Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije pigmenata iz zelene makroalge Codium bursa

Lončarić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:422606

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Petra Lončarić

OPTIMIZACIJA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE PIGMENATA IZ ZELENE MAKROALGE *Codium bursa*

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij: Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje:	Biotehničke znanosti
Znanstveno polje:	Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet:	Projektiranje uređaja u procesnoj industriji
Tema rada	je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 31. ožujka 2022.
Mentor:	prof. dr. sc. *Stela Jokić*
Komentor:	doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*
Pomoć pri izradi:	dr. sc. *Ana-Marija Cikoš*

Optimizacija ultrazvučne ekstrakcije pigmenata iz zelene makroalge *Codium bursa*

Petra Lončarić, 0113145077

Sažetak:
Provedena je ekstrakcija pigmenata potpomognuta ultrazvukom (UAE) iz zelene makroalge *Codium bursa* s ciljem optimiranja parametara ekstrakcije. Uz metanol:diklormetan kao ekstrakcijsko otapalo, ispitivani su sljedeći uvjeti ekstrakcije: temperatura (30, 50 i 70 °C), vrijeme (15, 30 i 45 min) i omjer tekuće:kruto (10, 20 i 30 mL/g). Temeljem metode odzivnih površina, provedeno je 17 pokusa pri čemu je praćen utjecaj procesnih parametara na udjele ispitivanih pigmenata. Koncentracije fukoksantina u dobivenim ekstraktima određene su visokodjelotvornom tekućinskom kromatografijom (HPLC) te su iznosile od 0,07 do 0,43 mg/g suhog ekstrakta i bile su više nego u ekstraktima dobivenim konvencionalnom metodom (0,18 ± 0,09 mg/g suhog ekstrakta). Statistički visoko značajan utjecaj na ekstrakciju fukoksantina imali su linearan i kvadratni član vremena, a njegova najveća koncentracija je dobivena pri uvjetima: 30,29 °C, 15,06 min, 15,17 mL/g. Preostali pigmenti određeni su spektrofotometrijski, a utvrđene koncentracije bile su od 0,0336 do 0,3762 mg/g suhog ekstrakta za klorofil *b*, 0,0067 do 0,0685 mg/g suhog ekstrakta za klorofil *a* te 0,0038 do 0,0467 mg/g suhog ekstrakta za ukupne karotenoide. Statistički visoko značajan utjecaj na ekstraktabilnost klorofila *b* i ukupnih karotenoida imali su linearni član temperature i omjer tekuće:kruto, a za klorofil *a* su uz te parametre značajan utjecaj imali i drugi. Njihove najveće koncentracije dobivene su pri sljedećim uvjetima: 30°C, 30 min i 10 mL/g.

Ključne riječi: *Codium bursa*, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, fukoksantin, klorofil *a*, klorofil *b*, ukupni karotenoidi

Rad sadrži: 46 stranica
17 slika
10 tablica
78 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	prof. dr. sc. *Darko Velić*	Predsjednik
2.	prof. dr. sc. *Stela Jokić*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Krunoslav Aladić*	član-komentor
4.	izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*	zamjena člana

Datum obrane: 15. srpnja 2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18 Osijek.

Komentirano [S1]: Ovo prebacite gore u stranicu

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Process Engineering

Scientific area:	Biotechnical sciences
Scientific field:	Food Technology
Course title:	Process Equipment Design
Thesis subject	was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VI held on March 31, 2022.
Mentor:	*Stela Jokić*, PhD, full prof.
Co-mentor	*Krunoslav Aladić, PhD,* assistant prof.
Technical assistance:	*Ana-Marija Cikoš*, PhD

Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Pigments from Green Macroalga *Codium bursa*

Petra Lončarić, 0113145077

Summary:
Ultrasound-assisted extraction of pigments (UAE) from the green macroalga Codium bursa was performed with the aim of optimizing the extraction parameters. With methanol:dichloromethane as extraction solvent, the following conditions were investigated: temperature (30, 50 and 70 °C), time (15, 30 and 45 min) and solvent:solid ratio (10, 20 and 30 mL/g). Based on response surface methodology, 17 experiments were performed, in which the influence of process parameters on concentrations of tested pigments was monitored. Fucoxanthin concentrations in obtained extracts were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) and ranged from 0.07 to 0.43 mg/g of dry extract and were higher than in the extracts obtained by the conventional method (0.18 ± 0.09 mg/g dry extract). Linear and quadratic terms of time had statistically highly significant influence on fucoxanthin extraction, and its highest concentration was obtained at the following conditions: 30.29 °C, 15.06 min, 15.17 mL/g. Concentrations of other pigments were determined spectrofotometrically and ranged from 0.0336 to 0.3762 mg/g for chlorophyll *b*, 0.0067 to 0.0685 mg/g for chlorophyll *a*, and 0.0038 to 0. 0467 mg/g dry extract for total carotenoids. Linear term of temperature and solvent:solid ratio had statistically highly significant influence on extractability of chlorophyll *b* and total carotenoids; for chlorophyll *a* those and other parameters had a significant influence. Their highest concentrations were obtained at the conditions: 30°C, 30 min and 10 mL/g.

Key words: *Codium bursa*, optimization of ultrasound-assisted extraction, chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, total carotenoids

Thesis contains: 46 pages
17 figures
10 tables
78 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1.	*Darko Velić*, PhD, full prof.	chair person
2.	*Stela Jokić*, PhD, full prof.	Supervisor
3.	*Krunoslav Aladić*, PhD, assistant prof.	co-mentor
4.	*Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.	stand-in

Defense date: July 15, 2022

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek

Iskreno se zahvaljujem

svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Steli Jokić na ukazanom povjerenju, susretljivosti, vodstvu i podršci, kako tijekom cijelog studiranja, tako i tijekom izrade diplomskog rada. Najveće hvala na svim savjetima, ukazanim prilikama i inovativnim idejama!

Također, izrada ovog rada ne bi bila moguća bez drage dr. sc. Ana-Marije Cikoš, zbog svih dodijeljenih savjeta, riječi podrške i smirenja, ugodne i nasmijane atmosfere tijekom rada u laboratoriju te prijateljstva.

Veliko hvala dragim prijateljima i kolegama koji su razdoblje studiranja olakšali svojim razumijevanjem i podrškom.

Posebno se želim zahvaliti svome dečku na bezuvjetnoj podršci, bodrenju i pomoći.

Najveće hvala ostavljam svojoj obitelji, na svemu!



Ovo istraživanje je provedeno u okviru znanstvenog Centra izvrsnosti za bioprospecting Jadranskog mora (BioProCro) na projektu BioProspecting Jadranskog mora (KK.01.1.1.01.0002) financiranog sredstvima Europske unije.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. MAKROALGE 4

2.2. ZELENA MAKROALGA *Codium bursa* 8

2.3. PIGMENTI U ZELENIM ALGAMA 11

2.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA ULTRAZVUKOM (UAE) 13

3. EKSPERIMENTALNI DIO 17

3.1. ZADATAK RADA 18

3.2. MATERIJALI 18

3.3. METODE 19

3.3.1. Priprema uzorka makroalge 19

3.3.2 Konvencionalna tehnika ekstrakcije 19

3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE) 20

3.3.4. Identifikacija i kvantifikacija pigmenata u dobivenim ekstraktima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) 21

3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida ... 22

3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina 23

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. UAE FUKOKSANTINA IZ MAKROALGE *C. bursa* 26

4.2. OPTIMIZACIJA UAE PARAMETARA I VALIDACIJA PREDLOŽENOG MODELA 31

4.3. USPOREDBA UČINKOVITOSTI UAE SA KONVENCIONALNOM METODOM EKTRAKCIJE 32

4.4. UKUPNE KONCENTRACIJE KLOROFILA *a*, KLOROFILA *b* I KAROTENOIDA 33

5. ZAKLJUČCI 37

6. LITERATURA 39

Popis oznaka, kratica i simbola

ANOVA	analiza varijance (engl. *analysis of variance*)
BBD	Box-Behnkenov plan pokusa (engl. *Box-Behnken design*)
C.	Codium
DMS	dimetil-sulfid (engl. *dimethyl sulfide*)
$ESCO_2$	ekstrakcija s CO_2 u superkritičnom stanju (engl. *supercritical CO_2 extraction*)
GC-MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *gas chromatography-mass spectrometry*)
HD	hidrodestilacija (engl. *hydrodistillation*)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography)*
MAAs	aminokiseline nalik mikosporinu (engl. *mycosporine-like amino acids*)
MeOH:DCM	metanol:diklormetan (engl. *methanol:dichloromethane*)
UAE	ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound-assisted extraction*)
UV / VIS	ultraljubičasto/vidljivo (engl. *ultraviolet-visible*)
v/v	volumni udio (engl. *volume per volume*)

1. UVOD

Makroalge su morski organizmi poznati po svojoj biološkoj i kemijskoj raznolikosti te po bogatom sadržaju bioaktivnih spojeva. Na temelju sastava pigmenata i kemijskog sastava, one se dijele na tri skupine: smeđe (Ochrophyta), crvene (Rhodophyta) i zelene (Chlorophyta) makroalge. Velik broj vrsta nastanjuje područja s ekstremnim okolišnim uvjetima, a kojima se prilagođavaju pomoću sinteze sekundarnih metabolita, prirodnih organskih spojeva u koje se ubrajaju isparljivi organski spojevi, polinezasićene masne kiseline, pigmenti i dr. Zahvaljujući navedenim bioaktivnim organskim spojevima i njihovoj potencijalnoj primjeni u nekoliko vrsta industrija, makroalge postaju tema mnogih znanstvenih radova (Mahadevan, 2015; Agostini-Costa i sur., 2012).

Pigmenti su klasificirani kao jedni od najvažnijih sekundarnih metabolita makroalgi te pokazuju brojna bioaktivna svojstva zbog kojih se sve više istražuju. Štoviše, danas se primjenjuju u industriji kao bojila za hranu i antioksidansi, a postoje i dokazi o njihovim pozitivnim učincima na ljudsko zdravlje. Smeđe i crvene makroalge se odlikuju bogatim sadržajem karotenoida, dok je dominantan pigment zelenih makroalgi klorofil i njegovi derivati. Zelene makroalge su skupina makroalgi koja je najmanje istraživana, iako je dokazano da njihovi pigmenti posjeduju razna bioaktivna svojstva (Dasgupta, 2015). Jedan od rodova zelenih makrolagi koji je vrlo slabo istražen je rod *Codium* kojemu pripada zelena makroalga *Codium bursa*. Jerković i sur. (2019) su prvi okarakterizirali fitokemijski profil ove makroalge korištenjem nekoliko različitih tehnika ekstrakcije. Međutim, jedna od suvremenih tehnika ekstrakcija koju nisu koristili je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE), zelena metoda ekstrakcije koja se odlikuje brojnim prednostima. Nadalje, za uspješnost samog procesa ekstrakcije krucijalna je optimizacija procesnih parametara.

Općenito, UAE jedna je od tehnika ekstrakcije koja je najmanje korištena za ekstrakciju pigmenata iz makroalgi, iako se kroz rezultate brojnih znanstvenih istraživanja pokazala prikladnom za ekstrakciju pigmenata iz mikroalgi (Kim i sur., 2012; Plaza i sur., 2012). Iz tih razloga nužno je primijeniti UAE na što više vrsta makroalgi. Osim toga, rezultati istraživanja koje su proveli Jerković i sur. (2019) ukazali su na značajan potencijal fitokemijskog profila makroalge *C. bursa*, kako u znanstvenoistraživačkom, tako i u industrijskom smislu. Tijekom diplomskog rada provedena je optimizacija UAE određenih pigmenata zelene makroalge *C. bursa* što pridonosi boljem shvaćanju njezinog fitokemijskog profila, a donosi i nova znanja u području optimiranja UAE kako zelenih, tako i makroalgi općenito.

