

Optimizacija konvencionalne ekstrakcije polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata*

Dobroslavić, Erika

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:159:531028>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 22. srpnja 2020.g.

Erika Dobroslavić 1184/N

**OPTIMIZACIJA
KONVENCIONALNE
EKSTRAKCIJE POLISAHARIDA IZ
SMEĐE ALGE *Cystoseira barbata***

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

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

ZAHVALA

Iskreno zahvaljujem svojoj mentorici prof.dr.sc. Verici Dragović-Uzelac na ukazanom povjerenju, uloženom vremenu i korisnim savjetima. Od srca zahvaljujem doktorandici Ani Dobrinčić, mag.ing. na pomoći, strpljenju, prenesenom znanju i dostupnosti u svakom trenutku izrade ovog rada.

Posebno želim zahvaliti svojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog školovanja, kao i ostatku obitelji i svim prijateljima koji su bili uz mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Erika Dobroslavić, 1184/N

Sažetak: Smeđa alga *Cystoseira barbata* izvor je brojnih bioaktivnih molekula od kojih je sulfatirani polisaharid fukoidan među značajnijima. Fukoidanu se pripisuju brojna biološka svojstva i aktivnosti te stoga ima značajnu primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Cilj rada bio je optimizirati uvjete konvencionalne ekstrakcije fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira barbata*. Ekstrakcija je provedena primjenom klasičnih postupaka uz kontinuirano miješanje otapala i uzorka, a istražen je utjecaj otapala (destilirana voda i 0,1M HCl), temperature (40, 60 i 80 °C) i vremena (1, 2 i 3 h) ekstrakcije na degradaciju alge (gubitci algalne mase tijekom ekstrakcije), prinos fukoidana, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, koncentraciju sulfatnih grupa i antioksidacijsku aktivnost. Najmanja degradacija alge postignuta je u vodi pri 40°C i 1 h s trendom porasta povećanjem temperature i produljenjem vremena ekstrakcije. Optimalni uvjeti pri kojima se dobivaju najveći prinosi fukoidana i koncentracija ukupnih ugljikohidrata bili su otapalo 0,1M HCl, temperatura 80 °C i vrijeme ekstrakcije 3 h. Najveća koncentracija sulfatnih grupa dobiva se uz primjenu 0,1M HCl, pri temperaturi 40 °C i vremenu ekstrakcije 1 h. Antioksidacijska aktivnost najveća je u vodenim ekstraktima dobivenim pri temperaturi 60 °C i vremenu ekstrakcije 2 h. Veća koncentracija sulfatnih grupa rezultirala je manjom antioksidacijskom aktivnosti.

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

Rad sadrži: 58 stranica, 6 slika, 4 tablice, 123 literaturna 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. Doc.dr.sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednik)
2. Prof.dr.sc. Verica Dragović-Uzelac (mentor)
3. Izv.prof.dr.sc. Sandra Albino (član)
4. Prof.dr.sc. Božidar Šantek (zamjena)

Datum obrane: 22. srpnja 2020.g.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Erika Dobrosravić, 1184/N

Abstract: The brown alga *Cystoseira barbata* is a source of many bioactive molecules among which the sulfated polysaccharide fucoidan is a significant one. Fucoidan is used by the food and pharmaceutical industry due to its many biological activities. The aim of this study was to optimize the conditions of conventional extraction of fucoidan from the brown alga *Cystoseira barbata*. Extraction was performed using classical procedures with continuous mixing of the solvent and sample. The influence of solvents (distilled water and 0.1M HCl), temperature (40, 60 and 80 °C) and extraction time (1, 2 and 3 h) on algal degradation (loss of algal mass during extraction), fucoidan yield, concentration of total carbohydrates, concentration of sulfate groups and antioxidant activity was investigated. The lowest percent of algal degradation was achieved in water at 40 °C and 1 h with a tendency to increase with increasing temperature and prolonging the extraction time. The optimal conditions for the highest yield of fucoidan and the concentration of total carbohydrates were 0.1M HCl as a solvent, temperature of 80°C and extraction time of 3 h. The highest concentration of sulphate groups was achieved in 0.1M HCl, at temperature of 40 °C and an extraction time of 1 h. Antioxidant activity was highest in water extracts at temperature of 60 °C and 2 h extraction time. A higher concentration of sulfate groups resulted in lower antioxidant activity.

Keywords: brown algae, *Cystoseira barbata*, sulphated polysaccharides, fucoidan, extraction

Thesis contains: 58 pages, 6 figures, 4 tables, 123 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Ana Dobrinčić, MSc Engg.

Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD, Assistant Professor (president)
2. Verica Dragović-Uzelac, PhD, Full Professor (mentor)
3. Sandra Balbino, PhD, Associate Professor (member)
4. Božidar Šantek, PhD, Full Professor (substitute)

Thesis defended: July 22nd 2020

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ALGE.....	2
2.1.1. <i>Cystoseira barbata</i>	3
2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA.....	5
2.2.1. Crvene alge – karagenan.....	5
2.2.2. Zelene alge – ulvan.....	6
2.2.3. Smeđe alge.....	7
2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA U ALGAMA.....	10
2.3.1. Pregled metoda ekstrakcije polisaharida iz algi.....	11
2.3.2. Ekstrakcija karagenana.....	12
2.3.3. Ekstrakcija ulvana.....	13
2.3.4. Ekstrakcija fukoidana.....	13
2.4. PRIMJENA FUKOIDANA.....	16
2.4.1. Zakonska regulativa o fukoidanu u hrani i dodacima prehrani.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJALI.....	18
3.1.1. Uzorak smeđe alge <i>Cystoseira barbata</i>	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Aparatura.....	19
3.1.4. Pribor.....	20
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Predtretman.....	20
3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida.....	22
3.2.3. Postupci nakon ekstrakcije.....	22
3.2.4. Određivanje klorofila-a, klorofila-b i karotenoida UV/Vis spektrofotometrijom.....	23
3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata.....	24
3.2.6. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa.....	25
3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	26
3.2.8. Određivanje udjela suhe tvari.....	27
3.2.9. Statistička obrada rezultata.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA DEGRADACIJU ALGE.....	32
4.1.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na degradaciju alge.....	32
4.1.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na degradaciju alge.....	32
4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA PRINOS FUKOIDANA.....	33
4.2.1. Utjecaj otapala na prinos fukoidana.....	33
4.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije na prinos fukoidana.....	34
4.2.3. Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos fukoidana.....	35
4.2.4. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na prinos fukoidana.....	35
4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA.....	37
4.3.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	37
4.3.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	38
4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA KONCENTRACIJU SULFATNIH GRUPA.....	39
4.4.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na koncentraciju sulfatnih grupa.....	39
4.4.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na koncentraciju sulfatnih grupa.....	40

4.5. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST.....	41
4.5.1. Utjecaj otapala, temeprature i vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost.....	41
4.5.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost.....	42
4.6. UTJECAJ KONCENTRACIJE SULFATNIH GRUPA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST.....	43
4.7. KONCENTRACIJA PIGMENATA U EKSTRAKTU IZ PREDTRETMANA.....	44
5. ZAKLJUČCI.....	46
6. POPIS LITERATURE.....	47

1. UVOD

Posljednjih godina kontinuirano se razvijaju i nadograđuju spoznaje o funkcionalnim sastojcima iz različitih vrsta hrane te se nastoje pronaći novi potencijalni izvori bioaktivnih spojeva. Morske alge prepoznate su kao vrijedan izvor istih zbog biološke aktivnosti polisaharida, lipida, proteina, polifenola, pigmenata i drugih molekula u njihovom sastavu. Stanične stijenke algi bogate su sulfatiranim polisaharidima koji nalaze svoju primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Primjer takvih polisaharida, koji se iz algi ekstrahiraju različitim metodama ekstrakcije, jesu karagenan u crvenim algama, ulvan u zelenim algama i fukoidan u smeđim algama.

Različite studije pokazale su da fukoidan iz smeđih algi ima antioksidacijsko, antikoagulacijsko, protuupalno, antitumorno, antivirusno i imunoregulatorno djelovanje, a postoje i rezultati koji ukazuju na to da ima utjecaj na humanu crijevnu mikrobiotu, kao i da može djelovati antialergijski (Mizuno i sur., 2020; Wang i sur., 2019).

Fukoidan se najčešće iz smeđih algi ekstrahira konvencionalnim metodama koje uključuju predtretman alge radi uklanjanja interferirajućih spojeva, ekstrakciju fukoidana s otapalima poput vruće vode, razrijeđene kiseline ili lužine, izolaciju i pročišćavanje fukoidana frakcijskim taloženjem etanolom, solima olova i kalcija kao i kvarternim amonijevim solima te konačno sušenje ekstrakta fukoidana. Postoje i nove metode ekstrakcije razvijene u svrhu povećanja brzine ekstrakcije i manjeg utroška energije i otapala, a najpoznatije su upotreba enzima, ultrazvuka i mikrovalova.

Cilj ovog rada bio je optimizirati konvencionalnu metodu ekstrakcije fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira barbata* i odrediti utjecaj otapala (destilirana voda i 0,1M HCl), vremena (1, 2 i 3 h) i temperature (40, 60 i 80°C) na postotak degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk), koncentraciju ukupnih ugljikohidrata (mg g^{-1}), koncentraciju sulfatnih grupa (mg g^{-1}) i antioksidacijsku aktivnost, te odrediti optimalne parametre pri kojima se dobivaju najveći prinosi. Određene su i količine pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) u filtratu koji zaostaje kao nusprodukt iz postupka predtretmana.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Alge su raznolika skupina vodenih organizama koji imaju sposobnost stvaranja kisika procesom fotosinteze. Izraz "alge" obuhvaća mnogo organizama koji nisu nužno usko povezani, no zajedničko im je što za razliku od kopnenih biljaka, nemaju korijen, stabljiku, listove ni sustav žila (ksilem i floem), no imaju biljkama slične stanice koje sadrže plastide, stanične stijenke i vakuole. Morske alge mogu biti litofiti (rast na tvrdoj površini), epifiti (rast na drugim algama), endofiti (unutar drugih algi) ili paraziti koji ovise o domaćinu (Dawes, 2016). Dije se na mikrofitske i makrofitske te svojom veličinom mogu varirati između nekoliko mikrometara u promjeru kao što je slučaj kod jednostaničnih algi, pa sve do preko 30 metara dugih kelpova. Morske alge mogu se razvrstati u tri glavne skupine na temelju izraženih fotosintetskih pigmenata: smeđe, crvene i zelene (Adl i sur., 2005).

1. Smeđe alge ili morska trava (Phaeophyta) obično su velike, a veličina im varira od divovskih kelpova duljine i do 20 m, debelih morskih trava duljine 2–4 m, do manjih vrsta duljine 30–60 cm. Dnevno mogu rasti i po 20 cm. Više od 95% smeđih algi su morske (Dawes, 2016), a najpoznatiji predstavnici su: Diktiota (lat. *Dyctiota dichotoma*), Padina (lat. *Padina pavonica*), Jadranski bračić (lat. *Fucus virsoides*), Cistozira (lat. *Cystoseira*). Većina smeđih morskih algi sadrži pigment fukoksantin, koji je odgovoran za izrazitu zelenkasto-smeđu boju po kojoj su dobile ime. Smeđe morske alge proizvode niz bioaktivnih komponenti, uključujući jedinstvene sekundarne metabolite kao što su florotanini, a mnogi od njih imaju specifične biološke aktivnosti koje su potencijal za njihovo ekonomsko iskorištavanje (McHugh i sur., 2003).
2. Crvene alge (Rhodophyta) predstavljaju drevnu lozu fotosintetskih eukariota nastalih endosimbiozom za što je dokaz fosil star 1,2 milijardu godina (Dawes, 2016). Često žive u dubokim oceanima gdje nema ostalih algi. Obično su manje s duljinom koja varira od nekoliko centimetara do jednog metra. Proizvode agar koji se koristi u mikrobiološkim hranjivim podlogama i kao prehrambeni aditiv. Dominantni pigment u crvenim morskim algama je fikoeritrin. Zanimljivo je da crvene morske alge nisu uvijek crvene boje, ponekad su ljubičaste, čak smeđe-crvene, ali ipak se klasificiraju kao Rhodophyceae zbog drugih karakteristika (El Gamal, 2010).
3. Zelene alge (Chlorophyta) prethodnici su današnjih biljaka, produciraju slobodni kisik, imaju klorofil "a" i "b" koji im daju tipičnu zelenu boju, pohranjuju škrob unutar kloroplasta, a u

staničnim stijenkama sadrže celulozu. Zelene morske trave rasponom veličine slične su crvenim morskim algama (El Gamal, 2010).

Od ostalih vrsta značajne su :

- Kremene alge (Chrysophyta ili dijatomeje) - zlatnosmeđe i žutozelene alge. Produciraju kisik te mogu proizvoditi vitamine A i D. Dijatomejska zemlja koristi se za filtriranje, u industriji stakla, eksploziva i izolacijskih materijala.
- Euglenoidi (Euglenophyta) - zeleni bičaš
- Dinoflagelati (Pyrrophyta) - uzrokuju paralizu nakon hranjenja školjkašima. Cvjetanje dinoflagelata naziva se «crvena plima», a indikator je onečišćenja jer alge cvjetaju u okolišu koji ima visoki sadržaj organske tvari pri čemu se izrazito smanjuje razina kisika koji je otopljen u vodi.

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

2.1.1. *Cystoseira barbata*

Rod *Cystoseira* uključuje oko 294 vrste algi i najreprezentativniji je u obitelji *Sargassaceae*, sastavljene od nekadašnjih dviju porodica *Sargassaceae* i *Cystoseiraceae* (Gouveia i sur., 2013). Alge ovog roda pronalaze se uglavnom na obalama Sredozemnog i Crnog mora, kao i istočnoj obali Atlantskog oceana. Istraživanja kemijskog sastava roda *Cystoseira* utvrdila su širok

spektar sekundarnih metabolita s biološkim djelovanjem kao što su terpenoidi, ugljikohidrati i florotanini koji su specifični upravo za smeđe alge (Trica i sur., 2019).

Cystoseira barbata (Slika 1.) smeđa je grmolika alga koja može narasti i do dva metra visine. Najčešće obitava u gornjoj sublitoralnoj zoni na otprilike 0,2 m dubine na zaštićenim i otvorenim stjenovitim obalama te obalnim lagunama (Berov i sur., 2015). Prihvaća se za podlogu čvrstom bazom iz koje izlazi više cilindričnih grana na kojima se nalaze ovalne ili okrugle aerociste koje služe za održavanje vertikalne pozicije u vodi. Višegodišnja je alga čiji je vrhunac razvoja u travnju i svibnju, a unutar svoje geografske rasprostranjenosti pokazuje morfološke varijacije, ovisno o okolišnim uvjetima (Falace i Bressan, 2006).



Slika 1. *Cystoseira barbata* alga (Razred: Phaepophyta; Red: Fucales; Rod: *Cystoseira*)
(Galatchi i sur., 2014)

Cystoseira barbata prikupljana na obalama Tunisa prema istraživanjima sadrži spojeve koji su biološki aktivni kao što je laminarin koji ima antioksidacijska, antibakterijska i svojstva zacjeljivanja rana (Trica i sur., 2019). Fukoksantin, pigment izoliran iz ove alge, koristi se kao pojačivač boje i oksidacijske stabilnosti u mesnim proizvodima, a konjugati polifenola, proteina i polisaharida koriste se kao biokonzervansi. Na obalama Crnoga mora *Cystoseira barbata* tradicionalno se konzumira kao funkcionalna hrana (Trica i sur., 2019). Nije provedeno mnogo istraživanja s fokusom na sulfatirane polisaharide u ovoj algi. Istraživanje Sellimi i suradnika (2014) pokazalo je kako sulfatirani polisaharidi iz alge *Cystoseira barbata* imaju značajnu antioksidacijsku aktivnost putem nekoliko mehanizama uključujući keliranje iona metala, doniranje elektrona ili protona i hvatanje radikala prilikom peroksidacije što se pripisuje upravo

visokom sadržaju sulfatnih i acetilnih grupa. Ovi rezultati ukazuju na to da sulfatirani polisaharidi izolirani iz alge *Cystoseira barbata* imaju velik potencijal za primjenu kao funkcionalna hrana, te u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

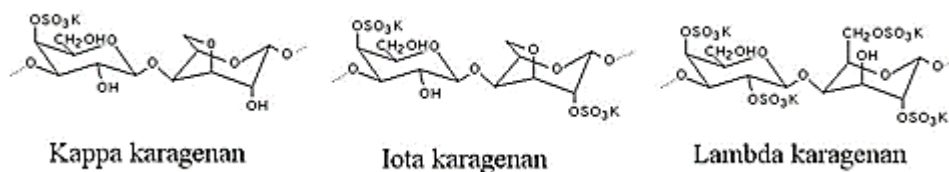
2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA

Polisaharidi su ugljikohidrati veće molekularne mase i složenije građe, koji se sastoje od više monosaharida tj. jednostavnih šećera, međusobno povezanih glikozidnom vezom. Monomerne jedinice šećera povezuju se pomoću enzima i formiraju polimere ili polisaharide koji se nazivaju i glikani. Polisaharidi u kojima su sve monomerne jedinice iste nazivaju se homopolisaharidi, a u kojima su različite heteropolisaharidi. Oblici polisaharida ovise o tome koji se monosaharidi povezuju i preko kojeg ugljika u njihovim molekulama se povezuju. Linearni polisaharid jest ravni lanac monosaharida, dok su u razgranatom polisaharidu molekule monosaharida razgranato povezane (BeMiller, 2019).

Morske alge bogate su sulfatiranim polisaharidima koji se nalaze u njihovim staničnim stijenkama, a neki od njih postali su vrijedni aditivi u prehrambenoj industriji zbog svojih reoloških svojstava poput geliranja ili zgušnjavanja (karagenan iz crvenih algi). Također, sulfatirani polisaharidi posjeduju različita biološka djelovanja poput antikoagulacijskog, antivirusnog te imunomodulatornog djelovanja koje im daje mogućnost primjene kao nutraceutika, funkcionalne hrane te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Jiao i sur., 2011). Osim spomenutog karagenana, potrebno je izdvojiti ulvan u zelenim algama te fukoidan i laminarin u smeđim algama.

2.2.1. Crvene alge - karagenan

Crvene morske alge proizvode dvije obitelji sulfatiranih polisaharida, agarane i karagenane, koji se klasificiraju ovisno o njihovoj stereokemiji. Agarani se sastoje od lanaca galaktoznih jedinica u L konfiguraciji, dok se struktura okosnice karagenana temelji na linearnim lancima ponavljajućih galaktoznih jedinica u D konfiguraciji (D-šećer) i 3,6-anhidro-galaktozni kopolimer, spojenih naizmjeničnim α -(1→3) i β -(1→4) vezama (Jiao i sur., 2011). Postoji najmanje 15 različitih struktura karagenana, a industrijski najvažniji su Kappa, Iota i Lambda karagenan (Slika 2.)



