

Ekstrakcija polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira compressa*

Nenadić, Mateja

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:159:328316>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Mateja Nenadić

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

Diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Zorana Zorića te uz pomoć asistentice dr. sc. Ane Dobrinčić.

Ovaj rad izrađen je u okviru znanstvenog centra izvrsnosti BioProspecting mora (BioProCro) na projektu BioProspecting Jadranskog mora (KK.01.1.1.01.0002) financiranog sredstvima Europske unije, a voditeljica projekta je dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac.



ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Zoranu Zoriću na vodstvu, strpljenju, razumijevanju i podršci tijekom pisanja ovog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Verici Dragović-Uzelac na pomoći i ukazanoj prilici da budem dio ovog projekta. Također, hvala doc. dr. sc. Mojci Čakić Semenčić na pruženoj pomoći i ustupljenim uređajima korištenim pri izradi ovog rada.

Posebno hvala dr. sc. Ani Dobrinčić na pomoći, prenesenom znanju i trudu koji je uložila u mene te na pristupačnosti i blagosti kojom me dodatno gurala naprijed.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na svakoj lijepoj riječi koju su imali za mene i stvorili sa mnom divne uspomene za cijeli život.

Hvala mom Juri koji ne prestaje vjerovati u mene, kao i Marti i Mati zbog kojih ovo sve vrijedi i ima smisla.

Hvala mom anđelu koji me podigao onda kad su moja krila zaboravila letjeti.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese sušenja i praćenje stabilnosti biološki aktivnih spojeva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Upravljanje sigurnošću hrane

EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ SMEĐE ALGE

Cystoseira compressa

Mateja Nenadić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058196390

Sažetak: U ovom radu provedena je ekstrakcija polisaharida fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira compressa* te je istražen utjecaj konvencionalne ekstrakcije (KE) i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE) te utjecaj različitih otapala (H_2O , 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H_2SO_4 , 0,2 M H_2SO_4) i volumena otapala (15 i 30 mL) na stupanj degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Primjenom KE postignut je nešto veći (10,24 %) % Fuk u odnosu na MAE (9,88 %), ali je primjenom MAE vrijeme ekstrakcije skraćeno s 4 h na 15 min što je velika prednost s ekološkog i ekonomskog stajališta. Najveći % Fuk (17,96 %) postignut je primjenom 0,2 M H_2SO_4 , a najmanji primjenom vode (4,42 %) te su vođeni ekstrakti tamnije boje što upućuje na njihovu manju čistoću. Najmanje vrijednosti % DA i koncentracije ukupnih ugljikohidrata zabilježene su primjenom MAE i vode kao otapala.

Glavne riječi: smeđe alge, *Cystoseira compressa*, fukoidan, ekstrakcija

Rad sadrži: 46 stranica, 7 slika, 6 tablica, 79 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Zoran Zorić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Ana Dobrinčić

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Ivona Elez Garofulić (predsjednica)
2. Doc. dr. sc. Zoran Zorić (mentor)
3. Doc. dr. sc. Sandra Pedisić (član)
4. Doc. dr. sc. Maja Repajić (zamjenski član)

Datum obrane: 15. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of Food Engineering

Laboratory for Drying Technologies and Monitoring of Biologically Active Compounds

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Safety Management

EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM THE BROWN ALGAE *Cystoseira compressa*

Mateja Nenadić, univ. bacc. ing. techn. aliment. 0058196390

Abstract: The extraction of polysaccharide fucoidan from the brown alga *Cystoseira compressa* was performed and the influence of conventional extraction (CE), microwave-assisted extraction (MAE) and different solvents (H₂O, 0.1 M HCl, 0.2 M HCl, 0.1 M H₂SO₄, 0.2 M H₂SO₄) and solvent volume (15 and 30 mL) on algae degradation (% DA), fucoidan yield (% Fuk) and total carbohydrate concentrations was studied. Slightly higher (10.24 %) % Fuk was achieved applying CE compared to MAE (9.88 %), but applying MAE, the extraction time was shortened from 4 h to 15 min, which is positive from an ecological and economic point of view. The highest % Fuk (17.96 %) was achieved applying 0.2 M H₂SO₄, and the lowest applying water (4.42 %) where the water extracts are darker in color, which indicates their lower purity. The lowest % DA and total carbohydrate concentrations were achieved using MAE and water as a solvent.

Keywords: brown algae, *Cystoseira compressa*, fucoidan, extraction

Thesis contains: 46 pages, 7 figures, 6 tables, 79 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: Zoran Zorić, PhD, Assistant professor

Technical support and assistance: Ana Dobrinčić, PhD

Reviewers:

1. Ivona Elez Garofulić, PhD (president)
2. Zoran Zorić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Sandra Pedisić, PhD (member)
4. Maja Repajić, PhD (substitute)

Thesis defended: September 15th, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ALGE	2
2.1.1. Crvene alge (<i>Rhodophyta</i>).....	2
2.1.2. Zelene alge (<i>Chlorophyta</i>)	3
2.1.3. Smeđe alge (<i>Phaeophyta</i>).....	3
2.1.4. Upotreba morskih algi	5
2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA	5
2.2.1. Karagenan.....	6
2.2.2. Ulvan	7
2.2.3. Laminarin	7
2.2.4. Fukoidan.....	8
2.3. METODE EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI	10
2.3.1. Ekstrakcija fukoidana	11
2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE).....	14
2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE).....	15
2.3.4. Ekstrakcija potpomognuta enzimima (EET)	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. MATERIJALI	17
3.1.1. Uzorak smeđe alge <i>Cystoseira compressa</i>	17
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Aparatura	18
3.1.4. Pribor.....	18
3.2. METODE RADA	19
3.2.1. Predtretman uzorka	19
3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija	19
3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima	20
3.2.4. Postupci nakon ekstrakcije	21
3.2.5. Stupanje degradacije alge i prinos fukoidana.....	21
3.2.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata.....	21
3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih fenola	22
3.2.8. Određivanje pigmenata UV/Vis spektrofotometrijom	23

3.2.9.	Određivanje suhe tvari	24
3.2.10.	Statistička analiza	25
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1.	UTJECAJ TEHNIKE EKSTRAKCIJE NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA	29
4.1.1.	Utjecaj tehnike ekstrakcije na prinos fukoidana	30
4.1.2.	Utjecaj tehnike ekstrakcije na degradaciju alge	30
4.1.3.	Utjecaj tehnike ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata	31
4.2.	UTJECAJ OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA	31
4.2.1.	Utjecaj otapala na prinos fukoidana	31
4.2.2.	Utjecaj otapala na degradaciju alge.....	32
4.2.3.	Utjecaj otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.....	33
4.3.	UTJECAJ VOLUMENA OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA	33
4.3.1.	Utjecaj volumena otapala na prinos fukoidana	33
4.3.2.	Utjecaj volumena otapala na postotak degradacije alge.....	33
4.3.3.	Utjecaj volumena otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata	34
4.4.	UTJECAJ KOMBINACIJE TEHNIKE EKSTRAKCIJE I OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA	34
4.4.1.	Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na prinos fukoidana	34
4.4.2.	Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na degradaciju alge.....	34
4.4.3.	Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata	34
4.5.	ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA.....	35
4.5.1.	Koncentracija ukupnih fenola	35
4.5.2.	Koncentracija pigmenata	36
5.	ZAKLJUČCI	38
6.	LITERATURA	39

1. UVOD

Razvoj svijesti o funkcionalnim sastojcima iz hrane raste svakog dana, a time su i alge postale interes brojnih istraživača upravo zbog brojnih bioaktivih spojeva koje sadrže. Polisaharidi, lipidi, proteini, polifenoli, pigmenti samo su neke od molekula u njihovom sastavu čija biološka aktivnost sve više privlači pažnju brojnih znanstvenika. Među njima su najznačajniji sulfatirani polisaharidi zbog svoje biološke aktivnosti kao i potencijalne primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Najpoznatiji sulfatirani polisaharidi su karagenan iz crvenih algi, ulvan iz zelenih algi te fukoidan i laminarin iz smeđih algi.

Fukoidan je sulfatirani polisaharid sastavljen uglavnom od fukoze povezane α -(1→2)-, α -(1→3)- i/ili α -(1→4)- glikozidnim vezama (Lim i Wan Aida, 2017). Ima pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, a brojna istraživanja pokazuju da sadrži protuupalno, antioksidacijsko, antivirusno, antitumorno i imunoregulatorno djelovanje. Također, sve se više koristi za razvoj novih lijekova kao i u proizvodnji funkcionalne hrane (Cunha, 2016). Ekstrakcija fukoidana iz uzoraka najčešće se provodi konvencionalnim metodama kojima prethodi postupak predtretmana, odnosno uklanjanja mogućih nečistoća (lipidi, pigmenti i drugi spojevi niske molekulske mase) te se u tu svrhu koriste otapala različite polarnosti kako ne bi došlo do strukturnih promjena polisaharida u algama. Nedostatak konvencionalnih metoda uključuje upotrebu velikih volumena otapala te dugo vrijeme ekstrakcije zbog čega se sve više koriste nove napredne metode ekstrakcije kojima je cilj ukloniti navedene nedostatke. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima jedna je od tih naprednih metoda kod koje se djelovanjem energije mikrovalova zagrijava polarno otapalo koje je u kontaktu s čvrstim uzorkom čime se smanjuje količina potrebnog otapala i vrijeme ekstrakcije što je zbog uštede na energiji ekonomski isplativo jer nema dodatnog zagrijavanja (Veggi i sur., 2013).

Cilj ovog rada bio je ekstrahirati fukoidan iz smeđe alge *Cystoseira compressa* primjenom konvencionalne ekstrakcije i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima te istražiti utjecaj različitih ekstrakcijskih parametara (otapala i omjera otapala i uzorka) na stupanj degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Također, analizom ekstrakta iz predtretmana odrediti će se količina ukupnih fenola i pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) u smeđoj algi *Cystoseira compressa*.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Alge (lat. *algae*) predstavljaju vrlo veliku i raznoliku skupinu uglavnom vodenih organizama. Najveći broj vrsta živi u morima i oceanima, u kopnenim vodama, a one koje su se prilagodile životu izvan vode obitavaju na osvijetljenim i vlažnim mjestima. Zbog svoje široke rasprostranjenosti i bioraznolikosti zabilježeno je da postoji između 25 000 i 30 000 vrsta algi (Castro i Huber, 2005). Mogu biti jednostanični, višestanični i kolonijalni oblici. Pripadaju skupini fotosintetskih organizama zbog koje imaju vrlo važnu ulogu u hranidbenom lancu. Iz vode i ugljikovog dioksida, uz pomoć sunčeve svjetlosti i klorofila, stvaraju organske spojeve (šećer) i kisik, neophodan element svih živih bića na Zemlji. Zbog toga alge spadaju u primarne proizvođače mora jer su glavni izvor hrane i energije primarnim potrošačima.

Klasifikacija algi još uvijek je predmet rasprava brojnih autora. Alge se međusobno razlikuju prema veličini talusa, sastavu stanične stijenke, vrsti pigmenata, skladišnim molekulama i brojnim drugim karakteristikama koje ih svrstavaju u određenu skupinu. Prema morfologiji, odnosno veličini talusa, morske alge se mogu podijeliti u dvije skupine: mikroalge i makroalge (Bux, 2013). Mikroalge čine skupinu jednostavnih organizama koji mogu biti jednostanični i višestanični. Pronalazimo ih u različitim ekosustavima poput mora, rijeka i jezera, prisutne u bentonskim i litoralnim staništima te u slobodnoj vodi kao fitoplankton (Kılınç i sur., 2013). Zbog svoje jednostavne građe prilagodile su se nepovoljnim uvjetima okoline. Za razliku od njih, makroalge odnosno morske alge su višestanični i autotrofni organizmi prisutni uglavnom u litoralnoj zoni. Brzorastući su organizmi koji dosegnu visinu čak do 70 m (tzv. kelpovi), a mogu rasti do 50 cm dnevno (Hillison, 1977). Prema boji pigmenta morske alge dijele se na: crvene (*Rhodophyta*), zelene (*Chlorophyta*) i smeđe (*Phaeophyta*) alge (Cunha, 2016).

2.1.1. Crvene alge (*Rhodophyta*)

Kao najraznolikija skupina morskih algi, s oko 8000 vrsta, crvene alge predstavljaju vrijedan izvor biološki aktivnih spojeva. Crvena boja potječe od dva dominantna pigmenta fikoeritrina i fikocijanina koji maskiraju ostale prisutne pigmente (El Gamal, 2010). Nalazimo ih na morskim dubinama u rasponu od 40 m do 250 m, a veličina ima varira od nekoliko cm do 1 m. Zbog manje veličine u odnosu na smeđe alge, ne mogu se zadržavati u području jakih plima pa stoga obitavaju u mirnim dubokim područjima. Crvene alge nisu uvijek nužno crvene boje jer postoje i one alge koje bojom variraju pa mogu biti i ljubičaste ili

crvenosmede. S obzirom na ostale karakteristike koje imaju klasificiraju se kao *Rhodophyta* (Cunha, 2016).

2.1.2. Zelene alge (*Chlorophyta*)

Kao što samo ime kaže, karakteristična zelena boja posljedica je prisutnosti klorofila a i b kojih ima u jednakim omjerima kao kod biljaka (Bold i sur., 1985). Veličinom se mogu usporediti s crvenim algama. Obuhvaćaju negdje oko 7 500 do 10 000 vrsta koje su široko rasprostranjene na pješčanim i stjenovitim plažama. Prisutnost klorofila znači da im je potrebna dovoljna količina svjetlosti kako bi se nesmetano odvijao proces fotosinteze. Stoga zelene alge ne mogu opstati u velikim dubinama niti zasjenjenim područjima. Za život na površini ne moraju konkurirati smeđim i crvenim algama (Kılınç i sur., 2013). Najpoznatija zelena alga je morska salata (*Ulva rigida*) koja je bioindikator onečišćenog mora.

2.1.3. Smeđe alge (*Phaeophyta*)

U svijetu je poznato oko 1500 do 2000 vrsta smeđih algi koje se intenzivno istražuju zahvaljujući svojoj bioraznolikosti. Veličina smeđih algi može varirati pa tako mogu biti manje 30-60 cm, srednje 2-4 m te veće poput velikih kelpova koji dosežu visine i do 20 m (Cunha, 2016). Prisutnost dominantnih pigmenata ksantofila i fukoksantina odgovorna je za boju koja varira od maslinasto zelene do različitih nijansi smeđe. Većina smeđih algi živi u morskom okruženju u dubokim hladnijim vodama gdje zauzimaju velik dio morskog dna. Imaju važnu ulogu jer pružaju sklonište mnogim beskralješnjacima, a mogu služiti i kao hrana. U Jadranskom moru zabilježeno je negdje oko 640 vrsta alga, a najbrojnija skupina upravo su smeđe alge među kojima se ističu cistozire (*Cystoseira*) koje predstavljaju kozmopolitsku vrstu. Najpoznatija smeđa alga u našem moru je Jadranski bračić (*Fucus virsoides*) koja je ujedno naš endem i bioindikator čistoće mora.