Cilj ovog istraživanja bila je optimizacija UAE liofilizirane zelene makroalge *C. bursa* kako bi se procijenio utjecaj parametara ekstrakcije na prinos pigmenata. Prema Box-Behnkenovom planu pokusa (BBD), ispitivani parametri ekstrakcije bili su temperatura (30, 50 i 70 °C), vrijeme ekstrakcije (15, 30 i 45 min) i omjer tekuće:kruto (10, 20 i 30 mL/g). Radi usporedbe rezultata, provedena je i konvencionalna metoda ekstrakcije (miješanje sa zagrijavanjem), a za obje metode ekstrakcije je korištena smjesa otapala metanol:diklormetan (MeOH:DCM) (1:1, *v/v).* Budući da fukoksantin ima semipolarne karakteristike i atom kisika u svojoj strukturi, može se otopiti u otapalima srednje polarnosti. Binarna otapala se također mogu koristiti za ekstrakciju karotenoida te je u nekoliko istraživanja za ekstrakciju korištena smjesa otapala MeOH:DCM (Aburai i sur., 2013; Soares i sur., 2016; Sugawara i sur., 2002). Uz to, Chen i sur. (1981) su zaključili da diklormetan može zamijeniti kloroform u smjesi otapala s obzirom na to da je manje toksičan, a Soares i sur. (2016) su proveli istraživanje u kojem su ispitivali stabilnost luteina i β-karotena te su dokazali da su ekstrakti dobiveni pomoću MeOH:DCM stabilni u periodu od 32 sata. U dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određene koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida, dok su koncentracije fukoksantina određene tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Na temelju dobivenih rezultata određeni su optimalni parametri UAE uz koje se postiže najveći prinos navedenih pigmenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Makroalge

Makroalge su višestanični vodeni fotosintetski autotrofni organizmi slični biljkama, samo bez korijena, lišća i cvjetova, koji su nastali i razvijali se u vodenoj sredini te upravo ona predstavlja stanište većini vrsta makroalgi. Makroalge pripadaju eukariotima i carstvima *Plantae* i *Chromista* te se većina njih može pronaći u vodi na stjenovitim područjima (Cavalier-Smith, 2007). Razlikuju se po nekoliko svojstava kao što su pojava ili izostanak biča, struktura mitoze i građa stanične stijenke (Dobrinčić i sur., 2020).

Njihova rasprostanjenost, raznolikost i kemijski sastav većinom su ograničeni zbog okolišnih uvjeta, kao što su temperatura vode i količina dostupne svjetlosti. Ipak, makroalge često nastanjuju prostore s ekstremnim okolišnim uvjetima (npr. svjetlost, salinitet, temperatura) i većina njih zbog prilagodbe takvim okolišnim uvjetima proizvodi različite sekundarne metabolite. Sekundarni metaboliti su prirodni organski spojevi koji ne utječu i neovisni su o primarnom metabolizmu te se proizvode u posebnim stanicama (Agostini-Costa i sur., 2012). U prirodne organske spojeve koje alge proizvode sekundarnim metabolizmom ubrajaju se isparljivi organski spojevi, pigmenti (klorofili, karotenoidi), polinezasićene masne kiseline te drugi spojevi poput polifenola, vitamina, minerala i polisaharida (Mahadevan, 2015).

Makroalge su također potencijalni izvor nutrijenata zato što sadrže ugljikohidrate, aminokiseline, polinezasićene masne kiseline, vlakna, polifenole, vitamine (A, C, B1, B2, B6 i niacin) i minerale (jod, kalij, magnezij i kalcij) (Torres i sur., 2014). Navedeni spojevi su strukturno raznoliki i pokazuju antifungalna, antibakterijska, antivirusna, citotoksična, insekticidna, antihelmintska, protuupalna, antioksidacijska, antitumorska i druga svojstva (Thomas i Kim, 2011). U makroalgama je identificirano gotovo 3000 kemijskih spojeva što predstavlja gotovo 20 % kemijskih spojeva koji potječu iz morskog ekosustava (Maschek i Baker, 2008).

Na temelju pigmentacije talusa i kemijskog sastava, makroalge se mogu podijeliti u tri grupe: smeđe (Phaeophyceae), crvene (Rhodophyceae) i zelene (Chlorophyceae) (Xu i sur., 2017).

Smeđe alge su najzastupljenija skupina algi u Jadranskom moru prema arealu koji pokrivaju, međutim neke vrste su danas ugrožene. Najvažnije endemske vrste Jadranskog mora pripadaju rodu *Cystoseira* koji je u Jadranu ekološki najvažniji i najdominantniji (**Slika 1.**). Na globalnoj razini postoji 1500 do 2000 vrsta smeđih algi, a većina ih je morska i duljine do 45 metara. Pretežito žive na stjenovitim podlogama hladnijih voda te pripadaju najvišoj razini

složenosti mediteranskih algi, a mogu dominirati u nekoliko zajednica zbog dostizanja visoke vrijednosti biomase i imaju duži životni vijek. Iz tih razloga ih se smatra „mediteranskim kelpima“ (Mangialajo i sur., 2008). Još neki poznati rodovi smeđih algi u Jadranskom moru su *Padina* i *Taonia* (Kranjac i sur., 2020), a poznatije vrste smeđih makroalgi Jadranskog mora su jadranski bračić (*Fucus virsoides*), *Laminaria digitata*, *Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica* (Botić, 2018).



Slika 1. Smeđa alga Cystoseira (Matanić, 2018)

Općenito, smeđe makroalge predstavljaju bogat izvor bioaktivnih molekula kao što su polisaharidi, proteini, aminokiseline, masne kiseline, vitamini, minerali, prehrambena vlakna, steroli, pigmenti, polifenoli i dr. (Zhao i sur., 2018). Sve više raste interes za polisaharidima smeđih algi, od kojih se izdvajaju laminarin, alginat i fukoidan jer su svoju primjenu pronašli u različitim industrijama. Navedeni polisaharidi smeđih algi su sulfatirani, a fukoidan nije prisutan ni u jednoj drugoj skupini morskih makroalgi (Chaminda-Lakmal i sur., 2015; Lim i Wan-Aida, 2017). Polisaharidi morskih makroalgi se znatno razlikuju od onih u kopnenim biljkama kao što je primjerice škrob. Od ostalih prisutnih komponenti u smeđim makroalgama mogu se izdvojiti pigmenti od kojih su najprisutniji karotenoidi s fukoksantinom kao najzastupljenijim te pojedini klorofili. Nadalje, Heffernan i sur. (2014) provodili su istraživanje na dvije smeđe, jednoj zelenoj i jednoj crvenoj makroalgi, a rezultati su pokazali da smeđe makroalge imaju najveći sadržaj polifenola zbog prisutnosti florotanina. Florotanini su prisutni samo u smeđim makroalgama, a posjeduju antioksidacijsku aktivnost i mnoge druge biološki korisne aktivnosti.

Najveću primjenu u industriji imaju upravo smeđe makroalge zbog svoje ekološke i ekonomske vrijednosti te zauzimaju čak 59 % od ukupne proizvodnje makroalgi. Najzastupljenije su u prehrambenoj industriji, a **Tablica 1.** prikazuje primjenu njihovih osnovnih komponenti u određenim prehrambenim proizvodima (također i komponente koje se pojavljuju u crvenim algama) (Wang i sur., 2015; Parapurath i sur., 2012).

Tablica 1. Primjena polisaharida smeđih makroalgi u prehrambenoj industriji (prilagođeno iz Sartal i sur., 2012)

Polisaharidi iz makroalgi	Primjena
alginat	Žvakaća guma bez okusa, aditiv za povećanje viskoznosti proizvoda, emulgator, stabilizator sladoleda, za nastajanje pivske pjene
karagenan	Za geliranje, kao stabilizator ili sredstvo za zgušnjavanje u mliječnim proizvodima, za bistrenje voćnih sokova te proizvodnju nemasnih mesnih proizvoida
agar	Stabilizator mliječnih proizvoda, zgušnjivač nadjeva za pite i sladolede, za bistrenje vina i pripremu nemasnih mesnih proizvoda, za sprječavanje kristalizacije

Crvene alge se obično pojavljuju po stjenovitim obalama i grebenima te obitavaju do 230 metara dubine. Neki od industrijski važnih rodova crvenih algi su *Polysiphonia, Pterocladia, Gelidiella, Palmaria, Asparagopsis*, itd (Koletić, 2011; Stipanović, 2020). Na **Slici 2.** prikazana je invazivna crvena alga roda *Asparagopsis.*

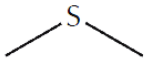


Slika 2. Crvena alga *Asparagopsis taxiformis* (Stipanović, 2020)

Crvene makroalge su najpoznatije po zastupljenosti i raznolikosti sekundarnih metabolita te su s više od 1500 identificiranih spojeva u tom pogledu bogatije od smeđih i zelenih makroalgi. Okarakterizirane su kao glavni proizvođači halogeniranih spojeva (najviše s bromom i jodom). Međutim, iako se crvene makroalge smatraju najvećim proizvođačima bioaktivnih spojeva, smeđe alge su najvažnije za industriju (Kranjac i sur., 2020; Parapurath i sur., 2012).

Neki od najvažnijih polisaharida dobivenih iz crvenih makroalgi su karagenan i agar. Karagenan ima tri različita kopolimera koji posjeduju različita svojstva, a agar je glavni dio stanične stjenke

crvenih makroalgi. Crvene makroalge također sintetiziraju velik broj aminokiselina nalik mikosporinu (MAAs). Crvena boja ovih makroalgi potječe od pigmenta fikoeritrina koji je karakterističan upravo za njih (Sartal i sur., 2012; Koletić, 2011; MCConnell i Fenical, 1977). Nadalje, isparljivi organski spojevi važni su u komunikaciji u morskom ekosustavu te ih alge koriste kao feromone, inhibitore bakterija, zaštitu od predatora, itd. Rod crvenih makroalgi *Polysiphonia* proizvodi velike količine dimetil-sulfida (DMS) koji služi kao kemijski atraktant za ribe, morske ptice, planktone i bakterije te je jedan od najvažnijih isparljivih organskih spojeva općenito (**Slika 3.**) (Kranjac i sur., 2020).



Slika 3. Dimetil-sulfid (Kranjac i sur., 2020)

Crvene alge se najviše koriste u farmaceutskoj industriji kao sastavni dio antioksidacijskih, antikancerogenih, antivirusnih, antimikrobnih, neuroprotektivnih, antialergenskih, hipoglikemijskih i hepatoprotektivnih proizvoda (Carreto i Carignan, 2011).

Zelene makroalge se mogu pronaći širom morskog staništa Jadrana, ali i na vlažnim staništima u blizini mora te su usprkos svojoj sličnosti s kopnenim biljkama najslabije istražena skupina algi. One su velika skupina s raznolikim morfološkim oblicima, od kojih su u Jadranu najpoznatije; *Cladophora glomerata*, *Caulerpa sp.*, *Acetabularia mediterranea*, *Ulva sp.*, itd. Još neki važniji rodovi su primjerice *Flabellia, Codium* i *Enteromorpha* (**Slika 4.**) (Kiridžija, 2017; Botić, 2018; Kranjac i sur., 2020).

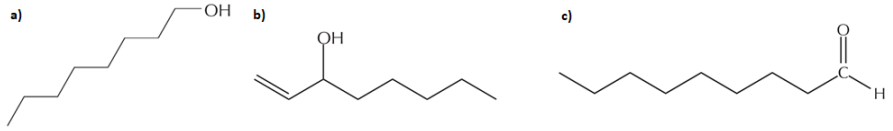


Slika 4. Zelene makroalge (Botić, 2018)

Odlikuju se visokim udjelom proteina (preko 20 %), a neke vrste sadrže i visoku koncentracijuvitamina i minerala, dok su im pričuvne tvari kapljice ulja i škrob (Botić, 2018).

Zelene makroalge su prilično kemijski bogate u pogledu isparljivih organskih spojeva. DMS je identificiran kao glavni spoj u vršnim parama algi roda *Codium*, a velike količine proizvode i

rodovi *Ulva* i *Enteromorpha*. DMS je odgovoran za nepoželjan miris algi, a njegova prisutnost također ukazuje na ulogu algi u kruženju sumpora u prirodi. U vršnim parama alge *C. bursa* identificirani su i niži alifatski alkoholi kao i nekoliko alifatskih aldehida (**Slika 5.**). Zelene alge se u nekim pogledima prilično razlikuju od crvenih i smeđih. Primjerice, dok su najzastupljenije nezasićene masne kiseline u crvenim i smeđim makroalgama eikosapentaenska kiselina (ω-3) i arahidonska kiselina (ω-6), zelene makroalge većinom sadrže linolnu (ω-6) kiselinu i α-linolensku (ω-3) kiselinu (Kranjac i sur., 2020; Pereira i sur., 2012).