Slika 2. Struktura Kappa, Iota i Lambda karagenana (Simon, 2020)

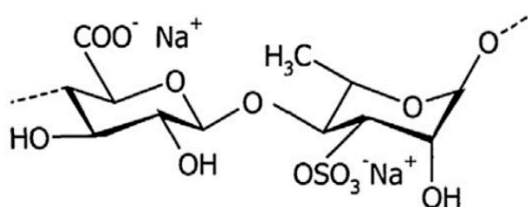
Svima im je okosnica galaktoza, ali se razlikuju po položaju i količini ester sulfatnih skupina i anhidro- galaktoza. Kappa i Iota karagenani tvore gelove, pri čemu su gelovi Kappa karagenana čvršći, a gelovi Iota karagenana mekši i elastičniji. Lambda karagenani ne tvore gel (Cunha i sur., 2016). Kao što je već spomenuto karagenani imaju nekoliko primjena u prehrambenoj industriji, a unutar podskupina ovog prirodnog hidrokoloida može se razviti vrlo širok raspon tekstura koristeći se njihovim različitim svojstvima i koristeći sinergizam s nekim drugim hidrokoloidima i mliječnim proteinima. Kappa karagenan formira gel u prisutnosti kalijevih iona, te se to svojstvo uvelike iskorištava u industriji mesa, u desertnom gelu i glazurama za kolače.

Karagenani ekstrahirani iz crvenih morskih algi nisu probavljivi u ljudskom tijelu i smatraju se izvorom dijetalnih vlakana te u nekim slučajevima mogu biti vegetarijanska zamjena za želatinu. Postoji briga o sigurnosti upotrebe karagenana u prehrani zbog rezultata istraživanja na životinjama gdje se pokazalo kako konzumacija karagenana dovodi do gastrointestinalnih upala. Zbog toga mnogi liječnici savjetuju izbjegavanje karagenana osobama s postojećim gastrointestinalnim poteškoćama poput ulceroznog kolitisa i sindroma iritabilnog crijeva. Karagenani su se pokazali kao moćni inhibitori HPV infekcije *in vitro* i na životinjskim modelima, a postoje i istraživanja koja pokazuju kako karagenani djeluju na uzročnike, a ne simptome obične prehlade te da se nazalni sprejevi s karagenanima mogu koristiti profilaktički za sprječavanje prehlade (Kariduraganavar i sur., 2014).

2.2.2. Zelene alge - ulvan

Ulvan je veliki polisaharid iz zelenih algi reda Ulvales koji u najvećoj količini sadrži sulfat, ramnozu, ksilozu, i uronsku kiselinu. Njegova struktura (Slika 3.) iznimno je kompleksna i varijabilna zbog brojnih ponavljajućih strukturnih jedinica oligosaharida (Jiao i sur., 2011). Ramnozni ostaci se sulfatiraju uglavnom na položaju C-3 ili na položajima C-2 i C-3. U nekim ekstraktima ulvana mogu se pojaviti ostaci ksiloze ili sulfatirane ksiloze na položajima C-2 i C-3 umjesto uronskih kiselina. Kao i kod ostalih polisaharida, svojstva ulvana ovise o kemijskom

sastavu, gustoći električnog naboja i molekularnoj težini ulvana. Također, prinos i specifičan sastav polisaharida iz zelenih algi ovisi o različitim čimbenicima kao što su vrsta alge, godišnje doba u kojem se alge sakupljaju te korištena metoda ekstrakcije. (Alves i sur., 2013).



Slika 3. Struktura ulvana (Fleurence i Gall, 2016)

Ulvan pokazuje antioksidativno djelovanje koje, kao i kod svih sulfatiranih polisaharida, ovisi o njegovoj molekularnoj masi. Ulvan manje molekularne mase pokazuje veću antioksidacijsku aktivnost, moguće zbog toga što lakše ulazi u stanicu i učinkovitije donira proton u odnosu na one veće molekularne mase (Li i sur., 2020). Prema literaturi, ulvan smanjuje ukupni serumski kolesterol, trigliceride i LDL kolesterol, dok povisuje razinu HDL kolesterola (Qia i sur., 2012). Ivanova i suradnici (1994) navode da ulvan izoliran iz zelene alge ima dobar inhibitorski učinak na virus gripe A *in vitro*, a učinak inhibicije ovisan je o dozi polisaharida i specifičan za sojeve gripe. Pokazalo se da ulvan ima visoku i specifičnu aktivnost protiv herpes simplex virusa (Cunha i sur., 2016), a istraživanje Kidgell i suradnika (2020) pokazalo je kako ulvan iz alge *Ulva ohnoi* pokazuje imunomodulatorni učinak *in vitro*.

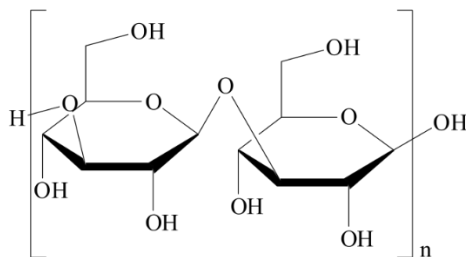
2.2.3. Smeđe alge

Polisaharidi iz smeđih algi izoliraju se i u značajnim količinama koriste u biotehnologiji, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Usov i Bilan, 2009). Polisaharidi koji se nalaze u staničnoj stijenci smeđih algi jesu alginati, laminarin i sulfatirani polisaharidi (fukoidan) koji privlače mnogo pažnje u području farmakologije i biokemije. Fukoidan je prisutan samo u smeđim morskim algama i sadrže ga sve poznate smeđe alge (Lim i sur., 2014; Usov i Bilan, 2009). Na sastav i fizikalno-kemijska svojstva ovih polisaharida utječu vrsta i starost alge, godišnja doba, te geografski položaj (Rioux i sur., 2007; Zvyagintseva i sur., 2003). Sva tri polisaharida imaju jedinstvena fizikalno - kemijska svojstva koja su bitna za proces njihovog izlučivanja iz stanica algi.

2.2.3.1. Laminarin i alginat

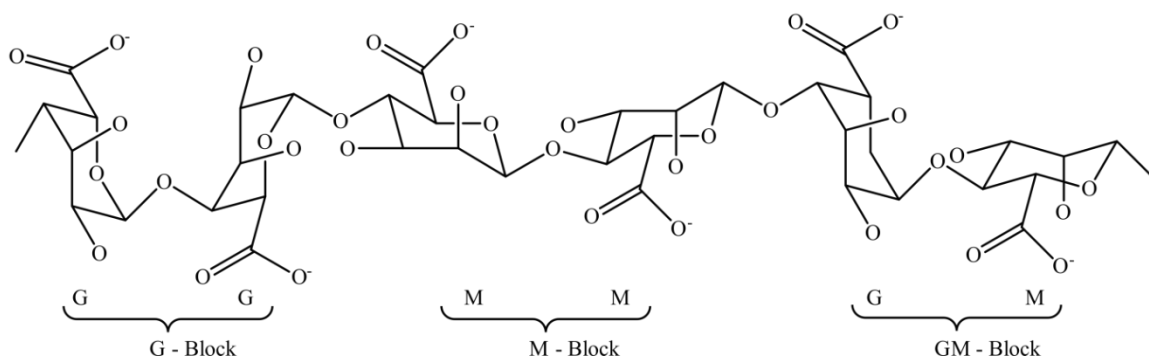
Laminarin (Slika 4.), također poznat kao laminaran ili leukozin, polisaharid je relativno

niske molekularne mase od približno 5 kDa, ovisno o stupnju polimerizacije. Prvi ga je izolirao Schmiedeberg 1885. godine iz algi porodice *Laminariaceae*. Sastavljen je od 20-25 jedinica glukoze s tragovima manitola, a služi kao rezerva hrane u smeđim algama zbog čega je poznat i kao škrob smeđih algi (Zhang, 2020). Studije su pokazale kako laminarin i produkti njegove enzimske hidrolize pokazuju antitumorsku aktivnost - inhibiraju proizvodnju stanica melanoma i raka debelog crijeva (Menshova i sur., 2014), kao i rast stanica raka jajnika (Bae i sur., 2020).



Slika 4. Struktura laminarina (prema Bae i sur., 2020)

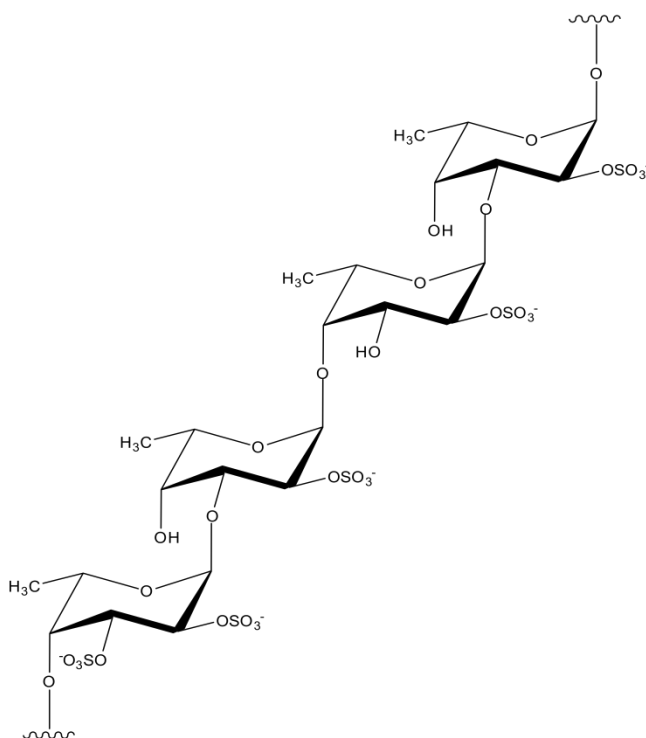
Alginati (Slika 5.) su linearni polisaharidi sastavljeni od β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline koje su nepravilno raspoređene i spojene u konfiguraciji 1 \rightarrow 4. Mogu biti prisutni u obliku alginske kiseline ili u formi njene soli, a zanimljivo svojstvo alginata je da su u kalcijevom obliku netopljivi, dok su u natrijevom topljivi. Molekurna masa alginata iznosi uglavnom između 500 i 1000 kDa. Prema istraživanjima, alginati imaju brojne učinke na zdravlje poput prevencije apsorpcije teških metala u tijelu (Burtin, 2003), prevenciji razvoja dijabetesa tipa II te inhibitornog učinka na bakterije rodova *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* i *E.coli* (Kim i sur., 2008).



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

2.2.3.2. Fukoidan

Fukoidan je naziv za sulfatirane polisaharide koji se nalaze u fibrilarnom tkivu stanične stijenke i međustaničnom prostoru smeđih morskih algi. Sastoji se uglavnom od fukoza koje su povezane α -(1,3) ili naizmjeničnim α -(1,3) i α -(1,4) glikozidnim vezama (Slika 6.), te rijetko α -(1,2) vezama. Osim fukoze, sadrži i druge monosaharide uključujući galaktozu, glukozu, manozu, ramnozu, ksilozu i uronsku kiselinu, čiji udio ovisi o vrsti alge i godišnjem dobu (Lim i sur., 2016; Zvyagintseva i sur., 2003). Glavna karakteristika fukoidana je da sadrži sulfat estersku skupinu (Usov i Bilan, 2009; Lim i sur., 2016). Sulfatne grupe mogu se smjestiti u ekvatorijalnoj ravnini na C2 i/ili C3 položajima i/ili u aksijalnoj ravnini, odnosno C4 položaju fukoze (Ale i sur., 2011a). Fukoidan čini otprilike 40% suhe tvari stanične stijenke alge (Udani i Hesslink, 2012), odnosno 5-10% ukupne suhe tvari alge. Ima veliki raspon molekulske mase, od 7 kDa (Zvyagintseva i sur., 2003) pa sve do 2300 kDa (Rioux i sur., 2009), a sadržaj sulfata varira između 5% (Lim i sur., 2016) i 38% (Usov i Bilan, 2009). Osim u smeđim algama, fukoidan se može naći u vrlo malim količinama u zelenim (Chlorophyta), crvenim (Rhodophyta) i zlatnožutim algama (Xanthophyta) te u morskim beskralježnjacima (Echinodermata) poput morskog ježinca i trpa (Udani i Hesslink, 2012).



Slika 6. Shematski prikaz molekule fukoidana iz *Fucus vesiculosus* s naizmjeničnim α -(1 \rightarrow 3) i α -(1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama (prema van Weelden i sur., 2019)

Prema istraživanjima, fukoidan ima različite biološki važne uloge uključujući antioksidacijsku, protuupalnu, antibakterijsku, antivirusnu, antitumorsku, antikoagulacijsku i antialergijsku (Ale i sur., 2011a; Lim i sur., 2014; Mizuno i sur., 2020), kao i specifične aktivnosti protiv bubrežnih i jetrenih bolesti, te bolesti mokraćnog sustava. Sulfatne skupine u strukturi fukoidana igraju veliku ulogu u njegovim biološkim aktivnostima te je utvrđeno da se povećanjem udjela sulfatnih skupina povećavaju antikoagulacijska (Chevot i sur., 1999) i antioksidacijska aktivnost (Wang i sur., 2010a). Prema Wang i suradnicima (2010a), sulfatne skupine djeluju na način da privlače elektrone u polisaharidu čime se povećava njegova stabilnost i antioksidacijska aktivnost te učinak čišćenja slobodnih radikala.

Budući da fukoidan ima relativno visoku molekularnu masu, njegova apsorpcija poslije oralnog unosa u čovjekovom organizmu je niska što je potvrđeno ELISA testom sa specifičnim antitijelima za fukoidan (Irhimeh i sur., 2005). Alternativni način unosa je intravenozni unos fukoidana niske molekularne mase za kojeg se pokazalo kako se vrlo brzo apsorbira kod zečeva (Zhang i sur., 2016) te autori u njemu vide potencijal za kliničku primjenu. Huang i Lam (2011) razvili su nanočestice kitozana i fukoidana u svrhu povećanja biodostupnosti kurkumina, a Udani i Hesslink (2012) u ovome vide mogućnost razvoja veće biodostupnosti samog fukoidana poslije oralnog unosa. Na životinjskim modelima, fukoidan nije uzrokovao toksični odgovor, čak ni s relativno visokim ponavljajućim dozama što je u skladu s rezultatima *in vitro* istraživanja na zdravim ljudskim stanicama iz drugih studija (van Weelden i sur., 2019).

2.3. EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA U ALGAMA

Ekstrakcija je učinkovita i brza metoda razdvajanja i koncentriranja tvari. Tvari iz homogenih smjesa ekstrahiraju se na osnovu njihove različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Dobivenu otopinu potrebno je otpariti i kristalizirati kako bi se izdvojila tvar u čistom obliku (Lianfu i Zelong, 2008). Postoje različite konvencionalne metode ekstrakcije poput destilacije, ekstrakcije otapalima i hladnog prešanja, ali i nekonvencionalne kao što je ekstrakcija superkričnim fluidima, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, ekstrakcija s električnom energijom, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom i ubrzana ekstrakcija otapalima prvi povišenom tlaku. Opće pravilo kod ekstrakcije je da kod ekstrakcije čvrstih tvari usitnjavanjem treba povećati površinu uzajamnog djelovanja među fazama, u sredini povećati brzinu gibanja faza, a za povećanje količine tvari produljiti vrijeme trajanja ekstrakcije (Eskilsson i Bjorklund, 2000).

2.3.1. Pregled metoda ekstrakcije polisaharida iz algi

Sulfatirani polisaharidi iz algi u većini literature se ekstrahiraju vrućom vodom i klorovodičnom kiselinom, što su popularne i prikladne konvencionalne metode koje se mogu koristiti za učinkovitu izolaciju polisaharida iz algi (Vanavil i sur., 2020). Uz konvencionalne sve više se istražuju i razvijaju napredne tehnike ekstrakcije s ciljem povećanja iskorištenja, smanjene upotrebe otapala za ekstrakciju, skraćanja vremena provođenja ekstrakcije na nižim temperaturama, što doprinosi održivosti ekstrakcije smanjenjem utrošene energije (Jönsson i sur., 2020). Pregled naprednih tehnika ekstrakcije polisaharida iz smeđih algi sistematično je prikazan u radu „Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides“ (Dobrinčić i sur., 2020).

2.3.1.1. Konvencionalne metode ekstrakcije

Konvencionalne metode ekstrakcije obuhvaćaju različite postupke ekstrakcije kiselinama ili bazama te ekstrakcije vrućom ili hladnom vodom. Kiseline ili baze koriste se obično kako bi se olakšala ekstrakcija jer vodikovi ioni (H^+) i hidroksilne skupine (OH^-) ometaju vodikove veze među polisaharidima. Konvencionalne metode oslanjaju se na svojstva topljivosti ciljanih spojeva i često im prethodi predtretman gdje se otapalima uklanjaju lipidi, pigmenti, proteini i druge nečistoće (Jönsson i sur., 2020). Prednost ovih metoda je što su uhodane, a nedostaci su dugo vrijeme ekstrakcije, visoka potrošnja energije i otapala, moguća degradacija ciljanih polisaharida kod korištenja kiselina i baza te moguće opasnosti za zdravlje kod korištenja određenih kemijskih otapala (Wang i sur., 2010b).

2.3.1.2. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ova metoda zasniva se na tome da se algalna biomasa izlaže zvučnim valovima frekvencija iznad 20 kHz pri čemu se stvaraju kavitacije koje rastu i propadaju čime se zvučni valovi pretvaraju u mehaničku energiju koja uzrokuje raspad stanice i stanične stijenke. UAE se može provoditi na niskim temperaturama što olakšava ekstrakciju ciljanih spojeva osjetljivih na temperaturu, no potrebno je voditi računa o unosu energije tijekom ekstrakcije kako bi se izbjegle moguće strukturne promjene na sulfatiranom polisaharidu (Vilkhu i sur., 2008). Kadam i suradnici (2015a) proveli su istraživanje u kojem su uspoređene učinkovitosti konvencionalnih postupaka ekstrakcije laminarina i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom te su utvrdili da je primjena postupka UAE rezultirala većim prinosom laminarina u odnosu na konvencionalne postupke.

2.3.1.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima bazira se na neionizirajućem elektromagnetskom zračenju frekvencija između 300 MHz i 300 GHz što uzrokuje pucanje vodikovih veza zbog rotacije dipola i migraciju otopljenih iona. Ovo povećava penetraciju otapala u matriks stanice i na taj način potiče otapanje (Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000). Temperatura, tlak, vrijeme i omjer alge i vode mogu se mijenjati kako bi se optimirao prinos željenog spoja. Izbor otapala je u mikrovalnoj ekstrakciji jako važan, a izabrano otapalo treba posjedovati visoku dielektričnu konstantu i mogućnost dobrog upijanja energije mikrovalova (Bousbia i sur., 2009). Prednosti su kraće vrijeme ekstrakcije, visoka kvaliteta proizvoda i relativno mala potreba za otapalom, a nedostatak može biti manji prinos zbog degradacije polisaharida (Jönsson i sur., 2020). Istraživanja su pokazala da je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima obećavajuća metoda za ekstrakciju aktivnih komponenti iz prirodnih resursa, uključujući i morske alge (Vazquez-Delfin i sur., 2014; Bagherian i sur., 2011).