2.1.3.1. Smeđa alga *Cystoseira compressa*

Cystoseira compressa smeđa je grmolika alga iz roda *Cystoseira* koja može doseći visinu i do pola metra. Rod *Cystoseira*, s više od 294 vrste, predstavnik je obitelji *Sargassaceae* koja je nastala nedavnim spajanjem dviju bivših obitelji *Cystoseiraceae* i *Sargassaceae* (Gouveia i sur., 2013). Ovaj rod široko je rasprostranjen po cijelom svijetu s 80 % vrsta koje se nalaze duž mediteranske i susjedne atlanske obale, uglavnom u subtropskim područjima. U Sredozemnom moru zastupljeno je 29 vrsta među kojima je čak 19 endemskih (Amico, 1995). Nastanjuju infralitoralne zone, zahtijevaju iznimno čisto more, dugovječne su, a zbog svoje grmolikosti i osebjunosti prekrivaju velike površine morskog dna. Imaju važnu ekološku ulogu zahvaljujući svojoj trodimenzionalnoj strukturi gdje pružaju stanište i utočište mnogim

epifitima, beskralješnjacima i brojnim drugim algama (Antit i sur., 2013). Naziv *Cystoseira* u prijevodu znači "lanac vezikula" i opisuje zračne mjehuriće koji se nalaze u talusu, a *compressa* se odnosi na onaj oblik grana koji je spljošten. Međutim, postoji i drugi oblik koji je cilindričan, ali glavno obilježje *Cystoseira compressa* je upravo taj spljošteni oblik grana (Slika 1).



Slika 1. Spljošteni oblik grana smeđe alge *Cystoseira compressa* (Izvor: www.vecta.io)

Većina vrsta duljine je između 15-30 cm, ali mogu biti i veće. Klasifikacija smeđe alge *Cystoseira compressa* prikazana je u tablici 1. Zadnjih godina dolazi do smanjenja algi iz roda *Cystoseira* što može biti rezultat pogoršanja kvalitete vode na Mediteranu. Svakako bi trebalo obratiti pažnju na takve promjene prije nego ove vrijedne vrste algi nestanu s naših obala.

Tablica 1. Klasifikacija smeđe alge *Cystoseira compressa* (Guiry i Guiry, 2020)

Carstvo	<u>Eukaryota</u>
Kraljevstvo	<u>Chromista</u>
Red	<u>Ochrophyta</u>
Razred	<u>Phaeophyceae</u>
Podrazred	<u>Fucophycidae</u>
Poredak	<u>Fucales</u>
Obitelj	<u>Sargassaceae</u>
Rod	<u>Cystoseira</u>

2.1.4. Upotreba morskih algi

Morske alge predstavljaju bogat izvor visokovrijednih bioaktivnih molekula koje imaju potencijala postati važna sirovina u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Iako se smatraju namirnicama suvremenog doba, dio su ljudske prehrane otkad je čovjeka. Tome svjedoči i prvi zapis o upotrebi morskih algi u prehrani koji datira iz 4. stoljeća u Japanu i 6. stoljeća u Kini stoga i ne čudi da se upravo u ovim zemljama alge smatraju nacionalnim jelom. Također, engleski fizičar je proučavajući svojstva algi otkrio da je prah smeđih algi bogat jodom što je tada uvelike pomoglo u liječenju gušavosti. Alge su se primjenjivale i u liječenju pretilosti, a agar se koristio kao laksativ. Otkriće brojnih pozitivnih utjecaja algi na ljudsko zdravlje dovelo je do uzgoja algi u korist industrije koja danas proizvodi više od 90 % tržišnih potreba (Kılınç i sur., 2013). Alge se uzgajaju i kako bi se iz njih izolirali moćni ugušćivači i emulgatori - agar, karagenan i alginati - želatinozne tvari koje alge nakupljaju u velikim količinama. U Azijskim zemljama je uočeno da prehrana koja uključuje konzumaciju algi rezultira smanjenom vjerojatnosti nastanka kroničnih bolesti poput raka ili bolesti srca (Rioux i sur., 2017). U prehrani se mogu dodavati juhama, salatama ili začinima pa ih tako Japanci koriste kao omot u pripremi sushija ili prže u ulju kao grickalice, u Kini se konzumiraju kao povrće dok ih u Irskoj pripremaju kao kašu i koriste kao sredstvo za ugušćivanje. Karakterističan okus algi potječe od natrijevog glutamata koji je poznatiji kao pojačivač okusa koji često nosi naziv "peti" okus koji se može opisati kao ugodan tzv. *umami* okus. Dok se u Aziji koriste uglavnom u prehrani, u zapadnim zemljama predstavljaju glavni izvor bioaktivnih spojeva koje se koriste u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (Wijesinghe i Jeon, 2012).

Kao odgovor na ekstremne promjene temperature, slanosti i svjetlosti u kojima žive, alge proizvode sekundarne metabolite koji pokazuju određenu biološku aktivnost (Ibañez i sur., 2012). Zahvaljujući upravo svojoj bioraznolikosti predstavljaju bogat izvor bioaktivnih molekula kao što su polisaharidi, peptidi, omega-3 masne kiseline, karotenoidi, fenolni spojevi, vitamini i minerali (Kadam i sur., 2015). Među njima su najznačajniji polisaharidi koji su pokazali brojne koristi, kako u prehrambenoj tako i u farmaceutskoj industriji.

2.2. POLISAHARIDI U ALGAMA

Polisaharidi su ugljikohidrati nastali povezivanjem većeg broja monosaharida glikozidnom vezom. Mogu imati različita funkcionalna svojstva što ovisni o strukturi i načinu na koji su građeni (Wijesinghe i Jeon, 2013). Osnovna građevna jedinica većine polisaharida je šećer glukoza. Molekule glukoze se uz pomoć enzima međusobno povezuju glikozidnom vezom.

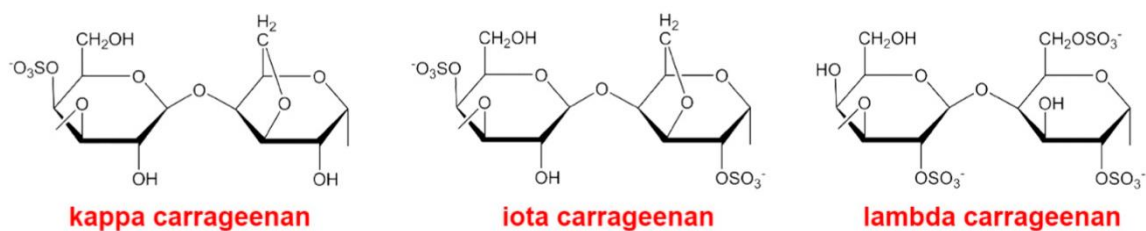
Polisaharidi mogu biti sastavljeni od istih monomernih jedinica i tada govorimo o homopolisaharidima, a ako su monomerne jedinice različite onda su to heteropolisaharidi. Kao glavni strukturni elementi staničnih stijenki osiguravaju mehaničku potporu stanicama i tvore staničnu zalihu najvažnijega metaboličkoga goriva - glukoze. Njihov sastav u algama varira ovisno o sezoni, dobi, vrstama algi i geografskom položaju (Gupta i Abu-Ghannam, 2011).

Sulfatirani polisaharidi iz algi su najviše proučavani zadnjih godina zbog svoje biološke aktivnosti i potencijalne primjene u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Njihov broj i kemijski sastav variraju ovisno o vrsti alge u kojoj se nalaze (Cunha i Grenha, 2016). Najznačajniji sulfatirani polisaharidi iz algi su karagenan iz crvenih algi, ulvan iz zelenih algi te fukoidan i laminarin iz smeđih algi koji mogu imati antikoagulativnu, protuupalnu, antitumorsku, imunomodulatornu i antikancerogenu aktivnost.

2.2.1. Karagenan

Karagenan proizvode crvene alge koje se jednim imenom nazivaju karagenofiti. Iako se crvene alge koriste u ljudskoj prehrani, karagenani ekstrahirani iz algi nisu probavljivi u ljudskom tijelu, ali predstavljaju vrijedan izvor dijetalnih vlakana. Jedno od važnih svojstava karagenana je sposobnost stvaranja termoreverzibilnih gelova zbog kojeg se koriste kao sredstvo za geliranje, stabiliziranje i emulgiranje u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Kao prvi izvor karagenana u literaturi se spominju crvene morske alge *Chondrus crispus* (Cunha i Grenha, 2016).

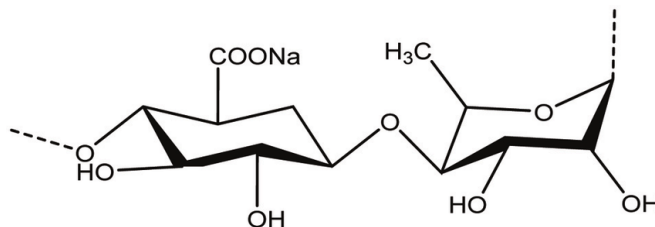
Također, karagenan je drugi naziv za obitelj galaktana čiju strukturu okosnice čine linearni lanci ponavljajućih jedinica D-galaktoze i 3,6-anhidro-galaktozni kopolimer naizmjenično povezani α -(1 $\rightarrow$ 3) i β -(1 $\rightarrow$ 4) vezama. Postoji barem 15 vrsta karagenana od kojih su Kappa (κ), Iota (ι) i Lambda (λ) karagenan industrijski najvažniji (Slika 2). Razlikuju se po strukturi što uključuje broj i položaj sulfatnih skupina i pojavu 3,6-anhidro-D-galaktoze u lancu (Lahaye, 2001). Svaki od njih ima svojstvenu sposobnost formiranja gela pa je tako kappa najjače strukture i njegova primjena daje jake, krute gelove, iota je nešto slabije strukture što rezultira mekšom formom gelova dok lambda nema gelirajuće sposobnosti i najčešće se upotrebljava za zgušnjavanje mliječnih proizvoda.



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

2.2.2. Ulvan

Ulvan je sulfatirani polisaharid zelenih morskih algi iz roda *Ulva* koji je važan zbog svojih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava te njihove potencijalne primjene u poljoprivredi i farmaceutskoj industriji. Sastoji se od sulfatiranog šećera ramnoze, uronskih kiselina (glukuronska i iduronska) i šećera ksiloze (Lahaye i Robic, 2007). Strukturu ulvana čine ponavljajuće disaharidne jedinice u kojima je uronska kiselina povezana sulfatnom grupom neutralnog šećera (Slika 3). *Ulva* spp. poznatija kao morska salata predstavlja bogat izvor ugljikohidrata, vitamina, esencijalnih aminokiselina, minerala i prehrambenih vlakana. Kemijski sastav, gustoća električnog naboja i molekulska masa ulvana su faktori o kojima ovise svojstva ulvana, ali i ostalih prethodno navedenih polisaharida (Cunha i Grenha, 2016). Također, brojni autori u literaturi navode kako prinos i specifičan sastav polisaharida iz zelenih algi ovise o čimbenicima iz okoliša kao što su vrste algi iz kojih se dobivaju, godišnje doba u kojem se sakupljaju alge te metodi ekstrakcije koja se koristila.

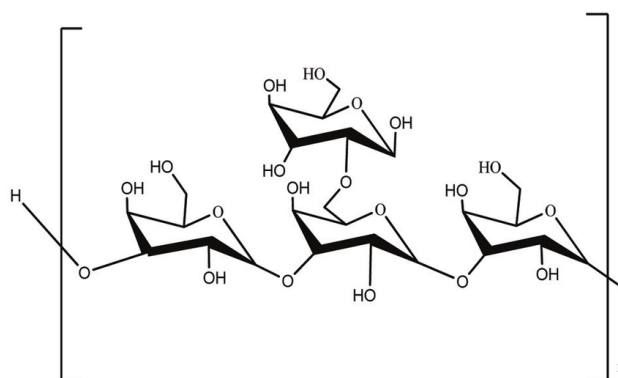


Slika 3. Struktura ulvana (Shahidi i Rahman, 2018)

2.2.3. Laminarin

Laminarin je skladišni polisaharid koji služi kao rezerva hrane u smeđim algama. Također, u literaturi se može naći i pod imenom laminaran ili leukozin. Prvi ga je izolirao Schmiedeberg 1885. godine iz algi porodice *Laminariaceae*, a nalazi se i u listovima algi roda *Laminaria* i *Saccharina*. Sastavljen je od 20-25 jedinica glukoze, ima nisku molekularnu težinu, približno oko 5 kDa, čija vrijednost ovisi o stupnju polimerizacije (Slika 4). Postoje dvije vrste laminarina kod kojih se završetci lanaca razlikuju po reducirajućim krajevima, tzv. M i G lanci gdje M lanci završavaju manitolom kao završnim redukcijским krajem, a glukoza je

pričvršćena na kraj G lanaca. Struktura i omjer im ovise o čimbenicima iz okoliša, hranjivim solima i dobi listova (Chizhov i sur., 1998). Kemijski sastav laminarina definira i utjecaj ostalih čimbenika kao što su temperatura vode, slanost, valovi, morske struje i dubina na kojoj se nalaze, a sadržaj laminarina u smeđim alagama ovisi o vrsti alge, godišnjem dobu, staništu i metodi ekstrakcije koja se koristi. Istraživanja su pokazala kako laminarin pokazuje anti-apoptotsku, antikoagulacijsku i antioksidativnu i antitumorsku aktivnost te se može koristiti kao terapijsko sredstvo s imunostimulacijskim i protuupalnim djelovanjem (Kadam i sur., 2015).