Slika 5. a) Alifatski alkohol oktan-1-ol, b) Alifatski alkohol okt-1-en-3-ol, c) Alifatski aldehid nonanal (prilagođeno iz Kranjac i sur., 2020)

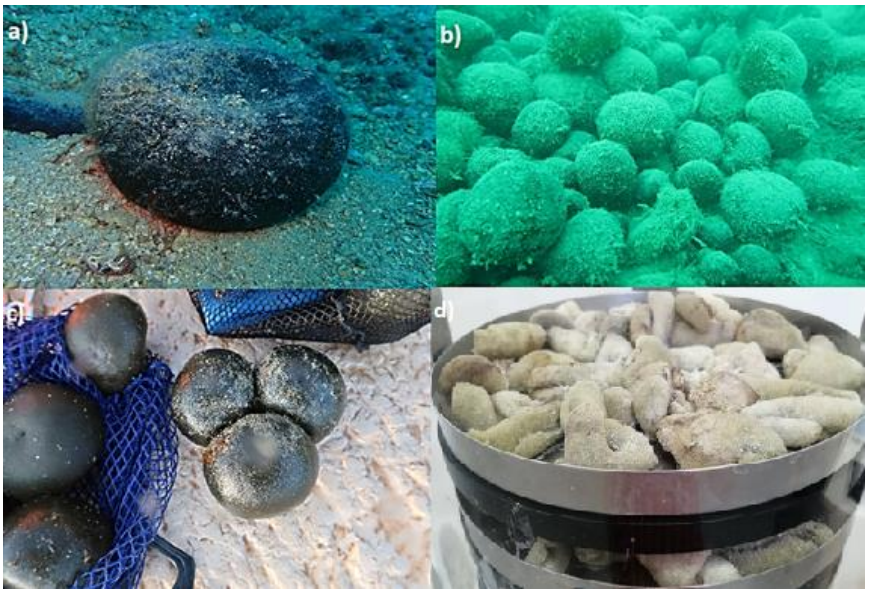
Iako zelene alge imaju najslabiju industrijsku primjenu s obzirom da zauzimaju samo 1 % sveukupne proizvodnje makroalgi, pronašle su značajniju primjenu u kozmetičkoj industriji jer se u posljednje vrijeme pojavio interes za ekološkim kozmetičkim proizvodima koji imaju farmaceutsko (medicinsko) djelovanje. Makroalge se upotrebljavaju u kozmetičkoj industriji zbog sadržaja proteina, polisaharida, pigmenata i polifenola, ali i kao stabilizatori i emulgatori. Koriste se u proizvodima za zaštitu od sunčevog zračenja zato što sintetiziraju spojeve (polifenoli, karotenoidi, MAAs) za zaštitu od slobodnih radikala. Navedeni spojevi mogu apsorbirati štetno ultraljubičasto zračenje i na taj način zaštititi kožu od starenja. Proteini i aminokiseline iz makroalgi koriste se i u proizvodima koji usporavaju starenje kože zbog stimulacije proizvodnje kolagena i antioksidativnog djelovanja, a polisaharidi i oligosaharidi se zbog svoje sposobnosti zadržavanja vode koriste u proizvodnji hidratacijskih proizvoda (Agatonović-Kustrin i Morton, 2013).

2.2. Zelena makroalga *Codium bursa*

Rod *Codium* pripada porodici Codiaceae, redu Bryopsidales i razredu Chlorophyta i sadrži 144 taksonomski prihvaćene vrste rasprostranjene u skoro svim morskim vodama na svijetu. Talus je kod svih vrsta spužvast te raste priljubljen uz stijene, a veličina mu varira od 1 cm do 10 m (Guiry i Guriy, 2021). Jerković i sur. (2019) navode kako je biološka aktivnost roda *Codium* najmanje istražena od svih zelenih makroalgi, pri čemu je invazivna alga *Codium fragile* privukla najviše pozornosti zbog mogućnosti primjene u biomedicinske svrhe. Rod *Codium* ima

specifična organoleptička svojstva i sastav te se zbog toga cijeni u gurmanskoj kuhinji i kozmetičkoj industriji gdje se prvenstveno primjenjuje u proizvodima za zaštitu kože (Rey i sur., 2020). Rezultati analize pomoću plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) koje su dobili Nazarudin i sur. (2021) pokazuju da rod *Codium* prvenstveno sadrži masne kiseline, nakon kojih slijede ugljikovodici, steroli i ketoni i na kraju u vrlo malim koncentracijama esteri masnih kiselina.

C. bursa je zelena makroalga koja pripada porodici Codiaceae i koljenu Chlorophyta te pretežito nastanjuje područja umjerene i suptropske klime. Karakterizira ju debeli, gusti talus veličine u rasponu od nekoliko milimetara do 40 cm promjera iz razloga što su stanične stijenke stanica također debele pa sama alga poprima oblik balona (**Slika 7.**). Ima skromne nutritivne zahtjeve zato što ima sposobnost minimizirati gubitak nutrijenata zahvaljujući debeloj staničnoj stjenci. Ona je također jedna od najsporije rastućih algi na svijetu zbog niske respiracije i fotosinteze (Guiry i Guriy, 2021; Geertz-Hansen i sur., 1994; Jerković i sur., 2019).



Slika 6~~7~~. a) *C. bursa* u moru, b) Kolonije *C. bursa* u moru, c) Izronjene kolonije *C. bursa*, d) Liofilizirana *C. bursa* (izvor: ronilac Donat Petricioli, dr.sc. Ana-Marija Cikoš)

Jerković i sur. (2019) proveli su ekstrakciju isparljivih organskih spojeva pomoću tri metode ekstrakcije te ih identificirali pomoću dvije analitičke metode. Korištene metode ekstrakcije bile su mikroekstrakcija vršnih para na krutoj fazi, hidrodestilacija (HD) i superkritična CO_2 ekstrakcija ($ESCO_2$), a korištene analitičke metode bile su plinska kromatografija s plameno-

ionizacijskim detektorom i GC-MS. Rezultati su prvenstveno pokazali da je sastav isparljivih spojeva značajno varirao ovisno o primijenjoj metodi ekstrakcije te o prirodi uzorka jer je ekstrakcija provođena na svježoj i osušenoj algi. Primjerice, dominantni isparljivi spoj svježe *C. bursa* bio je DMS, dok je u sušenoj *C. bursa* isti spoj bio prisutan u značajno nižim koncentracijama. (*E*)-fitol iz osušene alge dobiven je pomoću HD i $ESCO_2$ kao jedan od dominantnih spojeva, što je najvjerojatnije uzrokovano degradacijom klorofila. S druge strane, izolat dobiven pomoću HD iz svježe alge bio je bogat alifatskim ugljikovodicima poput heptadekana, najvjerojatnije zbog gubitka DMS. Nadalje, prisutnost loliloida utvrđena je samo u superkritičnom CO_2 ekstraktu. Dakle, za dobivanje potpunog kemijskog profila isparljivih i poluisparljivih organskih spojeva alge *C. bursa* preporučuje se primjena različitih metoda ekstrakcije budući da bi rezultati analize jedne metode prikazali nepotpuni kemijski profil isparljivih spojeva. Nadalje, *C. bursa* bogatija je nezasićenim masnim kiselinama u odnosu na zasićene. Kao glavna masna kiselina dobivena je oleinska, a zatim palmitinska, linoleinska i stearinska masna kiselina.

Osim isparljivih spojeva i masnih kiselina alge *C. bursa,* Jerković i sur. (2019) ispitali su i njezinu antifungalnu aktivnost. Antifungalna aktivnost ekstrakata ovisila je o korištenom otapalu, pa je tako vodeni ekstrakt pokazao bolju antifungalnu aktivnost protiv plijesni roda *Fusarium,* a dimetil-sulfoksid ekstrakt protiv vrsta *Penicillium expansum, Aspergillus flavus* i roda *Rhizopus.* S druge strane, neki su ekstrakti stimulirali rast određenih navedenih vrsta plijesni. Zaključno, ekstrakti *C. bursa* pokazali su dobru antifungalnu aktivnost, pogotovo protiv *P. expansum.*

Dakle, kemijski profil *C. bursa* okarakteriziran je u pogledu isparljivih organskih spojeva, masnih kiselina i antifungalne aktivnosti te ima potencijala za buduća istraživanja i primjenu u industriji. S druge strane, sastav pigmenata alge nije posebno zastupljen u dosadašnjim znanstvenim istraživanjima.

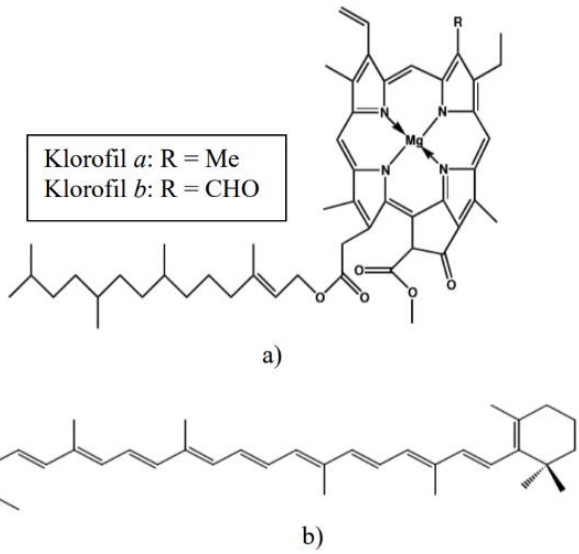
2.3. Pigmenti u zelenim algama

S obzirom na to da su pigmenti jedni od prirodnih organskih spojeva koje alge sintetiziraju pomoću sekundarnog metabolizma, oni imaju ulogu zaštite same alge od stresnih okolišnih uvjeta. Pri tome se prvenstveno misli na klorofile i karotenoide koji su također pokazali da imaju antikancerogena, antibakterijska i antioksidacijska svojstva. Zbog toga su pigmenti jedni od najvrijednijih sekundarnih metabolita algi te imaju važnu ulogu u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Glavni prirodni pigmenti detektirani u makroalgama su karotenoidi, klorofili i fikobiliproteini. Smeđe makroalge se odlikuju visokim koncentracijama karotenoida (prvenstveno fukoksantin), crvene sadrže najviše fikobiliproteina, a zelene su najpoznatije po visokim koncentracijama klorofila (Martins i sur., 1999; Karpinski i Adamczak, 2019).

S obzirom na to da su zelene makroalge skupina koja je najsličnija višim biljkama, njihov profil pigmenata je najsličniji onome u viših biljaka. Kada se pogledaju istraživanja provedena na zelenim makroalgama, jasno je da su klorofil i njegovi derivati glavni pigmenti koji se pojavljuju u zelenim makroalgama i odgovorni su za njihovu boju. Klorofil *a* je glavni pigment odgovoran za fotosintezu i hvatanje sunčeve energije na način da ju apsorbira u vidljivom dijelu spektra od narančastog do crvenog i od ljubičastog do plavog dijela spektra te se nakon toga ta apsorbirana sunčeva energija koristi za ostale reakcije fotosinteze. Klorofili *b, c* i *d* su pomoćni pigmenti koji apsorbiraju sunčevu energiju te ju prenose do primarnog klorofila *a* (Kuczynska i sur., 2015).

Provođenjem analize pigmenata u zelenim makroalgama najzastupljeniji su klorofili koji su odgovorni za njihovu zelenu boju. Ako se pigmenti analiziraju spektrofotometrijski, klorofili su izraženi kao ukupne koncentracije klorofila *a* i klorofila *b,* a postoje i analize provedene pomoću HPLC metode ili masene spektrometrije (Hegazi i sur., 1998).

Ostali pigmenti zelenih makroalgi su β-karoten, lutein, violaksantin, anteraksantin, zeaksantin i neoksantin, a koji pripadaju karotenoidima. Karotenoidi su pomoćni pigmenti jer također služe za prenošenje sunčeve energije do klorofila *a.* Budući da su klorofili iznimno osjetljivi na svjetlost, u makroalgama su prisutni i njihovi derivati od kojih je najzastupljeniji feofitin. β-karoten pripada skupini karotena, a lutein i ostali skupini ksantofila. Obje skupine karotenoida štite stanice makroalgi od fotooksidacijskih oštećenja (Martins i sur., 1999; Zhang i sur., 2020). **Slika 6.** prikazuje kemijske strukture klorofila *a* i *b* te karotenoida.



Slika 76. Kemijska struktura: a) klorofila *a* i *b*; b) β-karotena (Sumanta i sur., 2014)

Prilikom ekstrakcije klorofila iz zelenih makroalgi pokazalo se da je najpovoljnije koristiti polarna otapala poput acetona, metanola i etanola zato što imaju sposobnost otapanja stanične stjenke alge pri čemu dolazi do otpuštanja ciljanih komponenti koje se žele ekstrahirati (Martins i sur., 2021b). Međutim, Martins i sur. (2021a) su u drugom istraživanju pokazali da je najveće iskorištenje ostvareno prilikom korištenja ionskih tekućina kao otapala kod ekstrakcije klorofila. Pri tome se pokazalo da je primjena ionskih tekućina i jeftinija te da su ekstrakti duže stabilni. Također, korištenje UAE pokazalo se boljim od ekstrakcije potpomognute mikrovalovima zbog manjih oscilacija temperature i manje mogućnosti degradacije komponenti algi.