2.3.1.4. Ekstrakcija potpomognuta enzimima (EAE)

U ovoj ekstrakciji koriste se enzimi za degradaciju stanične stijenke algi što olakšava otpuštanje i migraciju željenih spojeva u ekstrakcijsko otapalo. Najčešće se koriste enzimi koji kataliziraju degradaciju spojeva u staničnoj stijenci kao što su celuloza, β -glukan i hemiceluloza, a budući da je stanična stijenska kemijski i strukturno vrlo heterogena, potrebno je dobro definirati enzimsku smjesu koja će se koristiti. Prema Hahn i suradnicima (2012) za ekstrakciju fukoidana iz *F. vesiculosus*, preporuča se upotreba enzima kao što su alginat liaza, celulaza i laminarinaza. Važna prednost metode ekstrakcije enzimima je jednostavno odvajanje polisaharida od produkata enzimske obrade upotrebom poprečnog filtriranja ili membrana. Enzimi i sulfatirani polisaharidi zadržavaju se na membrani, dok se manji fragmenti stanične stijenke, uklanjaju tijekom lize stanice. Prinos ekstrakcije uvelike ovisi o vremenu provođenja, pH i temperaturi, a rizik je razgradnja ciljanih spojeva za ekstrakciju djelovanjem nespecifičnih enzima (Kadam i sur., 2015b)

2.3.2. Ekstrakcija karagenana

Proizvodnja karagenana sastoji se od ekstrakcije, pročišćavanja, koncentriranja, taloženja i sušenja, iako se osnovni postupak može razlikovati ovisno o obitelji crvenih algi iz koje se ekstrahira polisaharid. U konvencionalnoj ekstrakciji karagenana koriste se alkalne otopine jer se u takvim uvjetima uklanjaju neke sulfat-esterske grupe formacijom 3,6-anhidro-D-galaktoze što poboljšava jačinu gela (Bono i sur., 2014). Postoje dvije glavne metode konvencionalne ekstrakcije karagenana temeljene na različitim principima. U prvoj i originalnoj metodi karagenan se

ekstrahira iz morskih algi u vodenoj otopini koja sadrži lužinu, npr. natrijev hidroksid. Nakon filtriranja uklanjaju se preostali ostaci i dodatkom alkohola se ubrzava proces taloženja. Na kraju se talog odvoji, osuši i melje, što rezultira pročišćenim karagenanom. U drugoj metodi, karagenan se ne ekstrahira iz morskih algi već se u vrućoj otopini kalijeva klorida ispiru zaostali minerali, proteini, soli i masnoće iz morskih algi, ostavljajući za sobom karagenan i ostale netopive tvari. Netopivi ostatak, koji se uglavnom sastoji od karagenana i celuloze, suši se i prodaje kao polu-rafinirani karagenan, koji nije za prehranu. Iako je postupak mnogo kraći i jeftiniji od prvog, čistoća karagenana je manja (McHugh, 2003.; Stanley, 1987).

2.3.3. Ekstrakcija ulvana

Ekstrakcija ulvana uglavnom se provodi vrućom vodom, a može biti poboljšana prisutnošću kalcijevih kelatnih sredstava (Hernández-Garibay i sur., 2011) te kiselih ili alkalnih otopina. Pročišćavanje u svrhu uklanjanja pigmenata, lipida, aminokiselina i peptida provodi se organskim otapalima, često etanolom (Siddhanta i sur., 2001). Vodeni ekstrakt ulvana može se koncentrirati u rotacijskom isparivaču, sušenjem smrzanjem ili sušenjem vrućim zrakom. Istraživanja o utjecaju vremena i temperature na degradaciju ulvana, ukazuju na to da je temperatura glavni faktor koji utječe na brzinu depolimerizacije (Cunha i sur., 2016). Također, upotreba različitih otapala za ekstrakciju ulvana rezultirat će ekstraktima različitog sastava, a tako i njihovim različitim biološkim i fizikalno-kemijskim svojstvima. (Cunha i sur., 2016).

2.3.4. Ekstrakcija fukoidana

Fukoidan je prvi ekstrahirao i okarakterizirao švedski botaničar Kylin, 1913.godine, iz raznih vrsta algi *Laminaria* i *Fucus*. Sulfatirani polisaharid kojeg je Kylin nazvao "fukoidan", ekstrahiran je razrijeđenom octenom kiselinom i naznačeno je da "sadrži fukoza koja se pojavljuje zajedno s manitolom, alginatom i laminarinom" koji nastaju kao rezultat koekstrakcije s fukoidanom (Ale i sur., 2011a). Od prve ekstrakcije fukoidana do 1952. razvijale su se različite tehnike, od kojih je većina bila karakterizirana primjenom blagih kiselih otopina i visokim temperaturama. Prvi primjer kako postupak ekstrakcije može utjecati na čistoću, a tako i na analizirani sastav fukoidana bilo je istraživanje Hoagland i Lieb (1915) gdje su koristili natrijev karbonat za prethodnu obradu morske trave *Macrocystis pyrifera*, prije ekstrakcije klorovodičnom kiselinom. Ekstrakt je sadržavao uglavnom alginate i nešto fukoza-sulfata, a alginati su ekstrahirani u velikoj mjeri upravo zbog korištenja natrijeva karbonata.

Tijekom godina metode ekstrakcije fukoidana su poboljšane zahvaljujući boljem

razumijevanju strukture i karakteristika fukoidana i ostalih komponenata u smeđim morskim algama. Osnovni cilj ekstrakcije je izoliranje fukoidana od drugih komponenti u uzorcima morskih algi, odnosno smanjenje koekstrakcije ostalih spojeva poput alginata, mijenjajući prirodne karakteristike tih spojeva. U slučaju koekstrakcije, čistoća ekstrahiranog fukoidana povećava se nekim pod postupaka za izolaciju.

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

2.3.4.1. Predtretman

Prije ekstrakcije poželjno je obaviti predtretman uzorka alge kako bi se uklonili lipidi, pigmenti i drugi spojevi niske molekularne mase. Za predtretman mogu se koristiti različita otapala koja ne uzrokuju strukturne promjene na fukoidanu (Hahn i sur., 2012). Lipidi se uklanjaju nepolarnim otapalima poput kloroforma ili diklormetana, pigmenti srednje polarnim otapalima poput acetona, metanola ili etanola dok se ostale molekule koje su polarne, poput proteina, minerala i monosaharida, ekstrahiraju u vodi (Nisizawa i sur., 1963).

Lim i suradnici (2016) osmislili su postupak predtretmana za uklanjanje nečistoća prije potpune ekstrakcije. Uzorke morskih algi obradili su mješavinom metanola, kloroforma i vode u omjeru MeOH: CHCl₃: H₂O (4:2:1) na sobnoj temperaturi kako bi uklonili lipide, pigmente i komponente niske molekularne mase. U postupku nisu koristili visoke temperature kako ne bi došlo do prerane ekstrakcije fukoidana koji je topiv u vodi. Za razliku od njih, Ponce i suradnici (2003) izveli su postupak predtretmana upotrebom 80 % -tnog etanola na 70 °C tijekom 24 sata. Viša temperatura je korištena kako bi se postupak ubrzao, a budući da fukoidan nije topiv u etanolu, on bi se istaložio kada bi došlo do njegove ekstrakcije stoga je kombinacija više temperature i etanola prihvatljiva. Kad se otapalo odfiltrira, uklanjaju se samo nečistoće (pigmenti, lipidi), ali ne i istaloženi fukoidan. Mehaničkim miješanjem (magnetska miješalica, tresilica inkubatora itd.) dolazi do bolje interakcije između uzoraka čvrstih morskih algi i otapala, povećavajući na taj način brzinu izdvajanja nečistoća čime se poboljšava uspješnost predtretmana. Predtretirani uzorci morskih algi suše se prije ekstrakcije fukoidana brojnim metodama uključujući sušenje u peći i vakuum sušenje u pećnici ili sušenje zamrzavanjem (Lim i sur., 2016).

2.3.4.2. *Konvencionalna ekstrakcija*

Konvencionalne tehnike ekstrakcije provode se s ciljem izolacije fukoidana iz staničnih stijenki morskih algi u otapalo za ekstrakciju, nakon čega se uklanjaju kruti ostaci. Prethodno obrađeni uzorci morskih algi podvrgavaju se različitim tehnikama ekstrakcije koje mogu biti namijenjene za selektivno izdvajanje samo fukoidana bez alginata, ili za ekstrakciju fukoidana i alginata zajedno. Ako se izdvajaju zajedno, onda se alginati uklanjaju daljnim postupcima (Lim i Wan Aida, 2017).

Jedna od metoda, koju su proveli Duarte i suradnici (2001), Li i suradnici (2006) i Maruyama i Yamamoto (1984), je metoda ekstrakcije s vodom. Koriste se visoke temperature (70-100 °C) uz mehaničko miješanje uzorka. Ova je metoda neselektivna jer se ekstrahiraju sve vrste polisaharida i ostali sastojci morskih algi koji su topljivi u vodi zbog čega je potrebno provesti više koraka izolacije tako dobivenog ekstrakta fukoidana. Za ekstrakciju se mogu koristiti i otopine kiseline, obično klorovodične ili sumporne, s pH ekstrakcijskog otapala u rasponu od 1 do 3, pri visokoj temperaturi od 80-100 °C uz mehaničko miješanje. Upotrebom kiseline omogućava se hidroliza staničnih stijenki alge čime se olakšava ekstrakcija fukoidana, a istovremeno se alginat iz smeđe alge pretvara u alginsku kiselinu koja nije topljiva u vodi (McHugh, 1987). Alginska kiselina se zatim odbacuje zajedno sa čvrstim ostacima morske alge, a ostaje relativno čist fukoidan u ekstraktu (Lim i Wan Aida, 2017). Još jedan način ekstrakcije je korštenjem vodene otopine CaCl_2 uz mehaničko miješanje i visoku temperaturu (70–85 °C) koji se koriste radi povećanja brzine ekstrakcije i otapanja fukoidana. Zajedno s fukoidanom ekstrahira se i alginat koji reagira s CaCl_2 , te nastaje kalcijev alginat netopljiv u vodi koji se zatim istaloži (McHugh, 1987). Ovom metodom se fukoidan selektivno ekstrahira iz uzorka morske alge. Nakon uklanjanja krutih ostataka iz ekstrakta dobiva se relativno čist fukoidan, čija se čistoća može povećati daljnjim postupcima izolacije kada za to postoji potreba. Bez obzira na tip korištenog otapala, sve ove metode obično zahtijevaju toplinsku obradu, mehaničko miješanje i produljeno vrijeme ekstrakcije (Lim i sur. 2016).

2.3.4.3. *Pročišćavanje fukoidana*

Postupak izolacije može se provesti ili taloženjem fukoidana (u supernatantu zaostaju neutralni polisaharidi) ili taloženjem alginata (fukoidan ostaje u supernatantu) nakon čega se druge nečistoće uklanjaju dijalizom (Lim i Wan Aida, 2017). Lim i suradnici (2016) i Cumashi i suradnici (2007) koristili su katione deterdženta heksadeciltrimetilamonijev bromid („Cetavlon“) za taloženje fukoidana u ekstraktu. Princip ove metode leži u činjenici da je fukoidan sulfatirani

polisaharid zbog čega je negativno nabijen (polianion) te će kationski deterdženti, koji su pozitivno nabijeni, tvoriti soli s fukoidanom. Ove soli će se, budući da su netopljive u vodi, istaložiti i naknadno sušiti i tretirati kako bi se fukoidan odvojio od deterdženta (Lim i sur., 2016). Ostali prisutni spojevi, poput alginata i laminarina, su neutralni polisaharidi, stoga ne reagiraju s kationskim deterdžentima i ostaju otopljeni u vodi (Scott, 1965).

Nagaoka i suradnici (1999) i Hemmingson i suradnici (2006) za izolaciju fukoidana iz ekstrakta dobivenog ekstrakcijom pomoću kiseline koristili su NaOH kako bi neutralizirali ekstrakt. Neutralizacijom nastaju soli koje se zatim moraju ukloniti. Kako bi uklonili sol i nečistoće, proveli su ultrafiltraciju i dijalizu u oba istraživanja. Nagaoka i suradnici (1999) proveli su dodatne korake za izolaciju fukoidana, gdje su koristili CaCl_2 i etanol za taloženje fukoidana te zatim ponovili dijalizu za postizanje veće čistoće.

Kod korištenja metode ekstrakcije vrućom vodom, koju su proveli Duarte i suradnici (2001) i Li i suradnici (2006), bili su neophodni dodatni koraci za izolaciju fukoidana. U njihovom istraživanju, ekstrakti fukoidana pomiješani su s etanolom kako bi dobili 75%-tnu otopinu etanola u kojoj će se polisaharidi istaložiti. Centrifugiranje omogućava uklanjanje supernatanta, koji sadrži ostale nepolisaharidne nečistoće, ostavljajući istaložene polisaharide. Talog je zatim otopljen u vodi i tretiran s CaCl_2 kako bi se istaložili alginati, koji se mogu ukloniti centrifugiranjem. Izolirani fukoidan u supernatantu prije sušenja prolazi kroz dijalizu kako bi se uklonile ostale nečistoća niske molekularne mase.

2.4. PRIMJENA FUKOIDANA

Oceani su stanište za 50% živućih vrsta na Zemlji, te samim time i izvor mnogih sastojaka s potencijalnom primjenom u raznim industrijama. Među različitim organizmima u moru koji su izvor polisaharida, morske alge su najviše iskorištavane u komercijalnom smislu (Ahmed i sur., 2014). Ukupna godišnja proizvodnja algi ima komercijalnu vrijednost od 6 milijardi američkih dolara, od čega je 5 milijardi od proizvoda za ljudsku potrošnju (McHugh, 2003).

Fukoidan izoliran iz algi se na tržištu pojavljuje u različitim proizvodima, od dodataka prehrani u obliku kapsula ili praha, kao nutraceutik u pićima i jogurtima, do kozmetičkih proizvoda kao što su kreme za tijelo i serumi za njegu kože. Koristi se također u farmaceutskoj industriji kao sastavni dio nosača u proizvodnji lijekova, faktora rasta, proteina i gena, a ima i potencijalnu kliničku primjenu u različitim područjima zbog svojih brojnih bioloških aktivnosti (Fitton i sur., 2019). Na tržištu postoji jedan proizvod za primjenu u veterinarstvu namijenjen konjima, s fukoidanom iz alge *Laminaria japonica*, koji služi za sprječavanje unutarnjih abdominalnih ožiljaka poslije

operacija čiji je učinak dokazan u studiji Charboneau i suradnika (2018) provedenoj na miševima.

Procjena je da je prosječna cijena proizvoda za ljudsku upotrebu koji sadrže fukoidan 154 američka dolara na 50 mg fukoidana (Ahmed i sur., 2014). Azija je najveći potrošač fukoidana, s Kinom i Japanom na čelu po potrošnji. U 2017. g. tamo je potrošeno 6751 kg fukoidana ukupno, uključujući farmaceutsku i kozmetičku industriju i industriju dodataka prehrani (The Express Wire, 2020). SAD je sljedeći po potrošnji s 5248 kg fukoidana potrošenog u 2017. g. Prema izvješću The Express Wire-a, očekiva se globalni rast tržišta fukoidana za 3,8% sa ukupnim profitom od 37 milijuna američkih dolara do 2024.g što je 7 milijuna više nego što je ostvareno u 2019. g.

2.4.1. Zakonska regulativa o fukoidanu u hrani i dodacima prehrani

Posljednjih godina ekstrakti fukoidana odobreni su od strane brojnih svjetskih organizacija za upotrebu u hrani i dodacima prehrani. Ekstrakti fukoidana iz morskih algi *Undaria pinnatifida* i *Fucus vesiculosus* 2016. godine dobili su GRAS status od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) s dopuštenim dozama od 250 mg dnevno (Citkowska i sur., 2019). U Europskoj Uniji su isti ekstrakti krajem 2017.g. Uredbom EU 2017/2470 odobreni kao nova hrana u kategoriji "Hrana koja sadržava dodatke prehrani u smislu Direktive 2002/46/EZ za opću populaciju" s maksimalnim dozvoljenim količinama 250 mg dnevno. Za oba ekstrakta prema Uredbi EU 2017/2470 vrijedi da moraju biti ekstrahirani vodenom ekstrakcijom u kiseloj otopini i postupcima filtriranja bez upotrebe organskih otapala, a koncentrirani i osušeni produkt mora biti prah sivobijele do smeđe boje, blagog mirisa i okusa s postotkom vlažnosti nižim od 10% i pH vrijednosti 4,0 - 7,0 (1%-tna suspenzija pri 25 °C).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak smeđe alge *Cystoseira barbata*

Istraživanje je provedeno na uzorku smeđe alge *Cystoseira barbata*, izronjene na području Zadarskog arhipelaga (44° 06' 26" geografske širine i 15° 13' 54" geografske dužine) u veljači 2018. godine. Uzorci alge isprani su u slatkoj i destiliranoj vodi te odmah zamrznuti na -60 °C u zamrzivaču ScanCool SCL210P (Labogene ApS, Danska) do trenutka provođenja postupka liofilizacije. Postupak liofilizacije prethodno smrznutih uzoraka alge proveden je na liofilizatoru CoolSafe, Model: 55-9 PRO, (Labogene, Danska). Masa od oko 500 g smrznute alge u jednom je sloju raspoređena na 6 plitica nakon čega je proveden postupak liofilizacije koji je trajao ukupno 24 sata. Primarno sušenje (sublimacija) provedeno je pri vakuumu 0,130-0,155 hPa i temperaturi od -30 do 0 °C/18 sati, a izotermna desorpcija pri 20 °C/6 sati. Osušena alga samljevena je u prah pomoću električnog mlinca (CM 3260, Grundig, Njemačka), te je prah pohranjen u staklenu posudu i čuvan u mraku na temperaturi 20 °C do provođenja ekstrakcije.

3.1.2. Kemikalije

- aceton, p.a. (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 96 %-tni etanol (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 0,1 M otopina HCl (TKI, Hrastnik, Slovenija)
- destilirana voda
- 0,004% DPPH otopina

PRIPREMA: 10 mg DPPH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Njemačka) otopi se u 250 mL 96%-tnog etanola.

- koncentrirana 95% H₂SO₄ (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- fenol (5%-tna otopina)

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

- BaCl₂ (abcr GmbH, Njemačka)
- D (+)-glukoza (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- Otopina želatine (0,3%)

PRIPREMA: 0,3 g želatine (Acros Organics, Belgija) otopi se u 100 mL vode temperature 70 °C i pohrani preko noći u hladnjak na 4°C.

- Otopina želatine (0,3%)- BaCl₂

PRIPREMA: 2 g BaCl₂ otopi se u prethodno pripremljenoj otopini želatine i ostavi mirovati 2-3 h na 25 °C.