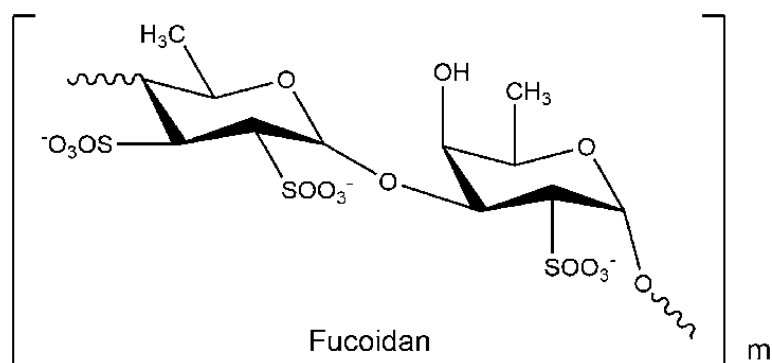


Slika 4. Struktura laminarina (Sanjeewa i Jeon, 2018)

2.2.4. Fukoidan

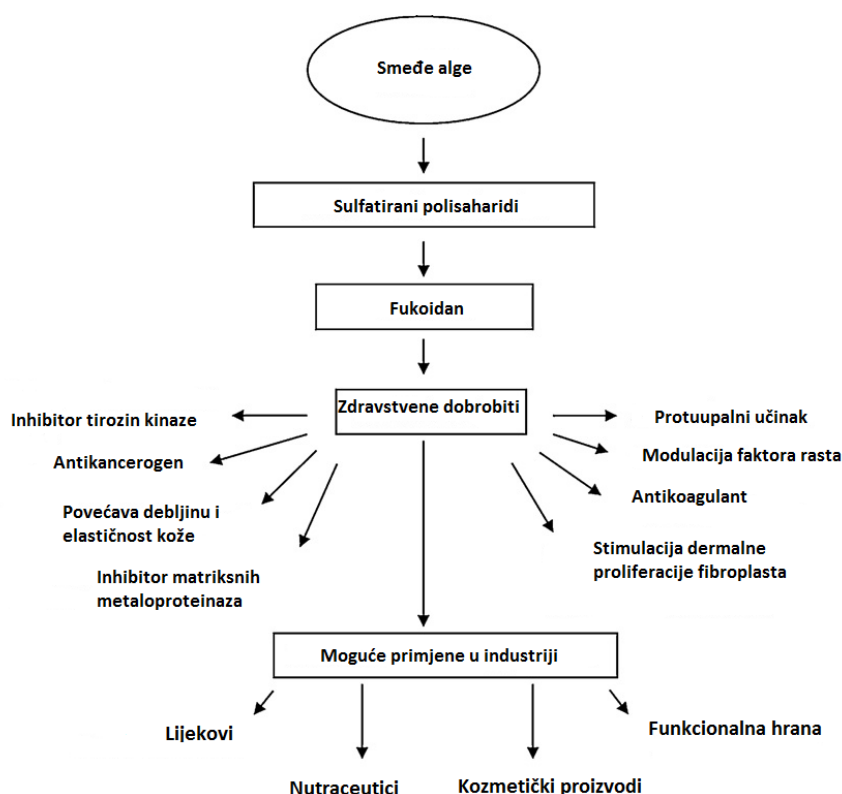
Fukoidan označava obitelj sulfatiranih polisaharida koji se nalazi u staničnim stijenkama smeđih morskih algi (*Phaeophyta*). Prvi ga je izolirao Kilin 1913. godine i od tada se intenzivno istražuju strukture fukoidana iz različitih vrsta smeđih algi (Li i sur., 2008). U početku je nosio naziv fucoidin, ali prema preporuci IUPAC-a preimenovan je u naziv fukoidan koji je zadržan sve do danas. Sastoji se uglavnom od L-fukoza koje mogu biti povezane α -(1,2), α -(1,3) ili naizmjeničnim α -(1,4) glikozidnim vezama što ovisi i o vrsti smeđih algi iz koje se izolira (Slika 5). Fukoza je heksoznideoksi šećer kemijske formule $C_6H_{12}O_5$ i glavni monosaharid fukoidana. Osim šećera fukoze, može sadržavati i druge monosaharide kao što su galaktoza, glukoza, manosa, ksiloza, ramnoza i uronska kiselina (Lim i sur., 2016; Zvyagintseva i sur., 2003). Iako su ove komponente prisutne u značajnim količinama, njihova pojava još uvijek nije uobičajena. Razlog tome je što sastav monosaharida može varirati ovisno o vrsti alge i godišnjem dobu pa se različiti profili monosaharida fukoidana mogu dobiti iz različitih vrsta smeđih algi (Lim i Wan Aida, 2017). Raspon molekulske mase od 7 kDa (Zvyagintseva i sur., 2003) do 2379 kDa (Rioux i sur., 2009) također ovisi o vrsti alge, godišnjem dobu sakupljanja i geografskom položaju. Prema istraživanjima koja su proveli Chevot i sur. (1999) važnu ulogu u fukoidanu ima i sulfat

esterska skupina jer se povećanjem udjela sulfatnih grupa povećava antikoagulacijska aktivnost dok su Wang i sur. (2010a) utvrdili da se povećava antioksidativna aktivnost fukoidana.



Slika 5. Struktura fukoidana (Anbuczechian i sur., 2015)

Fukoidan ima brojne učinke koji djeluju pozitivno na ljudsko zdravlje. Koliko je zanimljiv znanstvenicima pokazuje činjenica da se istraživanje njegove biološke aktivnosti provodi skoro svake godine (Hahn i sur., 2012). Biološka svojstva koja posjeduje pružaju brojne mogućnosti primjene u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji te u prehrambenoj industriji kao nutraceutici i funkcionalna hrana (Slika 6).



Slika 6. Biološka svojstva i potencijalna primjena fukoidana u industriji (prema Wijesinghe i Jeon, 2012)

2.3. METODE EKSTRAKCIJA POLISAHARIDA IZ ALGI

Ekstrakcija je tehnološka operacija potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topivost u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Na ekstrakciju može utjecati kemijska priroda spojeva, metoda ekstrakcije koja se koristi i prisutnost interferirajućih tvari (Wijesinghe, 2012). Postoje različite vrste ekstrakcija koje se mogu podijeliti u dvije osnovne skupine: konvencionalne (klasične) i nekonvencionalne (napredne) metode ekstrakcije.

Konvencionalne metode ekstrakcije kao što su ekstrakcija tekuće-tekuće, čvrsto-tekuće ili ultrazvučna ekstrakcija temelje se na upotrebi različitih organskih otapala u kombinaciji s grijanjem ili miješanjem s ciljem ekstrakcije željene komponente iz smjese. Također, uključuju postupke ekstrakcije vrućom i hladnom vodom te kiselinama i bazama. Prednost im je što su uhodane, ali nerijetko su i zahtjevne jer proces dugo traje, koriste se velike količine otapala koja su ponekad i štetna, slabo selektivna te daju niske prinose ekstrakcije (Herrero i sur., 2006).

Zbog navedenih razloga, a s ciljem poboljšanja učinkovitosti ekstrakcije, javila se potreba za razvojem novih naprednih tehnika ekstrakcije u koje spadaju i ekstrakcija potpomognuta enzimima (EET), ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE) te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE). Prednost naprednih tehnika u odnosu na klasične očituje se u većim prinosima, nižim troškovima, kraćem vremenu trajanja procesa, boljom selektivnošću te su sigurnije za okoliš (Lim i Wan Aida, 2017).

2.3.1. Ekstrakcija fukoidana

Konvencionalne tehnike ekstrakcije provode se s ciljem izolacije fukoidana iz staničnih stijenki morskih algi u tekući medij (ekstrakt fukoidana) nakon čega slijede daljnji postupci obrade. Izolacija i pročišćavanje fukoidana iz morskih algi obično uključuju nekoliko koraka u koje spadaju 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. Od kada je 1913. godine Kylin prvi izolirao fukoidan koristeći razrijeđenu octenu kiselinu pa sve do 1952. godine, većina ekstrakcija koje su tada izvodili znanstvenici provodile su se u blago kiselim uvjetima, uz varijacije temperature i taloženje etanola. Glavna ideja prilikom ekstrakcije bila je izolirati fukoidan od ostalih spojeva koji su se nalazili u uzorcima morskih algi. Iz tog razloga, znanstvenici nastoje manipulirati prirodnim karakteristikama fukoidana i drugih spojeva u uzorku kako bi moguće koekstrakcije sveli na minimum. Ukoliko bi ipak došlo do koekstrakcije, može se primijeniti nekoliko postupaka za izolaciju fukoidana, čime se povećava čistoća ekstrahiranog fukoidana. U većini slučajeva, ti postupci uključuju smanjenje veličine morskih algi, predtretman uklanjanja nečistoća, ekstrakciju fukoidana, izolaciju fukoidana i sušenje (Lim i Wan Aida, 2017).

Smanjenje veličine algi važan je dio ekstrakcije fukoidana jer povećava površinu morskih algi koja će biti izložena ekstrakcijskom otapalu i poboljšati postupak ekstrakcije. To je vrlo izravna fizička metoda gdje se mlinovi obično koriste za mljevenje algi čije uzorke je prethodno potrebno osušiti. U laboratorijskoj primjeni se obično koristi mlin s laboratorijskim sitom kako bi se osigurala jednolikost morskih algi u veličini (Lim i Wan Aida, 2017).

2.3.1.1. *Predtretman*

Korak koji prethodi ekstrakciji, a važno ga je provesti kako bi se iz uzorka uklonile moguće nečistoće kao što su lipidi, pigmenti i drugi spojevi niske molekulske mase. U tu svrhu koriste se otapala različite polarnosti kako ne bi došlo do strukturnih promjena polisaharida u algama.

Lipidi se uklanjaju nepolarnim otapalima kao što je kloroform, naftni eter ili diklormetan, pigmenti srednje polarnim otapalima kao što je aceton, metanol ili etanol, a ostale molekule koje su visoke polarnosti poput monosaharida, proteina i minerala ekstrahiraju se u vodi (Nisizawa i sur., 1963).

Cumashi i sur. (2017), Lim i sur. (2016) i Chizov i sur. (1999) proveli su postupak predtretmana u kojem su uzorke morskih algi obradili mješavinom metanola, kloroforma i vode u omjeru MeOH: CHCl₃: H₂O (4:2:1) na sobnoj temperaturi. U postupku se nije koristila visoka temperatura jer bi visoka temperatura mogla nenamjerno započeti ekstrakciju fukoidana koji je topiv u vodi.

Ponce i sur. (2003) također su proveli postupak predtretmana u kojem su koristili 80 %-tni etanol pri temperaturi 70 °C u trajanju od 24 sata. Ubrzano izdvajanje nečistoća postignuto je višom temperaturom, a pošto se koristio 80 %-tni etanol, visoka temperatura je prihvatljiva jer fukoidan nije topiv u etanolu pa ukoliko bi došlo do njegove ekstrakcije on bi se istaložio. Kad se otapalo odfiltrira, ne uklanja se istaloženi fukoidan već samo nečistoće (pigmenti, lipidi). Mehaničkim miješanjem dolazi do bolje interakcije između uzoraka čvrstih morskih algi i otapala, a ujedno se povećava brzina izdvajanja nečistoća čime se poboljšava uspješnost predtretmana. Predtretirani uzorci morskih algi suše se prije ekstrakcije fukoidana metodama kao što je sušenje u peći, vakuum sušenje u pećnici ili sušenje zamrzavanjem (Lim i Wan Aidar., 2017).

2.3.1.2. *Konvencionalna ekstrakcija*

Konvencionalna ekstrakcija fukoidana obično se provodi tretiranjem uzoraka morskih algi vrućim vodenim ili kiselim otopinama pri temperaturama u rasponu od 70-100 °C u trajanju od nekoliko sati (Ale i sur., 2011a). Nakon predtretmana, prethodno obrađeni uzorci podvrgavaju se različitim tehnikama ekstrakcije koje mogu biti selektivne tj. namijenjene izdvajanju samo fukoidana bez alginata, ili neselektivne (izdvajanje fukoidana i alginata zajedno). Cilj je ekstrahirati željene spojeve uz minimalnu koekstrakciju drugih polisaharida. Ukoliko se fukoidan i alginat izdvajaju zajedno tada se primjenjuju daljni koraci za uklanjanje alginata kako bi se povećala čistoća fukoidana. Budući da je fukoidan topiv u vodi, ekstrakcijska sredstva koja se koriste uvijek su vodene otopine (Lim i Wan Aida, 2017).

Li i sur. (2006), Duarte i sur. (2001) i Maruyama i Yamamoto (1984) proveli su postupak ekstrakcije s vrućom vodom. Pri visokoj temperaturi od 70-100 °C uz mehaničko miješanje uzorka ekstrahiraju se sastojci morskih algi koji su topivi u vodi i svi polisaharidi zajedno

(fukoidan, alginat i laminarin) što metodu čini neselektivnom te su potrebni daljnji koraci za dobivanje čistog fukoidana.

Za ekstrakciju fukoidana iz uzoraka može se koristiti i vodena otopina kalcijeva klorida. Uz mehaničko miješanje i visoke temperature (70-85 °C) koji povećavaju brzinu ekstrakcije i otapanje fukoidana, ekstrahira se i alginat koji reagira s CaCl_2 pri čemu nastaje kalcijev alginat koji nije topiv u vodi te se istaloži (McHugh, 1987). Ova metoda ekstrakcije fukoidana iz uzoraka morskih algi je selektivna jer se nakon uklanjanja krutih ostataka dobije relativno čisti fukoidan koji se može dalje tretirati radi povećanja čistoće.

Osim vodene otopine CaCl_2 , za ekstrakciju se mogu koristiti i otopine kiselina, najčešće klorovodična ili sumporna, uz mehaničko miješanje u uvjetima gdje je temperatura između 80-100 °C i pH ekstrakcijskog otapala u rasponu od 1 do 3. Kiselina omogućava hidrolizu staničnih stijenki alge čime je olakšana ekstrakcija fukoidana te pretvara alginat iz smeđih algi u alginsku kiselinu koja je netopiva u vodi (McHugh, 1987).

2.3.1.3. Pročišćavanje

Kao što je prethodno navedeno, ekstrakt fukoidana može sadržavati i druge spojeve, odnosno nečistoće pa je potrebno poduzeti daljne korake kao što je pročišćavanje kako bi se dobio čisti fukoidan. Postoji čitav niz metoda koje se mogu primijeniti, a sve uključuju uklanjanje drugih polisaharida, bilo taloženjem fukoidana (ostavljajući neutralne polisaharide u supernatantu) ili taloženjem alginata (ostavljajući fukoidan u supernatantu) nakon čega se dijalizom uklanjanju ostale nečistoće (Lim i Wan Aida, 2017). U prehrambenoj industriji metoda taloženjem etanola najčešće se koristi za uklanjanje polisaharida i ostalih nečistoća. Hentati i sur. (2018) u svom istraživanju o strukturnoj karakterizaciji i antioksidativnom djelovanju polisaharida topivih u vodi iz smeđe alge *Cystoseira compressa* (izronjena u blizini Tunisa) postupak pročišćavanja proveli su dodavanjem 96 %-tnog etanola u ekstrakt. Uz mehaničko miješanje u trajanju od 15 minuta, smjesa je ostavljena da se taloži preko noći na 4 °C. Polisaharidi koji su se istaložili centrifugom se odvoje od supernatanta u kojem se nalazi fukoidan te se procesom dijalize uklanjaju moguće prisutne nečistoće niske molekuleske mase.

Slično su napravili Li i sur. (2006) i Duarte i sur. (2001) koji su u svom radu proveli metodu ekstrakcije vrućom vodom te su ekstrakte fukoidana pomiješali s etanolom kako bi dobili 75 %-tnu otopinu etanola u kojoj će se istaložiti polisaharidi. Centrifugiranjem se uklanja supernatant u kojem se nalaze nopolisaharidne nečistoće, a polisaharidi se istalože. Talog je

zatim otopljen u vodi i tretiran CaCl_2 da bi se istaložili alginati koji se uklone centrifugiranjem. Izolirani fukoidan u supernatantu se prije sušenja podvrgava dijalizi kojom se uklanjaju ostale nečistoće niske molekulske mase.