Iako bioaktivnost pigmenata ekstrahiranih iz zelenih makroalgi nije detaljno istraživana, poznata je bioaktivnost feofitina *a*, feoforbida *a* i klorofila *a*. Klorofil *a* se često degradira u feofitin, pirofeofotin i feoforbid, ponekad i tijekom ekstrakcije, a svi dobiveni derivati imaju antioksidacijske, antimutagene, protuupalne i druge aktivnosti. Bioaktivnost pigmenata, a i općenito njihova koncentracija ovisi uvelike o vrsti makroalge te o okolišnim uvjetima (Okai i Hiqashi-Okai, 1997). **Tablica 2.** prikazuje pigmente ekstrahirane iz različitih vrsta zelenih makroalgi te njihovu bioaktivnost.

Tablica 2. Pregled odabranih znanstvenih istraživanja ekstrakcije pigmenata iz zelenih makroalgi u 2021. godini

Vrsta makroalge	Pigmenti	Tehnika ekstrakcije	Uvjeti ekstrakcije	Dobivene koncentracije detektiranih pigmenata	Analitička metoda	Bioaktivnost	Literaturna referenca
Codium adhaerens	Feoforbid *a*, fukoksantin, feofitin *a*	Ekstrakcija na čvrstoj fazi	Metanol, MeOH:DCM	-	Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti sa elektrosprej ionizacijskom masenom spektroskopijom visoke rezolucije	Antioksidacijska	Radman i sur., 2021
Ulva fasciata, Ulva compressa	Klorofil *a*, klorofil *b*, ukupni karotenoidi	Ekstrakcija kruto:tekuće	80 % metanol, 10 min	Klorofil *a*: 1,4-1,6 mg/g; Klorofil *b*: 1.06 mg/g; ukupni karotenoidi: 0.45 mg/g	UV-Vis spektroskopija	-	Gabal i sur., 2021
Caulerpa taxifolia, Ulva rigida, Caulerpa racemosa, Codium fragile	Klorofil *a*, klorofil *b*, β-karoten, violaksantin, sifonaksantin	UAE	Aceton	-	HPLC	Antioksidacijska	Yalçın i sur., 2021
Ulva rigida, Ulva armoricana	Klorofil	Turbulentno miješanje	Vodene otopine ionskih tekućina, etanol, 20-25°C	-	UV-Vis spektroskopija	-	Martins i sur., 2021a

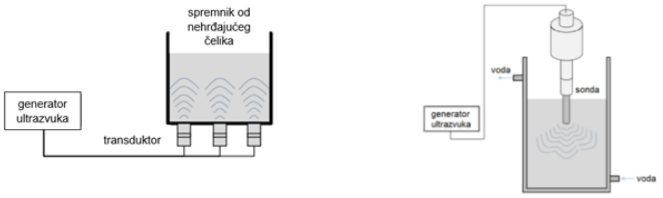
Iako različite vrste zelenih makroalgi imaju pojedine sličnosti u sastavu pigmenata, ne postoji jedinstveni profil pigmenata koji se može primijeniti na svaku vrstu. Da bi se prilikom ekstrakcije postigle visoke koncentracije pigmenata u ekstraktima, smanjila degradacija pigmenata i smanjili troškovi proizvodnje, nužno je provesti optimizaciju procesa ekstrakcije, a za primjenu u samoj industriji potrebno je istražiti mehanizme njihove bioaktivnosti.

2.4. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom temelji se na korištenju ultrazvučnih valova frekvencije od 20-100 kHz. Kao i kod zvuka, ultrazvučni valovi se postižu serijom kompresije i razrjeđivanja valova u mediju kroz koji prolaze. Kako se zvučni val širi kroz tekući medij, tako se stvaraju longitudinalni valovi koji dovode do izmjenjivanja kontrakcije i ekspanzije, odnosno stvaranja ekspanzivnih vrtloga. Male količine plina iz medija ulaze u nastale mjehuriće tijekom faze ekspanzije, no ne izlaze u potpunosti iz faze kompresije, što dovodi do rasta mjehurića i na kraju do pucanja (kavitacija). Pucanjem mjehurića, odnosno dostizanjem kompresijskog kruga se proizvodi energija koja djeluje na staničnu stjenku materijala koji je podvrgnut

ekstrakciji. Kavitacija djeluje na staničnu stjenku tako da ju mehanički oštećuje, čime se olakšava pristup otapala staničnom sadržaju i poboljšava prijenos mase. Primjena visokog tlaka i temperature dodatno razara stijenke stanica matriksa materijala i omogućava ispuštanje njezinog sadržaja u otapalo (Drmić i Režek Jambrak, 2010; Patist i Bates, 2008).

Aparatura potrebna za provođenje ove tehnike ekstrakcije je tekući medij, generator energije i transduktor koji pretvara električnu, magnetnu ili kinetičku energiju u akustičnu. UAE se može provoditi u ultrazvučnoj kupelji ili pomoću ultrazvučne sonde (**Slika 8.**) koja daje bolje rezultate zbog manjih gubitaka i ujednačenije distribucije energije. Prednosti ove metode su povećan prijenos tvari, smanjenje vremena ekstracije, provođenje na relativno niskim temperaturama, jeftina oprema u odnosu na ostale suvremene tehnike ekstrakcije, manja potrošnja otapala i energije, veći prinos ekstrakcije, itd. Nedostaci su da se prilikom izdvajanja nekih komponenti (primjerice fikobiliproteina) UAE mora kombinirati s konvencionalnim tehnikama ekstrakcije, moguć je nastanak degradacijskih produkata i slobodnih radikala te ograničenost fenomena kavitacije na reaktore manjih dimenzija (problemi sa *„scale-up"*) (Mujić i Jokić, 2018; Cravotto i sur., 2018).



Slika 8. Shematski prikaz ultrazvučne kupelji i ultrazvučne sonde (Pavlić, 2017)

Na UAE utječe nekoliko procesnih parametara: vrsta ultrazvučnog reaktora, frekvencija i snaga ultrazvučnog zračenja, temperatura i vrijeme ekstrakcije, karakteristike uzorka i odabranog otapala. Povećanjem snage ultrazvučnog zračenja povećava se intenzitet miješanja, ali i degradacija određenih komponenti, a smanjenjem frekvencije ultrazvuka raste prinos procesa. Temperaturu je potrebno optimirati s ciljem dobivanja maksimalnog prinosa željenih komponenti, a ne ukupnog prinosa ekstrakcije jer povišena temperatura općenito dovodi do većeg prinosa (povećane interakcije između uzorka i otapala, povećana difuzivnost otapala), ali može dovesti i do degradacije termolabilnih komponenti. Duže vrijeme ekstrakcije također može dovesti do većeg prinosa ekstrakcije, ali i do određenih kemijskih promjena u materijalu.

Karakteristike uzorka koje najviše utječu na ekstrakciju su veličina čestica i omjer tekuće:kruto. Odabir otapala je jedan od osnovnih procesnih parametara koji utječu na proces ultrazvučne ekstrakcije, a važne fizikalne karakteristike otapala koje se trebaju uzeti u obzir su viskoznost, površinska napetost, tlak para iznad otapala i dielektrična konstanta (Pavlić, 2017).

Dostupni rezultati prikazani u **Tablici 3.** pokazuju da su se dosad ovom metodom iz makroalgi većinom ekstrahirali polifenoli i antioksidansi.

Tablica 3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom bioaktivnih spojeva iz morskih makroalgi i njihova bioaktivnost

Vrsta makroalgi	Ultrazvučna oprema; Frekvencija [kHz]; Snaga [W]	Masa uzorka [g]	Volumen otapala [mL]	Temp. [˚C]	Vrijeme [min]	Bioaktivni spojevi	Bioaktivnost	Literaturna referenca
Ascophyllum nodosum, Laminaria hyperborea	Ultrazvučna sonda; 20; 750	10	200 (destilirana voda i 0,03 M HCl)	-	15	Polifenoli, laminarin	Antioksidacijska	Kadam i sur., 2015
Ecklonia cava	Ultrazvučna kupelj; 40; 200	1	100 (voda; 50 % metanol; 100 % metanol)	30	360 i 720	Polifenoli	Antioksidacijska	Lee i sur., 2013
Sargassum muticum, Osmandea pinnatifida, Codium tomentosum	Ultrazvučna kupelj; 50/60; 400	2	50 (deionizirana voda)	50	60	Ukupni polifenoli, antioksidansi, prebiotički spojevi	Antioksidacijska, prebiotička, inhibicija α-glukozidaze	Rodrigues i sur., 2015
Laurencia obtuse	Ultrazvučna kupelj; 40; 250	1	10-30 (95 % etanol)	30-50	30-60	Fenolni spojevi, antioksidansi	Antioksidacijska	Topuz i sur., 2016

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Cilj ovog rada je provesti ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom (UAE) pigmenata iz zelene makroalge *C. bursa* u svrhu optimiranja parametara ekstrakcije. Promatrani parametri ekstrakcije su temperatura (30, 50 i 70 °C), vrijeme (15, 30 i 45 min) i omjer tekuće:kruto (10, 20, 30 mL/g) te su optimirani tijekom 17 pokusa provedenih na osnovu eksperimentalnih podataka metode odzivnih površina, primjenom Box-Behnkenovog plana pokusa. Za usporedbu rezultata je provedena i konvencionalna metoda ekstrakcije (miješanje sa zagrijavanjem), a za obje metode ekstrakcije je korištena smjesa otapala MeOH:DCM (1:1, *v/v).* Identifikacija i kvantifikacija fukoksantina u dobivenim ekstraktima je provedena pomoću HPLC metode, dok je identifikacija i kvantifikacija klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida provedena pomoću spektrofotometrijske metode analize.

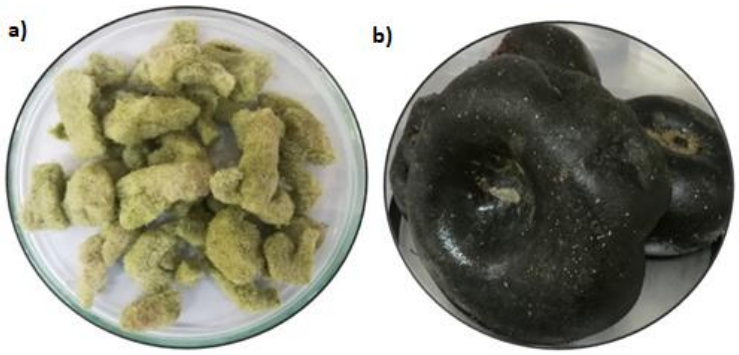
3.2. Materijali

Kemikalije

- HPLC standard za fukoksantin (čistoće ≥ 97 %) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA)
- Otapala (metanol, diklormetan), HPLC čistoće (J.T. Baker, New Jersey, PA, USA)
- Ostale kemikalije analitičke čistoće

Uzorak zelene makroalge

- *C. bursa* je izronjena u središnjem dijelu Jadranskog mora na poluotoku Rtina (Paška vrata; 44°19´14´´N; 15°55´42´´E), u veljači 2020. (**Slika 9.**)



Slika 9. a) Liofilizirana *C. bursa*, b) Svježa *C. bursa* (izvor: dr. Ana-Marija Cikoš)

Komentirano [S2]: Provjerite ej li ovo ANaMarija stavila kao sliku u svoj doktorat. Ako je onda je to IZVOR: Cikoš, 2021. Ako Vam je ustupila sliku koja nije dio njezinog doktorata onda ostavite ovako.

3.3. Metode

3.3.1. Priprema uzorka makroalge

Nakon prikupljanja uzorka morske makroalge, uzorak je smješten u nepropusnu plastičnu vrećicu koja je sadržavala okolnu morsku vodu i odmah je transportirana u laboratorij. Makroalga je liofilizirana prije provedbe procesa ekstrakcije. Uzorak je opran tri puta u demineraliziranoj vodi te izrezan na manje komadiće. Komadići makroalge su nakon toga zamrznuti na -20 °C tijekom 24 sata. Plitice sa uzorcima stavljene su u laboratorijski liofilizator (Martin Christ, Alpha 2-4 LSC Plus, Osterode am Harz, Njemačka) pod visokim vakuumom (0,5-1,81 hPa) na 96 sati s primarnom temperaturom liofilizacije od -20 °C i 20 °C kao sekundarnom temperaturom liofilizacije. Liofilizirani uzorci alge *C. bursa* korišteni su za određivanje sadržaja fukoksantina, klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida.