- K₂SO₄ (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- trikloroocetna kiselina (TCA) (3 %)

PRIPREMA: 3 g TCA (Fisher Scientific, UK) otopi se u 100 mL destilirane vode

3.1.3. Aparatura

- električni mlinac, CM3260 (Grundig, Njemačka)
- analitička vaga, ABT 220 – 4M (Kern, Njemačka)
- vortex miješalica, MS2 Minishaker (IKA, Njemačka)
- spektrofotometar, UV – 1600PC (VWR International, SAD)
- magnetna miješalica, RT 5 (IKA, Njemačka)
- vakuum koncentrator, Savant SPD2010 (ThermoScientific, SAD)
- vodena kupelj, Rotavapor R-205 (Büchi, Švicarska)
- centrifuga, Rotofix 32A (HETTICH, Njemačka)
- liofilizator, CoolSafe, Model: 55-9 PRO (Labogene, Danska)
- ultrazvučna kupelj UP 400 S (Dr. Hielscher GmbH, Njemačka)
- sušionik/pećnica

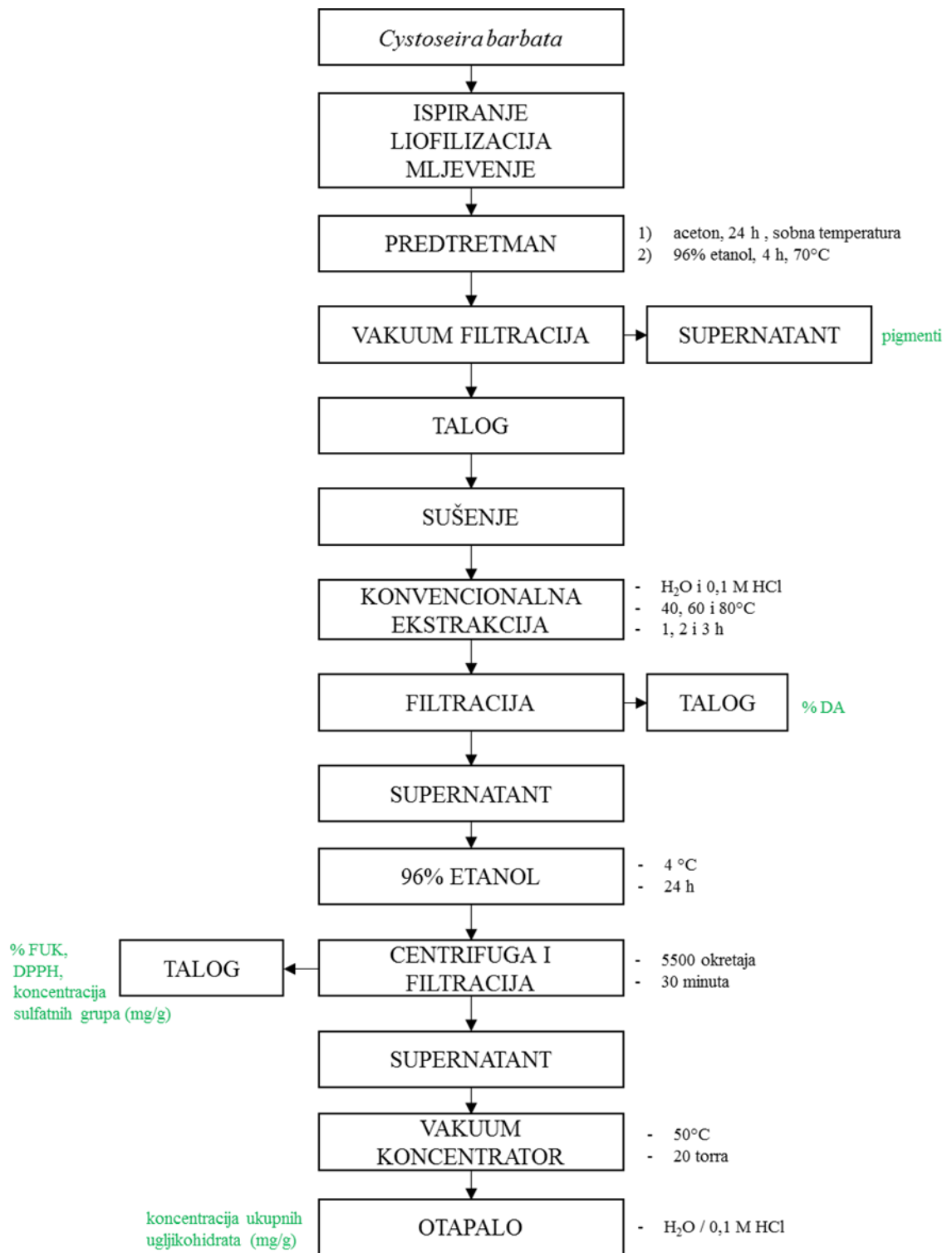
3.1.4. Pribor

- plastična žličica
- filter papir
- stakleni lijevak
- Erlenmeyerove tikvice (500mL, 250 mL)
- odmjerne tikvice (100 mL)
- tikvica s okruglim dnom (50 mL)
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)
- mikropipete (100 μL, 1000 μL i 5000 μL)
- stakleni štapić
- staklene kivete
- plastične kivete
- petrijeva zdjelica
- menzure (10 mL)
- magnetni štapići

3.2. METODE

3.2.1. Predtretman

Postupku ekstrakcije polisaharida prethodio je postupak predtretmana uzorka alge *Cystoseira barbata*, na način da se izvaže 15 g uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu volumena 500 mL, nakon čega se dodaje 375 mL acetona preko uzorka. U tikvicu se stavi magnetni štapić, zatvori se vatom i postavi na magnetnu miješalicu (RT 5, IKA, Njemačka) pri brzini miješanja 5 na 18 h. Nakon 18 h provede se vakuumska filtracija, 50 mL ekstrakta iz svake tikvice se pohrani u plastične kivete s poklopcem, a na talog se doda 375 mL 96%-tnog etanola zagrijanog na 70 °C. Potom se u tikvicu stavi magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i ponovo postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na 4 h. Nakon 4 h sadržaj tikvice se filtrira uz primjenu vakuuma, 50 mL ekstrakta se pohrani u plastičnu kivetu s poklopcem, a talog se stavlja na sušenje u Petrijevim zdjelicama na sobnoj temperaturi do konstantne mase. Na slici 7 shematski su prikazani postupci provedeni tijekom eksperimenta.



Slika 7. Shematski prikaz eksperimenta

3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija polisaharida

Konvencionalna ekstrakcija provedena je na magnetnoj miješalici RT 5 (IKA, Njemačka) prema parametrima prikazanim u tablici 1. Na analitičkoj vagi izvaže se 1 g predtretiranog uzorka smeđe alge *Cystoseira barbata* u Erlenmeyerovu tikvicu. U tikvicu se doda 30 mL otapala (destilirana voda ili 0,1 M HCl) zagrijanog na određenu temperaturu (40, 60 ili 80 °C), stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i postavi na magnetnu miješalicu (brzina miješanja: 5) na određeno vrijeme (1, 2 ili 3 h).

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

OZNAKA	OTAPALO	TEMPERATURA (°C)	VRIJEME (h)
V1	H ₂ O	40	1
V2	H ₂ O	60	1
V3	H ₂ O	80	1
V4	H ₂ O	40	2
V5	H ₂ O	60	2
V6	H ₂ O	80	2
V7	H ₂ O	40	3
V8	H ₂ O	60	3
V9	H ₂ O	80	3
C1	0,1 M HCl	40	1
C2	0,1 M HCl	60	1
C3	0,1 M HCl	80	1
C4	0,1 M HCl	40	2
C5	0,1 M HCl	60	2
C6	0,1 M HCl	80	2
C7	0,1 M HCl	40	3
C8	0,1 M HCl	60	3
C9	0,1 M HCl	80	3

3.2.3. Postupci nakon ekstrakcije

Nakon provedene ekstrakcije, ekstrakti dobiveni konvencionalnom ekstrakcijom se filtriraju, a talog se stavlja na sušenje na prethodno izvaganu petrijevu zdjelicu (M₁). U

Erlenmayerovu tikvicu sa supernatantom doda se 60 mL 96% etanola sobne temperature, tikvica se promućka, začepi vatom i stavi na 24 h u hladnjak. Nakon 24 h uzorci se u plastičnim kivetama postavljaju na centrifugu (Rotofix 32A, HETTICH, Njemačka) 30 minuta na 5500 okretaja. Nakon centrifugiranja, ekstrakt se filtrira u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, a talog se prebaci u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelicu i stavlja na sušenje do konstantne mase (M_T). Supernatant se koncentrira u vakuum koncentratoru (Savant SPD2010, ThermoScientific, SAD), pri tlaku 2666,40 Pa i temperaturi 50 °C, do konačnog volumena od 25 mL.

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

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

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

gdje su:

% Fuk – prinos fukoidana

M_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

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

Princip metode:

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

Postupak određivanja:

Kvantitativno određivanje provedeno je spektrofotometrom pri sljedećim valnim

duljinama: **644,8 nm, 661,6 nm, 664 nm i 649 nm** za klorofil a i b (u skladu sa korištenim ekstrakcijskim otapalom) i **470 nm** za karotenoide. Svako mjerenje provedeno je u paraleli, a kao slijepa proba upotrijebljeno je otapalo korišteno za ekstrakciju. Apsorbanciju slijepe probe potrebno je oduzeti od apsorbancije uzorka te se tako dobivena vrijednost koristi za izračunavanje konačnog rezultata.

Udjeli klorofila a i b te karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Lichtenthaler i Buschmann, 2005):

Aceton:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 11,24 A_{661,6} - 2,04 A_{644,8} \quad [3]$$

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

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 1,9C_a - 63,14C_b)/214 \quad [5]$$

Etanol:

$$C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) = 13.36 A_{664} - 5.19 A_{649} \quad [3]$$

$$C_b (\mu\text{g mL}^{-1}) = 27.43 A_{649} - 8.12 A_{664} \quad [4]$$

$$C_{(x+c)} (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 A_{470} - 2.13C_a - 97.63 C_b)/209 \quad [5]$$

A = apsorbancija, C_a = klorofil a, C_b = klorofil b, C_(x+c) = karotenoidi (ksantofili + karoteni)

3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata

Princip metode:

Koncentracija ukupnih ugljikohidrata određivana je fenol – sumpornom metodom prema Dubois i sur. (1956). Princip metode je da ugljikohidrati (jednostavni šećeri, oligosaharidi, polisaharidi i njihovi derivati) reagiraju u prisutnosti jake kiseline i topline čime nastaju derivati furana koji se kondenziraju s fenolom te nastaju stabilni zlatno-žuti spojevi koji se mogu spektrofotometrijski mjeriti na valnoj duljini od 490 nm (Nielsen, 2010).

Postupak rada:

Uzorku iz odmjerne tikvice dobivenom nakon uparivanja u vakuum koncentratoru i dodatka otapala napravi se dvostruko razrjeđenje na način da se u staklenu epruvetu stavi 1 mL uzorka i 1 mL odgovarajućeg otapala (H₂O ili 0,1 M HCl). Poslije toga otpipetira se 400 μL razrijeđenog uzorka i 400 μL 5% otopine fenola u novu epruvetu te se zatim dodaje 2 mL

koncentrirane 95%-tne H_2SO_4 . Važno je paziti da se kiselina dodaje okomito u epruvetu, bez diranja stijenki kako bi se postiglo dobro miješanje. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali se umjesto uzorka dodaje otapalo u jednakom volumenu. Svaki uzorak priredi se u paraleli. Sadržaj epruvete promiješa se na vorteksu i epruvete se stavljaju 20 minuta u vodenu kupelj na $25\text{ }^\circ\text{C}$. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji, mjeri se apsorbancija pri 490 nm na spektrofotometru (UV-1600PC, VWR International, SAD) (Li, 2012).

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za pripremu baždarnog pravca odvaže se 10 mg glukoze koja se otopi u 100 mL vode u odmjernoj tikvici od 100 mL . Iz tako pripremljene otopine glukoze (100 mg L^{-1}) rade se razrjeđenja koncentracija $20, 40, 60$ i 80 mg L^{-1} . Od svakog razrjeđenja otpipetira se $400\text{ }\mu\text{L}$ i postupa po propisu za određivanje ukupnih ugljikohidrata. Iz izmjerenih vrijednost apsorbancija nacrtana se baždarni pravac čija jednadžba [6] glasi:

$$y = 0,0092x + 0,0149 \quad [6]$$

$$R^2 = 0,9938$$

gdje je: y – apsorbancija pri 490 nm

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

3.2.6. Određivanje koncentracije sulfatnih grupa

Princip metode:

Koncentracija sulfatnih grupa ($-\text{SO}_3\text{H}$) u polisaharidima određivana je metodom zamućenja BaCl_2 -želatina prema Song i suradnicima (2018). Sadržaj sulfatnih grupa u ovoj metodi procjenjuje se mjerenjem apsorbancije zamućenja u obliku barijeva sulfata (BaSO_4) koji nastaje reakcijom sulfatnih grupa s otopinom barijeva klorida (BaCl_2) u otopini želatine, gdje je želatina stabilizator. Mjerenjem apsorbancije zamućenja, pomoću baždarnog pravca pripremljenog sa standardnom otopinom K_2SO_4 , izračuna se koncentracija sulfatnih grupa u uzorku polisaharida.

Postupak određivanja:

8 mg ekstrahiranih polisaharida prethodno usitnjenih u tarioniku odvaže se u epruvetu s čepom i hidrolizira dodatkom 3 mL 1 M otopine HCl . Epruveta se začepi, sadržaj se promiješa na vorteksu i stavi u ultrazvučnu kupelj na $20\text{-}30$ minuta. Epruveta se zatim stave u sušionik na

temperaturu 105 °C na 5 h. Poslije hlađenja, sadržaj epruvete se promiješa i 200 µL uzorka se otpipetira u novu epruvetu te se doda 3,8 mL 3% otopine TCA i 1 mL otopine želatine-BaCl₂. Smjesa se ostavi 15-20 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega se mjeri apsorbancija uzorka na 360 nm pomoću spektrofotometra (UV – 1600PC, VWR International, SAD). Svaki uzorak pripremljen je u paraleli, a u slijepoj probi korišteno je 200 µL destilirane vode umjesto uzorka.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

Za pripremu baždarnog pravca, prah K₂SO₄ se osuši se u sušioniku na 105 °C do konstantne mase, a zatim se odvaži 181,4 mg i otopi u 100 mL vode u odmjernoj tikvici od 100 mL. Iz tako pripremljene otopine K₂SO₄, koja sadrži 1 g/L sulfatnih grupa, radi se niz od 5 razrjeđenja. Od svakog razrjeđenja otpipetira se 200 µL i postupa po propisu za određivanje koncentracije sulfatnih grupa. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtana je baždarni pravac čija jednačica [7] glasi:

$$y = 0,265x - 0,0161 \quad [7]$$

$$R^2 = 0,989$$

gdje je: y – apsorbancija pri 360 nm

x – koncentracija sulfatnih grupa (g L⁻¹)

3.2.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Princip metode:

Antioksidacijska aktivnost određivana je DPPH metodom prema Sun i suradnicima (2009). DPPH je stabilni slobodni radikal zbog delokalizacije elektrona u strukturi molekule što mu daje tamnu ljubičastu boju koja u etanolu ima apsorbanciju na valnoj duljini približno 520 nm. Pri miješanju s antioksidansom koji donira svoj vodikov atom i tako formira reducirani oblik molekule DPPH, ljubičasto obojenje se gubi i rezultira nižim vrijednostima apsorbancije. Što je intenzitet obojenja manji, antioksidacijska je aktivnost veća (Sagar i Singh, 2011).

Postupak rada:

Ekstrahirani polisaharidi poslije sušenja do konstantne mase usitne se u tarioniku te odmjere u odgovarajućim masama za željene koncentracije (0,25 mg mL⁻¹, 0,5 mg mL⁻¹, 0,75 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹) u staklenu epruvetu za svaki uzorak. U epruvetu se zatim doda 4 mL destilirane vode. Otopina se promiješa na vorteksu i postavi na ultrazvučnu mješalicu na 30 minuta. Nakon

toga 2 mL uzorka polisaharida i 2 mL 0,004% otopine DPPH stavi se u epruvetu, promiješa na vorteksu te stavlja na 30 minuta u mrak pri temperaturi od 25 °C. Osim uzorka pripreve se i dvije slijepe probe: A₁ (2 mL destilirane vode i 2 mL otopine DPPH) i A₀ (2 mL uzorka i 2 mL etanola). Nakon 30 minuta mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 517 nm na spektrofotometru (UV–1600PC, VWR International, SAD). (Song i sur., 2018)

Izračun rezultata:

Izmjerene vrijednosti apsorbancija uvrštavaju se u jednadžbu [8] pomoću koje se izračunava sposobnost hvatanja DPPH radikala (RSC - eng. "DPPH radical scavenging capacity effect"), a ona glasi:

$$RSC (\%) = \left[1 - \frac{A - A_0}{A_1} \right] * 100 \quad [8]$$

gdje je:

A - apsorbancija uzorka u otopini DPPH pri 517 nm

A₀ - apsorbancija uzorka u etanolu pri 517 nm (ne sadrži DPPH otopinu)

A₁ – apsorbancija DPPH u destiliranoj vodi pri 517 nm

Zatim se napravi graf ovisnosti RSC (%) o koncentraciji polisaharida te se pomoću logaritamske jednadžbe odredi koncentracija polisaharida kod koje se postiže 50 % hvatanja DPPH radikala (EC₅₀).

3.2.8. Određivanje udjela suhe tvari

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

Izračunavanje:

Nakon hlađenja u eksikatoru, posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar

pomoću sljedeće formule:

$$\text{Suha tvar (\%)} = (m_2 - m_0) / (m_1 - m_0) \times 100 \quad [9]$$

3.2.9. Statistička obrada rezultata

Eksperimentalni dizajn (Tablica 1.) te statistička obrada podataka provedeni su programom Statistica 8 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, SAD). Zavisne varijable bile su: %DA, % Fuk, koncentracija ukupnih ugljikohidrata (mg L^{-1}), koncentracija sulfatnih grupa (g g^{-1}) i antioksidacijska aktivnost (EC_{50}) te je ispitan utjecaj neovisnih varijabli: a) temperatura (40, 60 i 80 °C), b) vrijeme (1, 2 i 3 h), c) otapalo (H_2O i 0,1 M HCl). Kontinuirane varijable analizirane su pomoću multivarijantne analize varijance (MANOVA) dok je višestruko uspoređivanje provedeno Tukey LSD testom višestrukog uspoređivanja. Razina značajnosti za sve testove je bila $\alpha \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Sulfatirani polisaharidi iz smeđih algi mogu se ekstrahirati konvencionalnim tehnikama vrućom vodom, razrijeđenom kiselinom ili razrijeđenom lužinom. U ovom istraživanju provedena je konvencionalna ekstrakcija polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata* gdje je kao otapalo korišteno 30 mL destilirane vode ili 0,1 M HCl pri različitim temperaturama (40, 60 i 80°C) i vremenima ekstrakcije (1, 2 i 3 h) te je istražen utjecaj uvjeta ekstrakcije i njihovih kombinacija na degradaciju alge, prinos fukoidana, koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, koncentraciju sulfatnih grupa i antioksidacijsku aktivnost. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Rezultati određivanja postotka degradacije alge (% DA), prinosa fukoidana (% Fuk) koncentracije ukupnih ugljikohidrata, koncentracije sulfatnih grupa i antioksidacijske aktivnosti (EC₅₀) ekstrakata polisaharida dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom destiliranom vodom (V1-V9) i 0,1 M HCl (C1-C9)

Uzorak	Temperatura (°C)	Vrijeme (h)	% DA	% Fuk	Ukupni ugljikohidrati (mg L ⁻¹)	Koncentracija sulfatnih grupa (g g ⁻¹)	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
V1	40	1	14,43 ± 0,00	2,84 ± 0,02	40,60 ± 1,07	0,6178 ± 0,0288	0,186 ± 0,002
V2	60	1	17,81 ± 0,00	3,31 ± 0,04	46,88 ± 1,57	0,5073 ± 0,0045	0,119 ± 0,003
V3	80	1	19,61 ± 0,00	4,00 ± 0,03	62,41 ± 3,72	0,4896 ± 0,0177	0,117 ± 0,002
V4	40	2	16,00 ± 0,00	3,00 ± 0,09	53,49 ± 0,08	0,7682 ± 0,0598	0,165 ± 0,004
V5	60	2	20,36 ± 0,00	4,00 ± 0,08	53,74 ± 1,65	0,5659 ± 0,0077	0,126 ± 0,005
V6	80	2	33,60 ± 0,00	7,52 ± 0,08	36,30 ± 0,74	0,3337 ± 0,0166	0,075 ± 0,002
V7	40	3	17,21 ± 0,00	3,26 ± 0,04	68,86 ± 0,58	0,4829 ± 0,0398	0,127 ± 0,005
V8	60	3	19,29 ± 0,00	4,95 ± 0,10	54,15 ± 2,73	0,4464 ± 0,0210	0,061 ± 0,002
V9	80	3	20,75 ± 0,00	5,11 ± 0,05	51,34 ± 0,25	0,5051 ± 0,0089	0,243 ± 0,005
C1	40	1	30,25 ± 0,00	2,86 ± 0,03	34,64 ± 0,08	1,4558 ± 0,0155	0,504 ± 0,006
C2	60	1	29,54 ± 0,00	3,34 ± 0,05	69,02 ± 0,41	1,6593 ± 0,0331	0,362 ± 0,003
C3	80	1	23,25 ± 0,00	4,63 ± 0,03	124,64 ± 1,98	0,6444 ± 0,0111	0,279 ± 0,002
C4	40	2	33,11 ± 0,00	3,02 ± 0,10	33,74 ± 0,00	1,4337 ± 0,0641	0,262 ± 0,004
C5	60	2	31,63 ± 0,00	4,09 ± 0,08	75,80 ± 2,56	1,0446 ± 0,0177	0,225 ± 0,002
C6	80	2	33,84 ± 0,00	8,17 ± 0,03	103,14 ± 0,21	0,8710 ± 0,0454	0,344 ± 0,004
C7	40	3	31,62 ± 0,00	2,77 ± 0,06	52,66 ± 1,40	1,1596 ± 0,0309	0,214 ± 0,003
C8	60	3	33,00 ± 0,00	3,68 ± 0,10	74,48 ± 1,74	0,9041 ± 0,0011	0,363 ± 0,002
C9	80	3	34,41 ± 0,00	9,53 ± 0,12	196,94 ± 5,99	0,5393 ± 0,0055	0,443 ± 0,004

U tablici 3 prikazan je utjecaj otapala, vremena i temperature konvencionalne ekstrakcije, te njihov kombinirani utjecaj na postotak degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk), koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, koncentraciju sulfatnih grupa i antioksidacijsku aktivnost (EC₅₀). Svi parametri su pojedinačno i kombinirano statistički značajni ($p \leq 0,05$).

Tablica 3. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na postotak degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk), koncentraciju ukupnih ugljikohidrata, koncentraciju sulfatnih grupa i antioksidacijsku aktivnost (EC₅₀)

	N	% DA	% Fuk	Ukupni ugljikohidrati (mg L ⁻¹)	Sulfatne grupe (g g ⁻¹)	EC ₅₀ (mg mL ⁻¹)
Otapalo		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
H ₂ O	18	19,90 ± 0,00 ^a	4,22 ± 0,00 ^a	51,97 ± 0,07 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,00 ^a
0,1M HCl	18	31,18 ± 0,00 ^b	4,68 ± 0,00 ^b	85,01 ± 0,07 ^b	0,72 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,00 ^b
Temperatura (°C)		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
40	12	23,77 ± 0,00 ^a	2,96 ± 0,00 ^a	47,33 ± 0,86 ^a	0,66 ± 0,01 ^c	0,24 ± 0,00 ^b
60	12	25,27 ± 0,00 ^b	3,90 ± 0,00 ^b	62,34 ± 0,86 ^b	0,58 ± 0,01 ^b	0,21 ± 0,00 ^a
80	12	27,58 ± 0,00 ^c	6,49 ± 0,00 ^c	95,80 ± 0,86 ^c	0,39 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,00 ^c
Vrijeme (h)		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
1	12	22,48 ± 0,00 ^a	3,50 ± 0,00 ^a	63,03 ± 0,86 ^b	0,61 ± 0,01 ^c	0,26 ± 0,00 ^c
2	12	28,09 ± 0,00 ^c	4,97 ± 0,00 ^b	59,37 ± 0,86 ^a	0,57 ± 0,01 ^b	0,20 ± 0,00 ^a
3	12	26,05 ± 0,00 ^b	4,88 ± 0,00 ^b	83,07 ± 0,86 ^c	0,46 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,00 ^b
Otapalo; temperatura (°C)		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
H ₂ O; 40	6	15,88 ± 0,00 ^a	3,03 ± 0,00 ^a	54,31 ± 1,22 ^b	0,43 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,00 ^c
H ₂ O; 60	6	19,15 ± 0,00 ^b	4,09 ± 0,00 ^c	51,59 ± 1,22 ^b	0,36 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,00 ^a
H ₂ O; 80	6	24,65 ± 0,00 ^c	5,54 ± 0,00 ^d	50,02 ± 1,22 ^b	0,32 ± 0,01 ^a	0,15 ± 0,00 ^b
0,1M HCl; 40	6	31,66 ± 0,00 ^e	2,88 ± 0,00 ^a	40,35 ± 1,22 ^a	0,90 ± 0,01 ^d	0,33 ± 0,00 ^e
0,1M HCl; 60	6	31,39 ± 0,00 ^e	3,70 ± 0,00 ^b	73,10 ± 1,22 ^c	0,80 ± 0,01 ^c	0,32 ± 0,00 ^d
0,1M HCl; 80	6	30,50 ± 0,00 ^d	7,44 ± 0,00 ^e	141,58 ± 1,22 ^d	0,47 ± 0,01 ^b	0,36 ± 0,00 ^f
Otapalo; vrijeme (h)		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
H ₂ O; 1	6	17,28 ± 0,00 ^a	3,34 ± 0,00 ^a	49,96 ± 1,22 ^a	0,38 ± 0,01 ^{a,b}	0,14 ± 0,00 ^b
H ₂ O; 2	6	23,32 ± 0,00 ^c	4,84 ± 0,00 ^d	47,84 ± 1,22 ^a	0,39 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,00 ^a
H ₂ O; 3	6	19,08 ± 0,00 ^b	4,44 ± 0,00 ^c	58,12 ± 1,22 ^b	0,34 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,00 ^b
0,1M HCl; 1	6	27,68 ± 0,00 ^d	3,61 ± 0,00 ^b	76,10 ± 1,22 ^c	0,83 ± 0,01 ^e	0,38 ± 0,00 ^e
0,1M HCl; 2	6	32,86 ± 0,00 ^e	5,09 ± 0,00 ^e	70,89 ± 1,22 ^c	0,75 ± 0,01 ^d	0,28 ± 0,00 ^c
0,1M HCl; 3	6	33,01 ± 0,00 ^e	5,33 ± 0,00 ^f	108,03 ± 1,22 ^d	0,59 ± 0,01 ^c	0,34 ± 0,00 ^d
Vrijeme (h); temperatura (°C)		$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$	$p \leq 0.00^\dagger$
1; 40	6	22,34 ± 0,00 ^a	2,29 ± 0,00 ^a	37,62 ± 1,49 ^a	0,70 ± 0,01 ^d	0,35 ± 0,00 ^e
1; 60	6	23,68 ± 0,00 ^b	3,33 ± 0,00 ^b	57,95 ± 1,49 ^b	0,73 ± 0,01 ^d	0,24 ± 0,00 ^d
1; 80	6	21,43 ± 0,00 ^a	4,32 ± 0,00 ^d	93,53 ± 1,49 ^d	0,39 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,00 ^b
2; 40	6	24,56 ± 0,00 ^b	3,01 ± 0,00 ^a	43,61 ± 1,49 ^a	0,74 ± 0,01 ^d	0,21 ± 0,00 ^c

2; 60	6	26,00 ± 0,00 ^c	4,05 ± 0,00 ^c	64,77 ± 1,49 ^{b,c}	0,55 ± 0,01 ^c	0,18 ± 0,00 ^a
2; 80	6	33,72 ± 0,00 ^e	7,85 ± 0,00 ^f	69,72 ± 1,49 ^c	0,42 ± 0,01 ^{a,b}	0,21 ± 0,00 ^{b,c}
3; 40	6	24,42 ± 0,00 ^b	3,02 ± 0,00 ^a	60,76 ± 1,49 ^b	0,56 ± 0,01 ^c	0,17 ± 0,00 ^a
3; 60	6	26,15 ± 0,00 ^c	4,32 ± 0,00 ^d	64,31 ± 1,49 ^{b,c}	0,46 ± 0,01 ^b	0,21 ± 0,00 ^c
3; 80	6	27,58 ± 0,00 ^d	7,32 ± 0,00 ^e	124,14 ± 1,49 ^e	0,37 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,00 ^e
Prosječna vrijednost	36	25,54	4,44	68,49	0,55	0,23

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

*Rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška.

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

U tablici 3 je vidljivo da je prosječna vrijednost degradacije alge iznosila 25,54%, što je manje od postotka degradacije postignutog konvencionalnom ekstrakcijom fukoidana iz alge *Cystoseira compressa* -39,03% (Jurić i sur. 2019), kao i od postotka degradacije prilikom konvencionalne ekstrakcije fukoidana iz alge *Ascophyllum nodosum* -37,37% (Yuan i Macquarrie, 2015). Prosječna vrijednost prinosa fukoidana iznosila je 4,44 %, što je slično prinosu fukoidana od 4,20% koji je dobiven pri izolaciji iz alge *Cystoseira sedoides* (Ammar i sur., 2016). Selimi i suradnici (2014) su pri ekstrakciji fukodana iz alge *Cystoseira barbata* dobili prinos fukoidana 5,45%. Prosječna ukupna koncentracija ugljikohidrata iznosila je 68,49 mg L⁻¹ uzorka što je slično rezultatima istraživanja Sigamani (2016) gdje je ukupna koncentracija ugljikohidrata u sulfatiranim polisaharidima iz alge *Padina tetrastromatica* iznosila 69 mg L⁻¹. Prosječna koncentracija sumpora iznosila je 0,55 g g⁻¹ suhe tvari što je 3,5 do gotovo 4 puta više od prosječne koncentracije sumpora u sličnim istraživanjima. Ale i suradnici (2011b) su prilikom optimizacije ekstrakcije fukoidana iz algi *Sargassum* sp dobili koncentraciju sumpora 0,155 g g⁻¹, a January i suradnici (2019) 0,135 mg g⁻¹ iz alge *Ecklonia maxima*. Prosječna vrijednost EC₅₀ iznosila je 0,23 mg L⁻¹, što je približno vrijednosti 0,21 mg mL⁻¹ koja je određena za algu *Cystoseira barbata* (Trifan i sur. 2019). EC₅₀ vrijednosti u našem istraživanju značajno su niže u odnosu na one iz istraživanja Ammar i suradnika (2015) koje su iznosile: 0,96 mg mL⁻¹ (*Cystoseira sedoides*), 0,84 mg mL⁻¹ (*Cystoseira compressa*) i 0,76 mg mL⁻¹ (*Cystoseira crinita*). Uzme li se kao referentni spoj askorbinska kiselina s vrijednosti EC₅₀ 0,14 mg mL⁻¹ (Ammar i sur., 2015), prema tablici 3 se može vidjeti kako u nekim uvjetima ekstrakcije fukoidan iz alge *Cystoseira barbata* ima veću sposobnost hvatanja DPPH radikala od askorbinske kiseline. U skladu s time su i rezultati istraživanja Wang i suradnika (2007) koji su utvrdili kako fukoidan iz alge *Laminaria japonica* pokazuje znatno veću sposobnost hvatanja DPPH radikala od askorbinske kiseline.

4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA DEGRADACIJU ALGE

Za optimalne rezultate ekstrakcije potrebno je utvrditi uvjete koji će rezultirati najboljim prinosima ciljanih molekula, uz minimalnu degradaciju alge koja vodi do njihovih gubitaka. U ovom radu istražen je utjecaj otapala, temperature i vremena te njihovih kombinacija (otapala s temperaturom, otapala s vremenom te vremena s temperaturom) na degradaciju alge *Cystoseira barbata*. Utjecaj navedenih uvjeta ekstrakcije na degradaciju alge prikazan je u tablici 3.

4.1.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na degradaciju alge

Postotak degradacije alge značajno je ovisio o primjenjenom otapalu za ekstrakciju. Značajno veći postotak degradacije alge zabilježen je prilikom ekstrakcije u 0,1M HCl u odnosu na ekstrakciju u destiliranoj vodi što se može pripisati hidrolizi stanične stijenke pomoću kiseline što omogućava ekstrakciju fukoidana, ali istovremeno narušava strukturu alge (Lim i sur., 2016).

Temperatura je također faktor koji doprinosi povećanju postotka degradacije alge. Postotak degradacije alge blago se povećava porastom temperature ekstrakcije te je najveći pri 80°C i iznosi 27,58%. Viša temperatura može dovesti do degradacije temperaturno osjetljivih komponenti i narušavanja strukture (Chen i sur., 2005), što objašnjava opisani trend.

Vrijeme je još jedan faktor koji utječe na postotak degradacije alge. Najveći postotak degradacije alge zabilježen je nakon 2 h ekstrakcije i iznosi 28,09%. Duža ekstrakcija znači veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje strukture zbog čega je izrazito važno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije (Favretto, 2004). Smanjenje postotka degradacije produljenjem vremena s 2 na 3 h vjerojatno je rezultat kombinacije drugih čimbenika.

4.1.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na degradaciju alge

Otapalo i temperatura

Značajno veći postotak degradacije alge zabilježen je prilikom ekstrakcije sa 0,1M HCl u odnosu na ekstrakciju u destiliranoj vodi. Povećanjem temperature ekstrakcije u 0,1M HCl s 40 °C na 60 °C nema značajne razlike u postotku, dok je porastom na 80 °C zabilježeno smanjenje od približno 1% s iznosom 30,50%. U destiliranoj vodi, najmanja je degradacija alge zabilježena pri 40°C s postotkom od 15,88% s trendom porasta povećanjem temperature ekstrakcije koji je objašnjen prethodno u potpoglavlju 4.1.1.

Otapalo i vrijeme

Produljenjem vremena ekstrakcije s 1 h na 2 h u 0,1M HCl zabilježen je porast postotka degradacije alge do 32,86%, dok daljnje produljenje vremena na 3 h nema značajan utjecaj. Trend porasta postotka degradacije produljenjem vremena s 1 h na 2 h zabilježen je i u vodi gdje je postignut najmanji postotak degradacije alge nakon 1 h te iznosi 17,28%.

Vrijeme i temperatura

Pri temperaturi od 40 °C najmanji je postotak degradacije zabilježen kroz vrijeme ekstrakcije od 1 h nakon čega dolazi do porasta uz izostanak značajne razlike u postotku degradacije između vremena ekstrakcije od 2 h i 3 h. Isti trend prati i postotak degradacije pri temperaturi od 60 °C s najmanjom vrijednosti 23,43% nakon 1 h ekstrakcije. Pri temperaturi od 80 °C i vremenu ekstrakcije od 1 h zabilježen je najmanji postotak degradacije alge od svih kombinacija vremena i temperature, a produljenjem vremena na 2 h on raste na najveći zabilježen s iznosom 33,72%. Produljenjem vremena ekstrakcije na 3 h smanjuje se postotak degradacije alge.

4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA PRINOS FUKOIDANA

Kao što je opisano u poglavlju 2.3.4, postoje različiti načini provođenja konvencionalne ekstrakcije fukoidana koji podrazumijevaju upotrebu različitih otapala, temperatura i vremena ekstrakcije, a svaki od tih načina rezultira različitim prinosima fukoidana (Jönsson i sur., 2020). U ovom radu istražen je utjecaj destilirane vode i 0,1M HCl kao otapala, različitih temperatura (40, 60 i 80°C) i vremena ekstrakcije (1, 2 i 3 h) te njihovih kombinacija (otapala s temperaturom, otapala s vremenom te vremena s temperaturom) na prinos fukoidana kako bi se utvrdili optimalni uvjeti za ekstrakciju fukoidana iz alge *Cystoseira barbata*. Utjecaj navedenih uvjeta ekstrakcije na prinos fukoidana prikazan je u tablici 3.

4.2.1. Utjecaj otapala na prinos fukoidana

Za konvencionalne metode ekstrakcije sulfatiranih polisaharida koriste se različita otapala poput vode, kiselih otopina i otopina soli, najčešće pri povišenim temperaturama. Kada se kao otapalo koristi voda, ostali spojevi prisutni u algi koji su topivi u vodi mogu koekstrahirati što zahtijeva više koraka pročišćavanja nakon ekstrakcije. Korištenje 0,1M HCl pokazalo se učinkovitim za poboljšanje prinosa jer omogućuje hidrolizu stanične stijenke i ekstrakciju polisaharida iz matriksa (Fletcher i sur., 2017). Kiselina pretvara alginat u alginsku kiselinu koja

je netopiva u vodi što rezultira čistim ekstraktom (Nisizawa i sur., 1963).

Prinos fukoidana veći je kada se koristi 0,1 M HCl kao otapalo i iznosi 4,68%, u odnosu na destiliranu vodu pri čijem korištenju prinos fukoidana iznosi 4,22%. Takvi rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja Liu i suradnika (2019) gdje je prinos fukoidana iz alge *Sargassum fusiforme* bio značajno veći prilikom ekstrakcije u kiselini. Vanavil i suradnici (2020) dobili su suprotne rezultate te je prinos fukoidana iz alge *Sargassum swartzii* bio značajno veći prilikom ekstrakcije vrućom vodom u odnosu na 0,1M HCl. U tom istraživanju je ekstrakcija u 0,1M HCl trajala 24 h na sobnoj temperaturi, a ekstrakcija vodom 4 h na temperaturi 90-95°C te je prinos koji su postigli vjerojatno rezultat kombinacije parametara, a ne samo korištenog otapala.

Osim utjecaja na prinos, primijećena je i razlika u boji ekstrahiranog fukoidana ovisno o korištenom otapalu. Na slici 5 vidljivo je kako je talog nakon ekstrakcije u 0,1M HCl svjetliji u usporedbi s talogom nakon ekstrakcije u destiliranoj vodi. Svjetlija boja taloga ukazuje na višu čistoću, odnosno veću kvalitetu ekstrahiranog fukoidana (Mak, 2012). Smeđa boja fukoidana ekstrahiranog u destiliranoj vodi ukazuje na prisustvo pigmenata smeđih algi (fukoksantin, β -karoten, violaksantin, klorofil a i c) koji zaostaju u polisaharidima prilikom procesa ekstrakcije (Saepudin i sur., 2017).



Slika 5. Ekstrakti fukoidana prije sušenja (vlastita fotografija)

4.2.2. Utjecaj temperature ekstrakcije na prinos fukoidana

Prinos fukoidana značajno se povećava povećanjem temperature, te je najmanji pri 40 °C i iznosi 2,96% što je slično prinosu fukoidana dobivenom iz alge *Cystoseira crinita* izoliranog pri sobnoj temperaturi (Ammar i sur., 2015). Najveći prinos fukoidana u našem istraživanju zabilježen je pri 80 °C i iznosi 6,49%, a slični prinosi fukoidana dobiveni su i u istraživanjima provedenim

na algama *Ascophyllum nodosum* i *Fucus serratus* gdje su fukoidani izolirani pri temperaturi od 80 °C (Fletcher i sur., 2017). Povećanjem temperature ekstrakcije smanjuje se viskozitet otapala i površinska napetost čime se poboljšava topljivost polisaharida, brzina difuzije i prijenos mase unutarstaničnih tvari iz stanice u otapalo, što rezultira boljom ekstrakcijom (Tsubaki i sur., 2016).

4.2.3. Utjecaj vremena ekstrakcije na prinos fukoidana

Najmanji prinos fukoidana zabilježen je nakon 1 h ekstrakcije i iznosi 3,50% što je slično prinosu fukoidana iz alge *Cyrtoseira compressa* dobivenog nakon 3 h ekstrakcije u istraživanju Ammar i suradnika (2015). Nakon 2 h ekstrakcije prinos fukoidana iznosi 4,97% te između vremena ekstrakcije od 2 i 3 h nije zabilježena statistički značajna razlika u prinosu fukoidana. Različita istraživanja pokazuju da se slični prinosi fukoidana mogu postići pri različitim vremenima ekstrakcije. Mohamed i suradnici (2015) postigli su prinos fukoidana od 5,3% iz alge *Cyrtoseira myrica* kroz vrijeme ekstrakcije od 8 h, a Sellimi i suradnici (2014) prinos fukoidana od 5,45% iz alge *Cyrtoseira barbata* kroz vrijeme ekstrakcije od 2 h. Iz navedenih usporedbi je vidljivo kako nakon postizanja maksimalnog prinosa daljnjim produljenjem trajanja ekstrakcije ne dolazi do postizanja značajno većeg prinosa.

4.2.4. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na prinos fukoidana

Otapalo i temperatura

Najmanji prinos fukoidana zabilježen je pri temperaturi od 40 °C, a statističkom analizom pokazano je da nema statistički značajne razlike između koncentracije fukoidana u ekstraktima koji su dobiveni vodom i ekstraktima dobivenim 0,1M HCl. Navedeno upućuje na zaključak da pri nižoj temperaturi ekstrakcije nema značajnog utjecaja otapala na prinos fukoidana. Pri temperaturi ekstrakcije od 60 °C nešto veći prinos fukoidana zabilježen je u ekstraktima dobivenim uz upotrebu vode kao otapala što je u skladu s rezultatima drugih autora. Mak (2012) je proveo ekstrakciju fukoidana iz alge *Undaria pinnatifida* pri temperaturi od 65°C pri čemu je veći prinos fukoidana dobiven također uz upotrebu vode kao otapala. Niži prinosi dobiveni su uz upotrebu 0,15M HCl.

Najveći prinosi fukoidana neovisno o primjenjenom otapalu za ekstrakciju (voda; 0,1 M HCl) postignuti su pri višoj temperaturi tj. pri 80°C. Prinos fukoidana u vodi pri 80°C iznosi 5,54% što je približno prinosu fukoidana iz alge *Cyrtoseira myrica* ekstrahiranog u jednakim uvjetima temperature i otapala (Mohamed i sur. 2015). U 0,1M HCl pri 80°C prinos fukoidana je najveći

od svih kombinacija temperature i otapala te iznosi 7,44% što je u skladu s prinosima fukoidana dobivenim iz algi *Fucus serratus* i *Ascophyllum nodosum* ekstrahiranog u jednakim uvjetima temperature i otapala (Fletcher i sur., 2017).

Otapalo i vrijeme

Najmanji prinosi fukoidana neovisno o primjenjenom otapalu za ekstrakciju (voda; 0,1 M HCl) postignuti su pri najkraćem vremenu ekstrakcije tj. nakon 1 h.. Kod upotrebe vode kao otapala, najveći prinos (4,84%) postiže se pri trajanju ekstrakcije od 2 h. Liu i suradnici (2019) postigli su sličan prinos fukoidana iz alge *Sargassum fusiforme* uz vodu kao otapalo i vrijeme ekstrakcije 3 h. Produljenje vremena ekstrakcija iznad 3 h utjecalo je na smanjenje prinosa.

U našem istraživanju najveći prinos fukoidana, 5,33%, dobiven je u ekstraktima s 0,1M HCl te vremenu ekstrakcije od 3 h. Prinos fukoidana približan ovome zabilježen je u ekstraktima dobivenim pomoću 0,1M HCl kroz vrijeme ekstrakcije od 2 h iz alge *Cystoseira compressa* (Hentati i sur., 2018) te kroz vrijeme ekstrakcije od 4 h iz alge *Cystoseira barbata* (Sellimi i sur., 2014). Navedeno upućuje na važnost drugih parametara ekstrakcije, budući da se jednak prinos fukoidana postiže pri različitim vremenima ekstrakcije.

Vrijeme i temperatura

Prinos fukoidana dobiven pri temperaturi od 40 °C je najniži te nema značajne promjene u prinosu produljenjem vremena ekstrakcije s 1 h na 2 h ili 3 h. Porastom temperature na 60 °C zabilježen je rast prinosa fukoidana koji se povećava produljenjem vremena ekstrakcije i najveći je nakon 3 h. Pri temperaturi od 80 °C nakon 1 h postignut je jednak prinos fukoidana kao i pri temperaturi od 60 °C nakon 3 h ekstrakcije te iznosi 4,32% što upućuje da se jednak prinos može postići različitim kombinacijama temperature i vremena. Produljenjem vremena ekstrakcije na 2 h pri temperaturi od 80°C došlo je do značajnog porasta prinosa fukoidana te je u tim uvjetima iznosio 7,85%. Daljnjim produljenjem vremena ekstrakcije dolazi do pada prinosa, moguće zbog degradacije fukoidana pri visokim temperaturama (Chen i sur., 2005).

Dobiveni rezultati ukazuju na to da vrijeme ekstrakcije ima najveći utjecaj na prinos fukoidana pri višim temperaturama ekstrakcije. S navedenim je u skladu trend zabilježen prilikom ekstrakcije polisaharida iz alge *Chlorella* sp. gdje je pri temperaturi od 80 °C zabilježeno povećanje prinosa produljenjem vremena ekstrakcije, dok je na nižim temperaturama utjecaj vremena ekstrakcije na prinos bio značajno manji (Song i sur., 2018).

4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

Fukoidan je heteropolisaharid koji se sastoji uglavnom od fukoza povezanih α -(1,3) ili naizmjeničnim α -(1,3) i α -(1,4) glikozidnim vezama, te rijetko α -(1,2) vezama. Osim fukoze, sadrži i druge monosaharide uključujući galaktozu, glukozu, manozu, ramnozu, ksilozu i uronsku kiselinu koje variraju u udjelu unutar strukture, ovisno o vrsti alge i godišnjem dobu (Lim i sur., 2016), a metoda ekstrakcije uvelike može utjecati na koncentraciju ugljikohidrata u ekstrahiranom fukoidanu (Wang i Chen, 2016). U ovom radu istražen je utjecaj korištenja destilirane vode i 0,1M HCl kao otapala, različitih temperatura (40, 60 i 80°C) i vremena ekstrakcije (1, 2 i 3 h) te njihovih kombinacija (otapala s temperaturom, otapala s vremenom te vremena s temperaturom) na ukupnu koncentraciju ugljikohidrata u ekstraktu alge *Cystoseira barbata*. Utjecaj navedenih uvjeta ekstrakcije na ukupnu koncentraciju ugljikohidrata prikazan je u tablici 3.

4.3.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Koncentracija ukupnih ugljikohidrata značajno je veća u ekstraktima dobivenim uz 0,1 M HCl kao otapalo i iznosi 85,01 mg L⁻¹, dok u vodenom ekstraktu iznosi 51,97 mg L⁻¹. Dobiveni rezultati u skladu su sa istraživanjima drugih autora koji potvrđuju veće prinose ugljikohidrata prilikom ekstrakcije u kiselim uvjetima u odnosu na neutralne (Furuta, 1998; Sun i sur., 2018).

Budući da nisu izrazito osjetljivi na više temperature, veći prinosi polisaharida se uglavnom dobivaju pri višim temperaturama (Lim i sur., 2016). Koncentracija ukupnih ugljikohidrata značajno se povećava porastom temperature i najveća je pri 80 °C (95,80 mg L⁻¹), a najmanja pri 40 °C (47,33 mg L⁻¹). Porast koncentracije ugljikohidrata porastom temperature ekstrakcije zabilježili su i Song i suradnici (2018) prilikom optimizacije parametara ekstrakcije polisaharida iz algi *Chlorella* sp., sa značajnim povećanjem pri porastu temperature sa 70 °C na 80 °C. Long i suradnici (2019) zaključili su da je otapanje polisaharida bolje pri većim temperaturama, što rezultira većim prinosom, te da temperatura ekstrakcije utječe na strukturu i sadržaj vlage frakcijskih polisaharida.

Najmanja koncentracija ukupnih ugljikohidrata zabilježena je kroz vrijeme ekstrakcije od 2 h i iznosila je 59,37 mg L⁻¹, a najveća kroz vrijeme od 3 h (83,07 mg L⁻¹). U istraživanju Ale i suradnika (2011b) na algi *Sargassum* sp. produljenjem vremena ekstrakcije također je zabilježen rast koncentracije ugljikohidrata.

4.3.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Otapalo i temperatura

U vodenim ekstraktima nije određena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih ugljikohidrata porastom temperature ekstrakcije. Prilikom ekstrakcije fukoidana iz alge *Chlorella* sp. korištenjem vode kao otapala zabilježen je značajan porast koncentracije ukupnih ugljikohidrata porastom temperature sa 70 °C na 80 °C (Song i sur., 2018), što se razlikuje od trenda zabilježenog u našem istraživanju.

Pri 40 °C koncentracija ugljikohidrata značajno je manja u ekstraktima dobivenim s 0,1M HCl u odnosu na ekstrakte dobivene s vodom, no porastom temperature do 60 °C i 80 °C koncentracija u uzorcima s 0,1M HCl značajno raste te je najveća pri 80 °C i iznosi 141,58 mg L⁻¹. Navedeno je u skladu s dosadašnjim zaključcima da se ugljikohidrati bolje ekstrahiraju u kiselini (Sun i sur., 2018) i na višim temperaturama (Long i sur., 2019).

Otapalo i vrijeme

Ukupna koncentracija ugljikohidrata kod oba korištena otapala (voda; 0,1M HCl) ne mijenja se značajno nakon 1 ili 2 h vremena ekstrakcije. Porast je zabilježen i kod jednog i kod drugog otapala nakon 3 h ekstrakcije, a najveća koncentracija postignuta je nakon 3 h ekstrakcije u 0,1M HCl te iznosi 108,03 mg L⁻¹. Zhao i suradnici (2018) ekstrahirali su fukoidan iz alge *Laminaria japonica* pomoću različitih koncentracija otopine EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina) i promatrali utjecaj vremena na koncentraciju ugljikohidrata nakon 3, 6 i 9 h te utvrdili kako vrijeme ekstrakcije nije imalo značajan utjecaj. Rezultati upućuju na to da se nakon 3 h postižu optimalne koncentracije ugljikohidrata uz provođenje ekstrakcije u uvjetima kisele sredine.

Vrijeme i temperatura

Ukupna koncentracija ugljikohidrata pri temperaturi od 40 °C nije se značajno promijenila produljenjem vremena ekstrakcije s 1 h na 2 h. Nakon 3 h zabilježen je značajan porast koncentracije koja je iznosila 60,76 mg L⁻¹ što upućuje na to da je na nižim temperaturama značajan utjecaj vremena na koncentraciju ugljikohidrata. Ovaj iznos statistički se ne razlikuje od koncentracija dobivenih pri temperaturi od 60 °C u trajanju 1 h, 2 h i 3 h, među kojima također nema značajne promjene koncentracije ugljikohidrata promjenom vremena ekstrakcije, kao ni od koncentracije ukupnih ugljikohidrata dobivene pri temperaturi od 80 °C i vremenu ekstrakcije od

2 h. Najviša koncentracija dobivena je pri temperaturi od 80 °C i vremenu ekstrakcije 3 h i iznosi 124,14 mg L⁻¹, što je u skladu s trendom iz istraživanja Ale i suradnika (2011b) koji su postigli najbolji prinos ugljikohidrata pri temperaturi od 90 °C i vremenu ekstrakcije od 3 h.

4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA KONCENTRACIJU SULFATNIH GRUPA

Sadržaj sulfatnih grupa u strukturi fukoidana jedan je od utvrđenih čimbenika koji utječu na njegovu biološku aktivnost. Neki od dokaza su da djelomično desulfatirani fukoidani sa sadržajem sulfatnih grupa ispod 20% pokazuju drastično manju antikoagulacijsku i antitumorsku aktivnost (Haroun-Bohedja i sur., 2000), a visok sadržaj sulfatnih grupa u polisaharidnim frakcijama u pozitivnoj je korelaciji sa sposobnosti hvatanja superoksidnih radikala (Wang i sur., 2010a). Zbog važnosti sadržaja sulfatnih grupa za biološku aktivnost fukoidana ključno je utvrditi uvjete ekstrakcije koji će rezultirati njihovim najvećim koncentracijama. U ovom radu istražen je utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije te njihovih kombinacija (otapala s temperaturom, otapala s vremenom te vremena s temperaturom) na koncentraciju sulfatnih grupa u fukoidanu iz alge *Cystoseira barbata*, te su rezultati prikazani u tablici 3.

4.4.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na koncentraciju sulfatnih grupa

Kao i kod prinosa fukoidana i koncentracije ukupnih ugljikohidrata, koncentracija sulfatnih grupa značajno ovisi o primjenjenom otapalu za ekstrakciju. Koncentracija sulfatnih grupa u ekstraktima dobivenim s 0,1 M HCl iznosi 0,72 g g⁻¹ što je dvostruko više u usporedbi s vodenim ekstraktima. January i suradnici (2019) također su zabilježili veći sadržaj sulfata u ekstraktima algi *Ecklonia maxima*, *Laminaria pallida* i *Splachnidium rugosum* koji su dobiveni pomoću 0,15M HCl, temperaturi od 65 °C i vremenu ekstrakcije 2 h. U vodenim ekstraktima prinosi su bili manji, unatoč tome što je ekstrakcija provedena pri višoj temperaturi 70 °C te vremenu ekstrakcije 24h. S druge strane, Mak (2012) zabilježio je veći sadržaj sulfata u ekstraktu alge *Undaria pinnatifida* koji je dobiven pomoću destilirane vode, u odnosu na ekstrakt dobiven pomoću 0,15M HCl. Oba ekstrakta dobivena su pri temperaturi 65°C i vremenu ekstrakcije 2 h.

Koncentracija sulfatnih grupa, za razliku od prinosa fukoidana i koncentracije ukupnih ugljikohidrata smanjuje se s povećanjem temperature te je najmanja pri 80 °C (0,39 g g⁻¹), a najveća pri 40 °C (0,66 g g⁻¹). Jednak trend zabilježen je u istraživanju Ale i suradnika (2011b)

prilikom optimizacije ekstrakcije fukoidana iz algi *Sargassum* sp. gdje je pri temperaturi od 30 °C zabilježena najveća koncentracija sulfatnih grupa koja se porastom na 60 °C, a zatim i 90 °C smanjuje dok prinos fukoidana i ugljikohidrata raste.

Produljenjem vremena ekstrakcije zabilježeno je smanjenje koncentracije sulfatnih grupa, pa je tako najviša koncentracija pri vremenu ekstrakcije 1 h (0,61 g g⁻¹), a najmanja pri 3 h (0,46 g g⁻¹). Jednak trend zabilježen je u istraživanju Ale i suradnika (2011b) prilikom optimizacije ekstrakcije fukoidana iz algi *Sargassum* sp. gdje je produljenjem trajanja ekstrakcije s 1 h na 2 h i 4 h zabilježeno postupno smanjenje koncentracije sulfatnih grupa.

4.4.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na koncentraciju sulfatnih grupa

Otapalo i temperatura

Koncentracije sulfatnih grupa uglavnom su manje kod korištenja vode kao otapala u odnosu na 0,1M HCl, no trend pada koncentracije porastom temperature s 40 °C do 80 °C opisan prethodno u potpoglavlju 4.4.1. je prisutan u oba slučaja. Koncentracije sulfatnih grupa u 0,1M HCl pri 80 °C i u vodi pri 40 °C međusobno se statistički ne razlikuju što znači da se podešavanjem temperature ekstrakcije u vodi može postići jednaka koncentracija sulfatnih grupa kao i u 0,1M HCl. Najveća koncentracija sulfatnih grupa dobije se ekstrakcijom u 0,1M HCl pri temperaturi ekstrakcije od 40 °C i iznosi 0,90 g g⁻¹ što je gotovo trostruko više od koncentracije koju su Ale i suradnici (2011b) postigli u 0,1M HCl na temperaturi od 90 °C prilikom ekstrakcije fukoidana iz alge *Sargassum* sp.

Otapalo i vrijeme

Koncentracija sulfatnih grupa prilikom ekstrakcije u vodi ne mijenja se značajno između vremena ekstrakcije 1 h i 2 h, dok je produljenjem na 3 h zabilježeno blago smanjenje koncentracije. Kod ekstrakcije u 0,1M HCl koncentracija sulfatnih grupa najveća je pri vremenu ekstrakcije od 1 h i iznosi 0,83 g g⁻¹, a smanjuje se s porastom vremena ekstrakcije što je u skladu s trendom opisanim u potpoglavlju 4.4.1.

Vrijeme i temperatura

Koncentracija sulfatnih grupa pri temperaturi ekstrakcije 40 °C je najviša te nakon 1 h i iznosi 0,70 g g⁻¹. Nakon 2 h nema statistički značajne promjene koncentracije pri ovoj temperaturi, dok se nakon 3 h koncentracija smanjuje. Nakon 1 h pri temperaturi od 60 °C koncentracija

sulfatnih grupa se statistički ne razlikuje od koncentracije pri temperaturi od 40 °C, a produljenjem vremena na 2 h i 3 h dolazi do smanjenja. Pri temperaturi od 80 °C koncentracije sulfatnih grupa su najniže te promjenom vremena ekstrakcije nema statistički značajne promjene koncentracije sulfatnih grupa. Navedeno upućuje na zaključak da pri višim temperaturama ekstrakcije vrijeme ima manji utjecaj na smanjenje koncentracije sulfatnih grupa. Ale i suradnici (2011b) su došli do drukčijeg zaključka zabilježivši smanjenje koncentracije sulfatnih grupa u ekstraktu alge *Sargassum* sp. pri temperaturi od 90°C produljenjem vremena ekstrakcije s 1 h na 3, 5 i 8 h.

4.5. UTJECAJ RAZLIČITIH UVJETA EKSTRAKCIJE NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Posljednjih godina, brojna su istraživanja utvrdila značajnu antioksidacijsku sposobnost sulfatiranih polisaharida iz algi (Li, 2020; Wang, 2010a). Veza između strukture i antioksidacijske aktivnosti sulfatiranih polisaharida još uvijek nije sasvim razjašnjena zbog poteškoća u identifikaciji točne kemijske strukture, no veliki se utjecaj pripisuje udjelu sulfatnih grupa u strukturi, uz kojeg se spominju i sadržaj uronske kiseline, sadržaj proteina, omjer fukoze i sulfatnih grupa te molekularna masa polisaharida (Jiao i sur., 2011). U ovom radu istražen je utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije te njihovih kombinacija (otapala s temperaturom, otapala s vremenom te vremena s temperaturom) na antioksidacijsku aktivnost fukoidana iz alge *Cystoseira barbata* te su rezultati prikazani u tablici 3.

4.5.1. Utjecaj otapala, temperature i vremena ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost

Značajno veća vrijednost EC_{50} dobivena je u ekstraktima dobivenim s 0,1 M HCl te iznosi 0,33 mg mL⁻¹, dok je u vodenim ekstraktima EC_{50} značajno manja i iznosi 0,14 mg mL⁻¹. Ovo ukazuje kako ispitivani uzorak alge *Cystoseira barbata* ima značajno veću antioksidacijsku aktivnost kada se kao otapalo koristi destilirana voda što je u skladu s rezultatima Liu i suradnika (2019) čije istraživanje potvrđuje da vodeni ekstrakti fukoidana iz alge *Sargassum fusiforme* imaju veću sposobnost hvatanja slobodnih radikala u odnosu na ekstrakte dobivene s 1,0M HCl.

Najmanja vrijednost EC_{50} zabilježena je pri 60°C (0,21 mg mL⁻¹). Jednaku vrijednost dobili su Trifan i suradnici (2019) u ekstraktu alge *Cystoseira barbata* iz Crnog mora dobivenom pri sobnoj temperaturi. Činjenica da su postigli jednaku antioksidacijsku aktivnost pri znatno nižoj temperaturi vjerojatno je rezultat kombinacije uvjeta ekstrakcije i drugog staništa alge koje može utjecati na njezin kemijski sastav (Abdala-Diaz i sur, 2006). Razlika u vrijednostima EC_{50} pri

temperaturama 40 °C i 80 °C iznosi samo 0,01 mg mL⁻¹. Navedeno ukazuje da porast temperature do 60 °C povećava sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala, a daljnjim povećanjem temperature dolazi do smanjenja sposobnosti, vjerojatno zbog utjecaja temperature na strukturu fukoidana (Chen i sur., 2005).

Najmanja vrijednost EC₅₀ zabilježena je nakon vremena ekstrakcije 2 h i iznosi 0,20 mg mL⁻¹. Trifan i suradnici (2019) zabilježili su sličnu vrijednost (0,21 mg mL⁻¹) u ekstraktu alge *Cystoseira barbata* dobivenom također nakon 2 h. EC₅₀ vrijednost se daljnjim produljenjem vremena na 3 h povećava što ukazuje na to da vrijeme ekstrakcije od 2 h rezultira najvećom sposobnosti gašenja DPPH radikala, dok daljnje produljenje vremena rezultira smanjenjem sposobnosti. Tome u prilog govori vrijednost EC₅₀ od 0,56 mg mL⁻¹ koja je značajno viša od onih u našem istraživanju, a dobivena je u ekstraktu alge *Cystoseira barbata* nakon Soxhlet ekstrakcije koja podrazumijeva dulje vrijeme ekstrakcije od uvjeta našeg istraživanja (Kosanić i sur., 2015).

4.5.2. Utjecaj kombinacije uvjeta ekstrakcije na antioksidacijsku aktivnost

Otapalo i temperatura

Najveća sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala postiže se u vodenim ekstraktima dobivenim pri temperaturi od 60 °C u kojima EC₅₀ iznosi 0,10 mg mL⁻¹. Ekstrakt dobiven pri navedenim uvjetima ima veću sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala u usporedbi sa vodenim ekstraktom fukoidana dobivenim iz alge *Cystoseira barbata* pri sobnoj temperaturi čija vrijednost EC₅₀ iznosi 0,21 mg mL⁻¹ (Trifan i sur., 2019). Također, ekstrakt fukoidana dobiven pri temperaturi od 60 °C pokazuje veću učinkovitost gašenja aktivnosti DPPH radikala u usporedbi sa otopinom askorbinske kiseline koja prema Ammar i suradnicima (2015) ima EC₅₀ od 0,14 mg mL⁻¹. Najslabiju sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala pokazuju ekstrakti dobiveni s 0,1M HCl pri 80 °C - EC₅₀ 0,36 mg mL⁻¹.

Otapalo i vrijeme

Najveća sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala postiže se u vodenim ekstraktima nakon 2 h ekstrakcije s iznosom EC₅₀ 0,12 mg mL⁻¹. Takav ekstrakt pokazuje veću učinkovitost gašenja aktivnosti DPPH radikala u usporedbi sa otopinom askorbinske kiseline koja prema Ammar i suradnicima (2015) ima EC₅₀ od 0,14 mg mL⁻¹. Između vremena ekstrakcije 1 i 3 h nema statistički značajne razlike u vrijednostima EC₅₀ što je u skladu s trendom smanjenja učinkovitosti gašenja aktivnosti DPPH radikala produljenjem vremena ekstrakcije opisanim u potpoglavlju

4.5.1. Mhadhebi i suradnici (2014) dobili su EC_{50} vrijednost od $0,075 \text{ mg mL}^{-1}$ u vodenom ekstraktu alge *Cystoseira sedoides* nakon 24 h, što je suprotno od pretpostavke da dulje vrijeme ekstrakcije u vodi rezultira smanjenom sposobnosti gašenja aktivnosti DPPH radikala.

Pri ekstrakciji u $0,1M \text{ HCl}$ najmanja se EC_{50} vrijednost također postiže nakon 2 h ekstrakcije i iznosi $0,28 \text{ mg mL}^{-1}$.

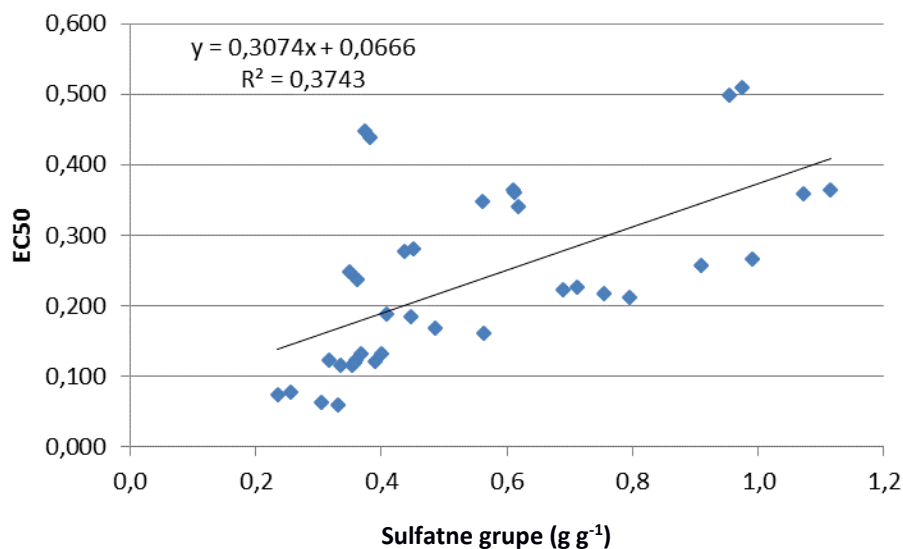
Vrijeme i temperatura

Najveća sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala postiže se pri temperaturi od 40°C nakon 3 h ekstrakcije s iznosom EC_{50} $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, a najmanja pri temperaturi od 40°C nakon 1 h s iznosom EC_{50} $0,35 \text{ mg mL}^{-1}$. Navedeno upućuje na zaključak da produljenje vremena ekstrakcije pri nižim temperaturama vodi do poboljšanja sposobnosti gašenja aktivnosti DPPH radikala. Iznos EC_{50} dobiven u uvjetima temperature 40°C i vremena 1 h statistički se ne razlikuje od postignutog u uvjetima temperature 60°C i vremena 2 h. Sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala pri temperaturi od 80°C statistički se ne mijenja produljenjem vremena s 1 na 2 h, a daljnjim produljenjem na 3 h dolazi do značajnog smanjenja sposobnosti. Iznos EC_{50} ($0,35 \text{ mg mL}^{-1}$) pri temperaturi od 80°C i vremenu ekstrakcije 3 h statistički se ne razlikuje od iznosa postignutog pri temperaturi od 40°C i vremenu ekstrakcije od 1 h. Moguće je da se ove vrijednosti poklapaju zbog smanjene ekstrakcije pri nižoj temperaturi i kraćem vremenu ekstrakcije te degradacije fukoidana pri većoj temperaturi i duljem vremenu. Suprotno tome, u ekstraktu alge *Sargassum fusiforme* dobivenom pri temperaturi od 80°C i vremenu ekstrakcije 3 h postignuta je vrijednost EC_{50} od $0,065 \text{ mg mL}^{-1}$ (Liu i sur., 2019) koja podrazumijeva veću sposobnost gašenja aktivnosti DPPH radikala od postignute u našem istraživanju. Budući da je riječ o drugoj vrsti alge, takvi rezultati ne moraju nužno biti primjenjivi na algu *Cystoseira barbata*. U ekstraktu alge *Cystoseira barbata* dobivenom pri sobnoj temperaturi i vremenu ekstrakcije 2 h dobiven je iznos EC_{50} $0,21 \text{ mg mL}^{-1}$ (Trifan i sur., 2019), koji je jednak onome koji je u našem istraživanju postignut na najnižoj korištenoj temperaturi (40°C) također nakon 2 h ekstrakcije.

4.6. UTJECAJ KONCENTRACIJE SULFATNIH GRUPA NA ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Kao što je opisano u poglavlju 4.5., veze između strukturalnih čimbenika i antioksidacijskog kapaciteta sulfatiranih polisaharida još nisu sasvim razjašnjene, no Wang i suradnici (2010a) utvrdili su da sulfatne grupe u strukturi polisaharida djeluju na način da privlače elektrone i tako povećavaju sposobnost hvatanja radikala. Povezanost koncentracije sulfatnih grupa i

antioksidacijske aktivnosti (EC_{50}) fukoidana iz ovog istraživanja prikazana je na slici 6.



Slika 6. Povezanost koncentracije sulfatnih grupa i antioksidacijske aktivnosti (EC_{50})

Koeficijent determinacije R^2 iznosi 0,374, koeficijent korelacije r je 0,61, a statistička značajnost koeficijenta korelacije $p = 0,00007$. Budući da je $p < 0,05$ može se reći da je koeficijent korelacije značajan i da se radi o umjerenoj pozitivnoj korelaciji ($0,5 < r < 0,8$). To znači da ako je koncentracija sulfatnih grupa veća, veća je i vrijednost EC_{50} odnosno manja je antioksidacijska aktivnost. Ovaj trend nije u skladu s dosad zabilježenim rezultatima (Wang i sur., 2010a; Liu i sur., 2019). To može biti rezultat činjenice da antioksidacijska aktivnost fukoidana nije funkcija jednog čimbenika već nekoliko povezanih fizikalno-kemijskih karakteristika poput sadržaja uronske kiseline za čiji su sadržaj neki autori (January i sur., 2019; Ponce i sur., 2003) zabilježili kako je obrnuto proporcionalan sadržaju sulfatnih grupa prilikom porasta temperature i produljenja vremena ekstrakcije.

4.7. KONCENTRACIJA PIGMENATA U EKSTRAKTU IZ PREDTRETMANA

Postupak predtretmana proveden je na početku eksperimenta, a služi uklanjanju tvari poput lipida, terpena, fenola i pigmenata koje mogu ometati ekstrakciju polisaharida. U filtratu zaostalom iz predtretmana određene su koncentracije pigmenata koje sadrži ispitivana alga. Provedeno je određivanje klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida te su dobiveni rezultati prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u ekstraktima dobivenim uz aceton i etanol kao otapalo

Otapalo	Klorofil – a (mg g ⁻¹)	Klorofil – b (mg g ⁻¹)	Ukupni karotenoidi (mg g ⁻¹)
Aceton	0,55 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,30 ± 0,00
Etanol	0,39 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,15 ± 0,00

U acetonu dobivena koncentracija klorofila-a iznosi 0,55 mg g⁻¹, klorofila-b 0,04 mg g⁻¹ te ukupnih karotenoida 0,30 mg g⁻¹. Dobivena koncentracija klorofila-a je u skladu s rezultatima Seely i sur. (1972) koji su određivali pigmente u smeđoj algi *Laminaria saccharina* gdje je koncentracija klorofila a iznosila 0,538 mg g⁻¹. U istraživanju koje je provedeno na algi *Cystoseira compressa* određene su sljedeće koncentracije pigmenata: klorofil-a 0,55 mg g⁻¹, klorofil-b 0,05 mg g⁻¹ i ukupni karotenoidi 0,24 mg g⁻¹ (Jurić, 2019). Razlika u koncentraciji ukupnih karotenoida može biti posljedica drukčijeg sadržaja karotenoida u algama, budući da se radi o dvije različite vrste (Abdala-Diaz i sur., 2006).

Prilikom ekstrakcije u etanolu koncentracija ekstrahiranog klorofila-b približno je jednaka koncentraciji postignutoj ekstrakcijom u acetonu. Koncentracije klorofila-a i ukupnih karotenoida manje su prilikom ekstrakcije u etanolu, što može biti rezultat ekstrakcije ovih pigmenata u acetonu tijekom prvog koraka predtretmana. Tome u prilog govore rezultati istraživanja Pardiho i suradnika (2020) koji su utvrdili da je aceton učinkovitije otapalo od etanola za ekstrakciju klorofila-a i karotenoida iz smeđe alge *Saccorhiza polyschides*.

5. ZAKLJUČCI

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

1. U usporedbi s 0,1M HCl uz primjenu destilirane vode kao otapala postiže se manji postotak degradacije alge. Najmanji postotci degradacije alge u vodi postižu se pri nižoj temperaturi i kraćem vremenu ekstrakcije (40 °C, 1 h) dok povećanje temperature i vremena utječe na porast degradacije alge. U oba otapala najveći postotak degradacije alge zabilježen je nakon 2 h ekstrakcije.
2. Optimalni uvjeti pri kojima se dobivaju najveći prinosi fukoidana i ugljikohidrata su 0,1M HCl kao otapalo, temperatura od 80 °C i vrijeme ekstrakcije 3 h. Produljenje vremena ekstrakcije (1-3 h) na svim temperaturama rezultira povećanjem prinosa fukoidana.
3. U usporedbi s destiliranom vodom uz primjenu 0,1M HCl dobiva se dvostruko veća koncentracija sulfatnih grupa, dok povećanje temperature (40-80 °C) u oba korištena otapala rezultira smanjenjem koncentracije sulfatnih grupa. Vrijeme ekstrakcije u vodenim ekstraktima nema značajan utjecaj na koncentraciju sulfatnih grupa, dok u 0,1M HCl produljenje vremena (1-3 h) rezultira smanjenjem koncentracije. Stoga su optimalni uvjeti za postizanje najveće koncentracije sulfatnih grupa: otapalo 0,1M HCl, temperatura 40 °C i vrijeme ekstrakcije 1 h.
4. Optimalni uvjeti pri kojima se postiže najveća antioksidacijska aktivnost su destilirana voda kao otapalo, temperatura od 60°C i vrijeme ekstrakcije 2 h. Pri vremenu ekstrakcije 1 h, porast temperature (40-80°C) rezultira većom antioksidacijskom aktivnosti. Produljenjem vremena ekstrakcije na 3 h, porast temperature (40-80°C) rezultira smanjenjem antioksidacijske aktivnosti.
5. Koncentracija sulfatnih grupa je u umjerenoj pozitivnoj korelaciji s vrijednosti EC₅₀, odnosno povećanjem koncentracije sulfatnih grupa dolazi do smanjenja antioksidacijske aktivnosti.
6. Određivanjem pigmenata u filtratu iz predtretmana postignute su koncentracije klorofila a 0,55 mg g⁻¹ u acetonu i 0,39 mg g⁻¹ u etanolu, klorofila b 0,04 mg g⁻¹ u acetonu i 0,06 mg g⁻¹ u etanolu te karotenoida 0,30 mg g⁻¹ u acetonu i 0,15 mg g⁻¹ u etanolu.

6. POPIS LITERATURE

Abdala-Diaz, R. T., Cabello-Pasini, A., Perez-Rodriguez, E., Conde Alvarez, R. M., Figueroa, F. L. (2006) Daily and seasonal variations of optimum quantum yield and phenolic compounds in *Cystoseira tamariscifolia* (Phaeophyta). *Mar. Biol.* **148**, 459–465.

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

Ahmed, A. B. A., Adel, M., Karimi, P., Peidayesh, M. (2014). Pharmaceutical, Cosmeceutical, and Traditional Applications of Marine Carbohydrates. *Adv. Food Nutr. Res.* **73**, 197–220.

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

Ale, M. T., Mikkelsen, J. D., Meyer, A. S. (2011b). Designed optimization of a single-step extraction of fucose-containing sulfated polysaccharides from *Sargassum* sp. *J. Appl. Phycol.* **24(4)**, 715–723.

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(22)**, 8131–8141.

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

Ammar, H. H., Lajili, S., Said, R. B., 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 J. Pharm. Sci.* **23(1)**, 1-8.

Ammar, H. H., Hafsa, J., Le Cerf, D., Bouraoui, A., Majdoub, H. (2016) Antioxidant and gastroprotective activities of polysaccharides from the Tunisian brown algae (*Cystoseira*

sedoides). *Journal of the Tunisian Chemical Society* **18**, 80-88.

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(3)**, 152-170.

Bagherian, H., Zokaee Ashtiani, F., Fouladitajar, A., Mohtashamy, M. (2011) Comparisons between conventional, microwave- and ultrasound-assisted methods for extraction of pectin from grapefruit. *Chem. Eng. Process.* **50**, 1237-1243.

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

Berov, D., Ballesteros, E., Sales, M., Verlaque, M., (2015) Reinstatement of species rank for *Cystoseira bosporica* Sauvageau (Sargassaceae, Phaeophyceae). *Cryptogam. Algal.* **36**, 65–80.

Bono, A., Anisuzzaman, S. M., Ding, O. W. (2014) Effect of process conditions on the gel viscosity and gel strength of semi-refined carrageenan (SRC) produced from seaweed (*Kappaphycus alvarezii*). *J. King Saud. Univ. Sci.* **26**, 3–9.

Bousbia, N., Vian, A. M., Ferhat, M. A., Petitcolas, E., Meklati, B. Y., Chemat, F. (2009) Comparison of two isolation methods for essential oil from rosemary leaves: Hydrodistillation and microwave hydrodiffusion and gravity. *Food Chem.* **114**, 355-362.

Burtin, P. (2003) Nutritional value of seaweeds. *Electron. J. Environ. Agric. Food Chem.* **2**, 498–503.

Charboneau, A. J., Delaney, J. P., Beilman, G. (2018) Fucoidans inhibit the formation of post-operative abdominal adhesions in a rat model. *PLoS ONE* **13**, 1-13.

Chen, X. Q., Liu, Q., Jiang, X. Y., Zeng, F. (2005) Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Solanum nigrum*. *J. Cent. South Univ. T.* **12**, 556–560.

Chevlot, L., Foucault, A., Chaubet, F., Kervarec, N., Sinquin, C., Fisher, A. M., Boisson-Vidal, C. (1999) Further data on the structure of brown seaweed fucans: Relationships with anticoagulant activity. *Carbohydr. Res.* **319**, 154–165.

Citkowska A., Szelaska M., Winnicka K. (2019) Possibilities of Fucoidan Utilization in the

Development of Pharmaceutical Dosage Forms. *Mar. Drugs* **17**, 458-478.

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., *et al.* (2020). Complex polysaccharide- based nanocomposites for oral insulin delivery. *Mar. Drugs* **18**, doi:10.3390/md18010055

Cribb, A. B. (1954) *Macrocystis pyrifera* (L.) Ag. in Tasmanian Waters. *Aust. J. Mar. Fresh Res.* **5**, 1–34.

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

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., Usov, A. I., Ustyuzhanina, N. E., Grachev, A. A., Sanderson, C. J., Kelly, M., Rabinovich, G. A., Iacobelli, S., Nifantiev, N. E. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **5**, 541–552.

Dawes, C. (2016) Chapter 4: Macroalgae Systematics. U: *Seaweed in Health and Disease Prevention* (Fleurence J., Levine I., ur.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 107-148.

Dobrinčić, A., Balbino, S., Zorić, Z., Pedisić, S., Bursać Kovačević, D., Elez Garofulić, I., Dragović-Uzelac, V. (2020) Advanced Technologies for the Extraction of Marine Brown Algal Polysaccharides. *Mar. Drugs* **18**, 168-197.

Duarte, M. E., Cardoso, M. A., Nosedá, M. D., Cerezo, A. S. (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res.* **333**, 281–293.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* **28(3)**, 350-356.

El-Gamal, A. A. (2010) Biological importance of marine algae. *Saudi Pharm. J.* **18**, 1–25

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

- Falace, A., Bressan, G. (2006). Seasonal Variations of *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh Frond Architecture. *Hydrobiologia*, **555**(1), 193–206.
- Favretto, L. (2004) Basic guidelines for microwave organic chemistry applications. Milestone, Bergamo, Italija.
- Firuta, H., Takahashi, T., Tobe, J., Kiwata, R., Maeda, H. (1998) Extraction of Water-soluble Soybean Polysaccharides under Acidic Conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**, 2300-2305.
- Fitton H. J., Stringer D.S, Park, A. Y., Karpiniec S. N. (2019) Therapies from Fucoidan: New Developments. *Mar. Drugs* **17**, 571-589.
- Fletcher, H. R., Biller, P., Ross, A. B., Adams, J. M. M. (2017) The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Res.* **22**, 79–86.
- Fleurence, J., Gall, E. (2016) Antiallergic properties. U: Seaweed Health and Disease Prevention (Fleurence, J.; Levine, I., ur.), Elsevier Inc., London, UK, 389-406.
- Galatchi, M., Nenciu, M., Nita, V., Nicolaev, S., Tania, Z., Valodia, M. (2014) Viata in Marea Neagra, 1.izd., Editura Aureo, Oradea, Mađarska.
- Gouveia, V., Seca, A. M., Barreto, M. C., Pinto, D. C. (2013) Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga *Cystoseira abies-marina*. *Mini-Rev. Med. Chem.* **13**, 1150.
- Hahn, T., Lang, S., Ulber, R., Muffler, K. (2012) Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Proc. Biochem.* **47**, 1691–1698.
- Haroun-Bouhedja, F., Ellouali, M., Siquin, C., Boisson-Vidal, C. (2000) Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thromb. Res.* **100**, 453-459.
- Hemmingson, J. A., Falshow, R., Furneaux, R. H., Thompsom, K. (2006) Structure and antiviral activity of the galactofucans sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *J Appl Phycol.* **18**, 185–193.
- Hentati, F., Delattre, C., Ursu, A. V., Desbrieres, J., Le Cerf, D., Gardarin, C., Abdelkafi, S., Michaud, P., Pierre, G. (2018) Structural characterization and antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from the Tunisian brown seaweed *Cystoseira compressa*. *Carbohydr. Polym.* **198**,589-600.

- Hernández-Garibay, E., Zertuche-González, J., Pacheco-Ruíz, I. (2010) Isolation and chemical characterization of algal polysaccharides from the green seaweed *Ulva clathrata* (Roth) C. Agardh. *J Appl Phycol.* **23**, 537–542
- Hoagland, D. R., Lieb, L. L. (1915) The complex carbohydrates and forms of sulphur in marine algae of the Pacific coast. *J. Biol. Chem.* **23**, 287–297.
- Hu, T.T., Liu, D., Chen, Y., Wu, J., Wang, S.S. (2010) Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *Int. J. Biol. Macromol.* **46**, 193-198.
- Huang Y. C., Lam U. I. (2011) Chitosan/Fucoidan pH Sensitive Nanoparticles for Oral Delivery System, *J. Chin. Chem. Soc.* **58**, 779-785.
- Irhimeh, M. R., Fitton, J. H., Lowenthal, R. M., Kongtawelert, P. (2005) A quantitative method to detect fucoidan in human plasma using a novel antibody. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **27**, 705–710.
- Ivanova, V., Rouseva, R., Kolarova, M., Serkedjieva, J., Rachev, R., Manolova, N. (1994) Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*. *Prep. Biochem.* **24**, 83–97.
- January, G. G., Naidoo, R. K., Kirby-McCullough, B., Bauer, R. (2019) Assessing methodologies for fucoidan extraction from South African brown algae. *Algal Res.* **40**, 101517.
- Jiao, G., Yu, G., Zhang, J., Ewart, S., T. (2011) Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae. *Mar. Drugs* **9**, 196-223.
- Jönsson, M., Allahgholi, L., Sardari, R. R. R., Hreggviðsson, G. O., Nordberg Karlsson, E. (2020). Extraction and Modification of Macroalgal Polysaccharides for Current and Next-Generation Applications. *Molecules*, **25(4)**, 930-959.
- Jurić, M. (2019) Ekstrakcija polisaharida potpomognuta mikrovalovima iz smeđe alge *Cystoseira compressa*. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Kadam, S. U., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. (2015a) Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int. J. Food Sci. Tech.* **50**, 24–31.
- Kadam, S. U., Álvares, C., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P. (2015b) Extraction of biomolecules

from seaweeds. U: Seaweed Sustainability—Food and Non-Food Applications (Tiwari, B. K., Troy, D. J., ur.), Academic Press, San Jose, CA, SAD, 243–269.

Kariduraganavar, M. Y., Kittur, A. A., Kamble, R. R. (2014) Polymer Synthesis and Processing. Natural and Synthetic Biomedical Polymers. U: Protein and Peptide Nanoparticles for Drug Delivery, Volume 98 (Donev R., ur.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, SAD, 1-31.

Kidgell, J. T., Glasson, C. R. K., Magnusson, M., Vamvounis, G., Sims, I. M., Carnachan, S. M., Taki, A. C. (2020). The molecular weight of ulvan affects the in vitro inflammatory response of a murine macrophage. *Int. J. Biol.Macromol.*, **150**, 839–848.

Kim, I.H., Lee, J.H. (2008) Antimicrobial activities against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from macroalgae. *J. Ind. Eng. Chem.* **14**, 568–572.

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

Lianfu, Z., Zelong, L. (2008) Optimization and comparison of ultrasound/microwave assisted extraction (UMAE) and ultrasonic assisted extraction (UAE) of lycopene from tomatoes, *Ultrason. Sonochem.* **15**, 731–737.

Li, B., Wei, X. J., Sun, J. L., Xu, S. Y. (2006) Structural investigation of a fucoidan containing a fucose free core from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* **341**, 1135–1146.

Li, B., Xu, H., Wang, X., Wan, Y., Jiang, N., Qi, H., Liu, X. (2020). Antioxidant and antihyperlipidemic activities of high sulfate content purified polysaccharide from *Ulva pertusa*. *Int. J. Biol. Macromol.* **145**, 1059-1065.

Li, S., Zhang, H., Han, D., Ho Row, K. (2012) Optimization of enzymatic extraction of polysaccharides from some marine algae by response surface methodology. *Korean J. Chem. Eng.* **29(5)**, 650-656.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. (2005) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. U: Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components (Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., Sporns, P., ur.), John Wiley & Sons, Inc. 171-178.

- Li, S. J., Aida, W. M. W. (2017) Chapter 3 - Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. U: Seaweed Polysaccharides (Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., ur.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 27-46.
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Mamot, S., Ropien, J., Mazita Mohd, D. (2014) Isolation and antioxidant capacity of fucoidan from selected Malaysian seaweeds. *Food Hydrocoll.* **42**, 280–288.
- Lim, S. J., Wan Aida, W. M., Maskat, M. Y., Latip, J., Badri, K. H., Hassan, O., Yamin, B. M. (2016) Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *Food Chem.* **209**, 267–273.
- Liu, S.-Y., Wu, L. Chen, L., Li, Q.-Y., 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* fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol.* (objavljeno *online* 12. studenoga 2019.) doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.113>
- Long, X., Yan, Q., Peng, L., Liu, X., Luo, X. (2019) Effect of Various Temperatures on *Bletillae Rhizoma* Polysaccharide Extraction and Physicochemical Properties. *Appl. Sci.* **9**, 116-121.
- Mak, W. W. F. (2012) Extraction, Characterization and Antioxidant Activity of Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Diplomski rad. Auckland University of Technology, Novi Zeland.
- Maruyama, H., Yamamoto, I. (1984) An antitumor fraction from an edible brown seaweed, *Laminaria religiosa*. *Hydrobiologia* **116**, 534–536.
- McHugh, D. J. (1987) Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds—FAO Fisheries Technical Paper 288. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- McHugh, D. J. (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, **441**, 1-98.
- Menshova, R.V., Ermakova, S.P., Anastyuk, S.D., Isakov, V.V., Dubrovskaya, Y.V., Kusaykin, M.I., Um, B.H., Zvyagintseva, T.N. (2014) Structure, enzymatic transformation and anticancer activity of branched high molecular weight laminaran from brown alga *Eisenia bicyclis*. *Carbohydr. Polym.* **99**, 101–109.

Messyasz, B., Michalak, I., Łeska, B., Schroeder, G., Górka, B., Korzeniowska, K., Lipok, J., Wieczorek, P., Rój, E., Wilk, R. i sur. (2018) Valuable natural products from marine and freshwater macroalgae obtained from supercritical fluid extracts. *J. Appl. Phycol.* **30**, 591–603.

Mhadhebi, L., Mhadhebi, A., Robert, J., Bouraoui, A. (2014) Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Effects of Aqueous Extracts of Three Mediterranean Brown Seaweeds of the Genus *Cystoseira*. *Iran. J. Pharm. Res.* **13**, 207-220.

Mizuno, M., Sakaguchi, K., Sakane, I. (2020) Oral Administration of Fucoidan Can Exert Anti-Allergic Activity after Allergen Sensitization by Enhancement of Galectin-9 Secretion in Blood. *Biomolecules* **10(2)**, 258-271.

Mohamed, S. F., Slamy, T. M., Shaeiri, S. Y. (2015) Characterization of Sulphated Polysaccharide with Antiviral Activity from Marine Brown Alga *Cystoseira myrica* Collected from Jazan Coasts, KSA. *Int. J. PharmTech Res.* **8**, 198-203.

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.

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

Nisizawa, K., Yamaguchi, T., Handa, N., Maeda, M., Yamazaki, H. (1963) Chemical nature of a uronic acid-containing polysaccharide in the peritrophic membrane of the silkworm. *J. Biochem.* **54**, 419–426.

Pardilhó, S. L., Machado, S., F. Bessada, S. M., F. Almeida, M., Oliveira, M. B., M. Dias, J. (2020). Marine Macroalgae Waste from Northern Portugal: A Potential Source of Natural Pigments? *Waste Biomass Valorization* (objavljeno online 19. ožujka 2020.) doi:10.1007/s12649-020-01016-2.

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

Provedbena uredba Komisije (EU) br. 2017/2740 od 30. prosinca 2017. o utvrđivanju Unijina

popisa nove hrane u skladu s Uredbom (EU) 2015/2283 Europskog parlamenta i Vijeća o novoj hrani. *SL L* **351**, 72.str.

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

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

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

Saepudin, E., Sinurat, E., Suryabrata, I. (2017). Depigmentation and Characterization of Fucoidan from Brown Seaweed *Sargassum binderi* Sonder. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **299**. 012027.

Sagar, B. K., Singh, R. P. (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J. Food Sci. Technol.* **48(4)**, 412-422.

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

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

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.

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.

Sigamani, S. (2016) Extraction and purification of sulfated polysaccharide from brown algae and its efficacy in preventing blood clotting. *Asian J. Biol. Life Sci.* **5 (3)**, 237-244.

Simon, B. W. Carrageenan. < <https://slideplayer.info/slide/2594698>> Pristupljeno 20. ožujka. 2020.

Song, H., Meilin, H., 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**, 292-310.

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

Stanley, N. (1987) Production, properties and uses of carrageenan. U: Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds (McHugh, D. J., ur.), Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 116–146.

Stanojković, T. P., Konić-Ristić, A., Kljajić, Z., Grozdanić-Stanisavljević, N., Srdić-Rajić, T., Zdunić, R. i sur. (2014) Antioxidant, antiplatelet and cytotoxic activity of extract of *Cystoseira amentacea* from the coast of Montenegro (south-east Adriatic Sea). *Dig. J. Nanomater. Bios.* **9**, 869–880.

Sun, H., Mao, W., Chen, Y., Guo, S., Li, H., Qi, X., Chen, Y., Xu, J. (2009) Isolation, chemical characteristics and antioxidant properties of the polysaccharides from marine fungus *Penicillium* sp. F23-2. *Carbohydr. Polym.* **78**, 117–124.

Sun, Y., Hou, S., Song, S., Zhang, B., Ai, C., Chen, X., Liu, N. (2018). Impact of acidic, water and alkaline extraction on structural features, antioxidant activities of *Laminaria japonica* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**, 985–995.

The Express Wire, Global Fucoidan Market 2020 : Industry Outlook, Top Countries Data, Market Size, Driving Factors by Manufacturers, Growth and Forecast 2024. < https://www.theexpresswire.com/pressrelease/Global-Fucoidan-Market-2020-Industry-Outlook-Top-Countries-Data-Market-Size-Driving-Factors-by-Manufacturers-Growth-and-Forecast-2024_10786825> Pristupljeno 20. ožujka 2020.

Trica, B., Delattre, C., Gros, F., Ursu, A. V., Dobre, T., Djelveh, G., Michaud, P., Oancea, F. (2019) Extraction and Characterization of Alginate from an Edible Brown Seaweed (*Cystoseira barbata*) Harvested in the Romanian Black Sea. *Mar. Drugs* **17**, 405-420.

- Trifan A., Vasincu, A., Luca, S. V., Neophytou, C., Wolfram, E., Opitz, S. E. W., Sava, D., Bucur, L., Cioroiu, B. I., Miron, A., Aprotosoaie, A. C., Cionanca, O., Hancianu, M., Jitareanu, A., Constantinoiu, A. I. (2019) Unravelling the potential of seaweeds from the Black Sea coast of Romania as bioactive compounds sources. Part I: *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh. *Food Chem. Toxicol.* **134**, 110-122.
- Tsubaki, S., Oono, K., Hiraoka, M., Onda, A., Mitani, T. (2016) Microwave-assisted hydrothermal extraction of sulfated polysaccharides from *Ulva* spp. and *Monostroma latissimum*. *Food Chem.* **210**, 311–316.
- Udani J., Hesslink R. (2012) The Potential Use of Fucoidans from Brown Seaweed as a Dietary Supplement. *J. Nutr. Food Sci.* **2(10)**, 1-6.
- Usov, A. I., Bilan, M. I. (2009). Fucoidans — sulfated polysaccharides of brown algae. *Russ. Chem. Rev.*, **78(8)**, 785–799.
- Vanavil B., Selvaraj, K., Aanandhalakshmi, R., Usha Sri K., Arumugam M. (2020) Bioactive and thermostable sulphated polysaccharide from *Sargassum swartzii* with drug delivery applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **153**, 190-200.
- Van Weelden, G., Bobiński, M., Okła, K., van Weelden, W., Romano, A., Pijnenborg, J. (2019). Fucoidan Structure and Activity in Relation to Anti-Cancer Mechanisms. *Mar. Drugs*, **17(1)**, 30-62.
- Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., Shim, M. S. (2016) Seaweed Polysaccharide-Based Nanoparticles: Preparation and Applications for Drug Delivery. *Polymers*, **8(2)**, 30-55.
- Vazquez-Delfin, E., Robledo, D., Freile-Pelegrin, Y. (2014) Microwave-assisted extraction of the Carrageenan from *Hypnea musciformis* (Cystocloniaceae, Rhodophyta). *J Appl Phycol.* **26(2)**, 901-907.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008) Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—a review. *Innov. Food Sci. Technol.* **9**, 161–169.
- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, Z. (2007). Antioxidant activity of sulphated polysaccharide fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.*, **42**, 127-132.

- Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Song, H., Li, P. (2010a) Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Int. J. Biol. Macromol.* **46**, 6–12.
- Wang, F., Wang, X., Liu, X., Hou, Y., Zhang, Q. (2010b) Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro. *Carbohydr. Polym.* **82**, 118–121.
- Wang, C.-Y., Chen, Y.-C. (2016) Extraction and Characterization of fucoidan from six brown macroalgae. *J. Mar. Sci. Tech-Japan* **24**, 319-326.
- Wang, Y., Xing, M., Cao, Q., Ji, A., Liang, H., Song, S. (2019). Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies. *Mar. Drugs*, **17(3)**, 183-201.
- Yuan, Y., Macquarrie, D. (2015) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym.* **29**, 101-107.
- Zhang, W. J., Sun, D. L., Zhao, X., Jin, W. H., Wang, J., Zhang, Q. B. (2016) Microanalysis and preliminary pharmacokinetic studies of a sulfated polysaccharide from *Laminaria japonica*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **34**, 177–185.
- Zhang, R., Zhang, X., Chen, Z., Tang, Y., Mao, J. (2020). Composition, isolation, purification and biological activities of *Sargassum fusiforme* polysaccharides: A review. *Carbohydr. Polym.* **228**, 1-14.
- Zhao, D., Xu, J., Xu, X. (2018) Bioactivity of fucoidan extracted from *Laminaria japonica* using a novel procedure with high yield. *Food Chem.* **245**, 911–918.
- Zvyagintseva, T. N., Shevchenko, N. M., Popivnich, I. B., Isakov, V. V., Scobun, A. S., Sundukova, E. V. (1999) A new procedure for the separation of water soluble polysaccharides from brown seaweeds. *Carbohydr. Res.* **322**, 32–39.

Izjava o izvornosti

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



Erika Dobroslavic