Za izolaciju fukoidana iz ekstrakta dobivenog ekstrakcijom pomoću kiseline autori Nagaoka i sur. (1999) i Hemmingson i sur. (2006) koristili su NaOH kako bi neutralizirali ekstrakt. Neutralizacijom nastaju soli koje se zatim moraju ukloniti. U oba istraživanja proveli su ultrafiltraciju i dijalizu kako bi uklonili sol i druge nečistoće. Nagaoka i sur. (1999) proveli su još dodatne korake za izolaciju fukoidana gdje su koristili CaCl_2 i etanol za taloženje fukoidana nakon čega su ponovili dijalizu s ciljem postizanja veće čistoće fukoidana.

Kationska površinski aktivna sredstva, odnosno deterdženti, kao što je heksadeciltrimetilamonijev bromid (Cetavlon) također se mogu primijeniti u procesu pročišćavanja. Primjena Cetavlona zabilježena je u istraživanju koje su proveli autori Lim i sur. (2016) i Cumashi i sur. (2007). Metoda se bazira na činjenici da je fukoidan sulfatirani polisaharid negativno nabijen te reagira s kationskim deterdžentima stvarajući soli. Soli koje nastaju nisu topive u vodi pa će se istaložiti dok neutralni polisaharidi poput laminarina i alginata ne reagiraju s kationskim deterdžentima te ostaju otopljeni u vodi (Scott, 1965).

2.3.2. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE)

Bez obzira koja tehnika ekstrakcije se koristi, naglasak je uvijek na brzini trajanja procesa i njegovoj učinkovitosti. Primjena mikrovalnog zagrijavanja za ekstrakciju spojeva iz različitih uzoraka koristi se još od 1985. godine, a najjednostavniji primjer korištenja mikrovalova u prehrambenoj industriji je mikrovalna pećnica. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima je postupak u kojem se mikrovalna energija koristi za zagrijavanje otapala koji je u kontaktu s uzorkom kako bi se analiti iz smjese uzorka razdvojili u otapalo. Na učinkovitost MAE utječe snaga mikrovalova, temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije, izbor otapala i omjer otapala i uzorka. Bazira se na neionizirajućem elektromagnetskom zračenju frekvencija od 300 MHz do 300 GHz. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola, a kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje. Sposobnost brzog zagrijavanja svojstvena je MAE i glavna prednost ove tehnike (Spar Eskilsson i Bjourklund, 2000). Općenito, selektivnost ekstrahiranih spojeva je učinkovitija i trajanje procesa je brže od uobičajenih tehnika. Također, pruža slične, ako ne i bolje prinose u usporedbi s onima kod konvencionalnih postupaka ekstrakcije, a ujedno troši manju količinu energije i otapala, što se smatra održivim i ekološki prihvatljivijim postupkom. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) su u svom istraživanju

pokazali kako se ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima, provedena u optimalnim uvjetima tlaka, vremena i biomase alge, pokazala kao učinkovita metoda za ekstrakciju fukoidana visokog prinosa (18,22 %) iz *Fucus vesiculosus*. Međutim, svojstva poput molekulske mase i biološke aktivnosti fukoidana autori nisu proučavali.

2.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ova metoda koristi ultrazvučne valove između 20 kHz do 100 kHz. Ti valovi uzrokuju stvaranje mjehurića prolaskom kroz područja visokog i niskog tlaka. Kada se mjehurići sruše u jakom ultrazvučnom polju dolazi do kavitacije. Kavitacija u blizini smjesa tekućina-krutina uzrokuje raspadanje čestica što znači da se povećava prijenos mase i oslobađaju bioaktivni spojevi iz stanične stijenke. Prethodna istraživanja pokazuju da su polifenolni spojevi i antioksidansi najčešće ekstrahirani spojevi iz morskih algi ovim postupkom. Također, bitan je sam proces razaranja stanične stijenke zbog učinkovitog oslobađanja molekula. Rodrigues i sur. (2015) zaključili su da polisaharidi zbog svoje složenosti i količine mogu ometati ekstrakciju molekula kroz staničnu stijenku pa je degradacija njihove strukture temeljni korak koji dovodi do oslobađanja spojeva iz morskih algi. Također su zaključili da antioksidativno djelovanje ovisi o vrsti morskih algi i primjenjenoj metodi ekstrakcije te je dokazano da smeđe alge imaju veći sadržaj fenola i veće antioksidativno djelovanje od crvenih i zelenih algi. Kadam i sur. (2015) proveli su istraživanje u kojem su uspoređene učinkovitosti konvencionalnih postupaka ekstrakcije biološki aktivnih spojeva smeđih morskih algi (laminarina) i ekstrakcije potpomognute ultrazvukom. Utvrdili su da je primjena postupka UAE rezultirala većim prinosom laminarina u odnosu na konvencionalne postupke.

2.3.4. Ekstrakcija potpomognuta enzimima (EET)

Primjena ekstrakcije potpomognute enzimima u posljednje je vrijeme porasla, posebno kada je važno sačuvati specifične strukturne karakteristike i funkcionalna svojstva ciljnih komponenata. Enzimi su katalizatori koji povećavaju brzinu pretvorbe supstrata u produkt, a njihova upotreba znači smanjenu upotrebu kemikalija u ekstrakciji hidrokoloida iz morskih algi. Stoga tehnike enzimske ekstrakcije (EET) pokazuju ogroman potencijal primjene za razvoj održive proizvodnje polisaharida morskih algi (Lim i Wan Aida, 2017). Glavni korak sastoji se u odabiru enzima koji uzrokuju razgradnju staničnih stijenki morskih algi i time omogućuju oslobađanje polisaharida u ekstrakcijskom mediju. Za izolaciju fukoidana iz morskih algi potrebni su enzimi koji utječu na degradaciju stanične stijenke te omogućuju izvođenje ekstrakcije u uvjetima koji čuvaju bioaktivnost fukoidana. Hahn i sur. (2012) opisali su upotrebu enzima celulaze, alginat-lijaze i laminarinaze u ekstrakciji fukoidana iz

morske alge *Fucus vesiculosus*. Ti enzimi omogućuju razgradnju stanične stijenke (celulaze) što omogućuje oslobađanje fukoidana u ekstrakcijski medij, razgradnju alginata (alginatlijaza) i laminarina (laminarinaza), u kojima se obojica normalno koekstrahiraju tijekom ekstrakcije fukoidana iz smeđih algi. Razgradnja alginata i laminarina omogućuje odvajanje ovih polisaharida od fukoidana, čime se izolira fukoidan, koji je ostao netaknut.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorak smeđe alge *Cystoseira compressa*

U ovom radu korišteni su uzorci smeđe alge *Cystoseira compressa* koja je izronjena u veljači 2018. godine na području Zadarskog arhipelaga. Uzorci alge su najprije isprani u slatkoj i destiliranoj vodi te odmah zamrznuti na $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provođenja postupka liofilizacije. Oko 500 g smrznutih uzoraka alge raspoređeno je na 6 plitica u jednom sloju nakon čega je proveden postupak liofilizacije u trajanju od 24 h. Najprije je proveden postupak primarnog sušenja (sublimacija) pri vakuumu 0,130-0,155 hPa i temperaturi od -30 do $0\text{ }^{\circ}\text{C}/18\text{ h}$, a zatim je slijedila izotermna desorpcija pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}/6\text{ h}$. Osušeni uzorci alge usitnjeni su uz pomoć električnog mlinca. Prah je pohranjen u staklenu posudu i čuvan u mraku na sobnoj temperaturi do provođenja ekstrakcije.

3.1.2. Kemikalije

- aceton, p.a. (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 96 %-tni etanol
- apsolutni etanol (CARLO ERBA Reagents, Italija)
- zasićena otopina natrijeva karbonata (20 %-tna otopina)

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

- destilirana voda
- Folin - Ciocalteu reagens (Fisher Scientific, UK)
- bezvodni kalcijev klorid (1 %-tna otopina) (Gram-mol doo, Zagreb, Hrvatska)
- 0,1 M HCl

PRIPREMA: 833 μL koncentrirane 37 % HCl (CARLO ERBA Reagents, Italija) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 0,2 M HCl

PRIPREMA: 1666 μL koncentrirane 37 % HCl (CARLO ERBA Reagents, Italija) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 0,1 M H_2SO_4

PRIPREMA: 560 μL koncentrirane 96 % H_2SO_4 (CARLO ERBA Reagents, Italija) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 0,2 M H_2SO_4

PRIPREMA: 1110 μL koncentrirane 96 % H_2SO_4 (CARLO ERBA Reagents, Italija) otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake.

- 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, u odmjernoj tikvici volumena 100 mL.

3.1.3. Aparatura

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

3.1.4. Pribor

- plastična žličica
- plastične epruvete s konusnim dnom
- laboratorijske čaše (25 mL, 50 mL, 100 mL i 200 mL)
- Petrijeve zdjelice
- propipeta
- mikropipete (100 μL i 1000 μL)
- staklene kivete
- hvataljka
- filter papir
- stakleni štapić
- odmjerne tikvice s čepom (100 mL)

- pinceta
- staklene epruvete
- štoperica
- stakleni lijevci
- magnetni mješači
- Erlenmeyerove tikvice
- menzure
- tikvice s okruglim dnom (100 mL)
- vata
- termometar
- metalna špatula

3.2. METODE RADA

3.2.1. Predtretman uzorka

Prije samog postupka pripreve ekstrakata, proveden je predtretman uzorka smeđe alge *Cystoseira compressa* na način da se odvaže 2 puta po 15 g uzorka u 2 Erlenmeyerove tikvice volumena 250 mL te se preko uzorka prelije 2 puta po 200 mL acetona. U Erlenmeyerovu tikvicu stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i postavi na magnetnu miješalicu 24 h, na brzinu miješanja 5. Nakon toga se sadržaj tikvice filtrira preko filter papira te se na talog dodaje 200 mL 80 % etanola, stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i ponovo se postavi na magnetnu miješalicu u trajanju od 24 h, na brzinu miješanja 5. Zatim se sadržaj tikvice filtrira preko filter papira, zagrije se 400 mL 80 % etanola do 60 °C i prelije 200 mL u svaku tikvicu preko taloga. Stavi se magnetni štapić, tikvica se zatvori vatom i postavi na magnetnu miješalicu 4 h, na brzinu 5. Nakon 4 h, sadržaj tikvice se filtrira preko filter papira, a talog se stavi na sušenje do konstantne mase.

3.2.2. Konvencionalna ekstrakcija

Konvencionalna ekstrakcija provedena je na magnetnoj miješalici RT 5 (IKA, Njemačka) primjenom 5 različitih otapala (voda, 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H₂SO₄, 0,2 M H₂SO₄) i 2 različita volumena otapala (15 mL i 30 mL) prema uvjetima prikazanim u tablici 2. Na analitičkoj vagi u Erlenmeyerovu tikvicu odvaže se 1 g predtretiranog uzorka smeđe alge *Cystoseira compressa*, stavi se magnetni štapić te se, ovisno o uzorku, dodaje određena količina otapala zagrijanog na 60 °C. Tikvica se zatvori vatom te se postavi na magnetnu miješalicu 4 h, na brzinu miješanja 5.

3.2.3. Ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

Ekstrakcija potpomognuta valovima provedena je prema planu pokusa prikazanom u tablici 2. Na analitičkoj vagi u tikvicu s okruglim dnom (50 mL) odvaži se 1 g predtretiranog uzorka smeđe alge *Cystoseira compressa*. Neposredno prije samog mjerenja u mikrovalnom ekstraktoru dodaje se 15 ili 30 mL određenog otapala i magnetni štapić te se sadržaj tikvice promiješa. Tikvica se stavi na postolje u ekstraktoru, spoji na zračno hladilo, na koje se spoji i vodeno hladilo. Na uređaju se postave opći parametri ekstrakcije: temperatura (100 °C), vrijeme (15 min), vrijeme za postizanje temperature ekstrakcije (5 min), miješanje (75 %) te ventilacija nakon ekstrakcije (1 min).

Tablica 2. Plan provedbe konvencionalne (KE) i ekstrakcije potpomognute mikrovalovima (MAE)

UZORAK	TEHNIKA EKSTRAKCIJE	OTAPALO	VOLUMEN OTAPALA (mL)
K1	KE	H ₂ O	15
K2	KE	H ₂ O	30
K3	KE	0,1 M HCl	15
K4	KE	0,1 M HCl	30
K5	KE	0,2 M HCl	15
K6	KE	0,2 M HCl	30
K7	KE	0,1 M H ₂ SO ₄	15
K8	KE	0,1 M H ₂ SO ₄	30
K9	KE	0,2 M H ₂ SO ₄	15
K10	KE	0,2 M H ₂ SO ₄	30
M1	MAE	H ₂ O	15
M2	MAE	H ₂ O	30
M3	MAE	0,1 M HCl	15
M4	MAE	0,1 M HCl	30
M5	MAE	0,2 M HCl	15
M6	MAE	0,2 M HCl	30
M7	MAE	0,1 M H ₂ SO ₄	15
M8	MAE	0,1 M H ₂ SO ₄	30
M9	MAE	0,2 M H ₂ SO ₄	15
M10	MAE	0,2 M H ₂ SO ₄	30

3.2.4. Postupci nakon ekstrakcije

Nakon završene ekstrakcije, dobiveni ekstrakti se ohlade te se filtriraju pod vakuumom, a talog se stavi na sušenje na prethodno izvaganom filter papiru. Plastične kivete s filtratom se stave u vakuum koncentrator (50 °C, 25 torra) te se uzorak koncentrira na otprilike 5 odnosno 10 mL. Nakon toga dodaje se 1 %-tna otopina CaCl_2 i to 20 mL u uzorke u kojima je za ekstrakciju korišteno 30 mL otapala i 10 mL u uzorke u kojima je za ekstrakciju korišteno 15 mL otapala. Uzorci se stave u hladnjak na 24 h da se istalože alginati. Zatim se otopina profiltrira preko filter papira u novu plastičnu kivetu te se ponovo stavi u vakuum koncentrator da se uzorak koncentrira na 5 ili 10 mL. Nakon toga se dodaje dupli volumen apsolutnog etanola, smjesa se promiješa i stavi u hladnjak preko noći. Slijedi centrifuga na 5500 okretaja u trajanju od 15 min. Otopina se filtrira preko filter papira i prebaci u plastičnu kivetu, a talog se prebaci u prethodno izvaganu Petrijevu zdjelicu i stavi na sušenje na sobnoj temperaturi. Filtrat se koncentrira u vakuum koncentratoru do 10 mL. Ekstrakti se skladište u hladnjaku do daljnje analize.