3.3.2 Konvencionalna tehnika ekstrakcije

Za usporedbu učinkovitosti procesa ekstrakcije fukoksantina, konvencionalna ekstrakcija provedena je pri temperaturi od 50 °C tijekom 30 minuta te s omjerom tekuće:kruto 20 mL/g na magnetskoj miješalici sa zagrijavanjem. Za provedbu ekstrakcije je korištena smjesa otapala MeOH:DCM (1:1, *v/v).* Ekstrakti su zatim filtrirani kroz filter papir, podvrgnuti uparavanju u vakuum koncentratoru SpeedVac SPD1030 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) (**Slika 10.**) kako bi se uklonilo otapalo te skladišteni pri temperaturi od 4 °C do analize.



Slika 10. Vakuum uparivač SpeedVac SPD1030, ThermoFisher Scientific (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

3.3.3. Ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (UAE)

Optimizacija UAE provedena je sa smjesom otapala MeOH:DCM (1:1, *v/v*). UAE je provedena pri različitim temperaturama (30, 50 i 70 °C) tijekom različitog vremena (15, 30 i 45 min) i pri različitim omjerima tekuće:kruto (10, 20 i 30 mL/g). Svi eksperimenti provedeni su u ultrazvučnoj kupelji (Elma, Elmasonic P 70 H, 37 kHz, 50 W) (**Slika 11.**).



Slika 11. Ultrazvučna kupelj ELMA, Elmasonic P 120 H (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

Dobiveni ekstrakti (**Slika 12.**) su zatim filtrirani kroz filter papir, podvrgnuti uparavanju u vakuum koncentratoru SpeedVac SPD1030 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) kako bi se uklonilo otapalo te skladišteni pri temperaturi od 4 °C. Prema poglavlju 3.2.6. Optimiranje procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina, po BBD provedeno je 17 eksperimenata na makroalgi *C. bursa*.



Slika 12. UAE ekstrakti makroalge *C. bursa* (izvor: autor)

3.3.4. Identifikacija i kvantifikacija pigmenata u dobivenim ekstraktima primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Prema modificiranoj metodi autora Castro-Puyana i sur. (2017), separacija, identifikacija i kvantifikacija fukoksantina u dobivenim ekstraktima provedene su pomoću HPLC sustava Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) opremljenog kvarternom pumpom (G7111B), grijačem kolone (G7116A), uređajem za automatsko injektiranje (G7129A), detektorom s nizom dioda (PDA detektor, G7115A) i sakupljačem frakcija (G1364E) (**Slika 13.**). Metanol:izopropanol:voda (90:7:3, *v/v/v*) (A) i metanol:izopropanol (10:90, *v/v*) (B) korišteni su kao mobilne faze prema gradijentu: 0 min, 100 % A, 0 % B; 50 min, 0 % A, 100 % B; 60 min, 100 % A, 0 % B. Brzina protoka bila je sljedeća: 0-50 min, 0,6-0,8 mL/min; 50-60 min, 0,8 mL/min, injektirani volumen iznosio je 30 µL, a detekcija je provedena pri 450 nm (zabilježeni spektar od 350 nm do 660 nm). Korištena je kolona obrnute faze YMC-C30 (250 mm x 4.6 mm id, 5 µm veličine čestica, YMC Europe, Schernbeck, Njemačka). Za identifikaciju fukoksantina u ekstraktima korištena je usporedba retencijskih vremena i spektara odvojenih pikova sa standardom. Kvantifikcija je provedena pomoću metode vanjskog standarda. Za kalibracijsku krivulju su pripremljene standardne otopine fukoksantina (linearnosti R^2=0,99970) pomoću prikladnog razrjeđenja radne otopine u acetonu.



Slika 13. HPLC sustav Agilent 1260 Infinity II (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

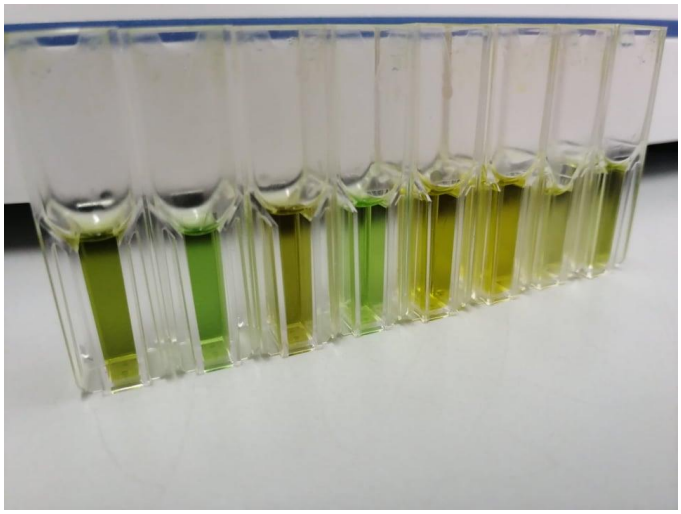
3.3.5. Spektrofotometrijsko određivanje ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida

Dobiveni UAE ekstrakti makroalge *C. bursa* podvrgnuti su uparavanju u vakuum koncentratoru SpeedVac SPD1030 (ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) i razrijeđeni u metanolu do koncentracije od 10 mg/mL. Uzorci su potom filtrirani kroz PTFE filter s porama veličine 0,20 µm direktno u kivete za spektrofotometrijsko mjerenje (**Slika 14.**) na Boeco S-220 UV/VIS spektrofotometru (Hamburg, Njemačka) **(Slika 15.**). Apsorbancije su mjerene pri valnim duljinama od 665,2 nm (maksimalna apsorbancija za klorofil *a*), 652,4 nm (maksimalna apsorbancija za klorofil *b*) i 470 nm (maksimalna apsorbancija za karotenoide). Ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida su izračunate prema jednadžbama (1-3) preuzetima iz Lichtenhaler i Buschmann (2001). Količine pigmenata su izražene kao mg/g suhog ekstrakta.

$$c_a = 16{,}82 \times A_{665{,}2} - 9{,}28 \times A_{652{,}4} \quad (1)$$

$$c_b = 36{,}92 \times A_{652{,}4} - 16{,}54 \times A_{665{,}2} \quad (2)$$

$$c_{(x+c)} = \frac{1000 \times A_{470} - 1{,}91 \times c_a - 95{,}15 \times c_b}{225} \quad (3)$$



Slika 14. UAE ekstrakti makroalge *C. bursa* u kivetama za spektrofotometrijsko mjerenje (izvor:autor)



Slika 15. UV/VIS spektrofotometar Boeco S-220 (Katalog opreme Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, 2021)

3.3.6. Optimiranje procesa ekstrakcije primjenom metode odzivnih površina

Za statističku analizu i dizajn eksperimenta korišten je komercijalni softwer Design Expert® (Ver. 9, Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA). Nadalje, za određivanje optimalnih UAE parametara primijenjen je BBD, prema radu autora Bas i Boyaci (2007). UAE parametri, temperatura (X_1), vrijeme (X_2) i omjer tekuće:kruto (X_3) bile su ispitivane nezavisne varijable kako bi se odredio utjecaj na odziv (sadržaj fukoksantina) te kako bi se optimirao proces ekstrakcije s ciljem dobivanja maksimalne koncentracije fukoksantina u ekstraktima. BBD je uključivao 17 eksperimenata, od kojih su 5 činile centralne točke za provjeru reproducibilnosti i stabilnosti rezultata pri sljedećim uvjetima: 50 °C, 30 min i 20 mL/g. Eksperimenti izvedeni pomoću BBD prikazani su u **Tablici 4.**

Tablica 4. BBD plan pokusa za provođenje UAE

Broj eksperimenta	Temperatura (°C)	Vrijeme (min)	Omjer tekuće:kruto (mL/g)
1	50	30	20
2	30	45	20
3	30	30	10
4	50	30	20
5	70	45	20
6	50	45	30
7	30	30	30
8	50	45	10
9	70	30	10
10	70	30	30
11	50	15	30
12	70	15	20
13	50	30	20
14	50	15	10
15	50	30	20
16	50	30	20
17	30	15	20

4. REZULTATI I RASPRAVA

Osim određivanja potencijala UAE za ekstrakciju klorofila *a*, klorofila *b*, ukupnih karotenoida te fukoksantina iz zelene makroalge *C. bursa*, cilj ovog istraživanja bio je i procijeniti utjecaje najvažnijih UAE parametara na koncentracije željenih pigmenata i optimirati proces ekstrakcije.

4.1. UAE fukoksantina iz makroalge C. bursa

Primjenom BBD, UAE je primijenjena pri različitim temperaturama (30, 50 i 70 °C), vremenima (15, 30 i 45 min) i omjerima tekuće:kruto (10, 20 i 30 mL/g) što je rezultiralo sa 17 kombinacija ovih varijabli s ponavljanjima u centralnoj točki. Fukoksantin je u dobivenim ekstraktima određen i kvantificiran pomoću HPLC-a te su rezultati prikazani u **Tablici 6.**

Prema dobivenim rezultatima, makroalga *C. bursa* nije sadržavala značajno visoke koncentracije fukoksantina; koncentracije su varirale između 0,07 i 0,43 mg/g suhog ekstrakta. Uzrok tomu su klorofili koji su prisutni u znatno većim koncentracijama i samim time daju algi zelenu boju te na taj način „maskiraju“ prisutnost fukoksantina (Hegazi i sur., 1998.). Također, razlike u sadržaju fukoksantina mogu biti uzrokovane sezonskim promjenama, geografskoj lokaciji, izloženosti svjetlosti i nutrijentima te metodom ekstrakcije i korištenim otapalom (Terasaki i sur., 2017; Nunes i sur., 2019).

Tablica 6. Koncentracije fukoksantina u ekstraktima makroalge *C. bursa* dobivenih pomoću UAE (korištenjem BBD)

Broj eksperimenta	Fukoksantin (mg/g suhog ekstrakta makroalge *C. bursa*)
1	0,08
2	0,22
3	0,33
4	0,09
5	0,11
6	0,14
7	0,16
8	0,24
9	0,18
10	0,07
11	0,36
12	0,24
13	0,12
14	0,35
15	0,11
16	0,10
17	0,43

Pregled utjecaja procesnih parametara UAE na sadržaj fukoksantina prikazan je u **Tablici 7.** Linearni članovi temperature (X_1) i omjera tekuće:kruto (X_3), kao i kvadratni član omjera tekuće:kruto (X_3^2) pokazali su značajan utjecaj (p<0,05) na sadržaj fukoksantina, dok su linearni

član vremena (X_2) i kvadratni član vremena (X_2^2) pokazali statistički visoko značajan utjecaj (p<0,0001).

Tablica 7. Analiza varijance (ANOVA) promatranih odziva za sadržaj fukoksantina

Izvor varijabilnosti	Suma kvadratnih odstupanja	Stupnjevi slobode (df)	Varijanca	f-vrijednost	*p*-vrijednost
Model	0,20	9	0,022	27,67	0,0001**
X_1	0,037	1	0,037	45,99	0,0003*
X_2	0,056	1	0,056	70,68	< 0,0001**
X_3	0,018	1	0,018	22,71	0,0020*
X_1^2	0,004441	1	0,004441	5,56	0,0504
X_2^2	0,059	1	0,059	74,31	< 0,0001**
X_3^2	0,012	1	0,012	15,20	0,0059*
X_1X_2	0,001417	1	0,001417	1,78	0,2245
X_1X_3	0,0006941	1	0,0006941	0,87	0,3820
X_2X_3	0,003422	1	0,003422	4,29	0,0771
Ostatak	0,005586	7	0,0007980		
Nedostatak modela	0,004403	3	0,001468	4,96	0,0779
Pogreška	0,001183	4	0,0002957		
Ukupni	0,20	16			
R^2	0,9727				

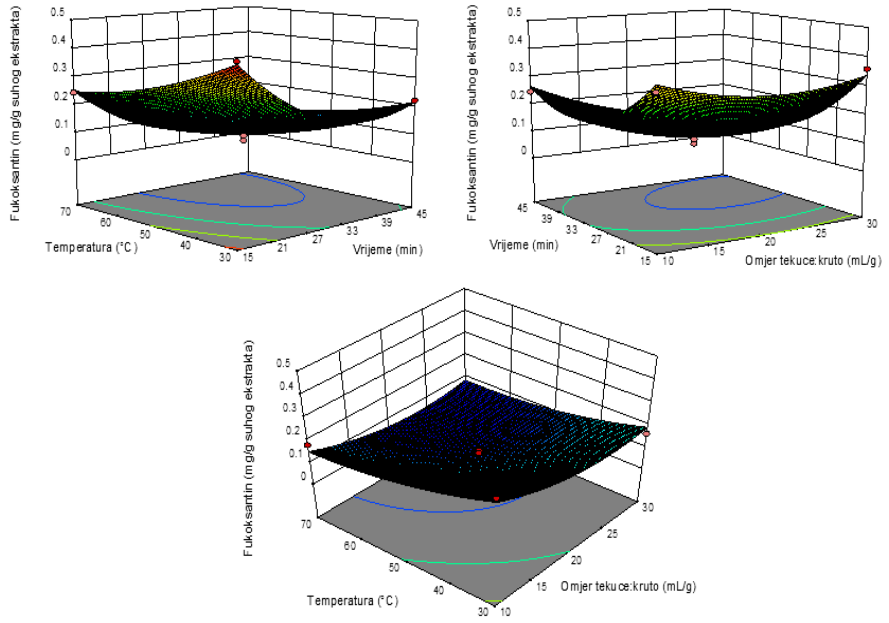
X_1, temperatura (°C); X_2, vrijeme (min); X_3, omjer tekuće:kruto (mL/g); ** $p < 0.01$ visoko značajan; * $p < 0.05$ značajan; $p \geq 0.05$ nije značajan.

Za izražavanje koncentracije fukoksantina u makroalgi *C. bursa* kao funkcije nezavisnih varijabli prikazan je model u kodiranim vrijednostima (polinom drugog reda) jednadžbom 4. Vrijednost koeficijenta korelacije R^2 za promatrani odziv iznosi 0,9727 što znači da primijenjeni regresijski model odgovara eksperimentalno predviđenim podacima, a prema istraživanju Bas i Boyaci (2007) svi modeli sa R>0,8 smatraju se prihvatljivima.

$$Y_{C.\ bursa} = 0{,}100 - 0{,}068X_1 - 0{,}084X_2 - 0{,}048X_3 + 0{,}032X_1^2 + 0{,}120X_2^2 + 0{,}054X_3^2 + 0{,}019\ X_1X_2 + 0{,}013\ X_1X_3 - 0{,}029X_2X_3 \quad (4)$$

Y predstavlja koncentraciju fukoksantina, a X_1, X_2 i X_3 su kodirane vrijednosti temperature, vremena i omjera tekuće:kruto.

3D dijagram utjecaja procesnih parametara UAE (temperatura, vrijeme, omjer tekuće:kruto) na zavisnu varijablu (koncentracija fukoksantina) prikazan je na **Slici 16.**



Slika 16. 3D dijagrami utjecaja ispitivanih varijabli na koncentraciju fukoksantina u makroalgi *C. bursa* (izvor: autor)

Povišenjem temperature, koncentracija fukoksantina u algi *C. bursa* smanjivala se, a to može biti uzrokovano degradacijom fukoksantina prilikom primjene visokih temperatura. Temperatura primijenjena prilikom ekstrakcije fukoksantina predstavlja važan faktor zbog osjetljivosti fukoksantina na povišenu temperaturu, kao i na izloženost svjetlu i kisiku koji

može uzrokovati degradaciju fukoksantina (Kim i sur., 2012). Ova pojava je također promatrana kod ostalih karotenoida, npr. violaksantina i anteraksantina kada je temperatura bila viša od 50 °C (Fratianni i sur., 2010; Sun i sur., 2010). Nadalje, sadržaj fukoksantina smanjivao se porastom vremena ekstrakcije od 15. do 33. minute, a primijećen je i slabi porast od 33. do 45. minute. Ovakav trend uočen je i s omjerom tekuće:kruto gdje je povećanje omjera od 15 do 20 mL/g uzrokovalo smanjenje sadržaja fukoksantina, dok se s povećanjem omjera od 20 do 30 mL/g sadržaj fukoksantina blago povećao. Vjerojatno je došlo do odvajanja fukoksantina iz kompleksa u kojima je prethodno bio vezan. Obično je vezan na nekoliko proteina ili na klorofil *a*, tvoreći komplekse koji mogu degradirati tijekom procesa ekstrakcije povećanjem vremena i temperature, pri čemu dolazi do većeg prinosa ekstrakcije (Kanazawa i sur., 2008).

Iako utjecaj snage ultrazvuka na sadržaj fukoksantina nije istražen u ovom radu, dostupna istraživanja pokazala su da on također djeluje na ekstrakciju pigmenata iz makroalgi, većinski zbog kavitacijskog efekta ultrazvuka. Veća snaga ultrazvuka može dovesti do razgradnje pigmenata zbog formiranja radikala koji iniciraju lančane reakcije nastanka degradacijskih produkata koji mogu reagirati s karotenoidima, čime se smanjuje njihova koncentracija u mediju. Također, može doći do lokalnog intenzivnog zagrijavanja medija što je posljedica puknuća mjehurića generiranih zbog ultrazvučnih valova. Nadalje, točke zagrijavanja ubrzavaju kemijsku reaktivnost i procese degradacije (Pingret i sur., 2013). Degradacija uzrokovana visokim intenzitetom snage ultrazvuka promatrana je za β-karoten (Sun i sur., 2010), klorofile (Zhu i sur., 2017) i ukupne karotenoide (Jaeschke i sur., 2017), a rezultati pokazuju da je snaga ultrazvuka ključni parametar prilikom ekstrakcije karotenoida. Povrh toga, koncentracija otapala je također razmatrana kao važan faktor za optimizaciju i povezana je s oštećenjima stanica uzrokovanih ultrazvučnim valovima zbog intenziteta kavitacije (Raguraman i sur., 2018; Parniakov i sur., 2015).

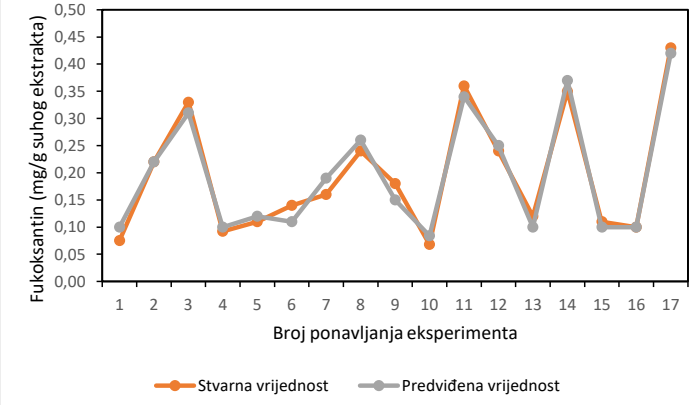
4.2. Optimizacija UAE parametara i validacija predloženog modela

Optimalni UAE uvjeti za dobivanje maksimalnog sadržaja fukoksantina utemeljeni su na principu željene funkcije (eng. desirability function). Optimiranje se provodi tako da se promatrani odziv prevodi u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću od 0 do 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, dok 1 predstavlja najbolju vrijednost za promatrani odziv. Optimalni uvjeti ekstrakcije za makroalgu *C. bursa* dani su u **Tablici 8.** te je sadržaj fukoksantina ovisan o temperaturi, vremenu i omjeru tekuće:kruto. Ukupna željena funkcija za algu *C. bursa* iznosila je 1,00 što znači da dobivene vrijednosti parametara predstavljaju najbolje moguće rješenje za željeni odziv.

Tablica 8. Optimalni UAE parametri za makroalgu *C. bursa* dobiveni metodom odzivnih površina

Optimalni parametar	Rezultat
Temperatura (°C)	30,29
Vrijeme (min)	15,06
Omjer tekuće:kruto (mL/g)	15,17
Predviđena koncentracija fukoksantina (mg/g)	0,45
Eksperimentalno dobivena koncentracija fukoksantina (mg/g)	0,41
Ukupna željena funkcija	1,00

Optimalna temperatura ekstrakcije dobivena metodom odzivnih površina za algu *C. bursa* iznosi 30,29 °C, vrijeme tretiranja 15,06 min, a omjer tekuće:kruto 15,17 mL/g. Eksperimentalne vrijednosti su u dobrom odnosu s predviđenim vrijednostima dobivenim analizom metode odzivnih površina, sa standardnom devijacijom ± 10 %. Na **Slici 17.** prikazana je grafička usporedba stvarnih i predviđenih vrijednosti odziva.



Slika 17. Grafička usporedba stvarnih i predviđenih vrijednosti sadržaja fukoksantina u algi *C. bursa*

4.3. Usporedba učinkovitosti UAE sa konvencionalnom metodom ektrakcije

Kako bi se mogla usporediti učinkovitost ekstrakcije, provedena je referentna metoda ekstrakcije (miješanje sa zagrijavanjem) s istim otapalom i pri istim procesnim uvjetima ekstrakcije u centralnoj točki BBD, kako slijedi: 50 °C, 30 min i 20 mL/g. Dobiveni rezultati pokazuju znatno niži sadržaj fukoksantina u makroalgi *C. bursa*. Dobiveni sadržaj fukoksantina nakon provedbe konvencionalne metode ekstrakcije iznosio je 0,18 ± 0,09 mg/g suhog ekstrakta, dok je nakon provedbe UAE ekstrakcije sadržaj fukoksantina varirao između 0,08 do 0,43 mg/g suhog ekstrakta. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem koje su proveli Raguraman i sur. (2018), gdje su ispitivali utjecaj koncentracije otapala, vremena i temperature te optimirali postupak UAE fukoksantina iz makroalge *Padina tetrastromatica.* Vrijednosti njihovih rezultata dobivenih pomoću UAE bile su znatno veće (750 µg/g suhe tvari) od vrijednosti dobivenih pomoću konvencionalne ekstrakcije (430 µg/g suhe tvari). Učinkovitost UAE pripisuje se kavitaciji koja se događa na granici tekuće i krute faze, što rezultira uništavanjem stanične stijenke i povećanim prijenosom mase (Fung i sur., 2013).

4.4. Ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i karotenoida

Dobiveni rezultati spektrofotometrijske analize ekstrakata makroalge *C. bursa* (**Tablica 9.**) pokazuju da su najviše koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida dobivene pri sljedećim uvjetima ekstrakcije: 30 °C, 30 min i 10 mL/g. S druge strane, najniže koncentracije ukupnih pigmenata dobivene su pri višim temperaturama, većinom pri 70 °C i dužim vremenom ekstrakcije (45 min). Ove spoznaje mogu biti povezane sa degradacijom klorofila i karotenoida koja se javlja pri povišenim temperaturama.

Dominantnost klorofila *b* (0,0485 – 0,3762 mg/g) nad klorofilom *a* (0,0067 – 0,0685 mg/g) u algi *C. bursa* karakteristična je za zelene alge roda *Codium* budući da žive i rastu u dubokim i mutnim vodama (Marques i sur., 2021). Nadalje, mogu se primijetiti razlike u rezultatima sadržaja pigmenata između ovog istraživanja i istraživanja koje su proveli Cvitković i sur. (2021), gdje je srednja vrijednost koncetracije klorofila *a* iznosila 360,08 mg/kg, a srednja vrijednost koncentracije ukupnih karotenoida 59,53 mg/kg. Osim utjecaja metode ekstrakcije na sadržaj pigmenata, različita istraživanja (Lalegerie i sur., 2020; Catarino i sur., 2018; Yang i sur., 2021) pokazala su da životni ciklus i okolišni uvjeti kao što su svjetlost, temperatura, salinitet i kemijski sastav morske vode također mogu imati veliku važnost.

Tablica 9. Ukupne koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida iz makroalge *C. bursa*

Broj eksperimenta	Klorofil *a* (mg/g suhog ekstrakta)	Klorofil *b* (mg/g suhog ekstrakta)	Ukupni karotenoidi (mg/g suhog ekstrakta)
1	0,0102	0,0517	0,0056
2	0,0375	0,2546	0,0376
3	0,0685	0,3762	0,0467
4	0,0099	0,0767	0,0093
5	0,0125	0,0782	0,0115
6	0,0089	0,0485	0,0057
7	0,0223	0,1227	0,0140
8	0,0223	0,1911	0,0312

9	0,0179	0,1043	0,0153
10	0,0067	0,0336	0,0038
11	0,0285	0,1422	0,0182
12	0,0161	0,0725	0,0069
13	0,0100	0,0816	0,0101
14	0,0496	0,2286	0,0288
15	0,0144	0,0846	0,0109
16	0,0110	0,0731	0,0093
17	0,0387	0,2842	0,0430

Uočen je značajni utjecaj (p<0,05) linearnih članova temperature, vremena i omjera tekuće:kruto te kvadratnih članova vremena i temperature za klorofil *a*. Visoko značajan utjecaj (p<0,0001) linearnih članova temperature i omjera tekuće:kruto; značajan utjecaj (p<0,05) za linearne članove vremena, kvadratnih članova temperature, vremena i omjera tekuće:kruto; te interakcije između temperature i omjera tekuće:kruto uočeni su za klorofil *b*. Za ukupne karotenoide visoko značajan utjecaj (p<0,0001) su imali linearni članovi temperature i omjera tekuće:kruto, dok su značajan utjecaj (p<0,05) imali kvadratni članovi temperature i vremena (**Tablica 10.**).

Tablica 10. ANOVA odzivnih površina za ukupne koncentracije pigmenata u algi *C. bursa*

Izvor	Zbroj kvadrata	df	Srednji korijen	F-vrijednost	p-vrijednost
Klorofil *a*					
Model	6,65	9	0,74	9,58	0,0035*
X_1	2,55	1	2,55	33,15	0,0007*
X_2	0,63	1	0,63	8,19	0,0242*
X_3	1,61	1	1,61	20,90	0,0026*
X_1^2	0,44	1	0,44	5,66	0,0490*
X_2^2	0,77	1	0,77	10,00	0,0159*

X_3^2	0,41	1	0,41	5,30	0,0547
$X_1 X_2$	0,012	1	0,012	0,16	0,7045
$X_1 X_3$	$4,675x10^{-3}$	1	$4,675x10^{-3}$	0,061	0,8125
X_2X_3	0,034	1	0,034	0,44	0,5301
Ostatak	0,54	7	0,077		
Nedostatak podešenja	0,44	3	0,15	6,16	0,0557
Čista pogreška	0,096	4	0,024		
Ukupni Cor	7,18	16			
R=0.9249					
Klorofil *b*					
Model	0,15	9	0,017	34,72	< 0,0001**
X_1	0,070	1	0,070	147,19	< 0,0001**
X_2	$3,006x10^{-3}$	1	$3,006x10^{-3}$	6,31	0,0403*
X_3	0,038	1	0,038	80,29	< 0,0001**
X_1^2	0,012	1	0,012	24,56	0,0016*
X_2^2	$8,951x10^{-3}$	1	$8,951x10^{-3}$	18,78	0,0034*
X_3^2	$4,570x10^{-3}$	1	$4,570x10^{-3}$	9,59	0,0174*
$X_1 X_2$	$3,102x10^{-3}$	1	$3,102x10^{-4}$	0,65	0,4464
$X_1 X_3$	$8,349x10^{-3}$	1	$8,349x10^{-3}$	17,52	0,0041*
X_2X_3	$7,900x10^{-4}$	1	$7,900x10^{-4}$	1,66	0,2389
Ostatak	$3,336x10^{-3}$	7	$4,766x10^{-4}$		
Nedostatak podešenja	$2,664x10^{-3}$	3	$8,881x10^{-4}$	5,29	0,0708
Čista pogreška	$6,721x10^{-4}$	4	$1,680x10^{-4}$		
Ukupni Cor	0,15	16			
R=0.9781					
Ukupni karotenoidi					
Model	$2,993x10^{-3}$	9	$3,325x10^{-4}$	26,40	0,0001**

X_1	$1{,}347 \times 10^{-3}$	1	$1{,}347 \times 10^{-3}$	106,90	< 0,0001**
X_2	$1{,}468 \times 10^{-5}$	1	$1{,}468 \times 10^{-5}$	1,17	0,3161
X_3	$8{,}058 \times 10^{-4}$	1	$8{,}058 \times 10^{-4}$	63,97	< 0,0001**
X_1^2	$2{,}258 \times 10^{-4}$	1	$2{,}258 \times 10^{-4}$	17,92	0,0039*
X_2^2	$2{,}939 \times 10^{-4}$	1	$2{,}939 \times 10^{-4}$	23,33	0,0019*
X_3^2	$5{,}326 \times 10^{-5}$	1	$5{,}326 \times 10^{-5}$	4,23	0,0788
$X_1 X_2$	$2{,}500 \times 10^{-5}$	1	$2{,}500 \times 10^{-5}$	1,98	0,2017
$X_1 X_3$	$1{,}136 \times 10^{-4}$	1	$1{,}136 \times 10^{-4}$	9,02	0,0199*
$X_2 X_3$	$5{,}566 \times 10^{-5}$	1	$5{,}566 \times 10^{-5}$	4,42	0,0737
Ostatak	$8{,}818 \times 10^{-5}$	7	$1{,}260 \times 10^{-5}$		
Nedostatak podešenja	$7{,}179 \times 10^{-5}$	3	$2{,}393 \times 10^{-5}$	5,84	0,0606
Čista pogreška	$1{,}639 \times 10^{-5}$	4	$4{,}096 \times 10^{-6}$		
Ukupni Cor	$3{,}081 \times 10^{-3}$	16			
R^2	0,9714				

X_1, temperatura (°C); X_2, vrijeme (min); X_3, omjer tekuće:kruto (mL/g); ** $p < 0.01$ visoko značajan; * $p < 0.05$ značajan; $p \geq 0.05$ nije značajan.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu provedenog istraživanja o optimizaciji ultrazvučne ekstrakcije pigmenata iz zelene makroalge *C. bursa*, odnosno utjecaja parametara ekstrakcije (temperature, vremena i omjera tekuće:kruto) na sadržaj pigmenata u ekstraktima makroalge te prezentiranih rezultata i rasprave, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ekstrakti zelene makroalge *C. bursa* bogat su izvor klorofila i karotenoida, a u najvećoj koncentraciji određeni su klorofil *b* (od 0,0336 do 0,3762 mg/g suhog ekstrakta makroalge), zatim klorofil *a* (od 0,0067 do 0,0685 mg/g suhog ekstrakta) te ukupni karotenoidi (od 0,0038 do 0,0467 mg/g suhog ekstrakta).
- Od ukupnih karotenoida, ekstrakti zelene alge *C. bursa* također sadrže i značajne koncentracije fukoksantina (od 0,07 do 0,43 mg/g suhog ekstrakta makroalge).
- UAE je učinkovita metoda za izolaciju klorofila i karotenoida iz zelene alge *C. bursa* pri čemu je utvrđeno da se kroz kratko vrijeme ekstrakcije postižu visoki prinosi istraživanih pigmenata.
- UAE se pokazala kao bolja metoda ekstrakcije za dobivanje pigmenata u usporedbi sa konvencionalnom metodom ekstrakcije: dobiveni sadržaj fukoksantina nakon provedbe konvencionalne metode ekstrakcije iznosio je 0,18 ± 0,09 mg/g suhog ekstrakta, dok je nakon provedbe UAE ekstrakcije sadržaj fukoksantina varirao između 0,07 do 0,43 mg/g suhog ekstrakta.
- U pogledu optimizacije ekstrakcije pigmenata, visoko značajan utjecaj (p<0,0001) na ekstrakciju klorofila *b* i ukupnih karotenoida su imali linearni članovi temperature i omjera tekuće:kruto. Za klorofil *a*, značajan utjecaj (p<0,05) su imali linearni članovi temperature, vremena i omjera tekuće:kruto, kao i kvadratni članovi temperature i vremena. Za fukoksantin, visoko značajan utjecaj su imali linearni član vremena i kvadratni član vremena.
- Najveće koncentracije klorofila *a*, klorofila *b* i ukupnih karotenoida dobivene su pri 30°C, 30 min i 10 mL/g, dok je najveća koncentracija fukoksantina ostvarena pri 30,29 °C, 15,06 min, 15,17 mL/g. S druge strane, najniže koncentracije pigmenata dobivene su nakon primjene viših temperatura (70 °C) i vremena ekstrakcije (45 min), najvjerojatnije zbog degradacije pigmenata pri izloženosti višim temperaturama.

6. LITERATURA

Aburai N, Ohkubo HM, Abe K: Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japa. *Algal Research* 2:237-243., 2013.

Agatonović-Kustrin S, Morton DW: Cosmeceuticals derived from bioactive substances found in marine algae. *Journal of Oceanography and Marine Research* 1:106, 2013.

Agostini- Costa TS, Vieira RF, Bizzo HR, Silveira D, Gimenes MA: Secondary metabolites. U *Chromatography and Its Applications,* str. 131-164. InTech, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2012.

Bas D, Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78:836–845, 2007.

Botić V: Utjecaj primijenjene metode ekstrakcije na izolaciju bioaktivnih komponenti iz jadranskih algi *Ulva lactuca, Dictyota dichotoma* i *Padina pavonica. Završni rad.* Kemijsko- tehnološki fakultet, Split, 2018.

Carreto J, Carignan MO: Mycosporine-like amino acids: relevant secondary metabolites. Chemical and ecological aspects . *Marine Drugs* 9:387–446, 2011.

Castro-Puyana M, Perez-Sanchez A, Valdes A, Ibrahim OHM, Suarez-Alvarez S, Ferragut JA, Micol V, Cifuentes A, Ibanez E, Garcia-Canas V: Pressurized liquid extraction of *Neochloris oleoabundans* for the recovery of bioactive carotenoids with anti-proliferative activity against human colon cancer cells. *Food Research International* 99:1048–1055, 2017.

Catarino MD, Silva AMS, Cardoso SM: Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Marine Drugs* 16:249, 2018.

Cavalier-Smith, T: Evolution and relationships of algae: Major branches of the tree of life. U *Unravelling the Algae the Past, Present, and Future of Algal Systematics*, str. 21–55. CRC Press, London, Ujedinjeno Kralljevstvo, 2007.

Chaminda Lakmal HH, Lee H, Jeon YJ: Enzyme-assisted extraction of a marine algal polysaccharide, fucoidan and bioactivities. U *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* str. 1-2241. Springer, Berlin, Njemačka, 2015.

Chen IS, Shen CSJ, Sheppard AJ: Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 58:599–601, 1981.

Cravotto G, Mariatti F, Gunjevic V, Secondo M, Villa M, Parolin J, Cavaglià G: Pilot scale cavitational reactors and other enabling technologies to design the industrial recovery of polyphenols from agro–food by–products, a technical and economical overview. *Foods* 7:130, 2018.

Cvitković D, Dragović-Uzelac V, Dobrinčić A, Čož-Rakovac R, Balbino S: The effect of solvent and extraction method on the recovery of lipid fraction from Adriatic Sea macroalgae. *Algal Research* 56:102291, 2021.

Dasgupta CN: Algae as a source of phycocyanin and other industrially important pigments. U *Algae Biorefinery: An Integrated Approach*, str. 253-276. Springer International Publishing, Cham, Švicarska, 2015.

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

Drmić H, Režek Jambrak A: Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2:22-33, 2010.

Fratianni A, Cinquanta L, Panfili G: Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science & Technology* 43:867–871, 2010.

Fung A, Hamid N, Lu J: Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida. Food Chemistry* 136:1055–1062, 2013.

Gabal AAA, Khaled AA, Aboul-Ela HM, Aly HM, Shalaby OK: Variation of photosynthetic pigments and biochemical screening in some seaweeds from Eastern Harbor, Alexandria, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries* 25:213-226, 2021.

Geertz-Hansen O, Enríquez S, Duarte CM, Agustí S, Vaqué D, Vidondo B: Functional implications of the form of Codium bursa, a balloon-like Mediterranean macroalga. *Marine Ecology Progress Series* 108:153-160, 1994.

Guiry MD, Guiry GM: *AlgaeBase. World-wide electronic publication.* National University of Ireland, Galway, 2021. http://www.algaebase.org [23.5.2022.]

Heffernan N, Smyth TJ, FitzGerald RJ, Villa-Soler A, Brunton N: Antioxidant activity and phenolic content of pressurized liquid and solid-liquid extracts from four Irish origin macroalgae*. International Journal of Food Science and Technology* 49: 1765–1772, 2014.

Hegazi MM, Perez-Ruzafa A, Almela L, Candela ME: Separation and identification of chlorophylls and carotenoids from *Caulerpa prolifera*, *Jania rubens* and *Padina pavonica* by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 829:153–159, 1998.

Jaeschke DP, Rech R, Marczak LDF, Mercali GD: Ultrasound as an alternative technology to extract carotenoids and lipids from *Heterochlorella luteoviridis*. *Bioresource Technology* 224:753-757, 2017.

Jerković I, Kranjac M, Marijanović Z, Šarkanj B, Cikoš AM, Aladić K, Pedisić S, Jokić S: Chemical Diversity of Codium bursa (Olivi) C. Agardh Headspace Compounds, Volatiles, Fatty Acids and Insight into Its Antifungal Activity. *Molecules* 24:842-858, 2019.

Kadam SU, O'Donnell CP, Rai DK, Hossain MB, Burgess CM, Walsh, Tiwari BK: Laminarin from irish brown seaweeds ascophyllum nodosum and laminaria hyperborea: ultrasound assisted extraction, characterization and bioactivity. *Marine Drugs* 13: 4270–4280, 2015.

Kanazawa K, Ozaki Y, Hashimoto T, Swadesh K, Das S, Matsushita M, Hirano T, Okada AK, Mori N, Nakatsuka M: Commercial-scale Preparation of biofunctional fucoxanthin from waste parts of brown sea algae *Laminaria japonica. Food Science & Technology Research* 14:573-582, 2008.

Karpinski TM, Adamczak A: Fucoxanthin–an antibacterial carotenoid. *Antioxidants* 8:239, 2019.

Kim SM, Jung YJ, Kwon ON, Cha KH, Um BH, Chung D, Pan CHA: Potential commercial source of fucoxan-thin extracted from the microalga Phaeodactylum tricornutum. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 166:1843–1855, 2012.

Kiridžija M: Upotreba alga u proizvodnji biogoriva. *Završni rad.* Odjel za biologiju, Osijek, 2017.

Koletić N: Alge u biotehnologiji. *Završni rad.* Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2011.

Kranjac M, Zekić M, Radonić A, Marijanović Z, Jokić S, Jerković I: BioProspecting Jadranskog mora: Pregled dosadašnjih istraživanja isparljivih organskih spojeva. *Kemija u Industriji* 69: 521-529, 2020.

Kuczynska P, Jemiola-Rzeminska M, Strzalka K: Photosynthetic pigments in diatoms. *Marine Drugs* 13:5847-5881, 2015.

Lalegerie F, Gager L, Stiger-Pouvreau V, Connan S: The stressful life of red and brown seaweeds on the temperate intertidal zone: effect of abiotic and biotic parameters on the physiology of macroalgae and content variability of particular metabolites. U *Advances in Botanical Research—Seaweeds around the World: State of Art and Perspectives*, str.247-287. Elsevier, London, Ujedinjeno kraljevstvo, 2020.

Lee SH, Kang MC, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ: Potential use of ultrasound in antioxidant extraction from Ecklonia cava. *Algae* 28:371–378, 2013.

Lim SJ, Wan Aida WM: Extraction of sulfated polysaccharides (fucoidan) from brown seaweed. U *Seaweed* str. 1-24. Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, 2017.

Lichtenthaler HK, Buschmann C: Chlorophylls and carotenoids – Measurement and characterisation by UV-VIS. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1:F431-F438, 2001.

Mahadevan K: Seaweeds: A sustainable food source. U *Seaweed Sustainability*, str. 347-364. Elsevier, London, Ujedinjeno Kraljevstvo, 2015.

Mangialajo L, Chiantore M, Cattaneo-Vietti R: Loss of fucoid algae along a gradient of urbanisation, and structure of benthic assemblages. *Marine Ecology Progress Series* 358:63–74, 2008.

Martins I, Oliveira JM, Flindt MR, Marques JC: The effect of salinity on the growth rate of the macroalgae *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) in the Mondego estuary (west Portugal). *Acta Oecologica* 20:259–265, 1999.

Martins M, Fernandes APM, Torres-Acosta MA, Collen PN, Abreu MH, Ventura SPM: Extraction of chlorophyll from wild and farmed *Ulva* spp. using aqueous solutions of ionic liquids. *Separation and Purification Technology* 254:117589, 2021a

Martins M, de Souza Mesquita LM, Vaz BMC, Dias ACRV, Torres-Acosta MS, Queguineur B, Coutinho JAP, Ventura SPM: Extraction and Fractionation of Pigments from *Saccharina latissima* (Linnaeus, 2006) Using an Ionic Liquid + Oil + Water System. ACS Sustainable *Chemistry & Engineering* 9:6599-6612, 2021b

Matanić J: Izolacija pigmenata iz alge Cystoseira primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. *Diplomski rad.*Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2018.

Marques R, Cruz S, Calado R, Lillebo A, Abreu H, Pereira R, Pitarma B, da Silva JM, Cartaxana P: Effects of photoperiod and light spectra on growth and pigment composition of the green macroalga *Codium tomentosum. Journal of Applied Phycology* 33:471-480, 2021.

Maschek JA, Baker BJ: The Chemistry of Algal Secondary Metabolism. U *Algal Chemical Ecology*, str. 1-24. Springer, Berlin, Njemačka, 2008.

Mujić I, Jokić S: Ostale suvremene metode ekstrakcije. U *Ekstrakcija i ekstraktori biljnih sirovina,* str. 47-48. Studio HS internet d.o.o., Osijek, 2018.

Nazarudin MF, Alias NH, Sharifuddin N, Abidin AZ, Ahmad MI, Mazli NAIN, Natrah I, Aliyu-Paiko M, Isha A: Preliminary Evaluation of the Biochemical and Antioxidant Properties of Seaweed Species Predominantly Distributed in Peninsular Malaysia. *Journal of Fisheries and Environment* 45:119-133, 2021.

Nunes N, Leça JM, Pereira AC, Pereira V, Ferraz S, Barreto MC, Marques JC, de Carvalho MAAP: Evaluation of fucoxanthin contents in seaweed biomass by vortex-assisted solid-liquid microextraction using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Algal Research* 42:101603, 2019.

Okai Y, Hiqashi-Okai K: Potent anti-inflammatory activity of pheophytin *a* derived from edible green alga, *Enteromorpha prolifera* (Sujiao-nori). *International Journal of Immunopharmacology* 19:355-358, 1997.

MCConnell OMM, Fenical W: Halogen chemistry of the Red algae Asparagopsis. *Phytochemistry* 16: 367-374, 1977.

Parapurath SN, Bernard HE, Subramaniamc DM, Ramamurthy R: A Dimensional investigation on seaweeds: their biomedical and industrial applications. U *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology*, str. 532-540. Wiley, Hoboken, Njemačka, 2012.

Parniakov O, Apicella E, Koubaa M, Barba FJ, Grimi N, Lebovka N, Pataro G, Ferrari G, Vorobiev E: Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae *Nannochloropsis* spp. *Bioresource Technology* 198:262–267, 2015.

Patist A, Bates D: Ultrasonic Innovations in the Food Industry: From the Laboratory to Commercial Production. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 9:147-154, 2008.

Pavlić B: Valorizacija sporednog proizvoda žalfije (*Salvia officinalis* L.) u cilju dobijanja bioaktivnih jedinjenja savremenim tehnikama ekstrakcije. *Disertacija*. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2017.

Pereira H, Barreira L, Figueiredo F, Custodio L, Vizetto-Duarte C, Polo C, Rešek E, Engelen A, Varela J: Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications. *Marine Drugs* 10:1920–1935, 2012.

Pingret D, Fabiano-Tixier AS, Chemat F: Degradation during application of ultrasound in food processing: a review. *Food Control* 31:593–606, 2013.

Plaza M, Santoyo S, Jaime L, Avalo B, Cifuentes A, Reglero G, García-Blairsy Reina G, Señorans FJ, Ibáñez E: Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from Chlorella vulgaris. *LWT—Food Science and Technology* 46:245-253, 2012.

Radman S, Cikoš AM, Flanjak I, Babić S, Čižmek L, Šubarić D, Čož-Rakovac R, Jokić S, Jerković I: Less Polar Compounds and Targeted Antioxidant Potential (In Vitro and In Vivo) of *Codium adhaerens* C. Agardh 1822. *Pharmaceuticals* 14, 2021.

Raguraman V, Abraham L, Mubarakali D, Narendrakumar G, Thirugnanasambandam R, Kirubagaran R, Thajuddin N: Unraveling rapid extraction of fucoxanthin from *Padina tetrastromatica*: Purification, characterization and biomedical application. *Process Biochemistry* 73:211-219, 2018.

Rey F, Cartaxana P, Melo T, Calado R, Pereira R, Abreu H, Domingues P, Cruz S, Domingues MR: Domesticated Populations of Codium tomentosum Display Lipid Extracts with Lower Seasonal Shifts than Conspecifics from the Wild—Relevance for Biotechnological Applications of this Green Seaweed. *Marine drugs* 18:188-207, 2020.

Rodrigues D, Sousa S, Silva A, Amorim M, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Gomes AMP, Duarte AC, Freitas AC: Impact of enzyme- and ultrasound-assisted extraction methods on biological properties of red, brown and green seaweeds from the central west coast of portugal. *Journal of Agicultural and Food Chemistry* 63:3177–3188, 2015.

Sartal CG, Alonso MC, Barrera PB: Application of seaweeds in the food industry. U *Handbook of marine macroalgae: biotechnology and applied phycology* str. 522-531. Wiley, Hoboken, Njemačka, 2012.

Soares AT, Marques Júnior JG, Lopes RG, Derner RB, Antoniosi Filho NR: Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. Microalgae*. Journal of the Brazilian Chemical Society* 277:1083-1093, 2016.

Stipanović N: Isparljivi organski spojevi invanzivne crvene alge Asparagopsis taxiformis (Rhodophyta): halogenirani ugljikovodici. *Diplomski rad*. Kemijsko-tehnološki fakultet, Split, 2020.

Sugawara T, Baskaran V, Tsuzuki W, Nagao A: Brown algae fucoxanthin is hydrolyzed to fucoxanthinol during absorption by Caco-2 human intestinal cells and mice. *The Journal of Nutition* 132:946-951, 2002.

Sumanta N, Haque CI, Nishika J, Suprakash R: Spectrophotometric Analysis of Chlorophylls and Carotenoids from Commonly Grown Fern Species by Using Various Extracting Solvents. *Research Journal of Chemical Sciences* 4:63-69, 2014.

Sun Y, Ma G, Ye X, Kakuda Y, Meng R: Stability of all-*trans*-β-carotene under ultrasound treatment in a model system: effects of different factors, kinetics and newly formed compound. *Ultrasonics Sonochemistry* 17:654–661, 2010.

Terasaki M, Kawagoe C, Ito A, Kumon H, Narayan B, Hosokawa M, Miyashita K: Spatial and seasonal variations in the biofunctional lipid substances (fucoxanthin and fucosterol) of the laboratory-grown edible Japanese seaweed (*Sargassum horneri* Turner) cultured in the open sea. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24:1475-1482, 2017.

Thomas NV, Kim SK: Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32:325–335, 2011.

Topuz OK, Gokoglu N, Yerlikaya P, Ucak I, Gumus B: Optimization of Antioxidant Activity and Phenolic Compound Extraction Conditions from Red Seaweed (Laurencia obtuse). *Journal of Aquatic Food Products Technology* 25:414–422, 2016.

Torres FAE, Passalacqua TG, Velásquez AMA, De Souza RA, Colepicolo P, Graminha MAS: New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: A review. *Revista Brasileira Farmacognosia* 24: 265–276, 2014.

Wang HD, Chen CC, Huynh P, Chang JS: Exploring the potential of using algae in cosmetics. *Bioresource Technology* 184:355-362, 2015.

Xu SY, Huang X, Cheong KL: Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine Drugs* 15:388, 2017.

Yalçın S, Karakaş Ö, Okudan ES, Başkan KS, Çekiç SD, Apak R: HPLC Detection and Antioxidant Capacity Determination of Brown, Red and Green Algal Pigments in Seaweed Extracts. *Journal of Chromatographic Science* 59:325-337, 2021.

Yang F, Wei Z, Long L: Transcriptomic and physiological responses of the tropical reef calcified macroalga *Amphiroa fragilissima* to elevated temperature. *Journal of Phycology* 57:1254-1265, 2021.

Zhang R, Yuen AKL, de Nys R, Masters AF, Maschmeyer T: Step by step extraction of bio-actives from the brown seaweeds, *Carpophyllum flexuosum*, *Carpophyllum plumosum*, *Ecklonia radiata* and *Undaria pinnatifida*. *Algal Research* 52:102092, 2020.

Zhao C, Yang C, Liu B, Lin L, Sarker SD, Nahar L, Yu H, Cao H, Xiao J: Bioactive compounds from marine macroalgae and their hypoglycemic benefits. *Trends in Food Science and Technology* 72: 1–12, 2018.

Zhu Z, Wu Q, Di X, Li S, Barba F, Koubaa M, Roohinejad S, Xiong X, He J: Multistage

recovery process of seaweed pigments: Investigation of ultrasound assisted extraction and ultra-filtration performances. *Food and Bioproducts Processing* 104:40-47, 2017.