji kod pripreme sushija (Moroney i Ynalvez, 2009).

Alge proizvode različite sekundarne metabolite koji predstavljaju biološki aktivne tvari, a sve kao posljedica prilagodbe ekstremnim uvjetima svjetlosti, saliniteta i temperature u kojima često žive (Ibañez i sur., 2012). Od različitih skupina biološki aktivnih tvari, alge su bogat izvor polisaharida, proteina, lipida, fenolnih spojeva, florotanina, tokoferola, bromfenola, terpena, askorbinske kiseline, minerala, pigmenata te biološki aktivnih enzima kao što su superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza i katalaza (Dhara i sur., 2017).

Od polisaharida, najznačajniji su galaktan, fukoidan, laminarin i alginati, a većina njih nije probavljiva u ljudskom organizmu i smatraju se prehranbenim vlaknima (Baweja i sur., 2016). Proteini su glavni makronutrijenti u mikroalgama što je i razlog početka njihove masovne proizvodnje. U crvenim i zelenim makroalgama prisutne su veće količine proteina (10 – 47 % s.tv.) nego u smeđim algama (3 – 15 % s.tv.) (Baweja i sur., 2016). Najvažniji protein iz algi je lektin koji se veže s ugljikohidratima i sudjeluje u brojnim biološkim procesima. Oni imaju izrazita antibakterijska, antivirusna i protuupalna djelovanja (Cunningham i Joshi, 2010). Vrste lipida koje se uglavnom nalaze u algama su fosfolipidi i glikolipidi. Također, alge su uz ribu jedan od najvažnijih izvora omega-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina te sadrže dokozaheksaensku (DHA) i eikozapentaensku (EPA) kiselinu. Sadrže i omega-6 masne kiseline i to  $\gamma$ -linolensku i arahidonsku kiselinu. Najznačajniji polifenoli iz algi su fenolne kiseline, flavonoidi, izoflavoni, cimetna kiselina, benzojeva kiselina, kvercetin i lignani (Keyrouz i sur., 2011). Zelene i crvene alge imaju niske koncentracije fenola u odnosu na smeđe alge koje imaju visoke koncentracije florotanina, npr. ekcola ili dieckola (Gupta i Abu-Ghannam, 2011). Florotanini pokazuju antidijabetičke, antihiperlipidemijske i protuupalne učinke pa mogu biti korisni kao funkcionalni sastojak hrane u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i dijabetesa (Murray i sur., 2017). Alge su bogat izvor minerala pa se zbog toga često koriste u obliku dodataka prehrani (Nwosu i sur., 2011). Sadrže cink, mangan, selen i bakar koji su strukturne komponente nekih antioksidacijskih enzima i doprinose njihovoj aktivnosti (Batista González i sur., 2012). Pigmenti pronađeni kod algi dijele se na tri glavne skupine: klorofili, karotenoidi i fikobiliproteini, a obzirom na veliku raznovrsnost navedenih pigmenata, alge predstavljaju vrijedan izvor prirodnih bojila (Khattar i sur., 2009).

U prehrambenoj industriji alge imaju široku primjenu. Upotrebljavaju se kao dodaci prehrani, dodaju se u mesne proizvode poput odrezaka i kobasica te u ribu i riblja ulja. Osim toga, alge

se mogu dodati i u proizvode od žitarica poput tjestenine i kruha (Ścieszka i Klewicka, 2018). Također, budući da imaju određene fiziološke učinke poput antioksidativnog i protuupalnog djelovanja, te uz izrazitu energetsku i prehrambenu vrijednost, alge se upotrebljavaju kao funkcionalna hrana (Herrero i sur., 2006).

### 2.1.1. *Cystoseira barbata*

*Cystoseira* je rod smeđih morskih algi koji pripada u red *Fucales* te u obitelj *Sargassaceae* koja se najčešće nalazi na obalama Sredozemnog mora te istočnog Atlantskog oceana, a može se pronaći i u Crnom moru (Marin i Timofte, 2011). Najrasprostranjenija je i najznačajnija smeđa alga Jadranskog mora. Poznato je oko 294 vrsta ovog roda te je dokazana njihova izrazita prehrambena vrijednost i farmakološka primjena. Većina istraživanja koja su provedena kod algi iz roda *Cystoseira* pokazuju veliku raznolikost sekundarnih metabolita s biološkom aktivnošću, uključujući florotanin, terpenoide i polisaharide (Bruno de Sousa i sur., 2017).

*Cystoseira barbata* velika je, fleksibilna, žuto-smeđa alga (Slika 1.) koja može narasti do 170 cm. Indikator je čistoće vode, a prepoznata je kao izrazito vrijedna sirovina u industriji i poljoprivredi (Petrova-Karadzova, 1975). Za primjenu u industriji, ekstrahiraju se alginska kiselina i njezine soli kao predstavnici jednih od najvrjednijih produkata koji proizvode morske alge. Alginska kiselina prisutna je u staničnim stijenkama alge *C. barbata* (do 35 % s. tv. alge) u obliku kalcijevog i magnezijevog alginata, a princip ekstrakcije bazira se na modifikaciji netopljivih alginata (kalcijeve i magnezijeve soli) u topive (natrijeve i kalijeve soli) (Manev i sur., 2013).



Slika 1. Talus alge *Cystoseira barbata* iz Jadranskog mora (Italija) (Pennesi i sur., 2014)

*C. barbata* sadrži spojeve izrazite biološke aktivnosti, uključujući laminarin koji ima antioksidacijska, antibakterijska i zacjeljujuća svojstva, fukoksantin koji se koristi kao pojačivač oksidacijske stabilnosti kod mesnih proizvoda te spojeve koji se koriste kao biokonzervansi (Sellimi i sur., 2017). Također, utvrđeno je da se alge vrste *C. barbata* izronjene iz područja Crnog mora primjenjuju kao funkcionalna hrana, dok osušena biomasa ima potencijal da se koristi kao biosorbent (Yalcin i sur., 2012).

### 2.1.2. *Fucus virsoides*

*Fucus virsoides* endem je Jadranskog mora i jedina vrsta roda *Fucus* koja se pojavljuje u Sredozemnom moru (Rindi i Battelli, 2005). Pripada u porodicu *Fucaceae* koja pak pripada u smeđe, višestanične alge (Rajan, 2002) koje se u Jadranskom moru pojavljuju u obliku roda *Sargassum*, *Fucus* i *Cystoseira*. To su isključivo morske alge koje žive na stjenovitim obalama umjerenog pojasa sjeverne hemisfere. U Jadranskom moru prevladava u sjevernom i srednjem dijelu zbog utjecaja slatke vode u tim područjima, koji je pogodan za ovu algu.

Tijelo alge *F. virsoides* čini tamnosmeđa steljka koja je plosnata, vrpčasta i kožaste strukture (Slika 2.) te je bazalnom pločicom pričvršćena za podlogu (Rajan, 2002). Sama se steljka sastoji od morfološki različitih dijelova i to od stabalca (držak, kauloid), bazalne pločice (rizoid) i lisnatih dijelova (filoidi). Najveći dio steljke čini list koji je bilateralni i vrpčasti dio tijela te joj predstavlja glavno vanjsko morfološko obilježje. List je građen od središnjeg rebra oko kojeg se nalaze zračni mjehurići koji osiguravaju uspravan položaj alge tijekom plime. Površina samog lista ima točkastu strukturu i skliska je zbog prisutnosti želatinoznog materijala (Rajan, 2002). Upravo mu želatinozni materijal omogućava preživljavanje izvan vode što je iznimno važna prilagodba budući da živi u zoni plime i oseke pa polovicu svog života provede izvan vode (Linardić, 1949). Zreli terminalni listovi imaju nabubrene fertilne strukture, odnosno receptakule u kojima se nalaze spolni organi. Razmnožavanje alge *F. virsoides* može biti spolno i vegetativno, pri čemu se spolno razmnožavanje odvija pomoću oogonija i ateridija (Rajan, 2002).



Slika 2. Smeđa alga *Fucus virsoides* (Verlaque i sur., 2019)

## 2.2. POLISAHARIDI

Glavna uloga polisaharida kod algi je sprječavanje njihovog isušivanja i fleksibilnost same alge. Ovisno o staničnoj strukturi alge i odgovarajućoj taksonomskoj klasifikaciji, postoje razne vrste polisaharida koje alge mogu sadržavati (Ferreira i sur., 2012). Oni su sastavni dio njihove stanične stijenke, a količina polisaharida ovisi o godišnjem dobu, pri čemu može postići udio od 76 % suhe mase alge (Holdt i Kraan, 2011).

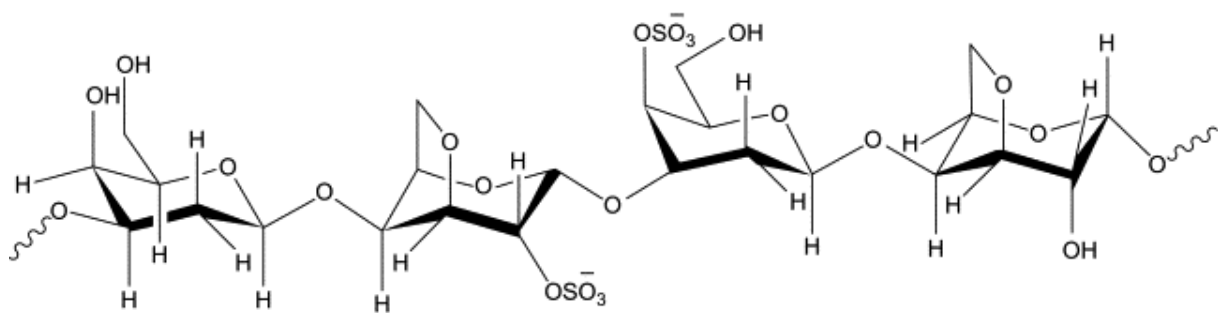
Polisaharidi izolirani iz algi imaju veliku ulogu u prehrambenoj industriji te se njihov potencijal iskorištava u obliku stabilizatora, sredstva za zgrušnjavanje te punila. Također, većina polisaharida iz algi su prehrambena vlakna te imaju i ulogu prebiotika čime poboljšavaju zdravlje čovjeka. Općenito, mnogi polisaharidi imaju pozitivan učinak na probavni sustav životinja, a ukoliko su izolirani iz algi, mogu biti učinkoviti i netoksični antioksidansi (Li i Kim, 2011; Souza i sur., 2012.).

Sulfatirani polisaharidi poput karagenana u crvenim algama, ulvana u zelenim algama te fukoidana i laminarina u smeđim algama zaslužni su za različita biološka svojstva algi. Upravo se velike količine sulfatiranih polisaharida koje sadrže smeđe alge potencijalno mogu iskorištavati kao funkcionalni sastojci hrane s pozitivnim učinkom na zdravlje (Wijesinghe i Jeon, 2013). Sulfatirani polisaharidi mogu spriječiti djelovanje različitih virusa i bakterija, a općenito su to kompleksne makromolekule koje reguliraju aktivnost biofaktora poput fibroblasta i interferona (Leonard i sur., 2010).

### 2.2.1. Karagenan

Karagenan je opće ime za kompleksnu mješavinu sulfatiranih galaktana koji se dobivaju iz crvenih algi. Ovaj polisaharid sadrži linearni galaktanski kostur s disaharidnim ponavljajućim sekvencama 1,3- $\alpha$ -D-galaktoze i 1,4- $\beta$ -D-galaktoze (Slika 3.). Postoje tri vrste karagenana,

Kappa, Iota i Lambda, koji se razlikuju obzirom na broj i smještaj sulfatnih grupa te prisutnost 3,6-anhidrogalaktoznog kopolimera (Cunha i sur., 2016).

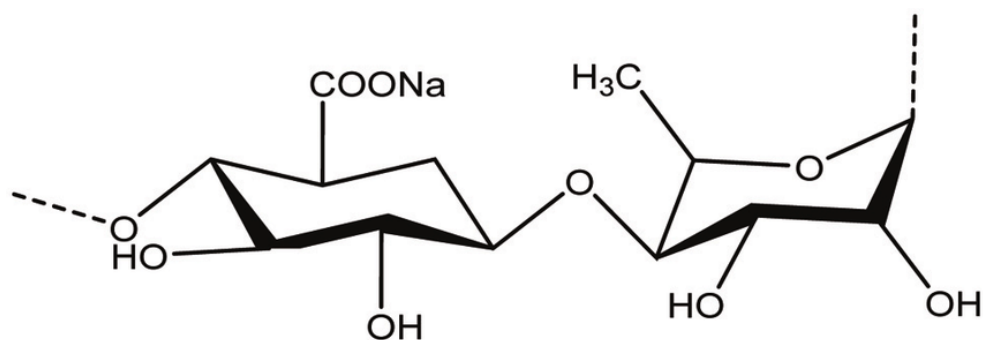


Slika 3. Struktura karagenana (Kariduraganavar i sur., 2014)

Karagenan ima izrazita funkcionalna svojstva pa se primjenjuje u prehrambenoj, tekstilnoj i kozmetičkoj industriji (Shchipunov, 2003). U prehrambenoj se industriji koristi za stabilizaciju prehrambenih proizvoda te kao funkcionalni sastojak u pripremi mliječnih gelova. Također, Kappa karagenan ima važnu ulogu u mesnoj industriji, glazurama za kolače i desertima, budući da može formirati gel u prisutnosti kalijevih iona.

#### 2.2.2. Ulvan

Ulvan je kompleksni polisaharid koji čini 8 – 29 % suhe tvari zelenih algi (Lahaye i Robic, 2007). Sastoji se od L-raminoze, D-ksiloze, D-glukoze i D-glukuronske kiseline (Brading i sur., 1954). Većina sulfatnih grupa nalazi se na položaju C-3 raminoznih ostataka, dok je manji dio na položaju C-2 ostataka ksiloze (Slika 4.).



Slika 4. Struktura ulvana (Shahidi i Rahman, 2018)

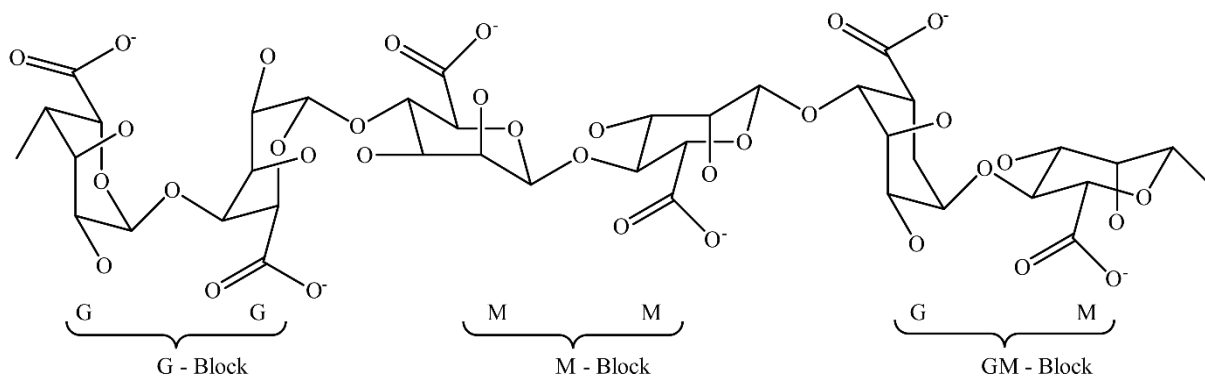
Ulvan pokazuje brojne fizikalno-kemijske i biološke značajke koje imaju velik potencijal za primjenu u proizvodnji hrane, farmaciji te poljoprivredi, a ima i veliku biološku aktivnost, posebice antioksidativnu aktivnost (Qi i sur. 2005). Upravo je to razlog njegovog pozitivnog utjecaja na snižavanje ukupnog serumskog kolesterola, LDL kolesterola i smanjenje



triglicerida kao rizičnih faktora pri kardiovaskularnim bolestima (Kim i sur., 2010). Ipak, struktura ulvana uvelike utječe na njegova reološka svojstva, npr. velika količina uronske kiseline (približno 30 %) ima negativan utjecaj na njegovu viskoznost (Siddhanta i sur., 2001)

### 2.2.3. Alginat

Alginat je polianionski linearni kopolimer koji se sastoji od blokova  $\beta$ -D-manuronske (M - blok) i  $\alpha$ -L-guluronske (G - blok) kiseline povezane  $\alpha$ -1,4 glikozidnom vezom (Slika 5.) (Rowley i sur., 1999). Način dobivanja alginata je ekstrakcija iz smeđih morskih algi, a proizvode ga i bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Azotobacter* (Remminghorst i Rehm, 2006). Značajno je njegovo stvaranje gela koje je uzrokovano dodatkom viševalentnih kationa u vodenu otopinu alginata čime se formiraju ionski mostovi između lanaca jer kationi vežu susjedne alginatne lance. Karakterizira ga širok raspon pora (5 – 200 nm), a njegova je propusnost uvjetovana koncentracijom i prirodom iona koji utječu na učvršćivanje, pri čemu veće koncentracije iona stvaraju čvršće strukture (Aslani i Kennedy, 2006).



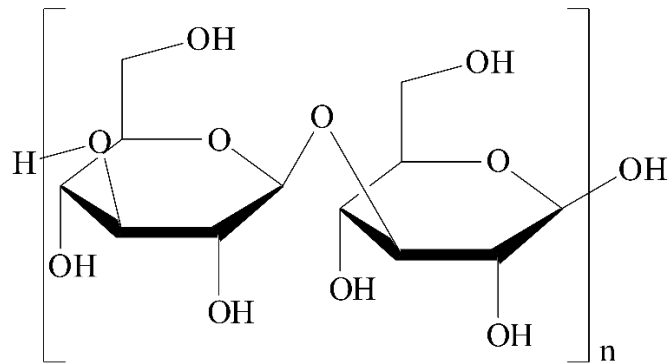
Slika 5. Struktura alginata (Collado-González i sur., 2020)

Alginat se često primjenjuje za inkapsulaciju terapijskih agenasa te postaje jedan od najistraživanijih materijala za inkapsulaciju živih stanica. Također, popularna je i njegova primjena u biomedicinske svrhe, za liječenje tumora na mozgu, anemije i krioprezervaciju (Gryshkov i sur., 2013).

### 2.2.4. Laminarin

Glavni skladišni polisaharid smeđih algi naziva se laminarin, čija je kemijska struktura sastavljena od 1,3- $\beta$ -D-glukana s 1,6- $\beta$  ograncima s različitim reducirajućim krajevima koji mogu imati ili ostatke manitola ili pak glukoze (Slika 6). Njegova količina u algama može biti između 0 % i 18 % (Indegaard i Minsaas, 1991), a sadržaj ovisi o vrsti i uvjetima okoliša. Također, smanjenje nitrita i nitrata u vodi stimulira sintezu laminarina u algama (Chapman i

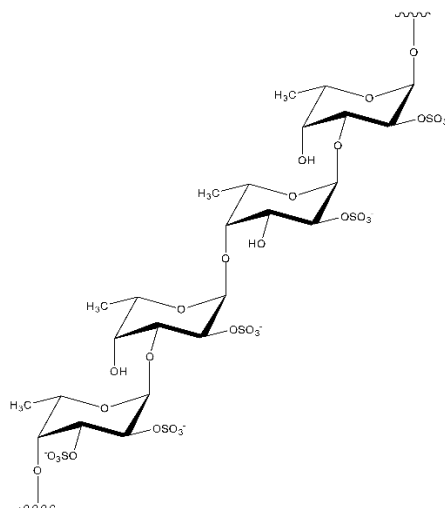
Craigie, 1977). Alge iskorištavaju nitrite i nitrate kao izvore dušika prilikom svog rasta, a prilikom smanjenja njihove količine u vodi, rast algi je limitiran pa ih to potiče na sintezu laminarina. Nadalje, on algama predstavlja i izvor ugljika za rast tijekom zimskih mjeseci, a pokazuje prebiotičku i antibakterijsku aktivnost (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).



Slika 6. Struktura laminarina (Bae i sur., 2020)

#### 2.2.5. Fukoidan

Fukoidani su sulfatirani polisaharidi bogati fruktozom koji se najčešće nalaze u smeđim algama iz reda *Laminariales* i *Fucales* te se ne pojavljuju u drugim vrstama algi i kopnenim biljkama. Njihova je struktura jednostavne kemijske kompozicije čiju okosnicu uglavnom čini L-fukoza povezana  $\alpha$ -1,3 vezama ili  $\alpha$ -1,4 vezama (Slika 7.). Također, fukoidani sadrže i manje komponente u različitim omjerima i to galaktozu, manozu, ksilozu, glukozu i uroničnu kiselinu (Wu i sur., 2016). Predstavljaju 5 – 10 % suhe tvari alge, velikog su raspona molekulske mase i to od 7 kDa do 2379 kDa. Sadržaj sulfata je između 5 % i 38 % (Lim i sur., 2017) te su topivi su vodi.



Slika 7. Struktura fukoidana iz alge *Fucus vesiculosus* (Van Weelden i sur., 2019)

U posljednje vrijeme proučavana su bioaktivna svojstva fukoidana i dokazana su njegova antitumorska, antioksidativna te antivirusna svojstva, kao i uloga u zaštiti jetre te sredstva protiv zgrušavanja (Cumashi i sur., 2007; Tanaka i sur., 2011; Li i sur., 2008; Kim i sur., 2014). Pokazalo se i da frakcije fukoidana male molekulske mase (manje od 30 kDa) dobivene depolimerizacijom pokazuju određena svojstva slična heparinu s manje nuspojava (Senni i sur., 2011).

Također, brojni znanstvenici istražili su njegov utjecaj na smanjenje pretilosti, primjerice Kim i suradnici (2014) dokazali su da je hrana sa sadržajem fukoidana od 2 % imala pozitivan učinak na model pretilih miševa na način da im je smanjena tjelesna masa, razina ukupnog kolesterola te triglicerida u plazmi. Dokazan je i utjecaj fukoidana na proliferaciju stanica (Haroun-Bouhedja i sur., 2000; Koyanagi i sur., 2003) i indukciju apoptoze (Aisa i sur., 2005).

Obzirom na nisku toksičnost i oralnu bioraspoloživost, fukoidan i proizvodi koji ga sadrže počeli su se pojavljivati na tržištu u obliku dodataka prehrani ili nutraceutici za različite bolesti, uključujući i tumore.

### 2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI

Ekstrakcija predstavlja tehnološku operaciju potpunog ili djelomičnog odjeljivanja tvari iz homogenih smjesa, temeljeno na njihovoj različitoj topljivosti u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Na ovaj se način dobije tvar za čije je izdvajanje u čistom obliku potrebno dobivenu otopinu otpariti ili kristalizirati (Lianfu i Zelong, 2008). Iskorištenje ekstrakcije ovisi o vrsti

otapala s obzirom na polarnost, vremenu ekstrakcije, temperaturi te kemijskim i fizikalnim svojstvima samog uzorka (Conde i sur., 2010). Otapalo kojim se vrši ekstrakcija mora biti selektivno za spojeve koje se žele ekstrahirati, sadržavati veliki ekstrakcijski kapacitet, biti nereaktivno s biljnim sastavnicama, neškodljivo za ljude i opremu, potpuno hlapljivo i ekonomično (jeftino) (Albu i sur., 2004).

Upravo je ekstrakcija najvažniji korak u izolaciji bioaktivnih spojeva iz algi (Khanra i sur., 2018). Obzirom na više različitih metoda ekstrakcije, potrebno je odabrati prikladnu metodu ovisno o svojstvima spoja (veličini, naboju, polarnosti i stabilnosti) kojeg želimo izolirati (Michalak i Chojnacka, 2014). Također, potrebno je u obzir uzeti i brzinu, ponovljivost, iskorištenje ekstrakcije, selektivnost, jednostavnost, trošak te zaštitu ekstrahiranih molekula od kemijske transformacije i degradacije (Pasquet i sur., 2011).

Konvencionalne metode ekstrakcije uz pomoć organskih otapala su tehnike koje se najčešće koriste za ekstrakciju pigmenata iz algi budući da daju dobre prinose bez upotrebe sofisticiranih i skupih instrumenata (Poojary i sur., 2016; Saini i Keum, 2018). Također, njihova je upotreba prilagodljiva za industrijsku primjenu i imaju nisku cijenu što predstavlja prednost kod korištenja ovakvog načina ekstrakcije (Gong i Bassi, 2016). Otapala koja se najčešće upotrebljavaju su aceton, metanol, etanol, heksan, kloroform, dietil eter, etil acetat, diklormetan, dimetilsulfoksid i tetrahidrofuran, a mogu se upotrebljavati u obliku čistih otapala, vodenih otopina ili u kombinaciji s drugim otapalima (Amorim-Carrilho i sur., 2014; Saini i Keum, 2018; Ventura i sur., 2017). Etanol i aceton smatraju se sigurnijima za okoliš i zdravlje pa se stoga potiče njihovo korištenje umjesto heksana, dietil etera, diklormetana i kloroforma (Saini i Keum, 2018).

Ipak, konvencionalne metode imaju određene nedostatke: većinom su dugotrajne, zahtjevne, slabo selektivne i imaju niske prinose ekstrakcije te većinom koriste velike količine otapala koja mogu biti štetna (Herrero i sur., 2006). Također, tijekom konvencionalnih metoda ekstrakcije ciljane skupine bioaktivnih spojeva često su izložene višim temperaturama, svjetlosti i kisiku potičući tako potencijalnu izomerizaciju i oksidaciju (Denery i sur., 2004). Iz tog se razloga sve više koriste napredni alternativni postupci ekstrakcije u koje se ubrajaju: ubrzana ekstrakcija otapalima pri povišenom tlaku, ekstrakcija superkričnim plinovima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija primjenom visokog tlaka, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija pomoću enzima i ekstrakcija potpomognuta pulsirajućim električnim poljem (Saini i Keum, 2018). Na ovaj način ostvaruju se veći prinosi, smanjuje se vrijeme

trajanja procesa, niži su troškovi, bolja je selektivnost, smanjuje se uporaba otapala te je ekološki prihvatljivije što svakako čini veliku prednost u odnosu na konvencionalne tehnike ekstrakcije (Kadam i sur., 2013).

Polisaharidi iz algi konvencionalno se ekstrahiraju tretiranjem uzorka alge s različitim otapalima koje uključuju vodu, kiselinu ili otopinu soli i to na visokoj temperaturi kroz duže vrijeme. Primjerice metoda u kojoj se kao otapalo upotrebljava voda uključuje i ekstrakciju drugih spojeva pa je potrebno primijeniti više koraka izolacije željenog polisaharida (Dobrinčić i sur., 2020). Upotrebom kiseline povećavaju se prinosi kod konvencionalne ekstrakcije te se 0,1 M otopina HCl pokazala učinkovitom jer omogućava hidrolizu stanične stijenke i olakšava ekstrakciju fukoidana i laminarina (Sellimi i sur., 2018; Fletcher i sur., 2017).

Uvjeti provođenja nekonvencionalnih postupaka ekstrakcije razlikuju se ovisno o pojedinoj metodi pa bi mogla nastupiti degradacija polisaharida što može utjecati na viskoznost ekstrakta, sadržaj sulfata, sastav monosaharida i bioaktivnost pa je izrazito bitno optimizirati parametre ekstrakcije poput temperature, vremena, snage i omjera uzorka i otapala (Dobrinčić i sur., 2020).

### 2.3.1. Ekstrakcija fukoidana

Švedski botaničar Kylin prvi je ekstrahirao fukoidan 1913. godine iz različitih vrsti algi *Laminaria* i *Fucus* te ga je nazvao „fukoidin“. Ekstrahirao ga je pomoću razrijeđene octene kiseline i okarakteriziran je kao spoj koji sadrži fruktozu koja se pojavljuje s manitolom, alginatom i laminarinom (Ale i sur., 2011). Ekstrakcije fukoidana koje su se provodile nakon toga, odvijale su se u blago kiselim uvjetima te pri različitim temperaturama. Također, Hoagland i Lieb (1915) su koristili natrijev karbonat za predtretman morske trave *Macrocystis pyrifera* nakon čega su proveli ekstrakciju klorovodičnom kiselinom te je utvrđeno da se ekstrakt sastoji uglavnom od alginske kiseline i nekih fukoza-sulfata.

Budući da je brojnim istraživanjima razvijena bolja spoznaja o strukturi i karakteristikama fukoidana te ostalih komponenti smeđih algi, došlo je i do napretka u metodama ekstrakcije fukoidana s ciljem njegove izolacije od drugih komponenti u uzorcima. Manipulacijom prirodnih karakteristika fukoidana i ostalih komponenti u uzorku, svrha je smanjiti koekstrakciju drugih spojeva iz smeđih algi. Ukoliko dođe do koekstrakcije, moguća je primjena nekoliko postupaka za izolaciju fukoidana, čime se povećava njegova čistoća.

Većina metoda ekstrakcije uključuje: smanjenje veličine alge čime se povećava površina izložena ekstrakciji, a podrazumijeva mljevenje sirovine; zatim predtretman čime se uklanjaju nečistoće prije same ekstrakcije; potom ekstrakcija fukoidana; izolacija fukoidana i njegovo pročišćavanje; te sušenje ekstrakta fukoidana.

### 2.3.2. Predtretman

Pojam predtretman podrazumijeva niz različitih tehnoloških postupaka koji se provode s ciljem dobivanja krajnjeg proizvoda što bolje kvalitete. Cilj predtretmana prije ekstrakcije fukoidana je ukloniti nečistoće poput lipida, pigmentata i molekula male molekulske mase koje se nalaze u uzorku. U brojnim je istraživanjima za predtretman korištena mješavina otapala različite polarnosti da bi se uklonile nečistoće različitih polarnosti pa su se primjerice lipidi ekstrahirali u otapalu niske polarnosti poput kloroforma, pigmenti u otapalima srednje polarnosti poput metanola, dok su se monosaharidi, proteini i minerali koji imaju visoku polarnost ekstrahirali u vodi. Također, budući da je fukoidan topiv u vodi, nisu se upotrebljavale visoke temperature kako se ne bi počela odvijati prerana ekstrakcija fukoidana (Lim i sur. 2016; Cumashi i sur. 2007; Chizhov i sur. 1999).

S druge strane, postoji istraživanje u kojem se predtretman provodio pomoću 80 %-tnog etanola na 70 °C tijekom 24 sata (Ponce i sur. 2003), a korištena je viša temperatura da bi se sam postupak ubrzao što je bilo moguće upravo zbog upotrebe 80 %-tnog etanola. Obzirom da fukoidan poput svih polisaharida nije topiv u etanolu, ukoliko i dođe do njegove ekstrakcije, on će se istaložiti. Nakon uklanjanja otapala filtracijom, uklonjene su samo nečistoće (pigmenti i lipidi), a ne i istaloženi fukoidan.

Uporaba mehaničkog miješanja (npr. uz upotrebu magnetske miješalice) povećava učinkovitost predtretmana budući da dolazi do veće interakcije otapala s uzorkom pa se na taj način povećava brzina ekstrakcije nečistoća. Uzorci algi s primjenom predtretmana se obično suše prije ekstrakcije pri čemu se mogu upotrijebiti brojne metode, uključujući sušenje u peći, vakuum sušenje u pećnici te sušenje zamrzavanjem (Lim i sur., 2016).

### 2.3.3. Ekstrakcija

Uzorci algi nakon predtretmana mogu biti podvrgnuti različitim metodama ekstrakcije koje mogu biti namijenjene ili za selektivno izdvajanje samo fukoidana bez alginata ili za ekstrakciju oba polisaharida zajedno nakon čega slijede dodatni koraci razdvajanja (Lim i Wan Aida, 2017).

Primjer metode za selektivnu ekstrakciju fukoidana je upotreba kalcijevog klorida ( $\text{CaCl}_2$ ) uz mehaničko miješanje i visoku temperaturu (70-85 °C) koji omogućuju veću brzinu ekstrakcije i otapanja fukoidana. Budući da je i alginat topiv u vodi, on će se koekstrahirati, no zbog prisutnosti  $\text{CaCl}_2$  pretvorit će se u kalcijev alginat koji nije topiv u vodi pa će se istaložiti. Na taj se način nakon uklanjanja čvrstih ostataka dobiva relativno čist fukoidan koji se dalje može podvrgnuti postupcima izolacije da bi se dobila veća čistoća (Lim i sur., 2016). Također, kao selektivna metoda upotrebljavaju se i otopine kiselina, primjerice klorovodična ili sumporna pri pH između 1 i 3 te pri temperaturi između 80 i 100 °C uz mehaničko miješanje. Na ovaj se način hidrolizira stanična stijenka i omogućava se ekstrakcija fukoidana. Osim toga, kiselina pretvara alginat u alginsku kiselinu koja nije topiva u vodi (McHugh, 1987) te se na taj način ona odbacuje zajedno s krutim ostacima uzorka alge čime se ponovno dobiva relativno čist ekstrakt fukoidana (Lim i Wan Aida, 2017).

Od neselektivnih metoda, provodi se ekstrakcija vodom pri visokim temperaturama (70 – 100 °C) uz mehaničko miješanje čime se osim fukoidana ekstrahiraju i drugi polisaharidi (alginat i laminarin) iz smeđih algi. Na ovaj se način dobije ekstrakt koji je niske čistoće te ga je potrebno podvrgnuti izolaciji u više koraka (Lim i sur., 2016).

Zbog povećanja industrijske i ekonomske vrijednosti morskih algi, počele su se razmatrati napredne tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ultrazvukom te ekstrakcije enzimima, a sve s ciljem poboljšanja postojećih metoda. Ove tehnike s različitim načinom djelovanja razaraju stanične stijenke smeđih algi te na taj način omogućuju ekstrahiranje fukoidana (Okolie i sur., 2019). Iako se ove metode i dalje upotrebljavaju samo u laboratorijskim uvjetima, očekuje se da će njihova primjena povećati učinkovitost i prinose ekstrakcije u kraćem vremenu, istovremeno održavajući strukturni integritet ekstrakta fukoidana.

#### 2.3.4. Pročišćavanje

Metode koje se generalno koriste za pročišćavanje fukoidana uključuju ili taloženje fukoidana (ostavljajući neutralan polisaharid u supernatantu) ili taloženje alginata (ostavljajući fukoidan u supernatantu) te dijalizu kojom se uklanjanju ostale nečistoće. Jedna od metoda uključuje upotrebu kationa deterdženta heksadeciltrimetilamonijevog bromida („Cetavlon“) za taloženje fukoidana u ekstraktu. Budući da fukoidan ima negativan naboj (polianion) jer pripada u sulfatirane polisaharide, kationski će deterdženti s fukoidanom tvoriti soli koje su netopive u

vodi i talože se. Neutralni polisaharidi poput alginata i laminarina na ovaj način ostaju otopljeni u vodi jer ne reagiraju s kationskim deterdžentima (Lim i sur., 2016; Cumashi i sur., 2007).

Također, za izolaciju fukoidana dobivenog ekstrakcijom pomoću kiseline može se koristiti metoda koja uključuje upotrebu NaOH da bi se neutralizirao ekstrakt čime nastaju soli koje je potom potrebno ukloniti. Za uklanjanje soli i drugih nečistoća koristi se ultrafiltracija ili dijaliza (Nagaoka i sur., 1999; Hemmingson i sur., 2006).

Ukoliko se za ekstrakciju koristi samo vruća voda, za izolaciju fukoidana potrebni su dodatni koraci. Ekstrakte fukoidana potrebno je pomiješati s etanolom da bi se dobila 75 %-tna otopina etanola u kojoj se polisaharidi mogu istaložiti. Nakon toga, centrifugiranjem se uklanja supernatant koji sadrži nečistoće u koje se ne ubrajaju drugi polisaharidi. Time se dobivaju istaloženi polisaharidi koji se potom otapaju u vodi i tretiraju s  $\text{CaCl}_2$  da bi se istaložili alginati koje je moguće ukloniti centrifugiranjem. Na ovaj se način fukoidan dobije u supernatantu koji se podvrgava dijalizi da bi se uklonile druge nečistoće niske molekulske mase.

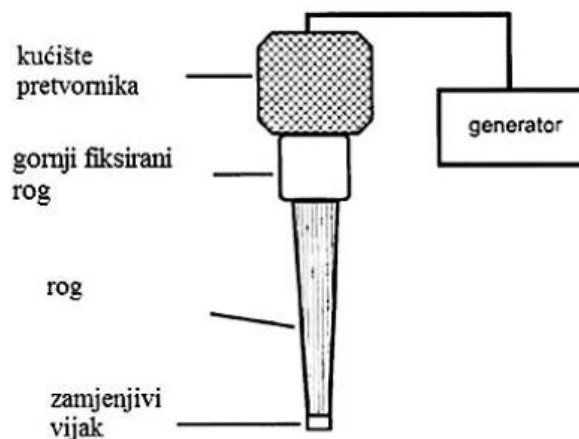
#### **2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM**

Ultrazvukom se naziva područje zvučnog vala iznad 20 kHz što predstavlja frekvenciju previsoku za ljudsko uho, a može se podijeliti na ultrazvuk niskih intenziteta i ultrazvuk visokih intenziteta. Ultrazvuk niskih intenziteta obuhvaća frekvencije 2 – 20 MHz, a ne uzrokuje ni fizikalne ni kemijske promjene materijala pa predstavlja neinvanzivnu metodu. Upravo se zato primjenjuje kao analitička tehnika (Brnčić, 2006; Drmić i Jambrak, 2010). Ultrazvuk visokih intenziteta obuhvaća frekvencije od 20 do 100 kHz te uzrokuje fizikalne i kemijske promjene materijala na koji djeluje. Njegova je primjena u odzračivanju tekućina, sušenju, ekstrakciji, čišćenju te destilaciji (Dent i sur., 2015; Herceg i sur., 2009).

Ultrazvukom potpomognuta ekstrakcija (UAE - „Ultrasound assisted extraction“) u kojoj se upotrebljava ultrazvuk visokih intenziteta ima veliku ulogu u prehrambenoj industriji jer poboljšava ekstrakciju komponenti iz biljnog i životinjskog materijala, a te komponente podrazumijevaju polifenole, antocijane, aromatske tvari, polisaharide i funkcionalne spojeve (Drmić i Jambrak, 2010). To je jeftina, direktna i ekološki prihvatljiva metoda (Vilkhu i sur., 2008). Ultrazvuk poboljšava ekstrakciju otapalima budući da mehanički djeluje na uzorak, a to se postiže na više načina: razaranjem staničnih stijenki u biljnom materijalu koje omogućuje lakše otpuštanje staničnih sastojaka, osiguravanje lakšeg ulaska otapala u stanice te povećanje prijenosa mase (Brnčić i sur., 2009).



Ultrazvučna ekstrakcija može se odvijati u ultrazvučnoj kupelji ili u sustavu s direktno uronjenom sondom. Ultrazvučna kupelj sadrži elemente pretvornika smještene na dnu spremnika i uglavnom radi na frekvenciji između 20 i 40 kHz, no postoje i izvedbe u višem frekvencijskom području (Brnčić i sur., 2009). S druge strane, ekstrakcija s direktno uronjenom sondom (Slika 8.) odvija se na način da se ultrazvučna sonda uranja u uzorak koji se nalazi u tekućem agregatnom stanju, uz miješanje da bi se temperatura nastala prilikom kolapsa kavitacijskih mjehurića ravnomjerno raspodijelila na cijelom uzorku (De Castro i Capote, 2007).



Slika 8. Sustav s direktno uronjenom sondom (De Castro i Capote, 2007)

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na zvučnim valovima koji stvaraju kavitacije migracijom kroz srednje inducirajuće promjene tlaka. Rastom i propadanjem kavitacija te njihovim djelovanjem na stanične stijenke, zvučni se valovi pretvaraju u mehaničku energiju koja uzrokuje raspad stanice i stanične stijenke. Na taj se način omogućuje veće prodiranje otapala u stanični materijal te se povećava prijenos mase. Također, omogućen je direktni kontakt sa sadržajem stanice pa se proces ekstrakcije ubrzava i povećava se učinkovitost (Brnčić i sur., 2009).

Od iznimne je važnosti optimizacija procesa da bi iskorištenje bilo maksimalno pa je potrebno i podešavanje parametara ultrazvuka i ekstrakcije (Tablica 1.) Uslijed djelovanja ultrazvuka dolazi do zagrijavanja sustava pa je izrazito važno održavati i kontrolirati temperaturu tijekom procesa da se termolabilni spojevi koji se žele ekstrahirati ne bi razgradili (Ren i sur., 2013). Također, amplitudu ultrazvuka je potrebno povećavati, budući da je ona potrebna za dobivanje vibracija koje potiču kavitaciju (Santos i sur., 2008). Upotrebom veće snage ultrazvuka, prilikom agresivnog djelovanja kavitacije na stanične stijenke zbog bržeg

kretanja molekula, doći se do većeg ekstrakcijskog kapaciteta (Balachandar i sur., 2006). Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom može utjecati i na degradaciju fukoidana budući da unesena energija može prijeći razinu energije potrebnu za cijepanje sulfatnih estera pa je nužno da unos energije bude kontroliran tijekom ekstrakcije da bi se izbjegle strukturne promjene na sulfatiranom polisaharidu (Vilkhu i sur., 2008).

Tablica 1. Parametri koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije (Wang i Weller., 2006)

<b>ULTRAZVUK</b>	<b>EKSTRAKCIJA</b>
Frekvencija	Vrijeme trajanja
Ciklus	Otapalo
Amplituda	Temperatura
Akustična snaga	

Postoji nekoliko istraživanja u kojima se upotrebljavao ultrazvuk za ekstrakciju polisaharida iz algi, primjerice za izolaciju laminarina iz algi *Ascophyllum nodosum* i *Laminaria hyperborea* (Kadam i sur., 2015), fukoidan iz alge *Undaria pinnatifida* (Songa i sur., 2015) te polisaharidi iz zelene alge *Ulva intestinalis* (Rahimi i sur., 2016). Hmelkov i suradnici (2017) proveli su ekstrakciju polisaharida potpomognutu ultrazvukom iz alge *Fucus evanescens* i usporedili su je s klasičnom metodom. Zaključili su da ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom ima sljedeće prednosti: vrijeme ekstrakcije je 20 puta manje od klasične metode, temperatura procesa odvijala se na sobnoj temperaturi, dok je kod klasične ekstrakcije potrebna viša temperatura (60 °C) te nije potrebno provoditi dijalizu kao kod klasične metode što štedi vrijeme, dodatan rad i potrošnju materijala.

## **2.5 PRIMJENA FUKOIDANA**

Fukoidan je trenutno dostupan za upotrebu u kozmetičkoj industriji, kao funkcionalna hrana, dodatak prehrani i dodatak u hrani za kućne ljubimce, stoku i akvakulturu. Na tržištu se može pronaći u obliku kapsula, praškastog proizvoda i u tekućem obliku (Anonymus 1, 2019). Do danas ne postoji odobrena primjena ekstrakta fukoidana u medicini, bilo u biomaterijalima, bilo direktnim unosom. Međutim, istraživanja o njegovoj upotrebi u obliku lijekova za lokalnu i oralnu primjenu za različite patologije potencijalno bi mogla postići dobre rezultate (Fitton i sur., 2015). Poznato je da fukoidan ima antitkancerogena svojstva, no istraživanja na ljudima još uvijek nisu provedena. Dokazano je da može spriječiti rast tumorskih stanica te da ima antivirusne, neuroprotektivne i imuno modulirajuće učinke. Također, budući

da ima antikoagulacijsko svojstvo, fukoidan se može upotrebljavati kao sredstvo protiv stvaranja krvnih ugrušaka (Anonymus 2, 2018).

U kozmetičkoj industriji, fukoidan se upotrebljava kao sredstvo za izbjeljivanje i protiv starenja kože (Narayanaswamy i sur., 2016). Kliničkim je ispitivanjima dokazano da ima sedativna svojstva, štiti od UV zraka i povećava tonus kože uz ublažavanje bora (Fitton i sur., 2015) te se pročišćene frakcije mogu jednostavno inkorporirati u kreme i losione, omogućavajući protuupalnu aktivnost uz povećanje broja dermalnih fibroblasta (Fitton i sur., 2007).

Najveći potrošač fukoidana je Azija s godišnjom potrošnjom od 6751 kg fukoidana (Anonymus 1, 2019), pri čemu Kina zauzima najveći udio u potrošnji. Od ukupne svjetske potrošnje, SAD-u pripada 36,32 % potrošnje pa to ovu zemlju čini idućim velikim potrošačem nakon Azije. Pretpostavka je da će tržište fukoidana porasti za 3,8 % u idućih 5 godina i dostići iznos od 37 milijuna američkih dolara u 2024. godini s trenutnih 30 milijuna američkih dolara godišnje koliko je iznosila proizvodnja u 2019. godini (Anonymus 1, 2019).

Najveći proizvođači fukoidana su Kanehide Bio Co., MYM International, Yaizu Suisankagaku Industry Co. Ltd., Fucoidanforce, Sea Herb, Haerim Fucoidan i Marinova. MYM International, tvrtka koja proizvodi dodatke prehrani fukoidana, objavila da planira ulazak na tržišta u nastajanju poput Tajvana, Vijetnama i Jugoistočne Azije, a svoj su asortiman proširili s kozmetičkim proizvodima s fukoidanom (Anonymus 3, 2018). Proizvodnja fukoidana u Americi, sjeverozapadnoj Europi, Novom Zelandu, područjima Južne Australije, ali i u Republici Hrvatskoj mogla bi predstavljati unosne mogućnosti za proizvođače, budući da su to područja bogata smeđim algama. Ipak, potreban je intenzivan tehnološki razvoj koji potencijalno može biti prepreka proizvođačima, no ulaganjima u proizvodnju mogao bi se postići značajan uspjeh u budućnosti.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Uzorci alga *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides*

Za istraživanje su korišteni uzorci smeđih alga *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* izronjeni u prosincu 2018. godine. *C. barbata* sakupljena je s obalnog područja Zadra (44°12'42" N; 15°09'23" E), dok je alga *F. virsoides* sakupljena s jugozapadne obale Novigradskog mora (44°12'02" N; 15°28'51" E). Vrste alga identificirao je biolog Donat Petricioli. Svježi uzorci alga prvo su isprani morskom vodom, a potom destiliranom vodom. Zamrznuti su na -60 °C u zamrzivaču ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska) te je proveden proces liofilizacije 24 sata na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO, (Labogene, Danska). Osušene alge samljevene su električnim mlicem, a prah je skladišten na -20 °C do provođenja ekstrakcije.

#### 3.1.2. Kemikalije

- 96 %-tni etanol (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- aceton, p.a. (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- apsolutni etanol (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- natrijev karbonat 20 %-tni (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- D (+)-glukoza (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev sulfat (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- želatina (Acros Organics, Belgija)
- Folin-Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, Velika Britanija)
- trikloroctena kiselina (TCA) (Fisher Scientific, Velika Britanija)
- barijev klorid (GmbH, Njemačka)
- fenol, 5 %-tna otopina (Sigma-Aldrich, SAD)
- sulfatna kiselina (Scharlab S.L., Španjolska)
- klorovodična kiselina (TKI Hrastnik, Slovenija)
- destilirana voda

### 3.1.3. Aparatura

- zamrzivač ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska)
- liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- analitička vaga, ABT 220 – 4M (Kern, Njemačka)
- magnetna miješalica, RT 5 (IKA, Njemačka)
- vortex miješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- uređaj za tretiranje ultrazvukom UP200HT (200 W, 26 kHz) (Hielscher, Njemačka)
- vakuum koncentrator, Savant SPD2010 (ThermoScientific, SAD)
- vodena kupelj, Rotavapor R-205 (Büchi, Švicarska)
- centrifuga, Rotofix 32A (HETTICH, Njemačka)
- pećnica ST-01/02 (Instrumentaria, Hrvatska)

### 3.1.4. Pribor

- plastična žličica
- filter papir
- stakleni lijevak
- Erlenmeyerove tikvice (100 mL, 500 mL)
- odmjerne tikvice (25 mL, 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)
- staklene epruvete
- staklene epruvete s navojem
- stakleni štapić
- staklene kivete
- plastične kivete (50 mL)
- Petrijeve zdjelice
- tarionik s tučkom
- menzure (10 mL)
- magnetni štapići

### 3.2. METODE

Ekstrakcija polisaharida iz uzoraka smeđih alga *C. barbata* i *F. virsoides* provedena je prema parametrima navedenima u Tablici 2. Svaka je alga podvrgnuta konvencionalnoj ekstrakciji u trajanju od 3 sata bez primjene ultrazvuka, konvencionalnoj ekstrakciji uz predtretman ultrazvukom od 5 i 15 minuta te 30 minutnoj ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom. Također, za svaku algu korištena su dva otapala – voda i 0,1 M HCl. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski je određena koncentracija ukupnih ugljikohidrata i sulfatnih grupa, a u ekstraktima iz predtretmana određena je koncentracija ukupnih fenola te pigmenta. Kod označavanja, oznaka CYBA predstavlja uzorak alge *C. barbata*, FUVI uzorak alge *F. virsoides*, slovo označava otapalo (V – voda, C – 0,1 M HCl), a posljednji znak korištenu metodu (K – konvencionalna metoda, UZV - ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, 5 i 15 – vrijeme predtretmana ultrazvukom).

**Tablica 2.** Plan provedbe ekstrakcije polisaharida iz alga *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* upotrebom različitih otapala i metoda ekstrakcije

OZNAKA	ALGA	OTAPALO	PREDTRETMAN	EKSTRAKCIJA
CYBA_V_K	CYBA	voda	-	3h, 80°C
CYBA_V_UZV	CYBA	voda	-	UZV – 30 min
CYBA_V_5	CYBA	voda	UZV - 5 min	3h, 80°C
CYBA_V_15	CYBA	voda	UZV - 15 min	3h, 80°C
CYBA_C_K	CYBA	0,1M HCl	-	3h, 80°C
CYBA_C_UZV	CYBA	0,1M HCl	-	UZV – 30 min
CYBA_C_5	CYBA	0,1M HCl	UZV - 5 min	3h, 80°C
CYBA_C_15	CYBA	0,1M HCl	UZV - 15 min	3h, 80°C
FUVI_V_K	FUVI	voda	-	3h, 80°C
FUVI_V_UZV	FUVI	voda	-	UZV – 30 min
FUVI_V_5	FUVI	voda	UZV - 5 min	3h, 80°C
FUVI_V_15	FUVI	voda	UZV - 15 min	3h, 80°C
FUVI_C_K	FUVI	0,1M HCl	-	3h, 80°C
FUVI_C_UZV	FUVI	0,1M HCl	-	UZV – 30 min
FUVI_C_5	FUVI	0,1M HCl	UZV - 5 min	3h, 80°C
FUVI_C_15	FUVI	0,1M HCl	UZV - 15 min	3h, 80°C

### 3.2.1. Predtretman

Postupak predtretmana uzoraka alga *C. barbata* i *F. virsoides* za ekstrakciju provodi se na način da se najprije izvaže po 15 g svake alge u Erlenmeyerove tikvice volumena 500 mL te se na svaki uzorak dodaje po 375 mL acetona. Prije nego što se tikvica stavlja na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 18 h, potrebno je u tikvice s uzorkom staviti i magnetni štapić te ih zatvoriti vatom. Nakon isteka 18 h, sadržaj se tikvice filtrira pod vakuumom te se na taloge dodaje 375 mL 96%-tnog etanola zagrijanog na 70 °C i ponovno se dodaju magnetni štapići, tikvice se zatvore vatom i stavljaju na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5), 4 h uz zagrijavanje na 70 °C. Talog se nakon toga ponovno filtrira pod vakuumom i stavlja na sušenje do konstantne mase.

### 3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida

Za konvencionalnu ekstrakciju izvaže se po 1 g predtretiranog uzoraka te se u tikvicu dodaje 30 mL odgovarajućeg otapala (voda, 0,1 M HCl) zagrijanog na 80 °C. U tikvicu se stavi i magnetni štapić te se tikvica zatvori vatom i postavlja na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 3 sata uz grijanje na 80 °C.

### 3.2.3. Konvencionalna ekstrakcija uz predtretman ultrazvukom

Za konvencionalnu ekstrakciju kojoj prethodi predtretman ultrazvukom, također se izvaže po 1 g predtretiranog uzorka, dodaje se 30 mL odgovarajućeg otapala (voda, 0,1 M HCl) te se u nju se uranja ultrazvučna sonda. Kako ne bi došlo do pregrijavanja uzorka, tikvica s uronjenom sondom se stavlja u ledenu kupelj. Amplituda se namješta na 100 %, a vrijeme trajanja 5, odnosno 15 minuta. Nakon tretiranja ultrazvukom, u tikvicu se dodaje magnetni štapić te se zatvori vatom i stavlja na magnetnu miješalicu 3 h na 80 °C.

### 3.2.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom provodi se na način da se u 1 g predtretiranog uzorka dodaje 30 mL određenog otapala (voda, 0,1 M HCl), tikvica se stavlja u ledenu kupelj te se u nju uroni ultrazvučna sonda, pri čemu se amplituda podesi na 100 %, a vrijeme na 30 minuta.

### 3.2.5. Postupci nakon ekstrakcije

Nakon provedbe ekstrakcije, ekstrakti se filtriraju te se talog prebacuje u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelicu i stavlja na sušenje do konstantne mase koja se koristi za izračun postotka degradacije alge. U supernatant se dodaje dupli volumen apsolutnog etanola (60 mL) i ostavlja se u hladnjaku na 4 °C preko noći. Sadržaj se prebacuje u plastične kivete i centrifugira 30 minuta na 5500 okretaja, a zatim se profiltrira u odmjerne tikvice. Sav se talog prebacuje u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelicu i stavlja na sušenje do konstantne mase. Petrijeva zdjelica s osušenim ekstraktom se ponovno izvaže i sadržaj se usitni u tarioniku s tučkom te se prah prebacuje u plastične kivete s čepom i pohranjuje u zamrzivaču na -20 °C. Dobivena masa koristi se za izračun prinosa polisaharida. Filtrat se koncentrira na vakuum koncentratoru do otprilike 25 mL, prebacuje u odmjerne tikvice od 25 mL i nadopuni do oznake otapalom korištenim za ekstrakciju.

Iz izmjerenih masa se izračuna prinos polisaharida (% PS) i postotak degradacije alge (% DA), prema formulama [1] i [2] (Rodriguez-Jasso i sur., 2011):

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

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

pri čemu je:

% PS – prinos polisaharida

$M_T$  – masa (g) nakon taloženja etanolom

$M_0$  – masa alge (g) korištena u svakom eksperimentu

% DA – postotak degradacije alge

$M_1$  – masa alge (g) nakon ekstrakcije

### 3.2.6. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata

*Princip metode:*

U svrhu određivanja koncentracije ukupnih ugljikohidrata, korištena je fenol – sumporna metoda prema Dubois i sur. (1956). To je jednostavna i brza metoda kojom se određuju svi ugljikohidrati, uključujući mono-, di-, oligo- i polisaharide. Temelji se na djelovanju jake kiseline koja cijepa sve polisaharide, oligosaharide i disaharide na



monosaharide, nakon čega dehidratacijom nastaju derivati furana koji u reakciji s fenolom daju stabilne spojeve žuto-zlatne boje. Nastali produkti mjere se pomoću spektrofotometra na valnoj duljini 490 nm (Nielsen, 2010).

*Postupak određivanja:*

400 µL uzorka i 400 µL 5 % otopine fenola otpipetira se u staklenu epruvetu te se dodaje 2 mL koncentrirane 95 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Od iznimne je važnosti dodavanje kiseline direktno u sadržaj epruvete bez dodirivanja stijenki zbog jednoličnog miješanja. Za svaki uzorak mjerenja se provode u paraleli, a slijepa proba priprema se na isti način, samo što se umjesto uzorka dodaje otapalo korišteno za ekstrakciju. Sadržaj epruvete se snažno vorteksira i stavlja u vodenu kupelj na 25 °C te se termostira 20 minuta, a potom se mjeri apsorbancija na spektrofotometru pri valnoj duljini od 490 nm (Li, 2012).

*Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:*

Baždarni pravac izrađuje se pomoću vrijednosti apsorbancije koncentracija otopina glukoze pa se najprije odvaži 10 mg glukoze u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju se zatim dodaje 100 mL vode. Od pripremljene otopine naprave se razrjeđenja koncentracija 20, 40, 60 i 80 mg L<sup>-1</sup> te se 400 µL svake koncentracije upotrebljava prema postupku za određivanje ukupnih ugljikohidrata. Dobivene vrijednosti apsorbancija služe za izradu baždarnog pravca s jednadžbom [3]:

$$y = 0,0118x + 0,0278 \quad [3]$$

$$R^2 = 0,9979$$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 490 nm

x – koncentracija otopine glukoze (mg L<sup>-1</sup>)

### 3.2.7. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa

*Princip metode:*

Određivanje sadržaja sulfatnih grupa (-SO<sub>3</sub>H) u polisaharidima provodi se pomoću metode zamućenja BaCl<sub>2</sub> – želatine prema protokolu Song i sur. (2018). Ova metoda zasniva

se na reakciji sulfatnih grupa polisaharida s  $\text{BaCl}_2$ , pri čemu nastaje barijev sulfat te se nastaloj suspenziji spektrofotometrijski mjeri valna duljina pri 360 nm.

*Postupak određivanja:*

Najprije se pripremi 100 mL 0,3 %-tne otopine želatine u vodi zagrijanoj na 70 °C i pohrani se na 4 °C preko noći. Potom se u otopinu dodaje 2 g  $\text{BaCl}_2$  i termostatira 2 do 3 h na 25 °C. 8 mg ekstrahiranih polisaharida hidrolizira se u 3 mL 1 M HCl pri 105 °C u zatvorenoj staklenoj epruveti. Zatim se 200  $\mu\text{L}$  uzorka pomiješa s 3,8 mL TCA i 1 mL otopine  $\text{BaCl}_2$  – želatina te se nakon 15 minuta na sobnoj temperaturi mjeri apsorbancija pri 360 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, osim što se umjesto uzorka stavlja 200  $\mu\text{L}$  vode. Sva se mjerenja provode u paraleli.

*Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:*

Za izradu baždarnog pravca potrebno je pripremiti otopinu standarda  $\text{K}_2\text{SO}_4$  na način da se prah  $\text{K}_2\text{SO}_4$  osuši pri 105 °C i zatim se izvaže točno 181,4 mg te se otopi u 100 mL 1 mol  $\text{L}^{-1}$  HCl. Iz tako pripremljene otopine  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , koja sadrži 1 g  $\text{L}^{-1}$  sulfatnih grupa, radi se niz od 5 razrjeđenja. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 200  $\mu\text{L}$  i postupa po propisu za određivanje koncentracije sulfatnih grupa. Dobivene vrijednosti apsorbancije služe za izradu baždarnog pravca s jednadžbom [4]:

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

$$R^2 = 0,989$$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 360 nm

x – koncentracija sulfata ( $\text{g L}^{-1}$ )

### 3.2.8. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

*Princip metode:*

Koncentracija ukupnih fenola određuje se pomoću izmjerene apsorbancije pri valnoj duljini 765 nm. Fenolne skupine oksidiraju dodatkom Folin – Ciocalteu reagensa (smjesa fosfovolframove i fosfomolibden kiseline) i daju obojeni produkt. Odnosno, Folin – Ciocalteu

reagens reagira s fenoksid ionom koji se tada oksidira, a sam Folin – Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida (Shortle i sur., 2014).

*Postupak određivanja:*

100 µL ekstrakta, 200 µL Folin – Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode otpipetira se u staklenu epruvetu te se nakon 3 minute dodaje 1 ml 20 %-tne zasićene otopine natrijeva karbonata i pomiješa pomoću vortexa. Zatim se provodi termostatiranje u vodenoj kupelji 25 min na 50 °C i izmjeri se apsorbancija na spektrofotometru pri 765 nm. Slijepa proba priprema se na isti način, osim što se umjesto uzorka dodaje voda. Sva mjerenja provode se u dvije paralele.

*Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:*

Baždarni pravac izrađuje se pomoću izmjerenih vrijednosti apsorbancija galne kiseline pa se najprije izvaže 0,5 g galne kiseline u odmjernu tikvicu od 100 mL te se doda 10 mL 96 %-tnog etanola i tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Zatim se naprave razrjeđenja koncentracija 50, 100, 150, 250 i 500 mg L<sup>-1</sup> iz pripremljene otopine i od svakog razrjeđenja se 100 µL upotrebljava prema propisu za određivanje ukupnih fenola. Dobivene vrijednosti apsorbancija služe za izradu baždarnog pravca s jednadžbom [5]:

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

$$R^2 = 0,9995$$

pri čemu je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg L<sup>-1</sup>)

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

### 3.2.9. Određivanje koncentracije klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida

*Princip metode:*

Jaki apsorpcijski spektri pigmenata klorofila a, klorofila b i karotenoida osnova su za spektrofotometrijsko određivanje njihovih udjela. Vrsta otapala ima utjecaj na apsorpcijske

maksimume ekstrahiranih pigmenata, dok tip spektrofotometra u manjoj mjeri može utjecati na iste (Lichtenthaler i Buschmann, 2005).

*Postupak određivanja:*

Klorofili a i b kvantitativno se određuju spektrofotometrijski pri valnim duljinama od 644,8 nm, 661,6 nm, 664 nm i 649 nm (u skladu s korištenim ekstrakcijskim otapalom), dok se karotenoidi određuju pri 470 nm. Za slijepu probu koristi se otapalo korišteno za ekstrakciju te se njena apsorbancija oduzima od apsorbancije uzorka. Mjerenja se provode u dvije paralele, a konačni rezultati za udjele klorofila a, klorofila b i karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama [6 - 11] (Lichtenthaler i Buschmann, 2005):

Aceton:

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

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

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

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13,36 A_{664} - 5,19 A_{649} \quad [9]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27,43 A_{649} - 8,12 A_{664} \quad [10]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2,13C_a - 97,63 C_b)/209 \quad [11]$$

pri čemu je:

A = apsorbancija

C<sub>a</sub> = klorofil a

C<sub>b</sub> = klorofil b

C<sub>(x+c)</sub> = ukupni karotenoidi (ksantofili + karotenoidi)

### 3.2.10. Statistička obrada rezultata

Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: % DA, % PS, koncentracija sulfatnih grupa (g g<sup>-1</sup>) i koncentracija ukupnih ugljikohidrata (mg g<sup>-1</sup>), dok su neovisne varijable bile: (a) vrsta alge (*C. barbata* i *F. virsoides*), (b) otapalo (0,1 M HCl i voda), (c) metoda (konvencionalna metoda, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, konvencionalna metoda uz 5 min

predtretmana ultrazvukom i konvencionalna metoda uz 15 min predtretmana ultrazvukom). Kontinuirane varijable analizirane su uz pomoć multivarijantne analize varijance (MANOVA), a višestruko uspoređivanje provedeno je Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila  $\alpha \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je istraživanju provedena ekstrakcija polisaharida iz smeđih algi *C. barbata* i *F. virsoides* primjenom konvencionalne ekstrakcije, konvencionalne ekstrakcije uz predtretman ultrazvukom od 5 i 15 minuta i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom od 30 minuta uz upotrebu vode i 0,1 M klorovodične kiseline kao otapala. U ekstraktima polisaharida provedeno je određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata i sulfatnih grupa (Tablica 3.), a u acetonskim i etanolnim ekstraktima iz predtretmana provedeno je određivanje koncentracije ukupnih fenola i pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida). Statističkom obradom podataka određen je utjecaj svakog ispitivanog parametra na prinos polisaharida, degradaciju alge, koncentraciju sulfatnih grupa te koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (Tablica 4.).

Tablica 3. Rezultati mjerenja prinosa polisaharida (% PS), degradacije alge (% DA), koncentracije sulfatnih grupa te koncentracije ukupnih ugljikohidrata uzoraka algi *C. barbata* i *F. virsoides*

OZNAKA	% PS	% DA	Sulfatne grupe (g g <sup>-1</sup> )	Ukupni ugljikohidrati (mg g <sup>-1</sup> )
CYBA_V_K	4,92%	31,20%	0,4289	1,28
CYBA_V_UZV	4,11%	80,70%	0,1813	0,94
CYBA_V_5	5,52%	68,61%	0,4594	1,31
CYBA_V_15	5,07%	68,93%	0,4643	1,03
CYBA_C_K	11,15%	57,01%	0,5322	14,07
CYBA_C_UZV	1,66%	58,03%	0,3207	2,08
CYBA_C_5	6,60%	78,92%	0,4127	0,69
CYBA_C_15	7,51%	77,51%	0,3808	0,75
FUVI_V_K	9,52%	69,43%	0,2131	5,90
FUVI_V_UZV	6,78%	72,82%	0,1431	6,99
FUVI_V_5	8,97%	80,83%	0,4020	5,26
FUVI_V_15	11,26%	71,66%	0,2527	2,93
FUVI_C_K	9,86%	40,77%	0,3553	64,64
FUVI_C_UZV	3,80%	63,59%	0,2761	4,61
FUVI_C_5	10,59%	66,36%	0,2881	7,90
FUVI_C_15	10,73%	68,68%	0,2145	7,63

CYBA – *Cystoseira barbata*; FUVI - *Fucus virsoides*; V – voda; C – 0,1 M HCl; K – konvencionalna metoda ekstrakcije; UZV – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; 5 i 15 – vrijeme predtretmana ultrazvukom prije konvencionalne ekstrakcije

Tablica 4. Utjecaj različitih parametara ekstrakcije na prinos polisaharida (% PS), degradaciju alge (% DA), koncentraciju sulfatnih grupa te koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

	N	% PS	% DA	Sulfatne grupe (g g <sup>-1</sup> )	Ukupni ugljikohidrati (mg g <sup>-1</sup> )
<b>Alga</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†
CYBA	16	5,82 ± 0,00 <sup>a</sup>	65,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,00 <sup>b</sup>	2,77 ± 0,09 <sup>a</sup>
FUVI	16	8,94 ± 0,00 <sup>b</sup>	66,77 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,00 <sup>a</sup>	13,23 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Otapalo</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†
H <sub>2</sub> O	16	7,02 ± 0,00 <sup>a</sup>	68,02 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,20 ± 0,09 <sup>a</sup>
0,1M HCl	16	7,74 ± 0,00 <sup>b</sup>	63,86 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,35 ± 0,00 <sup>b</sup>	12,80 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Tretman</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†
CE	8	8,86 ± 0,00 <sup>d</sup>	49,60 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,00 <sup>c</sup>	21,47 ± 0,13 <sup>c</sup>
samo UAE	8	4,09 ± 0,00 <sup>a</sup>	68,79 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,66 ± 0,13 <sup>b</sup>
UAE 5 min	8	7,92 ± 0,00 <sup>b</sup>	73,68 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,39 ± 0,00 <sup>d</sup>	3,79 ± 0,13 <sup>b</sup>
UAE 15 min	8	8,64 ± 0,00 <sup>c</sup>	71,70 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,33 ± 0,00 <sup>b</sup>	3,09 ± 0,13 <sup>a</sup>
<b>Alga; otapalo</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p = 0,51‡	p ≤ 0,00†
CYBA; H <sub>2</sub> O	8	4,91 ± 0,00 <sup>a</sup>	62,36 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,38 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,14 ± 0,13 <sup>a</sup>
CYBA; 0,1M HCl	8	6,73 ± 0,00 <sup>b</sup>	67,98 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,41 ± 0,00 <sup>d</sup>	4,40 ± 0,13 <sup>b</sup>
FUVI; H <sub>2</sub> O	8	9,13 ± 0,00 <sup>d</sup>	73,69 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,13 <sup>c</sup>
FUVI; 0,1M HCl	8	8,75 ± 0,00 <sup>c</sup>	59,85 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,00 <sup>b</sup>	21,20 ± 0,13 <sup>d</sup>
<b>Alga; tretman</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†
CYBA; CE	4	8,04 ± 0,00 <sup>d</sup>	44,11 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,48 ± 0,00 <sup>g</sup>	7,67 ± 0,18 <sup>d</sup>
CYBA; samo UAE	4	2,89 ± 0,00 <sup>a</sup>	69,37 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>c</sup>	1,51 ± 0,18 <sup>a</sup>
CYBA; UAE 5 min	4	6,06 ± 0,00 <sup>c</sup>	73,77 ± 0,00 <sup>g</sup>	0,44 ± 0,00 <sup>f</sup>	1,00 ± 0,18 <sup>a</sup>
CYBA; UAE 15 min	4	6,29 ± 0,00 <sup>c</sup>	73,22 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,42 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,89 ± 0,18 <sup>a</sup>
FUVI; CE	4	9,69 ± 0,00 <sup>e</sup>	55,10 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,00 <sup>d</sup>	35,27 ± 0,18 <sup>e</sup>
FUVI; samo UAE	4	5,29 ± 0,00 <sup>b</sup>	68,21 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,21 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,80 ± 0,18 <sup>b,c</sup>
FUVI; UAE 5 min	4	9,78 ± 0,00 <sup>e</sup>	73,60 ± 0,00 <sup>f,g</sup>	0,35 ± 0,00 <sup>e</sup>	6,58 ± 0,18 <sup>c</sup>
FUVI; UAE 15 min	4	10,99 ± 0,00 <sup>f</sup>	70,17 ± 0,00 <sup>e</sup>	0,23 ± 0,00 <sup>b</sup>	5,28 ± 0,18 <sup>b</sup>
<b>Otapalo; tretman</b>		p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†	p ≤ 0,00†
H <sub>2</sub> O; CE	4	7,22 ± 0,00 <sup>c</sup>	50,32 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,00 <sup>c</sup>	3,59 ± 0,18 <sup>b,c,d</sup>
H <sub>2</sub> O; samo UAE	4	5,45 ± 0,00 <sup>b</sup>	76,76 ± 0,00 <sup>h</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>a</sup>	3,96 ± 0,18 <sup>b,c,d</sup>
H <sub>2</sub> O; UAE 5 min	4	7,25 ± 0,00 <sup>c</sup>	74,72 ± 0,00 <sup>g</sup>	0,43 ± 0,00 <sup>e</sup>	3,29 ± 0,18 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O; UAE 15 min	4	8,17 ± 0,00 <sup>d</sup>	70,30 ± 0,00 <sup>d</sup>	0,36 ± 0,00 <sup>d</sup>	1,98 ± 0,18 <sup>a</sup>
0,1M HCl; CE	4	10,51 ± 0,00 <sup>g</sup>	48,89 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,00 <sup>e</sup>	39,36 ± 0,18 <sup>e</sup>
0,1M HCl; samo UAE	4	2,73 ± 0,00 <sup>a</sup>	60,81 ± 0,00 <sup>c</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>b</sup>	3,35 ± 0,18 <sup>b,c</sup>
0,1M HCl; UAE 5 min	4	8,60 ± 0,00 <sup>e</sup>	72,64 ± 0,00 <sup>e</sup>	0,35 ± 0,00 <sup>d</sup>	4,30 ± 0,18 <sup>d</sup>
0,1M HCl; UAE 15 min	4	9,12 ± 0,00 <sup>f</sup>	73,10 ± 0,00 <sup>f</sup>	0,30 ± 0,00 <sup>b</sup>	4,19 ± 0,18 <sup>c,d</sup>
<b>Prosječna vrijednost</b>	32	7,38	65,94	0,33	8,00

CYBA – *Cystoseira barbata*; FUVI - *Fucus virsoides*; CE – konvencionalna metoda ekstrakcije; samo UAE – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; UAE 5 i 15 min – vrijeme predtretmana ultrazvukom prije konvencionalne ekstrakcije

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

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

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

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

#### 4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA PRINOS POLISAHARIDA

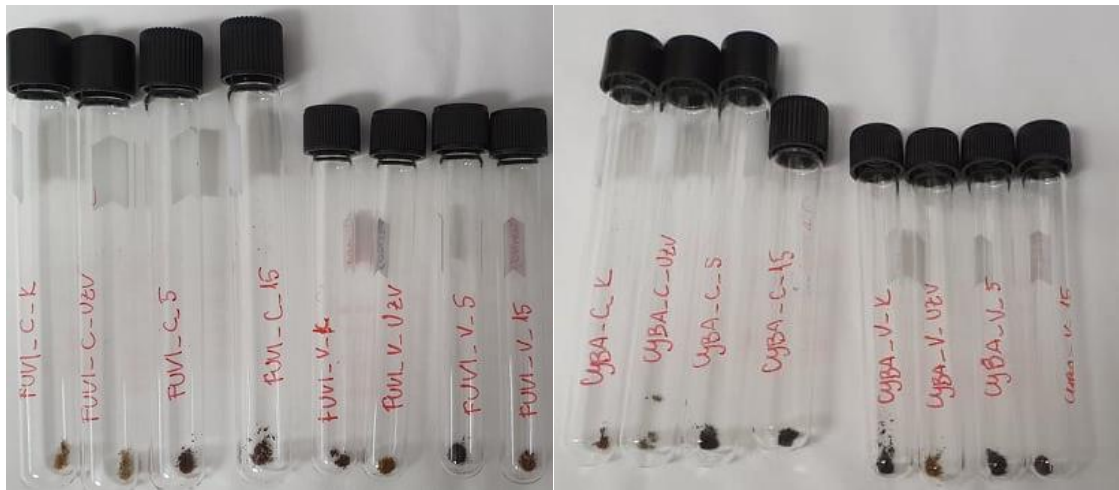
U ovom istraživanju promatran je utjecaj vrste alge, otapala i vrste tretmana te njihova međusobna kombinacija na prinos polisaharida. Iz Tablice 4. vidljivo je da su svi promatrani parametri statistički značajni ( $p \leq 0,05$ ).

Usporedbom algi *C. barbata* i *F. virsoides* vidljivo je da je prosječna vrijednost prinosa polisaharida svih uzoraka *C. barbata* bez obzira na ostale promatrane parametre 5,82 %, a *F. virsoides* 8,94 %, iz čega proizlazi da *F. virsoides* ima statistički značajno veći prinos polisaharida od alge *C. barbata*. Općenito, sadržaj polisaharida u algama može biti između 4 % i 70 %, a poznato je da smeđe alge imaju manji sadržaj polisaharida od primjerice zelenih algi (Stiger-Pouvreau i sur., 2016). Obzirom da do danas ne postoje istraživanja u kojima se provodila ekstrakcija polisaharida alge *F. virsoides*, rezultati ovog istraživanja mogu se usporediti s rezultatima dobivenima ekstrakcijom drugih vrsta alga iz istog roda. Najveći prinos polisaharida zabilježen je kod alge *F. distichus* i iznosi 21, 5 % (Bilan i sur., 2004), dok je najmanji prinos od 1,40 % zabilježen kod alge *F. vesiculosus* (Rioux i sur., 2007). Vrijednosti koje su najbliže ovom istraživanju postignute su kod alge *F. evanescens* s prinosom polisaharida od 9,00 % (Imbs i sur., 2015) te kod alge *F. serratus* s 9,52 % (Ptak i sur., 2019). S druge strane, rezultati za algu *C. barbata* pokazuju nešto niže vrijednosti u usporedbi s ostalim provedenim istraživanjima na istoj vrsti alge pa su Sellimi i sur. (2018) zabilježili prinos polisaharida od 7,27 %, dok su Turan i sur. (2017) dobili prinos polisaharida od 6,44 %. Najbližu vrijednost ovom istraživanju pokazuje istraživanje Sellimi i sur. (2014) u kojem je ekstrakcijom polisaharida alge *C. barbata* dobiveno 5,45 % polisaharida.

Ekstrakcija polisaharida olakšana je upotrebom kiseline zbog hidrolize stanične stijenke (Liu i sur., 2019) pa su dobiveni rezultati utjecaja otapala na % PS u skladu s navedenim budući da se može uočiti da je % PS veći primjenom 0,1 M HCl u odnosu na vodu. Obzirom da pH 0,1 M HCl iznosi 1, a pH vode je 7, izgledno je da niži pH daje veći prinos polisaharida. Ptak i sur.



(2019) zaključili su da se veći prinos fukoidana i laminarina postiže uz 100 mM HCl (pH 2) u odnosu na 10 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 4) kod algi iz roda *Fucus* koje obitavaju u području Francuske, dok je kod istih algi sa staništem u Njemačkoj postignut suprotan rezultat. U istraživanju koje su provodili Liu i sur. (2019) pokazalo se da 1 M HCl daje dvostruko više % PS od vode kod smeđe alge *Sargassum fusiforme*. Promatrajući utjecaj otapala na ekstrakciju, može se uočiti i razlika u boji uzoraka (Slika 9.). Vidljivo da su uzorci kod kojih je za ekstrakciju korištena 0,1 M HCl nešto svjetliji od uzoraka tretiranih vodom. Razlog tome je veća čistoća polisaharida, a samim time i bolja kvaliteta uzoraka (Baba i sur., 2018). Smeđa boja koja je nastala ekstrakcijom uz vodu ukazuje na prisutnost smeđih pigmenata (fukoksantin, violaksantin te klorofil a i c) (Saepudin i sur., 2018).



Slika 9. Razlika u boji suhih ekstrakata alga *Cystoseira barbata* (CYBA) i *Fucus virsoides* (FUVI) dobivenih ekstrakcijom uz otapala 0,1 M HCl (C) i vodu (V)

Konvencionalna ekstrakcija pokazala se tretmanom koji ima statistički najveći prinos polisaharida, predtretman ultrazvukom od 15 minuta ima nešto manji prinos, slijedi predtretman ultrazvukom od 5 minuta, dok upotreba samo ultrazvuka za ekstrakciju ima statistički najmanji prinos polisaharida. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je vrijednost % PS samo primjenom ultrazvuka, čije je vrijeme ekstrakcije 30 minuta, dvostruko niža od svih ostalih tretmana koji traju 3 sata što upućuje na prekratko vrijeme ekstrakcije. Poznato je da je vrijeme ekstrakcije bitan faktor koji utječe na prinos polisaharida (Zhang i sur., 2015). Temperatura također utječe na % PS jer se povećanjem temperature poboljšava ekstrakcijski učinak zbog bolje difuzije otapala u unutrašnjost biljnog materijala i izdvajanja željenih komponenata (Veggi i sur., 2013). Time se može objasniti nizak prinos polisaharida kod ekstrakcije ultrazvukom, budući da je

temperatura kod provođenja konvencionalne ekstrakcije znatno viša od ekstrakcije ultrazvukom u kojoj je tikvica s ultrazvučnom sondom uronjena u ledenu kupelj zbog hlađenja. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem u skladu su s istraživanjem Okolie i sur. (2019) koje pokazuje manji postotak prinosa polisaharida (4,56 %) kod ekstrakcije potpomognute ultrazvukom u trajanju od 35 minuta te uz amplitudu od 40 % u odnosu na upotrebu 3 puta po 3 sata konvencionalne ekstrakcije na 70 °C (11,9 % PS) alge *Ascophyllum nodosum*. S druge strane, Hanjabam i sur. (2019) zaključili su da je % PS alge *Sargassum wightii* veći ako se tretira ultrazvukom 30 minuta uz amplitudu od 50 % (14,61 g/100 g) od prinosa dobivenog nakon 2 sata konvencionalne ekstrakcije pri 85 °C (10,59 g/100 g). Učinkovitost ekstrakcije ultrazvukom mogla bi se pripisati fenomenu kavitacijskih mjehurića stvorenih ultrazvučnim valovima. Implozijom nastalih kavitacijskih mjehurića povećava se broj sudara između čestica velikih brzina i makroturbulencija što dovodi do erozije i oslobađanja različitih spojeva iz matriksa čime se povećava prijenos mase i učinkovitost ekstrakcije (Kadam i sur., 2015). Uspoređujući % PS primjenom konvencionalne ekstrakcije i predtretmana ultrazvukom, vidljivo je da postoji mala razlika u dobivenim rezultatima pa kod konvencionalne ekstrakcije prinos polisaharida iznosi 8,86 %, kod predtretmana ultrazvukom od 5 minuta 7,92 %, dok je % PS kod predtretmana ultrazvukom od 15 minuta 8,64 %. Prema istraživanju Kadam i sur. (2014), predtretman ultrazvukom povećava učinkovitost ekstrakcije te je povećanje amplitude ultrazvuka rezultiralo većim prinosima ekstrakcije alge *Ascophyllum nodosum*, no u ovom istraživanju to nije potvrđeno i prinos polisaharida je manji u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju. Premda je kraće vrijeme trajanja tretmana ultrazvukom poželjnije budući da se većina polisaharida može otpustiti u ranoj fazi provođenja tretmana te postoji mogućnost depolimerizacije ukoliko se primjenjuje veća amplituda ili dulje vrijeme provođenja ekstrakcije ultrazvukom (Claver i sur., 2010; Peng i sur., 2015), pokazalo se da 30 minuta tretmana nije dovoljno da bi se uspjeli postići veći prinosi polisaharida u odnosu na ostale metode ekstrakcije.

Usporedbom kombinacije određene vrste alge i odgovarajućeg otapala, vidljivo je da ekstrakcija alge *C. barbata* s HCl ima statistički veći prinos polisaharida od ekstrakcije vodom, dok je kod alge *F. virsoides* prinos polisaharida veći ukoliko se za otapalo koristi voda. Također, *F. virsoides* ima veći prinos polisaharida u obje kombinacije od alge *C. barbata*. Iz navedenog je vidljivo da osim što postoji statistički značajna razlika u postotku sadržaja polisaharida kod svake alge, značajna je i razlika u odabiru otapala za ekstrakciju pojedine alge.

Iz statističke obrade podataka proizlazi da je kod oba uzorka algi prinos polisaharida najmanji ukoliko se provodi samo ekstrakcija ultrazvukom u trajanju od 30 min. S druge strane,

različiti tretmani rezultirali su najvećim prinosima polisaharida za svaku algu pa je tako najveći % PS iz alge *C. barbata* dobiven konvencionalnom ekstrakcijom te nema statistički značajne razlike između predtretmana ultrazvukom od 5 i 15 minuta, dok je % PS kod *F. virsoides* najveći primjenom predtretmana ultrazvukom od 15 minuta.

Utjecaj kombinacije otapala i tretmana na % PS pokazuje da primjena samo ultrazvuka za ekstrakciju daje najmanje prinose polisaharida kod oba otapala, dok su najveći prinosi ostvareni primjenom predtretmana ultrazvukom od 15 minuta ukoliko se kao otapalo upotrebljavala voda te primjenom konvencionalne ekstrakcije ako je kao otapalo korištena 0,1 M HCl.

#### **4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA STUPANJ DEGRADACIJE ALGE**

Statističkom obradom podataka utvrđeno je da svi promatrani parametri (vrsta alge, otapalo i vrsta tretmana) te njihove kombinacije imaju statistički značajan utjecaj na degradaciju alge ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati pokazuju da je stupanj degradacije alge *C. barbata* nešto manji (65,11 %) od *F. virsoides* čiji % DA iznosi 66,77 %. Općenito je poželjno da degradacija alge pri ekstrakciji bude što manja pa je u ovom slučaju rezultat postignut kod alge *F. virsoides* manje poželjan. Dobiveni rezultati su prema vrijednostima približno jednaki rezultatima istraživanja Rodríguez-Jasso i sur. (2012) koji su provodili ekstrakciju sulfatnih polisaharida alge *Fucus vesiculosus* pomoću autohidrolize te je % DA nakon 10 minuta pri temperaturi od 180 °C bio 66,32 %.

Vrsta otapala ima utjecaj na stupanj degradacije alge pa je vidljivo da 0,1 M HCl ima statistički manji % DA (63,86 %) od vode čiji postotak degradacije alge iznosi 68,02 %. Iz navedenog proizlazi da je 0,1 M HCl pogodnije otapalo jer uzrokuje manju degradaciju alge.

Statistički značajna razlika postoji i između primijenjenih tretmana pa najmanju degradaciju alge pokazuje konvencionalna ekstrakcija, slijedi primjena samo ultrazvuka, zatim tretman ultrazvukom od 15 minuta, dok je najveći stupanj degradacije alge kod upotrebe ultrazvuka od 5 minuta. Vidljivo je da konvencionalna ekstrakcija pokazuje izrazito manji % DA, tek 49,60 %, u odnosu na sve tretmane ultrazvukom, dok je upotrebom samo ultrazvuka zabilježeno 68,79 %. Također, vidljiva je mala razlika između svih tretmana u kojima je korišten ultrazvuk pa se može pretpostaviti da je pojava kavitacije uzrokovala veći stupanj degradacije alge.

Kombinirani utjecaj vrste alge i otapala na degradaciju alge pokazuje da je kod alge *F. virsoides* veći % DA postignut primjenom vode kao otapala dok je kod alge *C. barbata* veći % DA postignut primjenom 0,1 M HCl. Nadalje, vidljivo je i da otapalo za ekstrakciju s kojim pojedina alga pokazuje najveći prinos polisaharida, ujedno uzrokuje i najveću degradaciju alge. Promatrajući kombinaciju vrste alge i vrste tretmana kao parametre koji utječu na % DA, primjećuje se isti trend kod obje alge: konvencionalna ekstrakcija pokazuje najmanju degradaciju, slijedi upotreba samo tretmana ultrazvukom, zatim predtretman ultrazvukom od 15 minuta i konačno predtretman ultrazvukom od 5 minuta koji izaziva najveći stupanj degradacije alge. Neovisno koje ekstrakcijsko otapalo je korišteno, najmanji stupanj degradacije alge postignut je konvencionalnom metodom.

#### **4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU SULFATNIH GRUPA**

Svi promatrani parametri, osim kombinacije vrste alge i otapala, pokazuju statistički značajni utjecaj ( $p \leq 0,05$ ) na koncentraciju sulfatnih grupa. Poznato je da sulfatne grupe imaju izrazitu biološku aktivnost i pokazuju svojstva antikoagulansa (Haroun-Bouhedja i sur., 2000), antioksidansa (Wang i sur., 2010) te mogu ublažiti simptome osoba oboljelih od HIV-a (Schaeffer i Krylov, 2000). Također, sulfatne grupe doprinose sposobnosti polisaharida za doniranje vodika na način da aktiviraju vodikov atom anomernog ugljika (Wang i sur., 2010).

Promatrajući utjecaj vrste alge na koncentraciju sulfatnih grupa, pokazalo se da *C. barbata* ima 0,40 g g<sup>-1</sup> što je više od alge *F. virsoides* čija koncentracija sulfatnih grupa iznosi 0,27 g g<sup>-1</sup>. Prema dosadašnjim istraživanjima, količina sulfatnih grupa kod roda *Fucus* iznosi 9 – 40,3 % (Imbs i sur., 2015; Fletcher i sur., 2017; Rioux i sur., 2007; Rodríguez-Jasso i sur., 2011; Bilan i sur., 2004). S druge strane, rezultati za algu *C. barbata* dobiveni ovim istraživanjem pokazuju veću količinu sulfatih grupa u odnosu na ostale alge iz istog roda jer je prema istraživanju Hadj Ammar i sur. (2015) utvrđeno da *C. sedoides* primjerice sadrži 16,3 % sulfatnih grupa, *C. compressa* 16,6 % te *C. crinita* 15,7 % sulfatnih grupa. Vrsta alge jedan je od tri ključna faktora (uz vrijeme berbe i metodu ekstrakcije) koji utječu na količinu sulfatih grupa (Fletcher i sur., 2017; Ale i Meyer, 2013), što je potvrđeno i ovim istraživanjem.

Statistički značajna razlika pokazala se i između otapala pa je uz 0,1 M HCl dobiveno više sulfatnih grupa (0,35 g g<sup>-1</sup>) u odnosu na vodu koja pokazuje koncentraciju sulfatnih grupa od 0,32 g g<sup>-1</sup> što je očekivano, budući da kiselina inducira cijepanje sulfatnog estera te se na taj

način oslobađa više sulfatnih grupa (January i sur., 2019). Ovaj rezultat u skladu je s istraživanjem Rupérez i sur. (2002) provedenim na *F. vesiculosus* u kojem je količina sulfatnih grupa veća upotrebom 0,1 M HCl na 37 °C u odnosu na ekstrakciju vodom zagrijanom na 60 °C. S druge strane, istraživanja koja su proveli Liu i sur. (2019) za algu *Sargassum fusiforme* te Saravana i sur. (2016) za algu *Saccharina japonica* pokazala su da ekstrakcija vodom daje veću koncentraciju sulfatnih grupa u odnosu na HCl.

Vrsta tretmana također utječe na koncentraciju sulfatnih grupa te se pokazalo da je upotrebom samo 30 minutnog tretmana ultrazvukom količina sulfatnih grupa značajno manja od ostalih primijenjenih vrsta tretmana. Slijedi upotreba predtretmana ultrazvukom od 15 minuta, zatim konvencionalna ekstrakcija, dok se najveća količina sulfatnih grupa postiže upotrebom predtretmana ultrazvukom od 5 minuta. Tretman ultrazvukom od 30 minuta rezultirao je najmanjom koncentracijom sulfatnih grupa, što upućuje na to da dulje vrijeme provođenja tretmana ultrazvukom može izazvati strukturalne promjene koje uključuju i sadržaj sulfata. Razlog tome je formiranje i kolaps kavitacijskih mjehurića u tretiranom tekućem mediju, što dovodi do ireverzibilnih kidanja veza (Yan i sur., 2016). Istraživanje koje su proveli Obluchinskysya i sur. (2015) pokazalo je da konvencionalna ekstrakcija etanolom daje manji udio sulfatnih grupa od ekstrakcije potpomognute ultrazvukom kod alge *F. vesiculosus*. S druge strane, istraživanje Song i sur. (2015) provedeno na sporofilima alge *Undaria pinnatifida* pokazalo je da konvencionalna metoda daje više sulfatnih grupa od ekstrakcije ultrazvukom u trajanju od 3 sata, ali manji postotak sulfatnih grupa kod ekstrakcije ultrazvukom od 6 sati i 24 sata.

Iz kombiniranog utjecaja vrste alge i vrste tretmana vidljivo je da se kod obje alge najmanja koncentracija sulfatnih grupa postiže tretiranjem ultrazvukom u trajanju od 30 minuta. Najveća koncentracija sulfatnih grupa kod alge *F. vesiculosus* postiže se predtretmanom ultrazvukom od 5 minuta, dok je kod alge *C. barbata* najveća koncentracija zabilježena konvencionalnom ekstrakcijom.

Promatrajući utjecaj kombinacije otapala i vrste tretmana, vidljivo je da je ukupno najmanja koncentracija sulfatnih grupa postignuta kombinacijom vode i ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom, a najveća 5 minutnim predtretmanom ultrazvukom s vodom te konvencionalnom ekstrakcijom s 0,1 M HCl, između kojih ne postoji statistički značajna razlika.

#### 4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

Statistički značajna razlika između promatranih parametara vidljiva je na njihovom utjecaju na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati prikazani u tablici 4. pokazuju da *F. virsoides* ima statistički značajno veću koncentraciju ukupnih ugljikohidrata ( $13,23 \text{ mg g}^{-1}$ ) od alge *C. barbata* čija koncentracija iznosi  $2,77 \text{ mg g}^{-1}$ .

Otapalo koje je pokazalo mnogo veću količinu ukupnih ugljikohidrata je  $0,1 \text{ M HCl}$  s  $12,80 \text{ mg g}^{-1}$ , dok voda pokazuje tek  $3,20 \text{ mg g}^{-1}$ . Ovaj rezultat može se usporediti s istraživanjem Hammed i sur. (2017) koje je pokazalo da je veća koncentracija ukupnih ugljikohidrata alge *Turbinaria turbinata* zabilježena pri pH 4,5 u odnosu na pH 6 – 8.

Najmanja koncentracija ukupnih ugljikohidrata postignuta je upotrebom predtretmana ultrazvukom od 15 minuta, dok je najveća koncentracija postignuta upotrebom konvencionalne ekstrakcije. Upotreba predtretmana ultrazvukom od 5 minuta i upotreba samo ultrazvuka za ekstrakciju ne pokazuju statistički značajnu razliku obzirom na količinu ukupnih ugljikohidrata. Ovi rezultati u skladu su s istraživanjem Song i sur. (2015) provedenim na sporofilima alge *Undaria pinnatifida* koje je pokazalo da se konvencionalnom ekstrakcijom postiže veći postotak ukupnih ugljikohidrata od ekstrakcije ultrazvukom u trajanju od 3 i 6 sati, ali neznatno manji od ekstrakcije ultrazvukom u trajanju od 24 sata. Ipak, ovi rezultati ne podudaraju se s istraživanjem Okolie i sur. (2019) u kojem je utvrđeno da je postotak ukupnih ugljikohidrata veći upotrebom ultrazvukom potpomognute ekstrakcije (35 minuta) u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju iz alge *Ascophyllum nodosum*.

Kombinirani utjecaj vrste alge i otapala pokazuje da je koncentracija ukupnih ugljikohidrata kod obje alge manja ako se za ekstrakciju upotrebljava voda te da je njihova koncentracija veća kod alge *F. virsoides* u odnosu na algu *C. barbata* u kombinaciji s oba korištena otapala. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem kojeg su proveli Rupérez i sur. (2002) u kojem se pokazalo da je koncentracija ukupnih ugljikohidrata alge *F. vesiculosus* niža ako se kao otapalo upotrebljava voda ( $18,8 \text{ g}/100 \text{ g}$ ) u odnosu na HCl ( $44,1 \text{ g}/100 \text{ g}$ ).

Utjecaj vrste alge i tretmana na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata pokazuje da su najmanje koncentracije prisutne kod alge *C. barbata* tretirane samo ultrazvukom te predtretmanom ultrazvukom od 5 i 15 minuta između kojih ne postoji statistički značajna razlika. Konvencionalna ekstrakcija daje najveću koncentraciju ukupnih ugljikohidrata kod

obje alge, pri čemu konvencionalna ekstrakcija alge *F. virsoides* pokazuje ukupno najveću koncentraciju.

Kombinacija otapala i tretmana ukazuje na to da je najmanja koncentracija ukupnih ugljikohidrata ostvarena upotrebom vode i predtretmana ultrazvukom od 15 minuta, dok je najveća koncentracija ostvarena konvencionalnom ekstrakcijom uz 0,1 M HCl. Između ostalih promatranih parametara postoji statistički vrlo mala razlika.

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

Postupak predtretmana koji prethodi ekstrakciji polisaharida proveden je zbog uklanjanja interferirajućih spojeva kao što su fenoli i pigmenti. Filtrat dobiven u predtretmanu iskorišten je za analizu sadržaja ukupnih fenola i pigmenata u uzorcima algi. Provedenom UV/Vis spektrofotometrijom dobiveni su rezultati koncentracije ukupnih fenola, klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida, što je prikazano u Tablicama 5. i 6.

##### 4.5.1. Koncentracija ukupnih fenola

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski mjerenjem apsorpcije nastalog obojenog produkta u reakciji oksidacije fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 5., a vidljivo je da je najveća vrijednost dobivena kod uzorka alge *C. barbata* s acetonom (21, 58 mg g<sup>-1</sup>), dok je najmanja vrijednost zabilježena kod alge *F. virsoides* s acetonom (3,80 mg g<sup>-1</sup>). Pokazalo se da *C. barbata* sadrži veću koncentraciju ukupnih fenola bez obzira na odabrano otapalo. Na sadržaj fenola utječu različiti čimbenici poput vrste, starosti, veličine, staništa, dubine, saliniteta, izloženosti svjetlu te vrijeme sakupljanja (Generalić Mekinić i sur., 2019). Također, vidljivo je da je otapalo izrazito važno za ekstrakciju, budući da je za algu *C. barbata* povoljniji aceton, dok je veća koncentracija ukupnih fenola kod alge *F. virsoides* zabilježena uz etanol.

Tablica 5. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja koncentracije ukupnih fenola ( $\text{mg g}^{-1}$ ) u ekstraktima iz različitih faza predtretmana

ALGA	OTAPALO	UKUPNI FENOLI $\pm$ S.D.
<i>C. BARBATA</i>	acetone	21,58 $\pm$ 0,13
<i>C. BARBATA</i>	etanol	14,17 $\pm$ 0,14
<i>F. VIRSOIDES</i>	acetone	3,80 $\pm$ 0,04
<i>F. VIRSOIDES</i>	etanol	5,97 $\pm$ 0,28

U dosadašnjim istraživanjima vidljive su velike razlike u koncentraciji ukupnih fenola u uzorcima smeđih algi uz različita otapala pa su primjerice Tierney i sur. (2013) zabilježili veću koncentraciju fenola kod alge *Ascophyllum nodosum* ekstrakcijom acetonom (155,95  $\text{mg PGE g}^{-1}$ ) u odnosu na ekstrakciju etanolom (66,26  $\text{mg PGE g}^{-1}$ ), dok je alga *Fucus spiralis* u istom istraživanju također pokazala veću koncentraciju fenola u ekstrakciji acetonom (204,40  $\text{mg PGE g}^{-1}$ ) u odnosu na ekstrakciju etanolom (124,30  $\text{mg PGE g}^{-1}$ ). Također, Júnior i sur. (2015) te Wang i sur. (2009) potvrdili su da acetone pokazuje najveće prinose ekstrahiranih fenola najvjerojatnije zbog inhibitornog djelovanja na interakciju tanina i proteina tijekom ekstrakcije ili čak zbog kidanja vodikovih veza između tanin-protein kompleksa. S druge strane, istraživanje koje su proveli Neto i sur. (2018) pokazalo je veću koncentraciju fenola uz etanol (56,6  $\text{mg GAE g}^{-1}$ ) u odnosu na ekstrakciju acetonom (39,1  $\text{mg GAE g}^{-1}$ ) kod alge *Fucus vesiculosus*. Promatrajući dosadašnja istraživanja na različitim vrstama alga, različitim postupkom izvođenja eksperimenta te ekspresije rezultata, teško je usporediti rezultate istraživanja (Generalčić Mekinić i sur., 2019), no vidljivo je da postoji velika povezanost između sadržaja fenola i lokalnih okolišnih čimbenika (López i sur., 2011).

#### 4.5.2. Koncentracija pigmenata

Klorofil a, klorofil b te ukupni karotenoidi određeni su UV/Vis spektrofotometrijom te je promatran otjecaj različitih otapala (acetona i etanola) kod svakog uzorka alge. U svrhu kvantitativnog određivanja navedenih pigmenata, korištene su jednadžbe kojima se olakšalo razlučivanje pojedinog pigmenta, budući da oni apsorbiraju svjetlost u regijama spektra koje se preklapaju.



Tablica 6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u ekstraktima dobivenim uz aceton i etanol kao otapala

ALGA	OTAPALO	KLOROFIL – A (mg g <sup>-1</sup> )	KLOROFIL – B (mg g <sup>-1</sup> )	UKUPNI KAROTENOIDI (mg g <sup>-1</sup> )
<i>C. barbata</i>	aceton	0,5503	0,0554	0,2993
	etanol	0,3382	0,0996	0,1407
<i>F. virsoides</i>	aceton	1,3596	0,0307	0,6629
	etanol	0,6930	0,2453	0,3134

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 6., vidljivo je da je kod obje alge veća koncentracija klorofila a (za *C. barbata* 0,5503 mg g<sup>-1</sup>, za *F. virsoides* 1,3596 mg g<sup>-1</sup>) i ukupnih karotenoida (za *C. barbata* 0,2993 mg g<sup>-1</sup>, za *F. virsoides* 0,6629 mg g<sup>-1</sup>) postignuta uz aceton kao otapalo, dok je veća koncentracija klorofila b zabilježena uz etanol (za *C. barbata* 0,0996 mg g<sup>-1</sup>, za *F. virsoides* 0,2453 mg g<sup>-1</sup>). Budući da je upotreba acetona bila prvi korak u predtretmanu, može se pretpostaviti da je to razlog većoj koncentraciji navedenih ekstrahiranih spojeva. Također, vidljivo je da uz isto otapalo *F. virsoides* ima veću koncentraciju svih pigmenata, osim u slučaju klorofila b uz aceton kao otapalo. Razlike u koncentracijama pigmenata izrazito su vidljive ukoliko se upotrebljavaju različita ekstrakcijska otapala što bi se moglo objasniti razlikama u topljivosti pigmenata prema različitim otapalima (Vimala i Poonghuzhali, 2015).

U istraživanju Sudhakar i sur. (2013) uspoređivao se utjecaj tri vrste otapala (90 % aceton, 100 % aceton te 90 % etanol) na ekstrakciju pigmenata više vrsta smeđih algi. Dobiveni rezultati pokazali su da je količina ekstrahiranih pigmenata veća upotrebom 90 % i 100 % acetona u odnosu na etanol kod svih promatranih vrsta algi (*Sargassum wightii*, *Sargassum ilicifolium*, *Sargassum longifolium*, *Padina gymnospora*, *Turbinaria ornate*). Warkoyo i Saati (2011) istraživali su utjecaj vrste otapala na ekstrakciju morske trave *Eucheuma cottoni* te su zaključili da aceton ekstrahira najveći udio karotenoida u usporedbi s etanolom, što je u skladu i s ovim istraživanjem. Karotenoidi nisu polarne molekule, stoga imaju veći afinitet prema polarnijim otapalima, u ovom slučaju preme acetonu (Nayek i sur., 2014). Aceton pokazuje i visok pik kod apsorpcije klorofila te se često koristi kao otapalo za njihovo ispitivanje (Ritchie, 2006), dok je s druge strane nepovoljno otapalo za ekstrakciju budući da je lako zapaljiv, izaziva iritacije kože te je opojan u visokim koncentracijama.

## 5. ZAKLJUČAK

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

1. Veći prinos polisaharida (% PS) i koncentracija sulfatnih grupa alge *C. barbata* postignuti su primjenom konvencionalne ekstrakcije, dok je kod alge *F. virsoides* predtretman ultrazvukom u trajanju od 15 minuta rezultirao najvećim % PS, a predtretman u trajanju od 5 min najvećom koncentracijom sulfatnih grupa. Značajno veći stupanj degradacije (% DA) i veća koncentracija ukupnih ugljikohidrata, kod obje vrste alge, dobiveni su primjenom ultrazvuka u odnosu na konvencionalnu ekstrakciju.
2. Primjena 0,1 M HCl kao ekstrakcijskog otapala rezultirala je većim prinosom polisaharida, većom koncentracijom sulfatnih grupa, većom koncentracijom ukupnih ugljikohidrata i manjim stupnjem degradacije alge.
3. Prinos polisaharida alge *F. virsoides* (8,94 %) veći je od % PS alge *C. barbata* (5,82 %), dok je stupanj degradacije alge *C. barbata* (65,11 %) manji u odnosu na % DA alge *F. virsoides* (66,77 %). *C. barbata* sadrži 0,40 g g<sup>-1</sup> sulfatnih grupa što je više od alge *F. virsoides* kod koje koncentracija iznosi 0,27 g g<sup>-1</sup>, dok *F. virsoides* ima značajno veću koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (13,23 mg g<sup>-1</sup>) u odnosu na algu *C. barbata* (2,77 mg g<sup>-1</sup>).
4. Analiza sadržaja ukupnih fenola i pigmenata u filtratima iz predtretmana pokazala je da *C. barbata* sadrži veću koncentraciju ukupnih fenola, dok *F. virsoides* sadrži veću koncentraciju ukupnih pigmenata. Koncentracija klorofila a i karotenoida veća je uz aceton kao otapalo, dok je veća koncentracija klorofila b zabilježena uz etanol pa se može zaključiti da je odabir otapala za ekstrakciju ima važan utjecaj na ekstrakciju ukupnih fenola i pigmenata u uzorcima algi.

## 6. POPIS LITERATURE

Aisa, Y., Miyakawa, Y., Nakazato, T., Shibata, H., Saito, K., Ikeda, Y., Kizaki, M., (2005) Fucoidan induces apoptosis of human HS-Sultan cells accompanied by activation of caspase-3 and down-regulation of ERK pathways. *Am. J. Hema.* **78**, 7–14.

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

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

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

Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., Regal, P. (2014) Review of methods for analysis of carotenoids. *Trend. Anal. Chem.* **56**, 49-73.

Andersen, R.A., Lewin R.A. (2019) Algae. Encyclopaedia Britannica Inc. <<https://www.britannica.com/science/algae>> Pristupljeno 2. veljače 2020.

Anonymus 1 (2019) Fucoidan Market 2019 Global Industry Size Analyzed by Business Opportunity, Development, Growth Factors, Applications Analysis and Future Prospects 2024 <<https://www.marketwatch.com/press-release/fucoidan-market-2019-global-industry-size-analyzed-by-business-opportunity-development-growth-factors-applications-analysis-and-future-prospects-2024-2019-10-15>> Pristupljeno 04. travnja 2020.

Anonymus 2 (2018) Fucoidan <<https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/fucoidan>> Pristupljeno 04. travnja 2020.

Anonymus 3 (2018) Fucoidan Extract Market <<https://www.futuremarketinsights.com/reports/fucoidan-extract-market>> Pristupljeno 04. travnja 2020.

- Aslani, P., Kennedy, R. A. (2006) Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *J. Control. Release.* **42**, 75–82.
- Baba, B.M., Wan Mustapha, W.A., Lim, S.J. (2018). Effect of extraction methods on the yield, fucose content and purity of fucoidan from *Sargassum* sp. Obtained from Pulau Langkawi, Malaysia. *Malaysian J. Anal. Sci.* **22**, 87-94.
- Bae, H., Song, G., Lee, J., Hong, T., Chang, M., Lim, W. (2020) Laminarin-derived from brown algae suppresses the growth of ovarian cancer cells via mitochondrial dysfunction and ER stress. *Mar. Drugs* **18**, 152.
- Balachandar, N., Kentish, S.E., Mawson, R., Ashokkumar, M. (2006) Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasound. Sonochem.* **13**, 471-479.
- Batista González, A.E., Silva, A.M.O., Vidal-Novoa, A., Pinto, J.R., Manchini D.A.P., ManchiniFilho, J. (2012) Analysis of in vitro and in vivo antioxidant properties of hydrophilic fractions from the seaweed *Halimeda monile*. L. *J Food Biochem.* **36**, 89-197.
- Baweja, P., Kumar, S., Sahoo, D., Levine, I. (2016) Biology of seaweeds U: Seaweed in Health and Disease Prevention, (Fleurence J., Levine, I., ured.), Elsevier, London, str. 41-106.
- 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(3)**, 511-517.
- 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.
- Brnčić M. (2006) Influence of ultrasound on properties of raw material for extrusion and finished extruded product. *Ph.D. Thesis*, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Zagreb.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., i sur.. (2009). Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **4 (1-2)**, 32-37.

Bruno de Sousa, C.; Gangadhar, K.N.; Macridachis, J.; Pavão, M.; Morais, T.R.; Campino, L.; Varela, J.; Lago, J.H.G. (2017) Cystoseira algae (Fucaceae): Update on their chemical entities and biological activities. *Tetrahedron Asymmetry* **28**, 1486–1505.

Chapman, A.R.O., Craigie, J.S., (1977) Seasonal growth in *Laminaria longicuris*: relations with dissolved inorganic nutrients and internal reserves of nitrogen. *Mar. Biol.* **40**, 197–205.

Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., (1999) A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res* **302**, 108–119.

Claver, I.P., Zhang, H., Li, Q., Ke, Z., Zhou, H. (2010) Optimization of ultrasonic extraction of polysaccharides from Chinese malted sorghum using response surface methodology. *Pakistan J. Nutr.* **9**, 336–342.

Collado-González, M., Cristina Ferreri, M., Freitas, A.R., Santos, A.C., Ferreira, N.R., Carissimi, G., Sequeira, J.A.D., Guillermo Díaz Baños, F., Villora, G., Veiga, F. (2020) Complex polysaccharide-based nanocomposites for oral insulin delivery. *Mar. Drugs* **18**, 55.

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

Cumashi, A., Ushakova, N.A., Preobrazhenskaya, M.E., D'incecco, A., Piccoli, A., Totani, L., Tinari, N., Morozevich, G.E., Berman, A.E., Bilan, M.I. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **17**, 541.

Cunha, L., Grenha, A. (2016) Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. *Mar. Drugs* **14**, 42.

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

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

- Denery, J., R., Dragull, K., Tang, C.S., X. Li, Q. X. (2004) Pressurized fluid extraction of carotenoids from *Haematococcus pluvialis* and *Dunaliella salina* and kavalactones from *Piper methysticum*. *Anal. Chim. Acta*, **501**, 175-181.
- Dent, M., Dragović Uzelac, V., Elez Garofulić, I., Bosiljkov, T., Ježek, D., Brnčić, M. (2015) Comparison of Conventional and Ultrasound-assisted Extraction Techniques on Mass Fraction of Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis* L.) *Chem. Biochem. Eng. Q.* **29 (3)**, 475-484.
- Dhara, C.D., Reddy, C.R.K., Balar, N., Suthar, P., Gajaria, T., Gadhavi, D.K. (2017) Assessment of the nutritive, biochemical, antioxidant and antibacterial potential of eight tropical macro algae along Kachchh coast, India as human food supplements. *J. Aquat. Food Prod. T.* **27**, 61-79.
- Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides. *Mar. Drugs* **18(3)**, 168.
- Dong, X. Y., Guo, L. L., Wei, F., Li, J. F., Jiang, M. L., Li, G. M., (2011). Some characteristics and functional properties of rapeseed protein prepared by ultrasonication, ultrafiltration and isoelectric precipitation. *J. Sci. Food Agric.*, **91(8)**, 1488-1498.
- Drmić, H., Jambreč-Režek, A. (2010) Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **2.(2)** 22-33.
- 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.
- Ferreira, L.G., Nosedá, M.D., Gonçalves, A.G., Ducatti, D.R.B., Fujii, M.T., Duarte, M.E.R. (2012) Chemical structure of the complex pyruvylated and sulfated agaran from the red seaweed *Palisada flagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta). *Carbohydr. Res.* **347**, 83-94.
- Fitton, J. H., Irhimeh, M., Falk, N. (2007) Macroalgal Fucoïdan Extracts: A New Opportunity for Marine Cosmetics. *Cosmet.Toiletries* **122 (8)**, 55-64.
- Fitton, J., Stringer, D., Karpinić, S. (2015). Therapies from Fucoïdan: An Update. *Mar. Drugs.* **13**, 5920-5946.

- Fletcher, H.R., Biller, P., Ross, A.B., Adams, J.M.M. (2017) The seasonal variation of fucoïdan within three species of brown macroalgae. *Algal Res.* **22**, 79–86.
- Generalić Mekinić, I., Skroza, D., Šimat, V., Hamed, I., Čagalj, M., Popović Perković, Z. (2019). Phenolic Content of Brown Algae (Pheophyceae) Species: Extraction, Identification, and Quantification. *Biomolecules*, **9(6)**, 244.
- Gong, M., Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: a review of recent developments. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1396-1412.
- Gryshkov, O., Pogozhykh, D., Hofmann, N., Glasmacher, B. (2013) Cell encapsulation into alginate microcapsules provides living cells with a mild environment during cryopreservation. *Cryobiology* **66**, 352.
- Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends Food Sci Tech.* **22**, 315–326.
- Hadj Ammar, H., Lajili, S., Ben Said, R., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. (2015) Physico-chemical characterization and pharmacological evaluation of sulfated polysaccharides from three species of Mediterranean brown algae of the genus *Cystoseira*. *Daru*, **23(1)**, 1.
- Hammed, A.M., Jaswir, I., Simsek, S., Alam, Z., Amid, A. (2017) Enzyme aided extraction of sulfated polysaccharides from *Turbinaria turbinata* brown seaweed. *Int. Food Res. J.* **24**, 1660–1666.
- Hanjabam, M. D., Kumar, A., Tejpal, C. S., K, E., Kishore, P., Kumar, K. A. (2019). Isolation of crude fucoïdan from *Sargassum wightii* using conventional and ultra-sonication assisted methods. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.* **20**, 100-200.
- Haroun-Bouhedja, F., Ellouali, M., Siquin, C., Boisson-Vidal, C., (2000) Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Throm. Res.* **100**, 453–459.
- 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.

- Herceg, Z., Brnčić, M., Jambreč Režek, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo*, **59** (1), 65-69.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chem.* **98**, 136-148.
- Hmelkov, A., Zvyagintseva, T., Shevchenko, N., Rasin, A., & Ermakova, S. (2018) Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from brown alga *Fucus evanescens*. Structure and biological activity of the new fucoidan fractions. *Journal of applied phycology*, **30**, 2039-2046.
- 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.
- Holdt, S.L., Kraan, S. (2011) Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *J. Appl. Phycol.* **23**, 543-597.
- Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje (2020) Alge. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=1687>>. Pristupljeno 14.travnja 2020
- Hsu, H. Y., & Hwang, P. A. (2019) Clinical applications of fucoidan in translational medicine for adjuvant cancer therapy. *Clin. Transl. Med.* **8**(1), 15.
- Ibañez, E., Herrero, M., Mendiola, J. A., Castro-Puyana, M. (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. U: *Marine Bioactive Compounds* (Hayes M., ured.), Springer, Boston, MA, str. 55-98.
- Imbs, T., Skriptsova, A. Zvyagintseva, T. (2015). Antioxidant Activity of Fucose-Containing Sulfated Polysaccharides Obtained from *Fucus Evanescens* by Different Extraction Methods. *J. Appl. Phycol.* **27**, 545-553.
- Indegaard, M., Minsaas, J., (1991) Animal and human nutrition. In: Guiry, M.D., Blunden, G. (Eds.), *Seaweed Resources in Europe: Uses and Potential*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, str. 21–64.



January, G., Naidoo, R., Kirby-McCullough, B., Bauer, R. (2019). Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Res.* **40**.

Júnior S.Q., Carneiro V.H.A., Fontenelle T.P.C., de Sousa Chaves L., Mesquita J.X., de Brito T.V., Prudêncio R.S., de Oliveira J.S., Rolim Medeiros J.V., Saboia Aragão K., (2015) Antioxidant and anti-inflammatory activities of methanol extract and its fractions from the brown seaweed *Spatoglossum schroederi*. *J. Appl. Phycol.* **27**, 2367–2376.

Kadam S.U., O'Donnell .C.P, Rai D.K., Hossain M.B., Burgess C.M., Walsh D., Tiwari B.K (2015) Laminarin from Irish brown seaweeds *Ascophyllum nodosum* and *Laminaria hyperborea*: ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Mar Drugs* **13**, 4270–4280.

Kadam, U.S., Tiwari, K.B., O'Donnell, C.P. (2013) Application of Novel Extraction Technologies for Bioactives from Marine Algae. *J. Agric. Food Chem.* **16**, 4667-4675.

Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Connell, S., O'Donnell, C. P. (2014). Effect of Ultrasound Pretreatment on the Extraction Kinetics of Bioactives from Brown Seaweed (*Ascophyllum nodosum*). *Sep. Sci. Technol.*, **50(5)**, 670–675.

Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., & Kamble, R. R. (2014). Polymer Synthesis and Processing. *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*, 1–31.

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

Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Gayen, K., Bhowmick, T. K. (2018) Downstream processing of microalgae for pigments, protein and carbohydrate in industrial application: A review. *Food Bioprod. Process.* **110**, 60-84.

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

Kim, E. J., Park, S. Y., Lee, J.-Y., and Park, J. H. Y. (2010). Fucoidan present in brown algae induces apoptosis of human colon cancer cells. *BMC Gastroenterol.* **10**, 1–11.

- Kim, M.-J., Jeon, J., Lee, J.-S., (2014) Fucoidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation. *Phytother. Res.* **28**, 137–143.
- Koyanagi, S., Tanigawa, N., Nakagawa, H., Soeda, S., Shimeno, H., (2003) Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. *Biochem. Pharma.* **65**, 173.
- Lahaye, M., Robic, A. (2007) Structure and Functional Properties of Ulvan, a Polysaccharide from Green Seaweeds. *Biomacromolecules* **8**, 1765-1774.
- Leonard, S.G., Sweeney, T., Pierce, K.M., Bahar, B., Lynch, B.P., O'Doherty, J.V. (2010) The effects of supplementing the diet of the sow with seaweed extracts and fish oil on aspects of gastrointestinal health and performance of the weaned piglet. *Livest. Sci.* **134**, 135-138.
- Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R., (2008) Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules* **13**, 1671.
- 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.
- Li, Y.X., Kim, S.K. (2011) Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1461-1466.
- 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.
- 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., Wan Aida, W. M. (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., Latip, J., Badri, K. H., Hassan, O., Yamin, B. M. (2016) Characterisation of fucoïdan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chem.* **209**, 267–273.
- Lindarić J. (1949) Studije o jadranskom fukusu. *Acta Botanica* **12/13**, 7-132
- Liu, J., Wu, S. Y., Chen, L., Li, Q. J., Shen, Y.Z., Jin, L., Zhang, X., Chen, P. C., Wu, M. J., Choi, J., Tong, H. B. (2019) Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoïdants, *Int. J. Biol. Macromol.*
- López 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.
- Manev, Z., Iliev, A., Vachikova, V. (2013) Chemical characterization of brown seaweed – *Cystoseira barbata*. *Bulg. J. Agric. Sci.*, **19** 12–15.
- Marin, O.A.; Timofte, F. (2011) Atlasul Macrofitelor de la Litoralul Romanesc; Editura Boldas: Constanta, Romania.
- 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.
- Michalak, I., Chojnacka, K. (2014) Algae as production systems of bioactive compounds. *Eng. Life Sci.* **15**, 160-176.
- Morais, S. (2013). Ultrasonic- and microwave-assisted extraction and modification of algal components. *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*, 585–605.
- Moroney, J. V., Ynalvez, R. A., (2009) Algal Photosynthesis. U: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, str. 1-7.
- Murray, M., Dordevic, A. L., Bonham, M. P., Ryan, L. (2018) Do marine algal polyphenols have antidiabetic, antihyperlipidemic or anti-inflammatory effects in humans? A systematic review. *Crit.Rev. Food Sci.* **58**, 2039-2054.

- 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.
- Narayanaswamy, R., Kanagesan, S., Pandurangan, A., Padmanabhan, P. (2016). Basics to different imaging techniques, different nanobiomaterials for image enhancement. *Nanobiomaterials in Medical Imaging*, 101-129.
- Nayek, S., Choudhury, I.H., Nishika, J., Roy, S.. (2014). Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Res. J. Chem. Sci.* **4**, 63-69.
- Neto, R., Marçal, C., Queirós, A., Abreu, H., Silva, A., & Cardoso, S. (2018). Screening of *Ulva rigida*, *Gracilaria* sp., *Fucus vesiculosus* and *Saccharina latissima* as Functional Ingredients. *Int. J. Mol. Sci.* **19(10)**, 2987.
- Nielsen, S. S. (2010) Food Analysis Laboratory Manual, 4. izd., Springer International Publishing, New York City, SAD.
- Nwosu, F., Morris, J., Lund, V.A., Stewart, D., Ross, H.A., McDougall, G.J. (2011) Antiproliferative and potential anti-diabetic effects of phenolic-rich extracts from edible marine alga. *Food Chem.* **126**, 1006-1012.
- Obluchinskaya, E. D., Makarova, M. N., Pozharitskaya, O. N., Shikov, A. N. (2015). Effects of Ultrasound Treatment on the Chemical Composition and Anticoagulant Properties of Dry *Fucus* Extract. *Pharm. Chem. J.* **49(3)**, 183–186.
- Okolie, C. L., Mason, B., Mohan, A., Pitts, N., Udenigwe, C. C. (2019) The comparative influence of novel extraction technologies on in vitro prebiotic-inducing chemical properties of fucoidan extracts from *Ascophyllum nodosum*. *Food Hydrocoll.*, **90**, 462–471.
- Pasquet, V., Chérourvriér, J.-R., Farhat, F., Thiéry, V., Piot, J.-M., Bérard, J.-B., Kaas, R., Serive, B., Patrice, T., Cadoret, J.-P. (2011) Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction. *Process Biochem.* **46**, 59-67.

- Peng, W., Xiaoman, Y., Bingna, C., Hua, C., Huili, S., Deke, C., Jianyu, P. (2015) Ultrasonic extraction of polysaccharides from *Laminaria japonica* and their antioxidative and glycosidase inhibitory activities. *J. Ocean Univ. China* **14**, 651–662.
- Pennesi, C., Rindi, F., Totti, C., Beolchini, F., (2014). Marine Macrophytes: Biosorbents. Hb25\_Springer Handbook of Marine Biotechnology, 597–610.
- Petrova-Karadzova, V., (1975) Quantitative distribution and stocks of *Cystoseira barbata* (Good et Wood) in the Bulgarian Black Sea coast. *Proceed. of IFR*, **14**.
- 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.
- Poojary, M. M., Barba, F. J., Aliakbarian, B., Donsì, F., Pataro, G., Dias, D. A., Juliano, P. (2016) Innovative alternative technologies to extract carotenoids from microalgae and seaweeds. *Mar. Drugs* **14**, 214.
- Ptak, S.H., Christensen, K., Meichssner, R., Frette, X. (2019) Improving Fucoidan Yield from *Fucus* Brown Algae by Microwave Extraction. *Chem. Eng. Trans.* **74**, 109-114.
- Qi, H., Zhao, T., Zhang, Q., Li, Z. Zhao, Z., Xing, R. (2005) Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* Kjellm (Chlorophyta), *J. Appl. Phycol.* **17**, 527–534.
- Rahimi F., Tabarsa M., Rezaei M. (2016) Ulvan from green algae *Ulva intestinalis*: optimization of ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity. *J. Appl. Phycol.* **28**, 2979–2990.
- Rajan S. S. (2002) Introduction to Algae. Anmol Publications PVT. Ltd., New Delhi, str. 239-241.
- Ren, Y-Z., Wu, Z-L, Franke, M., Braeutigam, P., Ondruschka, B., Comeskey, D.J., King, P.M. (2013) Sonoelectrochemical degradation of phenol in aqueous solutions. *Ultrason. Sonochem.*, **20**, 715-721.
- Rindi F., Battelli C. (2005) Spatio – temporal variability of intertidal algal assemblages of the Slovenian coast (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Botanica Marina* **48**: 96-105.

- Remminghorst, U., Rehm, B. H. A. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnol. Lett.* **28**, 1701–1712.
- Rioux, L. E., Turgeon, S., Beaulieu, M. (2007). Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* **69**, 530-537.
- Ritchie R. J., (2006) Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. *Photosynth. Res.*, **89**, 27–41.
- Rodriguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., Teixeira J. A. (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym.* **86**, 1137-1144.
- Rodríguez-Jasso, R. M., Mussatto, S. I., Pastrana, L., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A. (2012). Extraction of sulfated polysaccharides by autohydrolysis of brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Appl. Phycol.* **25(1)**, 31–39.
- Rowley, J. A., Madlambayan, G., Mooney, D. J. (1999) Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* **20**, 45–53.
- Saini, R.K., Keum, Y.S. (2018) Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* **240**, 90-103.
- Rupérez, P., Ahrazem, O., Leal, A. (2002) Potential Antioxidant Capacity of Sulfated Polysaccharides from the Edible Marine Brown Seaweed *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 840-845.
- Saepudin, E., Sinurat, E., Suryabrata, I. A. (2018). Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. IOP Conference Series: *Mater. Sci. Eng.*, **299**, 012027.
- Santos, H.M., Lodeiro, C., Capelo-Martínez, J. (2008) The Power of Ultrasound. U:Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications (Capelo-Martínez, J.L., ured.), Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1-15.
- Saravana, P.S., Cho, Y.J., Park, Y.B., Woo, H.C., Chun, B.S. (2016) Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydr. Polym.* **153**, 518-525.

- Schroeder, G., Leska, B., Messyasz, B., Pikosz, M. (2015) Analysis of Green Algae Extracts. U: Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications, (Kim, S.W. i Chojnacka, K., ured), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, str. 81-93.
- Sellimi, S., Kadri, N., Barragan-Montero, V., Laouer, H., Hajji, M., Nasri, M. (2014) Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: structural characteristics and antioxidant activity. *Int. J. Biol. Macromol.* **66**, 281-288.
- Sellimi, S., Ksouda, G., Benslimma, A., Nasri, R., Rinaudo, M., Nasri, M., Hajji, M. (2017) Enhancing colour and oxidative stabilities of reduced-nitrite turkey meat sausages during refrigerated storage using fucoxanthin purified from the Tunisian seaweed *Cystoseira barbata*. *Food Chem. Toxicol.* **107**, 620–629.
- Sellimi, S., Maalej, H., Rekik, D.M., Benslimma, A., Ksouda, G., Hamdi, M., Sahnoun, Z., Li, S., Nasri, M., Hajji, M. (2018) Antioxidant, antibacterial and in vivo wound healing properties of laminaran purified from *Cystoseira barbata* seaweed. *Int. J. Biol. Macromol.* **119**, 633–644.
- Senni, K.; Pereira, J.; Gueniche, F.; Delbarre-Ladrat, C.; Siquin, C.; Ratiskol, J.; Godeau, G.; Fischer, A.-M.; Helley, D.; Collic-Jouault, S. (2011) Marine Polysaccharides: A Source of Bioactive Molecules for Cell Therapy and Tissue Engineering. *Mar. Drugs* **9**, 1664-1681.
- Shahidi, F., Rahman, M.J. (2018) Bioactives in seaweeds, algae, and fungi and their role in health promotion. *J. Food Bioact.* **2**, 58–81.
- Schaeffer, D.J., Krylov, V.S. (2000) Anti-HIV Activity of Extracts and Compounds from Algae and Cyanobacteria. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **45**, 208–227.
- Shchipunov, Y.A. (2003) Sol-gel-derived biomaterials of silica and carrageenans. *J. Colloid. Interf. Sci.*, **268**, 68-76.
- Shortle, E., O'Grady, M. N., Gilroy, D., Furey, A., Quinn, N., Kerry, J. P. (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci.* **98**, 828-834.
- 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.

- Song, H., He, M., Gu, C., Wei, D., Liang, Y., Yan, J., Wang, C. (2018) Extraction Optimization, Purification, Antioxidant Activity, and Preliminary Structural Characterization of Crude Polysaccharide from an Arctic *Chlorella* sp. *Polymers*, **10(3)**, 292.
- Song, K.M., Ha, S.J., Lee, J.E., Kim S.H., Kim Y.H., Kim Y., Hong S.P., Jung S.K., Lee N.H. (2015) High yield ultrasonication extraction method for *Undaria pinnatifida* sporophyll and its anti-inflammatory properties associated with AP-1 pathway suppression. *LWT – Food. Sci. Technol.* **64**,1315–1322.
- Souza, B.W.S., Cerqueira, M.A., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Martins, J.T., Teixeira, J.A., Coimbra, M.A., Vicente, A.A. (2012) Chemical characterization and antioxidant activity of sulfated polysaccharide from the red seaweed *Gracilaria birdiae*. *Food Hydrocoll.* **27**, 287-292.
- Stiger-Pouvreau V., Bourgougnon N., Deslandes E. (2016) Carbohydrates from seaweeds. U: Seaweed in Health and Disease Prevention, (Fleurence J., Levine I., ured.), Academic Press, Cambridge, MA, USA, str. 223–274.
- Sudhakar, M.P., Ananthalakshmi, J.S.Beena, B.N. (2013) Extraction, purification and study on antioxidant properties of fucoxanthin from brown seaweeds. *J. Chem. Pharm. Res.* **5(7)**, 169-175.
- Ścieszka, S., & Klewicka, E. (2018). Algae in food- a general review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **59**. 1-23.
- Tanaka, K., Ito, M., Kodama, M., Tomita, M., Kimura, S., Hoyano, M., Mitsuma, W., Hirono, S., Hanawa, H., Aizawa, Y., 2011. Sulfated polysaccharide fucoidan ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther* **16**, 79.
- Tierney M.S., Smyth T.J., Hayes M., Soler-Vila A., Croft A.K., Brunton N. (2013) Influence of pressurised liquid extraction and solid–liquid extraction methods on the phenolic content and antioxidant activities of Irish macroalgae. *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**, 860–869.
- Turan, G.. (2017). Determination of the Seasonal Yields of Total Fucose and Fucoidan Yields in Brown Seaweeds (Order *Fucales*) Distributed along the Coast of Urla (Izmir, Turkey). *Aquacult. Fish.* **1**, 1-4.



- Van Weelden, G., Bobi, M., Okła, K., Van Weelden, W.J., Romano, A., Pijnenborg, J.M.A. (2019) Fucoidan structure and activity in relation to anti-cancer mechanisms. *Mar. Drugs* **17**, 32.
- 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.
- Ventura, S.P.M., Nobre, B.P., Ertekin, F., Hayes, M., Garcíá-Vaquero, M., Vieira, F., Koc, M., Gouveia, L., Aires-Barros, M.R., Palavra, A.M.F. (2017) Extraction of value-added compounds 43 from microalgae. U: Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts (Gonzalez-Fernandez, C., Muñoz, R., ured.), Woodhead Publishing, Duxford, str. 461-483.
- Verlaque, M., Boudouresque, C., Perret-Boudouresque, M. (2019). Mediterranean seaweeds listed as threatened under the Barcelona Convention: A critical analysis. 179-214.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry-A review. *Inno. Food. Sci. Emerg. Technol.* **9**, 161.
- Vimala, T., Poonghuzhali, T. V. (2015) Estimation of pigments from seaweeds by using acetone and DMSO. *Int. J. Sci. Res.* **4**, 1850-1854.
- Warkoyo, W., Saati, E. (2011) The solvent effectiveness on extraction process of seaweed pigment. *Makara Teknologi* **15**, 5-8.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., Li, P. (2010). Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **46(1)**, 6–12.
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J.S., Raven, J.A., Merchant, S.S., Helliwell, K.E., Smith, A.G., Camire, M.E., Brawley, S.H. (2017) Algae as nutritional and functional food sources: revisiting our understanding. *J. Appl. Phycol.* **29**, 949-982.
- Wijesinghe, W. A. J. P., Jeon, Y. J. (2013) Enzymatic extraction of bioactives from algae. U: Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals (Domínguez, H., ured.), Woodhead Publishing Limited, str. 517-533.

Wang, L., Weller, C.L. (2006) Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food Sci Technol.*, **17**, 300-312.

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

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

Yalcin, S., Sezer, S., Apak, R. (2012) Characterization and lead(II), cadmium(II), nickel(II) biosorption of dried marine brown macro algae *Cystoseira barbata*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **19**, 3118–3125.

Yan, J.K., Wang, Y.Y., Ma, H.L., Wang, Z. (2016) Bin Ultrasonic effects on the degradation kinetics, preliminary characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Phellinus linteus mycelia*. *Ultrason. Sonochem.* **29**, 251–257.

Zhang, T.T., Lu, C.L., Jiang, J.G., Wang, D.M., Zhu, W. (2015) Bioactivities and extraction optimization of crude polysaccharides from the fruits and leaves of *Rubus chingii* Hu. *Carbohydr. Polym.* **130**, 307-315.

## 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.

*Jelena Novak*  
\_\_\_\_\_  
Ime i prezime studenta