3.2.5. Stupanje degradacije alge i prinos fukoidana

Stupanje degradacije alge (% DA) izračunat je kao omjer razlike mase alge (g) koja je korištena u eksperimentu (M_0) i mase alge (g) preostale nakon ekstrakcije (M_1) i mase alge (g) koja je korištena u eksperimentu (M_0) prema jednadžbi [1]:

$$\text{DA}[\%] = \frac{M_0 - M_1}{M_0} * 100 \quad [1]$$

Prinos fukoidana (% Fuk) izračunat je kao omjer mase (g) nakon taloženja etanolom (M_T) i mase alge (g) koja je korištena u eksperimentu (M_0) prema jednadžbi [2]:

$$\text{Fuk}[\%] = \frac{M_T}{M_0} * 100 \quad [2]$$

3.2.6. Određivanje ukupnih ugljikohidrata

Princip metode:

Za određivanje koncentracije ukupnih ugljikohidrata primijenjena je fenol – sumporna metoda prema Dubois i sur. (1956). U ovoj metodi koncentrirana sumporna kiselina razgrađuje polisaharide, oligosaharide i disaharide do monosaharida. Ugljikohidrati (jednostavni šećeri, oligosaharidi, polisaharidi i njihovi derivati) reagiraju u prisutnosti jake kiseline i topline te kao produkt nastaju derivati furana koji kondenziraju s fenolom pri čemu nastaju stabilni spojevi zlatno - žutog obojenja koji se mogu mjeriti spektrofotometrijski. Za

proizvode s visokim sadržajem heksoza koristi se glukoza kao standard, a apsorpcija se mjeri na 490 nm (Nielsen, 2010).

Postupak rada:

U staklenu epruvetu otpipetira se 400 μL uzorka, 400 μL 5 %-tne otopine fenola i 2 mL koncentrirane 95 %-tne H_2SO_4 . Pri tome treba paziti da se kiselina dodaje direktno u epruvetu, bez diranja stjenki kako bi se postiglo dobro miješanje (ove reakcije su pokrenute toplinom proizvedenom dodatkom H_2SO_4 u vodeni medij). Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima otapalo korišteno u ekstrakciji. Svako mjerenje provodi se u paraleli. Nakon miješanja pomoću vortexa, epruvete se stave u vodenu kupelj na 25 °C u trajanju od 20 min. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji, mjeri se apsorbancija pri 490 nm na spektrofotometru (UV–1600 PC, 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 odmjerne 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 μL i postupa po propisu za određivanje ukupnih ugljikohidrata. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac čija jednačica [3] glasi:

$$y = 0,0092 * x + 0,0149 \quad [3]$$
$$R^2 = 0,9938$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 490 nm

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

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

3.2.7. Određivanje koncentracije ukupnih fenola

Princip metode:

Određivanje koncentracije ukupnih fenola provodilo se spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin – Ciocalteu reagensa

i nastajanjem obojenog produkta. Folin – Ciocalteu reagens (smjesa fosfomolibden i fosfomolibden kiseline) reagira s fenoksid ionom iz uzorka prilikom čega se fenoksid – ion oksidira, a Folin – Ciocalteu reagens reducira do plavo obojenih volframovih i molibdenovih oksida. Izmjereni intenzitet nastalog obojenja pri valnoj duljini 765 nm je direktno proporcionalan koncentraciji fenola (Shortle i sur., 2014).

Postupak rada:

U staklenu epruvetu otpipetira se 100 μL ekstrakta, 200 μL Folin - Ciocalteu reagensa i 2 mL destilirane vode. Nakon 3 min doda se 1 mL 20 % – tne zasićene otopine natrijeva karbonata i promiješa pomoću vortexa. Nakon termostatiranja u vodenoj kupelji 25 min na 50 $^{\circ}\text{C}$, na spektrofotometru se mjeri apsorbancija pri 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto uzorka uzima voda. Sva mjerenja su provedena u paraleli.

Izrada baždarnog pravca i izračun rezultata:

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

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

$$R^2 = 0,9995$$

gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

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

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

3.2.8. Određivanje pigmenata UV/Vis spektrofotometrijom

Princip metode:

Spektrofotometrijsko određivanje udjela klorofila a, klorofila b i karotenoida temelji se na jakim apsorpcijskim spektrima tih pigmenata. Apsorpcijski maksimumi ekstrahiranih

pigmenata uvelike ovise o vrsti otapala i, u određenoj mjeri, o tipu spektrofotometra koji se koristi (Lichtenthaler i Buschmann, 2005).

Postupak određivanja:

Kvantitativno određivanje pigmenata u acetonском ekstraktu provedeno je spektrofotometrom pri sljedećim valnim duljinama: 644,8 i 661,6 nm, za klorofil a i b i 470 nm za karotenoide. Pripremljene ekstrakte potrebno je razrijediti direktno u kivetama pomoću acetona. Svako mjerenje provedeno je u paraleli. Kao slijepa proba upotrijebljen je aceton te je apsorbanciju slijepe probe potrebno oduzeti od apsorbancije uzorka i tako dobivenavrijednost koristi se za izračunavanje konačnog rezultata.

Masene koncentracije ($\mu\text{g mL}^{-1}$) klorofila a i b te ukupnih karotenoida računaju se prema sljedećim jednadžbama (Sumanta i sur., 2014; Lichtenthaler i Buschmann, 2005):

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

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

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

A = apsorbancija, C_a = klorofil a, C_b = klorofil b, $C_{(x+c)}$ = ukupni karotenoidi

3.2.9. Određivanje suhe tvari

Princip metode:

Određivanje ukupne suhe tvari (topljive i netopljive) provodi se vaganjem početnog uzorka, sušenjem na 105 °C do konstantne mase te vaganjem ostatka nakon provedenog sušenja. Nakon toga se pomoću masa izračuna suha tvar u uzorku.

Postupak određivanja:

U osušenu aluminijsku posudicu stavi se oko 5 g kvarcnog pijeska i stakleni štapić. Nakon toga se stavi na sušenje u sušionik na temperaturu od 105 °C u trajanju od 60 min sa skinutim poklopcem. Nakon sušenja, posudica se s polupoklopljenim poklopcem hladi u eksikatoru, a zatim se izvaže s točnošću od $\pm 0,0002$ g. U ovako pripremljenu posudicu izvaže se 2,5 g pripremljenog uzorka s točnošću $\pm 0,0002$ g te se pomoću staklenog štapića dobro izmiješa s kvarcnim pijeskom. Zatim se posudica s uzorkom stavi u sušionik zagrijan na 105 °C $\pm 0,5$ °C i zagrijava 60 min 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.

Izračun rezultata:

Nakon hlađenja u eksikatoru posudice se važu te se vrši proračun za ukupnu suhu tvar pomoću sljedeće [5] formule:

$$\text{Suha tvar [\%]} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} * 100 \quad [5]$$

gdje je:

m_0 - masa posudice i pomoćnog materijala (pijesak, stakleni štapić)

m_1 - masa iste posudice s ispitivanim uzorkom prije sušenja

m_2 - masa iste posudice s ostatkom nakon sušenja

3.2.10. Statistička analiza

Eksperimentalni dizajn pokusa i statistička obrada podataka provedena je uz pomoć programskog sustava Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD). Eksperimenti su dizajnirani kao puni faktorijski dizajn. Deskriptivna statistika korištena je za izračun prosječnih vrijednosti. Kao zavisni parametri promatrani su: stupanj degradacije alge, prinos fukoidana i koncentracija ukupnih ugljikohidrata. Nezavisni parametri su bili: tehnika ekstrakcije (konvencionalna ekstrakcija, ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima), otapalo (H_2O , 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H_2SO_4 , 0,2 M H_2SO_4 i volumen otapala (15 i 30 mL). Za usporedbu uzoraka korištena je multivarijantna analiza varijance (ANOVA) s Tukey HSD post-hoc testom. Statistički značajna razlika je razmatrana na razini $p \leq 0.05$ (95 % – tni interval pouzdanosti).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Načini ekstrakcije koji se koriste za izolaciju polisaharida iz određenih uzoraka uvelike utječu na prinose, kemijsku strukturu te utječu na biološku aktivnost polisaharida (Zhu i sur., 2016; Dong i sur., 2008;).

U ovom radu provedena je ekstrakcija polisaharida fukoidana iz smeđe *alge* *Cystoseira compressa*. Ispitan je utjecaj dvije tehnike ekstrakcije od kojih je jedna klasična odnosno konvencionalna (ekstrakcija potpomognuta magnetskom miješalicom) i jedna napredna (ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima). Prije svake tehnike ekstrakcije proveden je predtretman uzorka kako bi se uklonile moguće nečistoće. Utjecaj tehnika ekstrakcije proveden je primjenom različitih otapala (H_2O , 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H_2SO_4 , 0,2 M H_2SO_4) i volumena otapala (15 i 30 mL). Također, određen je stupanj degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk) i koncentracija ukupnih ugljikohidrata, a rezultati određivanja prikazani su u tablici 3. Uz pomoć programskog sustava Statistica 8.0 određen je utjecaj svakog pojedinog ispitivanog parametra (tehnika ekstrakcije, otapalo, volumen otapala) na % DA, % Fuk i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata te su rezultati prikazani u tablici 4.

Tablica 3. Rezultati određivanja stupnja degradacije alge (% DA), prinosa fukoidana (% Fuk) i koncentracije ukupnih ugljikohidrata u ekstraktima smeđe alge *Cystoseira compressa* dobivenih konvencionalnom ekstrakcijom (KE) i ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima (MAE)

Tehnika ekstrakcije	Otapalo	Volumen otapala (mL)	% DA	% Fuk	Ukupni ugljikohidrati (mg g ⁻¹)
KE	H ₂ O	15	19,56 ± 0,03	4,23 ± 0,01	0,44 ± 0,01
KE	H ₂ O	30	21,78 ± 0,08	5,75 ± 0,04	2,60 ± 0,11
KE	0,1 M HCl	15	36,06 ± 0,06	6,83 ± 0,04	9,27 ± 0,10
KE	0,1 M HCl	30	45,00 ± 0,07	8,32 ± 0,01	21,95 ± 0,12
KE	0,2 M HCl	15	43,95 ± 0,21	8,77 ± 0,04	31,79 ± 2,21
KE	0,2 M HCl	30	41,87 ± 0,06	3,23 ± 0,03	45,24 ± 0,65
KE	0,1 M H ₂ SO ₄	15	19,62 ± 0,03	7,29 ± 0,04	14,83 ± 0,74
KE	0,1 M H ₂ SO ₄	30	36,49 ± 0,07	24,33 ± 0,07	56,44 ± 1,07
KE	0,2 M H ₂ SO ₄	15	19,71 ± 0,01	9,13 ± 0,03	12,99 ± 0,34
KE	0,2 M H ₂ SO ₄	30	39,03 ± 0,03	24,47 ± 0,03	73,15 ± 1,79
MAE	H ₂ O	15	11,32 ± 0,06	2,88 ± 0,03	0,41 ± 0,02
MAE	H ₂ O	30	7,87 ± 0,07	4,82 ± 0,06	1,93 ± 0,03
MAE	0,1 M HCl	15	18,93 ± 0,07	6,95 ± 0,03	3,14 ± 0,07
MAE	0,1 M HCl	30	26,58 ± 0,06	6,24 ± 0,03	29,68 ± 0,36
MAE	0,2 M HCl	15	25,31 ± 0,06	4,34 ± 0,06	18,03 ± 0,25
MAE	0,2 M HCl	30	38,54 ± 0,03	2,75 ± 0,01	35,30 ± 1,01
MAE	0,1 M H ₂ SO ₄	15	18,73 ± 0,04	10,25 ± 0,07	22,04 ± 0,18
MAE	0,1 M H ₂ SO ₄	30	32,07 ± 0,05	22,41 ± 0,06	27,06 ± 0,52
MAE	0,2 M H ₂ SO ₄	15	21,81 ± 0,06	13,17 ± 0,03	14,97 ± 0,75
MAE	0,2 M H ₂ SO ₄	30	31,52 ± 0,06	24,96 ± 0,03	32,94 ± 1,05

Tablica 4. Utjecaj različitih parametara ekstrakcije (tehnika ekstrakcije, otapalo, volumen otapala) na postotak degradacije alge (% DA), prinos fukoidana (% Fuk) i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata*

	N	% DA	% Fuk	Ukupni ugljikohidrati (mg g ⁻¹)
Tehnika ekstrakcije		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
KE	20	$32,31 \pm 0,04^a$	$10,24 \pm 0,00^b$	$26,87 \pm 0,18^b$
MAE	20	$23,26 \pm 0,04^b$	$9,88 \pm 0,00^a$	$18,55 \pm 0,18^a$
Otapalo		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
H ₂ O	8	$15,13 \pm 0,06^e$	$4,42 \pm 0,00^a$	$1,34 \pm 0,29^a$
0,1 M HCl	8	$31,64 \pm 0,06^b$	$7,11 \pm 0,00^c$	$16,01 \pm 0,29^b$
0,2 M HCl	8	$37,42 \pm 0,06^a$	$4,80 \pm 0,00^b$	$32,59 \pm 0,29^d$
0,1 M H ₂ SO ₄	8	$26,73 \pm 0,06^d$	$16,10 \pm 0,00^d$	$30,09 \pm 0,29^c$
0,2 M H ₂ SO ₄	8	$28,02 \pm 0,06^c$	$17,96 \pm 0,00^e$	$33,51 \pm 0,29^d$
Volumen otapala (mL)		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
15	20	$23,50 \pm 0,04^b$	$7,38 \pm 0,00^a$	$12,79 \pm 0,18^a$
30	20	$32,07 \pm 0,04^a$	$12,73 \pm 0,00^b$	$32,63 \pm 0,18^b$
Tehnika ekstrakcije; otapalo		$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$	$p \leq 0,00^{\dagger}$
KE; H ₂ O	4	$20,67 \pm 0,09^i$	$4,99 \pm 0,02^c$	$1,52 \pm 0,41^a$
KE; 0,1 M HCl	4	$40,53 \pm 0,09^b$	$7,58 \pm 0,02^f$	$15,61 \pm 0,41^b$
KE; 0,2 M HCl	4	$42,91 \pm 0,09^a$	$6,00 \pm 0,02^d$	$38,51 \pm 0,41^d$
KE; 0,1 M H ₂ SO ₄	4	$28,06 \pm 0,09^e$	$15,81 \pm 0,02^g$	$35,63 \pm 0,41^d$
KE; 0,2 M H ₂ SO ₄	4	$29,37 \pm 0,09^d$	$16,80 \pm 0,02^i$	$43,07 \pm 0,41^e$
MAE; H ₂ O	4	$9,60 \pm 0,09^j$	$3,85 \pm 0,02^b$	$1,17 \pm 0,41^a$
MAE; 0,1 M HCl	4	$22,76 \pm 0,09^h$	$6,60 \pm 0,02^e$	$16,41 \pm 0,41^b$
MAE; 0,2 M HCl	4	$31,93 \pm 0,09^c$	$3,54 \pm 0,02^a$	$26,67 \pm 0,41^c$
MAE; 0,1 M H ₂ SO ₄	4	$25,40 \pm 0,09^g$	$16,33 \pm 0,02^h$	$24,55 \pm 0,41^c$
MAE; 0,2 M H ₂ SO ₄	4	$26,67 \pm 0,09^f$	$19,06 \pm 0,02^j$	$23,95 \pm 0,41^c$
Prosječna vrijednost	40	27,79	10,06	22,71

KE – konvencionalna ekstrakcija; MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima

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

† Statistički značajni parametar kod $p \leq 0,05$; vrijednosti s različitim slovom su statistički značajne kod $p \leq 0,05$.

U tablici 4 prikazan je utjecaj različitih parametara ekstrakcije na % DA, % Fuk i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Svi ispitivani parametri su pojedinačno i kombinirano statistički značajni kod $p \leq 0,05$. Prosječna vrijednost % DA iznosila je 27,79 %, % Fuk 10,06 %, a koncentracija ukupnih ugljikohidrata 22,71 mg g⁻¹. Ovi rezultati u suglasju su i s rezultatima koje su objavili Dobrinčić i sur. (2021) prilikom određivanja prinosa fukoidana i ukupnih ugljikohidrata u smeđoj algi *Fucus virsoides* gdje je prosječna vrijednost ukupnih ugljikohidrata iznosila 25, 67 %, a prinos fukoidana 15, 07 %. Osim toga, Dobrinčić i sur. (2021) u istom istraživanju određivali su prinos fukoidana i ukupnih ugljikohidrata u smeđoj algi *Cystoseira barbata* gdje je prosječna vrijednost ukupnih ugljikohidrata iznosila 5,81 %, a prinos fukoidana 7,80 % što je niže u odnosu na prosječne vrijednosti dobivene ovim

istraživanjem na algi *Cystoseira compressa*. Navedene razlike mogu biti posljedica nekoliko čimbenika uključujući vrste algi, vrijeme sakupljanja algi te različite metode ekstrakcije koje su se koristile (Garcia-Rios i sur., 2012).

Rodriguez-Jasso i sur. (2011) su u svom radu proveli ekstrakciju polisaharida iz smeđe alge *Fucus vesiculosus* koristeći MAE te su određivali % DA, % Fuk i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata. Rezultati su pokazali da je % Fuk u algi 18,22 % što je više u odnosu na prosječne vrijednosti koje sadrži *Cystoseira compressa*. I koncentracija ukupnih ugljikohidrata u algi *Fucus vesiculosus* je veća u odnosu na prosječne vrijednosti koje sadrži *Cystoseira compressa*. Osim vrste alge, razlog tome može biti razdoblje u kojem se alga sakupljala u svrhu istraživanja; *Fucus vesiculosus* je sakupljan tijekom rujna dok je *Cystoseira compressa* izronjena u veljači. S obzirom da alge stvaraju svoju rezervu hrane tijekom brze faze rasta u proljeće kako bi preživjele zimu, tako je koncentracija ukupnih ugljikohidrata kod alge *Fucus vesiculosus* veća nego kod *Cystoseira compressa*. Kao posljedica toga veća količina polisaharida u algi nalazi se tijekom zimske sezone (Rodriguez-Jasso i sur., 2011).

4.1. UTJECAJ TEHNIKE EKSTRAKCIJE NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

Brojna istraživanja su pokazala da primjena određene metode ekstrakcije ima veliki utjecaj na kemijsku strukturu i biološku aktivnost polisaharida (Dong i sur., 2016; Zhu i sur., 2016). Sulfatirani polisaharidi obično se ekstrahiraju pomoću vruće vode te razrijeđenih kiselina ili lužina pri čemu se koriste veliki volumeni otapala i dugo vrijeme ekstrakcije (Marais i Joseleau, 2001). Konvencionalne metode ekstrakcije iako pogodne za ekstrakciju polisaharida, pokazale su i neke nedostatke (dugotrajan proces ekstrakcije, zahtjev za visokim temperaturama, niska učinkovitost ekstrakcije) zbog kojih se sve više koriste napredne tehnike ekstrakcije. Od naprednih metoda ona koja se najčešće koristi za ekstrakciju polisaharida iz algi je ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (MAE). U usporedbi s KE koje se koriste, prednosti MAE su kratko vrijeme ekstrakcije, niska potrošnja energije, niski troškovi te visoka učinkovitost (Xu, 2017). Prema rezultatima iz tablice 4 možemo zaključiti da je tehnika ekstrakcije bila statistički značajan parametar za % Fuk, % DA te koncentraciju ukupnih ugljikohidrata.

4.1.1. Utjecaj tehnike ekstrakcije na prinos fukoidana

Iz tablice 4 je vidljivo da je % Fuk koji je ekstrahirano iz alge *Cystoseira compressa* veći kod KE i iznosi 10,24 % u odnosu na MAE gdje iznosi 9,88 %. Usporedbom KE i MAE na algi *Ascophyllum nodosum*, Yuan i Macquarrie (2015a) dobili su veći % Fuk primjenom KE (20,98 %) nego MAE (16,08 %). S druge strane, sličan % Fuk postignut je primjenom MAE i KE kod *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* (Dobrinčić i sur., 2021). Navedeni rezultati se razlikuju od rezultata ovog istraživanja provedenog na smeđoj algi *Cystoseira compressa*, ali u obzir treba uzeti i druge parametre ekstrakcije čijom kombinacijom je moguće utvrditi optimalne uvjete za ekstrakciju. Osim samog mehanizma zagrijavanja, ove dvije tehnike ekstrakcije razlikuju se u vremenu trajanja ekstrakcije i primijenjenoj temperaturi ekstrakcije. Kod KE vrijeme ekstrakcije iznosi 4 h, a kod MAE 15 min. Ovi rezultati navode nas na zaključak da duže vrijeme KE daje veći % Fuk odnosno da je 15 min kod MAE prekratko vrijeme ekstrakcije za postizanje većih prinosa. Duža ekstrakcija znači veću količinu ekstrahirane tvari, ali i veću mogućnost razgradnje kemijske strukture zbog čega je jako važno odrediti optimalno vrijeme ekstrakcije (Favretto, 2004). Također, važan faktor u procesu ekstrakcije je i temperatura koja kod KE iznosi 60 °C, dok je kod MAE korištena temperatura 100 °C. Vrijeme i temperatura ekstrakcije potpomognute mirkovalovima koji su korišteni u ovom istraživanju rezultat su istraživanja Jurić (2019) u kojem je najviši prinos fukoidana iz alge *Cystoseira compressa* dobiven pri 100 °C i vremenu od 15 min.

4.1.2. Utjecaj tehnike ekstrakcije na degradaciju alge

Usporedbom KE i MAE iz tablice 4 je vidljivo da je veća vrijednost % DA postignuta kod KE te iznosi 32,31 %, a manja kod MAE te iznosi 23,26 %. Budući da je poželjna što manja vrijednost % DA može se zaključiti da je primjena mikrovalova bolja tehnika ekstrakcije. Ove dvije različite tehnike ekstrakcije koriste različito vrijeme i temperaturu što uvelike utječe na degradaciju alge. Povišenjem temperature dolazi do narušavanja strukture i degradacije spojeva koji su termolabilni (Chen i sur., 2005). Možemo primijetiti da kraće vrijeme kod MAE uzrokuje manju degradaciju alge dok je dugotrajna KE uzrokovala značajno veću degradaciju. Rodriguez-Jasso i sur. (2011) su u svom istraživanju koristili MAE za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *Fucus vesiculosus* te su određivali postotak degradacije alge koji je najviši bio pri temperaturi 172 °C i vremenu 31 min te je iznosio 67,98 % što je značajno više od vrijednosti dobivenih ovim istraživanjem.

4.1.3. Utjecaj tehnike ekstrakcije na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Iz tablice 4 je vidljivo da je veća koncentracija ukupnih ugljikohidrata zabilježena kod KE i iznosi 26,87 mg g⁻¹. Duže vrijeme KE pogoduje boljem prinosu ukupnih ugljikohidrata za razliku od kraće MAE gdje je ukupna koncentracija ugljikohidrata manja i iznosi 18,55 mg g⁻¹. Yuan i Macquarrie (2015a) su u svom istraživanju utvrdili da razlika u vremenu ekstrakcije ima utjecaj na prinos ugljikohidrata. Proveli su ekstrakciju u trajanju od 5, 15 i 30 min te rezultati pokazuju da pri vremenu od 5 min koncentracija ukupnih ugljikohidrata ne prelazi 45 mg mL⁻¹ dok se pri vremenu ekstrakcije od 30 min prinos ugljikohidrata povećava i do 80 mg mL⁻¹.

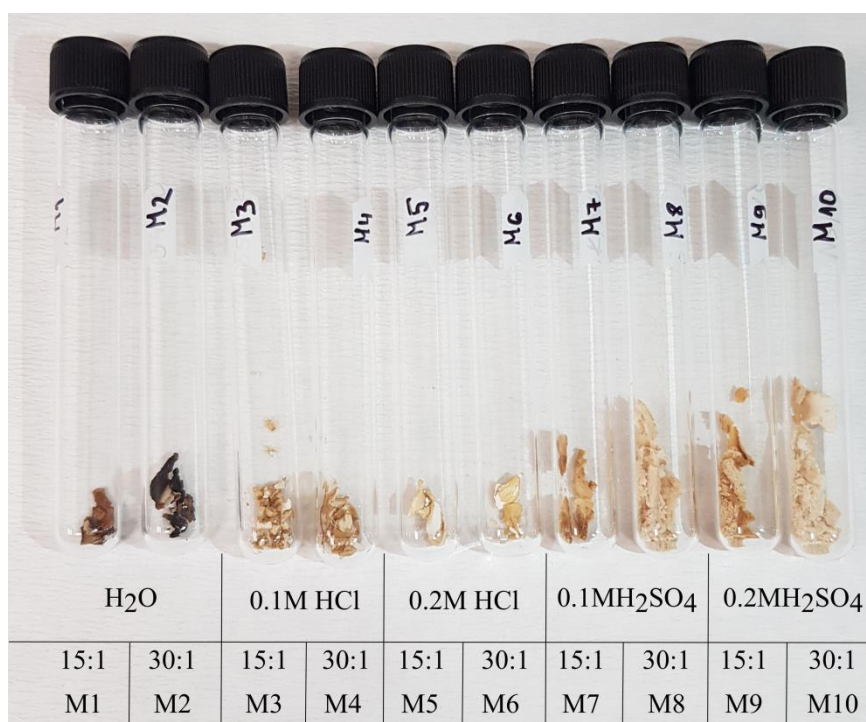
4.2. UTJECAJ OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

Kao što je već prethodno navedeno, KE se temelji na upotrebi različitih organskih otapala u kombinaciji s grijanjem i/ili miješanjem s ciljem ekstrakcije željene komponente iz smjese. Otapala koja se najčešće koriste za ekstrakciju polisaharida iz morskih algi su voda i razrijeđene otopine kiselina ili baze. U ovom radu istražen je utjecaj različitih otapala (H₂O, 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M Na_2CO_3 i 0,2 M H₂SO₄) i njihovih volumena (15 i 30 mL), u odnosu na 1 g uzorka, na ekstrakciju polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira compressa* te su rezultati prikazani u tablici 4.

4.2.1. Utjecaj otapala na prinos fukoidana

U tablici 4 je vidljivo da je najmanji % Fuk od 4,42 % postignut primjenom vode kao otapala. Voda je polarna molekula i djeluje kao polarno otapalo. Kada se koristi kao otapalo, spojevi koji su prisutni u algi i topivi su u vodi, mogu koekstrahirati što zahtijeva više koraka pročišćavanja nakon ekstrakcije. Najveći prinos fukoidana od 17,96 % postignut je primjenom 0,2 M H₂SO₄. Korištenje kiseline kao otapala pokazalo se učinkovitim za poboljšanje prinosa jer omogućuje hidrolizu stanične stijenke i ekstrakciju polisaharida iz matriksa (Fletcher i sur., 2017). Jednak trend zabilježen je u istraživanju Dobrinčić i sur. (2021) prilikom ekstrakcije fukoidana iz algi *Fucus virsoides* i *Cystoseira barbata* gdje je najniži prinos polisaharida postignut primjenom vode kao otapala dok je primjena kiseline rezultirala značajno višim prinosom polisaharida. Također, veći % Fuk dobiven je iz smeđe morske alge *Sargassum fusiforme* primjenom kiseline kao otapala nego kad se kao otapalo koristila voda (Liu i sur., 2019).

Nadalje, iz slike 7 može se uočiti da je fukoidan ekstrahirani kiselinama svjetlije boje u odnosu na uzorak fukoidana koji je ekstrahirani destiliranom vodom. Svjetlija boja ekstrakta fukoidana ukazuje na njegovu višu čistoću, a time i veću kvalitetu (Baba i sur., 2018). Smeđa boja polisaharida ekstrahiranih s vodom ukazuje na prisutnost pigmenata smeđih algi (fukoksantin, β -karoten, violaksantin, klorofil a i c) koji su koekstrahirali u polisaharidima tijekom procesa ekstrakcije (Saepudin i sur., 2017). Stoga možemo zaključiti da je boja uzorka pokazatelj kvalitete uzorka. Sličan rezultat zabilježen je i u ekstrakciji polisaharida iz algi *Cystoseira barbata* i *Fucus virsoides* uz primjenu različitih otapala (H_2O , 0,1 M HCl, i 0,1 M H_2SO_4) (Dobrinčić i sur., 2021).



Slika 7. Ekstrakti fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira compressa* dobiveni ekstrakcijom mikrovalovima uz primjenu različitih otapala (H_2O , 0,1 M HCl, 0,2 M HCl, 0,1 M H_2SO_4 i 0,2 M H_2SO_4) te omjera volumena otapala i uzorka (15:1 i 30:1 mL g^{-1})

4.2.2. Utjecaj otapala na degradaciju alge

Najmanja vrijednost degradacije alge, ujedno i najpoželjnija, zabilježena je primjenom vode kao otapala i iznosi 15,13 %. Najveći postotak degradacije alge iznosio je 37,42 % kad se kao otapalo koristio 0,2 M HCl. Primjenom kiseline dolazi do hidrolize stanične stijenke što omogućava ekstrakciju fukoidana, ali istovremeno se i narušava struktura alge (Lim i sur., 2016).

4.2.3. Utjecaj otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Prosječna vrijednost koncentracije ukupnih ugljikohidrata iznosi 22,71 mg g⁻¹. Približno jednake vrijednosti dobili su Dobrinčić i sur. (2021) prilikom određivanja koncentracije ukupnih ugljikohidrata iz smeđe alge *Fucus virsoides* gdje je prosječna vrijednost iznosila 25,67 %, a kod *Cystoseira barbata* 5,81 %. Kada govorimo o najvećoj koncentraciji ukupnih ugljikohidrata, iz Tablice 4. je vidljivo da nije zabilježena statistički značajna razlika kada se kao otapalo koristi 0,2 M HCl (32,59 mg g⁻¹) ili 0,2 M H₂SO₄ (33,51 mg g⁻¹). S druge strane, koncentracija ukupnih ugljikohidrata najmanja je kada se kao otapalo koristi voda i iznosi 1,34 mg g⁻¹. U istraživanju Sun i sur. (2018) zabilježeni su veći prinosi ugljikohidrata prilikom ekstrakcije u kiselim uvjetima u odnosu na ekstrakciju destiliranom vodom što je u skladu s našim rezultatima. Budući da se glikozidne veze hidroliziraju kiselinama lakše nego destiliranom vodom, očekivano je da će se dobiti veći sadržaj ukupnih ugljikohidrata s kiselinom kao otapalom (Saravana i sur., 2016).

4.3. UTJECAJ VOLUMENA OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

4.3.1. Utjecaj volumena otapala na prinos fukoidana

Za ekstrakciju fukoidana iz smeđe alge *Cystoseira compressa* korištena su različita otapala i volumen otapala od 15 i 30 mL uz konstantnu masu uzorka 1 g te su rezultati prikazani u Tablici 4. U ovom istraživanju povećanjem volumena sa 15 mL na 30 mL, uz konstantnu masu uzorka, % Fuk se povećao sa 7,38 % na 12,73 %. U istraživanju Rodriguez-Jasso i sur. (2011) smanjenjem mase uzorka s 5 g na 1 g uz konstantan volumen od 25 mL, % Fuk se povećao. Preveliki volumen otapala može uzrokovati loše mikrovalno zagrijavanje jer otapalo apsorbira mikrovalno zračenje pa je iz tog razloga potrebno uložiti dodatnu snagu (Chan i sur., 2011). S druge strane, premali volumen otapala predstavlja barijeru za prijenos mase budući da su bioaktivni spojevi koncentrirani u određenim regijama što ograničava njihovo kretanje izvan staničnog matriksa. Optimalan omjer otapala i mase uzorka preduvjet je za homogeno i učinkovito zagrijavanje.

4.3.2. Utjecaj volumena otapala na postotak degradacije alge

Postotak degradacije alge pri volumenu otapala od 15 mL iznosi 23,50 % dok je pri volumenu od 30 mL % DA veći i iznosi 32,07 %. Primjenom manjeg volumena otapala postignuta je

manja vrijednost degradacije alge, vjerojatno jer veći volumen otapala znači i veću dodirnu površinu te veću šansu da dodje do kontakta odnosno veće degradacije alge što nije poželjno.

4.3.3. Utjecaj volumena otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Iz tablice 4 je vidljivo da je zabilježen značajan porast koncentracije ukupnih ugljikohidrata porastom volumena otapala. Koncentracija ukupnih ugljikohidrata pri volumenu od 30 mL iznosi 32,63 mg g⁻¹, a pri volumenu 15 mL iznosi 12,79 mg g⁻¹.

4.4. UTJECAJ KOMBINACIJE TEHNIKE EKSTRAKCIJE I OTAPALA NA PRINOS FUKOIDANA, DEGRADACIJU ALGE I KONCENTRACIJU UKUPNIH UGLJIKOHIDRATA

4.4.1. Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na prinos fukoidana

Iz tablice 4 je vidljivo da izbor otapala ima značajan utjecaj na ekstrakciju fukoidana i kod KE i MAE te da je neovisno o tehnici ekstrakcije najveći % Fuk postignut primjenom 0,2 M H₂SO₄, a najmanji primjenom H₂O. Voda je uzrokovala najmanju ekstrakciju fukoidana te ekstrakte najniže čistoće zbog koekstrakcije spojeva topivih u vodi, što je već prethodno spomenuto.

4.4.2. Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na degradaciju alge

Usporedbom utjecaja kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na % DA može se vidjeti da je voda uzrokovala najmanju degradaciju alge, posebno kod MAE gdje iznosi 9,60 % dok kod KE degradacija alge uz vodu kao otapalo iznosi 20,67 %. S druge strane, u odnosu na vodu, najveću degradaciju alge i kod KE i MAE uzrokovala je 0,2 M HCl, i to dva puta veću degradaciju kod KE (42,91 %) i tri puta veću degradaciju kod MAE (31,93 %). Kiselina kao otapalo uzrokuje hidrolizu stanične stijenke što omogućava ekstrakciju fukoidana, ali istovremeno narušava strukturu alge (Lim i sur., 2016). Stoga možemo zaključiti da je niža degradacija alge primjenom MAE uz vodu kao ekstrakcijsko otapalo.

4.4.3. Utjecaj kombinacije tehnike ekstrakcije i otapala na koncentraciju ukupnih ugljikohidrata

Najveća koncentracija ugljikohidrata zabilježena je kod KE uz 0,2 M H₂SO₄ kao otapalo i iznosi 43,07 mg g⁻¹. Iz tablice 4 može se vidjeti da je najmanja koncentracija ukupnih ugljikohidrata postignuta uz vodu kao otapalo bez obzira na tehniku ekstrakcije. Ekstrakcijom potpomognutom mikrovalovima uz 0,2 M HCl, 0,1 M H₂SO₄ i 0,2 M H₂SO₄ kao otapala postignuta je najveća koncentracija ukupnih ugljikohidrata, ali bez statistički značajne razlike

među njima. Rezultati su u skladu s dosadašnjim istraživanjima da se ugljikohidrati bolje ekstrahiraju u kiseline (Sun i sur., 2018).

4.5. ANALIZA EKSTRAKTA IZ PREDTRETMANA

Predtretman je korak koji prethodi ekstrakciji čijim se postupkom uklanjaju spojevi niske molekulske mase poput polifenola, lipida i pigmenata. Važno ga je provesti jer se na taj način sprječava koekstrakcija tih interferirajućih bioaktivnih spojeva koje alga sadrži te olakšava ekstrakcija polisaharida (Dobrinčić i sur., 2020). Filtrat koji je zaostao iz predtretmana iskorišten je za određivanje koncentracije ukupnih fenola i pigmenata koje sadrži alga *Cystoseira compressa*. UV/Vis spektrofotometrijom određeni su udjeli ukupnih fenola, klorofila a, klorofila b te ukupnih karotenoida. Dobiveni rezultati prikazani su u tablicama 5 i 6.

4.5.1. Koncentracija ukupnih fenola

Zelene i crvene alge sadrže niže koncentracije fenolnih spojeva od smeđih algi, što je i glavni razlog da su fenolni spojevi u smeđim algama podvrgnuti brojnim istraživanjima. Fenoli se najčešće u uzorcima detektiraju spektrometrijskim, biološkim i analitičkim tehnikama (Jimenez-Lopez i sur., 2021). U ovom radu, koncentracija ukupnih fenola određivana je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na oksidaciji fenolnih skupina dodatkom Folin-Ciocalteu reagensa i nastajanjem obojenog produkta. Postupak sukcesivne ekstrakcije proveden je u tri koraka: primjenom acetona pri sobnoj temperaturi, primjenom 80 % etanola pri sobnoj temperaturi i na kraju primjenom 80 % etanola pri 60 °C. Iz tablice 5 možemo vidjeti da je najveća prosječna vrijednost dobivena u ekstraktu s 80 %-tnim etanolom na sobnoj temperaturi te iznosi 19,05 mg g⁻¹. U ekstraktu dobivenom s 80 %-tnim etanolom na 60 °C ta je vrijednost manja te iznosi 6,06 mg g⁻¹ dok je najmanja vrijednost od 2,98 mg g⁻¹ dobivena u ekstraktu s acetonom. Rezultati su u skladu s istraživanjima budući da su polifenoli bolje topivi u otapalima veće polarnosti (80 %-tni etanol) (Dobrinčić i sur., 2021). Udio ukupnih polifenola u ovoj algi predstavlja zbroj polifenola iz svih sukcesivnih koraka ekstrakcije koji iznosi 28,09 mg g⁻¹. Iz rezultata je vidljivo da je izbor otapala ključan parametar za ekstrakciju ukupnih fenola. Obzirom da su polifenolni spojevi uglavnom polarni, jako polarna otapala (kao što je voda) i nepolarna otapala (npr. etil acetat) nisu pogodna za njihovu ekstrakciju. Ekološki najprihvatljivija otapala koja se koriste su voda i vodene otopine alkohola, odnosno vodene otopine etanola su se pokazale učinkovitijima prilikom ekstrakcije od jednokomponentnog sustava otapala, posebice 50 %-tna vodena otopina etanola (Bucić-Kojić i sur, 2009). Upotreba vode u kombinaciji s alkoholom dovodi do povećanog bubrenja

biljnog materijala što omogućuje jače prodiranje otapala u uzorak, povećava se kontaktna površina između uzorka i otapala te samim time poboljšava učinak ekstrakcije (Rafiee i sur., 2011). U ovom radu se kao otapalo koristio 80 %-tni aceton.

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

OTAPALO	UKUPNI FENOLI $\pm$ S.D. (mg g^{-1})
Aceton (sobna temperatura)	$2,98 \pm 0,15$
80 % etanol (sobna temperatura)	$19,05 \pm 0,09$
80 % etanol (60 °C)	$6,06 \pm 0,13$
UKUPNO	$28,09 \pm 0,37$

Güner i sur. (2015) u svom radu su određivali ukupne fenole u ekstraktu smeđe alge *Cystoseira compressa*. Uzorak ekstrahiran s heksanom imao je najveću koncentraciju ukupnih fenola ($1,541 \text{ mg GA g}^{-1}$ s.tv.) dok je uzorak ekstrahiran s kloroformom imao najmanju koncentraciju ukupnih fenola ($0,454 \text{ mg GA g}^{-1}$ s.tv.).

Chkhikvishvili i Ramazanov (2000) istraživali su sastav i sadržaj ukupnih fenola i njihovu antioksidacijsku aktivnost u 14 vrsta smeđih morskih algi koje su sakupljene na području Kanarskih otoka. Fenolni spojevi ekstrahirani su 70 % vodenom otopinom metanola i najveći sadržaj fenolnih spojeva utvrđen je u smeđoj algi *Cystoseira compressa* (4,83 % suhe mase) i *Sargassum furcatum* (2,97 % suhe mase).

Nadalje, Ferreres i sur. (2012) u svom radu su proveli HPLC analizu pročišćenih ekstrakata florotanina iz četiri vrste smeđih algi (*Cystoseira nodicauli*, *Cystoseira tamariscifolia*, *Cystoseira usneoides* i *Fucus spiralis*) te su identificirali nekoliko spojeva poput fukofloroetola, fukodifloroetola i drugih.

4.5.2. Koncentracija pigmenata

Budući da smeđe alge predstavljaju bogat izvor pigmenata, sve je veći interes industrije za njima kao sirovinama pa iz tog razloga i raste broj istraživanja koja potvrđuju njihova važna svojstva i učinke. Postupak predtretmana proveden je u 3 sukcesivna koraka: primjenom acetona na sobnoj temperaturi, primjenom 80 % etanola na sobnoj temperaturi te primjenom 80% etanola na 60 °C. Koncentracije pigmenata (klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida) u algi *Cystoseira compressa* određene su UV/Vis spektrofotometrijom u acetonskim ekstraktima iz prvog koraka predtretmana dok u ekstraktima dobivenim 80 %-

tnim etanolom spektrofotometrijsko određivanje pigmenata nije bilo moguće zbog nedostatka odgovarajućih jednadžbi.

Tablica 6. Spektrofotometrijsko određivanje pigmenata klorofila a, klorofila b i ukupnih karotenoida u ekstraktima dobivenim uz aceton kao otapalo

Klorofil-a (mg g ⁻¹)	Klorofil-b (mg g ⁻¹)	Ukupni karotenoidi (mg g ⁻¹)
0,55 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,24 ± 0,00

Iz rezultata prikazanih u tablici 6 može se uočiti da je koncentracija klorofila a 0,55 mg g⁻¹, klorofila b 0,05 mg g⁻¹ te ukupnih karotenoida 0,24 mg g⁻¹. Prisutnost dominantnih pigmenata ksantofila i fukoksantina odgovorna je za smeđu boju algi tj. fukoksantin je prisutan u dovoljnoj količini da prikriva zelenu boju klorofila što im daje odgovarajuće smeđe obojenje (Kumar i Singh, 1979). U istraživanju koje je provedeno na algi *Cystoseira compressa* uz 80 % aceton kao otapalo određene su sljedeće koncentracije pigmenata: klorofil a 1,30 mg g⁻¹, klorofil b 0,04 mg g⁻¹ i ukupni karotenoidi 0,68 mg g⁻¹ (Jujnović, 2019). Etanol kao otapalo u ubrzanoj ekstrakciji otapalima pri povišenom tlaku rezultirao je koncentracijom klorofila a 1,47 mg g⁻¹, klorofila b 0,39 mg g⁻¹ te ukupnih karotenoida 0,54 mg g⁻¹ iz alge *Cystoseira compressa* (Matanić, 2018). Razlika u rezultatima može biti posljedica upotrebe dvije različite vrste otapala, ali i različitih tehnika ekstrakcije. U ovom istraživanju kao otapalo korišten je čisti aceton koji se pokazao kao učinkovito otapalo za ekstrakciju klorofila a i karotenoida, što su također u svom radu potvrdili i Pardilho i sur. (2020).

5. ZAKLJUČCI

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

1. Smeđa alga *Cystoseira compressa* je dobar izvor sulfatiranog polisaharida fukoidana s prosječnom vrijednošću prinosa fukoidana od 10,06 %. Na ekstrakcijski prinos te na degradaciju alge i koncentraciju ukupnih ugljikohidrata imala je utjecaj tehnika ekstrakcije te različiti ekstrakcijski parametri (otapalo i omjera uzorka i otapala).
2. Primjenom KE postignut je nešto veći (10,24 %) prinos fukoidana i koncentracija ukupnih ugljikohidrata (26,87 mg g⁻¹) iz alge *Cystoseira compressa* u odnosu na MAE (9,88 % odnosno koncentracija ukupnih ugljikohidrata 18,55 mg g⁻¹), ali je primjenom MAE degradacija alge manja (23,26 %) kao i vrijeme ekstrakcije značajno kraće (15 min) što je poželjno s ekološkog i ekonomskog stajališta. Prekratko vrijeme MAE je vjerojatno razlog za postizanje nižih % Fuk i koncentracije ukupnih ugljikohidrata, ali i manje % DA. Najveći % Fuk (17,96 %) postignut je primjenom 0,2 M H₂SO₄, a najmanji primjenom vode kao otapala (4,42 %) kao i vrijednosti % DA (15,13 %) i koncentracije ukupnih ugljikohidrata (1,34 mg g⁻¹). Kiselina je učinkovitije otapalo od vode za poboljšanje prinosa jer omogućuje hidrolizu stanične stijenke i ekstrakciju polisaharida iz matriksa, a dobiveni ekstrakti su svjetlije boje što upućuje na njihovu veću čistoću.
3. Povećanjem volumena otapala s 15 mL na 30 mL, uz konstantnu masu uzorka, % Fuk se povećao sa 7,38 % na 12,73 %, % DA s 23,50 % na 32,07 %, koncentracija ukupnih ugljikohidrata s 12,79 mg g⁻¹ na 32,63 mg g⁻¹.
4. U uzorku ekstrahiranom na sobnoj temperaturi s 80 %-tnim etanolom određena je najveća koncentracija ukupnih fenola (19,05 mg g⁻¹), a najmanja u acetonskom ekstraktu (2,98 mg g⁻¹). U acetonskom ekstraktu iz predtretmana koncentracija pigmenta klorofila a iznosila je 0,55 mg g⁻¹, klorofila b 0,05 mg g⁻¹ te ukupnih karotenoida 0,24 mg g⁻¹ što je ukupno 28,09 mg g⁻¹.

6. LITERATURA

1. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS (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. <https://doi.org/10.3390/md9102106>
2. Amico V (1995) Marine brown algae of family *Cystoseiraceae*: chemistry and chemotaxonomy. *Phytochemistry* **39**, 1257-1279. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00199-H](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00199-H)
3. Anbuechezchian R, Karuppiiah V, Li Z (2015) Prospect od Marine Algae for Production of Industrially Important Chemicals. U: Das D (ured.) *Algal Biorefinery: An Intergated Approach*, Springer, Cham.
4. Antit M, Daoulatli A, Rueda J, Salas C (2013) Temporal variation of the algae-associated molluscan assemblage of artificial substrata in Bay of Tunis (Tunisia). *Medit. Mar. Sc* **14** (2), 390-402. <https://doi.org/10.12681/mms.379>
5. Baba BM, Mustapha WAW, Joe LS (2018) Effect of extraction methods on the yield, fucose content and purity of fucoidan from *Sargassum* sp. obtained from Pulau Langkawi, Malaysia. *Malaysian Journal of Analytical Sciences* **22**(1), 87–94. <https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2201-11>
6. Bold HC, Wynne MJ (1985) *Introduction to the algae structure and reproduction*, 2.izd., Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, SAD, 07632, str.1-33.
7. Bucić-Kojić A, Planinić M, Tomas S, Jakobek L, Seruga M (2009) Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *Int.J.FoodSci.Technol* **44**, 2394–2401. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2008.01876.x>
8. Bux F (2013) *Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
9. Castro P, Huber ME (2005) *Marine Biology*, 5. izd., McGraw-Hill, Higher Education Inc., New York.
10. Chan C-H, Yusoff R, Ngoh GC, Kung FWL (2011) Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A* **1218**(37), 6213–6225. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>

11. Chen XQ, Liu Q, Jiang XY, Zeng F (2005) Microwave-assisted extraction of polysaccharides from *Solanum nigrum*. *J. Cent. South Univ. T* **12**, 556–560. <https://doi.org/10.1007/S11771-005-0122-X>
12. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SM, McDowell RA, Shashkov AS, Nifant'ev NE, Khatuntseva EA, Usov AI (1999) A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr. Res* **320**, 108-119. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00148-2](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00148-2)
13. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Reason AJ, Haslam SM, McDowell RA, Chizhov OS, Usov AI (1998) Structural analysis of laminarans by MALDI and FAB mass spectrometry. *Carbohydr. Res* **310**, 203-210. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00177-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00177-3)
14. Chkhikvishvili ID, Ramazanov ZM (2000) Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl. Biochem. Microbiol* **36**, 289. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02742582>
15. Cumashi A, Ushakova NA, Preobrazhenskaya, ME, D'Incecco A, Piccoli A, Totani L, Tinari N, Morozovich GE, Berman AE, Bilan MI, Usov AI, Ustyuzhanina NE, Grachev AA, Sanderson CJ, Kelly M, Rabinovich GA, Iacobelli S, Nifantiev NE (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology* **5**, 541-552. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwm014>
16. Cunha L, Grenha A (2016) Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. A review: *Mar. Drugs* **14**, 42. <https://doi.org/10.3390/md14030042>
17. 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. <https://doi.org/10.3390/md18030168>
18. Dobrinčić A, Dobrosravić E, Pedisić S, Balbino S, Elez Garofulić I, Čož-Rakovac R, Dragović-Uzelac V (2021) The effectiveness of the *Fucus virsoides* and *Cystoseira barbata* fucoidan isolation as a function of applied pre-treatment and extraction conditions. *Algal Res* **56**, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102286>
19. Dong H, Lin S, Zhang Q, Chen H, Lan W, Li H, Qin W (2016) Effect of extraction methods on the properties and antioxidant activities of *Chuanminshen violaceum* polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol* **93**, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.08.074>

20. Duarte ME, Cardoso MA, Nosedá, MD, Cerezo AS (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr. Res* **333**, 281-293. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00149-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00149-5)
21. El Gamal AA (2010) Biological importance of marine algae. *SaudiPharm. J* **18**, 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>
22. Eskilsson CS, Björklund E (2000) Analytical-scale microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **902(1)**, 227-50. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00921-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00921-3)
23. Favretto L (2004) Basic guidelines for microwave organic chemistry applications. Milestone, Bergamo, Italia.
24. Ferreres F, Lopes G, Gil-Izquierdo A, Andrade PB, Sousa C, Mouga T, Valentão P (2012) Phlorotannin Extracts from Fucales characterized by HPLC-DAD-ESI-MS: Approaches to hyaluronidase inhibitory capacity and antioxidant properties. *Mar. Drugs* **10**, 2766-2781. <https://doi.org/10.3390%2Fmd10122766>
25. Fletcher HR, Biller P, Ross AB, Adams JMM (2017) The seasonal variation of fucoidan within three species of brown macroalgae. *Algal Res* **22**, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.10.015>
26. García-Ríos V, Ríos-Leal E, Robledo D, Freile-Pelegrin Y (2012) Polysaccharides composition from tropical brown seaweeds. *Phycol. Res* **60**, 305–315. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1835.2012.00661.x>
27. Gouveia V, Seca AM, Barreto MC, Pinto DC (2013) Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga *Cystoseira abies-marina*. *Mini-Rev. Med. Chem* **13**, 1150. <http://doi.org/10.1016/j.phytol.2013.07.012>
28. Guiry MD, Guiry GM (2020) AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=814. Pristupljeno 31. kolovoza 2020.
29. Güner A, Koksall C, Erel SB, Kayalar H, Nalbantsoy A, Sukatar A, Karabay Yavasoglu NU (2015) Antimicrobial and antioxidant activities with acute toxicity, cytotoxicity and mutagenicity of *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff&Nizamuddin from the coast of Urla (Izmir, Turkey). *Cytotechnology* **67**, 135–43. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9668-x>
30. Gupta S, Abu-Ghannam N (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *TrendsFood Sci. Tech* **22**, 315-326. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>

31. Hahn T, Lang S, Ulber R, Muffler K (2012) Novel procedures for the extraction of fucoïdan from brown algae. *Process Biochemistry* **47**, 1691-1698. <http://doi.org/10.1016%2Fj.procbio.2012.06.016>
32. Hemmingson JA, Falshow R, Furneaux RH, Thompsom K (2006) Structure and antiviral activity of the galactofucan sulfates extracted from *Undaria pinnatifida* (Phaeophyta). *J. Appl. Phycol* **18**, 185–193. <https://doi.org/10.1007/s10811-006-9096-9>
33. Hentati F, Delattre C, Ursu AV, Desbrières 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. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.098>
34. Herrero M, Cifuentes A, Ibañez E (2006) Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *FoodChem* **98**, 136-148. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.05.058>
35. Hillison CI (1977) Seaweeds, a color-coded, illustrated guide to common marine Plants of eastcoast of the United States, Keystone Books, The State University Press, Pennsylvania, str.1-5.
36. Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, Castro-Puyana M (2012) Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates. U: Hayes M (ured.) *Marine Bioactive Compounds*, Springer, Boston, MA, str. 55-98.
37. Jimenez-Lopez C, Pereira AG, Lourenço-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Cassani L, Fraga M, Prieto MA, Simal-Gandara J (2021) Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits, *FoodChem* **341(2)**, 128262. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128262>
38. Jujnović A (2019) Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira sp.* primjenom različitih tehnika ekstrakcije (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
39. Kadam SU, Tiwari BK, O'Donnell CP (2015) Extraction, structure and biofunctional activities of laminarin from brown algae. *Int. J. Food Sci. Tech* **50**, 24-31. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12692>
40. Kılınç B, Cirik S, Turan G, Tekogul H, Koru E (2013) Seaweeds for Food and Industrial Applications. U: *Food Industry, Intech Open*, London, str. 735-745.

41. Kumar HD, Singh HN (1979) Phaeophyta. U: A Textbook on Algae. Palgrave, London, 141-160.
42. Kuznetsova TA, Andryukov BG, Besednova NN, Zaporozhets TS (2020) Marine Algae Polysaccharides as Basis for Wound Dressings, Drug Delivery, and Tissue Engineering. A Review. *J. Mar. Sci. Eng* **8**, 481. <http://doi.org/10.3390/jmse8070481>
43. Lahaye M (2001) Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol* **13**, 173-184. <https://doi.org/10.1023/A%3A1011142124213>
44. Lahaye M, Robic A (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* **8**, 1765-1774. <https://doi.org/10.1021/bm061185q>
45. Li, B., Lu, F., Wei, X., Zhao, R. (2008) Fucoidan: Structure and Bioactivity: A review. *Molecules*. **13**, 1671-1695. <https://doi.org/10.3390%2Fmolecules13081671>
46. Li B, Wei XJ, Sun JL, Xu SY (2006) Structural investigation of a fucoidan containing a fucose free core from the brown seaweed *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res* **341**, 1135-1146. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.035>
47. 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. <https://doi.org/10.1007/s11814-011-0221-3>
48. Lichtenthaler HK, Buschmann C (2005) Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. U: Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith D, Sporns P (ured.) Handbook of Food Analytical Chemistry: Pigments, Colorants, Flavors, Texture, and Bioactive Food Components, John Wiley&Sons, Inc., str. 171-178.
49. Lim SJ, Aida WMW (2017) Extraction of Sulfated Polysaccharides (Fucoidan) From Brown Seaweed. U: Venkatesan J, Anil S, Kim SK (ured.) Seaweed Polysaccharides, Elsevier, str. 27-46.
50. Lim SJ, Wan Aida WM, Maskat MY, Latip J, Badri KH, Hassan O, Yamin BM (2016) Characterisation of fucoidan extracted from Malaysian *Sargassum binderi*. *FoodChem* **209**, 267-273. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.058>
51. Liu SY, Wu L, Chen L, Li QY, Shen YZ, Jin L, Zhang X, Chen PC, Wu MJ, Choi J, Tong HB (2019) Different extraction methods bring about distinct physicochemical properties and antioxidant activities of *Sargassum fusiforme* fucoidans. *Int. J. Biol. Macromol* **155**, 1385-1392. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.113>

52. Lopez A, Rico M, Rivero A, Tangil MS (2011) The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of *Stypocaulon scoparium* algae extracts. *FoodChem* **125**, 1104-1109. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.09.101>
53. Marais MF, Joseleau JP (2001) A fucoidan fraction from *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydr. Res* **336**, 155–159. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(01\)00257-9](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(01)00257-9)
54. Maruyama H, Yamamoto I (1984) An antitumor fraction from an edible brown seaweed, *Laminaria religiosa*. *Hydrobiologia* **116**, 534-536. <https://doi.org/10.1007/BF00027740>
55. Matanić J (2018) Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku (diplomski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
56. McHugh DJ (1987) Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO Fisheries Technical Paper 288. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
57. 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. <https://doi.org/10.1023/A:1006945618657>
58. Nielsen SS (2010) Food Analysis Laboratory Manual, 4. izd., Springer International Publishing, New York City, SAD.
59. Pardilhó SL, Machado S, Bessada SMF, Almeida MF, Oliveira MB, Dias JM (2020) Marine Macroalgae Waste from Northern Portugal: A Potential Source of Natural Pigments? *Waste BiomassValorization*. **12**, 239-249. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01016-2>
60. Pravilnik (1983) Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka te obavljanja kemijskih i fizikalnih analiza radi kontrole kvalitete proizvoda od voća i povrća. Službeni list SFRJ br. 29. Narodne novine 53/91, Zagreb.
61. Rafiee Z, Jafari SM, Alami M, Khomeiri M (2011) Microwave - assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *J. Anim. Plant Sci* **21**, 738-745.
62. Rioux LE, Beaulieu L, Turgeon SL (2017) Seaweeds: A traditional ingredients for new gastronomic sensation. *Food Hydrocoll* **68**, 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.02.005>
63. Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M (2009) Effect of season on the composition of bioactive polysaccharides from the brown seaweed *Saccharina longicuris*. *Phytochemistry* **70**, 1069-1075. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.04.020>

64. Rodrigues D, Sousa S, Silva A, Amorim M, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC, Freitas AC (2015) Impact o fenzyyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown and green seaweeds from the central west coast of Portugal. *J. Agr. FoodChem* **63**, 3177-3188. <https://doi.org/10.1021/jf504220e>
65. Rodriguez-Jasso RM, Mussatto SI, Pastrana L, Aguilar CN, Teixeira JA (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. *Carbohydr. Polym* **86**, 1137-1144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.06.006>
66. Saepudin E, Sinurat E, Suryabrata IA (2017) Depigmentation and characterization of fucoidan from brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder. U: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, International Conference on Chemistry and Material Science. Malang, Indonesia. **299**, 012027.
67. Sanjeewa KKA, Jeon YJ (2018). Edible brown seaweeds: A review. *J. FoodBioact* **2**, 37-50. <http://dx.doi.org/10.31665/JFB.2018.2139>
68. Saravana PS, Cho YJ, Park YB, Woo HC, Chun BS (2016) Structural, antioxidant, and emulsifying activities of fucoidan from *Saccharina japonica* using pressurized liquid extraction. *Carbohydr. Polym* **153**, 518–525. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.014>
69. Scott J (1965) Fractionation by precipitation with quaternary ammonium salts. U: Whistler RL, BeMiller JN, Wolfrom ML (ured.) Methods in Carbohydrate Chemistry, 5. izd., Academic Press, New York, SAD, str. 38-44.
70. Shahidi F, Rahman MJ (2018) Bioactives in seaweeds, algae and fungi and their role in health promotion. *J. FoodBioact* **2**, 58-81. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.2141>
71. Shortle E, O'Grady MN, Giloroy D, Furey A, Quinn N, Kerry JP (2014) Influence of extraction technique on the anti-oxidative potential of hawthorn (*Crataegus monogyna*) extracts in bovine muscle homogenates. *Meat Sci* **98**, 828-834. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.001>
72. Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R (2014) Spectrophotometric analysis of chlorophylls and carotenoids from commonly grown fern species by using various extracting solvents. *Res. J. Chem. Sci* **4**, 63-69. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1340072>
73. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.066>

74. Vecta.io (2022) Flora - Macroalgae, <<https://vecta.io/symbols/300/flora-macroalgae/18/cystoseira-compressa>>. Pristupljeno 4. travanj 2022.
75. Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA (2013) Fundamentals of microwave extraction. U: Chemat F, Cravotto G (ured.) Microwave - assisted extraction for bioactive compounds: Theory and practice, Springer Science+Business Media, New York, str.15-52.
76. Wijesinghe WJ, Jeon YJ (2012) Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydr. Polym* **88**, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.029>
77. Xu SY, Huang X, Cheong KL (2017) Recent Advances in Marine Algae Polysaccharides: Isolation, Structure, and Activities. *Mar. Drugs* **15**, 388. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
78. Yuan Y, Macquarrie D (2015a) Microwave assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from *Ascophyllum nodosum* and its antioxidant activity. *Carbohydr. Polym* **29**, 101-7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.057>
79. Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova EV, Isakov VV (2003) Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J. Exp. Marine Biol. Ecol* **294**, 1-13. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00244-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00244-2)

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja MATEJA NENADIĆ izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis