



UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET



Potencijal cijanobakterija u formulaciji prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Gordana Ćetković
dr Aleksandra Mišan

Kandidat:

Ivan Milovanović, dipl. biohem.

Novi Sad, 2016. godine

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
Технолошки факултет

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivan Milovanović
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Gordana Četković, redovni profesor dr Aleksandra Mišan, naučni savetnik
Naslov rada: NR	Potencijal cijanobakterija u formulaciji prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

Fizički opis rada: FO	6 poglavlja i prilog, 152 stranice, 47 slika, 16 tabela, 242 reference
Naučna oblast: NO	Biotehničke nauke
Naučna disciplina: ND	Prehrambeno inženjerstvo
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Cijanobakterije, hemijska karakterizacija, ekstrakcija, hiperlipidemija
UDK	
Čuva se: ČU	U biblioteci Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, Bul. cara Lazara 1, 21000 Novi Sad
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	U okviru disertacije je ispitan hemijski sastav odabranih cijanobakterijskih sojeva roda <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> i <i>Spirulina</i> , kao i uticaj azota na sastav rodova <i>Anabaena</i> i <i>Nostoc</i> . U ispitivanim sojevima određen je sadržaj lipida, proteina, mineralnih materija, sastav i sadržaj lakoisparljivih jedinjenja, aminokiselina i masnih kiselina. U heksanskim i metanolno/vodenim ekstraktima sojeva određen je sadržaj ukupnih fenola, sastav i sadržaj karotenoida i proteinskih pigmenata, kao i antioksidativni potencijal ekstrakata prema DPPH radikal. Takođe, ispitan je antihiperlipidemijski potencijal roda <i>Spirulina</i> S2 u biološkom ogledu, pri čemu je određen nivo ukupnog holesterola, LDL i HDL čestica, izračunati su relevantni biohemijski markeri hiperlipidemije, kao i koncentracija ALS i AST u plazmi eksperimentalnih životinja. Određen je hemijski sastav fecesa eksperimentalnih životinja, kao i sadržaj holesterola i sastav i sadržaj žučnih kiselina u fecesu. Dobijeni rezultati ukazuju na veliki potencijal biotehnoške primene ispitivanih sojeva, a takođe predstavljaju važna saznanja o pomenutim cijanobakterijskim sojevima.
Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	03.03.2016.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>Prof. dr Jelica Simeunović, vanredni profesor, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, predsednik Prof. dr Gordana Četković, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor dr Aleksandra Mišan, naučni savetnik, Naučni institut za prehrambene tehnologije, Univerzitet u Novom Sadu, mentor Prof. dr Jasna Čanadanović-Brunet, redovni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, član</p>
---	---

University of Novi Sad
Faculty of Technology
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Ivan Milovanović
Mentor: MN	Gordana četković, PhD, professor Aleksandra Mišan, PhD, principal research fellow
Title: TI	Potential of cyanobacteria in formulation of value-added food products
Language of text: LT	Serbian, latin
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia

Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Serbia, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Physical description: PD	6 chapters and annex, 152 pages, 47 figures, 16 tables, 242 references
Scientific field SF	Biotechnical sciences
Scientific discipline SD	Food engineering
Subject, Key words SKW	Cyanobacteria, chemical characterization, extraction, hyperlipidemia
UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology, Novi Sad
Note: N	
Abstract: AB	In this thesis, the chemical composition of the selected strains of cyanobacteria belonging to <i>Anabaena</i> , <i>Nostoc</i> and <i>Spirulina</i> genus was determined. Influence of nitrogen addition on the chemical composition of <i>Anabaena</i> and <i>Nostoc</i> strains has also been investigated. Content of lipids, crude protein, and minerals, as well as composition and content of volatile organic compounds, amino acids, fatty acids was determined in the investigated strains. Total phenolic content and composition and content of carotenoids, protein pigments and antioxidative action toward DPPH radical was determined in the hexane and methanol/water extracts of the investigated strains. Antihyperlipidemic potential of the <i>Spirulina</i> S2 strain was investigated in a biological assay, and content of total cholesterol, LDL and HDL was determined in plasma of the experimental animals, which allowed calculation of relevant biochemical parameters for hyperlipidemia. ALT and AST concentrations were also determined in the plasma of the experimental animals. Chemical composition, as well as content of cholesterol and composition and content of bile acids in the feces of the experimental animals was also determined. The obtained results indicate a very good potential of the investigated strains for use in biotechnology and creation of functional food products, and also represent important scientific findings about the

	investigated cyanobacterial strains.
Accepted on Senate on: AS	03 rd March 2016
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>Jelica Simeunović, PhD, assistant professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences and Mathematics, University of Novi Sad, chairman</p> <p>Gordana Četković, PhD, professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, mentor</p> <p>Aleksandra Mišan, PhD, principal research fellow, Institute of Food Technology, University of Novi Sad, mentor</p> <p>Jasna Čanadanović-Brunet, PhD, professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member</p>

Ovu stranu bih želeo da iskoristim da se zahvalim svima koji su pomogli prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se Prof. dr Gordani Četković, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na ukazanom interesovanju i nesebičnoj pomoći tokom izrade ove disertacije. Takođe se zahvaljujem dr Aleksandri Mišan, naučnom savetniku pri Naučnom Institutu za Prehrambene tehnologije u Novom Sadu, na nesebičnoj pomoći, saradnji i prijateljstvu tokom zajedničkog rada i izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se Prof. dr Jelici Simeunović, vanrednom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta na pokazanom interesovanju za ovaj rad, kao i za stručne savete i pomoć u vezi cijanobakterijskih sojeva upotrebljenih u ovom radu. Takođe se zahvaljujem Prof. dr Jasni Čanadanović-Brunet, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, na pokazanom interesovanju za ovaj rad i savetima tokom izrade disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem i dr Anamariji Mandić, naučnom savetniku pri Naučnom Institutu za Prehrambene Tehnologije u Novom Sadu, za rukovođenje projektom TR31029 u okviru kog je nastala ideja i sredstva za ostvarenje ove disertacije.

Zahvalnost dugujem i Dajani Kovač na pomoći i savetima, kao i svim kolegama na Naučnom Institutu za Prehrambene Tehnologije u Novom Sadu na pomoći, podršci i prijateljstvu koje su mi pružili tokom izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se zaposlenima na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, Kliničkom centru Vojvodine, Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu i Fakulteta za hemiju i tehnologiju u Pragu (VSCHT) koji su učestvovali u pojedinim delovima rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Porodici i prijateljima dugujem ogromnu zahvalnost zbog velike podrške i pomoći tokom rada na ovoj doktorskoj disertaciji.

Sadržaj

1.	Uvod	1
2.	Opšti deo.....	3
2.1.	Izazovi u savremenoj proizvodnji hrane	3
2.1.1.	Funkcionalna hrana.....	4
2.2.	Metabolički sindrom	7
2.2.1.	Patofiziologija metaboličkog sindroma	8
2.2.2.	Uloga ishrane u terapiji metaboličkog sindroma.....	13
2.2.3.	Antioksidanti.....	14
2.2.4.	Lipidi	19
2.3.	Cijanobakterije	24
2.3.1.	Klasifikacija cijanobakterija	25
2.3.2.	Ekološka rasprostranjenost i biologija cijanobakterija.....	27
2.3.3.	Metabolizam i organele.....	28
2.3.4.	Cijanobakterije roda <i>Spirulina</i>	30
2.3.5.	Cijanobakterije roda <i>Nostoc</i>	31
2.3.6.	Cijanobakterije roda <i>Anabaena</i>	32
2.4.	Hemijski sastav cijanobakterija sa nutritivnog aspekta.....	33
2.4.1.	Nutrijenti	33
2.4.2.	Pigmenti.....	38
2.4.3.	Cijanotoksini	40
2.5.	Primena cijanobakterija u ishrani.....	41
2.5.1.	Primena u ishrani ljudi.....	41
2.5.2.	Primena u kreiranju funkcionalne hrane.....	43
2.5.3.	Primena u ishrani životinja	44
3.	Materijal i metode.....	46
3.1.	Hemikalije i reagensi.....	46
3.1.1.	Uzorci cijanobakterija i materijal za biološki ogled.....	47

3.2. Hemijska karakterizacija biomase cijanobakterija	49
3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih proteina.....	49
3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih lipida	49
3.2.3. Određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)- fluoridom metodom gasne hromatografije (CG-FID).....	50
3.2.4. Određivanje hemijskog profila lako isparljivih jedinjenja metodom gasne hromatografije (Headspace GC-MSD)	51
3.2.5. Određivanje hemijskog profila lako isparljivih jedinjenja metodom dvodimenzionalne gasne hromatografije (SPME Headspace GC×GC-TOFMS)	52
3.2.6. Određivanje sadržaja metala metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS).....	53
3.2.7. Hidroliza uzoraka i određivanje aminokiselinskog sastava metodom tečne hromatografije (HPLC-DAD/FLD)	54
3.3. Ekstrakcija i hemijska karakterizacija ekstrakata	56
3.3.1. Ekstrakcija pomoću rastvarača pod povišeni pritiskom (Accelerated Solvent Extraction, ASE)	56
3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	57
3.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale primenom spektrofotometrijske metode.....	58
3.3.4. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja karotenoidnih jedinjenja primenom tečne hromatografije (HPLC-DAD)	60
3.3.5. Određivanje sastava i sadržaja proteinskih pigmenata primenom spektrofotometrijske metode.....	60
3.4. Biološki ogled.....	61
3.4.1. Biološki ogled na laboratorijskim pacovima primenom soja <i>Spirulina platensis</i> u ishrani.....	61
3.4.2. Određivanje sadržaja holesterola u fecesu pacova metodom tečne hromatografije (HPLC-DAD).....	62
3.4.3. Određivanje ukupne kalorijske vrednosti fecesa kalorimetrom	64
3.4.4. Određivanje sadržaja žučnih kiselina metodom tečne hromatografije (HPLC- ELSD).....	64
3.4.5. Automatizovane enzimске metode za određivanje ukupnog holesterola (TC), lipoproteinskih frakcija (HDL, LDL), ukupnih triglicerida (TG), alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST) u plazmi	65

3.5.	Statistička obrada podataka	65
4.	Rezultati i diskusija	66
4.1.	Hemijski sastav biomase cijanobakterija	66
4.1.1.	Sadržaj masti i proteina	66
4.1.2.	Sastav masnih kiselina	68
4.1.3.	Aminokiselinski sastav cijanobakterija	72
4.1.4.	Sadržaj mineralnih materija	75
4.1.5.	PCA analiza hemijskog sastava uzoraka sojeva <i>Nostoc</i> i <i>Anabaena</i>	78
4.1.6.	Hemijski profil lakoisparljivih jedinjenja (Headspace GC-MSD)	80
4.1.7.	Hemijski profil lakoisparljivih jedinjenja (Headspace SPME GCxGC-TOFMS)	84
4.2.	Ekstrakcija i hemijska karakterizacija ekstrakata	91
4.2.1.	Sastav i sadržaj proteinskih pigmenata	91
4.2.2.	Sadržaj ukupnih fenola u metanolno/vodenim ekstraktima	93
4.2.3.	HPLC analiza sastava i sadržaja karotenoida u heksanskim ekstraktima	95
4.2.4.	Antioksidativna aktivnost metanolno/vodenih i heksanskih ekstrakata	98
4.3.	Biološki ogled sa laboratorijskim pacovima	101
4.3.1.	Biohemijski markeri hiperlipidemije	101
4.3.2.	Hemijski sastav fecesa, sadržaj holesterola i žučnih kiselina	104
5.	Zaključci	110
6.	Literatura	117
7.	Prilog	138

1. Uvod

Tokom poslednjih pet decenija ljudska populacija se praktično udvostručila, ali je došlo i do velikog porasta u proizvodnji hrane u svetu, što je rezultiralo smanjenjem broja ljudi direktno pogođenih glađu (Godfraz i sar., 2010). I pored toga što je energetska unos zadovoljen, veliki broj studija ukazuje na neadekvatan unos nutrijenata kod velikog dela ljudske populacije, tako da ovaj vid „gladi“ nameće potrebu za iznalaženjem novih i alternativnih izvora nutrijenata koji će ih učiniti široko dostupnim. Obzirom na to da mnogi alternativni izvori proteina biljnog porekla (leguminoze, soja) pokazuju veću isplativost i ekološku održivost u odnosu na klasične izvore proteina kao što je meso i mleko životinja, poslednjih godina sve je izraženiji trend supstitucije proteina životinjskog porekla biljnim i drugim proteinima u prehrambenim proizvodima (Fresco, 2009).

Paralelno sa porastom u proizvodnji hrane dešavala se i promena u svesti potrošača na način da je sve veći broj potrošača svestan uticaja ishrane na zdravlje (Mollet i Rowland, 2002).

Izazovi koji se nameću porastom broja stanovnika, skrivenom glađu i promenom u svesti potrošača doveli su do intenzivnih istraživanja na polju iznalaženja alternativnih izvora nutrijenata i biomolekula kao što su alge, a sve više i mikroalge i cijanobakterije. Danas se smatra da su ovi organizmi odličan izvor brojnih biomolekula koji potencijalno mogu ući u sastav funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Plaza i sar., 2009).

Cijanobakterije se koriste u ljudskoj ishrani od drevnih vremena. One predstavljaju važan izvor minerala, vitamina, proteina, polinezasićenih masnih kiselina, antioksidanata, itd. čiji biotehnološki potencijal nije dovoljno istražen (Blaženčić, 2007; Gouveia i sar., 2006). Sa druge strane, imajući u vidu trenutno stanje proizvodnje hrane i hrane za životinje u svetu koje karakterišu opasnost od klimatskih promena, neodrživi vidovi zemljoradnje i uzgoja životinja i zagađenost velikog dela rezervi pijaće vode, upotreba ovih organizama može biti odličan odgovor na mnoge od izazova moderne biotehnologije.

Polazeći od pretpostavke da bi dodavanje nutrijenata i biokativnih materija poreklom iz cijanobakterija u prehrambene proizvode značajno unapredilo njihov nutritivni i zdravstveni potencijal, a uzimajući u obzir sve gore navedene relevantne faktore, u okviru ove doktorske disertacije postavljeni su sledeći **ciljevi**:

- da se na bazi detaljne hemijske karakterizacije odabranih sojeva rodova *Spirulina*, *Nostoc* i *Anabaena* izvrši odabir soja najbogatijeg nutrijentima i određenim bioaktivnim materijama;

- da se ispituju razlike u hemijskom sastavu koje nastaju promenom uslova sredine (uticaj dodatka azota u hranljivu podlogu) kod odabranih sojeva;
- da se ispita antihiperlipidemijski potencijal odabranog soja u *in vivo* eksperimentu na pacovima.

U skladu sa postavljenim ciljevima definisani su i **zadaci**:

Detaljna hemijska analiza odabranih sojeva gajenih na podlozi sa i bez azota

- određivanje hemijskog sastava (sadržaja lipida, proteina i makro- i mikroelemenata) ispitivanih sojeva cijanobakterija,
- detaljnija hemijska analiza sastava nutrijenata, koja je uključivala određivanje sastava aminokiselina, masnih kiselina i lakoisparljivih jedinjenja odgovarajućim hromatografskim metodama,
- ekstrakcija ispitivane biomase (ubrzana ekstrakcija pod uslovima visokog pritiska) i analiza sastava i sadržaja karotenoidnih jedinjenja, ukupnih fenola i proteinskih pigmenta u dobijenim ekstraktima odgovarajućim hromatografskim i spektrofotometrijskim metodama,
- statistička obrada rezultata hemijskog sastava sojeva *Nostoc* i *Anabaena* gajenih pod različitim uslovima (sa i bez dodatka azota u hranljivu podlogu).

Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

- određivanje antiradikalske aktivnosti pomoću testa redukcije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikala (DPPH) i ispitivanje je korelacija dobijenih rezultata sa sadržajem pojedinih jedinjenja za koja je poznato da poseduju antioksidativno delovanje.

Biološki eksperiment na eksperimentalnim životinjama

- ispitivanje parametara lipidnog statusa u plazmi eksperimentalnih životinja primenom enzimatskih metoda,
- ispitivanje sadržaja holesterola i žučnih kiselina u fecesu eksperimentalnih životinja primenom odgovarajućih hromatografskih metoda,
- ispitivanje hemijskog sastava i ukupnog energetskeg sadržaja fecesa.

2. Opšti deo

2.1. Izazovi u savremenoj proizvodnji hrane

Tokom poslednjih pet decenija, veliki rast proizvodnje hrane u svetu rezultirao je smanjenjem broja ljudi pogođenih glađu, uprkos činjenici je u istom periodu ljudska populacija praktično udvostručena (Godfraz i sar., 2010). Uprkos tome, jedna od sedam osoba u svetu i danas nema pristup adekvatnom energetsom i proteinskom unosu, a smatra se da još veći broj pati od nedostatka pojedinih mikronutrijenata u svakodnevnoj ishrani (FAO, 2009). Procenjeno je da će svetska populacija nastaviti sa rastom do procenjenog broja od oko devet milijardi ljudi do sredine ovog veka. Veruje se da će sa postepenim usporavanjem rasta populacije doći do promena u smislu povećanja kupovne moći koje sa sobom nosi rast potrošnje, kao i povećanu potražnju za prerađenom hranom, mesom, mlečnim proizvodima i ribom, što zajedno vrši veliki pritisak na prirodno okruženje (Godfraz i sar., 2010). Istovremeno, proizvođači hrane se suočavaju sa sve većim ograničenjima po pitanju raspoloživih površina, vode i energije, dok se pred njih postavljaju zahtevi vezani za smanjenje negativnog uticaja proizvodnje hrane na životnu sredinu (Tilman i sar., 2001).

Izazovi koji se postavljaju pred proizvođače hrane u svetu mogu se sažeti u tri osnovna zahtava (Schmidhuber i Tubiello, 2007):

- usklađivanje promenljivih zahteva većeg dela populacije za hranom sa njenom proizvodnjom i isporukom,
- obezbeđenje ekološke i društvene održivosti sistema snabdevanja hrane,
- obezbeđenje nutritivne sigurnosti najugroženijeg dela populacije.

Navedeni izazovi zahtevaju radikalne promene u načinu proizvodnje, prerade, čuvanja i distribucije hrane u odnosu na dosadašnju praksu. Iako je cena hrane na globalnom nivou znatno opala tokom XX veka, tokom poslednjih godina može se uočiti porast cena pojedinih grupa namirnica, što ukazuje na potencijalnu nestabilnost ovog tržišta nastalu usled povećane tražnje na svetskim tržištima u razvoju, kao i takmičenja sa proizvodnjom prve generacije biogoriva (Royal Society of London, 2008). Povećanje cena hrane može delovati stimulatивно na investicije u proizvodnju hrane. Ključna važnost hrane za ljudsko zdravlje i političku i socijalnu stabilnost je faktor koji može uticati na vlade i organizacije da podrže proizvodnju hrane koja neće biti uslovljena isključivo pragmatičnim tržišnim pravilima (Skidelsky, 2009). Rešavanje modernih izazova vezanih za proizvodnju hrane takođe uključuje i inovacije na polju energetike, primene informacionih tehnologija, kao i primenu

novih saznanja na poljima medicinskih, biotehničkih i farmaceutskih nauka. Takođe, u obzir se mora uzeti i trend zahteva pojedinih korisnika za individualno kreiranim namirnicama i režimima ishrane (Fresco, 2009).

Poznato je da raznovrsnost konzumirane hrane, obrasci unosa namirnica, kao i zdravstvene posledice nepravilne ishrane u populaciji variraju sa promenom indikatora socio-ekonomskih činioca, kao što je novčani prihod (Nikolić i sar., 2014). Ljudi nižeg socio-ekonomskog statusa često konzumiraju namirnice lošijeg kvaliteta od dobrostojećeg dela iste populacije, njihova ishrana je češće bazirana na visokoenergetskim namirnicama koje su siromašnije esencijalnim nutrijentima, što za posledicu ima negativne zdravstvene posledice (Darmon i Drwenowski, 2008; Nikolić i sar., 2014). Raznovrsna ishrana namirnicama prirodnog porekla (npr. voće i povrće, cerealijske celog zrna), kao i obogaćenim/fortifikovanim namirnicama koje bi unapredile zdravlje populacije često je cenovno nedostupno populaciji sa nižim primanjima u Evropi (Nikolić i sar., 2014). Iz navedenih razloga, mnoge međunarodne zdravstvene organizacije insistiraju na većoj dostupnosti nutritivno vredne hrane za socijalno ugrožene populacije (WHO, 2012). Prema sprovedenim analizama dostupnih naučnih podataka, ishranu evropske populacije sa nižim prihodima karakteriše deficitaran unos proteina (Swan, 2004), gvožđa (Haggarty i sar., 2009) i vitamina A i D3 (Nelson i sar., 2007).

Iz navedenih razloga, upotreba novih i alternativnih izvora nutrijenata predstavlja zanimljivu mogućnost u proizvodnji hrane. Obzirom na to da mnogi alternativni izvori proteina biljnog porekla (leguminoze, soja) pokazuju veću isplativost i ekološku održivost u odnosu na klasične izvore proteina kao što je meso i mleko životinja, poslednjih godina sve je izraženiji trend supstitucije proteina životinjskog porekla biljnim i drugim proteinima u prehrambenim proizvodima (Fresco, 2009). Kombinovanje navedenog pristupa, zamene pojedinih nutrijenata alternativnim izvorima, sa potrebama za hranom koja će povoljno delovati na ljudsko zdravlje, otvara mogućnost za nastanak čitave grupe novih funkcionalnih prehrambenih proizvoda kao odgovor na izazove koje postavlja ishrana populacije u XXI veku.

2.1.1. Funkcionalna hrana

Tokom poslednjih decenija zahtevi potrošača po pitanju proizvodnje hrane značajno su promenjeni, a sve veći broj potrošača svestan je uticaja ishrane na zdravlje (Mollet i Rowland, 2002). Od prehrambenih proizvoda danas se očekuje ne samo da utole glad i potrebu za osnovnim nutrijentima potrošača, već i da imaju ulogu u prevenciji pojedinih bolesti i poremećaja, kao i da poboljšaju fizičko i mentalno blagostanje (Takachi i sar., 2008). Prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije, pojedine navike u ishrani, kao i

u stilu života, predstavljaju glavne izmenjive faktore rizika za razvoj koronarnih oboljenja, kancera, dijabetesa tipa 2, gojaznosti, osteoporoze i peridontalne bolesti (WHO, 2003). Povećano interesovanje za namirnicama koje mogu delovati povoljno na zdravlje može se objasniti sa više faktora, kao što je povećana cena zdravstvene zaštite, produžen prosečni životni vek ljudi u razvijenim zemljama, kao i želja starijih ljudi za visokim kvalitetom života u poznim godinama (Kotilainen, 2006).

Koncept funkcionalne hrane nastao je 1980-tih godina u Japanu, za prehrambene proizvode obogaćene konstituentima koji poseduju povoljne zdravstvene efekte. Ovaj koncept razvijen je od strane japanskih naučnika koji su proučavali odnos između ishrane, senzornog utiska fortifikacije hrane i modulacije fizioloških sistema (Siro i sar., 2008). Japansko Ministarstvo zdravlja je 1991. godine izdalo pravila za odobrenje specifične grupe prehrambenih proizvoda nazvanih FOSHU (Food for Specific Health Uses, hrana za specifičnu zdravstvenu namenu) koja su uključivala određivanje specifičnih zdravstvenih izjava (eng. health claims) za ovaj tip proizvoda (Burdock i sar., 2006). Iako postoje brojne definicije termina funkcionalne hrane, za sada ne postoji jedna univerzalno prihvaćena definicija koja obuhvata sve potencijalne proizvode ovog tipa (Alzamora i sar., 2005). Telo za nauku o funkcionalnoj hrani Evropske Komisije (FuFoSE) definisalo je funkcionalnu hranu na sledeći način: „Prehrambeni proizvod može se smatrati funkcionalnim ukoliko zajedno sa osnovnim nutritivnim uticajem poseduje i povoljno delovanje na jednu ili više funkcija ljudskog organizma, tako da ili poboljšava opšte fizičko ili mentalno stanje ili/i smanjuje rizik od nastanka bolesti. Uneta količina i oblik funkcionalnog proizvoda treba da bude ista kao pri normalnom dijetetskom unosu, tako da ne može biti unošen u obliku kapsule ili pilule, već samo u obliku normalne hrane (Siro i sar., 2008).

Evropska regulativa ne posmatra funkcionalnu hranu kao posebnu kategoriju hrane već kao koncept (Stanton i sar., 2005). Samim tim, zakonske regulative koje se odnose na ovakve proizvode su brojne i zavise prvenstveno od tipa prehrambenog proizvoda. Opšta evropska regulativa o hrani važi za sve vrste hrane. Takođe, uredba o dijetetskoj hrani, uredba o genetski modifikovanim organizmima (GMO), dijetetskim suplementima i novoj hrani se takođe mogu odnositi na funkcionalne proizvode, u zavisnosti od njihove prirode i načina primene. U Evropskoj Uniji (EU), umesto regulativa koje se odnose na određenu grupu proizvoda, razvijene su legislative koje ograničavaju upotrebu zdravstvenih izjava na pakovanjima proizvoda i u marketingu (EC, 2006). Prema evropskoj regulativi za nutritivne i zdravstvene izjave na prehrambenim proizvodima (EC No. 1924/2006, od 19. januara 2007 god.), izdata je lista odobrenih zdravstvenih izjava za sve zemlje članice EU, a takođe proizvodi koji nose zdravstvenu izjavu moraju da imaju istaknut i nutritivni profil. Zdravstvene izjave mogu biti definisane kao „izjave o funkciji“ i kao „izjave o redukciji rizika od bolesti/prevenciji nastanka bolesti“ (Siro i sar., 2008).

Tržište nutraceutika, suplemenata i svih ostalih proizvoda koji se nalaze negde na granici hrane i leka raste iz dana u dan. Teško je odrediti čvrste granice između konvencionalne, funkcionalne, organski proizvedene hrane, suplemenata i nutraceutika (Mišan i sar., 2013). Stoga se u široki koncept funkcionalne hrane može ubrojati:

- prirodno nutritivno vredna hrana,
- hrana koja je obogaćena funkcionalnim sastojcima,
- hrana iz koje su uklonjene određene supstance,
- hrana u kojoj su izmenjena svojstva pojedinih komponenata,
- hrana u kojoj je bioraspoloživost jedne ili više komponenata modifikovana i
- sve kombinacije navedenih mogućnosti (Mišan i sar., 2013).

Globalno tržište funkcionalne hrane veoma je raznovrsno i neravnomerno raspoređeno u različitim regionima sveta. Na osnovu definicije funkcionalne hrane po kojoj je to hrana u koju su dodati specifični sastojci sa povoljnim uticajem na zdravlje (a da je to pritom naglašeno potrošaču), vrednost globalnog tržišta funkcionalnih proizvoda procenjena je na najmanje 33 milijarde američkih dolara (\$) (Kotilainen i sar., 2006). Tri najveća tržišta funkcionalne hrane su Sjedinjene Američke Države (SAD), EU i Japan, koja zajedno čine oko 90% ukupnog svetskog tržišta (Siro i sar., 2008). Vrednost evropskog tržišta funkcionalne hrane procenjena je na oko 15 milijardi \$ u 2006. godini (Kotilainen i sar., 2006), mada udeo funkcionalne hrane na tržištu hrane i pića ne prelazi 1%. Potrebno je naglasiti da je po pitanju funkcionalnih proizvoda evropsko tržište vrlo heterogeno i postoje izražene regionalne razlike u potražnji i korišćenju funkcionalne hrane. Može se grubo reći da je interesovanje potrošača za funkcionalne proizvode više u centralnoj i severnoj Evropi u odnosu na zemlje Sredozemlja, gde veći broj potrošača ima naviku korišćenja kvalitetne i sveže hrane u ishrani (Van Trijp, 2007).

Uopšteno, troškovi razvoja novog konvencionalnog prehrambenog proizvoda procenjeni su na 1 do 2 miliona \$, dok troškovi razvoja funkcionalnog proizvoda mogu biti značajno viši. Pored resursa i ekspertize u oblasti ishrane i tehnologije proizvodnje, dokazivanje efikasnosti funkcionalnog prehrambenog proizvoda zahteva i ekspertizu iz pojedinih polja medicine (Siro i sar., 2008). Da bi funkcionalna hrana ispunila rigorozne zahteve za naučnu verifikaciju koja bi potvrdila njeno funkcionalno delovanje, neophodno je posedovanje statistički validovanih rezultata dobijenih u ispitivanjima različito konstruisanih model-sistema u epidemiološkim i interventnim studijama na ljudima (Menrad, 2003). Iz ovoga se može zaključiti da proizvođači funkcionalne hrane nemaju jednake mogućnosti za

ostvarivanje prisustva na tržištu. Tržišna prednost je na strani velikih multinacionalnih kompanija koje su vlasnici većeg broja prepoznatljivih brendova za potrošače, a takođe poseduju i velike resurse za razvoj novih proizvoda i njihov marketing (Menrad, 2003). Pored prehrambene industrije, mnoge farmaceutske kompanije takođe sve češće ulaze na tržište funkcionalne hrane, što za posledicu ima značajno preklapanje interesa prehrambenih i farmaceutskih kompanija (Kotilainen i sar., 2006). Na ovaj način formirane su neke od velikih međunarodnih kompanija koje spajaju ove interese, kao što su Novartis Consumer Health, Glaxo SmithKline, Johnson & Johnson ili Abbott Laboratories. Značajna motivacija ovakvih kompanija da investiraju u razvoj funkcionalnih proizvoda ogleda se u znatno kraćem vremenu razvoja i nižim razvojnim troškovima u poređenju sa razvojem novih farmaceutskih proizvoda. Osim toga, farmaceutske kompanije poseduju velike resurse i iskustvo u organizovanju kliničkih istraživanja, što olakšava proces dobijanja zdravstvene izjave za novi funkcionalni proizvod. Sa druge strane, farmaceutske kompanije često ne uspevaju da steknu značajnu poziciju na tržištu funkcionalnih proizvoda u poređenju sa prehrambenim kompanijama iz razloga što imaju često neadekvatan marketinški pristup i neretko inferioran kvalitet samog funkcionalnog proizvoda sa aspekta potrošača (Bech-Larsen i Scholderer, 2007).

Poslednjih decenija, u razvoju funkcionalnih proizvoda sve više figurišu alternativni izvori nutrijenata i biomolekula kao što su alge, a sve više i mikroalge i cijanobakterije. Ovi organizmi su odličan izvor brojnih biomolekula koji potencijalno mogu ući u sastav funkcionalnih prehrambenih proizvoda (Plaza i sar., 2009). Biomasa mikroalgi i cijanobakterija je poznata kao vrlo bogat izvor različitih nutrijenata i biomolekula kao što su karotenoidi, fikobilini, masne kiseline, polisaharidi, vitamini i steroli. Hemijski sastav mikroalgi i cijanobakterija je veoma varijabilan i osim od vrste, uveliko zavisi od uslova sredine kao što su salinitet, temperatura, svetlost i prisustvo nutrijenata u podlozi. Promene ovih ekoloških faktora mogu stimulisati, ili pak inhibirati biosintezu pojedinih biomolekula, što otvara mogućnost da se ovi organizmi ne koriste samo u svrhu prostog dobijanja biomase, već i da se optimizacijom uslova gajenja maksimizuje njihov biosintetski potencijal (Carlucci i sar, 1999; Plaza i sar., 2009).

2.2. Metabolički sindrom

Metabolički sindrom (MetS) predstavlja veliki izazov za savremeni sistem zdravstvene zaštite i javno zdravlje u velikom delu sveta, naročito u svetlu ubrzane urbanizacije, povećanog energetskeg unosa hrane, porasta gojaznosti i neaktivnog stila života ljudske populacije. Poreklo naziva metabolički sindrom potiče još iz 20-tih godina XX veka, kada je švedski lekar Kylin pokazao povezanost između povišenog krvnog pritiska (hipertenzije),

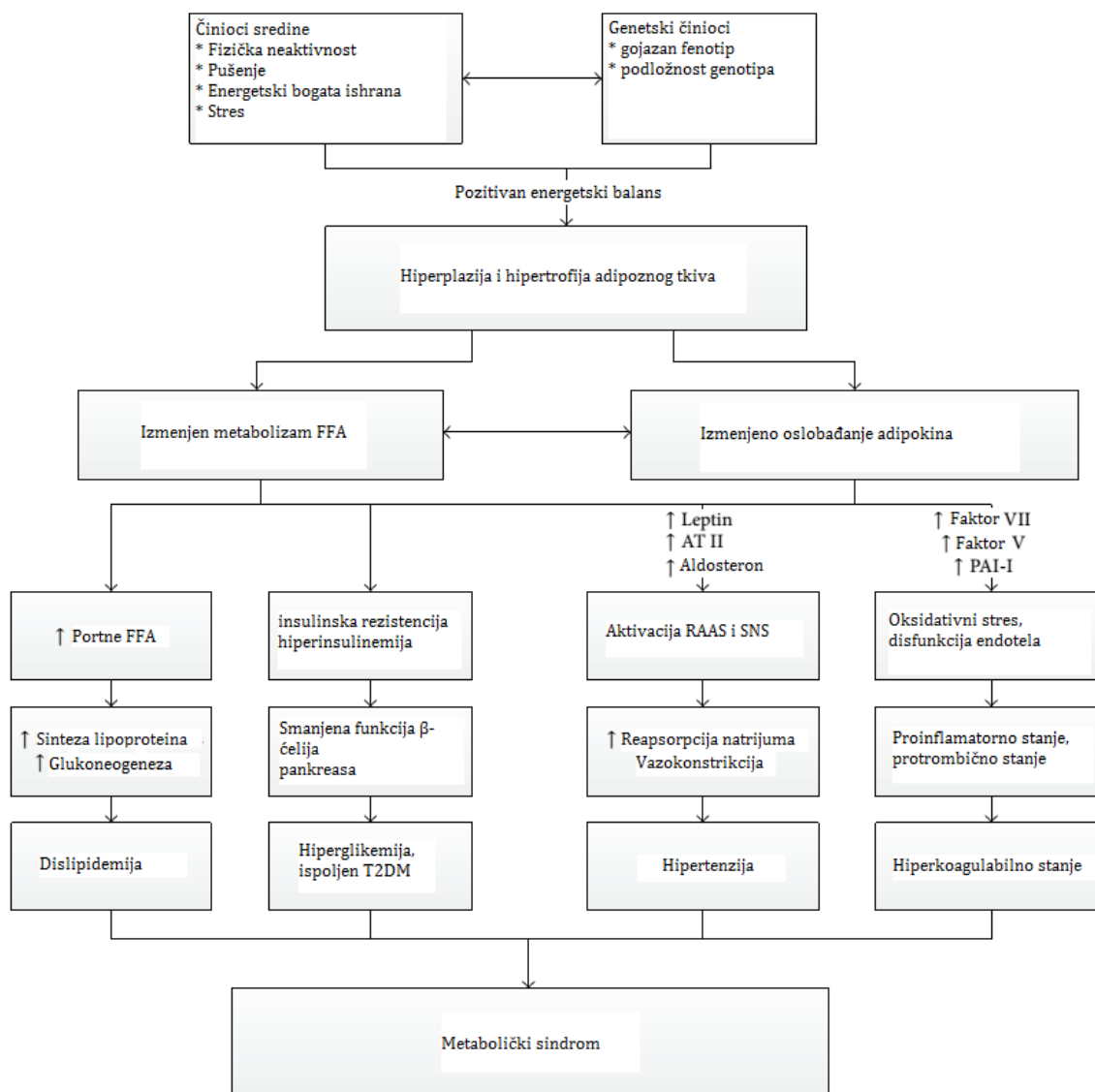
visokog nivoa glukoze u krvi (hiperglikemije) i gihta. Kasnije, tokom 1947 Vague je opisao povezanost visceralne gojaznosti sa metaboličkim poremećajima koji se sreću kod koronarno-vaskularnih bolesti (CVD) i dijabetesa tipa 2 (T2DM). Reaven je 1988 godine u okviru svog predavanja definisao „splet faktora rizika za dijabetes i koronarna oboljenja“ koje je nazvao „Sindrom X“. Glavni doprinos ove definicije bilo je uvođenje pojma insulinske rezistencije (Kaur, 2014).

Sa savremenog stanovišta, MetS se definiše kao skup povezanih fizioloških, biohemijskih, kliničkih i metaboličkih faktora koji direktno mogu povećati rizik od aterosklerotičnih kardiovaskularnih bolesti (ASCVD), T2DM i povećane smrtnosti. Ovaj zbir patoloških telesnih karakteristika i abnormalnih biohemijskih parametara uključuje aterogenu dislipidemiju, hipertenziju, netolerantnost na glukozu, proinflamatorna i protrombična stanja (Wilson i sar., 2005).

Učestalost MetS u svetu kreće se od ispod 10% pa sve do 84% u populaciji, u zavisnosti od regiona, urbanog ili ruralnog okruženja, karakteristika populacije (pol, starost, rasa i etnička pripadnost), kao i od definicije sindroma koja je u upotrebi. Međunarodna federacija za dijabetes (IDF) procenjuje da oko jedne četvrtine svetske populacije boluje od MetS (<http://www.idf.org/metabolic-syndrome>). Viši socioekonomski status, neaktivan način života i visok indeks telesne mase (BMI) smatraju se značajno povezanim sa pojavom ovog sindroma (Kolovou i sar., 2007).

2.2.1. Patofiziologija metaboličkog sindroma

MetS je stanje hroničnog upalnog procesa niskog intenziteta koje nastaje kao posledica udruženog delovanja genetskih faktora i faktora spoljne sredine. Insulinska rezistencija, visceralna adipoznost, aterogena dislipidemija, endotelna disfunkcija, genetska podložnost, povišen krvni pritisak, stanje povišene koagulacije, i hronično stanje stresa su faktori koji uzrokuju MetS (Slika 2.1.) (Kolovou i sar., 2007).



Slika 2.1. Šematski prikaz MetS (FFA- slobodne masne kiseline; ATII- angiotenzin II; PAI-1- plazminogen aktivator inhibitor 1; RAAS- renin angiotenzin aldosteron sistem; SNS- simpatički nervni sistem)

Abdominalna gojaznost

Takozvana „epidemija gojaznosti“ je posledica povećanog unosa jeftine, kalorijski bogate hrane u kombinaciji sa smanjenom fizičkom aktivnosti. Adipozno tkivo je sastavljeno od adipocita, stromalnih preadipocita, imunih ćelija i endotelijuma i karakteriše ga brz odgovor na suficit u ishrani u smislu hipertrofije i hiperplazije adipocita. Kod gojaznosti, uvećani adipociti mogu da ograniče dotok krvi u adipozno tkivo što dovodi do stvaranja

hipoksičnih uslova. Smatra se da su hipoksični uslovi etiološki faktor koji dovodi do nekroze i infiltracije makrofaga u adipozno tkivo, što za posledicu ima produkciju biološki aktivnih metabolita poznatih kao adipocitokini. Ovi metaboliti su glicerol, slobodne masne kiseline (FFA), proinflamatorni medijatori (faktor nekroze tumora alfa (TNF α) i interleukin-6 (IL-6)), plazminogen aktivator inhibitor-1 (PAI-1) i c-reaktivni protein (CRP). Ovi faktori dovode do lokalne inflamacije u adipoznom tkivu, što kao posledicu ima propagaciju sistemske inflamacije povezane sa razvojem bolesti vezanih za gojaznost (Trayhurn i Wood, 2004).

Insulinska rezistentnost

Insulinska rezistencija se definiše kao patofiziološko stanje u kom normalna koncentracija insulina ne izaziva adekvatan odgovor u ciljnim perifernim tkivima kao što su mišićno, adipozno i tkivo jetre. Usled ovakvog stanja, pankreasne beta-ćelije luče povećanu količinu insulina (hiperinsulinemija) radi kompenzovanja hiperglikemije u organizmu rezistentne osobe. Iako hiperinsulinemija inicijalno kompenzuje smanjenu osetljivost na delovanje insulina, tj. održava normalnu glikemiju, u tkivima koja imaju normalnu osetljivost na insulin ovo izaziva preteranu ekspresiju insulinske aktivnosti. Pojačano delovanje pojedinih aspekata insulina u određenim tkivima, u kombinaciji sa rezistentnošću na ostala delovanja dovodi do kliničke manifestacije MetS. Sposobnost beta ćelija da proizvode insulin tokom vremena postaje nedovoljna da kompenzuje sve izraženiju rezistentnost u pojedinim tkivima dovodi do hiperglikemije i manifestacije T2DM (Petersen i Shulman, 2006; Gill i sar., 2005).

Iako osobe sa insulinskom rezistencijom ne moraju nužno biti klinički gojazne, kod njih se u najvećem broju slučajeva zapaža abnormalna distribucija telesnog masnog tkiva u vidu nakupljanja u gornjoj polovini tela (abdomen). Bez obzira na različit doprinos visceralnog i subkutanog abdominalnog adipoznog tkiva na insulinsku rezistenciju, obrazac abdominalne gojaznosti značajnije korelira sa insulinskom rezistencijom i MetS nego gojaznost u nižim delovima tela (Jensen i sar., 1989).

Dislipidemija

Dislipidemija se karakteriše nizom kvalitativnih abnormalnosti lipidnog metabolizma koje se ogledaju u poremećajima strukture, metabolizma i biološke aktivnosti aterogenih lipoproteina kao i antiaterogenih čestica (HDL-C), što uključuje povećanje sadržaja lipoproteina koji sadrže apolipoprotein B (apo-B), povišen nivo triglicerida (TG), povećan nivo malih LDL čestica i smanjen nivo HDL-C. Insulinska rezistencija stimuliše dislipidemiju na više načina. Hipertrigliceridemija koja je direktna posledica insulinske rezistencije nastaje usled povećanog stvaranja i smanjene razgradnje VLDL čestica u jetri. Nastali VLDL se dalje metaboliše u ostatke lipoproteina i male gušće LDL čestice gde pritom i jedan i drugi proizvod mogu promovisati formiranje ateroma. Trigliceridi iz VLDL se prenose u

HDL čestice uz pomoć holesteril estar transportnog proteina (CETP) što dovodi do obogaćivanja HDL čestica trigliceridima i obogaćivanja VLDL čestica estrima holesterola. TG-obogaćeni HDL je bolji supstrat za hepatične lipaze, pa dolazi do njegovog bržeg uklanjanja iz cirkulacije, što dovodi do smanjenog broja HDL čestica koje mogu da služe za reverzni transport holesterola iz vaskulature. Na osnovu ovoga, smatra se da je dislipidemija koja je izazvana insulinskom rezistencijom direktna posledica povećane proizvodnje VLDL u jetri. Navedene anomalije su usko povezane sa povećanim oksidativnim stresom i disfunkcijom endotela, što stimuliše proinflamatornu prirodu makrovaskularnog aterosklerotskog procesa (Ginsberg i sar., 2005).

Hipertenzija

Esencijalna hipertenzija se često povezuje sa mnogim metaboličkim poremećajima, a najčešće sa gojaznošću, netolerancijom na glukozu i dislipidemijom. Ispitivanja su pokazala da i hiperinsulinemija i hiperglikemija pomažu aktivaciju renin-angiotenzin sistema (RAS) na taj način što štимуlišu ekspresiju angiotenzinogena, angiotenzina-2 (ATII) i AT1 receptora, što zajedno može da rezultira hipertenzijom kod osoba sa insulinskom rezistencijom. Takođe, pokazano je da hiperinsulinemija dovodi do aktivacije simpatičkog nervnog sistema, što za posledicu između ostalog ima povećanu reapsorpciju natrijuma u bubrezima. Usled povećanje reapsorpcije natrijuma dolazi do ubrzanog srčanog rada i vazokonstrikcije, što takođe rezultuje hipertenzijom (Morse i sar., 2005). Adipociti takođe igraju ulogu u nastanku hipertenzije, obzirom da je dokazano da produkuju aldosteron kao odgovor na prisustvo ATII (Briones i sar., 2012).

Genetske predispozicije

Velike varijacije u podložnosti prema MetS i razlike u starosti pri kojoj poremećaj nastaje kod osoba sa veoma sličnim profilima rizika, ukazuje na visok stepen interakcije genetskih i spoljnih faktora pri nastanku bolesti. Poznato je da neki ljudi koji po tradicionalnim merilima nisu gojazni ipak pokazuju insulinsku rezistenciju, kao i veći broj drugih abnormalnih metaboličkih faktora rizika (Ordovas, 2007).

Smatra se da je ekspresija svakog pojedinačnog metaboličkog faktora rizika delimično pod genetskom kontrolom, koja utiče na odgovor na različite eksterne faktore. Na primer, brojni polimorfizmi u genima odgovornim za sintezu lipoproteina su dovedeni u vezu sa pogoršanjem dislipidemije kod gojaznih ljudi (Laakso, 2004).

Prema „hipotezi štedljivog fenotipa“ (Neel, 1962), genetska selekcija u ljudskoj populaciji je tokom istorije favorizovala fenotip koji maksimizuje skladištenje viška unete energije, kao mehanizam preživljavanja u uslovima gladi. Obzirom na to da u modernom svetu ljudi imaju mnogo bolji pristup visokokaloričnoj ishrani, ova fenotipska adaptacija paradoksalno postaje uzrok gojaznosti i usko je povezana sa razvojem MetS u populaciji.

Endotelijalna disfunkcija

Poremećaj endotelne funkcije karakteriše smanjena endotel-zavisna vazodilatacija, smanjena arterijska elastičnost i ubrzan aterosklerotski proces. Brojni faktori, kao što su oksidativni stres, hiperglikemija, proizvodi glikozilacije, FFA, inflamatorni citokini i adipokini izazivaju poremećaj u normalnoj fiziološkoj i zaštitnoj funkciji vaskularnog endotela. Dokazano je i da imune ćelije igraju značajnu ulogu u svakoj od faza aterosklerotskog procesa; kao i da značajan uticaj ima smanjenje nivoa azot(II) oksida (NO) i povećanje nivoa reaktivnih kiseoničnih vrsta. Navedeni faktori deluju sinergistički i dovode do endotelne disfunkcije i formiranja proaterogene zone na vaskulaturi (Hansson, 2005; Harrison, 1997).

Hiperkoagulabilno stanje

Proinflamatorno stanje karakteriše povišen nivo citokina, kao i reaktanata akutne faze (npr. CRP) u cirkulaciji. Protrombično stanje ukazuje na poremećaje u prokoagulantnim faktorima kao što su povećani nivoi fibrinogena, faktora koagulacije VII i VIII i antifibrinolitičkog faktora (PAI-1); ali i abrazije trombocita i endotelijalnu disfunkciju. Pokazano je da nivo fibrinogena, koji zajedno sa CRP spada u proteine akutne faze, raste kao odgovor na povišen nivo citokina. Ovo ukazuje na to da su protrombično i proinflamatorno stanje metabolički povezana (Grundy, 2004).

Ishrana

Istraživanje Aljada i saradnika (2004) pokazalo je da je visok dnevni unos masti u ishrani povezan sa povećanim oksidativnim stresom i aktivacijom proinflamatornog transkripcionog nuklearnog faktora kapa-beta ($\text{NF}\kappa\text{B}$). Suprotno ovome, dijeta bogata voćem i vlaknima nije pokazala kapacitet za izazivanje upale u poređenju sa dijetom bogatom mastima, čak i u slučaju kada je kalorijski unos bio isti.

Hronični stres i delovanje glukokortikoida

Hronična hipersekrecija medijatora stresa kao što je kortizol kod osoba koje imaju genetske predispozicije, u kombinaciji sa spoljašnjim faktorima može dovesti do akumulacije visceralne masti, smanjene sekrecije hormona rasta i hipogonadizma. Glukokortikoidi povećavaju dejstvo enzima zaduženih za sintezu masnih kiselina i promovišu sekreciju lipoproteina, indukuju hepatičku glukoneogenezu, promovišu diferencijaciju preadipocita u adipocite što dovodi do povećanja telesne mase, inhibiraju insulin-stimulisanu apsorpciju aminokiselina od strane adipocita i stimulišu lipolizu i oksidaciju masti što može dovesti do periferne insulinske rezistencije. Navedene hormonske promene mogu da dovedu do reaktivne hipersekrecije insulina i povećaju

visceralnu gojaznost i sarkopeniju (smanjenje mišićne mase), što rezultuje dislipidemijom, hipertenzijom i T2DM (Chrousos, 2009; Andrew i sar., 2002).

2.2.2. Uloga ishrane u terapiji metaboličkog sindroma

Kao što je već ranije napomenuto, životne navike, fizička aktivnost i ishrana predstavljaju veoma značajne faktore koji doprinose nastanku MetS, a modifikacijom ovih faktora moguće je delovati preventivno na zdravlje. I pored velikog napretka koji je postignut na polju razvoja medicine i farmacije, izbor ishrane se i dalje smatra jednom od osnovnih mera za održavanje zdravlja i prevenciju koronarnih i drugih oboljenja.

Američka asocijacija za ishranu i srčane bolesti navodi sledeće ciljeve koje je poželjno postići radi sprečavanja CVD: zdravu dijetu, održavanje zdrave telesne mase (BMI u granicama 18,5-24,9), postizanje optimalnih nivoa LDL-C, HDL-C i TG u serumu, normalizaciju krvnog pritiska, normalan nivo glukoze u krvi (<100 mg/100ml), uz redovnu fizičku aktivnost i izbegavanje upotrebe duvanskih proizvoda. Specifične preporuke u ishrani uključuju ishranu bogatu voćem i povrćem, upotrebu integralnih žitarica i hrane bogate vlaknima, konzumaciju ribe (masne vrste) najmanje dva puta nedeljno, smanjenje energetskeg unosa preko zasićenih masti i trans-masti (<7% i <1% ukupnog energetskeg unosa dnevno) i kontrolisan unos holesterola (<300 mg dnevno). Takođe, savetuje se minimizacija unosa hrane i pića sa dodatim šećerima, priprema hrane sa što manje dodatka soli i umeren unos alkoholnih pića (Lichtenstein, 2006).

Unos nutrijenata u cilju preventivnog i terapijskog delovanja na MetS i CVD se može podeliti u tri kategorije:

- uobičajena hrana i pića sa specifičnim nutritivnim karakteristikama,
- funkcionalna hrana i pića,
- dijetetski suplementi.

Funkcionalna hrana i pića su kompletni prehrambeni proizvodi koji mogu sadržati dodatak ili biti poboljšani nekim tehnološkim postupkom, a koji sadrže određene sastojke koji povoljno deluju na neke zdravstvene aspekte ukoliko se konzumiraju u određenoj količini kao deo svakodnevne raznovrsne ishrane. Dijetetski suplementi sadrže koncentrovanu formu neke komponente hrane sa pretpostavljenim bioaktivnim dejstvom (nutraceutik) u formi za konzumiranje (najčešće tableta ili kapsula), tako da je na taj način moguće postići veći dnevni unos željene komponente, u većoj koncentraciji nego što bi bilo moguće unosom putem redovne ishrane. Primer za ovo su n-3 masne kiseline, koje se mogu uneti

putem hrane (riba), u vidu funkcionalnih proizvoda (npr. mleko ili sok sa dodatim n-3 MK) ili u formi suplementa (kapsule) (Sirtori i sar., 2009).

Obzirom na to da postoji veoma veliki broj jedinjenja sa bioaktivnim delovanjem koja su pokazala značajno dejstvo u prevenciji i terapiji MetS i CVD, u narednom delu teksta biće nabrojane neke od najvažnijih grupa nutraceutika i prehrambeni proizvodi koji su značajni sa ovog aspekta.

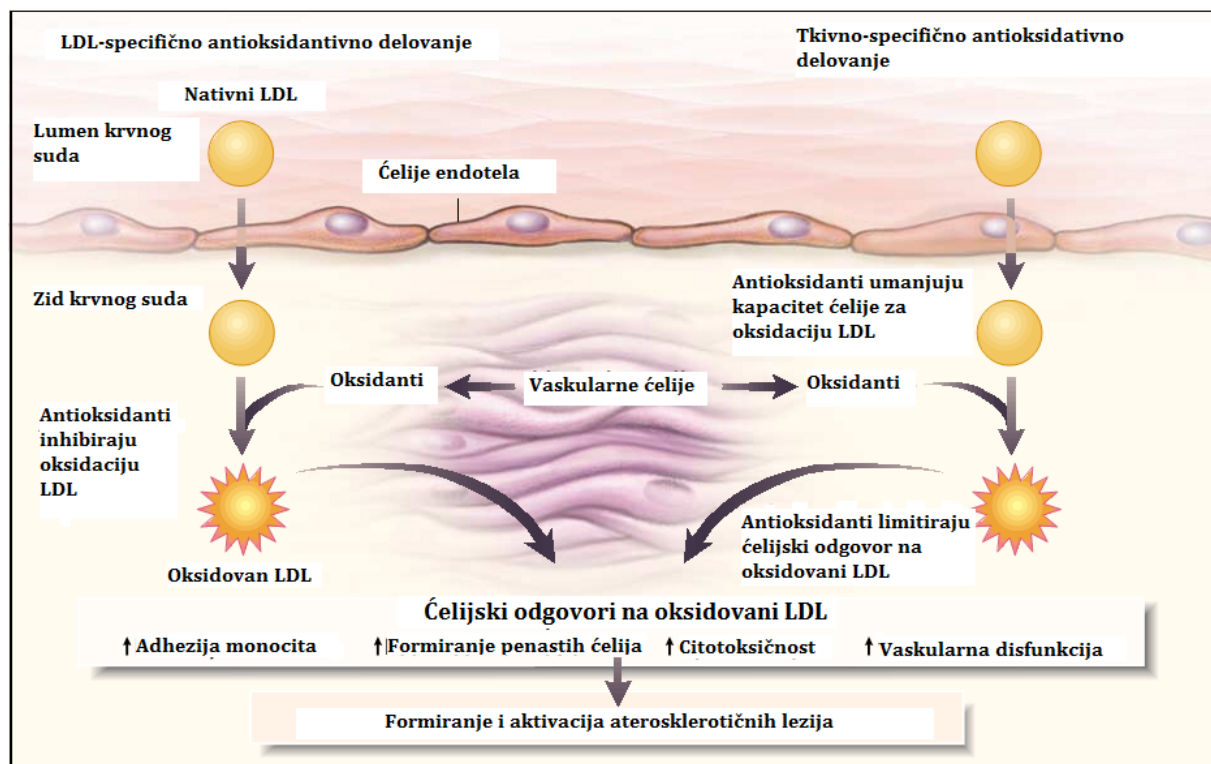
2.2.3. Antioksidanti

Oksidativni stres zauzima značajnu ulogu u patofiziološkim procesima nastanka MetS i CVD. I MetS i CVD karakteriše nizak nivo upale i poremećen status oksidantnih i antioksidativnih procesa, koji pomažu proces nastajanja ateroskleroze. Hiperglikemija i upalni proces koji karakterišu MetS dovode do povećanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u tkivima, što rezultuje oksidativnim stresom i pojačanom aktivacijom NADPH-oksidge. Ovaj proces smanjuje dostupnost oksida azota (NO), što objašnjava nizak nivo NO kod pacijenata sa metaboličkim poremećajima, kao i korelaciju promene nivoa NO sa BMI, krvnim pritiskom i trigliceridemijom. Glavna ROS u ovom procesu je superoksid-anjon radikal (O_2^-) koji nastaje delovanjem NADPH-oksidge, a koji brzo biva neutralisan antioksidantnim enzimima. Kada se pod uslovima oksidativnog stresa poremeti antioksidativni kapacitet, dolazi do formiranja viška O_2^- i smanjene produkcije NO, što dovodi do kaskade oksidativnih procesa koji rezultuju oksidativnim oštećenjima molekula i ćelija u organizmu (Hopps i sar., 2010).

Prema hipotezi oksidativne modifikacije u nastanku ateroskleroze, LDL česice se najpre nakupljaju u ekstracelularnom subendotelijalnom prostoru arterija, gde se pod dejstvom vaskularnih ćelija prevode u oksidovanu formu koja se naziva minimalno modifikovani LDL. Oksidovani LDL zatim stimuliše hemotaksu monocita iz lumena krvnog suda i istovremeno inhibira njihovo uklanjanje. Prisutni monociti se potom diferenciraju u makrofage koji internalizuju oksidovani LDL, što dovodi do formiranja penastih ćelija. Oksidovani LDL takođe izaziva disfunkciju i povredu endotelnih ćelija, kao i nekrozu nastalih penastih ćelija. Ovaj proces dovodi do oslobađanja lizozomalnih enzima iz penastih ćelija i nekrotičnog detritusa, što dovodi do početka aterogenog žarišta u zidu krvnog suda (Diaz i sar., 1997).

Uloga antioksidanata u organizmu sa stanovišta oksidativnog stresa može biti na nivou LDL-specifičnog i tkivno specifičnog mehanizma delovanja. Inkorporacija antioksidanata u LDL česticu je štiti od oksidacije u uslovima oksidativnog stresa i sprečava nastajanje oksidovane forme. Takođe, prisustvo antioksidanata u vaskularnim ćelijama može umanjiti

klinički efekat vaskularnog oštećenja na taj način što sprečava ćelijsku oksidaciju LDL, a takođe i umanjuje ćelijski odgovor na oksidovani LDL, što rezultuje smanjenom adhezijom monocita, smanjenim formiranjem penastih ćelija, manjim citotoksičnim efektom na vaskularne ćelije i poboljšanjem vaskularne funkcije. Mehanizam delovanja antioksidanata u sprečavanju nastanka oštećenja vaskularnog endotela i ateroskleroze prikazan je na Slici 2.2. (Diaz i sar., 1997).



Slika 2.2. Mehanizam delovanja antioksidanata u sprečavanju nastanka ateroskleroze

Vitamini

Poznato je da neki vitamini kao što su vitamin E (α -tokoferol) i vitamin C (askorbinska kiselina) imaju važnu antioksidativnu ulogu u organizmu. Veliki broj epidemioloških studija pokazao je da postoji veza između konzumacije antioksidativnih vitamina i redukcije kliničkih manifestacija ateroskleroze. Dokazano je i da pacijenti koji boluju od angine pectoris imaju sniženu koncentraciju E vitamina u plazmi u odnosu na zdrave subjekte, a sniženje nivoa C vitamina u leukocitima može ukazati na postojanje CVD. Istraživanja sprovedena na ljudima i životinjama su pokazala da suplementacija liposolubilnim antioksidantima povećava otpornost LDL čestica na oksidaciju u *ex vivo* testovima. Međutim, nije utvrđena tačna uzročno-posledična veza između otpornosti LDL

na oksidaciju i potencijalnih zaštitnih efekata antioksidantne terapije prema aterosklerozi i njenim kliničkim manifestacijama (Diaz i sar., 1997; Keaney i Frey, 1994).

Još nekoliko mehanizama mogu biti potencijalno bitni za objašnjenje uloge antioksidativnih vitamina u prevenciji kliničke manifestacije CVD. Postoje dokazi da pojedini antioksidanti, naročito vitamin E, mogu da modifikuju stabilnost plaka, vazomotornu funkciju i sklonost trombozi. Ćelijski antioksidanti takođe inhibiraju adheziju monocita, štite od citotoksičnog delovanja oksidovanog LDL, inhibiraju aktivaciju trombocita i sprečavaju disfunkciju endotela tako što održavaju endotelnu NO aktivnost (Diaz i sar., 1997).

Karotenoidi

Karotenoidi, kao što je β -karoten, takođe poseduju antioksidativno delovanje, a poznata je i njihova bitna uloga u očuvanju zdravlja. Karotenoidi uneti ishranom mogu igrati ulogu u antioksidativnom odbrambenom mehanizmu organizma, i mnoga istraživanja ukazuju na njihovu bitnu ulogu kao liposolubilnih antioksidanata koji sprečavaju procese lipidne oksidacije i neutrališu reaktivne kiseonične forme koje nastaju u foto-oksidativnim procesima (Stahl i Sies, 2003). Karotenoidi i njihovi derivati su brojna grupa jedinjenja koja se nalaze u mnogim namirnicama biljnog i životinjskog porekla kao što su lisnato povrće, šargarepa, paprika, narandžasto voće, žumance jajeta i dr. Mikroalge i cijanobakterije takođe predstavljaju izrazito bogat izvor ovih jedinjenja, i koncentracije pojedinih karotenoida u nekim vrstama cijanobakterija višestruko prelaze koncentracije u najbogatijim komercijalnim izvorima. Prirodni izvori karotenoida kao što je biomasa algi i cijanobakterija su pogodniji sa aspekta delovanja na zdravlje, obzirom da se smatra da različiti karotenoidi i drugi ćelijski antioksidanti iz konzumirane biomase imaju sinergistični efekat na zdravlje (Christaki i sar., 2013; Stahl i Sies, 2003).

Fenolna jedinjenja

Jedinjenja fenolne strukture čine jednu od najbrojnih klasa sekundarnih biomolekula biljaka. Osnovni strukturni elementi koji ih karakterišu su prisustvo bar jednog aromatičnog prstena, supstituisanog sa bar jednom hidroksilnom grupom, slobodnom ili modifikovanom (etarska, estarska, glikozidna). U literaturi se navode različite klasifikacije fenolnih jedinjenja. Lakoća oksidacije i antioksidativna aktivnost mnogih flavonoida i njihovih derivata je pokazana u mnogih oksidujućim sistemima tokom niza godina. Smatra se da ova jedinjenja svoje delovanje ispoljavaju putem više mehanizama, koji uključuju "skevindžing" slobodnih radikala i kompleksiranje slobodnih metalnih jona. Tako je, na primer, pokazano da sposobnost kvercetina da inhibira oksidativnu degradaciju loja katalizovanu jonima bakra potiče makar delom od njegove sposobnosti da gradi komplekse sa metalnim jonima (Mahgoub i Hudson, 1985).

Antocijani su grupa fenolnih jedinjenja koja ispoljava značajno antioksidativno delovanje. Nije međutim jasno da li je ova uloga od važnosti i u biljkama, obzirom da se antocijani nalaze u vakuolama i ne mogu da stupe u kontakt sa slobodnim radikalima koji nastaju tokom metabolizma. Određene studije su pokazale da vodonik-peroksid nastao u drugim organelama biljke može uspešno biti neutralisan delovanjem vakuolarnih antocijana (Winefield, 2009).

Brojne studije potvrdile su povoljan uticaj biljnih flavonoida na aterosklerozu, a njihova antioksidativna, antitrombička i antiinflamatorna delovanja imaju povoljan uticaj na razvoj CVD (Lin i sar., 2008). Obzirom na to da su flavonoidi i antocijani široko rasprostranjeni u hrani biljnog porekla, njihovo inkorporiranje u ishranu obolelih od MetS je jednostavno, bezbedno i ekonomski isplativo. Različite biljne sirovine bogate fenolnim jedinjenjima, od kojih mnoge predstavljaju nusproizvode prehrambene industrije, mogu se uspešno upotrebiti u formulaciji funkcionalnih proizvoda koji imaju povoljno delovanje na lipidni metabolizam i kardiovaskularno zdravlje.

Stokić i saradnici (2015) kreirali su specijalnu vrstu hleba u kom je izvršena supstitucija pšeničnog brašna sa integralnim brašnom heljde (*Fagopyrum esculentum*) na nivou 50%. Kreiranje hleba sa tako visokim nivoom supstitucije bilo je moguće uz prethodno tretiranje heljdinog brašna hidrotermičkim tretmanom, što je pomoglo u prevazilaženju nepovoljnih senzornih karakteristika finalnog proizvoda (zrnavost, neprijatan zaostali ukus). Nutritivni profil i antioksidativni kapacitet kreiranog hleba pokazali su velika poboljšanja u odnosu na hleb od belog pšeničnog brašna (2,22 puta viši sadržaj vlakana i 4,29 puta viši sadržaj ukupnih fenola). Integralno heljdino brašno izuzetno je bogat izvor flavonoida rutina, kao i drugih fenolnih jedinjenja kao što su hiperin, kvercetin i kvercitrin, za koje je poznato da poseduju povoljno delovanje na zdravlje. U cilju ispitivanja delovanja kreiranog hleba na određene markere ateroskleroze izvršena je dijetetska intervencija koja je uključivala konzumaciju ovog hleba od strane pacijenata normalne telesne mase na terapiji statinima, u trajanju od jednog meseca. Rezultati su pokazali da je unos ovog hleba u okviru uobičajenog režima ishrane tokom jednog meseca rezultirao značajnim smanjenjem nivoa LDL u plazmi pacijenata, kao i smanjenim odnosom LDL/HDL (marker rizika za aterosklerozu).

Zeleni čaj takođe je poznat kao bogat izvor fenolnih jedinjenja, od kojih su u masi čaja najznačajnija ona iz grupe katehina: epigalokatehin-3-galat (EGCG), epigalokatehin (EGC), epikatehin-3-galat (ECG) i epikatehin (EC). Thielecke i Boschmann (2009) izneli su detaljan pregled epidemioloških studija i saznanja vezanih za povoljna dejstva zelenog čaja na pacijente sa MetS. Iz prikupljenih podataka se vidi da brojne epidemiološke studije pokazuju da ljudske populacije koje praktikuju visok unos zelenog čaja bogatog katehinima imaju zdravstvene koristi u smislu smanjenja telesne mase, regulacije homeostaze glukoze i poboljšano kardiovaskularno zdravlje. Podaci iz *in vitro* i *in vivo* studija ukazuju na to da

katehini zelenog čaja, a naročito EGCG, deluju protiv gojaznosti putem više mehanizama kao što su inhibicija diferencijacije i proliferacije adipocita, smanjenje apsorpcije masti i inhibicije aktivnosti COMT (katehil-*o*-metil-transferaza) u smeđem adipoznom tkivu; što rezultuje smanjenjem telesne mase, snižavanjem nivoa triglicerida, ukupnih masnih kiselina i ukupnog holesterola pri dislipidemiji. Takođe, većina kliničkih studija na ljudima pokazala je i poboljšanje u homeostazi glukoze pri unosu katehina iz čaja, što je značajno u prevenciji T2DM kao ključne komponente MetS.

Trop predstavlja ostatak nakon industrijske prerade različitog voća i povrća i kao takav smatra se otpadnom sirovinom. Otpadne sirovine sa jedne strane predstavljaju problem u prehrambenoj industriji usled potrebe za odlaganjem velikih količina lako kvarljivog biljnog materijala, dok sa druge strane mogu biti iskorišćene kao potencijalni izvori tehnološki i nutritivno vrednih biomolekula (Ćetković i sar., 2012). Trop voća je veoma bogat izvor biljnih fenola kao što su antocijani, galna kiselina i flavonoidi, i interesantna je mogućnost njegovog inkorporiranja u prehrambene proizvode u cilju poboljšanja nutritivnih i zdravstvenih svojstava. Šarić i saradnici (2014) kreirali su bezglutenski keks sa dodatkom sušenog tropa borovnice kao funkcionalni proizvod sa dodatom nutritivnom vrednošću i antioksidativnim potencijalom. Ovakav način upotrebe tropa je pogodan i sa ekonomskog aspekta jer predstavlja valorizaciju slabo iskorišćene sirovine.

Antioksidativni peptidi i proteini

Proteini u ishrani se tradicionalno posmatraju kao izvor energije i aminokiselina potrebnih za održavanje fizioloških funkcija organizma. Poslednjih godina, međutim, povećava se interesovanje za identifikacijom i karakterizacijom bioaktivnih peptida poreklom iz biljnih i životinjskih izvora. Bioaktivni peptidi su proteinski fragmenti, koji su neaktivni kada su u sastavu originalnog proteina, ali nakon njihovog oslobađanja iz proteina putem delovanja enzima, oni mogu da ispolje različita fiziološka dejstva. Ovi peptidi se karakterišu dužinom niza od 2-20 aminokiselinskih ostataka i masom do 6000 Da, a raspored i sastav aminokiselina u njihovom sastavu određuje njihovo fiziološko delovanje. Na osnovu njihovih strukturnih osobina, kao i sastava i rasporeda aminokiselina u sekvenci, ovi peptidi mogu da ispoljavaju različita dejstva: opijatno, vezivanje minerala, imunomodulatorno delovanje, antimikrobno delovanje, antioksidativno, antitrombično, hipoholesterolemično i antihipertenzivno delovanje (Sarmadi i Ismail, 2010).

Antioksidativni peptidi iz hrane smatraju se zdravstveno bezbednim jedinjenjima niske molekulske mase koje karakteriše niska cena, visoka aktivnost i dobra apsorpcija. Takođe poseduju i određene prednosti u odnosu na enzimске antioksidante, koje se ogledaju u jednostavnijoj strukturi, boljoj stabilnosti u različitim sistemima i niži potencijal za izazivanje imunih reakcija. Istraživanja zdravstvenih efekata ovih jedinjenja se sprovode na dve glavne kategorije, hidrolizatima polaznih proteina i izolovanim bioaktivnim peptidima.

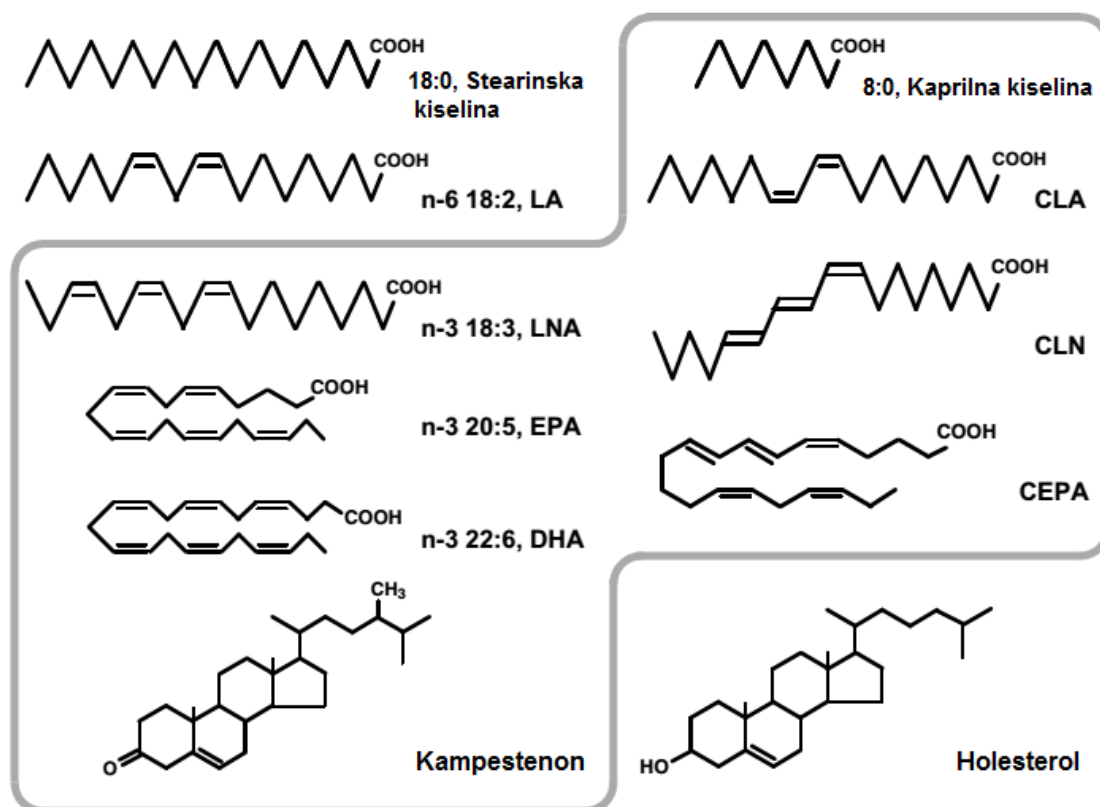
Brojna istraživanja vršena su u cilju procene antioksidantnog delovanja hidrolizata ili izolovanih peptida poreklom iz biljnih ili životinjskih izvora, kao što su kikiriki, pirinač, protein suncokreta, alfalfa protein, kukuruzni gluten, koža žabe, jam, proteini jajeta, proteini mlečnog i sojinog kefira, pečuraka, skuše, lista karija, kazeina, algi, heljde itd. (Sarmadi i Ismail, 2010).

Tačan mehanizam antioksidantnog delovanja ovakvih peptida nije još u potpunosti razjašnjen, ali različita ispitivanja su pokazala da oni mogu delovati kao inhibitori lipidne peroksidacije, hvatači slobodnih radikala ili helatori metalnih jona. Postoje takođe i istraživanja koja ukazuju na to da neki peptidi mogu da zaštite ćelije od delovanja ROS putem indukcije pojedinih gena (Sarmadi i Ismail, 2010; Rajapakse i sar., 2005).

Većina bioaktivnih peptida poreklom je iz namirnica koje ljudi konzumiraju dugo vremena bez uobičajenih negativnih posledica. Međutim, obzirom na to da su neki peptidi pokazali različite citotoksične efekte, potrebno je posvetiti naročitu pažnju njihovoj zdravstvenoj bezbednosti pre upotrebe u ishrani ljudi.

2.2.4. Lipidi

Lipidi su važan deo svakodnevne izbalansirane ishrane i njihova konzumacija povezana je sa podmirivanjem energetske potrebe, kao i unosom liposolubilnih vitamina putem hrane. Pojedini lipidi, a naročito određene masne kiseline takođe igraju važne metaboličke uloge u organizmu i njihov unos može da ima bitnu preventivnu ili terapijsku funkciju kod osoba sa MetS. Kao što je ranije pomenuto, kod individua koje započinju tretman povišenog nivoa holesterola, preporučeno je da 25-35% kalorijskog unosa u ishrani potiče od masti, kao optimalnu količinu koja neće izazvati negativne efekte na lipidni status. Masne kiseline, a naročito esencijalne masne kiseline su veoma važan deo ishrane. Poslednjih decenija je posvećena velika pažnja ulozi esencijalnih i drugih mono- i polinezasićenih masnih kiselina u ishrani i njihovom uticaju na kardiovaskularno zdravlje i imunitet. Na Slici 2.3. (Nagao i Yanagita, 2008) prikazani su neki od najčešće zastupljenih lipida u ishrani, kao i najvažniji bioaktivni lipidi (zaokvireno).



Slika 2.3. Najzastupljeniji lipidi u ishrani i neki bioaktivni lipidi

Polinezasićene n-3 masne kiseline

Polinezasićene masne kiseline (PUFA) kao što su linolna kiselina (LA, 18:2, n-6), α -linolenska kiselina (LNA, 18:3, n-3) i arahidonska kiselina (20:4, n-6) su važne za odvijanje brojnih bioloških funkcija kod sisara. Poznato je da je konzumacija visoko nezasićenih n-3 masnih kiselina kao što je LNA, eikozapentaenska kiselina (EPA, 20:5, n-3) i dokozaheksaenska kiselina (DHA, 22:6, n-3), povezana sa smanjenim rizikom od srčanih oboljenja i kancera u brojnim studijama na životinjama i ljudima (Holub, 2004).

LNA je zastupljena u relativno visokom procentu u mnogim uljima biljnog porekla kao što su ulje perile, lana, kanole, uljane repice, soje, oraha i dr. EPA i DHA se nalaze u ribi, pojedinim morskim životinjama, cijanobakterijama i mikroalgama. Glavni efekat n-3 PUFA na nivo lipida u plazmi ogleda se u snižavanju koncentracije triglicerida. Ovo se može objasniti povećanom lipolizom i smanjenom lipogenezom u jetri, što za posledicu ima regulaciju lipidne homeostaze u celom organizmu. Pojedina ispitivanja takođe pokazuju da konzumacija n-3 PUFA ima uticaj na porast nivoa HDL čestica kod ljudi (Kesavulu i sar., 2002).

Hipotenzivno delovanje n-3 PUFA je uočeno u mnogim klinčkim i predkliničkim studijama, a smatra se da je povezano sa sastavom fosfolipida plazme, u kojima DHA i EPA imaju ulogu u modulaciji fluidnosti ćelijske membrane, aktivnosti membranskih lipida i receptora i proizvodnje eikozanoida (Nagao i Yanagita, 2008).

Iako su antidijabetički efekti n-3 PUFA još uvek pod znakom pitanja, određene epidemiološke studije su pokazale da je u populacijama u kojima je viša konzumacija ovih PUFA, prisutna niža incidenca dijabetesa. Delarue i saradnici (1996) su pokazali da je konzumacija ribljeg ulja od strane zdravih ljudi indukovala 40% smanjenja insulinemije, kao i smanjenje oksidacije ugljenih hidrata i porast ne-oksidativnog skladištenja glukoze.

Poslednjih godina, uočen uticaj n-3 PUFA na regulaciju proizvodnje citokina je izazvao veliku pažnju. Istraživanja su pokazala da EPA i DHA mogu da dovedu do povećanja koncentracije adiponektina u plazmi putem stimulacije ekspresije mRNA zadužene za njegovu sintezu u adipocitima, nezavisno od unosa hrane (Itoh i sar., 2007).

n-3 PUFA su jedne od najčešćih biomolekula koji se poslednjih decenija inkorporiraju u proizvode sa dodatkom vrednošću, kao i u vidu dodataka ishrani. Veliki broj prehrambenih proizvoda je kreiran sa dodatkom n-3 PUFA, kao što su mleko, meso, jaja, različiti namazi i slično. Obogaćivanje mleka ovim biomolekulima se pokazalo kao naročito pogodno, obzirom na to da je mleko odličan matriks za apsorpciju masti. Mleko predstavlja sistem u kom su masti u emulgovanom obliku, i pruža veliku površinu za apsorpciju u digestivnom traktu (Lopez-Huertas, 2010). Problem kod ovako obogaćenih namirnica se ogleda u vidu nepovoljnih organoleptičkih osobina koje mogu da se jave („riblji“ miris) i u smanjenom roku trajanja. Navedeni problemi mogu se prevazići putem raznovrsnih tehnoloških postupaka kao što je dodavanje antioksidanata koji bi sprečili oksidaciju, mikroenkapsulacija željenih biomolekula, kao i kreiranjem dodataka ishrani u vidu zaštićenih kapsula koje rešavaju problem neprijatnih organoleptičkih svojstava.

Konjugovane masne kiseline

Konjugovane masne kiseline (CFA) predstavljaju smešu položajnih i geometrijskih izomera PUFA sa konjugovanim dvostrukim vezama u molekulu. Veliki broj izomera CFA je moguć na osnovu kombinacija numeričkih, položajnih i geometrijskih konfiguracija vezanih za konjugovane dvostruke veze. Konjugovana linolna kiselina (CLA), konjugovana forma linolne kiseline (LA), je važan izomer detektovan u mlečnoj masti, siru i mesu preživara (Nagao i Yanagita, 2008).

Od otkrića CLA kao antimutagenog faktora tokom 1980-tih godina, veliki deo studija koje su se bavile ispitivanjem fizioloških funkcija CLA bio je vezan za njene antikancerogene i antimutagene efekte. Međutim, u poslednje vreme se povećava broj istraživanja koja ukazuju na njeno delovanje protiv gojaznosti, antiaterogeno, antidijabetičko i hipotenzivno

delovanje na ljude i životinje. Delovanje na gubitak telesne mase i antilipidemijsko delovanje CLA pripisano je pospešivanju β -oksidacije masnih kiselina u organizmu i supresiji sinteze masnih kiselina u jetri. Pokazano je da CLA pospešuje β -oksidaciju masnih kiselina čak i u smeđem adipoznom tkivu i mišićima, kao i da potrošnju kiseonika i energije kod gojaznih pacova (Nagao i sar., 2003).

Antidijabetsko delovanje CLA takođe je dokazano u studiji sprovedenoj na gojaznim dijabetičnim pacovima. Ishrana obogaćena sa 1,5% CLA normalizovala je poremećenu toleranciju na glukozu, a klinički efekti bili su uporedivi sa efektom farmaceutskog agensa troglitazona (Houseknecht i sar, 1998).

Biljni steroli i njihovi derivati

Biljni steroli i stanoli su hemijski homolozi holesterola koji su u značajnim količinama prisutni u nekim biljnim uljima i integralnim žitaricama. Njihovo svojstvo da smanjuju nivo holesterola u organizmu, naročito u slučaju sitosterola i sitostanola, je potvrđeno u brojnim istraživanjima. Američka asocijacija za edukaciju o holesterolu je utvrdila da pri unosu 2 g sitosterola dnevno, dolazi do smanjenja LDL holesterola za oko 10%. (Ostlund, 2007). Ovaj uočeni efekat se može objasniti inhibicijom intestinalne apsorpcije holesterola putem smanjenja rastvorljivosti holesterola u intestinalnim micelama, kao i inhibicijom proizvodnje proinflamatornih citokina.

Kampest-5-en-3-on (kampestenon) je 3-okso derivat kampesterola za koji je utvrđeno da je jedan od najaktivnijih derivata u smanjenju telesne masnoće i serumskih lipida, a njegovi efekti su objašnjeni inhibicijom lipogeneze, stimulacijom lipolizne aktivnosti i povećanom potrošnjom energije (Tamaru i sar., 2006).

Masne kiseline srednje dužine

Masne kiseline srednje dužine lanca (MCFA) su masne kiseline dužine 6-10 C atoma, koje se nalaze u velikim količinama u nekim uljima, kao što je kokosovo ili ulje palminog jezgra. Još od 1950-tih, trigliceridi srednje dužine (MCT) se koriste za tretman sindroma malapsorpcije usled njihovog specifičnog ponašanja u digestivnom sistemu. MCT su podložni brzom hidrolizi, a nastale MCFA se apsorbuju direktno preko portalne vene u jetru, gde se koriste kao izvor energije zaobilazeći pritom transport u mitohondrije pomognut karnitinom (Bach i sar., 1996).

MCT imaju drugačiji uticaj na organizam u poređenju sa uobičajenim trigliceridima dužeg lanca (LCT). Pokazano je da konzumacija MCT može da dovede do smanjenja masnih naslaga, kao i do pojačane termogeneze. U kliničkim studijama, postprandijalni utrošak energije je bio značajno uvećan nakon konzumacije MCT (u odnosu na konzumaciju LCT), i

u slučaju gojaznih pacijenata i u slučaju pacijenata normalne telesne mase (St-Onge i sar., 2003a).

Obzirom na gore navedena povoljna delovanja MCT, njihovo inkorporiranje u svakodnevnu ishranu može biti od velike važnosti za obolele od MetS. Najjednostavniji predloženi način uključivanja u svakodnevnu upotrebu bilo bi korišćenje MCT kao jestivog ulja. Ovakav pristup nije se pokazao kao vrlo efektivan, jer ulja sa visokim sadržajem MCT poseduju određene nedostatke u vidu niske temperature dimljenja i obilnog penušanja pri zagrevanju, što ograničava primenu jestivog ulja. Iz tog razloga, nastoji se na kreiranju takozvanih „strukturisanih lipida“. Ovakvi lipidi dobijaju se modifikacijom masnokiselinskog sastava ili rasporeda na nosećem molekulu glicerola u cilju poboljšanja fizičkih i fizioloških karakteristika dobijenog ulja ili masti. Poslednjih decenija kreirani su strukturisani lipidi koji u sastavu imaju kombinaciju MFA i LCFA na jednom molekulu glicerola (MLCT). Ovako dobijeni lipidi MLCT imaju višu temperaturu dimljenja nego fizičke mešavine MCT i LCT i predstavljaju poboljšanje kada je u pitanju upotreba na visokim temperaturama (kuvanje, prženje) (Takeuchi i sar., 2002).

St-Onge i saradnici (2003b) kreirali su funkcionalni proizvod u vidu ulja koje sadrži mešavinu MCT, biljnih sterola i ulja semena lana bogatog n-3 PUFA. U kliničkoj studiji koja je obuhvatila 24 zdrave gojazne osobe koje su konzumirale ovo funkcionalno ulje tokom 29 dana, uočeno je poboljšanje lipidnog profila u plazmi, smanjenje nivoa LDL holesterola i povećanje veličine LDL čestica. Dobijeni rezultati ukazuju na to da upotreba ovakvih funkcionalnih lipida koji sadrže MCT, zahvaljujući njihovim dokazanim povoljnim dejstvima na organizam, može biti od velike koristi u smanjenju rizika od ateroskleroze i CVD.

2.3. Cijanobakterije

Cijanobakterije (*Cyanobacteria*), poznate i kao modrozelenne alge ili modrozelenne bakterije, su poseban tip (phylum) bakterija koje poseduju mogućnost vršenja oksigene fotosinteze (Stewart i Falconer, 2008). Naziv "cyanobacteria" potiče od njihove karakteristične plavičaste boje (grčki: κυανός (kyanós) = plavo). Spadaju među najstarije oblike života na Zemlji i prisustvo njihovih ostataka je potvrđeno u stromatolitskim strukturama starim 2,8 do 3,5 milijardi godina (Olson, 2006). Smatra se da se biohemijska osobina živih bića da kao izvor energije upotrebljavaju elektrone poreklom iz molekula vode pod uticajem svetlosne energije (fotosinteza) razvila upravo prvo kod cijanobakterija koje su direktni preci današnjih fotosintetskih vrsta. Sposobnost cijanobakterija da vrše aerobnu fotosintezu dovela je do prevođenja prvobitne redukcione atmosfere u oksidujuću, što je uzrokovalo dramatičnu promenu u sastavu prvobitnih oblika života na Zemlji, stimulisalo razvoj biodiverziteta i dovelo do smanjenja broja vrsta organizama koji nisu tolerantni na prisustvo kiseonika (anaeroba). Hloroplasti kao ćelijske organele kod biljaka i eukariotskih algi prema endosimbiotskoj teoriji vode poreklo od cijanobakterijskih predaka nastale putem endosimbioze (Sarma, 2012). Cijanobakterije i danas predstavljaju jednu od veoma raznovrsnih grupa bakterija na Zemlji i igraju veoma značajnu ulogu u fotosintezi u vodenim sredinama (Stewart i Falconer, 2008).

Mnoge vrste ovih organizama imaju bitno mesto u lancu ishrane u prirodi, a poslednjih decenija razmatra se i njihov biotehnološki potencijal, jer predstavljaju bogat i obnovljiv izvor hrane, biološki aktivnih jedinjenja i ulja, te kao takve mogu naći primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji i proizvodnji biogoriva (Svirčev, 2005; Borowitzka, 2013). Cijanobakterije su tokom istorije predstavljale značajan izvor hrane u pojedinim ljudskim kulturama. Tako su još u XVI veku Španski osvajači na području Meksika otkrili da Asteci koji su živeli u oblasti Meksičke doline u gradu Tenochtitlan sakupljaju „novu hranu“ sa površine jezera, za koju se danas smatra da se sastojala od jestivih modrozelenih algi (Vonshak, 2002). Sredinom 1960-tih godina botaničar Jean Léonard koji je bio član francusko-belgijske ekspedicije u Africi, opisao konzumaciju plavo-zelenih čvrstih kolača u području Fort Lami (država Čad). Daljim ispitivanjem, utvrđeno je da se taj kolač, na lokalnom dijalektu nazvan *dihé*, sastoji uglavnom od modrozelenih algi iz roda *Spirulina* i da je sastavni deo ishrane lokalnog plemena Kanembu koje je nastanjeno u blizini alkalnih jezera u Čadu i Nigeru (Vonshak, 2002). Iako je 1980-tih godina veoma poraslo interesovanje za primenu cijanobakterija u ishrani ljudi, skoriji trendovi ukazuju više na interes u njihovoj primeni u ishrani domaćih životinja, kao i biofarmaceutskoj industriji i industriji biološki obnovljivih izvora goriva. Razlog tome je sposobnost mnogih vrsta cijanobakterija da produkuju različita toksična jedinjenja koja mogu imati negativan zdravstveni uticaj.

2.3.1. Klasifikacija cijanobakterija

Cijanobakterije poseduju izrazito širok spektar morfoloških karakteristika, a po tradicionalnoj morfološkoj klasifikaciji mogu se podeliti u pet osnovnih grupa (Flores, 2008):

Grupa I (*Chroococcales*): čine je pojedinačne i kolonijale jednoćelijske cijanobakterije (npr. *Synechococcus* i *Gloeocapsa*).

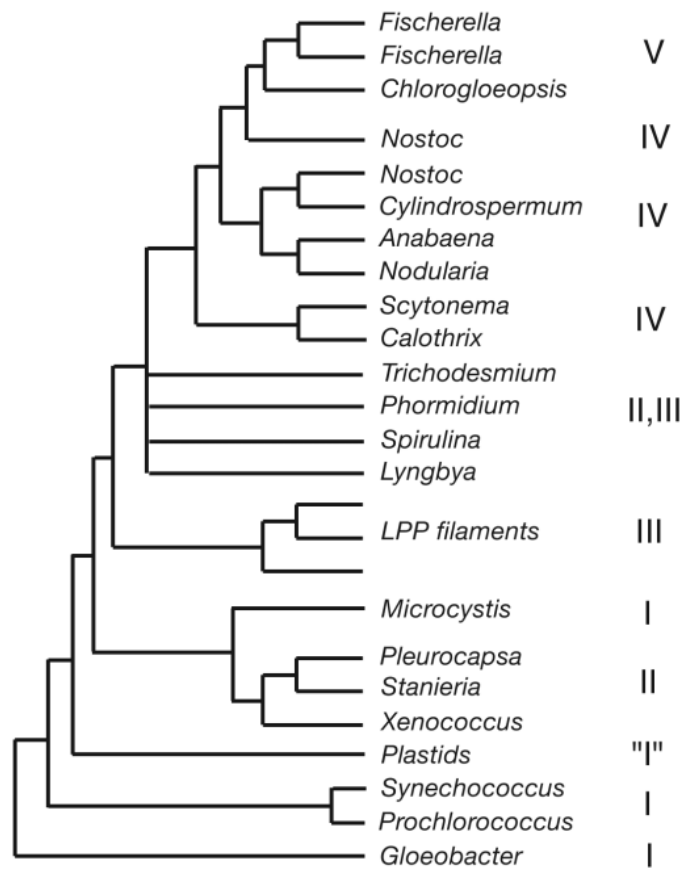
Grupa II (*Pleurocapsales*): čine je jednoćelijske i filamentozne, talus-formirajuće cijanobakterije, koje poseduju sposobnost binarnog kao i višestrukog deljenja ćelija.

Grupa III (*Oscillatoriales*): čine je filamentozne cijanobakterije koje ne ispoljavaju ćelijsku diferencijaciju.

Grupa IV (*Nostocales*): čine je filamentozne cijanobakterije kod kojih postoji ćelijska diferencijacija sa formiranjem specijalizovanih ćelija, akineta i heterocista.

Grupa V (*Stigonematales*): čine je cijanobakterije sa ispoljenom diferencijacijom ćelija i složenom višćelijskom organizacijom.

Molekularnim filogenetskim analizama potvrđene su neke, ali ne sve grupe cijanobakterija date u podeli prema morfološkom tipu (Sánchez-Baracaldo i sar., 2005; Tomitani i sar., 2006). Filogenetski afiniteti taksona (Slika 2.4.) (Sánchez-Baracaldo i sar., 2005) koji dele osobine kao što su diferencijacija ćelija i višestruka podela, nalaze potvrdu i u molekularnim analizama, dok prosti jednoćelijski organizmi i filamenta ne čine monofilogenetske grupe prema ovoj podeli.



Slika 2.4. Filogenetski odnosi između cijanobakterija na osnovu poređenja molekularnih sekvenci. Rimski brojevi označavaju pripadnost grupama I-V prema morfološkoj klasifikaciji.

Dostupna filogenetska ispitivanja ukazuju na to da se osobina formiranja filamenata javila kasnije u evolutivnoj istoriji cijanobakterija, nakon čega je usledila i pojava ćelijske diferencijacije (Komarek, 2010). Mapiranje filogenetskih i morfoloških osobina u filogenetskim ispitivanjima omogućava predviđanja o toku evolucije cijanobakterija, što se dodatno potvrđuje poređenjem sa dostupnim fosilnim dokazima.

2.3.2. Ekološka rasprostranjenost i biologija cijanobakterija

Cijanobakterije se mogu pronaći u gotovo svakom vodenom i kopnenom ekološkom staništu na Zemlji - prisutne su u okeanima, slatkim vodama, zemljištu, pa čak i u nekim stenama. One se mogu pojaviti u vidu planktonskih ćelija ili obrazovati fototrofne biofilme u morskim i slatkovodnim sredinama, nalaze se u vlažnom zemljištu, pa čak i u vidu privremenih kolonija na mokrim stenama ili u pustinjama. Neke vrste cijanobakterija u prirodi žive u simbiotskom odnosu sa pojedinim biljkama, u lišajevima, drugim mikroorganizmima i nekim vrstama morskih sunđera, vršeći funkciju obezbeđivanja hranljivih materija za organizam domaćina. Neke vrste se mogu naći i u neobičnim sredinama kao što je krzno tropskih lenjivaca, pri čemu svojom bojom omogućavaju efikasnu kamuflažu za životinju (Sarma, 2012).

Vodeni predstavnici cijanobakterija su poznati po tome da mogu da uzrokuju pojavu "cvetanja" (eksplozije u broju organizama pri povoljnim uslovima). Cvetanje se može sresti i u morskim i u slatkovodnim sredinama i prepoznaje se pre svega po plavo-zelenoj boji vode i nakupinama biomase cijanobakterija. Ovakva bujanja često dovode do privremenog zatvaranja vodoizvorišta i rekreativnih vodenih površina usled produkcije toksina od strane cijanobakterija koja se može javiti tokom njihovog prenamnožavanja u vodenoj sredini (Schultz, 2009).

Talusi cijanobakterija koji se sreću u prirodi mogu biti u vidu pojedinačnih ćelija, kolonija i filamenata. Kolonije se mogu formirati od većeg broja filamenata, ravnih slojeva, pa čak i u vidu šupljih lopti. Neki filamentozni talusi ispoljavaju sposobnost diferencijacije na više ćelijskih tipova: vegetativne ćelije (uobičajene fotosintetske ćelije koje se formiraju pod povoljnim životnim uslovima), akinete (spore otporne na spoljašnje uslove koje se formiraju pod nepovoljnim uslovima) i heterociste (sadrže enzim nitrogenazu koji je bitan za proces azotofiksacije). Heterociste se takođe mogu formirati pod određenim (anoksičnim) uslovima sredine pri niskoj koncentraciji fiksiranog azota. Vrste koje formiraju heterociste su specijalizovane za fiksaciju atmosferskog azota koji prevode do amonijaka (NH_3), nitrita (NO_2^-) ili nitrata (NO_3^-) koji zatim mogu biti usvojeni od strane biljaka i prevedeni biosintetskim putevima u nukleinske kiseline i proteine. Plantaže pirinča koriste zdrave populacije azotofiksirajućih cijanobakterija (*Anabaena*, u simbiozi sa vodenom paprati roda *Azolla*) kao vid obogaćivanja zemljišta hranljivim materijama (Herrero i Flores, 2008; Bocchi, 2010).

Mnoge vrste cijanobakterija poseduju osobinu formiranja pokretnih filamenata tzv. hromogonija koje se mogu udaljiti od matične biomase i formirati nove kolonije na drugim mestima (Sarma, 2012). Ćelije hromogonije su obično nešto sitnije od vegetativnih oblika, dok su one na krajevima obično sužene. Da bi se ćelije koje formiraju hromogoniju odvojile

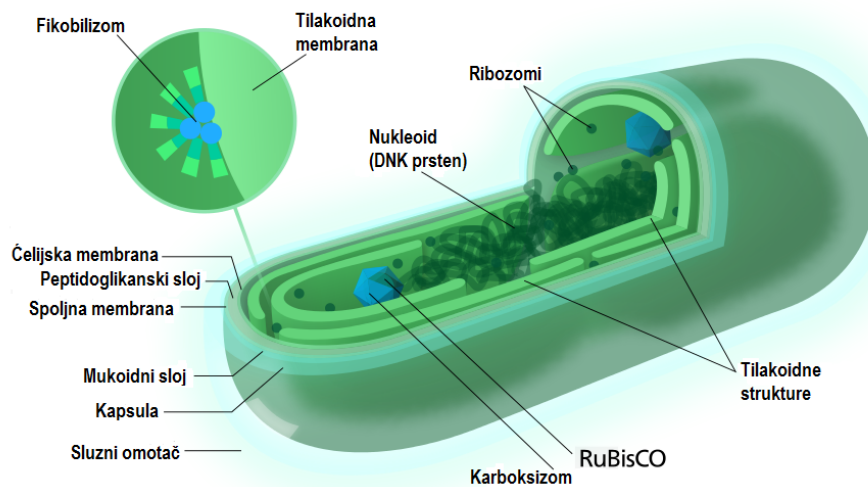
od matične kolonije, potrebno je da dođe do prekida ćelije koja predstavlja vezu sa ostatkom kolonije, a koja se naziva nekridijum (Sarma, 2012).

Svaka individualna cijanobakterijska ćelija obično poseduje debeo želatinozan višeslojan ćelijski zid. Ovi organizmi ne poseduju flagele, ali hromogonije i neke pojedinačne vrste poseduju sposobnost ograničenog slobodnog kretanja. Mnoge višećelijske forme roda *Oscillatoria* su sposobne za talasasto kretanje kroz medijum pri čemu ceo filament vrši ritmične oscilatorne pokrete. U vodenim sredinama, neke vrste cijanobakterija plutaju uz pomoć formiranja gasnih vezikula, koje same po sebi ne predstavljaju organele i njihovi zidovi nisu izgrađeni od lipidnih membrana, već su proteinske strukture (Tomitani, 2006, Sarma, 2012).

Cijanobakterije su zaslužne za 20-30% ukupne fotosintetske produktivnosti na Zemlji i konvertuju solarnu energiju u hemijski vezanu energiju u vidu biomase sa potencijalom od ~450 TW (Pisciotta i sar., 2010). One koriste solarnu energiju za proces fotosinteze u kom se energija svetlosti koristi za cepanje veza u molekulima vode pri čemu nastaju kiseonik, protoni i elektroni. Iako se većina ove svetlosne energije koristi za metaboličke potrebe samih ćelija, jedan deo nastalih slobodnih elektrona odlazi u spoljašnju sredinu u vidu elektrogenih aktivnosti. Elektrogena aktivnost cijanobakterija predstavlja važan vid sprovođenja solarne energije u biosferu (Pisciotta i sar., 2010).

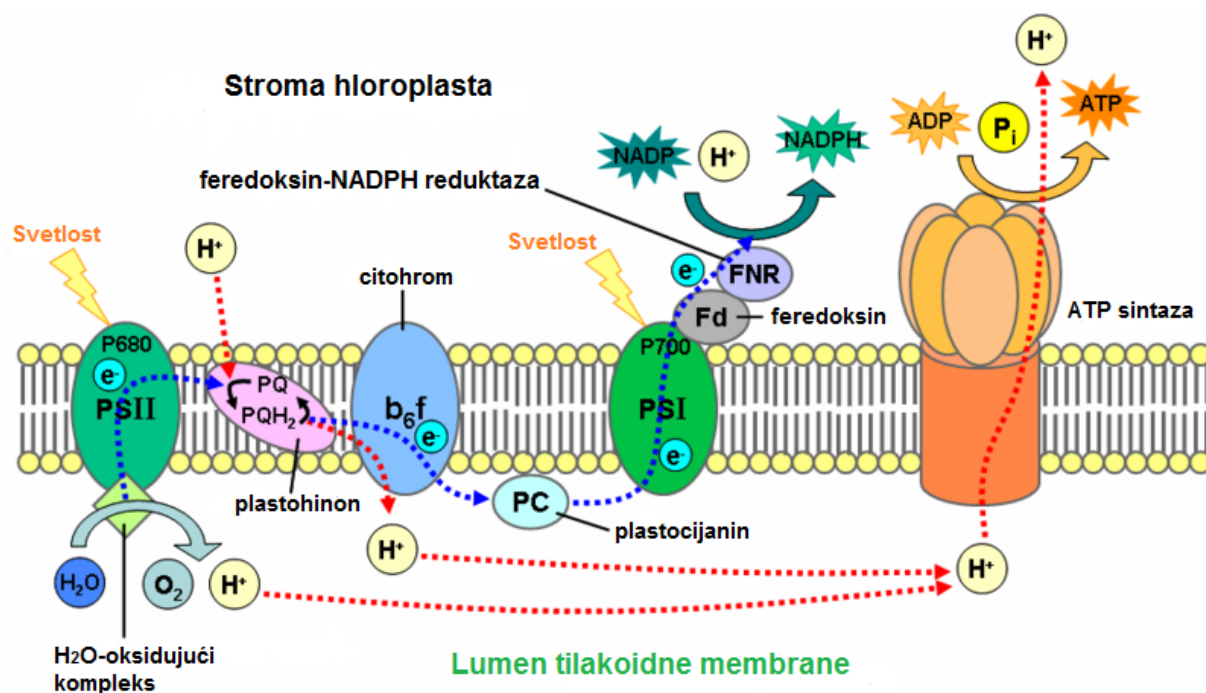
2.3.3. Metabolizam i organele

Kao i svi prokariotski organizmi, cijanobakterije ne poseduju razvijeno ćelijsko jedro (nukleus), kao ni razvijen sistem internih ćelijskih membrane tj. organela. Proces fotosinteze se odvija na pojedinačnim tilakoidima koji su membranske tvorevine smeštene u hromatoplazmi. Boja cijanobakterija potiče od fikobilinskih pigmenata, pre svega plavičastog pigmenta fikocijanina koji služi za prikupljanje sunčeve svetlosti u procesu fotosinteze. Fotosinteza kod cijanobakterija uglavnom koristi molekul vode (H_2O) kao elektron-donor, pri čemu kao nusprodukt nastaje molekulski kiseonik (O_2) (Olson, 2006). Neke vrste, slično nekim drugim fotosintetskim bakterijama, takođe mogu kao elektron-donorski molekul da koriste i vodonik-sulfid (H_2S) (Cohen i sar., 1986; Olson, 2006). Pri ovim procesima ugljen dioksid (CO_2) biva redukovano i koristi se za izgradnju ugljenih hidrata preko Kelvinovog ciklusa. Kod većine vrsta cijanobakterija fotosintetski aparat se nalazi u naborima ćelijske membrane koje se nazivaju tilakoidi (Slika 2.5.) (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cyanobacterium-inline.svg>).



Slika 2.5. Šematski prikaz građe cijanobakterije

Smatra se da je fotosintetska aktivnost praistorijskih vrsta cijanobakterija dovela do povećanja koncentracije kiseonika u atmosferi (Vonshak, 2002). Sposobnost cijanobakterija da redukuju azot i ugljen dioksid u aerobnim uslovima je verovatni ključ njihovog velikog evolutivnog i ekološkog uspeha. Proces fotosinteze pri kom se oksiduje molekul vode se postiže kuplovanjem fotosistema (PS) II i I (Z-šema, Slika 2.6.) (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_3.svg). U anaerobnim uslovima, one mogu koristiti samo PS I u procesu ciklične fosforilacije pri čemu se umesto vode kao elektron-donori mogu koristiti drugi molekuli (vodonik sulfid, tiosulfat ili čak molekulski vodonik), što je proces sličan onom koji koriste purpurne fotosintetske bakterije (Cohen i sar., 1986). Takođe, neke cijanobakterije ispoljavaju sposobnost redukovanja elementarnog sumpora u anaerobnim uslovima i odsustvu svetlosti, slično nekim vrstama bakterija. Sistem elektron-transporta kod cijanobakterija deli isti ćelijski kompartman sa komponentama respiratornog elektron-transporta. Njihova plazmalna membrana sadrži samo komponente respiratornog lanca, dok se na tilakoidnoj membrani nalaze i respiratorni i fotosintetski elektron-transportni sistemi (Bandyopadhyay i sar., 2010).



Slika 2.6. Svetlosno – zavisne reakcije fotosinteze (Z-šema)

2.3.4. Cijanobakterije roda *Spirulina*

Cijanobakterije roda *Spirulina* su planktonski organizmi koji se mogu naći u velikom broju u suptropskim i tropskim vodama koje karakteriše visok nivo karbonata i hidrogenkarbonata i visok pH (do 11). Sa ekonomskog aspekta *S. platensis* i *S. maxima* su dve najznačajnije vrste ovog roda. *S. platensis* je znatno šire rasprostranjena vrsta u prirodi, najviše raširena u Africi, ali takođe prisutna i u Aziji i Južnoj Americi, dok je glavno prirodno stanište *S. maxima* uglavnom ograničeno na Južnu Ameriku (Vonshak, 2002). Iako se po mnogim taksonomskim osobinama rod *Spirulina* često svrstava u sličan rod *Arthrospira* i ovaj naziv je često u upotrebi, naročito za ekonomski važne vrste (*A. platensis*, *A. maxima*). Potrebno je naglasiti da je rod *Arthrospira* različit i filogenetski udaljen od roda *Spirulina*, iako sa njim deli spiralni oblik trihoma i ekološku rasprostranjenost pojedinih vrsta (Vonshak, 2002).

S. maxima i *S. platensis* su filamentozne cijanobakterije koje karakteriše glavna morfološka odlika ovog roda – prostorni raspored višćelijskog cilindričnog trihoma u obliku levog heliksa celom dužinom (Balloni i sar., 1980) (Slika 2.7.) (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spirul2.jpg>).

Slika 2.7. *Spirulina platensis*

Iako je helikoidni oblik trihoma stabilan, postoje velike varijacije u stepenu i obliku heličnosti koje zavise od posmatranog soja u okviru vrste, a mogu se javiti razlike i u okviru istog soja. Trihom vrste *S. platensis* obično poseduje uniformnu širinu celom dužinom, dok trihom vrste *S. platensis* najčešće poseduje određen stepen suženja na krajevima. Obe vrste pod mikroskopom pokazuju visok stepen granulacije na međucelijskim spojevima, koja potiče od gasnih vakuola (aerotopa) (Balloni i sar., 1980). Ovaj rod cijanobakterija je usled svojih specifičnih osobina i povoljnog hemijskog sastava jedan od najčešće uzgajanih u svrhu dobijanja hrane za ljude i životinje, kao i za dobijanje čitavog niza biomolekula koji se koriste u prehrambenoj industriji i biotehnologiji.

2.3.5. Cijanobakterije roda *Nostoc*

Cijanobakterije roda *Nostoc* mogu se naći u različitim ekološkim staništima, gde formiraju kolonije sastavljene od heterocitnih filamenata koje čine ćelije u želatinoznom omotaču. Ovi mikroorganizmi se mogu naći u zemljištu, na vlažnim stenama, na dnu jezera i izvora, a ređe i u morskom okruženju. Takođe, mogu da rastu simbiotski u tkivima pojedinih biljaka, obezbeđujući azot putem terminalno diferenciranih heterocista (http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=42976). Kao i druge cijanobakterije, i vrste roda *Nostoc* poseduju fotosintetske pigmente i imaju mogućnost vršenja fotosinteze. Kolonije roda *Nostoc* su najčešće ovalnog ili amorfne oblika, tanke i tamne boje kada su u dehidriranom stanju (Slika 2.8.) (<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:>

CyanobacteriaColl1.jpg). Filamenti unutar kolonija su uglavnom nepravilno savijeni i najveća gustina filamenata je često u perifernim delovima kolonija. Trihomi su najčešće izopolarni, jednake širine celom dužinom (Komarek, 2010).



Slika 2.8. kolonije *Nostoc Pruniforme*

Pojedine vrste roda *Nostoc* (*N. flagelliforme*, *N. commune*, *N. elipsosporum*) se uzgajaju i koriste u ishrani ljudi, uglavnom u azijskim zemljama. Iako se koriste u ishrani, pokazano je da neki sojevi roda *Nostoc* sadrže značajnu količinu neurotoksične aminokiseline β -metilamino-L-alanina (BMAA) za koju se sumnja da preteranom konzumacijom može izazvati određene neurološke poremećaje (Johnson i sar., 2008). Osim toga određene vrste roda *Nostoc* su poznate i kao producenti drugih tipova toksina (Sivonen i Jones, 1999).

2.3.6. Cijanobakterije roda *Anabaena*

Rod *Anabaena* su heterocitne filamentozne cijanobakterije, široko rasprostranjene u različitim ekološkim staništima kao što su slatka i slana voda i zemljište, gde se mogu javiti u vidu slobodnih filamenata ili kolonija koje prekrivaju različite površine. Na većim vodenim površinama mogu izazvati tzv. "cvetanja", dok su pojedine vrste veoma značajne zbog svoje uloge azotofiksatora u zemljištu. Trihomi koji formiraju filamente su najčešće

zakrivljeni, ali mogu biti i nepravilno savijeni i uglavnom su uniformne širine, dok kod nekih vrsta pokazuju izvesno suženje na krajevima (http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=f9d14abc6858548dd) (Slika 2.9.) ([https:// commons.wikimedia.org/wiki/File:Anabaenaflosaquae_EPA.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Anabaenaflosaquae_EPA.jpg)).



Slika 2.9. *Anabaena flos aquae*

Rod *Anabaena* uključuje više vrsta koje su poznate po produkciji cijanotoksina koji mogu izazvati štetne efekte po zdravlje ljudi i životinja (Sivonen i Jones, 1999). Mnoge vrste ovog roda imaju ograničenu geografsku rasprostranjenost, međutim sam rod je široko prisutan u velikom broju ekoloških staništa širom sveta (Herrero i Flores, 2008).

2.4. Hemijski sastav cijanobakterija sa nutritivnog aspekta

2.4.1. Nutrijenti

Brojne vrste mikroalgi i cijanobakterija se u svetu komercijalno uzgajaju i koriste za ljudsku i životinjsku ishranu (Svirčev, 2005). Njihov značajan nutritivni potencijal se nalazi u mogućnosti njihovog uzgoja na područjima koja ne pogoduju drugim poljoprivrednim kulturama kao i slaboj ispitivosti u odnosu na uobičajene organizme koji se uzgajaju za potrebe ishrane. Neke vrste mikroalgi pružaju prinose biomase koji su za nekoliko redova veličine veći u odnosu na standardne biljne kulture. Mnoge vrste cijanobakterija predstavljaju bogat izvor visoko vrednih nutrijenata, što ih čini veoma interesantnim sa

stanovišta primene u ishrani ljudi i životinja (Svirčev, 2005). Iako su u pitanju fotosintetski mikroorganizmi, njihov hemijski sastav i nutritivni profil više odgovara namirnicama životinjskog porekla. Cijanobakterijska biomasa predstavlja veoma bogat izvor biološki vrednih nutrijenata, kao što su n-3 i n-6 nezasićene masne kiseline, proteini, minerali i drugi esencijalni nutrijenti (Tokusoglu i Ūnal, 2003). U Tabeli 2.1. prikazan je osnovni nutritivni sastav odabranih mikroalgi i cijanobakterija (Becker, 2007; Christi 2007).

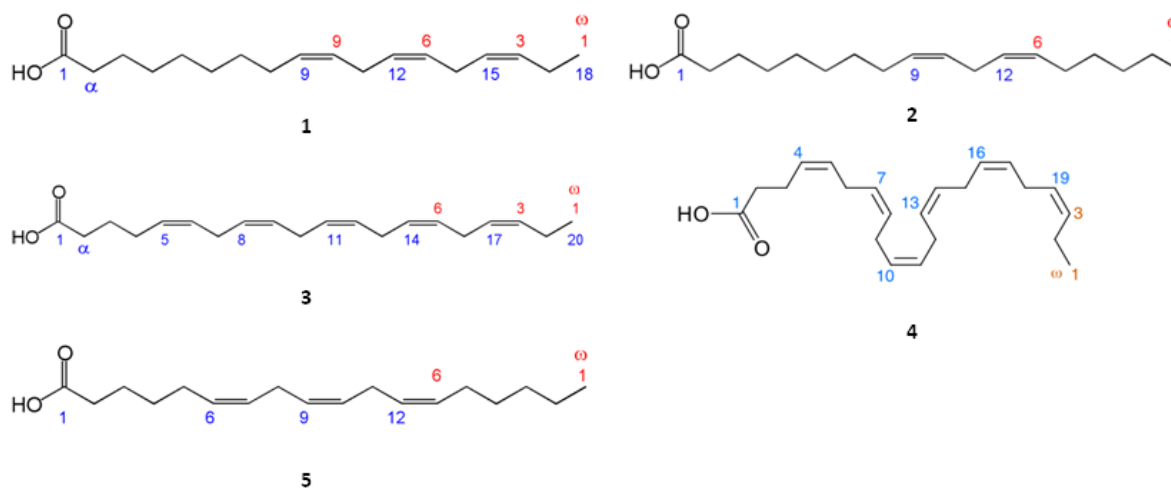
Tabela 2.1. Hemijski sastav nekih mikroalgi i cijanobakterija (w/w %)

Vrsta	Proteini	Ugljeni hidrati	Lipidi
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	62	23	3
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
<i>Schizochytrium sp.</i>	-	-	50-77
<i>Arthrospira maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Proteini su najrasprostranjeniji biološki makromolekuli koji se u prirodi javljaju kao gradivni blokovi ćelija i ćelijskih delova, ispoljavaju ogroman diverzitet bioloških funkcija u organizmu, i kao takvi značajan su činilac ljudske i životinjske ishrane. Obzirom na novonastale probleme vezane raspoložive površine za gajenje biljnih kultura i životinja u svrhu prehrane, gajenje mikroorganizama pokazuje određene prednosti u odnosu na pomenute izvore hrane. Fotosintetski mikroorganizmi mogu predstavljati odličan izvor navedenih makromolekula, a njihovo gajenje takođe pruža mogućnost simultanog dobijanja drugih važnih jedinjenja kao što su pigmenti (karotenoidi, hlorofil, fikocijanin), esencijalne aminokiseline, masne kiseline, lipidi i vitamini (Sassano i sar., 2010). Pored brojnih istorijskih primera upotrebe cijanobakterija i mikroalgi u ljudskoj ishrani, od 1950-tih godina se sa nutritivnog aspekta ispituju pretežno dva roda mikroalgi: *Chlorella* i *Scenedesmus* (ÖStilrind, 1950). Ovi organizmi međutim poseduju slabo svarljiv polisaharidni ćelijski zid i cena ekstrakcije upotrebljive biomase iz njih je veoma visoka. Ovi problemi bi se mogli prevazići upotrebom cijanobakterija koje ne poseduju celulozni ćelijski zid što ih čini lakše svarljivim. Većina cijanobakterija sadrži visok procenat proteina koji se obično kreće u rasponu 30-75% u odnosu na suhu masu (Tokusoglu i Ūnal, 2003; Sassano i sar., 2010; López i sar., 2010). Među cijanobakterijama vrste roda *Spirulina/Arthrospira* (*S. platensis*, *S. maxima*) se ističu visokim sadržajem proteina visoke

biološke vrednosti. Nutritivne studije su pokazale da *Arthospira sp.* Spada među najznačajnije biološke izvore proteina, kao i da je njihov sastav veoma kvalitetan jer su zastupljene sve esencijalne aminokiseline (izuzev metionina) u optimalnoj koncentraciji za ljudski ishranu preporučenu od strane Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih Nacija (FAO) (Sassano i sar., 2010; Svirčev, 2005; Balloni i sar., 1980).

Masne kiseline, a naročito esencijalne masne kiseline su veoma važan deo ishrane. Poslednjih decenija je posvećena velika pažnja ispitivanju uloge esencijalnih i drugih mono- i polinezasićenih masnih kiselina u ishrani i njihovom uticaju na kardiovaskularno zdravlje i imunitet. Cijanobakterije predstavljaju dragocen izvor ovih jedinjenja i to je jedan od razloga što se poslednjih decenija ispituje mogućnost njihovog gajenja u svrhu ishrane, kao i za proizvodnju biološki obnovljivih goriva (Svirčev, 2005). Sadržaj lipida u cijanobakterijama veoma varira od vrste do vrste, kao i od uslova gajenja i dostupnosti nutrijenata u medijumu, i može iznositi od 1% do čak preko 50% kod nekih vrsta mikroalgi (Mata i sar., 2010; Tokusoglu i Ünal, 2003; Henrikson, 2009). Sa nutritivnog aspekta, najvažniji faktor predstavlja sadržaj esencijalnih masnih kiselina, naročito n-3 i n-6 nezasićenih masnih kiselina. Sisari ne poseduju sposobnost uvođenja dvostruke veze u masne kiseline iza C9 i C10 atoma, tako da su n-6 linolna kiselina (18:2,9,12) i n-3 linolenska kiselina (18:3,9,12,15) neophodne u ljudskoj ishrani. Takođe, n-3 i n-6 masne kiseline dugog lanca, kao što su eikozapentaenska (EPA, 20:5), dokozaheksaenska (DHA, 22:6) i gama-linolenska (GLA, 18:3) (Slika 2.10.) pokazuju značajne povoljne efekte na zdravlje (Nagao i Yanagita, 2008).



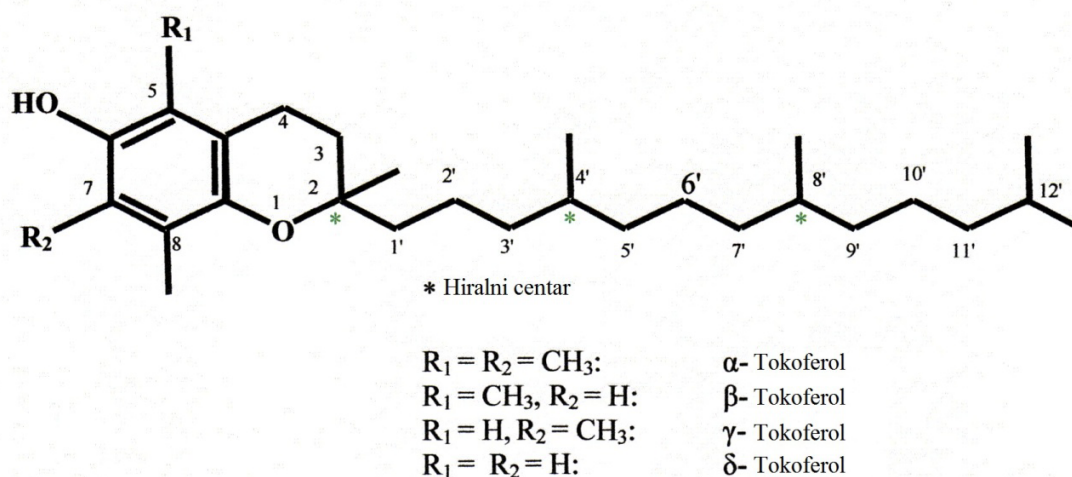
Slika 2.10. Odabrane esencijalne masne kiseline: 1 - ALA, 2 - LA, 3 - EPA, 4 - DHA, 5 - GLA

Mnoge cijanobakterije i mikroalge koje se koriste za ljudsku ishranu, kao što su *Spirulina sp.*, *Isochrysis Galbana*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Nostoc flagelliforme/communae* i *Chlorella* su veoma bogat izvor pojedinih esencijalnih masnih kiselina (cit. Kovač i sar., 2013). *Spirulina* vrste su sa ovog aspekta naročito interesantne, obzirom da predstavljaju jedan od retkih izvora gama-linolenske kiseline (GLA) za koju je pokazano da poseduje brojne pozitivne efekte na zdravlje, uključujući antiinflamatorno i antiproliferativno delovanje (Fan i Chapkin, 1998, Svirčev, 2005).

Makro- i mikroelementi predstavljaju neophodan činilac pravilne ishrane ljudi i njihovo unošenje je vezano za brojne uloge koje ispoljavaju u metabolizmu. Oni mogu imati gradivnu funkciju, učestvovati u uspostavljanju elektrohemijskih gradijenata ćelijskih membrana i međućelijskih fluida, prenosu kiseonika i kao kofaktori brojnih enzima u metaboličkim procesima. Makroelementi (kalijum, hlor, natrijum, kalcijum, fosfor, magnezijum) su elementi koji se u organizmu nalaze u relativno velikim količinama i njihov dnevni unos iznosi više od 100 mg, dok se mikroelementi (cink, gvožđe, mangan, bakar, jod, selen, molibden) u ljudskom organizmu nalaze u relativno malim količinama ili u tragovima i njihov preporučeni dnevni unos iznosi od 0,045 mg (za molibden) do 18 mg (za gvožđe) (Nelson i Cox, 2000). Cijanobakterije predstavljaju potencijalno bogat izvor makro- i mikroelemenata, obzirom na njihovu sposobnost bioakumulacije jona metala iz svoje okoline, što ih čini potencijalno vrednim izvorom ovih nutrijenata u ishrani ljudi i životinja (Kovač i sar., 2003; Henrikson, 2009; Tokusgol i sar. 2003, Voshnak 2002). Takođe, usled svoje sposobnosti da vrše bioakumulaciju mikroelemenata iz svoje okoline, pojedine vrste su pokazale potencijal za razvoj proizvoda sa dodatom vrednosti (added-value). Mosulishvili i saradnici (2002) ispitivali su mogućnost kreiranja funkcionalnih prehambenih proizvoda baziranih na biomasi *Spirulina platensis* obogaćene selenom i jodom. Rezultati ispitivanja su pokazali da cijanobakterija *Spirulina* poseduje odličnu sposobnost bioakumulacije jona metala iz svoje sredine, a obzirom da je u pitanju vrsta koja se upotrebljava u ishrani, utvrđen je veliki potencijal za kreiranje nutraceutika koji bi mogao poslužiti u svrhu prevencije deficita ovih elemenata u ishrani ljudi i životinja.

Vitamini i antioksidanti čine veoma bitne elemente zdrave ishrane, a alge i cijanobakterije predstavljaju veoma interesantne i bogate izvore ovih nutrijenata (cit. Svirčev, 2005). Neke vrste roda *Chlorella* sadrže veće koncentracije pojedinih vitamina nego većina jestivih biljnih kultura. Takođe, cijanobakrerije iz roda *Spirulina* sadrže i do deset puta veću koncentraciju β -karotena u odnosu na većinu namirnica, uključujući i šargarepe (Mohammed i sar., 2011), kao i koncentraciju vitamina B12 koja prevazilazi sve poznate prirodne izvore u ishrani. Ovaj rod cijanobakterija, u poređenju sa zelenim algama, spanaćem i životinjskom jetrom, predstavlja značajno bogatiji izvor vitamina E, tiamina, kobalamina, biotina i inozitola (Kovač i sar., 2013). Nekoliko vrsta mikroalgi proizvodi α -tokoferol (α -T, najaktivnija forma vitamina E, Slika 2.11.) u veoma visokoj koncentraciji.

Rodriguez-Zavala i saradnici (2010) utvrdili su da u algi *Euglena Gracilis* pri uslovima heterotrofnog gajenja nakon 120 časova koncentracija α -tokoferola dostiže vrednost od $3,7 \pm 0,2$ mg/g, što u poređenju sa suncokretom, sojinim semenom, maslinama i kukuruzom (neki od najrasprostranjenijih prirodnih izvora vitamina E u ishrani) predstavlja 13, 18, 95 i 56 puta veću produkciju, respektivno.



Slika 2.11. Glavni izomeri tokoferola (vitamin E)

Antioksidantna jedinjenja u mikroalgama i cijanobakterijama spadaju u jedinjenja od velikog komercijalnog i naučnog interesa. Biomasa ovih organizama se smatra višekomponentnim antioksidantnim sistemom čija je efektivnost uvećana usled interakcija i sinergističkog delovanja pojedinih antioksidantnih jedinjenja. Najaktivniji hidrosolubilni antioksidanti u ovim organizmima spadaju u red fenola, fikobiliproteina i vitamina (Plaza i sar., 2008). Obzirom da su fotosintetski organizmi, mikroalge i cijanobakterije bivaju izložene visokim nivoima kiseonika i svetlosti, koji mogu biti izuzetno povišeni prilikom gajenja ćelijskih kultura u zatvorenim tipovima fotobioreaktora. Takvi uslovi pogoduju nakupljanju visoko efektivnih antioksidantnih kompleksa „hvatača radikala“ (radical scavenger) koji štite ćeliju od oksidativnog stresa (Christaki i sar., 2013). Tako na primer antioksidantni potencijal ćelija *Spirulina platensis* može da se uveća i za 2,3 puta u uslovima oksidativnog stresa (Pulz i Gross, 2004). U industriji funkcionalne hrane i nutraceutika, visok antioksidativni kapacitet proizvoda od mikroalgi i cijanobakterija je od potencijalno velikog značaja, naročito u industriji napitaka (Pulz i Gross, 2004).

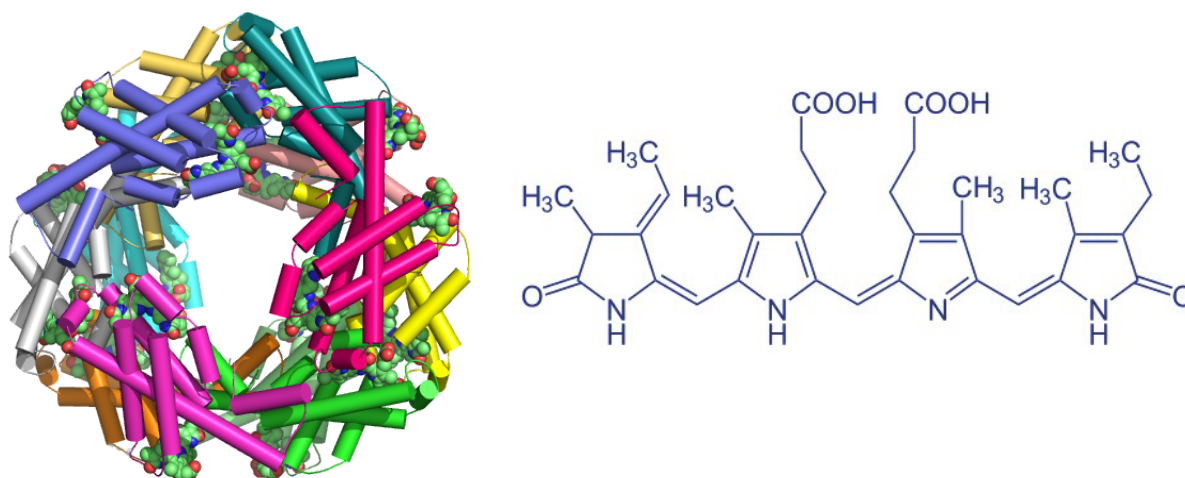
2.4.2. Pigmenti

Sintetske boje koje se koriste u prehrambenoj industriji uglavnom su jedinjenja dobijena hemijskim modifikacijama različitih petrohemijskih proizvoda. Iako su mnoge od ovih boja zabranjene za upotrebu usled nepovoljnih zdravstvenih efekata koje mogu da izazovu, njihova upotreba i dalje je veoma raširena zbog visoke cene i malih prinosa biljnih pigmenata u ove svrhe (Mohammed i sar., 2011). Obzirom na rastući trend u svetu da se veštačke boje u hrani zamene prirodnim alternativama, pri čemu ekstrakcija iz biljnih izvora zahteva velike količine biomase, mikroalge i cijanobakterije predstavljaju poencijalno dobru alternativu za te svrhe (Simeunović i sar., 2012).

U Brazilu se hlorofil za potrebe prehrambene boje dobija iz spanaća u kom se nalazi u količini od oko 0,06 mg/g, dok biomasa cijanobakterije *Spirulina sp.* ovaj pigment sadrži u koncentraciji od oko 1,15 mg/g (Danesi i sar., 2002). Upotrebom kalijum-nitrata (KNO_3) i amonijum-hlorida (NH_4Cl) kao izvora azota u podlozi, Rodrigues i saradnici (2010) uspeli su da postignu produkciju visoko kvalitetne biomase *Spirulina* sa sadržajem hlorofila od 21,85 mg/g. Danesi i saradnici (2002) su takođe ispitivali potencijal dodavanja celokupne biomase *Spirulina* u prehrambene proizvode, što bi pored obezbeđivanja zelene boje takođe moglo da unapredi nutritivnu vrednost finalnog proizvoda. Neke mikroalge predstavljaju bogat izvor karotenoida koji se koriste kao prirodne prehrambene boje, aditivi u hrani za životinje, vitaminski suplementi i funkcionalna hrana. U svrhu pigmentacije mesa brojlera i/ili žumanaca jaja, ishrana pilića mora da sadrži karotenoide, a u radovima Gouveia i saradnika (1996) efekat ovih pigmenata dobijenih iz biomase *Chlorella vulgaris* na obojenost žumanceta jaja bio je uporediv sa komercijalnim sintetskim preparatima koji su u upotrebi u tu svrhu. Najvažniji karotenoid iz biomase mikroalgi i cijanobakterija je β -karoten kao najaktivnije jedinjenje u ulozi provitamina A, a koji je u širokoj upotrebi kao prehrambena boja, provitamin, dodatak multivitaminским preparatima i dodatak ishrani sa potvrđenim antioksidantnim delovanjem (Christaki i sar., 2013, Kovač i sar., 2013). Prirodni oblik ovog provitamina ispoljava jače delovanje od svoje sintetske forme, od koje se nekoliko puta bolje apsorbuje u digestivnom traktu nakon konzumacije. Prema skorijim nalazima, karotenoidno jedinjenje astaksantin ispoljava značajnije antioksidantno delovanje od β -karotena, vitamina C, vitamina E i mnogih ksantofila (Takaichi i Mochimaru, 2007). Ovaj karotenoid se u svrhu bojenja koristi u akvakulturi, kao i u proizvodnji hrane, funkcionalne hrane i hrane za životinje. Iako prirodni oblik ovog jedinjenja ne može da se takmiči komercijalno sa sintetskim oblikom, on ima prednost u određenim primenama a mikroalga *Haematococcus pluvialis* se koristi kao njegov bogat izvor koji je moguće uzgajati na velikoj skali (Spolaore i sar., 2006).

Fikobiliproteini su grupa komercijalno značajnih proteinskih pigmenata koji se mogu naći jedino u pojedinim algama (Svirčev, 2005). Iako se prvenstveno koriste kao prirodne

prehrambene boje, postoje mnogobrojni dokazi njihovog povoljnog delovanja na zdravlje. Fikocijanin (Slika 2.12.) (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phycocyanin_assembly.png) je jedan od komercijalno veoma interesantnih produkata koji se dobijaju iz cijanobakterija *Spirulina*, a proizvodi se uglavnom u Japanu i koristi kao prirodna prehrambena boja pod nazivom Lina-Blue. U Japanu i Kini ima široku upotrebu kao prehrambena boja u proizvodima kao što su žvake, slatkiši, mlečni proizvodi, želei, bezalkoholna pića i sl. Istraživanja su pokazala da fikocijanin takođe ispoljava i značajnu antioksidativnu, antiinflamatornu i hepatoprotektivnu aktivnost, kao i da može poslužiti kao potencijalni hemioterapeutski i hepatoprotektivni agens (Kovač i sar., 2013; Gantar i Svirčev, 2008). Simeunović i saradnici (2012) su ispitivali produkciju fikobiliproteina u sojevima cijanobakterija poreklom iz Srbije i utvrdili da pojedini sojevi predstavljaju odličan potencijalni izvor ovih jedinjenja. Obzirom da ukupan sadržaj kao i sastav fikobiliproteina u cijanobakterijama zavisi od spoljašnjih faktora, Simeunović i saradnici (2013) takođe su ispitivali uticaj pojedinih faktora. Rezultati su pokazali da kod suvozemnih azotofiksirajućih sojeva *Nostoc* i *Anabaena* prisustvo dostupnog azota utiče na sastav fikobiliproteina. Takođe, rezultati su pokazali značajno niže koncentracije ovih pigmenta kod sojeva koji su gajeni u tamnim uslovima sa smanjenom količinom vlage.



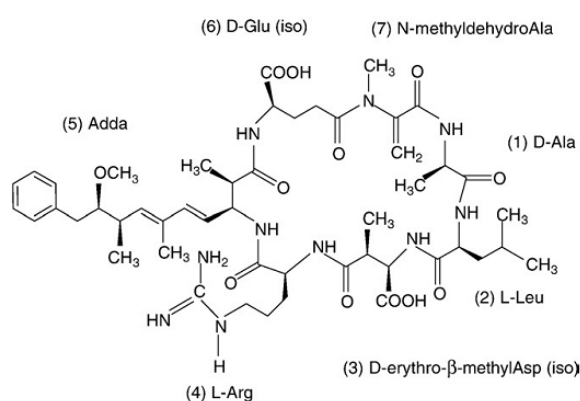
Slika 2.12. Struktura proteina fikocijanina i tetrapiroleskog lanca fikocijanobilina

Mikroalgalni i cijanobakterijski pigmenti, kao i kompletna biomasa mogu se koristiti kao boje za hranu, ali i u svrhu poboljšanja teksturnih svojstava prehrambenih proizvoda. Pokazano je da dodatak fikocijanina može da poboljša reološke parametre emulzija, koji su ispoljili linearan porast sa porastom koncentracije dodatog pigmenta (Batista i sar., 2006). Sa druge strane, zahvaljujući antioksidativnoj aktivnosti prirodnih pigmenta, moguće je postići povećanu otpornost ulja prema oksidaciji, što je veoma značajno kod prehrambenih

proizvoda sa visokim sadržajem ulja kao što su emulzije. Inkorporacija biomase mikroalgi u prehrambene emulzije od strane Gouveia i saradnika (2006) rezultirala je širokim spektrom privlačnih obojenja (od zelenih, do narandžastih i ružičastih), kao i povećanjem otpornosti ispitivanih emulzija prema oksidaciji. Pomenuti autori su takođe uporedili antioksidativnu aktivnost biomase sojeva *Haematococcus pluvialis* i *Chlorella vulgaris* i došli do pretpostavke da veća antioksidativna stabilnost u prisustvu *H. pluvialis* potiče od astaksantina koji je dominantni karotenoid u ovoj mikroalgi.

2.4.3. Cijanotoksini

Mnogi rodovi cijanobakterija proizvode veliki broj toksina i bioaktivnih jedinjenja koja predstavljaju sekundarne metabolite (jedinjenja koja nisu neophodna za rast i metabolizam organizma koji ih proizvode). Smatra se da cijanotoksini imaju ulogu u opstanku cijanobakterija u prirodnoj sredini tako što im omogućuju kompetitivnu prednost u prisustvu drugih mikroorganizama (O'Neil i sar., 2012). Cijanotoksini obuhvataju veliki broj raznovrsnih klasa hemijskih jedinjenja, a primeri toksikološki značajnijih su mikrocistini (primer na Slici 2.13.) (Rastogi i Sinha, 2009), nodularin, anatoksin, saksitoksini, β -metilamino-L-alanin (BMAA), palitoksini i cilindrospermopsini (Sivonen i Jones, 1999). Po biološkom efektu, ovi toksini se mogu podeliti u pet glavnih grupa: hepatotoksini, neurotoksini, citotoksini, dermatotoksini i toksini sa iritirajućim potencijalom (lipopolisaharidi) (cit. Simeunović, 2010) Iako je uzrok intoksikacije ovim jedinjenjima najčešće eutrofizacija (tzv. „cvetanje“) vodenih površina, konzumiranje cijanobakterija putem hrane takođe može predstavljati rizik po zdravlje ljudi i životinja (Rastogi i Sinha, 2009).



Slika 2.13. Struktura mikrocistina-LR

Od cijanobakterija koje mogu proizvoditi toksine od najvećeg značaja su rodovi *Anabaena* (mikrocistini, anatoksin, saksitoksini) i *Nostoc* (mikrocistini, BMAA), jer se neke vrste često koriste kao hrana (Berry i sar., 2008). Takođe, saksitoksini koje produkuju neke vrste roda *Anabaena* mogu dospeti u lanac ishrane morskih organizama i kao krajnji rezultat dovesti do trovanja (paralitičko trovanje morskim plodovima) krajnjih konzumenata morskih organizama u kojima dolazi do njihove bioakumulacije (Rastogi i Sinha, 2009; Msagati i sar., 2006). Mikrocistini imaju izražen hepatotoksični efekat, dok je za BMAA poznato da može dovesti do neurodegenerativnih oštećenja usled konzumacije. Iz navedenih razloga, svaki soj cijanobakterija i mikroalgi koji je od potencijalnog značaja za ishranu mora biti dokazano bezbedan za konzumaciju i ne sme proizvoditi cijanotoksine u toksikološki značajnim koncentracijama.

Osim toksikološkog značaja u ishrani, cijanotoksini su poslednjih godina takođe predmet naučnog istraživanja u cilju njihove potencijalne biotehnoške ili medicinske primene (cit. Simeunović, 2010). Mnoga od ovih toksičnih jedinjenja imaju potencijal kao ekološki i toksikološki prihvatljivija alternativa postojećim sintetskim insekticidima, algicidima i herbicidima. Takođe, neki od ovih biološki visoko aktivnih produkata metabolizma cijanobakterija se aktivno ispituju kao potencijalni hemioterapeutici, antibiotici i antikancerski agensi (Rastogi i Sinha, 2009; Berry i sar., 2008).

2.5. Primena cijanobakterija u ishrani

2.5.1. Primena u ishrani ljudi

Tokom poslednjih decenija, rast ljudske populacije je doveo do istraživanja u smeru nalaženja alternativnih izvora hrane, pri čemu su se mikroalge i cijanobakterije pokazale kao obećavajući izvori hrane. Iako se u nekim delovima sveta makroskopske alge koriste za ishranu ljudi, mikroalge i cijanobakterije predstavljaju još jedan alternativni izvor nutrijenata čiji potencijal nije u potpunosti iskorišćen (Svirčev, 2005; Kovač i sar., 2013).

Biomasa mikroalgi i cijanobakterija komercijalno može biti dostupna u vidu praha, tableta, kapsula i tečnosti, a takođe može biti inkorporirana u formulacije drugih prehrambenih proizvoda (Svirčev, 2005) (Slika 2.14.) (<http://www.designboom.com/technology/urban-farming-of-edible-algae-on-bangkok-skyscraper-rooftops/>; <http://www.tripow.ca/recipes/>). S druge strane, konzumacija ovih organizama je ograničena na relativno mali broj rodova, a za ljudsku ishranu najvažnije su vrste iz roda *Spirulina* i *Chlorella*. *Spirulina* se smatra jednim od najkompletnijih i najbogatijih potencijalnih prehrambenih proizvoda u prirodi usled visokog sadržaja kompletnih proteina u svom sastavu, kao i bogatom sklopu

biološki aktivnih nutrijenata i metabolita. Upotreba ove cijanobakterije od strane lokalne populacije u Meksiku i delovima Afrike datira iz davne prošlosti, pri čemu se koristi kao dodatak ishrani ljudi, kao i u ishrani životinja, akvakulturi i proizvodnji živine (Hasan i Chakrabarti, 2009; Svirčev, 2005).



Slika 2.14. Primeri prehrambenih proizvoda sa dodatkom cijanobakterije *Spirulina sp.*

Vrste roda *Chlorella* su rasprostranjene kao tradicionalna hrana u nekim dalekoistočnim zemljama. Ovaj rod je u upotrebi na tržištu zdrave hrane, kao i u proizvodnji hrane za životinje i akvakulturi. Neki autori ukazali su na značaj prethodne prerade nekih mikroalgi, obzirom da prisustvo ćelijskog zida predstavlja prepreku pri varenju i iskorišćavanju njihove biomase od strane ljudi (Becker, 2007). S druge strane, cijanobakterije ne poseduju navedeni polisaharidni ćelijski zid poput eukariotskih mikroalgi, što ih čini lakšim za digestiju ukoliko se koriste u ishrani ljudi (Richmond i Preiss, 1980).

Prilikom komercijalne primene, biomasa mikroalgi i cijanobakterija mora biti podvrgnuta proveru zdravstvene bezbednosti. Mnoge međunarodne organizacije izdale su regulative koje se tiču zdravstvene bezbednosti ovih proizvoda, a postoje i dodatne regulative na nivou pojedinačnih država. Navedene regulative najčešće propisuju granične dozvoljene nivoe toksina, nukleinskih kiselina, metala i drugih kontaminanata (Spolaore i sar., 2006). Ovi propisi ograničavaju upotrebnu vrednost mnogih vrsta algi i cijanobakterija u ljudskoj ishrani. U Tabeli 2.2. navedene su glavne vrste mikroalgi i cijanobakterija koje se nalaze u komercijalnoj upotrebi za ljudsku ishranu (Spolaore i sar., 2006).

Tabela 2.2. Najčešće komercijalno upotrebljavane vrste mikroalgi i cijanobakterija za ljudsku ishranu

Vrsta	Proizvodnja (t/godišnje)	Zemlje proizvođači	Primena i proizvodi
<i>Spirulina (Arthrospira)</i>	3000	Kina, Indija, SAD, Mijanmar, Japan	ishrana ljudi i životinja, kozmetika (fikobiliproteini, praškovi, ekstrakti, tablete, pića, čips, paste, tečni ekstrakti)
<i>Chlorella sp.</i>	2000	Tajvan, Nemačka, Japan	ishrana ljudi, akvakultura, kozmetika (tablete, praškovi, nektari, testenine)
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Australija, Izrael, SAD, Kina	ishrana ljudi, kozmetika (β -karoten, praškovi)
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500	SAD	ishrana ljudi (kapsule, kristalizirane forme, praškovi)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	SAD, Indija, Izrael	akvakultura, astaksantin
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	240t DHA ulja	SAD	DHA ulje
<i>Shizochytrium sp.</i>	10t DHA ulja	SAD	DHA ulje

Prehrambene industrije širom sveta su poslednjih godina započele kampanje popularizacije proizvoda dobijenih od mikroalgi i cijanobakterija, kao što su različite paste, hlebovi, kolači, sosevi za salate, sladoled, puding, jogurt i drugi mlečni proizvodi i napici (npr. pivo dobijeno od biomase *Spirulina sp.*) (Svirčev, 2005; Pulz i Gross, 2004).

2.5.2. Primena u kreiranju funkcionalne hrane

U razvijenim zemljama u svetu, kombinacija visoko kalorične ishrane i savremenog načina života često dovodi do zdravstvenih problema populacije u vidu gojaznosti, dijabetesa, kancera i srčanih oboljenja. Iz navedenih razloga javlja se potreba za prehrambenim proizvodima koji svakodnevnu ishranu obogaćuju polinezasićenim masnim kiselinama, vitaminima, mineralima i drugim bioktivnim komponentama u cilju unapređenja zdravlja, kao i zamene sintetskih formi prehrambenih aditiva prirodnim alternativama. Mikroalge i cijanobakterije predstavljaju izuzetno bogat, ali nedovoljno iskorišćen, izvor različitih bioaktivnih komponenti koje mogu povoljno uticati na zdravlje ljudi (Kovač i sar., 2013). U vrstama roda *Chlorella* najinteresantnije jedinjenje je 1,3-glukan, za koji je utvrđeno da

poseduje imunostimulativnu i antioksidantnu aktivnost, kao i da može da pomogne smanjenju nivoa serumskog holesterola (Spolaore i sar., 2006).

Uloga cijanobakterija kao antibakterijskih, antivirusnih, antitumorskih agenasa, kao i mogućnost primene kao aditiva hrani je potvrđena brojnim ispitivanjima (Singh i sar., 2005), a kao obećavajuća mogućnost algalne biotehnologije javlja se i potencijal za otkrivanje novih farmaceutika (Spolaore i sar., 2006). Pored uloge antioksidanata iz mikroalgi i cijanobakterija koja je pomenuta prethodno u tekstu, potvrđeno je i hipoholesterolemično delovanje njihove biomase, koje se može pripisati različitim bioaktivnim komponentama kao što su lipoprotein-lipaze, hlorofil i C-fikocijanin (Gantar i Svirčev, 2008; Singh i sar., 2005). Amano i saradnici (2005) su utvrdili da je kod pacova koji su u ishrani konzumirali više vrsta algi nivo serumskog holesterola umanjen za 49,7%, 48,1%, 49,0% i 74,8% u odnosu na kontrolnu grupu, respektivno, što je povezano sa sadržajem pojedinih polisaharida. U istraživanju sprovedenom na pilićima (Ginzberg i sar., 2000) koji su konzumirali biomasu mikroalge *Porphyridium sp.* nivo serumskog holesterola je umanjen za 28%, dok je u žumancima jaja sadržaj holesterola umanjen za 10%, uz istovremeno povećanje sadržaja linolne i arahidonske kiseline za 29% i 24%, respektivno. Takođe, boja žumanaca jaja postala je tamnija, kao posledica povećanja koncentracije β -karotena (povećanje od 2,4 puta kod grupe pilića koji su konzumirali hranu sa 5% dodate biomase cijanobakterije). Pojedina ispitivanja pokazala su da cijanobakterije iz roda *Spirulina* mogu ispoljiti i prebiotski efekat, koji je doveo do desetostrukog ubrzanja rasta laktobacila u odnosu na kontrolu (Pulz i Gross, 2004).

Biomasa mikroalgi i cijanobakterija se do skora koristila najviše u industriji zdrave hrane i nutritivnih suplemenata (Kovač i sar., 2013). U novije vreme se, međutim, sve veća pažnja širom sveta posvećuje inkorporiranju njihove biomase ili pojedinih bioaktivnih komponenti u tradicionalne prehrambene proizvode radi postizanja poboljšane nutritivne vrednosti tih proizvoda, kao i poboljšanja zdravstvenih efekata hrane koja se konzumira od strane šire populacije. Međutim, potencijal produkcije toksičnih jedinjenja koja mogu biti prisutni u biomasi, se u ovom slučaju ne sme zanemariti i mora se posebno detaljno analizirati.

2.5.3. Primena u ishrani životinja

Brojna istraživanja ukazuju na visok nutritivni potencijal mikroalgi i cijanobakterija u ishrani svinja, krava, ovaca, pilića i drugih domaćih životinja, kao i mnogih vodenih organizama (akvakultura) (Svirčev, 2005). U većini sprovedenih studija do sada, ovi mikroorganizmi se nisu razmatrali kao glavna komponenta hrane za životinje usled

potreba za velikom količinom biomase u takvom slučaju. Međutim, utvrđeno je da i dodatak hrani za životinje u malom procentu može dovesti do brojnih povoljnih efekata kao što je poboljšanje imunog sistema, lipidnog metabolizma, funkcije digestivnog trakta i povećanja otpornosti životinja na stres. Takođe, uočeno je i značajno poboljšanje apetita, mase, prinosa jaja i reproduktivnih performansi (Shields i Lupatsch, 2012; Svirčev, 2005).

Mnoge sprovedene studije pokazale su da mikroalge i cijanobakterije mogu biti veoma vredan dodatak hrani za životinje, ili čak služiti kao zamena za uobičajene izvore proteina (sojina pogača, riblje brašno i sl.). Živina predstavlja veoma pogodnu grupu domaćih životinja za ovakav vid suplementacije, pošto dodavanje biomase mikroalgi i cijanobakterija u takav tip hraniva predstavlja ekonomski najisplativiji vid ovako obogaćene prehrane (Becker, 2007). Preživari su takođe grupa domaćih životinja kod kojih je dodatna pogodnost prehrane mikroalgama u tome što njihov digestivni sistem može da svari i ćelijski zid mikroalgi bez prethodnih ekonomski nepovoljnih tretmana koji bi bili neophodni u slučaju drugih životinja. Mikroalge i cijanobakterije su takođe i bitan dodatak prehrani, pa čak i osnova prehrane u gajenju vodenih organizama (akvakultura), obzirom da mnogima od navedenih i predstavljaju prirodnu hranu. Upotreba pojedinih mikroalgi u ishrani riblje mlađi smanjuje cene gajenja i do 50%, a radi postizanja što ekonomičnije optimalne dijeta često se koristi kombinacija više vrsta mikroalgi i cijanobakterija (Svirčev, 2005). Cijanobakterije roda *Spirulina* se koriste u indutriji ribe u Japanu, pri čemu se dodaju u količini od 0,5 - 2,5% u riblju hranu (Hasan i Chakrabarti, 2009).

3. Materijal i metode

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratorijama Naučnog instituta za prehrambene tehnologije u Novom Sadu, a ispitivani sojevi cijanobakterija uzgajani su na Departmanu za biologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu. Biološki ogled sa laboratorijskim pacovima izveden je u vivarijumu za uzgoj eksperimentalnih životinja i odeljenju za patologiju životinja Kliničkog centra Vojvodine u Novom Sadu i Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu. Analiza lakoisparljivih jedinjenja u uzorcima cijanobakterija pomoću gasne hromatografije kuplovane sa masenim spektrometrom sa merenjem vremena leta jona (GC-TOFMS) izvešana je u laboratorijama Fakulteta za hemiju i tehnologiju u Pragu (Češka Republika).

3.1. Hemikalije i reagensi

Fikocijanin (99%), β -karoten (95%), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]), Folin-Ciocalteu's reagent, butilovani hidroksitoluen (BHT), β -muriholna kiselina, hiolna kiselina, henodeoksiholna kiselina, hiodeoksiholna kiselina, holna kiselina, deoksiholna kiselina, litholna kiselina, 50% Bor(III)-fluorid (u metanolu), FAME 37 Standard Mix, holesterol (99%) su proizvedeni kompanije Sigma-Aldrich GmbH (Sternheim, Germany). Metanol HPLC čistoće (gradient grade), mravlja kiselina HPLC čistoće, aceton HPLC čistoće, smeša n-alkana (C8-C20), n-heptan GC čistoće i acetonitril HPLC čistoće su pribavljeni iz kompanija Merck (Darmstadt, Germany) i Avantor Performance Materials (Gliwice, Poland).

Test kitovi za određivanje ukupnog holesterola (TC), lipoproteinskih frakcija (HDL, LDL), ukupnih triglicerida (TG), alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST) u plazmi su pribavljeni od kompanije Roche Molecular Diagnostics (Pleasanton, California, USA).

Svi ostali reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće, poreklom od različitih proizvođača. Ultračista voda je dobijena u laboratoriji, korišćenjem sistema Millipore, Elix UV i Simplicity Water Purification System-a.

3.1.1. Uzorci cijanobakterija i materijal za biološki ogled

Uzorci *Spirulina platensis* (obeleženi kao S1 i S2), *Nostoc* spp. (obeleženi kao 2S7B i 2S9B) i *Anabaena* spp. (obeleženi kao C2 i C5) su uzgojeni na Departmanu za biologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Svi ispitivani uzorci potiču sa područja Vojvodine (Srbija) (Simeunović, 2005) izuzev soja S1 koji je poreklom iz Japanske kolekcije kultura, Tokio. *Nostoc* i *Anabaena* sojevi su gajeni u laboratorijskim uslovima u sintetičkoj mineralnoj podlozi BG-11, sa dodatkom azota (+N) i bez dodatka azota (-N) (Rippka i sar., 1979), dok su uzorci sojeva *Spirulina* gajeni u mineralnoj SOT podlozi (Soong, 1980). Detaljni podaci o svim ispitivanim sojevima prikazani su u Tabeli 3.1. Svi cijanobakterijski sojevi gajeni su u stacionarnim kulturama u erlenmajer sudovima pri temperaturi od 22-24 °C i svetlosnom intenzitetu od 50 mol m⁻²s⁻¹. Svetlosni režim je iznosio 12 časova svetla i 12 časova tame tokom dana. Nakon 25 dana kultivacije, sojevi su profiltrirani, isprani dejonizovanom vodom i podvrgnuti liofilizaciji radi dobijanja suve biomase koja je korišćena za eksperimente. Liofilizirana biomasa je do upotrebe čuvana u hermetički zatvorenim posudama u frižideru na +8 °C.

Za potrebe biološkog ogleda pribavljeno je 40 laboratorijskih pacova soja Wistar, starih 4 meseca, telesne mase 310-440 g iz vivarijuma farmaceutske kuće Galenika a.d. (Beograd, Srbija). Svi eksperimenti i protokoli sa laboratorijskim pacovima su odobreni od strane Komiteta za upotrebu i čuvanje laboratorijskih životinja [Br. III-2011-01]. Hrana za ishranu laboratorijskih pacova bila je potpuna smeša za ishranu laboratorijskih pacova, koja sadrži 20% proteina, pribavljena takođe od Veterinarskog zavoda Subotica (Subotica, Srbija).

Tabela 3.1. Testirani sojevi cijanobakterija

Oznaka soja	Rod	Red	Familija	Klasa	Poreklo	Tip talusa
NSCCCT246 (S1)	<i>Spirulina</i>	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Japan	filamentozni neheterocitni
NSCCCW54 (S2)	<i>Spirulina</i>	<i>Oscillatoriales</i>	<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Srbija (Vojvodina)	filamentozni neheterocitni
NSCCCT17 (Č2)	<i>Anabaena</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Anabaenaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Srbija (Vojvodina)	filamentozni heterocitni
NSCCCT20 (Č5)	<i>Anabaena</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Anabaenaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Srbija (Vojvodina)	filamentozni heterocitni
NSCCCT13 (2S7B)	<i>Nostoc</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Srbija (Vojvodina)	filamentozni heterocitni
NSCCCT15 (2S9B)	<i>Nostoc</i>	<i>Nostocales</i>	<i>Nostocaceae</i>	<i>Hormogoniophyceae</i>	Srbija (Vojvodina)	filamentozni heterocitni

Spirulina S1 poreklom iz Japanske kolekcije kultura Tokio

Sojevi Č2 i Č5 izolovani iz zemljišta tipa crnica

Sojevi 2S7B i 2S9B izolovani iz zemljišta tipa solonjec

3.2. Hemijska karakterizacija biomase cijanobakterija

3.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih proteina

Određivanje sadržaja ukupnih proteina u uzorcima cijanobakterija, fecesa pacova i hrane za pacove izvršeno je pomoću uređaja TruSpec (Leco corporation, Plzen, Češka Republika). Određivanje je izvršeno prema zvaničnoj metodi AOAC, broj 992.23 (AOAC, 2000). Princip navedene instrumentalne metode zasniva se na merenju razlike termalne provodljivosti metodom po Dumas-u. Nakon homogenizacije, ispitivani uzorci su odmereni u aluminijumske vrećice (uzorci cijanobakterija približno 50 mg; uzorci fecesa i hrane približno 100 mg) i sadržaj azota direktno je određen na uređaju i izražen kao maseni procenat (%). Množenjem dobijenog sadržaja azota sa faktorom 6,25 dobijen je % proteina u ispitivanim uzorcima. Sve analize izvršene su u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

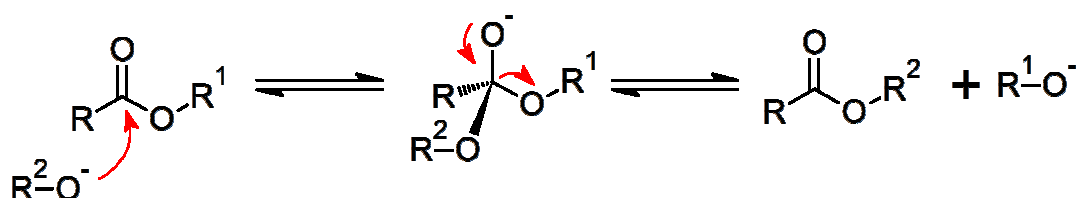
3.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih lipida

Sadržaj ukupnih lipida u uzorcima cijanobakterija određen je korišćenjem modifikovane metode ekstrakcije po Folch-u (Colla i sar., 2007). Liofilizirani uzorci cijanobakterija su odmereni (približno 250 mg) u staklene sudove i podvrgnuti ekstrakciji sa smešom metanol-hloroform (1:3). Ekstrakcija je izvršena tri puta sa po 2 ml ekstrakcione smeše, a dobijeni ekstrakti su spojeni, isprani koncentrovanim rastvorom NaCl, nakon čega je rastvarač uparen u struji azota. Količina ostatka nakon uparavanja je određena merenjem na analitičkoj vagi sa preciznošću od 0,0001 g. Sadržaj ukupnih lipida dobijen je deljenjem mase dobijenog ostatka nakon ekstrakcije sa masom uzorka, i izražen u masenim procentima (%). Određivanja su vršena u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

Određivanje sadržaja ukupnih lipida u fecesu pacova i hrani za pacove izvršeno je prema zvaničnoj AOAC metodi (AOAC, 1984) ekstrakcijom pomoću petrol-etra na uređaju po Soxhlet-u.

3.2.3. Određivanje sastava masnih kiselina nakon transesterifikacije sa bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (CG-FID)

Lipidni ekstrakti cijanobakterija dobijeni ekstrakcijom po Folch-u podvrgnuti su transesterifikaciji u prisustvu bor(III)-fluorida (BF₃) prema proceduri opisanoj od strane Karlović i Andrić (1996). Oko 20 mg lipidnog ekstrakta najpre je odmereno u posude za derivatizaciju, nakon čega je dodato 0,5 ml 5% NaOH u apsolutnom metanolu i atmosfera u posudi je zamenjena uvođenjem azota tokom 10 sekundi nakon čega su posude zatvorene i podvrgnute saponifikaciji u termostatu na 70 °C u trajanju od 10 minuta. Nakon isteka navedenog vremena, posude su izvađene iz termostata i sadržaj je ohlađen na sobnu temperaturu. U posude je nakon toga dodato 0,5 ml 14% BF₃ u apsolutnom metanolu, posude su zatvorene i zagrevane 10 minuta u termostatu na 70 °C. Opšti mehanizam reakcije transesterifikacije prikazan je na Slici 3.1. Nakon 10 minuta, posude su izvađene iz termostata, ohlađene na sobnu temperaturu i zatim je dodato 0,5 ml zasićenog rastvora NaCl. U smešu je nakon toga dodato 1 ml n-heptana GC čistoće i sadržaj je blago promućkan kako bi se pospešila ekstrakcija metil-estara masnih kiselina. Heptanski sloj je potom prenet u epruvetu i ispran sa 1 ml zasićenog rastvora NaCl, nakon čega je organski sloj prenet u vijalu i podvrgnut analizi na gasnom hromatografu.



Slika 3.1.: Opšti mehanizam reakcije transesterifikacije

Gasno-hromatografska analiza metil-estara masnih kiselina (FAMES) je izvršena na GC uređaju Agilent 7890A sa plameno jonizujućim detektorom (Flame Ionization Detector, FID) i kolonom Supelco SP-2560 (100 m x 0,25 mm; debljina stacionarne faze 0,20 μm). Helijum je korišćen kao gas nosač (čistoća > 99,9997% (v/v), protok = 1,21 ml/min). Pomoću autosamplera injektovano je 1 μl uzorka (split mod, 1:25), a temperaturni program kolone je bio sledeći: početna temperatura 140 °C, zadržana 7,945 min; zagrevanje do 280 °C brzinom 3,47 °C/min, bez zadržavanja (ukupno vreme trajanja: 48,333 min). Pikovi pojedinih metil-estara masnih kiselina identifikovani su poređenjem retencionih vremena sa retencionim vremenima smeše 37 standarda (Supelco 37 component fatty acid methyl

ester mix). Količina pojedinih masnih kiselina dobijena je poređenjem površine pikova uzorka sa površinama pikova standarda masnih kiselina poznate koncentracije. Svaka analiza urađena je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao maseni procenat masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama \pm standardna devijacija.

3.2.4. Određivanje hemijskog profila lako isparljivih jedinjenja metodom gasne hromatografije (Headspace GC-MSD)

Sadržaj lako isparljivih organskih jedinjenja u ispitivanim sojevima cijanobakterija određen je metodom gasne hromatografije sa masenom detekcijom i „headspace“ injektovanjem (Headspace GC-MSD) direktno iz ispitivanih uzoraka, bez posebne pripreme.

Statično „headspace“ uzorkovanje izvršeno je pomoću autosamplera CombiPAL System (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Injektovana zapremina gasne faze iznad uzorka je iznosila 2 ml, uzorkovana pomoću šprica za headspace od 2,5 ml, iz „headspace“ vijala zapremine 10 ml u kojima se nalazilo 1 g odmerenog uzorka ili 50 μ l smeše n-alkana. Uslovi autosemplera bili su sledeći: temperatura inkubacije 80 °C; vreme inkubacije 10 min; temperatura šprica 100 °C; brzina mešanja 500 obrtaja/min; brzina punjenja šprica 100 μ L/s; brzina injektovanja 500 μ L/s, pred- i post-injekciono vreme 500 ms; vreme ispiranja šprica 10 s. Nakon svakog injektovanja, zaostali sadržaj šprica je eliminisan automatskim ispiranjem šprica pomoću gasa nosača.

Hromatografsko razdvajanje je postignuto pomoću GC uređaja Agilent 7890A sa masenim detektorom (MSD) 5975C. Kolona upotrebljena za razdvajanje je kapilarna kolona HP 5 MS (30 m \times 0.25 mm, debljina stacionarne faze 0,25 μ m) (J & W Scientific, USA) a kao gas nosač korišćen je helijum (čistoća > 99.9997 vol %, protok = 1.10 ml/min). Temperaturni program je počinjao sa 60 °C (bez zadržavanja), a temperaturni gradijent od 3 °C/min je zadat linearno do konačne temperature od 260 °C sa zadržavanjem od 5 min (ukupno vreme analize: 65 min). Temperatura jonskog izvora MSD održavana je na 230 °C, kvadrupola na 150 °C, a maseni spektri su snimljeni u m/z opsegu 50-500, pri energiji elektronskog izvora od 70 eV.

Za analizu snimljenih hromatograma korišćen je softver ChemStation (Agilent Technologies), a krive za određivanje retencionih indeksa (RI) su konstruisane pomoću SciDaVis softvera (<http://scidavis.sourceforge.net/>). Identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem njihovih izračunatih RI (u odnosu na krivu konstruisanu za smešu n-alkana), retencionih vremena dobijenih pikova i njihovih masenih spektara sa NIST 05 i Adams spektralnim bazama i literaturnim podacima (Adams, 1995).

3.2.5. Određivanje hemijskog profila lako isparljivih jedinjenja metodom dvodimenzionalne gasne hromatografije (SPME Headspace GC×GC-TOFMS)

U cilju određivanja lako isparljivih jedinjenja metodom mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (solid phase microextraction, SPME) 50 mg liofiliziranih uzoraka cijanobakterija odmereno je u „headspace“ vijale zapremine 5 ml uz dodatak 0,5 ml zasićenog vodenog rastvora NaCl. Vijala je za potrebe ekstrakcije zagrevana na 50 °C tokom 10 minuta u termostatu autosemplera, a SPME je vršena pomoću StableFlex DVB/CAR/PDMS (50/30 µm) vlakna tokom zagrevanja. Jedinjenja ekstrahovana na vlaknu su zatim desorbovana u injekcionom portu gasnog hromatografa na 250 °C tokom u trajanju od 1 minut.

Za analizu uzoraka korišćen je uređaj Pegasus 4D (Slika 3.2.) (<http://www.leco.com/products/separation-science/gcxgc-tofms/pegasus-4d-gcxgc-tofms>) koji se sastoji od gasnog hromatografa Agilent 6890N sa split/splitless injektorom (Agilent, USA), MPS2 autosemplera za automatizovanu SPME (Gerstel, Nemačka) i Pegasus III masenog detektora sa merenjem vremena leta jona velike brzine akvizicije (TOFMS, Leco corporation, USA). Unutar GC termostata postavljen je kriogeni modulator i sekundarni termostat (Leco corporation, USA). Zagrejan vazduh korišćen je za dve mlaznice za zagrevanje, dok su dve mlaznice za hlađenje hladene gasovitim azotom ohlađenim pomoću tečnog azota. Ortogonalni hromatografski sistem se sastojao iz DB-5ms kapilarne kolone (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm debljina filma (Agilent, USA)) kuplovane sa SUPELCOWAX 10 kapilarnom kolonom (1.25 m, 0,10 mm, 0,10 µm debljina filma (Supelco, USA)). Temperaturni program bio je sledeći: primarni termostat: 40 °C (1,0 min), 10 °C/min do 280 °C (0,0 min); sekundarni termostat: +20 °C iznad temperature primarnog termostata, ofset modulatora: +30 °C iznad temperature primarnog termostata, vreme modulacije: 3 s (topli puls 0,6 s). Za dvodimenzionalnu hromatografiju korišćen je isti temperaturni program, samo bez razlike u temperaturi sekundarnog termostata. Helijum je korišćen kao gas nosač pri protoku od 1,3 ml/min. Uslovi TOFMS su bili sledeći: režim elektronske jonizacije (70 eV); temperatura jonskog izvora 220 °C; opseg masa m/z 25-300; brzina akvizicije 300 spektara/s; napon detektora 1750 V.



Slika 3.2.: TOFMS uređaj Leco Pegasus 4D sa gasnim hromatografom

Za kontrolu instrumenta, akviziciju i obradu hromatografskih podataka korišćen je softver ChromaTOF (v. 2.31; Leco corporation, USA). Identifikacija jedinjenja izvršena je na osnovu poređenja njihovih masenih spektara sa spektralnom bazom NIST 2002, kao i poređenjem izračunatih retencionih indeksa pikova sa literaturnim podacima.

3.2.6. Određivanje sadržaja metala metodom atomske apsorpcione spektrometrije (AAS)

Za potrebe određivanja sadržaja metala, odmereno je oko 0,1 g svakog uzorka sa tačnošću od 0,0001 g, a sve analize su izvršene u tri ponavljanja. Za određivanje Cu, Fe, Zn, Mn, Mg, Ca, Na i K izvršena je digestija uzoraka pomoću uređaja za mikrotalasnu digestiju Milestone Ethos (Milestone inc., Shelton, SAD). Nakon odmeravanja uzoraka u teflonske sudove za digestiju, uzorcima je dodato po 1 ml smeše koncentrovane HNO₃ i 30% H₂O₂ (u odnosu 3 : 1, v/v), nakon čega su sudovi zatvoreni i preneti u nosač uređaja. Digestija je vršena u trajanju od 20 minuta, na temperaturi od 550 °C, prema uputstvu za korišćenje od strane proizvođača (Milestone Microwave Laboratory Systems, 2008).

Sadržaj Pb, Cd, Fe, Cu, Zn, Ca, Mg, K, Na, Mn i Cr je određen pomoću atomskog apsorpcionog spektrofotometra Varian SpectrAA-10 (Varian Techtron Pty Limited, Mulgware Victoria, Australija) uz pozadinsku korekciju (D2-lampa).

3.2.7. Hidroliza uzoraka i određivanje aminokiselinskog sastava metodom tečne hromatografije (HPLC-DAD/FLD)

Uzorci cijanobakterija podvrgnuti su kiseloj hidrolizi u cilju određivanja aminokiselinskog sastava, prema modifikovanoj metodi navedenoj u radu Fountoulakis-a i Lahm-a (1998). Liofilizirani uzorci (oko 10 mg) precizno su odmereni na analitičkoj vagi direktno u sudove za derivatizaciju, nakon čega je dodato po 1 ml rastvora za hidrolizu (6M HCl sa dodatkom 0,1% fenola i 3% tioglikolne kiseline, v/v) i svaki sud je zatvoren poklopcem nakon prethodne zamene atmosfere u sudu radi sprečavanja oksidacije aminokiselina (uvođenjem azota u sud tokom 10 sekundi). Uzorci su zatim podvrgnuti hidrolizi zagrevanjem u termostatu na 110 °C u trajanju od 24 sata. Nakon isteka vremena, sudovi su ohlađeni na sobnu temperaturu i sadržaj svakog suda je prenet u odmernu tikvicu od 50 ml i dopunjen destilovanom vodom do crte. Rastvor iz odmerne tikvice je zatim profiltriran pomoću špic-filtera prečnika pora 0,22 µm (regenerisana celuloza; Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka) u vijalu i podvrgnut hromatografskoj analizi.

Aminokiselinski sastav uzoraka određen je tehnikom tečne hromatografijom visoke rezolucije (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) na aparatu HPLC Agilent 1200 serije (Slika 3.3.). Korišćena je kolona Agilent, Eclipse Plus C18, 5,0 µm, 3,0 x 250 mm. Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 338 i 262 nm, a apsorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 190 do 400 nm, R 500/100 nm. Za detekciju je korišćen i detektor fluorescencije (Fluorescence Detector, FLD), sa parametrima ekscitacije na 340 nm i emisije na 450 nm. Obzirom na to da je za analizu aminokiselina pod navedenim uslovima potrebno izvršiti njihovu prethodnu derivatizaciju, ovo je postignuto predkolonskom derivatizacijom hidrolizata sa orto-ftalaldehidom (OPA) i 9-fluorenilmetil hloroformatom (FMOC). Navedeni postupak predkolonske derivatizacije i hromatografske analize aminokiselina izvršen je prema proceduri proizvođača Agilent Technologies broj 5990-4547EN (Henderson i Brooks, 2010), u kojoj su navedeni detaljni parametri i uslovi hromatografske metode razdvajanja, procedure za derivatizaciju sa gotovim setovima reagenasa i način pripreme standarda aminokiselina.



Slika 3.3.: HPLC-DAD/FLD/ELSD uređaj

Hromatografsko razdvajanje postignuto je kombinovanjem rastvora: A (voda sa 10 mmol Na_2HPO_4 , 10 mmol $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 5 mmol NaN_3 , pH=8,2) i B (acetonitril : metanol : voda = 45 : 45 : 10; v : v : v) u gradijent režimu: 0-0,84 min. 2% B; 0,84-33,4 min. 57% B; 33,4-33,5 min. 100% B; 33,5-39,3 min. 100% B; 39,3-39,4 min. 2% B; kraj na 40 min. Uzorak, boratni pufer, injekcioni diluent, OPA i FMOc nalazili su se u vijalama smeštenim u autosempleru, a sledeći program autosemplera od 13 koraka zadat je u cilju predkolonske derivatizacije: 1) Povlačenje 2,5 μl iz vijale sa boratnim puferom 2) Povlačenje 1,0 μl iz vijale sa uzorkom 3) Mešanje 3,5 μl u portu za čišćenje 5 puta 4) Čekanje 0,2 min. 5) Povlačenje 0,5 μl iz vijale sa OPA 6) Mešanje 4,0 μl u portu za čišćenje 10 puta 7) Povlačenje 0,4 μl iz vijale sa FMOc 8) Mešanje 4,4 μl u portu za čišćenje 10 puta 9) Povlačenje 32 μl iz vijale sa injekcionim diluentom 10) Mešanje 20 μl u portu za čišćenje 8 puta 11) Injektovanje 12) Čekanje 0,1 min 13) Premošćavanje injekcione petlje.

Smeša standarda aminokiselina koja je korišćena za kalibraciju pripremljena je razblaživanjem gotovih smeša standarda sa 0,1M HCl pri čemu je dobijena serija razblaženja koncentracija od 0,1-2 $\mu\text{mol/ml}$. U cilju ispitivanja analitičkog prinosa metode hidrolize i derivatizacije, 500 μl smeše standarda koncentracije 10 $\mu\text{mol/ml}$ odmereno je u sud za derivatizaciju i podvrgnuto istom postupku hidrolize kao i uzorci. Konstruisana je kalibraciona kriva, za svaki pojedinačni standard, na osnovu dobijenih površina pikova u

zavisnosti od koncentracije standarda (određeni koeficijenti linearnosti za pojedinačne kalibracione krive bili u u opsegu $R=0,9956-0,9993$). Izračunate vrednosti za svaku pojedinačnu aminokiselinu korigovane su za izračunatu vrednost analitičkog prinosa (vrednosti analitičkog prinosa iznosile su od 67,2% za triptofan, do 106,7% za glicin). Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su masene koncentracije pojedinih aminokiselina u uzorcima i izražene kao $\mu\text{mol/g}$ uzorka. Koncentracije aminokiselina u uzorcima određene su pomoću serije razblaženja smeše standarda koncentracije od 0,1-2 $\mu\text{mol/ml}$.

3.3. Ekstrakcija i hemijska karakterizacija ekstrakata

3.3.1. Ekstrakcija pomoću rastvarača pod povišeni pritiskom (Accelerated Solvent Extraction, ASE)

Ekstrakcija ispitivanih sojeva cijanobakterija izvršena je pomoću uređaja Dionex ASE 350 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) (Slika 3.4., b), prema modifikovanoj proceduri Santoyo-a i saradnika (2006). Odmereni uzorci liofiliziranih cijanobakterija (oko 100 mg) pomešani su sa dijatomejskom zemljom (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) i preneti u čelične kivete za ekstrakciju zapremine 5 ml, u koje je prethodno postavljen celulozni filter. U cilju ekstrakcije nepolarnih komponenti iz uzoraka, kao što su karotenoidi, ekstrakcija je najpre vršena sa n-heksanom. Parametri ekstrakcije bili su: temperatura ekstrakcije 80 °C; vreme statičke ekstrakcije 10 minuta; ispiranje ćelije sa rastvaračem na nivou 30% zapremine, broj ciklusa 1. Nakon završene ekstrakcije, sistem je automatski ispran sa 20 ml ekstrakcionog rastvarača u cilju eliminacije prenošenja jedinjenja u sistemu na sledeći uzorak. U cilju ekstrakcije preostalih jedinjenja veće polarnosti koja nisu ekstrahovana pomoću n-heksana, uzorci u kivetu su sekvencijalno ekstrahovani sa polarnim sistemom rastvarača voda-metanol (1:1, v/v). Parametri ekstrakcije sa ovim sistemom rastvarača su isti kao gore navedeni za ekstrakciju sa n-heksanom.

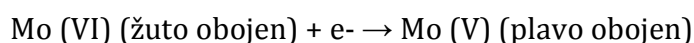
Dobijeni ekstrakti u ekstrakcionim vijalama preneti su u odmerne tikvice od 10 ml i dopunjeni do crte sa rastvaračem sa kojim je vršena ekstrakcija. Ovako dobijeni ekstrakti preneti su u staklene vijale zapremine 10 ml (Slika 3.4., a), zatvoreni i čuvani do upotrebe u zamrzivaču na -18 °C.



Slika 3.4.: a) heksanski ekstrakti cijanobakterija b) Dionex ASE 350 uređaj

3.3.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u metanolno-vodenim ekstraktima cijanobakterija određen je po metodi Singleton-a i saradnika (1999). Metoda po Folin-Ciocalteu (FC) je zasnovana na merenju redukujućeg kapaciteta polifenolnih jedinjenja, čijom disocijacijom nastaje proton i fenoksidni anjon, koji redukuje Folin-Ciocalteu reagens do plavo obojenog jona (Fenol-MoW11040)⁴⁻:



Za potrebe određivanja ukupnih fenola pripremljeni su vodeni rastvori Na₂CO₃ (20% w/w) i FC reagensa (0,67 mol/dm³). Za izradu kalibracione krive korišćena su razblaženja osnovnog rastvora galne kiseline u rasponu koncentracija od 1,25 do 100 µg/L. Pripremljene su probe na način koji je prikazan u Tabeli 3.2. i njihova apsorbanca je merena nakon 2 sata na 760 nm na ELISA čitaču Multiscan Spectrum (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Apsorbance (A) za svaki ispitivani ekstrakt su računane iz razlike apsorbanca radne probe (A_{sr}) i korekcije (A_{kor}):

$$A = A_{sr} - A_{kor}$$

Tabela 3.2.: Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja ukupnih fenola

RADNA PROBA	KOREKCIJA	SLEPA PROBA
25 µl ekstrakta	25 µl ekstrakta	25 µl destilovane vode
125 µl FC reagensa	225 µl destilovane vode	125 µl FC reagensa
100 µl rastvora Na ₂ CO ₃ *		100 µl rastvora Na ₂ CO ₃ *

* - rastvor je dodat 10 min nakon dodatka FC reagensa

Na osnovu izmerenih apsorbanci, sa kalibracione krive standardnog rastvora galne kiseline (1,25-100 µg/ml; $A=0,0194 \times C - 0,1002$; $R^2=0,9453$), određena je masena koncentracija (mg/ml) fenolnih jedinjenja u ekstraktima, a zatim je sadržaj fenolnih jedinjenja u biomasi izražen kao ekvivalent galne kiseline (mg galne kiseline/g uzorka). Rezultat je izražen kao srednja vrednost tri merenja (mg ekvivalenta GAE/g uzorka ± standardna devijacija).

3.3.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti na DPPH radikale primenom spektrofotometrijske metode

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal (DPPH[•]) je stabilan radikal sa maksimumom apsorpcije na 517 nm. Antioksidanti, donori vodonika u reakciji sa DPPH radikalima vrše njihovu redukciju do žuto obojenog difenilpikrilhidrazina, što dovodi do smanjenja apsorbanacije na 517 nm.

Rastvor 90 µmol/dm³ DPPH[•] je pripremljen na sledeći način: Rasvor 1 je dobijen odmeravanjem 0,01577 g DPPH[•] u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjavanjem 95 % etanolom do crte. Radni rastvor je dobijen prenošenjem 22,5 ml rastvora 1 u odmernu tikvicu od 100 ml i dopunjavanjem 95 % etanolom do crte. Heksanski i metanolno-vodeni ekstrakti cijanobakterija razblaženi su rastvaranjem u etanolu pri čemu je dobijena serija razblaženja 1-16 puta. Koncentracije su izražene kao masene koncentracije cijanobakterijske biomase (mg/ml) u rastvoru.

Eksperiment je rađen u mikrolejt pločama ELISA čitača Multiscan Spectrum (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), a radne probe, kontrola i korekcija su pripremljene na način prikazan u Tabeli 3.3. Posle inkubacije od 60 min u mraku na 25 °C apsorbanca je izmerena na 492 nm.

Tabela 3.3.: Rastvori pripremljeni za određivanje sadržaja DPPH• radikala:

RADNA PROBA	KOREKCIJA	KONTROLA
60 µl DPPH•	10 µl ekstrakta	60 µl 90 µM DPPH•
10 µl ekstrakta	240 µl MeOH	10 µl rastvarača
180 µl MeOH		180 µl MeOH

"Skevindžer" aktivnost na DPPH radikale (% RSC) je određena na osnovu jednačine:

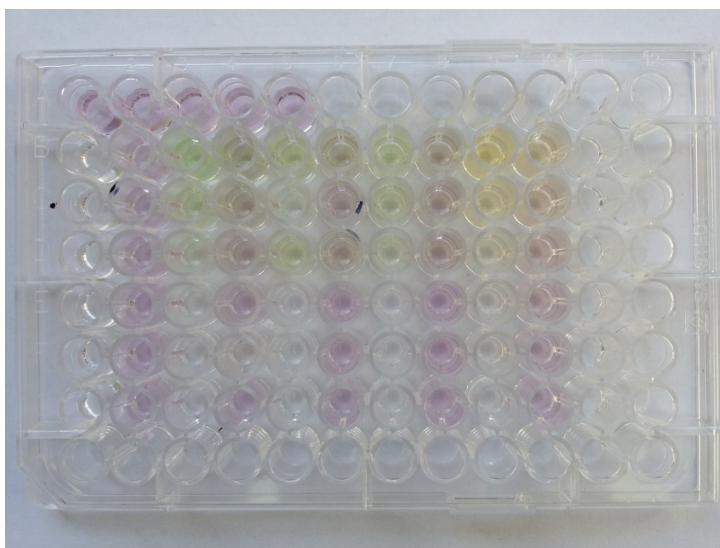
$$\% \text{ RSC} = 100 - (A_{\text{uz}} \times 100 / A_{\text{kont}})$$

gde je:

A_{uz} - apsorbanca uzorka,

A_{kont} - apsorbanca kontrole.

IC₅₀ vrednost je definisana kao masena koncentracija pri kojoj je neutralisano 50% radikala, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije (Espin i sar., 2000).



Slika 3.5.: izgled mikrolejt ploče tokom DPPH testa

3.3.4. Određivanje kvalitativnog i kvantitativnog sadržaja karotenoidnih jedinjenja primenom tečne hromatografije (HPLC-DAD)

Sadržaj karotenoidnih jedinjenja u ekstraktima cijanobakterija određen je metodom tečne hromatografije na aparatu HPLC Agilent 1200 serije, po metodi Tepić i saradnika (2009). Korišćena je kolona Agilent, Eclipse Plus C18 (5,0 μm ; 3,0 x 250 mm). Detekcija razdvojenih pikova izvršena je pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 440 i 460 nm, a apsorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 350 do 600 nm. Hromatografsko razdvajanje postignuto je kombinovanjem rastvora A – aceton : voda (75 : 25, v/v) i B – aceton : metanol (75 : 25, v/v) koji su korišćeni u sledećem linearnom gradijentu: 0-25% B do 10 min, zatim do 100% B do 35 min, 100% B do 45 min, 0% B do 65 min, post-vreme 15 min. Protok mobilne faze bio je 1,5 ml/min, a temperatura kolone održavana je na 30 °C. Injektovanje uzoraka vršeno je pomoću autosemplera, a injektovana zapremina je bila 10 μl . Ispitivani ekstrakti nisu razblaživani pre analize, već su injektovani direktno nakon filtracije pomoću špic-filtera prečnika pora 0,22 μm (PTFE; Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka).

Standard β -karotena za kalibraciju pripremljen je rastvaranjem β -karotena u acetonu i razblaživanjem je dobijena serija razblaženja u opsegu koncentracija od 0,001 do 1 mg/ml koja je služila za konstruisanje kalibracione krive ($A=5083,4 \times C + 4,4912$; $R^2=0,9979$). Koncentracija β -karotena u uzorcima određena je linearnom regresijom iz konstruisane kalibracione krive, a njegova identifikacija izvršena je na osnovu poređenja retencionog vremena pika u uzorku sa retencionim vremenom standarda i njihovih apsorpcionih spektara. Obzirom na nedostatak standarda ostalih karotenoida, njihova identifikacija izvršena je na osnovu poređenja sa apsorpcionim spektrima poznatim iz literature. Kvantifikacija karotenoida (izuzev β -karotena, za koji je postojala kalibraciona kriva) izvršena je relativno u odnosu na standard β -karotena, a koncentracije svih karotenoida su izražene kao mg karotenoida/g uzorka.

3.3.5. Određivanje sastava i sadržaja proteinskih pigmenata primenom spektrofotometrijske metode

Masena koncentracija proteinskih pigmenata (fikocijanin - PC, alofikocijanin – APC i fikoeritrin – PE) u ekstraktima cijanobakterija određena je na osnovu direktnog merenja apsorbanca na 562 nm za PE, 615 nm za PC, i 652 nm za APC (cit u Simeunović i sar., 2012). Merenja su vršena na spektrofotometru GBC Cintra 303 (GBC Scientific, Braeside, Australia). Masene koncentracije pigmenata u ekstraktima izračunate su primenom sledećih formula:

$$PE [mg mL^{-1}] = (A_{562} - (2.41 \times PC) - (0.849 \times APC))/9.62$$

$$PC [mg mL^{-1}] = (A_{615} - 0.474 \times A_{652})/5.34$$

$$APC [mg mL^{-1}] = (A_{652} - 0.208 \times A_{615})/5.09$$

Masena koncentracija hlorofila A (Chl a) takođe je određena na osnovu direktnog spektrofotometrijskog merenja apsorbance ekstrakta na 663 nm i primenom sledeće formule (Mackinney, 1941):

$$Chl a [\mu g mL^{-1}] = (A_{663} \times 12,64 \times a)/A$$

a=količina uzorka

A=količina metanola

Masene koncentracije svih pigmenata u ekstraktima su preračunate na mase odmerenih uzoraka cijanobakterija i izražene kao mg (za PC, APC i PE) ili μg (za Chl a)/g liofiliziranog uzorka. Svaka analiza urađena je u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao maseni procenat masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama \pm standardna devijacija.

3.4. Biološki ogled

3.4.1. Biološki ogled na laboratorijskim pacovima primenom soja *Spirulina platensis* u ishrani

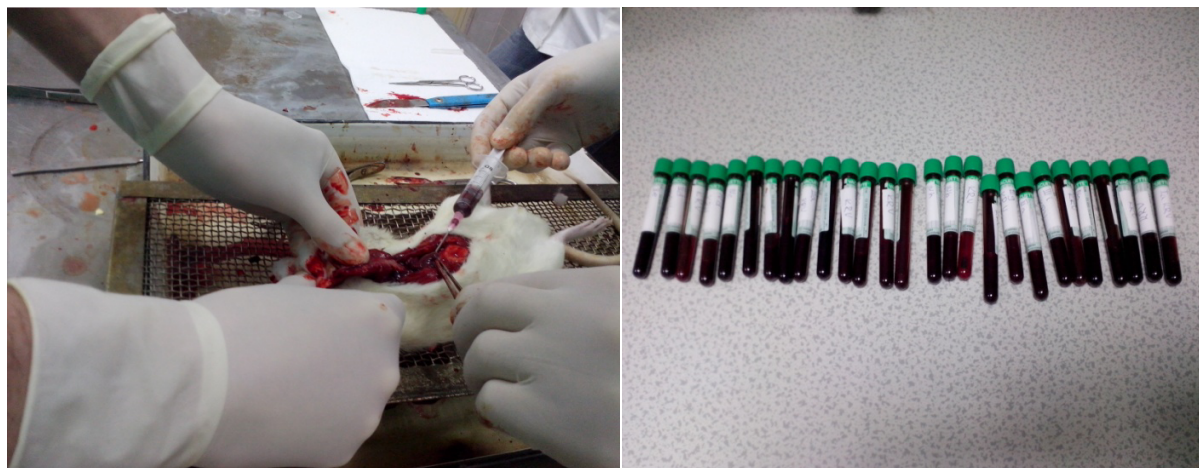
Nakon dobijanja saglasnosti od strane etičke komisije, ispitivanje je izvršeno na eksperimentalnim pacovima muškog pola, soja Wistar. U cilju ispitivanja delotvornosti i mehanizma delovanja odabranog soja, eksperiment je postavljen na način da se 40 eksperimentalnih životinja tokom perioda adaptacije (2 nedelje) hranilo standardnom peletiranom hranom, a nakon 2 nedelje shodno eksperimentalnom režimu:

1. kontrolna grupa (I) - dobijala je standardnu hranu za laboratorijske pacove,
2. eksperimentalna grupa 1 (II) - dobijala je standardnu hranu uz dodatak biomase odabranog soja,
3. aterogena grupa (III) - dobijala je veoma masnu hranu (standardna hrana obogaćena aterogenom smešom (20% suncokretovog ulja, 2,5% holesterola i 0,5% holne kiseline),
4. eksperimentalna grupa 2 (IV) - dobijala je veoma masnu hranu (kao i grupa 3.) uz dodatak biomase odabranog soja,

5. eksperimentalna grupa 3 (V) - se jedno vreme (dok nije konstatovana hiperlipidemija kod životinja) hranila kao i grupa 3., a potom se do kraja eksperimenta hranila kao i grupa 4.

Peletirana hrana i sveža voda bili su dostupni za ishranu pacova *ad libidum* tokom trajanja eksperimenta. Svaki pacov koji je trebao da konzumira *Spirulinu* tokom eksperimenta dobijao je 250 mg dnevno putem gavaže (250 mg liofilizirane *Spiruline* suspendovane u 1 ml destilovane vode i aplikovano putem šprica na koji je dodat čelični nastavak za gavažu). Feces se prikupljao na nedeljnom nivou.

Po isteku predviđenog vremenskog perioda životinje su žrtvovane pod anestezijom dietil-etra, a uzorci krvi uzimani su špricom iz srca i prebačeni u kivete sa natrijum-citratom (3,8%, w/v) kao antikoagulansom (Slika 3.6.). Kivete sa krvi su centrifugirane (10 minuta na 3000 obrtaja/min), nakon čega je plazma (supernatant) prenetu u plastične kivete sa čepom, koje su zatvorene i čuvane u zamrzivaču na -18 °C do upotrebe. Uzorci fecesa prikupljeni tokom oglada su zapakovani u plastične kutije i čuvani u zamrzivaču na -18 °C do upotrebe.

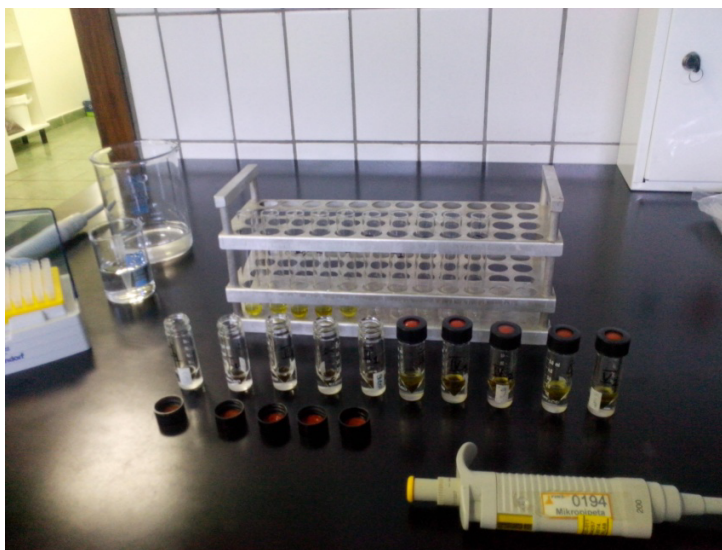


Slika 3.6.: Postupak uzimanja krvi iz srca pacova tokom žrtvovanja

3.4.2. **Određivanje sadržaja holesterola u fecesu pacova metodom tečne hromatografije (HPLC-DAD)**

U fecesu laboratorijskih pacova određen je sadržaj holesterola metodom tečne hromatografije (HPLC-DAD), a priprema uzoraka za analizu i hromatografsko razdvajanje su izvršeni po modifikovanoj metodi opisanoj od strane Oh i saradnika (2001).

U svrhu direktne saponifikacije, uzorci fecesa najpre su homogenizovani u laboratorijskom avanu, a nečistoće poput ostataka piljevine i viška dlake su uklonjene. Zatim je približno 0,5 g fecesa odmereno u staklene posude sa dobro zaptivajućim teflonskim zatvaračem u koje je dodato i 0,5 ml rastvora KOH (50% u vodi, w/w) i 2,5 ml etanola (96%, v/v). Posude su zatvorene i saponifikacija uzorka je izvršena uz zagrevanje na 70 °C u termostatu tokom 30 minuta. Nakon isteka vremena, posude su izvađene iz termostata, ohlađene na sobnu temperaturu i centrifugirane (5 min, 2000 obrtaja/min). Supernatant iz posuda je zatim prenet u staklene kivete (Slika 3.7.) i izvršena je ekstrakcija pomoću heksana (3 × 3 ml). Heksanski slojevi su nakon svake ekstrakcije preneti pomoću mikropipete u plastičnu kivetu sa poklopcem zapremine 50 ml, gde su spojeni i isprani destilovanom vodom (3 × 30 ml). Heksanski sloj je zatim prenet u staklenu kivetu pomoću mikropipete, rastvarač je uparen u struji azota, a ostatak je rastvoren u 1 ml etanola HPLC čistoće. Ovaj rastvor je zatim razblažen 50 puta etanolom HPLC čistoće, profiltriran pomoću špic-filtera prečnika pora 0,22 µm (PTFE; Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka) i 1 ml je prenet u vijalu za analizu na HPLC uređaju.



Slika 3.7.: Uzorci nakon direktne saponifikacije

Sadržaj holesterola u uzorcima određen je metodom tečne hromatografije na aparatu HPLC Agilent 1200 serije, po modifikovanoj metodi Ho i saradnika (2001). Korišćena je kolona Zorbax, Eclipse Plus C18 (1,8 µm; 4,6 x 50 mm). Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću detektora sa serijom dioda (Diode Array Detector, DAD) na 212 nm, a absorpcioni spektri komponenata su snimljeni u opsegu od 190 do 400 nm. Hromatografsko razdvajanje postignuto je pomoću metanola kao mobilne faze u izokratskom režimu, u trajanju od 7 minuta, uz post-vreme od 1 minut. Protok mobilne faze bio je 1,0 ml/min, a

temperatura kolone održavana na 30 °C. Injektovanje uzoraka vršeno je pomoću autosempera, a injektovana zapremina iznosila je 10 µl.

Standard holesterola za kalibraciju rastvoren je u etanolu HPLC čistoće i napravljena je serija razblaženja u opsegu koncentracija od 0,01 do 1 mg/ml. Pomoću ovih rastvora konstruisana je kalibraciona kriva, na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije holesterola u uzorcima i izražene kao mg/g fecesa.

3.4.3. Određivanje ukupne kalorijske vrednosti fecesa kalorimetrom

Ukupna kalorijska vrednost fecesa pacova određena je pomoću kalorimetra AC500 (Leco corporation, Plzen, Češka Republika). Uzorci fecesa najpre su homogenizovani u laboratorijskom avanu, nakon čega su od njih formirane čvrste pelete pomoću automatske mašine za tabletiranje u cilju lakše analize u kalorimetrijskoj bombi uređaja. Kalibracija uređaja izvršena je pomoću standarda benzojeve kiseline (standard 99,2%, Leco corporation, Plzen, Češka Republika). Sve analize izvršene su u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna devijacija (MJ/Kg).

3.4.4. Određivanje sadržaja žučnih kiselina metodom tečne hromatografije (HPLC-ELSD)

Ekstrakcija žučnih kiselina iz fecesa izvršena je prema modifikovanoj proceduri Locket i Gallaher (1989). Prethodno homogenizovani uzorci fecesa odmereni su u staklene kivete i ekstrakcija je izvršena pomoću etanola (80%, v/v, 3 × 2 ml) uz zagrevanje zatvorenih kiveta u termostatu (15 min, 100 °C). Nakon ekstrakcije, ekstrakti su spojeni i rastvarač je uparen u struji azota. Osušeni ekstrakti su resuspendovani u 0,6 ml metanola, nakon čega je u suspenziju dodato još 2,4 ml destilovane vode. Suspenzije ekstrakta su prečišćene metodom ekstrakcije na čvrstoj fazi (solid-phase extraction, SPE) uz upotrebu OPT SPE kertridža sa 60 mg punjenja (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Kolone za prečišćavanje su najpre kondicionirane sa 3 ml metanola, zatim sa 3 ml vode, nakon čega je naneta suspenzija ekstrakta. Protok kroz kolone u svim koracima je iznosio približno 1 ml/min. Nakon nanošenja uzorka, kolone su isprane sa 1 ml rastvorom metanola u vodi (5%, v/v) i eluiranje je izvršeno sa 2 ml metanola. Rastvarač iz eluata je nakon toga uparen u struji azota a suvi ostatak je rekonstituisan u 1 ml mobilne faze, profiltriran pomoću špric-filtera prečnika pora 0,22 µm (PTFE; Rotilabo-Spritzenfilter 13 mm, Roth, Karlsruhe, Nemačka) i prenet u vialu za HPLC analizu.

Sadržaj žučnih kiselina u uzorcima određen je metodom tečne hromatografije na aparatu HPLC Agilent 1200 serije, opremljenom sa kolonom Zorbax, Eclipse Plus C18 (1,8 μm ; 4,6 x 50 mm). Detekcija razdvojenih pikova je izvršena pomoću detektora rasipanja svetlosti (evaporative light scattering, ELSD). Parametri detektora su bili: pritisak gasa nosača (azot) 3,5 bar, temperatura 40 °C, gain vrednost 1. Hromatografsko razdvajanje postignuto je izokratski, pomoću mobilne koja se sastojala iz metanola (A) i rastvora mravlje kiseline u vodi (1%, v/v; B) u odnosu 75 : 25, respektivno, u trajanju od 20 minuta. Protok mobilne faze bio je 1,0 ml/min, a temperatura kolone nije kontrolisana. Injektovanje uzoraka je vršeno pomoću autosemplera, a injektovana zapremina je bila 10 μl .

Standardi žučnih kiselina (muriholna kiselina, hiokolna kiselina, henodeoksiholna kiselina, hiodeoksiholna kiselina, holna kiselina, deoksiholna kiselina, litholna kiselina) su rastvoreni u mobilnoj fazi i napravljena je serija razblaženja za svaku pojedinačnu kiselinu u opsegu koncentracija od 0,01 do 1 mg/ml. Pomoću ovih rastvora konstruisane su kalibracione krive, na osnovu dobijenih površina pikova u zavisnosti od koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti izračunate su koncentracije žučnih kiselina u uzorcima i izražene kao mg/g fecesa.

3.4.5. Automatizovane enzimske metode za određivanje ukupnog holesterola (TC), lipoproteinskih frakcija (HDL, LDL), ukupnih triglicerida (TG), alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST) u plazmi

Biohemijske analize izvršene su na uzorcima prethodno dobijene plazme laboratorijskih pacova pomoću biohemijskog analizatora c-111 (Roche Diagnostic, Sees, Francuska). Holesterol (TC), lipoproteinske frakcije (HDL, LDL), ukupni trigliceridi (TG), alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST) u plazmi pomoću automatizovanih enzimskih metoda prema uputstvima proizvođača. Sve analize izvršene su u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija.

3.5. Statistička obrada podataka

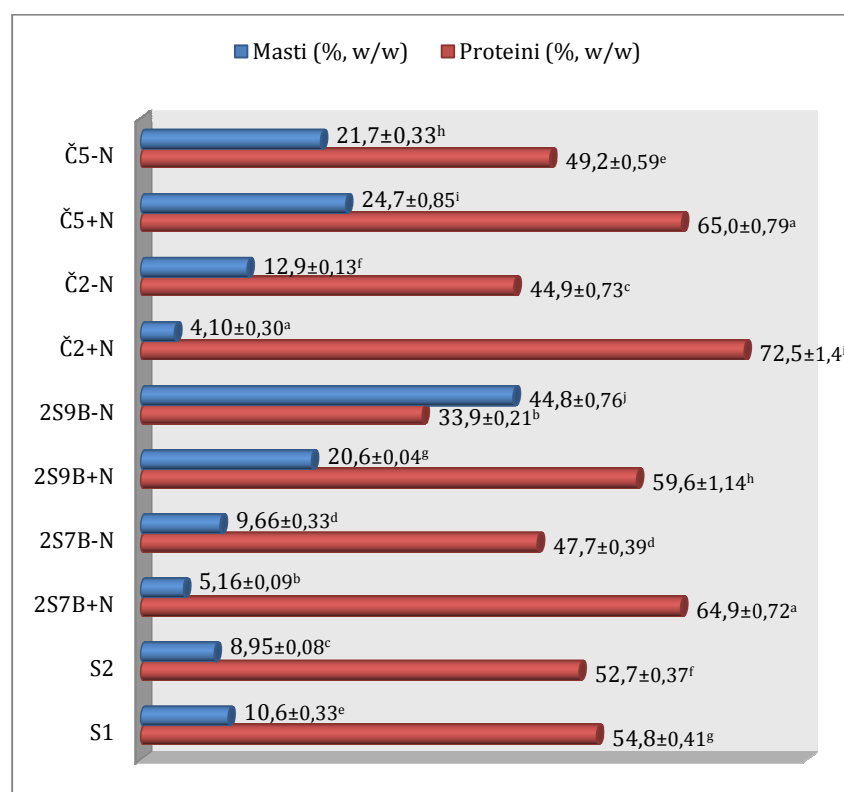
Za pojedine parametre je urađena analiza varijanse, koeficijenti korelacije između parametara, kao i Duncan-ov test višestrukih intervala. Podaci su obrađeni primenom softverskih paketa Microsoft Excel 2007 for Windows i StatSoft Statistica (data analysis software system), version 9.0. PCA (Principal Component Analysis) analiza obrađena je primenom prethodno navedenog softvera StatSoft Statistica i softvera XLSTAT (Addinsoft, 2013. NY, USA).

4. Rezultati i diskusija

4.1. Hemijski sastav biomase cijanobakterija

4.1.1. Sadržaj masti i proteina

Sadržaj masti i proteina u ispitivanim sojevima cijanobakterija prikazan je na Slici 4.1. U pogledu sadržaja masti, svi ispitivani sojevi značajno se statistički razlikuju. Razlika u sadržaju masti između sojeva *Spirulina* (S1 i S2), iako statistički signifikantna, nije veoma izražena i može se dovesti u vezu sa sličnošću ovih sojeva (soj S1 je komercijalni soj poreklom iz Japana, dok je S2 soj izolovan sa teritoriji Srbije). Sličnost navedenih sojeva takođe je uočljiva i ukoliko se posmatra njihov sadržaj ukupnih proteina, gde je razlika gotovo zanemarljiva. Dobijeni rezultati za sadržaj proteina u sojevima *Spirulina* su nešto niži nego što je navedeno u nekim literaturnim podacima (Tokusoglu i Unal, 2003; Henrikson, 2009) u kojima je naveden sadržaj proteina nešto veći od 60%. Sassano i saradnici (2010) ispitivali su uticaj količine dodatog azota (u obliku amonijum-hlorida) na hemijski sastav *Spirulina* spp. gajenih u laboratorijskim uslovima i zaključili su da sadržaj masti i proteina u biomasi direktno zavisi od količine dodatog azota u hranljivu podlogu u kontinualno gajenoj kulturi. Nalazi ovih autora ukazali su na to da sadržaj proteina u biomasi raste sa povećanjem koncentracije i brzine dodatka dodatog azota, a maksimalne vrednosti sadržaja proteina (72,5%) dobijene su pri brzini dotoka $DC_{N_0} = 1,20 \text{ mol/m}^3/\text{d}^{-1}$. Sadržaj lipida nije se bitno menjao sa promenom koncentracije i brzine dodatka azota, izuzev u graničnim slučajevima, kada je koncentracija azota iznosila 1 mol/m^3 . U poređenju sa navedenim rezultatima, vrednosti dobijene u našem eksperimentu odgovaraju gajenju *Spirulina* spp. pri koncentracijama dodatog azota ispod 10 mol/m^3 u hranljivu podlogu, iako ovo poređenje nije u potpunosti indikativno obzirom na to da u ovom slučaju gajenje nije izvedeno u kontinualnoj kulturi.



Slika 4.1.: Sadržaj masti i proteina u ispitivanim sojevima cijanobakterija (Brojevi označeni različitim slovima (a, b) se značajno razlikuju ($p < 0,05$))

Za razliku od soja *Spirulina* koji su gajeni u standardnoj laboratorijskoj podlozi, sojevi *Nostoc* (2S7B i 2S9B) i *Anabaena* (Č2 i Č5) gajeni su pod uslovima bez dodatka azota (-N) i sa dodatkom azota (+N) u hranljivu podlogu. Iako se rezultati sadržaja proteina i masti statistički značajno razlikuju kod svih sojeva, može se uočiti veoma izražen uticaj dodatka azota na hemijski sastav biomase. Dodatak azota imao je pozitivan uticaj na sadržaj proteina u ovim sojevima, a najveći porast sadržaja proteina pokazao je soj *Nostoc* 2S9B (za 42,9% veći sadržaj proteina u odnosu na uzgoj bez dodatka azota). Sa druge strane, dodatak azota negativno je uticao na produkciju masti kod svih sojeva, a najveća razlika uočava se kod soja *Anabaena* Č2 (3,14 puta niži sadržaj masti u odnosu na uzgoj bez dodatka azota). Ovakvi rezultati ukazuju na značajan uticaj azota u hranljivoj podlozi na metabolizam cijanobakterija, gde nepovoljni životni uslovi (niska koncentracija azota kao nutrijenta) dovode do smanjene sinteze proteina, a favorizuju sintezu lipida. Značajno je istaći da su se svi ispitivani sojevi pokazali kao bogat izvor proteina što ih čini potencijalno pogodnom sirovinom za obogaćivane prehrambenih proizvoda i hrane za životinje. Biosinteza lipida može se posmatrati kao adaptivni odgovor ovih autotrofnih organizama na nedostatak azota kao esencijalnog nutrijenta u biološki dostupnom obliku, što sa druge strane može biti od značaja u biotehnoškom smislu, ukoliko je povećanje sadržaja lipida u

biomasi poželjno (npr. u proizvodnji biodizela) (Mata i sar., 2010; Quintana i sar., 2011). Vargas i saradnici (1998) ispitivali su uticaj različitih faktora na nekoliko sojeva roda *Nostoc* i *Anabaena*. Njihovi rezultati su pokazali da je ispitivana vrsta *Nostoc paludosum* značajno povećala biosintezu lipida u odsustvu kombinovanog izvora azota (i do 70%), dok se sadržaj proteina u biomasi smanjio. Iako su cijanobakterije usled nižeg sadržaja lipida manje povoljne kao potencijalna sirovina za direktnu proizvodnju biodizela od mikroalgi, njihov veliki prinos biomase delimično može da kompenzuje taj nedostatak. Sa druge strane, biomasa cijanobakterija može biti iskorišćena za dobijanje brojnih drugih vidova obnovljive energije, kao što je proizvodnja vodonika, dobijanje bioetanola fermentacijom i proizvodnja složenih smeša viših alkohola (Quintana i sar., 2011).

4.1.2. Sastav masnih kiselina

Metoda ekstrakcije ispitivanih sojeva po Folch-u (Folch i sar., 1957) odabrana je u cilju što potpunije ekstrakcije svih prisutnih lipida, uključujući i polarne lipidne frakcije kao što su fosfolipidi. Sastav masnih kiselina ispitivanih sojeva nakon transesterifikacije bor(III)-fluoridom metodom gasne hromatografije (CG-FID), prikazan je u Tabeli 4.1. Sojevi roda *Spirulina* međusobno su slični, iako se mogu uočiti razlike u sastavu i zastupljenosti pojedinih masnih kiselina. Soj S1 u poređenju sa S2 karakterisalo je prisustvo laurinske (C12:0) i margarinske (C17:0) masne kiseline, koje nisu bile prisutne u soju S2, dok je u soju S2 uočeno prisustvo dihomogama-linolenske (C20:3n6) kiseline koja nije bila prisutna ni u jednom drugom ispitivanom cijanobakterijskom soju. U poređenju sa sojem S1, soj S2 posedovao je veći udeo pojedinih masnih kiselina, kao što su C14:0, C16:1 i C18:1n9c, dok je udeo palmitinske kiseline (C16:0) bio viši u soju S1. Ovo je uticalo i na sumu masnih kiselina, gde se može uočiti da je u soju S1 udeo zasićenih masnih kiselina (SFA) viši, dok je sadržaj mononezasićenih (MUFA) i zasićenih masnih kiselina (SFA) bio niži u odnosu na soj S2. Poznato je da je *Spirulina* spp. jedan od bogatih prirodnih izvora γ -linolenske kiseline (18:3n6, GLA), koja je usled dokazanog povoljnog delovanja na zdravlje komercijalno interesantna kao dodatak ishrani. U oba ispitana soja *Spirulina*, sadržaj GLA je bio visok (28,5±0,50% u S1 i 27,1±0,52% u S2), što je u skladu sa nalazima drugih autora (Tokusogli i Unal, 2003; Sassano i sar., 2010). Ova masna kiselina, zajedno sa C16:0 i C18:2n6c predstavlja dominantnu masnu kiselinu u masnokiselinskom profilu vrsta *Spirulina*. Prisustvo esencijalne α -linolenske kiseline (C18:3n3, ALA) nije dokazano u ispitivanim uzorcima *Spirulina*, iako je u literaturi poznato da ona može biti prisutna u ovim cijanobakterijama, mada u vrlo niskoj koncentraciji (Tokusogli i Unal, 2003; Sassano i sar., 2010).

Sastav masnih kiselina u sojevima roda *Nostoc* i *Anabaena* karakterisao je viši prosečan sadržaj UFA ($63,9 \pm 0,80\%$ - $72,5 \pm 1,63\%$), kao i niži sadržaj SFA ($27,3 \pm 0,29\%$ - $36,1 \pm 0,57\%$) u odnosu na sojeve *Spirulina*. Najznačajnija razlika u masnokiselinskom sastavu ogledala se u visokoj koncentraciji ALA u svim ispitivanim sojevima, dok ova masna kiselina nije detektovana u uzorcima *Spirulina*. Iako se vrednosti udela ALA statistički značajno razlikuju u svim ispitivanim uzorcima, iz dobijenih vrednosti može se uočiti da su sojevi *Anabaena* (Č2 i Č5) nešto bogatiji ovom masnom kiselinom od *Nostoc* sojeva (2S7B i 2S9B). Hromatogrami (GC-FID) uzoraka Č2-N i S2 prikazani su na Slici 4.2. Udeo linolne kiseline (C18:2n6c) bio je viši u uzorcima *Spirulina* nego u ostalim sojevima. U ostalim ispitivanim sojevima, najbogatiji linolnom kiselinom bili su uzorci roda *Nostoc* 2S9B ($14,81 \pm 0,18$ i $15,9 \pm 0,18$ za +N i -N varijaciju, respektivno). Palmitoleinska kiselina (C16:1) predstavljala je takođe jednu od dominantnih masnih kiselina u *Nostoc* i *Anabaena* sojevima i nalazila se u značajno većem udelu u ovim cijanobakterijama u odnosu na uzorke roda *Spirulina*.

Dodatak azota u hranljivu podlogu uticao je na sastav masnih kiselina sojeva *Nostoc* i *Anabaena*. Iako su razlike statistički značajne, iz dobijenih rezultata može se uočiti da je dodatak azota generalno uticao na smanjenje udela polinezasićenih masnih kiselina i ukupnih nezasićenih masnih kiselina (PUFA i UFA), dok je udeo zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA i SFA) povećan kod sojeva gajenih uz dodatak azota. Dobijeni rezultati u skladu su sa našim prethodnim ispitivanjima navedenih cijanobakterijskih sojeva (Milovanović i sar., 2012). Jedini izuzetak od ovog trenda predstavljao je soj *Anabaena* Č5, kod kog je uočen pad udela zasićene palmitinske kiseline (C16:0), što je rezultovalo tim da odnosi ukupnih nezasićenih i zasićenih masnih kiselina nisu značajnije promenjeni.

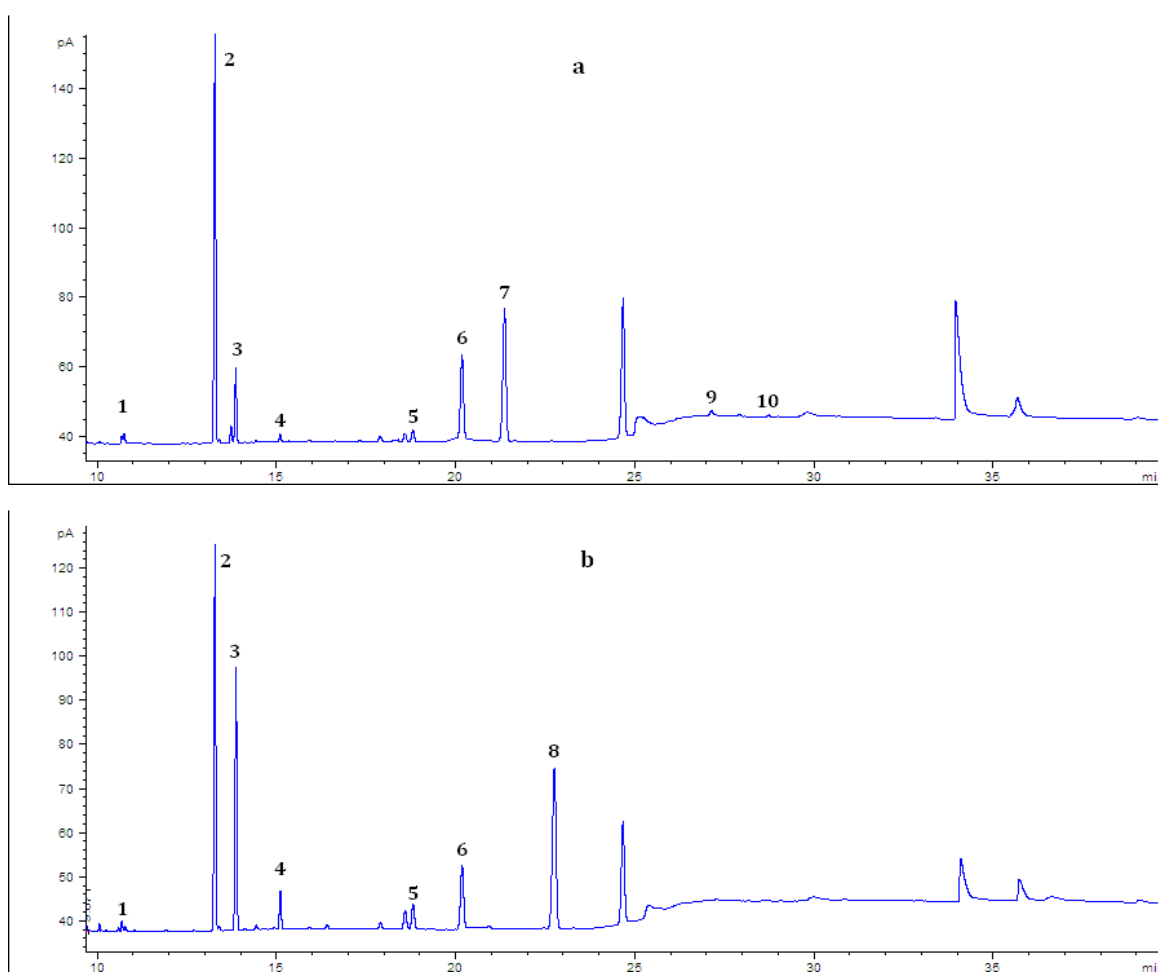
Tabela 4.1. Sastav masnih kiselina u ispitivanim sojevima cijanobakterija (izraženo kao % masne kiseline u ukupnim masnim kiselinama)

Soj	S1	S2	2S7B+N	2S7B-N	2S9B+N	2S9B-N	Č2+N	Č2-N	Č5+N	Č5-N
Masna kiselina										
C8:0	-	-	-	-	1,21 ± 0,03 ^a	-	-	-	-	-
C12:0	0,13 ± 0,01 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	0,13 ± 0,01 ^a
C14:0	0,09 ± 0,01 ^g	0,52 ± 0,07 ^{de}	0,29 ± 0,03 ^{bc}	0,36 ± 0,02 ^c	0,77 ± 0,07 ^h	0,65 ± 0,03 ^f	0,29 ± 0,03 ^{ab}	0,59 ± 0,04 ^{ef}	0,23 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,03 ^d
C14:1	-	-	-	0,17 ± 0,02 ^b	-	-	-	-	0,14 ± 0,01 ^a	-
C16:0	44,0 ± 1,00 ^h	36,5 ± 1,50 ^g	29,6 ± 0,42 ^e	34,4 ± 0,50 ^f	22,9 ± 0,06 ^d	31,4 ± 0,32 ^c	26,8 ± 1,00 ^a	31,8 ± 0,06 ^c	28,1 ± 0,28 ^b	27,6 ± 0,31 ^{ab}
C16:1	6,74 ± 0,17 ^d	10,0 ± 0,18 ^e	27,1 ± 0,01 ^c	26,0 ± 0,23 ^{ab}	24,9 ± 0,10 ^g	26,6 ± 0,44 ^{bc}	23,6 ± 0,36 ^f	26,1 ± 0,71 ^{ab}	25,7 ± 0,23 ^a	30,6 ± 0,43 ^h
C17:0	0,11 ± 0,01 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C17:1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14 ± 0,01 ^a	-
C18:0	0,80 ± 0,05 ^a	0,83 ± 0,05 ^a	1,04 ± 0,04 ^b	1,29 ± 0,06 ^d	2,37 ± 0,13 ^e	2,83 ± 0,05 ^f	1,19 ± 0,03 ^c	1,32 ± 0,03 ^d	1,09 ± 0,02 ^b	1,19 ± 0,02 ^c
C18:1n9c	1,07 ± 0,04 ^b	1,58 ± 0,08 ^c	2,59 ± 0,07 ^f	4,13 ± 0,04 ^g	6,46 ± 0,00 ^h	10,3 ± 0,28 ⁱ	1,85 ± 0,05 ^d	3,63 ± 0,06 ^a	2,41 ± 0,10 ^e	3,69 ± 0,05 ^a
C18:2n6c	18,9 ± 0,15 ⁱ	20,2 ± 0,03 ^j	6,23 ± 0,17 ^b	7,81 ± 0,04 ^d	14,8 ± 0,18 ^g	15,9 ± 0,18 ^h	5,74 ± 0,18 ^a	9,78 ± 0,28 ^e	7,13 ± 0,08 ^c	10,8 ± 0,34 ^f
C18:3n6	28,5 ± 0,50 ^a	27,1 ± 0,52 ^b	-	-	-	-	-	-	-	-
C18:3n3	-	-	33,1 ± 0,19 ^e	25,7 ± 0,48 ^c	27,2 ± 0,23 ^a	13,9 ± 0,35 ^b	39,9 ± 0,34 ^g	28,2 ± 0,29 ^d	34,5 ± 0,02 ^f	27,4 ± 0,80 ^a
C20:2	0,56 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,01 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
C20:3n6	-	0,73 ± 0,01 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-
SFA	45,1 ± 1,06 ^g	37,9 ± 1,62 ^f	30,9 ± 0,50 ^e	36,1 ± 0,57 ^d	27,3 ± 0,29 ^b	34,9 ± 0,39 ^{cd}	28,3 ± 1,06 ^{ab}	33,8 ± 0,13 ^c	29,4 ± 0,31 ^a	29,4 ± 0,37 ^a
MUFA	7,8 ± 0,20 ^b	11,6 ± 0,25 ^c	29,7 ± 0,08 ^a	30,3 ± 0,28 ^a	31,4 ± 0,10 ^f	36,9 ± 0,71 ^h	25,5 ± 0,41 ^d	29,7 ± 0,77 ^a	28,4 ± 0,47 ^e	34,3 ± 0,48 ^g
PUFA	47,9 ± 0,66 ^c	48,6 ± 0,57 ^c	39,3 ± 0,36 ^f	33,5 ± 0,52 ^e	41,9 ± 0,41 ^b	29,8 ± 0,53 ^d	45,7 ± 0,52 ^g	37,9 ± 0,57 ^a	41,7 ± 0,10 ^b	38,2 ± 1,15 ^a
UFA	55,7 ± 0,86 ^g	60,2 ± 0,82 ^h	69,0 ± 0,43 ^{bc}	63,9 ± 0,80 ⁱ	73,4 ± 0,51 ^f	66,8 ± 1,25 ^a	71,2 ± 0,94 ^{de}	67,7 ± 1,34 ^{ab}	70,1 ± 0,57 ^{cd}	72,5 ± 1,63 ^{ef}

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u redu se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$).

SFA – zasićene masne kiseline, MUFA – mononezasićene masne kiseline, PUFA – polinezasićene masne kiseline, UFA – nezasićene masne kiseline (ukupne)

Ahlgren i Hyenstrand (2003) su ispitali uticaj nivoa azota u hranljivoj podlozi na pojedine mikroalge i cijanobakterije i došli do zaključka da nedostatak azota utiče na povećanje nivoa C-tipa metabolita (npr. lipida) u odnosu na metabolite N-tipa (npr. proteine), kao i da u takvim uslovima dolazi do smanjenja nivoa polinezasićenih masnih kiselina C18n3 tipa, i povećanja udela zasićenih i nezasićenih kiselina C18n2 i C18n1 tipa. Dobijeni rezultati ukazuju na značaj uslova gajenja pojedinih sojeva cijanobakterija u cilju dobijanja optimalnog hemijskog sastava za pojedine biotehnoške primene. U slučaju upotrebe za ishranu i dobijanje funkcionalnih prehrambenih proizvoda, uslovi koji favorizuju biosintezu višeg stepena nezasićenosti masnih kiselina bili bi pogodniji sa zdravstvenog stanovišta.



Slika 4.2.: GC-FID hromatogrami sojeva *Spirulina* (a) i *Anabaena* (b): 1- C14:0; 2- C16:0; 3- C16:1; 4- C18:0; 5- C18:1n9c; 6- C18:2n6c; 7- C18:3n6; 8- C18:3n3; 9- C20:2; 10- C20:3n6

Prisustvo zasićenih masnih kiselina u velikim količinama u ishrani smatra se jednim od uzročnika koronarnih oboljenja i pojedinih kancera (Wood i sar 2008). Prema preporukama britanskog ministarstva zdravlja, odnos PUFA/SFA u namirnicama trebao bi da iznosi više od 0,45, dok je Svetska Zdravstvena Organizacija (WHO/FAO) izdala smernice za "balansiranu ishranu" u kojoj je preporučeno odnose PUFA/SFA iznad 0,4 (HMSO, 1994; Wood i sar, 2008). Značajno je istaći da su se svi ispitivani sojevi cijanobakterija u našem radu odlikovali povoljnim odnosom PUFA/SFA (od 0,85 za 2S9B-N do 1,62 za Č2+N) što ih čini potencijalnim funkcionalnim sirovinama za razvoj prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću namenjih osobama sa poremećajem u metabolizmu lipida.

4.1.3. Aminokiselinski sastav cijanobakterija

Određivanje aminokiselinskog sastava od velike je važnosti za procenu nutritivnih karakteristika sirovina u prehrambenoj industriji. Pojedine cijanobakterije predstavljaju veoma bogat izvor proteina i kao takve interesantne su sa stanovišta industrije hrane, hrane za životinje i prehrambenih suplemenata. Za razliku od mikroalgi, cijanobakterije ne poseduju ćelijski zid i samim tim su iskoristljivije sa stanovišta ljudske ishrane obzirom na njihovu laku svarljivost i visoku biološku dostupnost njihovih proteina. Sadržaj i sastav aminokiselina u ispitivanim sojevima prikazan je u tabeli 4.2.

U uzorcima roda *Spirulina* najzastupljenije aminokiseline bile su asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, arginin i leucin. Obzirom na to da je metoda pripreme uzorka uključivala hidrolizu u kiselim uslovima, sav glutamin i veliki deo asparagina u svim uzorcima preveden je u oblik asparaginske i glutaminske kiseline. Asparagin je međutim detektovan u svim uzorcima, što ukazuje na veoma visok početni sadržaj pomenute aminokiseline u ovim sojevima. Iako se statistički razlikuju, uzorci *Spirulina* su pokazali sličan aminokiselinski profil, pri čemu je sadržaj svih aminokiselina u uzorku S2 nešto niži nego u uzorku S1. Interesantno je da, iako kiselinski uslovi hidrolize prema literaturnim podacima (Fountoulakis i Lahm, 1998) dovode do potpunog gubitka triptofana, ova aminokiselina detektovana je u svim ispitivanim uzorcima, iako u relativno niskoj količini ($11,7 \pm 0,65 - 67,9 \pm 1,25 \mu\text{mol/g}$), što je verovatno posledica korišćenja fenola i tioglikolne kiseline kao zaštitnih agenasa tokom hidrolize.

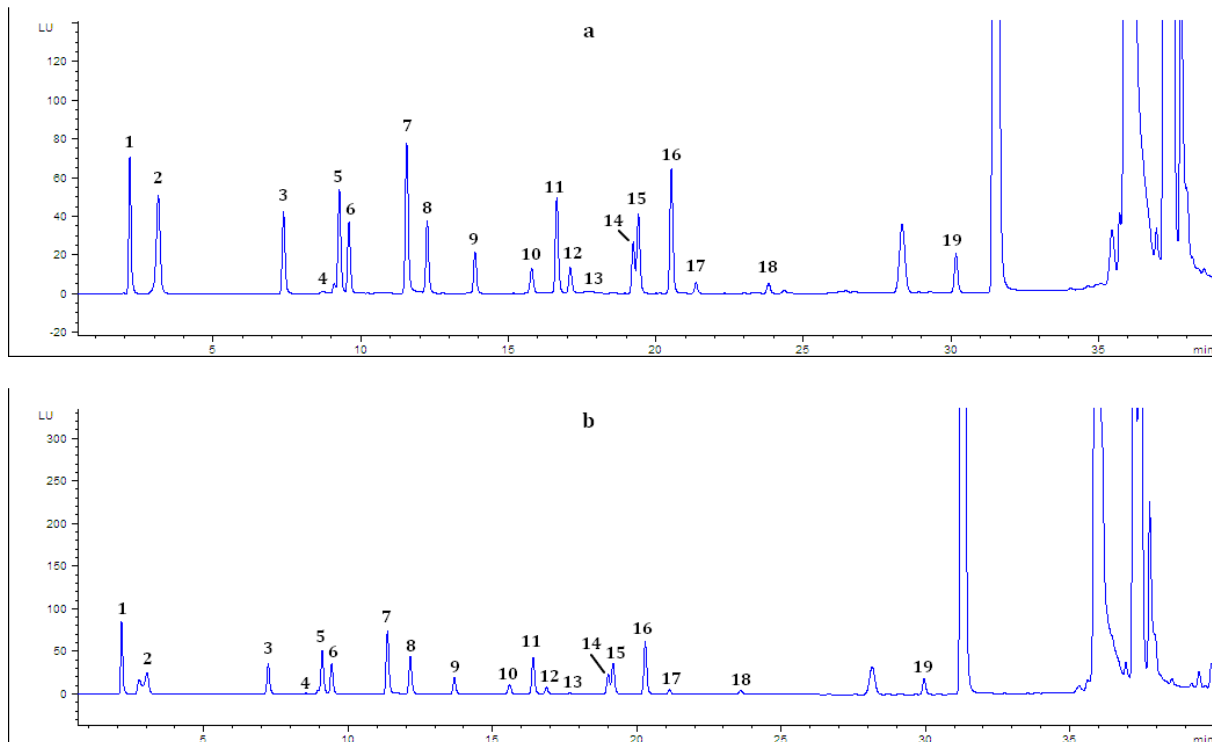
Tabela 4.2. Sadržaj i sastav aminokiselina u ispitivanim sojevima cijanobakterija

Soj	S1	S2	2S7B+N	2S7B-N	2S9B+N	2S9B-N	C2+N	C2-N	C5+N	C5-N
Aminokiselina ($\mu\text{mol/g}$)										
asparaginska kis	939 \pm 17,0 ⁱ	859 \pm 4,40 ^a	775 \pm 1,95 ^g	884 \pm 5,35 ^b	571 \pm 6,65 ^e	676 \pm 8,65 ^f	264 \pm 3,10 ^d	202 \pm 2,30 ^c	825 \pm 14,4 ^h	872 \pm 7,15 ^{ab}
glutaminska kis	1308 \pm 6,10 ⁱ	1138 \pm 17,2 ^h	957 \pm 1,40 ^e	987 \pm 4,55 ^f	640 \pm 8,30 ^b	721 \pm 3,60 ^d	149 \pm 1,40 ^a	142 \pm 2,60 ^a	1058 \pm 40,5 ^g	691 \pm 1,45 ^c
asparagin	615 \pm 10,8 ^j	560 \pm 7,2 ⁱ	385 \pm 3,55 ^g	423 \pm 0,90 ^b	164 \pm 1,40 ^e	341 \pm 6,50 ^f	107 \pm 2,35 ^d	83,0 \pm 3,10 ^c	412 \pm 9,70 ^h	420 \pm 2,75 ^b
glutamin	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
histidin	128 \pm 7,30 ^b	111 \pm 1,60 ^c	98,4 \pm 1,50 ^b	112 \pm 0,60 ^c	53,3 \pm 1,75 ^d	66,7 \pm 2,25 ^e	20,4 \pm 0,50 ^a	18,7 \pm 0,45 ^a	105 \pm 5,5	95,6 \pm 2,40 ^b
glicin	758 \pm 10,6 ^b	720 \pm 11,5 ^b	670 \pm 9,40 ^e	693 \pm 4,00 ^f	562 \pm 3,90 ^a	564 \pm 3,80 ^a	159 \pm 3,40 ^d	121 \pm 2,20 ^c	726 \pm 10,0 ^b	708 \pm 7,10 ^g
treonin	536 \pm 8,15 ^h	507 \pm 0,45 ^b	423 \pm 1,45 ^e	482 \pm 4,30 ^g	129 \pm 2,40 ^a	386 \pm 4,95 ^d	123 \pm 2,60 ^a	100 \pm 0,40 ^c	474 \pm 5,85 ^f	508 \pm 7,05 ^b
arginin	1149 \pm 18,7 ^g	1065 \pm 32,8 ^c	983 \pm 4,30 ^b	1052 \pm 7,60 ^c	825 \pm 6,50 ^a	829 \pm 7,10 ^a	247 \pm 10,9 ^e	194 \pm 5,35 ^d	1022 \pm 2,65 ^f	993 \pm 5,05 ^b
alanin	495 \pm 8,50 ^c	441 \pm 12,15 ^a	480 \pm 4,70 ^h	494 \pm 5,00 ^c	349 \pm 0,05 ^g	328 \pm 7,15 ^f	107 \pm 3,00 ^e	72,9 \pm 2,10 ^d	451 \pm 7,10 ^{ab}	459 \pm 7,50 ^b
tirozin	314 \pm 7,20 ^h	282 \pm 5,00 ^g	209 \pm 2,10 ^d	272 \pm 1,95 ^f	87,1 \pm 1,65 ^a	186 \pm 3,90 ^c	89,4 \pm 1,70 ^b	81,0 \pm 1,80 ^{ab}	189 \pm 3,50 ^c	252 \pm 9,00 ^e
cistin	758 \pm 7,60 ^f	717 \pm 9,15 ^e	563 \pm 3,30 ^d	579 \pm 9,95 ^a	461 \pm 3,40 ^c	460 \pm 1,45 ^c	113 \pm 2,15 ^b	106 \pm 2,20 ^b	581 \pm 7,35 ^a	582 \pm 4,85 ^a
valin	598 \pm 3,55 ⁱ	573 \pm 5,65 ^h	462 \pm 7,15 ^f	472 \pm 6,10 ^a	415 \pm 5,35 ^e	367 \pm 6,45 ^d	104 \pm 2,90 ^c	84,6 \pm 3,10 ^b	474 \pm 3,65 ^a	486 \pm 4,05 ^c
metionin	179 \pm 1,50 ^h	159 \pm 5,10 ^g	88,4 \pm 2,70 ^b	100 \pm 0,55 ^e	55,4 \pm 3,20 ^c	67,2 \pm 2,75 ^d	18,8 \pm 0,75 ^a	16,9 \pm 0,35 ^a	90,3 \pm 2,25 ^b	107 \pm 4,55 ^f
triptofan	22,9 \pm 2,60 ^c	19,2 \pm 0,75 ^a	15,6 \pm 0,05 ^b	17,8 \pm 0,20 ^{ab}	16,7 \pm 0,95 ^{ab}	11,7 \pm 0,65 ^d	67,9 \pm 1,25 ^f	48,5 \pm 2,45 ^e	18,6 \pm 1,50 ^a	22,1 \pm 0,85 ^c
fenilalanin	354 \pm 0,10 ^h	332 \pm 2,00 ^g	267 \pm 3,35 ^f	289 \pm 3,95 ^a	243 \pm 6,30 ^e	232 \pm 10,3 ^d	65,6 \pm 1,50 ^c	50,7 \pm 2,70 ^b	283 \pm 3,55 ^a	291 \pm 7,25 ^a
izoleucin	515 \pm 12,3 ^h	477 \pm 5,60 ^g	396 \pm 3,60 ^f	412 \pm 2,85 ^a	375 \pm 5,45 ^e	323 \pm 7,90 ^d	83,0 \pm 3,00 ^c	68,0 \pm 2,50 ^b	412 \pm 5,85 ^a	412 \pm 3,05 ^a
leucin	824 \pm 9,00 ^h	781 \pm 4,10 ^g	681 \pm 1,15 ^f	722 \pm 3,00 ^a	641 \pm 3,30 ^e	567 \pm 8,95 ^d	162 \pm 2,05 ^c	123 \pm 3,70 ^b	714 \pm 7,85 ^a	718 \pm 4,85 ^a
lizin	331 \pm 9,20 ^a	315 \pm 5,15 ^d	329 \pm 0,50 ^a	334 \pm 1,20 ^a	248 \pm 1,10 ^b	239 \pm 10,0 ^b	376 \pm 0,20 ^f	267 \pm 2,95 ^c	364 \pm 7,80 ^e	326 \pm 8,15 ^a
hidroksiprolin	75,8 \pm 3,00 ^g	68,5 \pm 2,00 ^f	60,5 \pm 1,50 ^a	54,6 \pm 2,20 ^e	40,7 \pm 1,55 ^b	38,6 \pm 1,80 ^b	34,0 \pm 1,00 ^d	25,5 \pm 1,50 ^c	59,1 \pm 1,75 ^a	60,0 \pm 2,80 ^a
prolin	443 \pm 7,95 ^g	367 \pm 5,65 ^f	305 \pm 4,00 ^a	302 \pm 3,50 ^a	306 \pm 0,70 ^a	238 \pm 9,10 ^c	32,9 \pm 0,90 ^b	31,1 \pm 0,05 ^b	317 \pm 7,80 ^d	350 \pm 4,80 ^e

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u redu se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$).

Uzorci sojeva *Nostoc* 2S7B i 2S9B imali su sličan aminokiselinski sastav uzorcima *Anabaena* Č5, dok se uzorak Č2 značajno razlikovao po sadržaju aminokiselina od svih ispitivanih uzoraka u smislu relativno niskog sadržaja aminokiselina, što može biti indikator drugačijih životnih uslovima optimalnih za rast ove cijanobakterije u prirodi, ali i manjkavosti prilikom prečišćavanja uzgojene biomase. U svim uzorcima detektovano je prisustvo svih esencijalnih aminokiselina (histidin, treonin, valin, metionin, triptofan, fenilalanin, izoleucin, leucin i lizin). Uzorci roda *Spirulina* pokazali su se kao izrazito bogati izvori esencijalnih aminokiselina, a naročito uzorak S1 koji je posedovao najviši sadržaj svih esencijalnih aminokiselina, osim triptofana (najviši sadržaj bio je u uzorku *Anabaena* Č2-N - $48,5 \pm 2,45$ $\mu\text{mol/g}$) i lizina (najviši sadržaj bio je u uzorku *Anabaena* Č5+N - $364 \pm 7,80$ $\mu\text{mol/g}$). Hromatogrami aminokiselinskog sastava uzoraka S1 i Č2+N prikazani su na Slici 4.3. Bitno je naglasiti da, osim aminokiselinskog sastava, i drugi faktori utiču na kvalitet prehrambenih proteina, kao što su biološka vrednost (biological value, BV) i koeficijent svarljivosti (digestibility coefficient, DC). Kao što je ranije napomenuto, cijanobakterije su sa ovog stanovišta povoljnije za ljudsku ishranu od mikroalgi, koje poseduju hemicelulozni ćelijski zid koji umanjuje svarljivost unete biomase. Pojedine cijanobakterije koje se koriste u ljudskoj ishrani, kao što je *Spirulina platensis*, imaju veoma visoke vrednosti BV i CV, uporedive sa najkvalitetnijim životinjskim izvorima proteina, kao što su jaja i kazein (Becker, 2007).

Volkman i saradnici (2008) ispitivali su uticaj gajenja u hranljivoj podlozi dobijenoj od otpadne vode desalinacionog procesa na sadržaj proteina i aminokiselinski sastav *Spirulina platensis*. U uzorcima gajenim u medijumu otpadne vode desalinatora sadržaj proteina bio je značajno viši (56%) odnosu na uzorke gajene u slanoj vodi (48,6%). Takođe, prinos biomase uzoraka gajenih u desalinacionoj otpadnoj vodi bio je izrazito visok (4,95 g/L). Analiza aminokiselinskog sastava pokazala je prisustvo svih esencijalnih aminokiselina u količini višoj od minimalne preporučene od strane FAO (Spies 1967), izuzev lizina i triptofana, koji su se nalazili u nižim količinama od preporučenih. Navedeni autori (Volkman i saradnici, 2008) zaključili su da su uočene promene u sadržaju proteina i aminokiselinskom sastavu kod *Spirulina platensis* posledica prilagođavanja na uslove stresa izazvane povećanom koncentracijom soli, kao i da gajenje ove cijanobakterije može biti interesantno sa stanovišta mogućnosti gajenja na velikoj skali u medijumima koji predstavljaju otpadnu sirovinu.



Slika 4.3.: HPLC-FLD hromatogram sojeva *Spirulina* (a) i *Nostoc* (b): 1- asparaginska kis.; 2- glutaminska kis.; 3- asparagin; 4- histidin; 5- glicin; 6-treonin; 7-arginin; 8- alanin; 9- tirozin; 10- cistin; 11- valin; 12- metionin; 13- triptofan; 14- fenilalanin; 15- izoleucin; 16- leucin; 17- lizin; 18- hidroksiprolin; 19- prolin

4.1.4. Sadržaj mineralnih materija

Pojedine cijanobakterije, kao jednoćelijski organizmi koji rastu slobodno u medijumu, imaju veoma izraženu sposobnost akumulacije metalnih jona iz svoje okoline (Abdel-Aty i sar., 2013). Akumulirani metali u biomasi najčešće se nalaze u biološki visoko dostupnom obliku, što ove organizme čini izrazito bogatim potencijalnim izvorom različitih mikro- i makroelemenata u ishrani (Mosulishvili i sar., 2002). Takođe, interesantna je i mogućnost fortifikacije biomase pojedinim esencijalnim mikroelementima kao što su selen i jod na jednostavan i ekonomski isplativ način (Mosulishvili i sar., 2002). Imajući gore navedeno u vidu, u ispitanim cijanobakterijskim sojevima u ovom radu određen je sadržaj pojedinih mikro- i makroelemenata u cilju njihove nutritivne karakterizacije, a dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Sadržaj mineralnih materija u ispitivanim sojevima cijanobakterija

Metal (mg/kg)	Cu	Fe	Zn	Mn	Mg	Ca	Na	K
Soj								
S1	20,8 ± 0,71 ^c	2583 ± 13,8 ^c	15,9 ± 0,34 ^a	38,2 ± 1,04 ^a	4171 ± 9,82 ^b	9639 ± 15,2 ^b	19462 ± 32,1 ^f	17110 ± 43,5 ^h
S2	5,29 ± 0,21 ^b	2303 ± 14,1 ^a	15,2 ± 0,45 ^a	28,3 ± 0,63 ^a	2558 ± 2,66 ^a	8875 ± 15,3 ^a	5161 ± 10,7 ^b	15924 ± 73,9 ^f
2S7B+N	319 ± 8,61 ⁱ	2904 ± 7,36 ^e	369 ± 2,52 ^e	2597 ± 7,08 ^b	14574 ± 15,5 ^f	18946 ± 20,7 ^d	64062 ± 37,3 ^g	9559 ± 37,4 ^b
2S7B-N	472 ± 7,30 ^a	4305 ± 79,7 ^g	573 ± 6,55 ^g	3962 ± 10,0 ^f	17100 ± 5,65 ^h	27345 ± 15,0 ^g	7358 ± 16,8 ^d	14701 ± 73,3 ^e
2S9B+N	305 ± 3,72 ^h	1318 ± 3,97 ^b	271 ± 2,07 ^b	1991 ± 7,33 ^c	10719 ± 19,4 ^d	15137 ± 16,3 ^c	121125 ± 121 ^j	9703 ± 11,1 ^c
2S9B-N	473 ± 3,22 ^a	4182 ± 67,5 ^f	792 ± 3,93 ⁱ	5572 ± 8,45 ^h	15062 ± 7,14 ^g	33011 ± 29,3 ^h	5798 ± 15,4 ^c	11413 ± 12,6 ^d
Č2+N	189 ± 1,30 ^d	2334 ± 16,1 ^a	312 ± 1,93 ^d	2379 ± 3,80 ^d	21579 ± 10,9 ⁱ	20377 ± 12,6 ^e	97901 ± 87,9 ⁱ	9266 ± 22,4 ^a
Č2-N	282 ± 5,12 ^g	4539 ± 24,5 ^h	683 ± 3,65 ^h	4836 ± 16,0 ^g	27629 ± 27,8 ⁱ	36058 ± 21,6 ^j	10091 ± 31,8 ^e	19739 ± 39,1 ⁱ
Č5+N	273 ± 3,57 ^f	2655 ± 4,89 ^d	280 ± 5,21 ^c	2595 ± 4,03 ^b	9372 ± 7,85 ^c	23763 ± 13,9 ^f	92208 ± 15,1 ^h	9216 ± 7,66 ^a
Č5-N	260 ± 2,21 ^e	6223 ± 7,52 ⁱ	427 ± 2,71 ^f	3939 ± 27,8 ^e	14453 ± 11,4 ^e	33830 ± 23,9 ⁱ	4668 ± 20,7 ^a	16468 ± 30,5 ^g

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u redu se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$).

U pogledu mineralnog sadržaja, uočene su značajne razlike između sojeva *Spirulina* S1 i S2. Najveće uočene razlike bile su u sadržaju Cu ($20,8 \pm 0,71$ mg/kg u S1 i $5,29 \pm 0,21$ mg/kg u S2), Mg ($4171 \pm 9,82$ mg/kg u S1 i $2558 \pm 2,66$ mg/kg u S2) i Na ($19462 \pm 32,1$ mg/kg u S1 i $5161 \pm 10,7$ mg/kg u S2), dok razlike u sadržaju Zn i Mn nisu bile statistički značajne ($p < 0,05$). Pojedini autori (Campanella i sar., 1999; Tokusoglu i Unal, 2003) su u svojim radovima takođe ukazali na značajne razlike u sadržaju mineralnih materija u različitim ispitivanim sojevima cijanobakterije *Spirulina*. Takođe, u poređenju sa sojevima *Nostoc* i *Anabaena*, uočeno je da sojevi *Spirulina* sadrže znatno niži sadržaj Cu, Zn, Mn, Mg i Ca. Obzirom na to da su *Spirulina* sojevi gajeni u podlozi drugačijeg hemijskog sastava, to bi moglo objasniti razlike u određenom sadržaju mineralnih materija, ali u obzir se mora uzeti i potencijalna razlika u sposobnosti bioakumulacije pojedinih elemenata između navedenih sojeva.

U ispitivanim sojevima *Nostoc* i *Anabaena* uočen je značajan uticaj dodatka azota u hranljivu podlogu na sadržaj pojedinih mineralnih materija u biomasi. Sadržaj svih mineralnih materija izuzev Na bio je niži u uzorcima sojeva koji su gajeni u prisustvu dodatog azota, sa izuzetkom sadržaja Cu u soju *Anabaena* Č5, gde je sadržaj ovog elementa bio neznatno niži u uzorku koji je gajen bez dodatog azota ($260 \pm 2,21$ mg/kg u Č5-N i $273 \pm 3,57$ mg/kg u Č5+N). U slučaju Na, sadržaj ovog metala bio je značajno viši (čak i do 20,9 puta u slučaju soja *Nostoc* 2S9B) u sojevima gajenim u prisustvu dodatog azota. Ovo može biti objašnjeno činjenicom da je podloga bez dodatka azota relativno siromašna Na^+ , dok dodatak azota u obliku NaNO_3 (u masenoj koncentraciji od 1,50 g/l) veoma povećava koncentraciju ovog elementa tako da on postaje dominantan jon u rastvoru hranjive podloge.

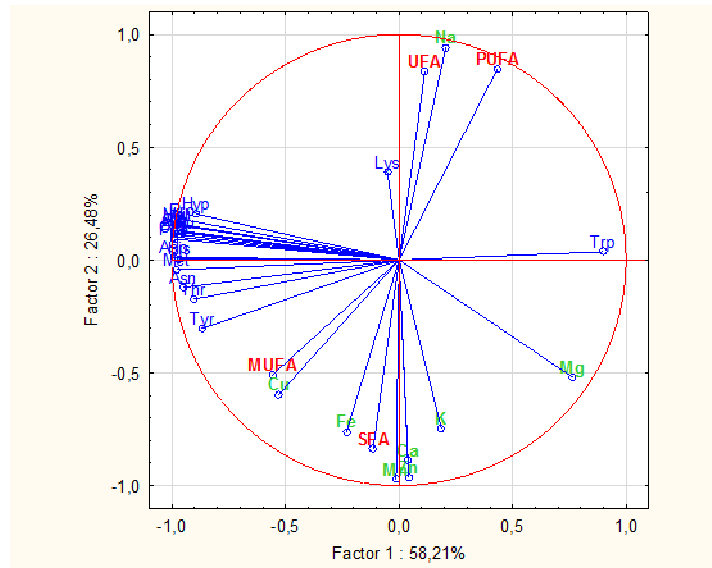
Abdel-Aty i saradnici (2013) ispitivali su sposobnost biosorpcije jona Pb(II) i Cd(II) iz vodenog medijuma pomoću biomase cijanobakterije *Anabaena sphaerica*. Njihovi rezultati FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analize biomase ove cijanobakterije pokazali su prisustvo površinskih amino, karboksilnih, hidroksilnih i karbonilnih funkcionalnih grupa za koje se pretpostavlja da učestvuju u adsorpciji metalnih jona na površinu ćelije, što može predstavljati objašnjenje za sposobnost bioakumulacije navedenih jona metala.

4.1.5. PCA analiza hemijskog sastava uzoraka sojeva *Nostoc* i *Anabaena*

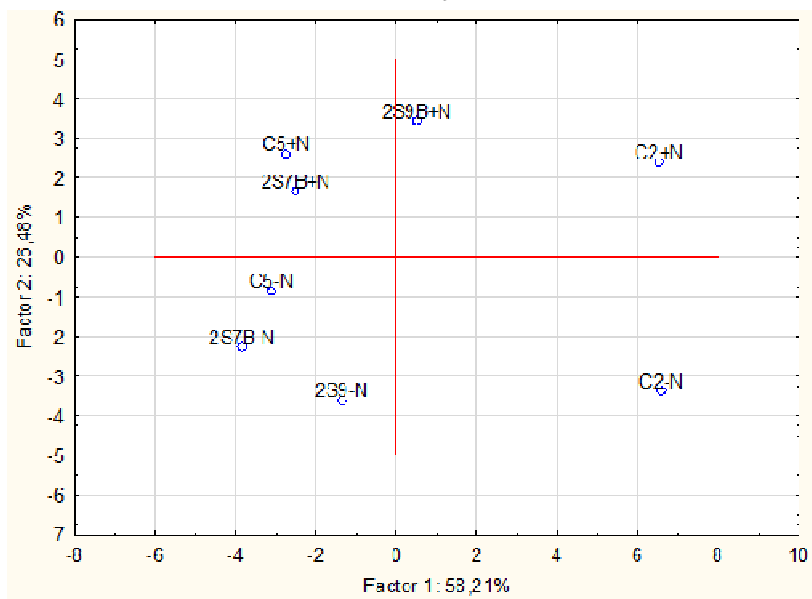
Analiza glavnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA) jedna je od najpopularnijih statističkih metoda multivarijantne analize, koja se koristi u svrhu smanjivanja broja analiziranih parametara (odabirom najvažnijih) u objašnjenju neke pojave. Obzirom na veliki broj određenih analitičkih parametara koji opisuju ispitivane uzorke, dobijeni rezultati analize sadržaja aminokiselina, metala i masnih kiselina u sojevima *Nostoc* i *Anabaena* podvrgnuti su PCA analizi u cilju što boljeg i vizuelno jednostavnijeg objašnjenja razlika između ovih sojeva, kao i razlika između uzoraka gajenih sa i bez dodatka azota u hranljivu podlogu. Za PCA analizu u ovom slučaju korišćen je softverski paket Statistica (v. 9.0, StatSoft).

Matrica podataka, koja se sastojala iz 8 redova (ispitivani uzorci) i 31 kolone (analitički parametri hemijskog sastava), podvrgnuta je PCA analizi. Prve dve komponente objašnjavaju 84,7% varijanse, uz doprinos komponente PC1 od 58,2% i komponente PC2 od 26,5%.

Prvi grafik (Slika 4.4. a) prikazuje projekciju inicijalnih promenljivih na faktorijalnoj ravni. Horizontalna osa pozitivno korelira sa sadržajem triptofana i magnezijuma, a negativno korelira sa najvećim brojem aminokiselina, MUFA i sadržajem Cu. Vertikalna osa pozitivno korelira sa UFA i PUFA i sadržajem Na, dok negativno korelira sa većinom metala, SFA i MUFA. Drugi grafik (Slika 4.4. b) prikazuje projekciju ispitivanih uzoraka na faktorijalnoj ravni. Uočava se da se uzorci *Anabaena* Č2+N i Č2-N, koje od faktora najbolje opisuje visok sadržaj triptofana i magnezijuma (pozitivna korelacija) znatno izdvajaju od ostalih uzoraka. Sa druge strane, negativna korelacija ovih sojeva sa sadržajem većine aminokiselina ukazuje na niži sadržaj istih u odnosu na ostale ispitivane uzorke. Takođe, na osnovu horizontalne ose očito je da se svi ispitivani uzorci razdvajaju prema prisustvu dodatog azota u podlogu za gajenje. Uzorke gajene uz dodatak azota opisuje visoka korelacija sa sadržajem Na, UFA i PUFA i umereno viši sadržaj lizina, dok su uzorci gajeni bez prisustva azota okarakterisani visokim sadržajem MUFA, SFA i metala (izuzev Na, sa kojim postoji negativna korelacija).



a)



b)

Slika 4.4. PCA; a) Projekcija promenljivih na faktorijalnoj ravni (masne kiseline, proteini i metali); b) projekcija uzoraka *Nostoc* i *Anabaena* na faktorijalnoj ravni

4.1.6. Hemijski profil lakoisparljivih jedinjenja (Headspace GC-MSD)

Poznato je da mnoge cijanobakterije proizvode brojna lako isparljiva organska jedinjenja kao svoje sekundarne metabolite, što sa prehrambenog stanovišta može da predstavlja nepovoljno svojstvo (Milovanović, 2015). Mnoga od ovih jedinjenja mogu biti neprijatnog mirisa (npr. ustajao miris, miris sličan ribi ili blatu) i bitno uticati na organoleptička svojstva cijanobakterijske biomase u formulaciji funkcionalnih proizvoda (Fradique i sar., 2013), kao i izazvati pojavu neprijatnog mirisa u proizvodima akvakulture poput ribe (Persson, 1980). Osim navedenog prehrambenog aspekta, poznato je da je pojava neprijatnog mirisa na vodenim površinama indikator nekontrolisanog rasta cijanobakterija (tzv. „cvetanje“) i produkcije cijanobakterijskih toksina koji predstavljaju značajan zdravstveni rizik (Smith i sar., 2008).

Lakoisparljiva jedinjenja određena u ispitivanim uzorcima prikazana su u Tabeli 4.4. Dobijeni rezultati pokazuju da u ovim vrstama nerazgranati alkani predstavljaju dominantnu grupu isparljivih jedinjenja. Poznato je da su metabolički putevi produkcije alkana u cijanobakterijama povezani sa metabolizmom masnih kiselina. Istraživanja su identifikovala dve grupe enzima odgovornih za sintezu alkana u cijanobakterijama: acil-acil prenosni protein reduktaza (AAR) i aldehid dekarboksilaza (AAD), koji igraju ključnu ulogu u konverziji metaboličkih intermedijera masnih kiselina u alkane i alkene (Ducat i sar., 2011). Heptadekan je detektovan u svim ispitivanim uzorcima u udelu od 27,4% u uzorku C5+N do 82,2% u uzorku S1. Heksadekan i pentadekan su takođe detektovani u svim uzorcima, ali u nižem udelu u odnosu na heptadekan (0,90 – 5,45% za heksadekan i 0,22 – 8,81% za pentadekan). Tetradekan i 6,9-heptadekadien su detektovani samo u uzorcima roda *Spirulina*. Drugi značajni ugljovodonici bili su 8-heptadecen koji je detektovan samo u jednom soju roda *Nostoc* (2S9B) i rodovima *Anabaena* (Č2 i Č5) i 8-metil-heptadekan koji je detektovan u sojevima 2S7B i Č2. 3-Oktadecen je detektovan samo u jednom *Nostoc* soju (2S9B). Ovi rezultati su u skladu sa nalazima drugih autora (Ozdemir i sar., 2004; Liu i sar., 2013) i ukazuju na to da, iako su masne kiseline tipa C16 i C18 dominantne kod cijanobakterija, glavni ugljovodonici vode poreklo od masnih kiselina dužine lanca od C15 do C17.

Tabela 4.4. Lakoisparljiva organska jedinjenja izražena kao % površine pika u ukupnom jonskom hromatogramu ispitivanih uzoraka cijanobakterija

Jedinjenje	RI	S1	S2	2S7B+N	2S7B-N	2S9B+N	2S9B-N	Č2+N	Č2-N	Č5+N	Č5-N
2-pentil-furan (I)*	992	0,80	5,25	3,69	6,05	1,27	1,17	1,81	8,56	8,98	0,72
2-etil-1-heksanol (II)	995	0,77	n.d.	0,51	5,59	0,98	5,56	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,2,6-trimetil-cikloheksanon (III)	1086	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,73	4,99	0,29	0,90
1,1,3-trimetil-2-cikloheksanon (IV)	1096	n.d.	0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,6-dimetil-cikloheksanol (V)	1030	2,16	2,66	3,95	4,24	1,69	1,92	1,24	3,06	3,48	0,61
β-ciklocitral (VI)	1204	0,20	1,09	0,43	1,17	0,25	0,50	0,33	1,34	n.d.	n.d.
2-metil-izoborneol (VII)	1262	0,90	1,06	0,80	2,88	0,51	4,42	0,94	4,48	1,77	2,18
Tetradekan (VIII)	1413	0,14	0,39	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-jonone (IX)	1457	1,42	1,75	1,96	2,47	1,75	1,47	1,15	2,72	1,72	1,20
Pentadekan (X)	1512	4,15	8,81	0,83	0,68	0,22	0,74	0,52	0,84	0,63	0,44
Diizobuterna kiselina 1-terc-butil-2-metil-1,3-propandiil estar (XI)	1560	0,90	n.d.	0,67	2,45	0,61	0,68	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Heksadekan (XII)	1612	5,45	4,79	1,29	1,07	1,35	1,55	1,11	1,34	1,46	0,90
6,9-heptadekadien (XIII)	1727	0,90	0,33	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8-heptadecen (XIV)	1719	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29,4	30,9	0,45	0,00	54,3	56,7
Heptadekan (XV)	1711	82,2	73,1	43,5	45,2	59,8	44,5	64,8	64,7	27,4	36,3
8-metil-heptadekan (XVI)	1746	n.d.	n.d.	42,4	28,2	n.d.	n.d.	26,9	8,01	n.d.	n.d.
3-octadecen (XVII)	1818	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,18	6,60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

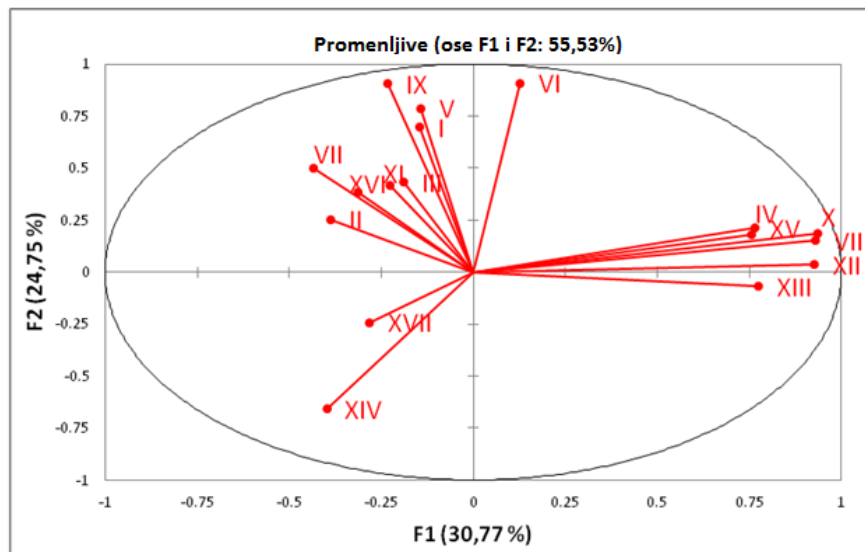
* Rimski brojevi u zagradama su dodati radi pojednostavljenja PCA grafika

n.d. – nije detektovano; RI – retencioni indeks

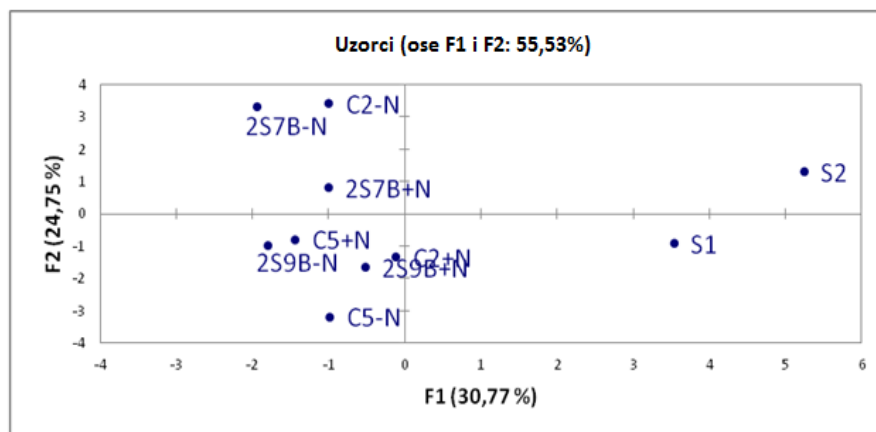
2-Metil-izoborenol (MIB) i geosmin spadaju među najznačajnija jedinjenja sa aspekta doprinosa neprijatnom mirisu cijanobakterija i često se navode kao uzročnici neprijatnog zemljanog i ustajalog mirisa, naročito u vodenim sredinama (Sugiura i sar., 1998; Saadoun i sar., 1998; Fujise i sar., 2010). MIB je detektovan u svim uzorcima u opsegu od 0,51% u uzorku 2S9B+N do 4,48% u uzorku C2-N. Prema našim saznanjima, proizvodnja MIB nije do sada uočena u vrstama roda *Spirulina*. U uzorcima *Anabaena* i *Nostoc* vrsta, udeli MIB bili su niži u uzorcima gajenim u prisustvu dodatog azota, što ukazuje na to da dodatak azota u hranljivu podlogu može da smanji biosintezu MIB u ovim sojevima. Pomenuta zapažanja potrebno je uzeti sa rezervom, obzirom da je kvantifikacija jedinjenja vršena na osnovu relativnog % površine pikova, a poznato je da promene površina drugih pikova u hromatogramu mogu da utiču direktno na % površine pika MIB. Geosmin nije detektovan ni u jednom od ispitivanih uzoraka, što može da se objasni zapažanjima Saadoun i saradnika (1998) koji su zaključili da dodatak jona bakra u hranljivu podlogu (u masenoj koncentraciji iznad 6,92 mg Cu²⁺/l) može da inhibira proizvodnju geosmina. Obzirom da je tokom gajenja svih sojeva u ovom radu masena koncentracija jona bakra bila viša od navedene, ovo može biti uzrok zašto geosmin nije detektovan ni u jednom ispitivanom uzorku. Takođe je moguće da ni jedan od ispitivanih sojeva ne proizvodi prirodno geosmin. 2-Pentilfuran je isparljivo organsko jedinjenje koje je bitan proizvod lipidne degradacije i odgovorno je za prijatan miris sličan sladiću i pasulju u brojnim prehrambenim proizvodima (Lam i Proctor, 2006). Njegovo prisustvo detektovano je u svim ispitivanim uzorcima u količini od 0,72% do 8,98%. β-Ciklocitral i β-jonon su takođe bitna isparljiva mirisna jedinjenja koja se u prehrambenoj industriji koriste kao komponente veštačkih aroma. β-Jonon je detektovan u svim ispitivanim uzorcima u relativno visokom udelu (1,15-2,72%), dok je β-ciklocitral takođe detektovan u svim uzorcima (izuzev *Anabaena* soja Č5), iako sa znatno nižim sadržajem (0,20-1,34%).

Dobijeni podaci podvrgnuti su PCA analizi, a matrica podataka konstruisana je u 10 redova (ispitivani uzorci) i 17 kolona (detektovana jedinjenja). Prve dve komponente objašnjavaju 55,5% varijanse, gde komponenta PC1 doprinosi 30,8% a komponenta PC2 24,8%.

Prvi grafik (Slika 4.5. a) prikazuje projekciju inicijalnih promenljivih na faktorijalnoj ravni. Horizontalna osa (PC1) povezana je sa ugljovodonicima tipa alkana i alkena (sa izuzetkom jedinjenja IV), obzirom na to da pozitivno korelira sa jedinjenjima IV, VIII, X, XII, XIII i XV. Vertikalna osa (PC2) je u pozitivnoj korelaciji sa jedinjenjima I, V, VI i IX koja su ciklične ili biciklične strukture. Jedinjenje XIV (8-heptadecen) je u negativnoj korelaciji sa PC2 osom, što ukazuje da ovo jedinjenje ne poseduje cikličnu strukturu.



a)



b)

Slika 4.5.: PCA; a) Projekcija promenljivih na faktorijalnoj ravni (lakoisparjiva jedinjenja); b) projekcija uzoraka na faktorijalnoj ravni

Ispitivani uzorci pokazali su dobro razdvajanje na faktorijalnoj ravni (Slika 4.5. b) na osnovu detektovanih jedinjenja. Uzorci roda *Spirulina* (S1 i S2) se znatno izdvajaju od ostalih što opisuje korelacija sa njihovim visokim sadržajem alkana, dok su uzorci *Anabaena* i *Nostoc* (obeleženi kao C2-N and 2S7B-N) opisani korelacijom sa visokom koncentracijom jedinjenja V, VI i IX (2,6-dimetil-cikloheksanol, β -ciklocitral i β -jonon, respektivno).

4.1.7. Hemijski profil lakoisparljivih jedinjenja (Headspace SPME GCxGC-TOFMS)

Obzirom da prisustvo pojedinih lakoisparljivih jedinjenja u biomasi cijanobakterija u velikoj meri može limitirati njihovu potencijalnu primenu u prehrambenim proizvodima, u cilju njihovog potpunijeg profilisanja, razvijena je još jedna metoda gasne hromatografije koja koristi drugačiji način injektovanja, razdvajanja i detekcije komponenti.

Za razliku od prethodne metode gde je uzorkovanje i analiza lakoisparljivih jedinjenja vršena direktno iz gasne faze nakon zagrevanja uzorka u zatvorenoj viali (HEAD space, HS), lakoisparljiva jedinjenja iz gasne faze, u ovom slučaju, koncentrovana su pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi na pogodnom vlaknu (SPME), a zatim desorbovana sa vlakna u inletu gasnog hromatografa i podvrgnute hromatografskom razdvajanju i detekciji pomoću TOFMS detektora. Optimizacija SPME uslova podrazumevala je odabir uslova pod kojim dolazi do maksimalnog oslobađanja lakoisparljivih jedinjenja i uključivala je testiranje temperaturnog programa zagrevanja viala sa uzorkom, kao i uticaja dodatka vode i rastvora NaCl na oslobađanje navedenih jedinjenja. Maseni detektor koji meri vreme preleta jona (eng. Time Of Flight Mass Spectrometer, TOFMS) poseduje određene prednosti u odnosu na standardni kvadrupolni maseni detektor (MSD) koje se ogledaju u većoj tačnosti procene m/z odnosa molekulskih fragmenata (tj. višoj rezoluciji), kao i potencijalno daleko bržoj akviziciji masenih spektara u realnom vremenu (spektar/s). Ove osobine omogućuju precizniju identifikaciju molekula na osnovu njihovih spektralnih karakteristika, kao i efikasniju dekonvoluciju (razdvajanje preklopljenih masenih spektara) hromatografskih podataka. Takođe, visoka rezolucija i brza spektralna akvizicija omogućuju akviziciju masenih spektara tokom dvodimenzionalne gasne (GCxGC) hromatografije u realnom vremenu (Leco Application note No. 203-821-428, 2012).

Rezultati analize dati su u Tabeli 4.5. Iz dobijenih rezultata su uočljive značajne razlike u odnosu na Headspace GC-MSD analizu. Pored linearnih alkana i alkena, kao dominantna jedinjenja figurisali su i aldehidi, ketoni i alkoholi u značajnim udelima. Od aldehida i ketona najznačajniji su bili heksanal (0,48-9,48%), bezaldehid (0,09-4,40%), 5-metil-2-heptanon (0,49-1,82%), 2,2,6-trimetil-cikloheksanon (1,74-4,72%) i izoforon (1,65-9,80%). Među detektovanim alkoholima najznačajniji su bili 1-pentanol (0,00-2,86%), 1-heksanol (0,00-25,9%), 1-okten-3-ol (0,71-15,6%), 3-oktanol (0,00-16,9%), 2-etil-1-heksanol (0,28-6,22%), 2,4-dimetil-cikloheksanol (6,68-21,3%) i *p*-cimen-2-ol (0,14-0,74%). Sojeve roda *Anabaena* karakterisalo je prisustvo 3,5-oktadien-2-ona koji nije detektovan u ostalim ispitivanim uzorcima, kao i znatno viši sadržaj 2,4-dimetil-cikloheksanola (18,9-21,3%) od ostalih sojeva. Uzorke sojeva *Spirulina* karakterisao je viši udeo 1-heksanola (18,9-25,9%) i heptadekana (15,2-35,2%). Takođe, za ove sojeve bio je karakterističan viši udeo pentadekana i heksadekana u odnosu na ostale uzorke, a udeo 2-etil-1-heksanola bio je niži nego u ostalim sojevima. 3-Oktanol i 7-metil-heptadekan nisu bili prisutni u sojevima

Spirulina, dok su se nalazili u različitim udelima u ostalim ispitivanim sojevima. Dodatak azota u podlogu za gajenje imao je negativan uticaj na udeo 1-okten-3-ola u sojevina *Nostoc* (0,82% i 1,18% u uzorcima 2S7B+N i 2S9B+N, respektivno; 15,6% i 9,88% u uzorcima 2S7B-N i 2S7B+N, respektivno), a takav efekat uočen je i na udeo 3-oktanona (0,00% i 0,06% u uzorcima 2S7B+N i 2S9B+N, respektivno; 4,16% i 3,47% u uzorcima 2S7B-N i 2S7B+N, respektivno) i 3-oktanona (0,80% i 0,22% u uzorcima 2S7B+N i 2S9B+N, respektivno; 15,7% i 16,9% u uzorcima 2S7B-N i 2S7B+N, respektivno).

Dobijeni podaci podvrgnuti su PCA analizi pomoću softvera XLSTAT (Addinsoft, 2013. NY, USA), a matrica podataka je konstruisana u 10 redova (ispitivani uzorci) i 17 kolona (detektovana jedinjenja). Prve dve komponente objašnjavaju 56,4% varijanse, gde komponenta PC1 doprinosi 35,1% a komponenta PC2 21,3%.

Prvi grafik (Slika 4.6.; a) prikazuje projekciju inicijalnih promenljivih na faktorijalnoj ravni. Horizontalna osa (PC1) je u pozitivnoj korelaciji sa jedinjenjima 3, 15, 23, 25, 27, 30 i 37, dok je vertikalna osa (PC2) u pozitivnoj korelaciji sa jedinjenjima 1, 12, 32, 33, 34, 39 i 40. Ispitivani uzorci pokazali su razdvajanje na faktorijalnoj ravni (Slika 4.6; b) na osnovu detektovanih jedinjenja. Uzorci roda *Spirulina* (S1 i S2) se znatno izdvajaju od ostalih što opisuje korelacija sa njihovim visokim sadržajem alkana (pentadekan, heksadekan, heptadekan) i MIB, dok negativna korelacija sa 2-etil-heksanolom i 7-metil-heptadekanom ukazuje na niži udeo ovih jedinjenja u odnosu na ostale uzorke. Uzorci roda *Anabaena* su opisani pozitivnom korelacijom sa 3,5-oktadien-2-onom, 3-decenom i 5-metil-2-heptanonom, do su uzorci roda *Nostoc* opisani korelacijom sa 3-oktadienom, 3-oktanolom, 1-okten-3-olom i 3-metil-1-butanolom.

Tabela 4.5. Lakoisparljiva organska jedinjenja izražena kao % površine pika u ukupnom jonskom hromatogramu (TIC, TOFMS) ispitivanih uzoraka cijanobakterija

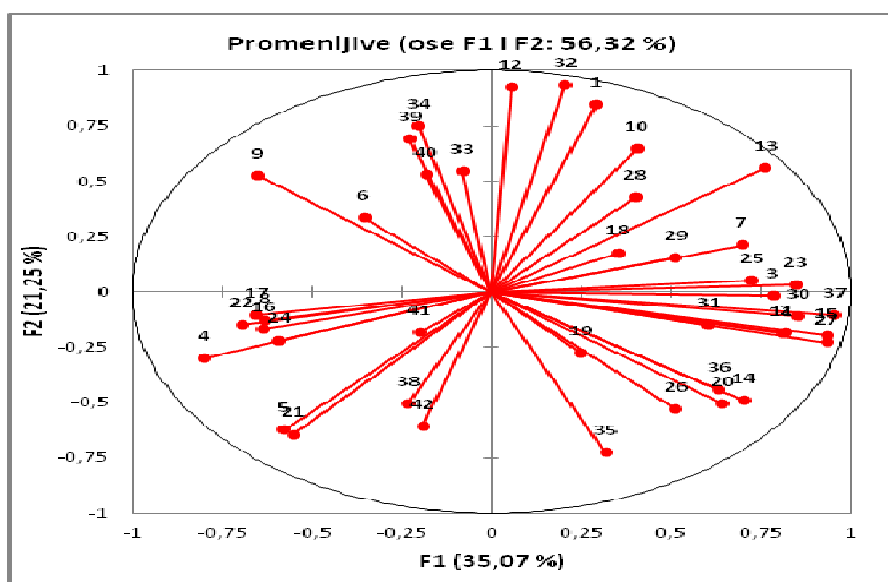
Jedinjenje	RI	Oznaka*	S1	S2	2S7B+N	2S7B-N	2S9B+N	2S9B-N	Č2+N	Č2-N	Č5+N	Č5-N
2,2,6-Trimetil-cikloheksanon,	697	1	1,25	0,86	0,06	0,52	0,80	0,60	0,97	0,63	0,22	0,91
2,3-Pentanedion	698	2	0,00	0,01	0,00	0,01	0,12	0,02	0,18	0,26	0,03	0,14
Pentanal	702	3	0,34	0,22	0,00	0,02	0,53	0,07	0,26	0,92	0,46	0,56
3-Metil-1-Butanol	734	4	0,28	0,07	0,94	1,95	1,51	2,76	0,00	0,01	0,27	0,00
(S)-2-metil-1-butanol	734	5	0,21	0,11	1,21	0,58	0,94	0,59	0,16	0,07	0,47	0,05
1-Pentanol	768	6	1,79	1,12	0,00	1,01	2,50	2,86	0,58	0,96	0,00	1,23
Heksanal	800	7	5,47	3,81	0,48	0,52	5,72	1,03	2,71	9,48	3,87	5,09
1,3-Oktadien	827	8	0,00	0,00	0,00	0,34	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00
1-Heksanol	869	9	25,9	18,9	6,14	9,78	20,81	23,8	0,00	3,38	1,90	1,26
2-Heptanon	893	10	0,82	0,25	0,07	0,30	0,36	0,27	0,36	0,48	0,18	0,58
Heptanal	906	11	0,15	0,10	0,08	0,08	0,44	0,07	0,33	1,21	0,34	0,83
6-Metil-5-hepten-2-on	938	12	0,06	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01
6-Metil-2-heptanon	955	13	0,99	0,62	0,00	0,30	0,50	0,18	1,27	0,76	0,41	1,05
Benzaldehid	968	14	0,46	0,39	1,22	1,57	2,77	0,09	2,15	4,40	2,60	1,94
5-Metil-2-heptanon	974	15	0,89	0,66	0,95	0,63	0,87	0,49	1,82	1,54	1,57	1,77
1-Okten-3-ol	982	16	0,71	0,56	0,82	15,6	1,18	9,88	0,77	0,80	2,02	0,73
3-Oktonon	988	17	0,15	0,10	0,00	4,16	0,06	3,47	0,00	0,16	0,00	0,23
2-Oktonon	992	18	0,26	0,00	0,00	0,49	0,00	0,22	0,63	0,22	0,00	0,53
1,2,3-Trimetil-benzen	993	19	0,09	0,02	0,08	0,05	0,12	0,01	0,20	0,00	0,47	0,06
2-Pentil-furan	993	20	0,93	0,48	1,41	0,94	1,43	0,35	0,94	2,40	1,49	1,35
6-Petil-5-hepten-2-ol	997	21	0,08	0,03	0,99	0,36	0,16	0,46	0,00	0,00	0,53	0,00
3-Oktnol	999	22	0,00	0,00	0,80	15,7	0,22	16,9	0,02	0,02	0,59	0,03
2,3,4-Trimetil-heks-3-enal	1002	23	0,58	0,42	0,47	0,46	0,35	0,33	0,64	0,91	0,50	0,93
Oktnal	1007	24	0,00	0,00	0,00	0,29	0,16	0,21	0,02	0,03	0,00	0,02
3-Decen	1023	25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,08	0,00	0,23

2-Etil-1-heksanol	1028	26	0,43	0,28	2,76	1,65	6,22	1,73	3,45	4,89	1,97	4,17
2,4-Dimetil-cikloheksanol	1032	27	10,9	8,39	11,8	8,28	11,4	6,68	21,1	18,9	19,4	21,3
2,2,6-Trimetil-cikloheksanon	1047	28	3,55	2,44	2,03	3,20	1,89	1,74	4,72	2,00	2,33	3,24
Izoforon	1080	29	3,31	2,35	1,65	5,41	1,81	2,95	8,00	3,28	2,06	9,80
3,5-Oktadien-2-on	1100	30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,49	5,04	0,00	2,75
β -Ciklocitral	1226	31	1,46	1,09	1,29	1,17	1,34	1,02	1,67	1,23	1,97	1,58
Limona keton	1255	32	1,20	0,87	0,00	0,22	0,27	0,11	0,74	0,25	0,16	0,42
2-metil-izoborneol	1291	33	0,74	0,46	0,27	0,23	0,27	0,14	0,18	0,17	0,54	0,20
Pentadekan	1400	34	1,71	2,66	0,60	0,19	0,13	0,10	0,33	0,13	0,50	0,12
(E)-6,10-dimetil-5,9-undekadien-2-on	1451	35	0,26	0,30	1,31	0,26	0,79	0,23	0,65	0,72	1,29	0,67
β -Jonon	1489	36	2,41	2,04	3,74	1,85	4,44	1,39	5,22	3,53	5,97	3,59
4-(2,2,6-trimetil-7-oksabiciklo[4.1.0]hept-1-il)-3-buten-2-on	1497	37	1,59	1,35	0,97	1,16	1,67	0,99	4,13	4,66	3,18	4,15
2,2,4-Trimetil-3-karboksiizopropil-pentanska kiselina, izobutil estar	1581	38	0,49	0,95	7,50	0,71	0,40	0,35	0,60	0,20	1,98	0,70
Heksadekan	1600	39	1,32	2,68	0,60	0,11	0,22	0,07	0,16	0,10	0,41	0,11
Heptadekan	1700	40	15,2	35,2	12,2	2,81	5,88	1,83	4,49	3,53	13,5	4,06
8-Heptadecen	1719	41	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	0,77	0,10	0,02	0,00	0,02
7-Metil-heptadekan	1745	42	0,00	0,00	8,85	1,25	0,15	0,02	0,97	0,24	2,89	0,29

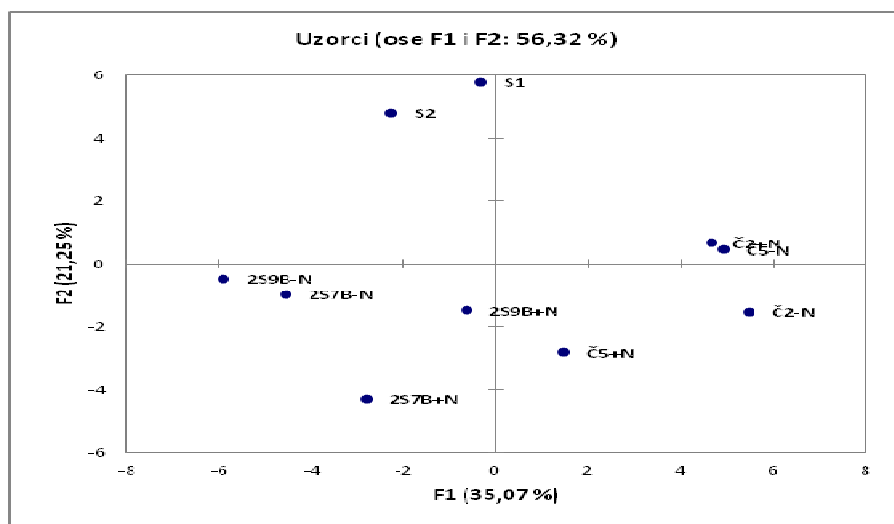
* oznaka iz softvera, ostavljena radi jednostavnijeg tumačenja PCA grafika

RI - retencioni indeks

Osim navedenih jedinjenja, u svim uzorcima dokazano je prisustvo lakoisparljivih mirisnih jedinjenja kao što su MIB, 2-pentilfuran, β -ciklocitral i β -jonon u različitim udelima, što je u skladu sa prethodnim nalazima analize isparljivih jedinjenja tehnikom GC-MSD. Takođe, prisustvo geosmina nije detektovano ni u jednom uzorku ispitivanih cijanobakterijskih sojeva.



a)

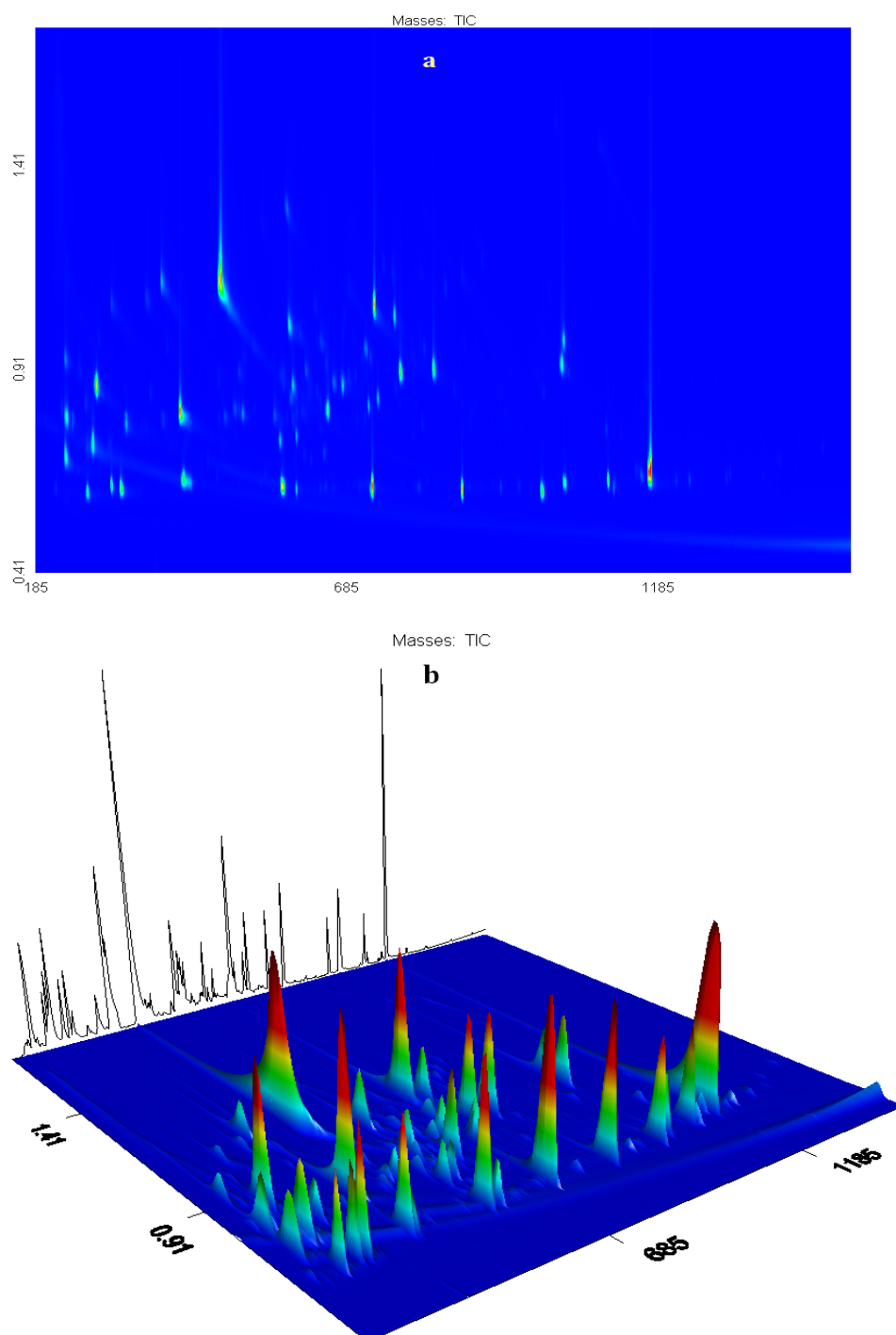


b)

Slika 4.6. PCA; a) Projekcija promenljivih na faktorijalnoj ravni (lakoisparjiva jedinjenja); b) projekcija uzoraka na faktorijalnoj ravni

Uočene razlike u rezultatima analize lakoisparljivih jedinjenja ovom tehnikom u odnosu na analizu pomoću Headspace GC-MSD tehnike ogledaju se u značajno većem broju i višem udelu polarnih jedinjenja (alkoholi, aldehidi, ketoni) detektovanih pomoću SPME GC×GC-TOFMS, što je uslovalo i razlike u relativnim udelima jedinjenja u hromatogramima. Ovo se može objasniti većom sposobnosti SPME vlakna da adsorbuje polarnija i teže isparljiva jedinjenja pri nižim temperaturama u odnosu na klasičnu Headspace tehniku. Takođe, efikasnije razdvajanje hromatografskih pikova pomoću GC×GC tehnike omogućava detekciju jedinjenja koja nisu mogla biti razdvojena pomoću klasične jednodimenzionalne GC.

Na slici 4.7. prikazani su dvodimenzionalni i trodimenzionalni hromatogrami (GC×GC-TOFMS) uzorka *Spirulina* S2. Oni predstavljaju ukupne jonske hromatograme (eng. Total Ion Chromatogram, TIC) u kojima dve ose predstavljaju retencionna vremena na primarnoj i sekundarnoj (ortogonalnoj) koloni. Ovakav način hromatografskog razdvajanja ima prednost u odnosu na klasičnu hromatografiju na jednoj koloni u tome što zahvaljujući različitim polarnostima dveju kolona omogućuje potpuno hromatografsko razdvajanje mnogih komponenti čiji bi se pikovi preklapili upotrebom samo jedne kolone određene polarnosti, naročito ukoliko je jedna od komponenti u znatno nižoj koncentraciji. Na ovaj način se, osim efikasnijeg hromatografskog razdvajanja, postiže i poboljšanje osetljivosti i snižava granica detekcije za analite od interesa. Dok u trodimenzionalnom hromatogramu intenzitet pojedinih pikova odgovara njihovoj zapremini, u dvodimenzionalnom prikazu nije moguće direktno odrediti tačan intenzitet pikova, iako njihova boja daje indikativnu vrednost njihovog intenziteta (Leco Application note No. 203-821-428, 2012; Leco Application note No. 203-821-490, 2015).



Slika 4.7. Dvodimenzionalni (a) i trodimenzionalni (b) prikaz GCxGC-TOFMS hromatograma uzorka *Spirulina S2*

4.2. Ekstrakcija i hemijska karakterizacija ekstrakata

Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja veoma je važan korak u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, a klasičan pristup ekstrakciji karotenoidnih jedinjenja i hlorofila podrazumeva postupke kao što su maceracija, delovanje ultrazvuka i ekstrakcija metodom po Soxhlet-u (Cha i sar., 2009). Ove tradicionalne tehnike poseduju brojne nedostatke, kao što su upotreba velikih količina toksičnih rastvarača, dugo vreme ekstrakcije, niska selektivnost, kao i suvišna izloženost ekstrakata svetlosti i vazduhu. Sa druge strane, ekstrakcija rastvaračima pod povišenim pritiskom (PLE/ASE) poseduje brojne prednosti u odnosu na navedene klasične metode ekstrakcije koje se ogledaju u visokoj efikasnosti i kraćem vremenu ekstrakcije, manjoj potrošnji rastvarača, kao i mogućnosti da se koriste sistemi manje škodljivih rastvarača (Careri, 2001; Cha i sar., 2009). Iz navedenih razloga, u ovom radu PLE je odabrana kao metoda za ekstrakciju ispitivanih sojeva cijanobakterija.

Prema dostupnim literaturnim podacima (Herrero i sar., 2005; Santoyo i sar., 2006, Herrero i sar., 2006) etanol predstavlja ekološki pogodan rastvarač za ekstrakciju antioksidanata primenom PLE, jer poseduje sposobnost ekstrakcije jedinjenja vrlo širokog opsega polarnosti iz biomase cijanobakterija, dok heksanski i perol-etarski ekstrakti pokazuju nešto nižu antioksidativnu aktivnost.

Odabir rastvarača za ekstrakciju u ovom radu izvršen je na bazi preliminarnog eksperimenta kod koga je testirana ekstrakciona sposobnost vode, acetone, metanola i n-heksana u cilju dobijanje ekstrakta najbogatijeg pigmentima i antioksidantima (DPPH• test) na odabranom soju cijanobakterija. Preliminarni rezultati su pokazali da je metanolni ekstrakt najbogatiji antioksidantima, potom sledi heksanski, acetonski i na kraju vodeni ekstrakt. Kako je sa druge strane heksanski sloj bio najbogatiji u pogledu sadržaja β -karotena odlučili smo se na sekvencijalnu ekstrakciju (najpre ekstrakcija heksanom, a potom sistemom metanol/voda). Umesto, po literaturi preporučenog ekstragenta etanola, sistem metanol/voda je odabran jer se pretpostavilo da će povećanje polarnosti ekstrakcionog sredstva omogućiti potpuniju ekstrakciju Chl a i fikobiliproteina u drugoj fazi ekstrakcionog postupka.

4.2.1. Sastav i sadržaj proteinskih pigmenata

Poznato je da cijanobakterije poseduju fikobilizome, koji predstavljaju komplekse proteina i hromofornih grupa i igraju bitnu ulogu u procesu fotosinteze. U sastav fikobilizoma ulaze tri osnovne grupe fikobiliproteina: fikoeritrin (PE), fikocijanin (PC) i alofikocijanin (APC). PC je vezan za centralni deo fikobilizoma i predstavlja glavni fikobiliprotein u mnogim

vrstama cijanobakterija (Huang i sar., 2007). Hlorofil a (Chl a) je glavni fotosintetički pigment u fotoautotrofnim mikroorganizmima i igra centralnu ulogu u procesu fotosinteze. Iz ugla prehrambene primene cijanobakterija, njihovi proteinski pigmenti mogu imati višestruku ulogu. PC se u industriji hrane koristi kao prehrambena plava boja za pojedine proizvode, a poznato je da može imati i pozitivan uticaj na održivost pojedinih prehrambenih proizvoda (Kovač i sar., 2013; Borowitzka, 2013). Takođe, proteinski pigmenti iz cijanobakterija, a naročito PC, pokazali su brojne pozitivne efekte na zdravlje ljudi i životinja koje se ogleda u antihiperlipidemijskom, hepatoprotektivnom, cerebroprotektivnom i antioksidativnom delovanju (Riss i sar., 2007; Ravi i sar., 2010; De Hesus Raposo i sar., 2015). Iz navedenih razloga, određivanje sadržaja navedenih proteinskih pigmenata u ekstraktima ispitivanih sojeva cijanobakterija je od velike važnosti za njihovu karakterizaciju. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja proteinskih pigmenata u metanolno/vodenim ekstraktima prikazani su u Tabeli 4.6.

Tabela 4.6. Sadržaj proteinskih pigmenata u ispitivanim sojevima cijanobakterija (vodeno/metanolni ekstrakti)

Pigment	Chl a (µg/g)	PC (mg/g)	APC (mg/g)	PE (mg/g)
Soj				
S1	3094 ± 7,02 ^j	0,68 ± 0,03 ^f	4,04 ± 0,06 ^g	2,64 ± 0,05 ⁱ
S2	486 ± 3,57 ^d	0,5 ± 0,01 ^c	0,48 ± 0,02 ^b	0,27 ± 0,02 ^e
2S7B+N	146 ± 2,30 ^a	0,26 ± 0,01 ^a	0,23 ± 0,02 ^a	0,21 ± 0,02 ^d
2S7B-N	2437 ± 4,42 ⁱ	5,18 ± 0,09 ^h	0,72 ± 0,03 ^c	0,02 ± 0,01 ^b
2S9B+N	167 ± 1,39 ^b	0,02 ± 0,01 ^d	0,79 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,03 ^a
2S9B-N	981 ± 4,51 ^h	0,33 ± 0,01 ^b	2,52 ± 0,05 ^f	0,52 ± 0,03 ^h
Č2+N	604 ± 4,04 ^f	0,52 ± 0,02 ^c	1,09 ± 0,01 ^e	0,42 ± 0,01 ^f
Č2-N	597 ± 3,41 ^e	1,08 ± 0,01 ^g	0,25 ± 0,01 ^a	0,5 ± 0,03 ^g
Č5+N	257 ± 4,05 ^c	0,12 ± 0,02 ^e	0,49 ± 0,02 ^b	0,11 ± 0,01 ^c
Č5-N	849 ± 3,10 ^g	0,29 ± 0,02 ^{ab}	0,83 ± 0,02 ^d	0,15 ± 0,02 ^a

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u koloni se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$).

Sadržaj Chl a u ispitivanim uzorcima kretao se od 146±2,30 do 3094±7,02 µg/g. Uzorci roda *Spirulina* pokazali su veliku razliku u sadržaju Chl a (3094±7,02 µg/g u S1 i 486±3,57 µg/g u S2). Soj S1 pokazao je više vrednosti i ostalih određenih pigmenata u odnosu na S2, gde je najveća razlika bila u sadržaju PE, a najmanja razlika je uočena u sadržaju PC. Među ispitivanim sojevima roda *Nostoc*, najviši sadržaj Chl a je posedovao uzorak 2S7B-N (2437±4,42 µg/g), koji je takođe pokazao i najviši sadržaj PC od svih ispitivanih sojeva (5,18±0,09 mg/g). U uzorku 2S9B-N uočen je najviši sadržaj APC od svih ispitivanih sojeva (2,52±0,05 mg/g) i najviši sadržaj PE (0,52±0,03 mg/g) od sojeva roda *Nostoc*. Od

ispitivanih sojeva *Anabaena*, uzorak Č5-N je posedovao najviši sadržaj Chl a ($849 \pm 3,10$ $\mu\text{g/g}$), sadržaj PC i PE je bio najviši u uzorku Č2-N ($1,08 \pm 0,01$ mg/g i $0,5 \pm 0,03$ mg/g, respektivno), dok je uzorak Č2+N posedovao najviši sadržaj APC ($1,09 \pm 0,01$ mg/g).

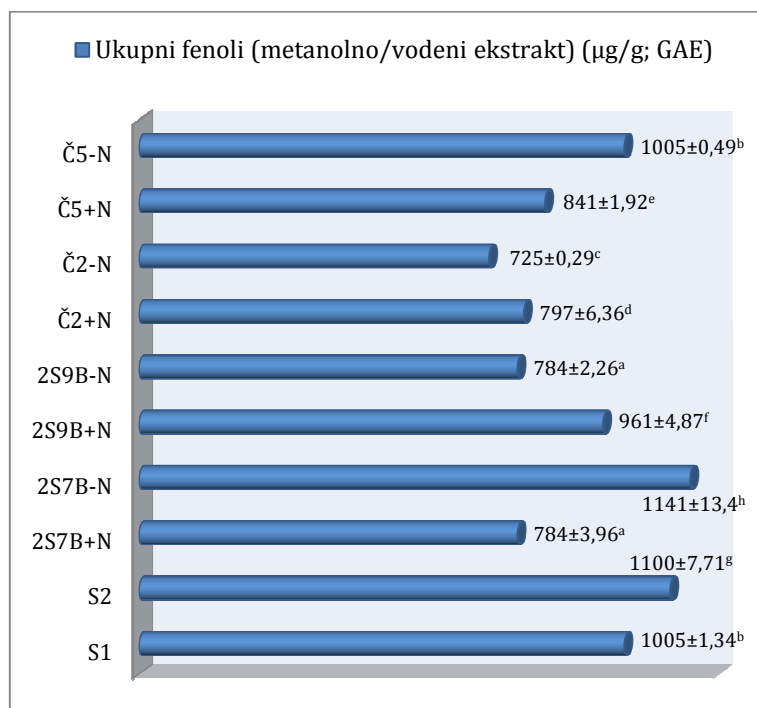
Ispitivanja uticaja različitih faktora na sastav fikobiliproteina je od velike važnosti za razumevanje odgovora pojedinih cijanobakterija na promenu životnih uslova u cilju adaptacije i opstanka. Johnson i saradnici (2014) ispitivali su uticaj različitih faktora na produkciju fikobiliproteina u sojevima roda *Nostoc* i zaključili da dodatak azota u hranljivoj podlozi povoljno utiče na sadržaj ovih pigmenata, tj. da nedostatak azota rezultuje razgradnjom fikobiliproteina kod cijanobakterija i njihovim sniženim sadržajem. Dobijeni rezultati u našem radu u suprotnosti su sa navedenim zapažanjima u vezi ispitivanih sojeva roda *Nostoc*, obzirom na to da je sadržaj sva četiri određena pigmenta bio viši u uzorcima sojeva koji su gajeni bez dodatka azota, sa izuzetkom sadržaja PE u soju 2S7B ($0,21 \pm 0,02$ mg/g u 2S7B+N i $0,02 \pm 0,01$ mg/g u 2S7B-N). Simeunović i saradnici (2013) ispitivali su uticaj prisustva azota i nedostatka vode na sadržaj i sastav fikobiliproteina u sojevima roda *Nostoc* i *Anabaena*. Rezultati dobijeni u navedenom radu ukazali su na statistički značajne razlike u sadržaju PC i APC kod sojeva gajenih u prisustvu azota u odnosu na sojeve gajene bez prisustva azota, dok se sadržaj PE i ukupnih fikobilina nije statistički značajno razlikovao.

Obzirom na to da je poznato da je sadržaj fikobiliproteina u pojedinim vrstama i rodovima cijanobakterija daleko viši nego u rezultatima dobijenim ekstrakcijom u našem eksperimentu, zaključeno je da primenjena metoda ekstrakcije polarnim sistemom rastvarača nije bila adekvatna za ekstrakciju proteinskih pigmenata u poređenju sa klasičnim metodama ekstrakcije za ove molekule (Simeunović i sar., 2013; Banji i sar., 2013). Međutim, pošto je isti način ekstrakcije primenjen kod svih uzoraka, bilo je moguće sagledati njihove međusobne razlike u sadržaju ispitivanih komponenti.

4.2.2. Sadržaj ukupnih fenola u metanolno/vodenim ekstraktima

Poznato je da su jedinjenja iz klase biljnih fenola nosioci antioksidativne aktivnosti u višim biljkama (Mandić i sar., 2008; Čanadanović-Brunet i sar., 2009; Mišan i sar., 2011), te je stoga njihova analiza vršena u metanolno/vodenim ekstraktima.

Na slici 4.8. su prikazani rezultati određivanja sadržaja ukupnih fenola po FC metodi.



Slika 4.8. Sadržaj ukupnih fenola u metanolno/vodenim ekstraktima ispitivanih sojeva cijanobakterija (Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$))

U pogledu sadržaja ukupnih fenola dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Goiris i saradnika (2012) koji se odnose na sadržaj ukupnih fenola u odabranim sojevima mikroalgi. Dobijeni rezultati jasno ukazuju i na to da je sadržaj ukupnih fenola znatno niži u cijanobakterijama i mikroalgama nego u višim biljkama, što upućuje na zaključak da ova jedinjenja možda i nisu glavni nosioci antioksidativne aktivnosti kod ove vrste organizama.

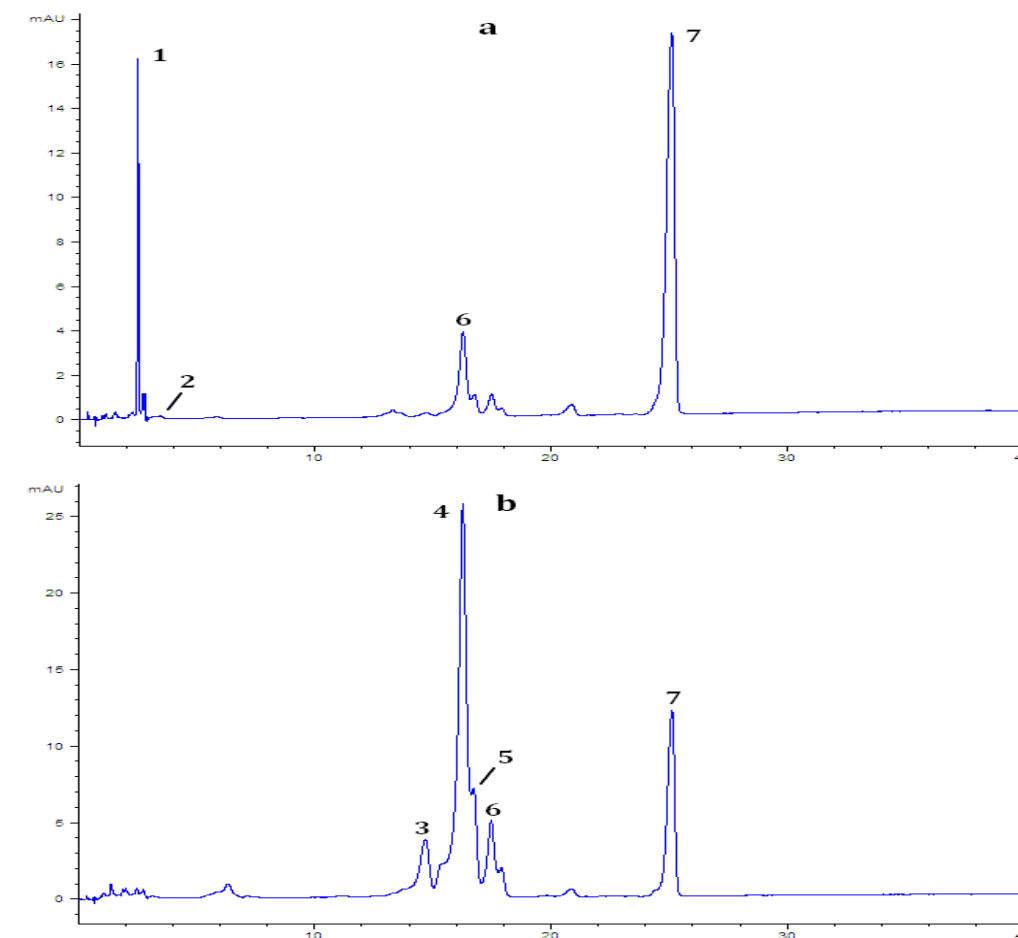
U cilju analize fenolnog sastava metanolno/vodenih ekstrakata oni su podvrgnuti HPLC DAD analizi po metodi Mišan i saradnika (2011), koja je optimizovana i validovana za analizu fenolnog sastava u lekovitom bilju. Dobijeni rezultati su pokazali da su u ekstraktima prisutni tragovi galne, protokathinske, cimetine i siringične kiseline, koje zbog svog niskog sadržaja nisu mogle biti kvantifikovane navedenom metodom. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima Klejdus i saradnika (2009) i Onofrejevaa i saradnika (2010) koji su primenom HPLC MS metode, specijalno razvijene i validovane za analizu fenolnih jedinjenja u mikroalgama i cijanobakterijama, utvrdili da su u njima najzastupljenija jedinjenja derivati benzojeve kiseline (*p*-hidroksibenzoeva, protokatehinskakiselina, galna i siringična) i cimetine kiseline (*p*-kumarinska, *o*-kumarinska, kafena, ferulna i sinapična), čiji je sadržaj izuzetno nizak i iskazan je u ng/g biomase.

4.2.3. HPLC analiza sastava i sadržaja karotenoida u heksanskim ekstraktima

U ovom radu, heksanski ekstrakti ispitivanih sojeva cijanobakterija podvrgnuti su analizi pomoću HPLC-DAD uređaja radi određivanja sastava i sadržaja karotenoidnih jedinjenja u uzorcima. Hromatogrami uzoraka S2 i Č5-N prikazani su na Slici 4.9.

Obzirom da, izuzev β -karotena, većina standardnih supstanci ispitivanih karotenoida nije bila dostupna, njihova identifikacija izvršena je na osnovu poređenja spektara identifikovanih jedinjenja u uzorku sa apsorpcionim spektrima poznatim iz literature (Roy i sar., 2011). Kvantifikacija karotenoida (izuzev β -karotena, za koji je postojala kalibraciona kriva) izvršena je relativno u odnosu na standard β -karotena, a sadržaj svih karotenoida je izražen kao mg karotenoida/g uzorka. U Tabeli 4.7. prikazani su rezultati određivanja sastava i sadržaja karotenoida u ispitivanim cijanobakterijskim uzorcima.

Za uzorke roda *Sirulina* karakteristično je bilo prisustvo zeaksantina, tragova različitih miksoksantofila (u soju S1), kao i veoma niskog sadržaja luteina, koji nisu bili prisutni u ostalim uzorcima. Pored zeaksantina, dominantni karotenoidi u sojevima roda *Spirulina* bili su i auroksantin (8,86 mg/g u S1 i 1,61 mg/g u S2) i β -karoten (5,82 mg/g u S1 i 7,58 mg/g u S2). Takođe, u oba soja utvrđeno je prisustvo β -kriptoksantina, ali u veoma niskoj količini, što je u skladu sa nalazima Careri i saradnika (2001). β -Kriptoksantin je bio prisutan u niskoj koncentraciji ili u tragovima i u svim ostalim ispitivanim sojevima, izuzev u uzorcima roda *Anabaena* Č2+N i Č5+N.



Slika 4.9. HPLC-DAD hromatogrami heksanskih ekstrakata uzoraka S2 (a) i Č2-N (b): 1- zeaksantin; 2- luteolin; 3- 3-hidroksiehinon; 4- kantaksantin; 5- ehinenon; 6- auroksantin; 7- β -karoten

U uzorcima roda *Nostoc*, dominantni karotenoidi bili su β -karoten, kantaksantin i ehinenon, a u soju 2S7B utvrđeno je prisustvo dva neidentifikovana karotenoida (na retencionim vremenima od 2,212 i 2,418 minuta) koja se nisu nalazila u ostalim ispitivanim sojevima, kao i prisustvo neidentifikovanog karotenoida na 9,028 minuta koji se nalazio u niskom sadržaju u svim ispitivanim uzorcima izuzev zoraka roda *Spirulina*. Sadržaj β -karotena, kantaksantina i ehinenona bilo je viši u uzorcima koji su gajeni bez prisustva azota, što je uticalo da ovi uzorci posедуju značajno viši ukupni sadržaj karotenoida u odnosu na uzorke koji su gajeni uz dodatak azota. Slično uzorcima roda *Nostoc*, i u uzorcima roda *Anabaena* dominantni karotenoidi bili su β -karoten, kantaksantin i ehinenon, što je u skladu sa nalazima Mochimaru i saradnika (2005). Sojevi *Anabaena* gajeni bez prisustva dodatog azota pokazali su, slično uzorcima roda *Nostoc*, povećanje sadržaja ukupnih karotenoida u odnosu na uzorke gajene u prisustvu dodatog azota.

Tabela 4.7. Sastav i sadržaj karotenoida u ispitivanim uzorcima cijanobakterija (izražen kao mg karotenoida/g uzorka)

RT (min)	Jedinjenje	λ_{\max} (nm) exp	λ_{\max} (nm) lit	S1	S2	2S7B+N	2S7B-N	2S9B+N	2S9B-N	Č2+N	Č2-N	Č5+N	Č5-N
1,910	Miksoksantofil	(454); 476; 510	(450); 478; 510	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,212	n.i.	430	478	n.d.	n.d.	tr.	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,399	Miksoksantofil	(446); 476; 508	(450); 478; 510	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,418	n.i.	462	478	n.d.	n.d.	tr.	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,620	Miksoksantofil	(446); 476; 504	(450); 478; 510	tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,732	n.i.	364; 450; 476		tr.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2,805	Zeaksantin	(428); 448; 478	(424), 450, 478	2,88	1,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4,604	Lutein	(436); 454; 480	(425), 448, 476	tr.	0,025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9,028	n.i.	474	478	n.d.	n.d.	tr.	tr.	tr.	2,2	0,03	0,03	tr.	0,55
13,958	3-Hidroksiehinenon	460	478	n.d.	n.d.	tr.	0,35	n.d.	tr.	0,09	tr.	tr.	2,40
18,974	Kantaksantin	462	478	tr.	n.d.	1,48	9,54	1,58	7,27	2,40	2,06	1,89	13,4
19,261	Ehinenon	468	460	n.d.	n.d.	0,47	2,33	0,59	2,60	0,45	0,49	0,53	2,08
19,750	Auroksantin	382; 414; 430	380, 401; 425	8,86	1,61	n.d.	0,82	n.d.	n.d.	0,34	n.d.	n.d.	2,63
23,431	β -Kriptoksantin	(422); 448; 476	(427), 452, 478	0,03	tr.	tr.	0,03	0,04	0,02	n.d.	0,06	n.d.	0,13
25,238	β -Karoten	(428); 450; 484	(425), 452, 478	5,82	7,58	3,24	6,73	2,25	2,60	2,76	4,55	5,58	5,15
Ukupni karotenoidi (mg/g)				17,6	10,3	5,19	19,8	4,46	14,7	6,07	7,19	8,00	26,4

RT - retenciono vreme; λ_{\max} (nm) exp i λ_{\max} (nm) lit – talasna dužina maksimuma apsorpcije utvrđena eksperimentalno i iz literaturnih podataka; n.d. – nije detektovano; tr. – u tragu (nije kvantifikovano); n.i. – nije identifikovano

Ovo povećanje bilo je znatno više izraženo u slučaju soja Č5 (26,4 mg/g u Č5+N u odnosu na 7,19 mg/g u Č2+N), u kom je sadržaj ukupnih karotenoida (u uslovima gajenja bez dodatka azota) bio najviši od svih ispitivanih sojeva.

Karotenoidi su lipofilna jedinjenja koja se po hemijskoj strukturi mogu podeliti na karotene i ksantofile. Karoteni su po strukturi ugljovodonici, dok ksantofili sadrže kiseoničnu funkciju u molekulu što ih čini više polarnim u odnosu na karotene. Karotenoidni pigmenti u fotoautotrofnim organizmima pružaju zaštitu fotosintetskog aparata na taj način što apsorbuju višak svetlosne energije. Oni imaju i aktivnu ulogu u fotosintezi na taj način što "čuvaju" prikupljenu svetlosnu energiju, a takođe učestvuju u stabilizaciji proteina fotosintetskog kompleksa. Karotenoidi vrše "kvenčing" singletnih formi kiseonika koji nastaj usled apsorpcije svetlosti u hromoforama i na taj način štite hlorofile, proteine, lipide i DNK od oksidativnih oštećenja (Ahmed i sar., 2014). Glavna karotenoidna jedinjenja u cijanobakterijama su β -karoten, njegovi hidroksil- i keto-derivati, kao i karotenoidni glikozidi. Prisustvo keto-karotenoida i glikozidnih derivata nije uobičajeno u fotosintetskim organizmima u prirodi osim u mikroalgama i cijanobakterijama. Miksol-glikozidi (miksoksanofili) su grupa karotenoidnih glikozida karakteristična za mnoge vrste cijanobakterija. Poznato je da sastav karotenoida u cijanobakterijama varira u zavisnosti faze i uslova rasta kao što su intenzitet svetlosti, prisustvo i oblik azota u podlozi, a takođe može varirati i u okviru različitih sojeva određene vrste (Takaichi i Mochimaru, 2007).

4.2.4. Antioksidativna aktivnost metanolno/vodenih i heksanskih ekstrakata

U ovom radu ispitan je antioksidativni kapacitet ekstrakata ispitivanih sojeva cijanobakterija prema DPPH•. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata prema DPPH•, prikazani su u Tabeli 4.8.

Ekstrakti uzoraka sojeva *Spirulina* su se značajno razlikovali u pogledu antioksidativnog kapaciteta prema DPPH•. Heksanski ekstrakt soja S1 je ispoljio značajno nižu IC₅₀ vrednost (viši antioksidativni potencijal) u odnosu na heksanski ekstrakt soja S1, dok je metanolno/vodeni ekstrakt soja S1 posedovao nižu IC₅₀ vrednost u odnosu na isti ekstrakt soja S2. Heksanski ekstrakt soja S1 je ispoljio značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na metanolno/vodeni ekstrakt, dok je kod soja S2 razlika u aktivnosti bila praktično zanemarljiva. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je heksanski ekstrakt soja S1 pokazao najvišu antioksidativnu aktivnost od ispitanih uzoraka roda *Spirulina* (a takođe i najvišu aktivnost od heksanskih ekstrakata svih ostalih ispitanih sojeva). Metanolno/vodeni ekstrakt soja S2 pokazao je značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na isti ekstrakt soja S1.

Tabela 4.8. Antioksidativna aktivnost (prema DPPH*), metanolno/vodenih i heksanskih ekstrakata ispitivanih sojeva cijanobakterija

Soj	DPPH* IC ₅₀ (mg/ml)	
	Heksan	Metanol/voda
S1	22,3 ± 0,37 ^a	110 ± 1,34 ^h
S2	61,5 ± 1,11 ^h	62,8 ± 2,36 ^b
2S7B+N	87,5 ± 1,71 ⁱ	31,7 ± 0,69 ^c
2S7B-N	47,8 ± 2,99 ^e	40,1 ± 0,88 ^d
2S9B+N	33,5 ± 1,97 ^c	56,4 ± 1,51 ^f
2S9B-N	25,4 ± 1,49 ^b	74,2 ± 2,56 ^g
Č2+N	72,4 ± 1,24 ⁱ	51,6 ± 1,62 ^e
Č2-N	43,6 ± 0,46 ^d	44,8 ± 0,29 ^a
Č5+N	55,4 ± 1,37 ^g	61,9 ± 2,31 ^b
Č5-N	49,5 ± 1,05 ^f	43,4 ± 1,02 ^a

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u koloni se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$).

U ispitivanim ekstraktima sojeva roda *Nostoc* uočene su razlike između sojeva 2S7B i 2S9B u antioksidativnoj aktivnosti. Metanolno/vodeni ekstrakti sojeva roda 2S7B su posedovali niže IC₅₀ vrednosti u odnosu na heksanske ekstrakte, dok su u slučaju sojeva roda 2S9B heksanski ekstrakti ispoljili značajno niže IC₅₀ vrednosti u odnosu na metanolno/vodene ekstrakte. Dodatak azota u hranljivu podlogu takođe je uslovio promene u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata sojeva *Nostoc*. U uzorcima sojeva 2S7B i 2S9B gajenim bez prisustva dodatog azota antioksidativna aktivnost heksanskih ekstrakata značajno je viša od uzoraka gajenih sa dodatkom azota, dok je u slučaju metanolno/vodenih ekstrakata aktivnost pokazala smanjene vrednosti. Dodatak azota u hranljivu podlogu uticao je na drugačiji način na sojeve roda *Anabaena*, gde je i u slučaju soja Č2 i u slučaju soja Č5 gajenje uz dodatak azota dovelo do smanjenja antioksidativne aktivnosti i heksanskih i metanolno/vodenih ekstrakata.

Prema brojnim literaturnim podacima sadržaj ukupnih fenola u višim biljkama dobro korelira sa antioksidativnom aktivnosti, što se može objasniti njihovim visokim sadržajem u biljnim tkivima (Mandić i sar., 2008; Čanadanović-Brunet i sar., 2009; Mišan i sar., 2011). Odsustvo statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) između antioksidativne aktivnosti vodeno/metanolnih ekstrakata i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u njima može da ukazuje na to da u metanolno/vodenim ekstraktima ispitivanih sojeva fenolna jedinjenja nisu od presudne važnosti za antioksidativnu aktivnost, već da je ova aktivnost verovatno posledica sinergije različitih polarnih jedinjenja. Moguće je da antioksidativnoj aktivnosti vodeno/metanolnih ekstrakata doprinosi i fikocijanin, za koga je pokazano da poseduje antioksidativnu aktivnost i da deluje kao „skevindžer“ slobodnih radikala, uključujući

alkoksil-, hidroksil- i peroksil-radikale (Li i sar., 2007; El-Baky i sar., 2009; Deng i Chow, 2010; Kovač i sar., 2013).

Takođe, iako je sadržaj karotenoidnih jedinjenja, a posebno β -karotena, u ispitivanim heksanskim ekstraktima visok, nije uočena njihova statistički značajna korelacija sa antioksidativnom aktivnošću heksanih ekstrakata ($p < 0,05$). Cijanobakterije predstavljaju bogat prirodni izvor jedinjenja koja mogu ispoljiti značajno antioksidativno delovanje *in vitro*, kao i u samim biološkim sistemima. Sa nutritivnog aspekta, pojedidni antioksidanti koji se unose putem hrane imaju dokazano povoljno fiziološko delovanje na organizam (Ravi i sar., 2010). Sa biotehnološkog aspekta, dodatak antioksidanata u prehrambene proizvode može povećati njihovu otpornost prema oksidativnim promenama i samim tim njihovu održivost.

Antioksidativno i antiinflamatorno delovanje cijanobakterija takođe je od izuzetnog značaja u proučavanju njihovog povoljnog delovanja na zdravlje. Delovanje fikocijanina u *in vivo* uslovima uključuje smanjenje produkcije nitrita, smanjenje ekspresije inducibilne sintaze azot monoksida (iNOS) i inhibiciju lipidne peroksidacije u mikrozomima hepatocita (Cherng i sar., 2007; Shih i sar., 2009; Manconia i sar., 2009). Kao molekul sa antiinflamatorim delovanjem, pokazano je da fikocijanin inhibira sintezu proinflamatornih citokina ko što su faktor nekroze tumora ($TNF\alpha$), suprimira ekspresiju ciklooksigenaze-2 (COX2) i snižava proizvodnju prostaglandina E(2) (Romay i sar., 2001; Ramirez i sar., 2002). β -Karoten je takođe jedan od biomolekula u cijanobakterijama za koji je poznato da poseduje *in vivo* antioksidativno i antiinflamatorno delovanje. U studiji koja se bavila poređenjem β -karotena, E-vitamina i azot(I)-oksida kao membranskih antioksidanata, zaključeno je da β -karoten ima izraženo zaštitno delovanje protiv lipidne peroksidacije izazvane singletnim formama kiseonika (Schafer i sar., 2002). Studije su takođe pokazale da β -karoten inhibira proizvodnju oksida azota i prostaglandina E(2) i smanjuje ekspresiju iNOS, COX2, $TNF\alpha$ i interleukina 1β (IL- 1β). Ova supresija inflamatornih medijatora verovatno je posledica inhibicije aktivacije nuklearnog faktora κB (NF- κB) putem blokade nukleane translokacije njegove p65 subjedinice (Bai i sar., 2005).

Dalja istraživanja su neophodna kako bi se u potpunosti objasnili mehanizmi antioksidativnog delovanja cijanobakterija u *in vitro* i *in vivo* uslovima.

4.3. Biološki ogled sa laboratorijskim pacovima

Hiperlipidemija se smatra jednim od najznačajnijih faktora rizika koji doprinosi raširenosti koronarnih srčanih oboljenja u svetu. Smatra se da su koronarna oboljenja srca, moždani insult i ateroskleroza jedni od primarnih uzročnika smrti u svetu (Sudha i sar., 2011). Hiperlipidemija se karakteriše povišenom koncentracijom serumskog holesterola (TC), triglicerida, lipoproteina niske gustine (LDL) i sniženom koncentracijom lipoproteina visoke gustine (HDL) (Đurendić Brenesel i sar., 2015). Ovakvi poremećaji lipidnog metabolizma povezuju se sa povećanim rizikom od nastanka aterosklerotskih promena u krvnim sudovima. Glavni cilj lečenja pacijenata sa hiperlipidemijom je smanjenje rizika od razvoja ishemijske bolesti srca, pojave i napredovanja ostalih kardiovaskularnih oboljenja i cerebrovaskularnih oboljenja (Davey i Pekkanen, 1992; Sudha i sar., 2011).

Sredinom 1980-tih, počela su intenzivna istraživanja u svrhu razvoja nutraceutika i funkcionalnih prehrambenih proizvoda u cilju prevencije i terapije određenih bolesti i poremećaja. Cijanobakterije roda *Spirulina* pokazale su se kao jedan od interesantnih nutraceutika zahvaljujući svojim mnogostrukim povoljnim delovanjima u slučaju pojedinih bolesti (Deng i Chow, 2010). Pokazano je da konzumacija *Spirulina* kao dodatka ishrani može imati povoljno dejstvo u prevenciji i terapiji različitih stanja kao što su hiperholesterolemija, hiperglikemija, pojedini upalni procesi, alergije, kancer, toksično dejstvo hemikalija i lekova, virusne infekcije, kardiovaskularne bolesti, dijabetes i drugi metabolički poremećaji (Khan i sar., 2006; Kulshreshtha i sar., 2008; Deng i Chow, 2010).

U ovom radu, soj cijanobakterije roda *Spirulina* izolovan na teritoriji Srbije (S2) odabran je za ispitivanje njegovog delovanja na hiperlipidemiju u biološkom ogledu sa laboratorijskim pacovima. Izbor soja je učinjen imajući u vidu gore navedena saznanja o povoljnom delovanju cijanobakterija ovog roda na zdravlje ljudi i životinja. Takođe, nakon prethodno navedene hemijske karakterizacije ispitivanih sojeva, zaključeno je da soj roda *Spirulina* S2 predstavlja veoma bogat i izbalansiran izvor nutrijenata i bioaktivnih metabolita kao što su proteini, masne kiseline (naročito gama-linolenska), esencijalne aminokiseline, fikocijanin i karotenoidna jedinjenja.

4.3.1. Biohemijski markeri hiperlipidemije

Koncentracije lipidnih markera u plazmi (holesterol, trigliceridi, LDL, HDL), enzimskih parametara funkcije jetre (AST i ALT) kao i indikativni parametri za ateroskleroze (indeks ateroskleroze, faktor ateroskleroze i stepen kardiovaskularnog rizika) nakon desete nedelje eksperimenta prikazani su u Tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Biohemijski markeri hiperlipidemije u plazmi laboratorijskih pacova

Grupa	I	II	III	IV	V
Holesterol (mmol/L)	1,71 ± 0,06 ^a	1,33 ± 0,05 ^a	3,95 ± 0,06 ^b	3,43 ± 0,07 ^b	3,33 ± 0,08 ^b
Trigliceridi (mmol/L)	1,45 ± 0,04 ^b	1,61 ± 0,05 ^b	1,07 ± 0,05 ^{ab}	0,86 ± 0,06 ^a	0,78 ± 0,03 ^a
HDL (mmol/L)	0,93 ± 0,04 ^b	1,09 ± 0,06 ^{ab}	1,14 ± 0,09 ^a	1,23 ± 0,06 ^a	1,23 ± 0,04 ^a
LDL (mmol/L)	0,11 ± 0,03 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	3,22 ± 0,08 ^c	2,82 ± 0,08 ^{bc}	2,39 ± 0,06 ^b
Indeks ateroskleroze (Hol-HDL)/HDL	0,77 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,02 ^a	2,49 ± 0,04 ^c	1,80 ± 0,08 ^{bc}	1,64 ± 0,06 ^b
Faktor ateroskleroze LDL/HDL	0,12 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,02 ^a	2,83 ± 0,07 ^d	2,30 ± 0,06 ^c	1,89 ± 0,05 ^b
Stepen kardiovaskularnog rizika (Hol/HDL)	1,78 ± 0,05 ^a	1,22 ± 0,05 ^a	3,49 ± 0,11 ^c	2,80 ± 0,09 ^{bc}	2,64 ± 0,07 ^b
AST (IU/L)	132 ± 8,61 ^c	144 ± 3,72 ^{ab}	152 ± 4,07 ^a	139 ± 3,67 ^{bc}	133 ± 5,37 ^c
ALT (IU/L)	44,6 ± 4,34 ^b	45,7 ± 6,68 ^b	55,0 ± 5,21 ^a	48,3 ± 2,81 ^{ab}	50,0 ± 3,55 ^{ab}

Brojevi označeni različitim slovima (a, b) u koloni se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$)

Nakon desete nedelje eksperimentalnog režima ishrane, može se uočiti da je koncentracija ukupnog holesterola značajno povišena u grupama pacova hranjenih aterogenom dijetom. U slučaju III grupe, koncentracija holesterola je viša za 130% u odnosu na kontrolnu grupu I. Iako razlike u koncentraciji holesterola između III, IV i V grupe nisu statistički značajne, može se uočiti sniženje koncentracije holesterola u grupama koje su pored aterogene dijetе dobijale *Spirulina* u ishrani (15,2% za grupu IV i 18,6% za grupu V) u odnosu na kontrolnu aterogenu grupu III. Iako koncentracija triglicerida u grupi III nije bila značajno različita u odnosu na kontrolnu grupu, u grupama IV i V uočava se značajno sniženje koncentracije triglicerida, kako u odnosu na III grupu (24,4% za grupu IV i 37,2% za grupu V), tako i u odnosu na kontrolne grupe I i II koje nisu dobijale aterogenu dijetu. Iako se koncentracija HDL čestica u plazmi sve tri grupe koje su dobijale aterogenu dijetu nije statistički značajno razlikovala, može se uočiti određen porast koncentracije HDL u grupama koje su dobijale *Spirulina* u ishrani (7,9% i za grupu IV i V) u odnosu na grupu III. LDL čestice su u grupi III pokazale veliki porast koncentracije u odnosu na kontrolne grupe I i II (za 29 i 27 puta, respektivno), a grupe IV i V koje su dobijale aterogenu dijetu sa *Spirulina* pokazale su značajno niže koncentracije LDL holesterola u odnosu na III grupu (14,2% za grupu IV i 34,7% za grupu V). Grupa III koja je dobijala aterogenu dijetu pokazuje značajno povećanje indeksa ateroskleroze, faktora ateroskleroze i stepena kardiovaskularnog rizika u odnosu na kontrolne grupe I i II koje nisu dobijale aterogenu dijetu. Grupe IV i V pokazale su značajno sniženje svih navedenih markera u odnosu na grupu III: za indeks ateroskleroze 38,3% i 51,8 (IV i V grupa, respektivno), za faktor ateroskleroze 23,0% i 49,7% (IV i V

grupa, respektivno) i za stepen kardiovaskularnog rizika 24,6% i 32,2% (IV i V grupa, respektivno).

Alanin transaminaza (ALT) i aspartat transaminaza (AST) su važni parametri čija promena može da ukaže na poremećaje funkcije uzrokovane različitim etiološkim činilacima (trovanje, alkoholizam i dr.), a njihova povišena koncentracija u serumu takođe je indikator masne infiltracije jetre izazvane poremećajima lipidnog statusa (Sharma, 2013). Koncentracija AST u plazmi III grupe značajno je povišena (15,2%) u odnosu na kontrolnu grupu I, dok se u grupama IV i V uočava sniženje u odnosu na grupu III (9,9% za grupu IV i 14,5% za grupu V). U slučaju ALT, uočen je sličan trend umerenog porasta koncentracije u plazmi grupe III (25%) u odnosu na kontrolnu grupu, dok je u grupama IV i V došlo do sniženja koncentracije AST u odnosu na III grupu (13,9% za grupu IV i 10% za grupu V). Dobijeni rezultati su uporedivi sa nalazima Đurendić Brenesel i saradnika (2015) koji su ispitivali antihiperlipidemijski efekat biljne mešavine „Vitalplant“ na laboratorijske pacove, s tom razlikom što u pomenutom radu nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji triglicerida i AST između grupa III, IV i V.

V grupa laboratorijskih pacova je do konstatacije pojave hiperlipidemije (peta nedelja) dobijala istu aterogenu ishranu kao i III grupa, a zatim je do kraja eksperimenta dobijala *Spirulina* uz aterogenu dijetu (kao i grupa IV). U ovoj grupi, uočen je značajno veći stepen sniženja ukupnog holesterola, triglicerida, LDL čestica i svih posmatranih markere hiperlipidemije (izuzev HDL čestica) u odnosu na IV grupu (koja je od početka eksperimenta dobijala *Spirulina* uz aterogenu dijetu), što ukazuje na to da je uočeni antihiperlipidemijski efekat *Spirulina* izraženiji ukoliko se ona doda ishrani kod subjekata kod kojih već postoji izražena hiperlipidemija. Navedeni efekat može se objasniti prethodnim nalazima (Lairon, 1996; Đurendić Brenesel i sar., 2015) da dodatak pojedinih jedinjenja sa antihiperlipidnim delovanjem u hranu ima izraženiji efekat kod hiperlipidemičnih subjekata u odnosu na subjekte sa normalnim lipidnim statusom.

Antihiperlipidemijski efekat *Spirulina* pokazan je u brojnim studijama na eksperimentalnim životinjama kao i u kliničkim studijama sprovedenim na zdravim ili individuama sa hiperlipidemijskim poremećajima. U studiji sprovedenoj od strane Colla i saradnika (2008), ispitan je efekat suplementacije *Spirulina* (0,5 g/dan) na zečeve kod kojih je hiperlipidemija izazvana dijetom bogatom holesterolom u trajanju od 30 i 60 dana. Kao efekat suplementacije *Spirulina* došlo je do smanjenja nivoa ukupnog serumskog holesterola za 49%, dok je nivo LDL umanjen za 25%. Suplementacija nije pokazala značajniji uticaj na nivo triglicerida u serumu. U pred- i postkliničkoj studiji na zdravih 36 dobrovoljaca (Torres-Duran i sar. 2007), konzumacija *Spirulina* u količini od 4,5 g dnevno tokom 6 nedelja dovela je do sniženja nivoa ukupnog holesterola i triglicerida u serumu za 10% i 28%, respektivno. Analiza serumskih lipoproteina pokazala je značajno sniženje nivoa LDL čestica, kao i povećanje nivoa HDL čestica za 15%. Takođe, sistolni i dijastolni pritisak je

pokazao značajno sniženje i kod muških i kod ženskih učesnika studije. Iako je antihiperlipidemijski efekat *Spirulina* pokazan u brojnim studijama, tačan mehanizam ovog delovanja i dalje nije u potpunosti razjašnjen. U kliničkoj studiji koju su sprovedi Nagaoka i saradnici (2005) pokazano je da koncentrat *Spirulina platensis* (SPC) prilikom konzumacije ispoljava efekat vezivanja metabolita holesterola, kao i smanjenje rastvorljivosti holesterola u crevu. Ishrana pacova sa SPC dovela je do povećane fekalne ekskrecije holesterola i žučnih kiselina, što je dovelo do zaključka da je upravo ova pojava jedan od potencijalnih mehanizama hipoholesterolemijskog delovanja SPC. Tokom istog eksperimenta (Nagaoka i sar., 2005), autori su takođe ispitali delovanje prečišćenog fikocijanina iz SPC na lipoproteinske frakcije kod eksperimentalnih pacova. Konzumacija fikocijanina dovela je do značajnog sniženja nivoa holesterola i aterogenog indeksa, uz povišenje nivoa HDL čestica. Ovi rezultati upućuju na to da je fikocijanin jedan od aktivnih biomolekula u cijanobakterijama roda *Spirulina* odgovoran za antihiperlipidemijsko delovanje.

4.3.2. Hemijski sastav fecesa, sadržaj holesterola i žučnih kiselina

Obzirom na prethodno navedena istraživanja o potencijalnim mehanizmima antihiperlipidemijskog delovanja cijanobakterija roda *Spirulina* (Nagaoka i sar., 2005; Colla i sar., 2008), pretpostavlja se da uočeni efekti mogu makar delom biti dovedeni u vezu sa modifikacijama metabolizma holesterola u organizmu, a kao jedan od mehanizama predložen je direktan uticaj cijanobakterijskih biomolekula na apsorpciju holesterola i žučnih kiselina u crevu. U cilju objašnjenja mehanizma uočenog antihiperlipidemijskog delovanja ispitivanog soja roda *Spirulina* (S1), sakupljeni uzorci fecesa laboratorijskih pacova podvrgnuti su ispitivanjima hemijskog sastava, kalorijske vrednosti, sadržaja holesterola i žučnih kiselina. Rezultati ispitivanja sadržaja proteina, lipida, holesterola i ukupne kalorijske vrednosti fecesa prikazani su u Tabeli 4.10.

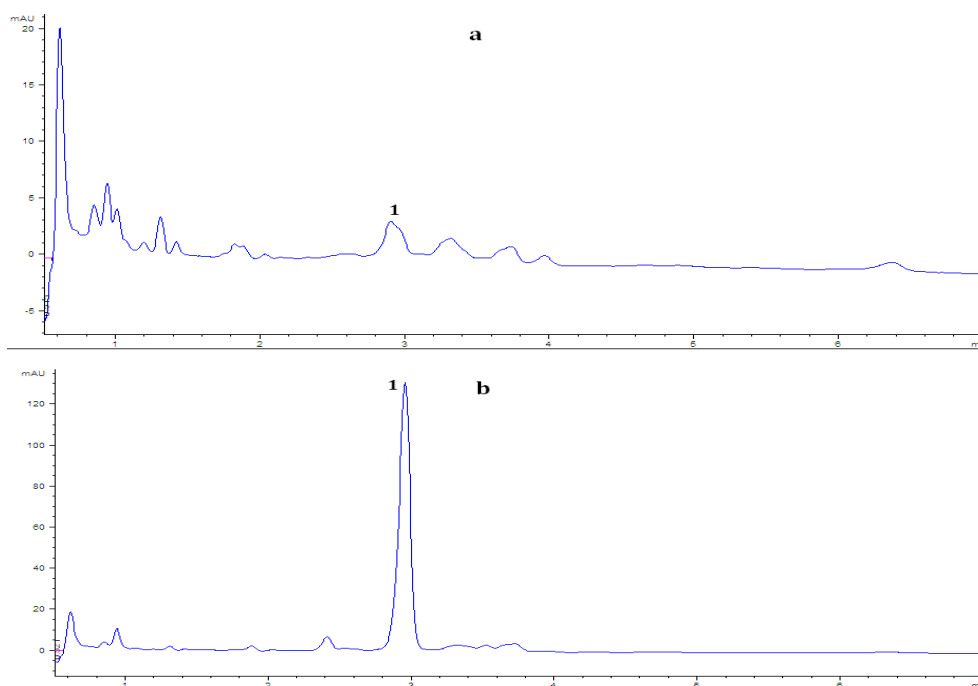
Tabela 4.10. Sadržaj proteina, lipida, holesterola i ukupna energetska vrednost ispitivanih uzoraka fecesa i hrane pacova

Grupa	Ukupna energetska vrednost (MJ/Kg)	Proteini (% w/w)	Lipidi (% w/w)	Holesterol (mg/g)
I	14,6 ± 0,04 ^a	19,7 ± 0,10 ^d	1,90 ± 0,07 ^b	0,43 ± 0,02 ^a
II	14,7 ± 0,00 ^b	22,6 ± 0,07 ^e	2,38 ± 0,03 ^c	0,50 ± 0,02 ^a
III	18,7 ± 0,00 ^d	15,5 ± 0,17 ^a	11,6 ± 0,04 ^a	14,7 ± 0,42 ^c
IV	18,5 ± 0,05 ^c	16,6 ± 0,01 ^b	11,5 ± 0,01 ^a	15,9 ± 0,51 ^d
V	19,2 ± 0,03 ^e	17,4 ± 0,04 ^c	13,2 ± 0,04 ^d	13,6 ± 0,06 ^b
Hrana				
K	16,1 ± 2,81	19,9 ± 0,07	1,84 ± 0,02	0,56 ± 0,01
AT	20,4 ± 3,64	16,5 ± 0,09	21,4 ± 0,03	13,3 ± 0,43

Brojevi označeni različitim slovima (a, b) u koloni se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$)

K – kontrolna hrana; AT – aterogena hrana

Energetska vrednost fecesa III, IV i V grupe bila je značajno viša u odnosu na kontrolne grupe I i II, što se može dovesti u vezu sa višom kalorijskom vrednošću aterogene dijete koje su te grupe dobijale, dok same razlike između grupa III, IV i V nisu bile velike. Sadržaj holesterola u grupama koje su hranjene aterogenom dijetom (III, IV i V) značajno je viši nego u kontrolnim grupama koje nisu dobijale aterogenu dijetu, što se može objasniti veoma visokim sadržajem holesterola u hrani koja je korišćena za aterogenu dijetu. Na Slici 4.10. prikazani su hromatogrami sadržaja holesterola II i III eksperimentalne grupe. Grupe koje su dobijale *Spirulina* uz aterogenu dijetu pokazale su značajnu razliku u odnosu na kontrolnu grupu III. U grupi IV sadržaj holesterola u fecesu bio je viši za 8,3%, dok je u grupi V sadržaj holesterola bio niži za 8,7%. Uprkos tome što su ove razlike bile statistički značajne ($p < 0,05$) realne razlike u sadržaju holesterola nisu bile velike, pa se može zaključiti da stimulacija fekalne ekskrecije holesterola u nepromenjenom obliku nije glavni faktor koji utiče na uočeno hipoholesterolemijsko delovanje ispitivanog soja *Spirulina*. Iako su razlike u sadržaju lipida i proteina u fecesu između grupa bile statistički značajne, zaključeno je da one nisu indikativne za procenu uticaja *Spirulina* na metabolizam laboratorijskih pacova, obzirom na to da je poznato da najveći deo mase fecesa čini bakterijska biomasa i produkti metabolizma (Mahipala i sar., 2009), što otežava realnu kvantitativnu procenu promene parametara kao što su proteini, lipidi i sl.



Slika 4.10. HPLC-DAD hromatogram sadržaja holesterola u uzorcima fecesa II (a) i III (b) eksperimentalne grupe: 1- holesterol

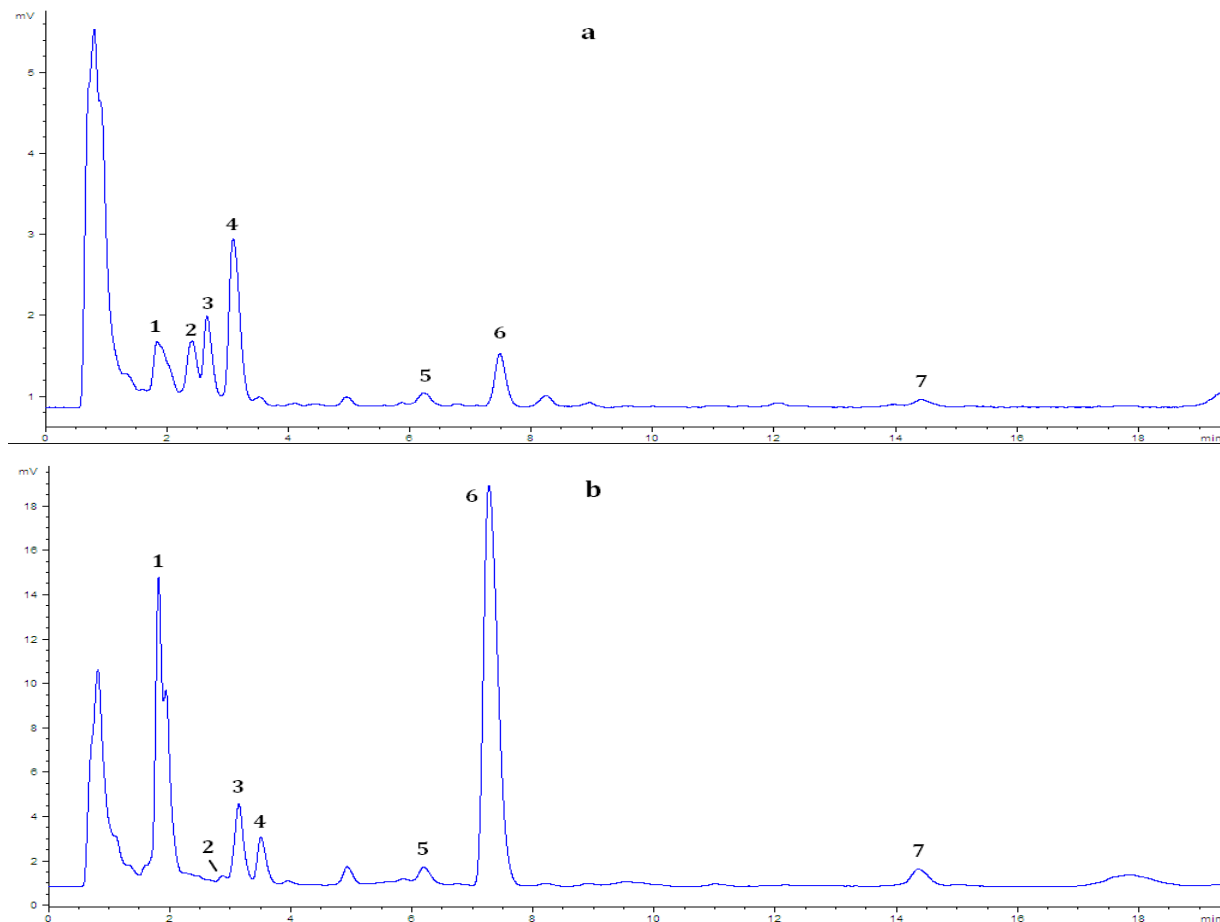
Sinteza žučnih kiselina u jetri je jedan od glavnih metaboličkih puteva za hemijsku transformaciju holesterola i predstavlja najvažniji način eliminacije viška holesterola kod životinja (Mukhopadhyay i Maitra, 2004). U cilju utvrđivanja dejstva dodatka *Spirulina* na enterohepatičnu cirkulaciju žučnih kiselina, u fecesu eksperimentalnih grupa laboratorijskih pacova određen je sadržaj β -muriholne, hioholne, henodeoksiholne, hiodeoksiholne, holne, deoksiholne i litoholne kiseline, kao i sadržaj ukupnih žučnih kiselina. Dobijeni rezultati prikazani su u Tabeli 4.11.

Tabela 4.11.: Sadržaj žučnih kiselina u fecesu eksperimentalnih grupa laboratorijskih pacova

Grupa	I	II	III	IV	V
β -Muriholna (mg/g)	0,82 ± 0,01 ^a	0,79 ± 0,02 ^a	4,32 ± 0,00 ^c	3,96 ± 0,05 ^b	4,70 ± 0,17 ^d
Hioholna (mg/g)	0,92 ± 0,00 ^d	0,78 ± 0,01 ^c	0,66 ± 0,04 ^b	0,60 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,01 ^{ab}
Henodeoksiholna (mg/g)	3,56 ± 0,02 ^c	3,67 ± 0,11 ^{ac}	3,74 ± 0,11 ^{ab}	3,82 ± 0,02 ^{ab}	3,89 ± 0,06 ^b
Hiodeoksiholna (mg/g)	1,22 ± 0,01 ^b	0,96 ± 0,01 ^a	1,87 ± 0,12 ^c	2,01 ± 0,03 ^d	2,17 ± 0,08 ^e
Holna (mg/g)	0,19 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,00 ^a	1,23 ± 0,04 ^b	2,24 ± 0,19 ^d	1,91 ± 0,08 ^c
Deoksiholna (mg/g)	0,66 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,03 ^a	13,04 ± 0,61 ^d	9,63 ± 0,50 ^b	11,4 ± 0,36 ^c
Litoholna (mg/g)	0,56 ± 0,01 ^a	0,54 ± 0,03 ^a	1,20 ± 0,03 ^d	0,81 ± 0,02 ^b	1,07 ± 0,03 ^c
Σ (μ mol/g)	20,1 ± 0,15 ^a	19,1 ± 0,51 ^a	65,9 ± 2,42 ^b	58,2 ± 2,09 ^c	65,1 ± 1,99 ^b

Brojevi označeni različitim slovima ^(a, b) u koloni se signifikantno razlikuju ($p < 0,05$)

Iz dobijenih rezultata vidi se da je u grupama koje su dobijale aterogenu dijetu (III, IV i V) sadržaj β -muriholne, hiodeoksiholne, holne, deoksiholne i litoholne kiseline značajno viši u odnosu na kontrolne grupe I i II. Sadržaj henodeoksiholne kiseline nije se značajno promenio između svih grupa, dok je sadržaj hioholne kiseline u eksperimentalnim grupama III, IV i V bio značajno niži u odnosu na kontrolne grupe I i II. U našem eksperimentu, hiperlipidemija kod eksperimentalnih pacova je izazvana mešavinom biljnog ulja, Na-holata i holesterola dodatom u standardnu hranu. Iz tog razloga, holna i deoksiholna kiselina (glavni produkt mikrobiološke razgradnje holne kiseline u crevu (Colleen i sar., 2007) u fecesu pacova potiču od Na-holata unetog dijetom i odgovorne su za značajne ($p < 0,05$) razlike u sadržaju ukupnih žučnih kiselina između grupa koje su dobijale aterogenu dijetu (III, IV i V) i kontrolnih grupa (I i II). Hromatogrami sadržaja žučnih kiselina u grupama I i III prikazani su na Slici 4.11.



Slika 4.11.: HPLC-ELSD hromatogrami sadržaja žučnih kiselina u uzorcima fecesa I (a) i III (b) eksperimentalne grupe: 1- β -muriholna kiselina, 2- hiokolna kiselina, 3- hiodeoksiholna kiselina, 4- holna kiselina, 5- henodeoksiholna kiselina, 6- deoksiholna kiselina, 7- litokolna kiselina

Holna kiselina je primarna žučna kiselina koja se sintetise u jetri od holesterola i transportuje u tanko crevo. Sekundarne žučne kiseline nastaju od primarnih delovanjem bakterijskih enzima u debelom crevu (Colleen i sar., 2007). Sadržaj hiodeoksiholne kiseline u uzorcima fecesa bio je značajno viši kod eksperimentalnih grupa pacova IV i V koji su pored aterogene ishrane dobijali *Spirulina* u odnosu na aterogenu grupu III (7,49% za grupu IV i 16,0% za grupu V). Sličan trend uočen je i u slučaju sadržaja holne kiseline, koji je u grupi IV bio viši za 82,1% i u grupi V za 55,3% u odnosu na aterogenu grupu III. Hiodeoksiholna kiselina je sekundarna žučna kiselina, koja kod pacova nastaje delovanjem crevnih bakterija iz izomera muriholne kiseline i litokolne kiseline (Eyssen i sar., 1999), dok je holna kiselina u ovom eksperimentu bila najvećim delom poreklom iz hrane. Interesantno je da je sadržaj deoksiholne kiseline, kao glavnog proizvoda transformacije

holne kiseline u crevu, bio značajno niži u fecesu IV i V grupe u odnosu na njen sadržaj u III grupi. Navedeni rezultati ukazuju na to da je dodatak *Spirulina* u aterogenu ishranu doveo do povećane ekskrecije unete holne kiseline u nepromenjenom obliku, kao i do povećane ekskrecije sekundarne hiodeoksiholne kiseline.

Smatra se da žučne kiseline imaju ulogu u razvoju raka debelog creva (Degirolamo i sar., 2011). Sadržaj deoksiholne kiseline je povišen u crevnom sadržaju ljudi kao odgovor na dijetu bogatu mastima (Reddy i sar., 1980), što je u skladu sa uočenim rezultatima u eksperimentu sa laboratorijskim pacovima. U populacijama u kojima je visoka incidenca raka debelog creva, fekalne koncentracije žučnih kiselina, a naročito deoksiholne kiseline (Cheah, 1990), su povišene što ukazuje na to da povećana izloženost debelog creva žučnim kiselinama može imati ulogu u razvoju kancera.

Kako ne postoje značajne razlike u sadržaju ukupnih žučnih kiselina unutar grupa koje su dobijale aterogenu dijetu (III, IV i V) i kontrolnih grupa (I i II), može se pretpostaviti da povećana ekskrecija žučnih kiselina ne predstavlja mehanizam antihiperlipidemijskog delovanja ispitivanog soja. Povećanje ekskrecije holne kiseline u nepromenjenom obliku, kao i povećanje ekskrecije pojedinih sekundarnih žučnih kiselina koje je uočeno u ovom eksperimentu mogu međutim ukazati na važnost uticaja određenih biomolekula iz cijanobakterija roda *Spirulina* na metabolizam holesterola i žučnih kiselina. Dalja istraživanja u ovom smeru neophodna su da bi se ovi uočeni efekti u potpunosti objasnili.

5. Zaključci

U ovom radu izvršeno je ispitivanje sojeva cijanobakterija koji pripadaju rodovima *Spirulina spp* (S1 i S2), *Nostoc spp* (2S7B i 2S9B) i *Anabaena spp* (Č2 i Č5) u cilju ocenjivanja njihovog potencijala u kreiranju proizvoda sa dodatkom vrednošću. Sojevi roda *Spirulina* sastojali su se iz komercijalnog soja *Spirulina* poreklom iz Japana (S1) i soja S2 koji je izolovan na teritoriji republike Srbije (Vojvodina). Sojevi roda *Nostoc* i *Anabaena* poreklom su iz različitih tipova zemljišta, takođe sa teritorije Republike Srbije. Uzorci sojeva *Spirulina* gajeni su u mineralnoj SOT podlozi (Soong, 1980), dok su *Nostoc* i *Anabaena* sojevi su gajeni u laboratorijskim uslovima u sintetičkoj mineralnoj podlozi BG-11, sa dodatkom azota (+N) i bez dodatka azota (-N) (Rippka i sar., 1979).

Izvršena je detaljna analiza hemijskog sastava ispitivanih sojeva cijanobakterija u cilju njihove karakterizacije i procene njihovog nutritivnog potencijala. Takođe, hemijski sastav sojeva *Nostoc* i *Anabaena* gajenih u prisustvu azota u hranljivoj podlozi (+N) upoređen je sa hemijskim sastavom istih sojeva gajenih bez prisustva dodatog azota (-N) u cilju utvrđivanja uticaja dodatka azota na njihov hemijski i nutritivni profil.

Razlika u sadržaju lipida između sojeva *Spirulina* (S1 i S2), iako statistički signifikantna, nije veoma izražena i može se dovesti u vezu sa sličnošću ovih sojeva. Sličnost navedenih sojeva takođe je uočljiva i ukoliko se posmatra njihov sadržaj ukupnih proteina, gde je razlika u sadržaju bila gotovo zanemarljiva. U slučaju ispitivanih uzoraka roda *Nostoc* i *Anabaena*, iako se rezultati sadržaja proteina i masti statistički značajno razlikuju kod svih sojeva, može se uočiti veoma izražen uticaj dodatka azota na hemijski sastav biomase. Dodatak azota imao je pozitivan uticaj na sadržaj proteina u ovim sojevima, a najveći porast sadržaja proteina pokazao je soj *Nostoc* 2S9B. Sa druge strane, dodatak azota negativno je uticao na produkciju masti kod svih sojeva, a najveća razlika uočava se kod soja *Anabaena* Č2. Ovakvi rezultati ukazuju na značajan uticaj azota u hranljivoj podlozi na metabolizam cijanobakterija, gde nepovoljni životni uslovi (niska koncentracija azota kao nutrijenta) dovode do smanjene sinteze proteina, a favorizuju sintezu lipida.

Ispitivanje sadržaja masnih kiselina u ispitivanim sojevima cijanobakterija pokazalo je da su sojevi roda *Spirulina* međusobno slični, iako se mogu uočiti pojedine razlike u sastavu i zastupljenosti pojedinih masnih kiselina. Soj S1 karakterisalo je prisustvo laurinske (C12:0) i margarinske (C17:0) masne kiseline, koje nisu bile prisutne u soju S2, dok je u soju S2 uočeno prisustvo dihomo-gama-linolenske (C20:3n6) kiseline koja nije bila prisutna ni u jednom drugom ispitivanom cijanobakterijskom soju. U oba ispitana soja *Spirulina*, sadržaj GLA je bio visok, što je u skladu sa nalazima drugih autora. Ova masna kiselina, zajedno sa C16:0 i C18:2n6c predstavlja dominantnu masnu kiselinu u masnokiselinskom profilu vrsta *Spirulina*. Sastav masnih kiselina u sojevima roda *Nostoc* i *Anabaena* karakterisao je viši

prosečan sadržaj UFA kao i niži sadržaj SFA u odnosu na sojeve *Spirulina*. Najznačajnija razlika u masnokiselinskom sastavu ogledala se u visokom udelu ALA u svim ispitivanim sojevima, dok ova masna kiselina nije detektovana u uzorcima roda *Spirulina*. Palmitoleinska kiselina (C16:1) predstavljala je takođe jednu od dominantnih masnih kiselina u *Nostoc* i *Anabaena* sojevima i nalazila se u značajno višem udelu u ovim cijanobakterijama u odnosu na uzorke roda *Spirulina*. Dodatak azota u hranljivu podlogu uticao je na sastav masnih kiselina sojeva *Nostoc* i *Anabaena*. Iako su razlike statistički značajne, iz dobijenih rezultata može se uočiti da je dodatak azota generalno uticao na smanjenje udela polinezasićenih masnih kiselina i ukupnih nezasićenih masnih kiselina (PUFA i UFA), dok je udeo zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA i SFA) povećan kod sojeva gajenih bez dodatka azota. Jedini izuzetak od ovog trenda predstavljao je soj *Anabaena* Č5, kod kog je uočen pad udela zasićene palmitinske kiseline (C16:0), što je rezultovalo tim da odnosi ukupnih nezasićenih i zasićenih masnih kiselina nisu značajnije promenjeni.

Analiza aminokiselinskog sastava pokazala je da, iako se statistički razlikuju, uzorci *Spirulina* poseduju sličan aminokiselinski profil, pri čemu je sadržaj svih aminokiselina u uzorku S2 nešto niži nego u uzorku S1. U uzorcima roda *Spirulina* najzastupljenije aminokiseline bile su asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, arginin i leucin. Uzorci sojeva *Nostoc* 2S7B i 2S9B imali su sličan aminokiselinski sastav uzorcima *Anabaena* Č5, dok se uzorak Č2 značajno razlikovao po sadržaju aminokiselina od svih ispitivanih uzoraka u smislu relativno niskog sadržaja aminokiselina. U svim uzorcima detektovano je prisustvo svih esencijalnih aminokiselina (histidin, treonin, valin, metionin, triptofan, fenilalanin, izoleucin, leucin i lizin). Uzorci roda *Spirulina* pokazali su se kao izrazito bogati izvori esencijalnih aminokiselina, a naročito uzorak S1 koji je posedovao najviši sadržaj svih esencijalnih aminokiselina, osim triptofana (najviši sadržaj bio je u uzorku *Anabaena* Č2-N) i lizina (najviši sadržaj bio je u uzorku *Anabaena* Č5+N).

U pogledu sastava mineralnih materija, uočene su značajne razlike između sojeva *Spirulina* S1 i S2. Najveće uočene razlike bile su u sadržaju Cu, Mg i Na, dok razlike u sadržaju Zn i Mn nisu bile statistički značajne ($p < 0,05$). U ispitivanim sojevima *Nostoc* i *Anabaena* uočen je značajan uticaj dodatka azota u hranljivu podlogu na sadržaj pojedinih mineralnih materija u biomasi. Sadržaj svih mineralnih materija osim Na bio je niži u uzorcima sojeva koji su gajeni u prisustvu dodatog azota, sa izuzetkom sadržaja Cu u soju *Anabaena* Č5, gde je sadržaj ovog elementa bio neznatno niži u uzorku koji je gajen bez dodatog azota. Ovo može biti objašnjeno činjenicom da je podloga bez dodatka azota relativno siromašna Na jonima, dok dodatak azota u obliku NaNO_3 (u masenoj koncentraciji od 1,50 g/l) veoma povećava masenu koncentraciju ovog elementa tako da on postaje dominantan jon u rastvoru hranjive podloge. Takođe, u poređenju sa sojevima *Nostoc* i *Anabaena*, uočeno je da sojevi *Spirulina* imaju znatno niži sadržaj Cu, Zn, Mn, Mg i Ca. Obzirom na to da su

Spirulina sojevi gajeni u podlozi drugačijeg hemijskog sastava, to bi moglo objasniti razlike u određenom sadržaju mineralnih materija, ali u obzir se mora uzeti i potencijalna razlika u sposobnosti bioakumulacije pojedinih elemenata između navedenih sojeva.

Analiza hemijskog profila lakoisparljivih jedinjenja u ispitivnim uzorcima cijanobakterija izvršena je na dva načina: pomoću Headspace GC-MSD uređaja i pomoću SPME GC×GC-TOFMS uređaja. Dobijeni rezultati pokazuju da u ovim vrstama nerazgranati alkani (tetradekan, pentadekan, heksadekan, heptadekan) predstavljaju dominantnu grupu isparljivih jedinjenja. Mirisna jedinjenja 2-metil-izoborneol (MIB), β-ciklocitral i β-jonon, koja mogu imati bitan uticaj na organoleptička svojstva, detektovana su u svim ispitivanim uzorcima primenom obe tehnike. Prema našim saznanjima, do sada ne postoje izveštaji o prisustvu MIB u vrstama roda *Spirulina*. Takođe, jedinjenje geosmin koji je bitan činilac neprijatnog mirisa mnogih vrsta cijanobakterija nije detektovan ni u jednom ispitivanom uzorku primenom obe pomenute tehnike. Uočene razlike u rezultatima analize lakoisparljivih jedinjenja tehnikom SPME GC×GC-TOFMS u odnosu na analizu pomoću Headspace GC-MSD tehnike ogledaju se u značajno većem broju i višem udelu polarnih jedinjenja (alkoholi, aldehidi, ketoni) detektovanih pomoću SPME GC×GC-TOFMS, što je uslovalo i razlike u relativnim udelima jedinjenja u hromatogramima.

Osim cijanobakterijske biomase, izvršena je i hemijska karakterizacija ekstrakata (heksanski i metanol/voda) dobijenih ekstrakcijom ispitivanih sojeva pomoću uređaja za ubrzanu ekstrakciju rastvaračima (ASE) uređaja Dionex ASE 350. Ispitivanje sadržaja proteinskih pigmenata u metanolno-vodenim ekstraktima pokazalo je da su uzorci roda *Spirulina* ispoljili veliku razliku u sadržaju Chl a. Soj S2 pokazao je više vrednosti i ostalih određenih pigmenata u odnosu na S1, gde je najveća razlika bila u sadržaju PE, a najmanja razlika je uočena u sadržaju PC. Među ispitivanim sojevima roda *Nostoc*, najviši sadržaj Chl a je posedovao uzorak 2S7B-N, koji je takođe pokazao i najviši sadržaj PC od svih ispitivanih sojeva. U uzorku 2S9B-N uočen je najviši sadržaj APC od svih ispitivanih sojeva i najviši sadržaj PE od sojeva roda *Nostoc*. Od ispitivanih sojeva *Anabaena*, uzorak Č5-N je posedovao najviši sadržaj Chl a, sadržaj PC i PE je bio najviši u uzorku Č2-N, dok je uzorak Č2+N posedovao najviši sadržaj APC. Obzirom na to da je poznato da je sadržaj fikobiliproteina u pojedinim vrstama i rodovima cijanobakterija daleko viši nego u rezultatima dobijenim ekstrakcijom u našem eksperimentu, zaključeno je da primenjena metoda ekstrakcije polarnim sistemom rastvarača bila manje efikasna za ekstrakciju proteinskih pigmenata u poređenju sa klasičnim metodama ekstrakcije za ove molekule. Međutim, pošto je isti način ekstrakcije primenjen kod svih uzoraka, bilo je moguće sagledati njihove međusobne razlike u sadržaju ispitivanih komponenata.

U pogledu sadržaja ukupnih fenola dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora oji se odnose sadržaj ukupnih fenola u odabranim sojevima mikroalgi. Dobijeni rezultati jasno ukazuju i na to da je sadržaj ukupnih fenola znatno niži u cijanobakterijama

nego u višim biljkama, što upućuje na zaključak da ova jedinjenja možda i nisu glavni nosioci antioksidativne aktivnosti kod ove vrste organizama.

Heksanski ekstrakti ispitivanih sojeva cijanobakterija podvrgnuti su analizi pomoću HPLC-DAD uređaja radi određivanja sastava i sadržaja karotenoidnih jedinjenja u uzorcima. Za uzorke roda *Spirulina* karakteristično je bilo prisustvo zeaksantina, tragova različitih miksoksantofila (u soju S1), kao i veoma niskog sadržaja luteina, koji nisu bili prisutni u ostalim uzorcima. Pored zeaksantina, dominantni karotenoidi u sojevima roda *Spirulina* bili su i auroksantin i β -karoten. Takođe, u oba soja utvrđeno je prisustvo β -kriptoksantina, ali u veoma niskoj količini, što je u skladu sa nalazima Careri i saradnika (2001). β -Kriptoksantin je bio prisutan u niskoj koncentraciji ili u tragovima i u svim ostalim ispitivanim sojevima, izuzev u uzorcima roda *Anabaena* Č2+N i Č5+N. U uzorcima roda *Nostoc*, dominantni karotenoidi bili su β -karoten, kantaksantin i ehinenon, a u soju 2S7B utvrđeno je prisustvo dva neidentifikovana karotenoida koja se nisu nalazila u ostalim ispitivanim sojevima, kao i prisustvo neidentifikovanog karotenoida koji se nalazio u niskoj količini u svim ispitivanim uzorcima izuzev uzoraka roda *Spirulina*. Sadržaj β -karotena, kantaksantina i ehinenona bilo je viši u uzorcima koji su gajeni bez prisustva azota, što je uticalo da ovi uzorci poseduju značajno viši ukupni sadržaj karotenoida u odnosu na uzorke koji su gajeni uz dodatak azota. Slično uzorcima roda *Nostoc*, i u uzorcima roda *Anabaena* dominantni karotenoidi bili su β -karoten, kantaksantin i ehinenon, što je u skladu sa nalazima Mochimaru i saradnika (2005). Sojevi *Anabaena* gajeni bez prisustva dodatog azota pokazali su, slično uzorcima roda *Nostoc*, povećanje sadržaja ukupnih karotenoida u odnosu na uzorke gajene u prisustvu dodatog azota. Ovo povećanje bilo je znatno više izraženo u slučaju soja Č5, u kom je sadržaj ukupnih karotenoida (u uslovima gajenja bez dodatka azota) bio najviši od svih ispitivanih sojeva.

Ispitan je antioksidativni kapacitet heksanskih i metanolno/vodenih ekstrakata testiranih sojeva cijanobakterija prema DPPH[•]. Ekstrakti uzoraka sojeva *Spirulina* su se značajno razlikovali u pogledu antioksidativnog kapaciteta prema DPPH[•]. Heksanski ekstrakt soja S1 je ispoljio značajno nižu IC₅₀ vrednost (viši antioksidativni potencijal) u odnosu na heksanski ekstrakt soja S1, dok je metanolno/vodeni ekstrakt soja S1 posedovao nižu IC₅₀ vrednost u odnosu na isti ekstrakt soja S2. Heksanski ekstrakt soja S1 je ispoljio značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na metanolno/vodeni ekstrakt, dok je kod soja S2 razlika u aktivnosti bila praktično zanemarljiva. Iz dobijenih rezultata može se zaključiti da je heksanski ekstrakt soja S1 pokazao najvišu antioksidativnu aktivnost od ispitanih uzoraka roda *Spirulina* (a takođe i najvišu aktivnost od heksanskih ekstrakata svih ostalih ispitanih sojeva). Metanolno/vodeni ekstrakt soja S2 pokazao je značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na isti ekstrakt soja S1. U ispitivanim ekstraktima sojeva roda *Nostoc* uočene su razlike između sojeva 2S7B i 2S9B u antioksidativnoj aktivnosti. Metanolno/vodeni ekstrakti sojeva roda 2S7B su posedovali niže IC₅₀ vrednosti

u odnosu na heksanske ekstrakte, dok su u slučaju sojeva roda 2S9B heksanski ekstrakti ispoljili značajno niže IC₅₀ vrednosti u odnosu na metanolno/vodene ekstrakte. Dodatak azota u hranljivu podlogu takođe je uslovio promene u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata sojeva *Nostoc*. U uzorcima sojeva 2S7B i 2S9B gajenim bez prisustva dodatog azota antioksidativna aktivnost heksanskih ekstrakata značajno je viša od uzoraka gajenih sa dodatkom azota, dok je u slučaju metanolno/vodenih ekstrakata aktivnost pokazala smanjene vrednosti. Dodatak azota u hranljivu podlogu uticao je na drugačiji način na sojeve roda *Anabaena*, gde je i u slučaju soja Č2 i u slučaju soja Č5 gajenje uz dodatak azota dovelo do smanjenja antioksidativne aktivnosti i heksanskih i metanolno/vodenih ekstrakata. Odsustvo statistički značajne korelacije ($p < 0,05$) između antioksidativne aktivnosti metanolno/vodenih ekstrakata i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u njima može da ukazuje na to da u metanolno/vodenim ekstraktima ispitivanih sojeva fenolna jedinjenja nisu od presudne važnosti za antioksidativnu aktivnost, već da je ova aktivnost verovatno posledica sinergije različitih polarnih jedinjenja. Moguće je da antioksidativnoj aktivnosti metanolno/vodenih ekstrakata doprinosi i fikocijanin, za koga je pokazano da poseduje antioksidativnu aktivnost i da deluje kao „skevindžer“ slobodnih radikala, uključujući alkoksil-, hidroksil- i peroksil-radikale (Li i sar., 2007; El-Baky i sar., 2009; Deng i Chow, 2010; Kovač i sar., 2013). Takođe, iako je sadržaj karotenoidnih jedinjenja, a posebno β -karotena, u ispitivanim heksanskim ekstraktima visok, nije uočena njihova statistički značajna korelacija sa antioksidativnom aktivnošću heksanskih ekstrakata ($p < 0,05$).

Osim hemijske karakterizacije sojeva i ekstrakata, u okviru ovog rada bio je izvršen i biološki ogled na laboratorijskim pacovima radi utvrđivanja delovanja odabranog cijanobakterijskog soja na hiperlipidemiju. Soj cijanobakterije roda *Spirulina* izolovan na teritoriji Srbije (S2) odabran je na osnovu poznatih literaturnih podataka o povoljnom delovanju cijanobakterija ovog roda na hiperlipidemiju, kao i na osnovu povoljnog hemijskog i nutritivnog sastava utvrđenog prethodnom hemijskom karakterizacijom.

Određene su koncentracije lipidnih markera u plazmi (holesterol, trigliceridi, LDL, HDL), enzimskih parametara funkcije jetre (AST i ALT) kao i indikativni parametri za aterosklerozu (indeks ateroskleroze, faktor ateroskleroze i stepen kardiovaskularnog rizika) kod laboratorijskih pacova podeljenih u kontrolne (I i II) i grupe koje su dobijale aterogenu dijetu bez (grupa III) ili sa dodatkom *Spirulina* (IV i V). Dodatak *Spirulina* grupama koje su dobijale aterogenu dijetu doveo je do značajnog sniženja koncentracije holesterola, LDL čestica i porasta HDL čestica u plazmi u odnosu na kontrolnu aterogenu grupu III. Koncentracije svih navedenih markera ateroskleroze (indeks ateroskleroze, faktor ateroskleroze i stepen kardiovaskularnog rizika) kao i markeri oštećenja funkcije jetre (AST i ALT) takođe su značajno snižene u grupama IV i V u odnosu na grupu III. U grupi V, uočen je značajno veći stepen sniženja ukupnog holesterola, triglicerida, LDL

čestica i svih posmatranih markere hiperlipidemije (izuzev HDL čestica) u odnosu na IV grupu (koja je od početka eksperimenta dobijala *Spirulina* uz aterogenu dijetu), što ukazuje na to da je uočeni antihiperlipidemijski efekat *Spirulina* izraženiji ukoliko se ona doda ishrani kod subjekata kod kojih već postoji izražena hiperlipidemija.

U cilju objašnjenja mehanizma uočenog antihiperlipidemijskog delovanja ispitivanog soja roda *Spirulina* (S1), sakupljeni uzorci fecesa laboratorijskih pacova podvrgnuti su ispitivanjima hemijskog sastava, ukupne energetske vrednosti, sadržaja holesterola i žučnih kiselina. Obzirom na to da razlike u sadržaju holesterola u fecesu III, IV i V grupe nisu bile velike, može se zaključiti da stimulacija fekalne ekskrecije holesterola u nepromenjenom obliku nije glavni faktor koji utiče na uočeno hipoholesterolemijsko delovanje ispitivanog soja *Spirulina*. U cilju utvrđivanja dejstva dodatka *Spirulina* na enterohepatičnu cirkulaciju žučnih kiselina, u fecesu eksperimentalnih grupa laboratorijskih pacova određen je sadržaj β -muriholne, hioholne, henodeoksiholne, hiodeoksiholne, holne, deoksiholne i litholne kiseline, kao i sadržaj ukupnih žučnih kiselina. Sadržaj hiodeoksiholne kiseline u uzorcima fecesa bio je značajno viši kod eksperimentalnih grupa pacova IV i V koji su pored aterogene ishrane dobijali *Spirulina* u odnosu na aterogenu grupu III. Sličan trend uočen je i u slučaju sadržaja holne kiseline, koji je u grupi IV bio viši za 82,11% i u grupi V za 55,28% u odnosu na aterogenu grupu III. Hiodeoksiholna kiselina je sekundarna žučna kiselina, koja kod pacova nastaje delovanjem crevnih bakterija iz izomera muriholne kiseline i litholne kiseline, dok je holna kiselina u ovom eksperimentu bila najvećim delom poreklom iz hrane. Interesantno je da je sadržaj deoksiholne kiseline, kao glavnog proizvoda transformacije holne kiseline u crevu, bio značajno niži u fecesu IV i V grupe u odnosu na njen sadržaj u III grupi. Navedeni rezultati ukazuju na to da je dodatak *Spirulina* u aterogenu ishranu doveo do povećane ekskrecije unete holne kiseline u nepromenjenom obliku, kao i do povećane ekskrecije sekundarne hiodeoksiholne kiseline. Kako ne postoje značajne razlike u sadržaju ukupnih žučnih kiselina unutar grupa koje su dobijale aterogenu dijetu (III, IV i V) i kontrolnih grupa (I i II), može se pretpostaviti da povećana ekskrecija žučnih kiselina ne predstavlja mehanizam antihiperlipidemijskog delovanja ispitivanog soja.

Konačno, na bazi hemijskog sastava ispitivanih sojeva cijanobakterija: visokog sadržaja proteina, izbalansiranog aminokiselinskog i masnokiselinskog sastava i visokog sadržaja karotenoida može se zaključiti da oni imaju potencijal kao sirovine za unapređenje nutritivnog sastava prehrambenih proizvoda. Dokazana antihiperlipidemijska aktivnost soja S2 dodatno ga čini atraktivnim za razvoj proizvoda sa dodatkom vrednošću namenjenih osobama sa poremećajem u metabolizmu lipida. Rezultati naših ispitivanja su pokazali i da se na hemijskih sastav pojedinih sojeva može uticati putem promene sastave hranljive podloge što svakako ostavlja prostora za buduća istraživanja. Sojevi cijanobakterija u ovom eksperimentu su odabrani na bazi preliminarnih rezultata koji su ukazali na njihovu nisku

toksičnost ili netoksičnost, ali pošto je poznato da pojedini sojevi cijanobakterija, pod specifičnim uslovima, mogu biti i producenti veoma toksičnih jedinjenja, dodatna ispitivanja njihove zdravstvene bezbednosti se moraju sprovesti pre komercijalne primene.

6. Literatura

- Abdel-Aty A., Ammar N., Abdel Ghafar H., Ali R. (2013), Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass, *Journal of Advanced Research*, 4, 367–374.
- Adams R. P. (1995), Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy, *Allured Publishing Corporation*, Carol Stream, Illinois, USA.
- Ahlgren G., Hyenstrand P. (2003), Nitrogen limitation effects of different nitrogen sources on nutritional quality of two freshwater organisms, *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae) and *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae), *Journal of Phycology*, 39(5), 906-917.
- Ahmed F., Fanning K., Netzel M., Turner W, Li Y., Schenk P. (2014), Profiling of carotenoids and antioxidant capacity of microalgae from subtropical coastal and brackish waters, *Food Chemistry*, 165, 300–306.
- Aljada A., Mohanty P., Ghanim H., Abdo T., Tripathy D., Chaudhuri A., Dandona P. (2004), Increase in intranuclear nuclear factor κ B and decrease in inhibitor κ B in mononuclear cells after a mixed meal: evidence for a proinflammatory effect, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 682–690.
- Alzamora, S. M., Salvatori, D., Tapia, S. M., Lopez-Malo, A., Welti-Chanes, J., & Fito, P. (2005), Novel functional foods from vegetable matrices impregnated with biologically active compounds, *Journal of Food Engineering*, 67, 205–214.
- Amano H., Kakinuma M., Coury D. A., Ohno H., Hara T. (2005), Effect of a seaweed mixture on serum lipid level and platelet aggregation in rats, *Fisheries Science*, 71(5), 1160–1166.
- Andrew R., Gale C. R., Walker B. R., Seckl J. R., Martyn C.N. (2002), Glucocorticoid metabolism and the metabolic syndrome: associations in an elderly cohort, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 110(6), 284–290.
- AOAC, Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists, 17th edn., Gaithersburg, MD, 2000, Method 992.23.
- Appel L. J., Brands M. W., Daniels S. R., Karanja N., Elmer P. J., Sacks F.M. (2006), Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association, *Hypertension*, 47(2), 296–308.

- Application note No. 203-821-428 (2012), Aroma Profile of Pet Food by GC-TOFMS and GCxGC-TOFMS, Leco corporation, Saint Joseph, Michigan USA.
- Application note No. 203-821-490 (2015), Improved Characterization of Perfumes with GCxGC-TOFMS, Leco Corporation, Saint Joseph, Michigan USA.
- Application notes for digestion Rev. 03_04 (2008), Milestone Microwave Laboratory Systems, USA.
- Bach A. C., Ingenbleek Y., Frey A. (1996), The usefulness of dietary mediumchain triglycerides in body weight control: fact of fancy?, *Journal of Lipid Research*, 37, 708–726.
- Bai S., Lee S., Na H., Ha K., Han J., Lee H., Kwon Y., Chung C., Kim Y., (2005), Beta-carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation, *Experimental and molecular medicine*, 37(4), 323.
- Balloni W., Tomaselli L., Giovannetti L., Margheri M. C. (1980), Biologia fondamentale del genere *Spirulina*, Prospettive della coltura di *Spirulinain Italia*, *Atti del Convegno Prospettive della coltura di Spirulinain Italia*, Roma: Consiglio Nazionale delle Ricerche, 49-85.
- Bandyopadhyay A., Stöckel J., Min H., Sherman L. A., Pakrasi H. B. (2010), High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions, *Nature Communications*, 1, 139.
- Banji D., Banji O., Pratusha G., Annamalai A. N. (2013), Investigation on the role of *Spirulina platensis* in ameliorating behavioural changes, thyroid dysfunction and oxidative stress in offspring of pregnant rats exposed to fluoride, *Food Chemistry*, 140, 321–331.
- Batista A. P., Raymundo A., Sousa I., Empis J. (2006), Rheological characterization of coloured oil in-water food emulsions with lutein and fycocyanin added to the oil and aqueous phases, *Food Hydrocolloids*, 20, 44-52.
- Bech-Larsen T., Scholderer J. (2007), Functional foods in Europe: Consumer research, market experiences and regulatory aspects, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 231–234.
- Becker E. W. (2007), Micro algae as a source of protein, *Biotechnology Advances*, 25(2), 207-210.
- Berry J. P., Gantar M., Perez M. H., Berry G., Noriega F.G. (2008), Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algaecides, herbicides and insecticides, *Marine Drugs*, 6, 117–46.

- Blaženčić J. (2007), *Sistematika algi*, NNK Internacional, Beograd, Srbija.
- Bocchi S., Malgioglio A. (2010), *Azolla-Anabaena* as a Biofertilizer for Rice Paddy Fields in the Po Valley, a Temperate Rice Area in Northern Italy, *International Journal of Agronomy*, 2010, ID 152158.
- Borowitzka M. (2013), High-value products from microalgae—their development and commercialisation, *Journal of Applied Phycoogy*, 25, 743–756.
- Briones A. M., Cat A. N., Callera G. E., Yogi A., Burger D., He Y., Corrêa J. W., Gagnon A. M., Gomez-Sanchez C. E., Gomez-Sanchez E. P., Sorisky A. (2012), Adipocytes Produce Aldosterone Through Calcineurin-Dependent Signaling Pathways Implications in Diabetes Mellitus–Associated Obesity and Vascular Dysfunction, *Hypertension*, 59(5), 1069-78.
- Burdock G. A., Carabin I. G., Griffiths J. C. (2006), The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries, *Toxicology*, 221(1), 17-27.
- Campanella L., Crescentini G., Avino P. (1999), Chemical composition and nutritional evaluation of some natural and commercial food products based on *Spirulina*, *Analisis*, 27(6), 533-540.
- Čanadanović-Brunet J. M., Četković G. S., Djilas S. M., Tumbas V. T., Savatović S. S., Mandić A. I., Markov, S. L., Cvetković D. D. (2009), Radical scavenging and antimicrobial activity of horsetail (*Equisetum arvense* L.) extracts, *International Journal of Food Science & Technology*, 44(2), 269-278.
- Careri M., Furlattini L., Mangia A., Musci M., Anklam E., Theobald A., von Holst C. (2001), Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: a chemometric approach, *Journal of Chromatography A*, 912, 61–71.
- Carlucci M. J., Scolano L. A., Damonte E. B. (1999), Inhibitory action of natural carrageenans on *Herpes simplex* virus infection of mouse astrocytes, *Chemotherapy*, 45, 429 – 436.
- Četković G., Stajčić S., Čanadanović-Brunet J., Đilas S., Vulić J., Mandić A., Četojević-Simin D. (2012), Valorisation of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste, *Food Chemistry*, 133, 938-945.
- Cha K. H., Lee H. J., Koo S. Y., Song D. G., Lee D. U., Pan C. H. (2009), Optimization of pressurized liquid extraction of carotenoids and chlorophylls from *Chlorella vulgaris*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 793-797.

- Cheah, P. Y. (1990), Hypotheses for the etiology of colorectal cancer--an overview, *Nutrition and Cancer-An International journal*, 14 (1), 5–13.
- Cherng S. C., Cheng S. N., Tarn A., Chou T. C. (2007), Anti-inflammatory activity of c-phycocyanin in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages, *Life Sciences*, 81, 1431–1435.
- Christaki E., Bonos E., Giannenas I., Florou-Paneri P. (2013), Functional properties of carotenoids originating from algae, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 5–11.
- Christi Y. (2007), Biodiesel from microalgae, *Biotechnology Advances*, 25, 294 – 306.
- Chrousos G. P. (2009), Stress and disorders of the stress system, *Nature Reviews Endocrinology*, 5(7), 374–381.
- Cohen Y., Jørgensen B. B., Revsbech N. P., Poplawski R. (1986), Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 51(2), 398–407.
- Colla L. M., Muccillo-Baisch A. L., Costa J. A. V. (2008), *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 405–411.
- Colla L. M., Reinehr C. O., Reichert C., Costa J. A. V. (2007), Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes, *Bioresource Technology*, 98, 1489–1493.
- Colleen S., Lieberman M., Marks D. B., Allan D. M. (2007), Marks' essential medical biochemistry, *Hagerstwon*, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Danesi E. D. G., Rangel Yagui C. de O., de Carvalho J. C. M., Sato S. (2002), An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*, *Biomass and Bioenergy*, 23(4), 261-269.
- Darmon N., Drewnowski A. (2008), Does social class predict diet quality?, *American Journal of Clinical Nutrition*, 87, 1107–1117.
- Davey G. S., Pekkanen J. (1992), Should there be a moratorium on the use of cholesterol lowering drugs?, *The British Medical Journal*, 304, 431-440.
- De Hesus Raposo M. F., De Morais A. M. M. B. (2015), Microalgae for the prevention of cardiovascular disease and stroke, *Life Sciences*, 125, 32-41.

- Degirolamo C., Modica S., Palasciano G., Moschetta A. (2011), Bile acids and colon cancer: Solving the puzzle with nuclear receptors, *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), 564–72.
- Delarue J., Couet C., Cohen R., Brehot J. F., Antoine J. M., Lamisse F. (1996), Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans, *American Journal of Physiology*, 270, E353–E362.
- Deng R., Chow T.-J. (2010), Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*, *Cardiovascular Therapeutics*, 28, e33–e45.
- Diaz M. N., Frei B., Vita J., Keaney J. (1997), Antioxidants and atherosclerotic heart disease, *The New England Journal of Medicine* (Epstein F., ed.), Massachusetts Medical Society, 408-416.
- Donato K. A. (1998), Executive summary of the clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults, *Archives of Internal Medicine*, 158(17), 1855–1867.
- Ducat D. C., Way J. C., Silver P. A. (2011), Engineering cyanobacteria to generate high-value products, *Trends in Biotechnology*, 29(2), 95-103.
- Duncan G. E., Perri M. G., Theriaque D. W., Hutson A. D., Eckel R. H., Stacpoole P. W. (2003), Exercise training, without weight loss, increases insulin sensitivity and postheparin plasma lipase activity in previously sedentary adults, *Diabetes Care*, 26(3), 557–562.
- Đurendić Brenesel M., Pilija V., Popović T., Arsić A., Milić M., Kojić D., Milić N., Mišan A. (2015), Antihyperlipidemic, antioxidant and weight- lowering effects of “Vitalplant”, *Open Life Sciences*, 10, 291–298.
- EC (2006), Regulation (EC) No. 1924/2006 of the European Parliament and of the Council of 20 December 2006 on nutrition and health claims made on foods, *Official Journal of the European Union*, L 12, 3–18.
- El-Baky H., El Baz F., El-Baroty G. (2009), Phenolics from *Spirulina maxima*: Overproduction and in vitro protective effect of its phenolics on CCl₄ induced hepatotoxicity, *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(1), 024-030.
- Espin J. C., Soler-Rivas C., Wichers H. J. (2000), Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 648-656.
- Eyssen H. J., De Pauw G., Van Eldere J. (1999), Formation of hyodeoxycholic acid from muricholic acid and hyocholic acid by an unidentified gram-positive rod termed

- HDCA-1 isolated from rat intestinal microflora, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 3158–3163.
- Fan Y.-Y., Chapkin R. S., (1998), Importance of Dietary γ -Linolenic Acid in Human Health and Nutrition, *Journal of Nutrition*, 128(9), 1411-1414.
- Flores G. (2008), The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics, and Evolution, *Caister Academic Press*, Norfolk, UK.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G. H. (1957), A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), State of Food Insecurity in the World 2009 (FAO, Rome, 2009).
- Fountoulakis M., Lahm H.-W. (1998), Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins, *Journal of Chromatography A*, 826, 109–134.
- Fradique M., Batista A. P., Nunes M. C., Gouveia L., Bandarra N. M., Raymundo A. (2013), *Isochrysis galbana* and *Diacronema vlkianum* biomass incorporation in pasta products as PUFA's source, *LWT - Food Science and Technology*, 50, 312-319.
- Fresco L. (2009), Challenges for food system adaptation today and tomorrow, *Environmental Science & Policy*, 12, 378-385.
- Fujise D., Tsuji K., Fukushima N., Kawai K., Harada K.-I. (2010), Analytical aspects of cyanobacterial volatile organic compounds for investigation of their production behavior, *Journal of Chromatography A*, 1217, 6122–6125.
- Gantar M., Svircev Z. (2008), Microalgae and cyanobacteria: food for thought, *Journal of Phycology*, 44 (2), 260–268.
- Gill H., Mugo M., Whaley-Connell A., Stump C., Sowers J. R. (2005), The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome, *The American Journal of the Medical Sciences*, 330(6), 290–294.
- Ginsberg H. N., Zhang Y.-L., Hernandez-Ono A. (2005), Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes, *Archives of Medical Research*, 36(3), 232–240.
- Ginzberg A., Cohen M., Sod-Moriah U., Shany S., Rosenshtrauch A., Arad S (2000), Chickens fed with biomass of the red microalga *Porphyridium sp.* have reduced blood cholesterol level and modified fatty acid composition in egg yolk, *Journal of Applied Phycology*, 12(3-5), 325-330.

- Godfraz C., Beddington J., Crute I., Haddad L., Lawrence D., Muir J., Pretty J., Robinson S., Thomas S., Toulmin C. (2010), Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People, *Science*, 327, 812-818.
- Goiris K., Muylaert K., Fraeye I., Foubert I., De Brabanter J., De Cooman L. (2012), Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content, *Journal of Applied Phycology*, 24(6), 1477-1486.
- Gouveia L., Raymundo A., Batista A. P., Sousa I., Empis J. (2006), *Chlorella vulgaris* and *Haematococcus pluvialis* biomass as colouring and antioxidant in food emulsions, *European Food Research and Technology*, 222, 362-367.
- Gouveia L., Veloso V., Reis A., Fernandes H. L., Empis J., Novais J. M. (1996), *Chlorella vulgaris* used to colour egg yolk, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 167-172.
- Grundy S. M. (2004), Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(6), 2595-2600.
- Haggarty P., Campbell D. M., Duthie S., Andrews K., Hoad G., Piyathilake C., McNeill G. (2009), Diet and deprivation in pregnancy, *The British Journal of Nutrition*, 102, 1487-149.
- Hansson G. K. (2005), Mechanisms of disease: inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease, *The New England Journal of Medicine*, 352(16), 1685-1695.
- Harrison D. G. (1997), Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction, *Journal of Clinical Investigation*, 100(9), 2153-2157.
- Hasan M. R., Chakrabarti R. (2009), Use of algae and aquatic macrophytes as feed in small scale aquaculture: a review, In Bulletin: FAO Fisheries and Aquaculture, Technical Paper No. 531, Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Henderson J. W., Brooks A. (2010), Improved Amino Acid Methods using Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Columns for a Variety of Agilent LC Instrumentation and Separation Goals, *Agilent Technologies Application note 5990-4547EN*, USA.
- Henrikson R. (2009), Earth Food *Spirulina*, *Ronore Enterprises, Inc.* PO Box 909, Hana, Maui, Hawaii 96718, SAD.
- Herrero A., Flores E. (2008), The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution | Book, *Caister Academic Press*, Velika Britanija.
- Herrero M., Jaime L., Martin-Alvarez P., Cifuentes A., Ibanez E. (2006), Optimization of the Extraction of Antioxidants from *Dunaliella salina* Microalga microalga by

- Pressurized pressurized Liquidliquids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5597–5603.
- Herrero M., Martin-Alvarez P., Senorans J., Cifuentes A., Ibanez E. (2005), Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga, *Food Chemistry*, 93,417–423.
- HMSO, UK Department of Health (1994), Nutritional aspects of cardiovascular disease, London, Report on Health and Social subject, 46, 37-46.
- Holub D. J., Holub B. J. (2004), Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263, 217–225.
- Hopps E., Noto D., Caimi G., Aversa M. R. (2010), A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress, *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 20, 72-77.
- Houseknecht K. L., Vanden Heuvel J. P., Moya-Camarena S. Y., Portocarrero C. P., Peck L. W., Nickel K. P., Belury M. A. (1998), Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 678–682.
- <http://scidavis.sourceforge.net/>
- http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=42976
- http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=f9d14abc6858548dd
- <http://www.designboom.com/technology/urban-farming-of-edible-algae-on-bangkok-skyscraper-rooftops/>
- <http://www.leco.com/products/separation-science/gcxgc-tofms/pegasus-4d-gcxgc-tofms>
- <http://www.tripow.ca/recipes/>
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CyanobacteriaColl1.jpg>
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cyanobacterium-inline.svg>
- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spirul2.jpg>
- https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_3.svg
- Huang Z., Guo B. J., Wong R. N. S., Jiang Z. (2007), Characterization and antioxidant activity of selenium-containing phycocyanin isolated from *Spirulina platensis*, *Food Chemistry*, 100, 1137-1143.

- International Diabetes Federation: The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>.
- Itoh M., Suganami T., Satoh N., Tanimoto-Koyama K., Yuan X., Tanaka M., Kawano H., Yano T., Aoe S., Takeya M., Shimatsu A., Kuzuya H., Kamei Y., Ogawa Y. (2007), Increased adiponectin secretion by highly purified eicosapentaenoic acid in rodent models of obesity and human obese subjects, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 27, 1918–1925.
- Jensen M. D., Haymond M. W., Rizza R. A., Cryer P. E., Miles J. M. (1989), Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity, *Journal of Clinical Investigation*, 83 (4), 1168–1173.
- Johnson E., Kumar K., Das D. (2014), Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated *Nostoc sp.*, *Bioresource Technology*, 166, 541–547.
- Johnson H., King S., Banack S. A., Webster C., Callanaupa W. J., Cox P. A. (2008), Cyanobacteria (*Nostoc commune*) used as a dietary item in the Peruvian highlands produce the neurotoxic amino acid BMAA, *Journal of Ethnopharmacology*, 118, 159–165.
- Karlović Đ., Andrić N. (1996), Kontrola kvaliteta semena uljarica, *Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezno ministarstvo za nauku tehnologiju i razvoj, Savezni zavod za standardizaciju*, Beograd.
- Kaur J. (2014), A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome, *Cardiology Research and Practice*, Volume 2014, Article ID 943162, 21 pages.
- Keaney J. F. Jr, Frei B. (1994), Antioxidant protection of low-density lipoprotein and its role in the prevention of atherosclerotic vascular disease, In: Frei B, ed. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*, San Diego, Calif., *Academic Press*, 303–352.
- Kesavulu M. M., Kameswararao B., Apparao C. H., Kumar E. G. T. V., Harinarayan C. V. (2002), Effect of x3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients, *Diabetes & Metabolism*, 28, 20–26.
- Khan M., Varadharaj S., Ganesan L. P., Shobha J. C., Naidu M. U., Parinandi N. L., Tridandapani S., Kutala V. K., Kuppusamy P. (2006), C-phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 290, H2136–H2145.

- Khan Z., Bhadouria P., Bisen P. S. (2005), Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 6, 373–379.
- Klejdus B., Kopecký J., Benešová L., Vacek, J (2009), Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species, *Journal of Chromatography A*, 1216(5), 763-771.
- Kolovou G. D., Anagnostopoulou K. K., Salpea K. D., Mikhailidis D. P. (2007), The prevalence of metabolic syndrome in various populations, *The American Journal of the Medical Sciences*, 333 (6), 362–371.
- Komarek J., Zapomelova E., Hindak, F. (2010), *Cronbergia gen. nov.*, a new cyanobacterial genus (*Cyanophyta*) with a special strategy of heterocyte formation, *Cryptogamie Algologie*, 31(3), 321-341.
- Koplan J. P., Dietz W. H. (1999), Caloric imbalance and public health policy, *Journal of the American Medical Association*, 282 (16), 1579–1581.
- Kotilainen L., Rajalahti R., Ragasa C., Pehu, E. (2006), Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries, *Agriculture and Rural Development Discussion*, Paper 30.
- Kovač D., Simeunović J., Babić O., Mišan A., Milovanović I. (2013), Algae in food and feed, *Food and Feed Research*, 40 (1), 21-31.
- Kulshreshtha A., Zacharia A. J., Jarouliya U., Bhadauriya P., Prasad G. B., Bisen P. S. (2008), *Spirulina* in health care management, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 9, 400–405.
- Laakso M. (2004), Gene variants, insulin resistance, and dyslipidaemia, *Current Opinion in Lipidology*, 15(2), 115–120.
- Lairon D. (1996), Dietary fibres: effects on lipid metabolism and mechanisms of action, *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 125-133.
- Lam H. S., Proctor A. (2006), Milled Rice Oxidation Volatiles and Odor Development, *Journal of Food Science*, 68(9), 2676-2681.
- Li A. H., Cheng K., Wong C., King-Wai F., Feng C., Yue J. (2007), Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae, *Food Chemistry*, 102, 771–776.

- Lichtenstein A. H., Appel L. J., Brands M. (2006), Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American heart association nutrition committee, *Circulation*, 114, 82–96.
- Lin L. Y., Peng C. C., Yang Y. L., Peng R. Y. (2008), Optimization of bioactive compounds in buckwheat sprouts and their effect on blood cholesterol in hamsters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1216-1223.
- Liu A., Zhu T., Lu X., Song L. (2013), Hydrocarbon profiles and phylogenetic analyses of diversified cyanobacterial species, *Applied Energy*, 111, 383–393.
- Locket P.L., Gallaher D.D. (1989), An improved procedure for bile acid extraction and purification and tissue distribution in the rat, *Lipids*, 24(3), 221-223.
- López C. V., García M. del C., Fernández F. G., Bustos C. S., Chisti Y., Sevilla J. M. (2010), Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass, *Bioresource Technology*, 101(19), 7587-7591.
- Lopez-Huertas E. (2010), Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies, *Pharmacological Research*, 61, 200–207.
- Mackinney G. (1941), Absorption of light by chlorophyll solutions, *The Journal of Biological Chemistry*, 140(2), 315-322.
- Mahgoub S. E. O., Hudson B. J. F. (1985), Inhibition of the pro-oxidant activity of copper by primary antioxidants in lard, *Food Chemistry*, 16, 97-101.
- Mahipala M. B. P. K., Krebs G. L., McCafferty P., Dods K., Suriyagoda B. M. L. D. B. (2009), Faecal indices predict organic matter digestibility, short chain fatty acid production and metabolizable energy content of browse-containing sheep diets, *Animal Feed Science and Technology*, 154, 68-75.
- Manconia M., Pendas J., Ledón N., Moreira T., Sinico C., Saso L., Fadda A. M. (2009), Phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity: *In-vitro in-vivo* studies, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 423–430.
- Mandić A. I., Đilas S. M., Četković G. S., Čanadanović-Brunet J. M., Tumbas, V. T. (2008), Polyphenolic composition and antioxidant activities of grape seed extract, *International Journal of Food Properties*, 11(4), 713-726.
- Mata M. T., Martins A. A., Caetano N. S. (2010), Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 217–232.

- McKeown N. M., Meigs J. B., Liu S., Saltzman E., Wilson P. W. F., Jacques P. F. (2004), Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort, *Diabetes Care*, 27(2), 538–546.
- Menrad K. (2003), Market and marketing of functional food in Europe, *Journal of Food Engineering*, 56, 181–188.
- Milovanović I., Mišan A., Šarić B., Kos J., Mandić A., Simeunović J., Kovač D. (2012), Evaluation of protein and lipid content and determination of fatty acid profile in selected species of cyanobacteria, *6th Central European Congress on Food*, Novi Sad, Serbia, 23-26.
- Milovanović I., Mišan A., Simeunović J., Kovač D., Jambrec D., Mandić A. (2015), Determination of volatile organic compounds in selected strains of cyanobacteria, *Journal of Chemistry* Article ID 969542, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/969542>.
- Mišan A., Arsić I., Đorđević S., Tadić V., Psodorov Đ. (2013), Funkcionalna hrana i lekovito bilje, Monografija, *Naučni institut za prehrambene tehnologije*, Novi Sad.
- Mišan A., Mimica-Dukić N., Mandić A., Sakač M., Milovanović I., Sedej, I. (2011), Development of a rapid resolution HPLC method for the separation and determination of 17 phenolic compounds in crude plant extracts, *Open Chemistry*, 9(1), 133-142.
- Mochimaru M., Masukawa H., Takaichi S. (2005), The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has two distinct b-carotene ketolases: CrtO for echinenone and CrtW for ketomyxol synthesis, *FEBS Letters*, 579, 6111–6114.
- Mohammed M. K., Mohd M. K. (2011), Production of carotenoids (antioxidants/colourant) in *Spirulina platensis* in response to indole acetic acid (IAA), *International Journal of Engineering Science and Technology (IJEST)*, 3(6), 4973-4979.
- Mollet B., Rowland I. (2002), Functional foods: at the frontier between food and pharma, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 483-485.
- Morse S. A., Zhang R., Thakur V., Reisin E. (2005), Hypertension and the metabolic syndrome, *The American Journal of the Medical Sciences*, 330(6), 303–310.
- Mosulishvili L. M., Kirkesali E. I., Belokobylsky A. I., Khizanishvili A. I., Frontasyeva M. V., Pavlov S. S., Gundorina S. F. (2002), Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 87-97.

- Msagati T., Siame B., Shushu D. (2006), Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins, *Aquatic Toxicology*, 78, 382-397.
- Mukhopadhyay S., Maitra U. (2004), Chemistry and biology of bile acids, *Current Science*, 87, 1666-1683.
- Nagao K., Wang Y. M., Inoue N., Han S. Y., Buang Y., Noda T., Kouda N., Okamatsu H., Yanagita T. (2003), The 10trans,12cis isomer of conjugated linoleic acid promotes energy metabolism in OLETF rats, *Nutrition*, 19, 652-656.
- Nagao K., Yanagita T. (2008), Bioactive lipids in metabolic syndrome, *Progress in Lipid Research*, 47, 127-146.
- Nagaoka S., Shimizu K., Kaneko H., Shibayama F., Morikawa K., Kanamaru Y., Otsuka A., Hirahashi T., Kato T. (2005), A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats, *The Journal of nutrition*, 135(10), 2425-3240.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002), Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult treatment panel III) final report, *Circulation*, 106 (25), 3143-3421.
- Neel J. V. (1962), Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"?, *The American Journal of Human Genetics*, 14, 353-362.
- Nelson D., Cox M. (2000), Lehninger Principles of Biochemistry, Third Edition (3 Har/Com ed.), W. H. Freeman, 1200, ISBN 1-57259-931-6.
- Nelson M., Erens B., Chuch S., Boshier T. (2007), Low Income Diet and Nutritional Survey, *The Stationery Office*, London, UK, 10-32.
- Nikolić M., Glibetić M., Gurinović M., Milešević J., Khokhar S., Chillo S., Abaravicius J. A., Bordoni A., Capozzi F. (2014), Identifying Critical Nutrient Intake in Groups at Risk of Poverty in Europe: The CHANCE Project Approach, *Nutrients*, 6, 1374-1393.
- Official Methods of Analysis, AOAC, Washington DC, USA (1984) (fourteenth ed.)
- Oh H. I., Shin T. S., Chang E. J. (2001), Determination of cholesterol in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography, *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 14(10), 1465-1469.
- Olson J. M. (2006), Photosynthesis in the Archean Era, *Photosynthesis Research*, 88(2), 109-117.

- O'Neil J. M., Davis T. W., Burford M. A., Gobler C. J. (2012), The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change, *Harmful Algae*, 14, 313-334.
- Onofrejevá L., Vašíčková J., Klejdus B., Stratil P., Mišurcová L., Kráčmar S., Kopecký J., Vacek, J. (2010), Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 464-470.
- Ordovas J. M. (2007), Genetic links between diabetes mellitus and coronary atherosclerosis, *Current Atherosclerosis Reports*, 9(3), 204–210.
- Östirlind, S. (1950). Inorganic carbon sources of green algae. I. Growth experiments with *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Physiologia Plantarum*, 3(4), 353-360.
- Ostlund Jr R. E. (2007), Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets, *Lipids*, 42, 41–45.
- Ozdemir G., Karabay N. U., Dalay M. C., Pazarbasi B. (2004), Antibacterial Activity of Volatile Component and Various Extracts of *Spirulina platensis*, *Phytotherapy Research*, 18, 754-757.
- Persson P. E. (1980), Sensory properties and analysis of two muddy odour compounds, geosmin and 2-methylisoborneol, in water and fish, *Water Research*, 14, 1113-1118.
- Petersen K. F., Shulman G. I. (2006), Etiology of insulin resistance, *The American Journal of Medicine*, 119 (5), S10–S16.
- Pisciotta J. M., Zou Y., Baskakov I. V. (2010), Light-Dependent Electrogenic Activity of Cyanobacteria, *PLoS One*, 5 (5), e10821.
- Plaza M., Cifuentes A., Ibanez E. (2008), In the search of new functional food ingredients from algae, *Trends in Food Science & Technology*, 19(1), 31-39.
- Plaza M., Herrero M., Cifuentes A., Ibanez E. (2009), Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7159–7170.
- Pulz O., Gross W. (2004), Valuable products from biotechnology of microalgae, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Quintana N., Van der Kooy F., Van de Rhee M., Voshol G., Vervpoorte R. (2011), Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 471–490.

- Rajapakse N., Mendis E., Jung W. K., Je J.Y., Kim S. K. (2005), Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties, *Food Research International*, 38, 175–182.
- Ramirez D., Fernandez V., Tapia G., Gonzalez R., Videla L. A. (2002), Influence of C-phycocyanin on hepatocellular parameters related to liver oxidative stress and Kupffer cell functioning, *Inflammation Research*, 51, 351–356.
- Rastogi R., Sinha R. (2009), Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites, *Biotechnology Advances*, 27, 521-539.
- Ravi M., Lata De S., Azharuddin S., Paul S. (2010), The beneficial effects of *Spirulina* focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties, *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 73–83.
- Reddy B. S., Hanson D., Mangat S., Mathews L., Sbaschnig M., Sharma C., Simi B. (1980), Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols, *The Journal of Nutrition*, 110(9), 1880-1887.
- Richmond A., Preiss K. (1980), The biotechnology of algaculture, *Interdisciplinary Science Reviews*, 5(1), 60–70.
- Rippka R., Deruelles J., Waterbury J. B., Herdman M. and Stanier R. Y., (1979), Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111, 1-61.
- Riss J., Decorde K., Sutra T., Delage M., Baccou J.-C., Jouy N., Brune J. P., Oreal H., Cristol J.-P., Rouanet J.-M. (2007), Phycobiliprotein C-phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7962–7967.
- Robards K., Prenzler P., Tucker G., Swatsitang P., Glover W. (1999), Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry*, 66, 401-436.
- Rodrigues M. S., Ferreira L. S., Converti A., Sato S., Carvalho J. C. M. (2010), Fedbatch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources, *Bioresource Technology*, 101(12), 4491-4498.
- Rodriguez Zavala J. S., Ortiz Cruz M. A., Mendoza Hernandez G., Moreno-Sanchez R. (2010), Increased synthesis of α tocopherol, paramylon and tyrosine by *Euglena gracilis*

- under conditions of high biomass production, *Journal of Applied Microbiology*, 109, 2160-2172.
- Romay C., Delgado R., Ramirez D., Gonzalez R., Rojas A. (2001), Effects of phycocyanin extract on tumor necrosis factor-alpha and nitrite levels in serum of mice treated with endotoxin, *Arzneimittelforschung*, 51, 733-736.
- Roy S., Llewellyn C., Skarstad Egeland E., Johnsen G. (2011), Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography, *Cambridge University Press* (ISBN 9781139500999).
- Royal Society of London, Sustainable Biofuels: Prospects and Challenges (Royal Society, London, 2008).
- Saadoun I. M. K., Schrader K. K., Blevins W. T. (1998), Environmental and nutritional factors affecting geosmin synthesis by *Anabaena* sp, *Water Research*, 35(5), 1209-1218.
- Sánchez-Baracaldo P., Hayes P. K., Blank C. E. (2005), Morphological and habitat evolution in the cyanobacteria using a compartmentalization approach, *Geobiology*, 3, 145-165.
- Santoyo S., Herrero M., Javier Senorans F., Cifuentes A., Ibanez E., Jaime L. (2006), Functional characterization of pressurized liquid extracts of *Spirulina platensis*, *European Food Research and Technology*, 224, 75-81.
- Šarić B., Nedeljković N., Šimurina O., Pestorić M., Kos J., Mandić A., Sakač M., Šarić Lj., Psodorov Đ., Mišan A. (2014), The influence of baking time and temperature on characteristics of gluten free cookies enriched with blueberry pomace, *Food and Feed Research*, 41(1), 39-46.
- Sarma T. A. (2012), Handbook of Cyanobacteria, *CRC Press*, SAD
- Sarmadi B., Ismail A. (2010), Antioxidative peptides from food proteins: A review, *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Sassano C. E. N., Gioielli L. A., Ferreira L. S., Rodrigues M. S., Sato S., Converti A., Carvalho J. C. M. (2010), Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira (Spirulina) platensis* using ammonium chloride as nitrogen source, *Biomass and Bioenergy*, 34, 1732-1738.
- Schafer F. Q., Wang H. P., Kelley E. E., Cueno K. L., Martin S. M., Buettner G. R. (2002), Comparing beta-carotene, vitamin E and nitric oxide as membrane antioxidants, *Journal of Biological Chemistry*, 383, 671-681.

- Schmidhuber J., Tubiello F. N. (2007), Global food security under climate change, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19703-19708.
- Schultz N. (2009), Photosynthetic viruses keep world's oxygen levels up, *New Scientist*, 2723.
- Sharma R. (2013), Biochemical Mechanisms of Fatty Liver and Bioactive Foods: Fatty Liver, Diagnosis, Nutrition Therapy, Bioactive Food as Dietary Interventions for Liver and Gastrointestinal Disease (Watson R. ed.), *Elsevier inc.*, Amsterdam, Netherlands pp. 623-655.
- Shields, R. J., Lupatsch I. (2012), Algae for aquaculture and animal feeds, *Journal of Animal Science*, 21, 23-37.
- Shih C. M., Cheng S. N., Wong C. S., Kuo Y. L., Chou T. C. (2009), Antiinflammatory and antihyperalgesic activity of C-phycoyanin, *Anesthesia & Analgesia*, 108, 1303–1310.
- Simeunović J. (2010), Cijanobakterije i cijanotoksini u površinskim vodama Vojvodine, Andrejević K. i Andrejević T.(eds), Beograd, Biblioteka Dissertatio, Zadužbina Andrejević, ISBN: 978-86-7244-903-7, pp.120.
- Simeunovic J., Beslin K., Svircev Z., Kovac D., Babic O. (2013), Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains, *Journal of Applied Phycology*, 25(2), 597-607.
- Simeunovic J., Markovic S., Kovac D., Misan A., Mandic A., Svircev Z. (2012), Filamentous cyanobacteria from Vojvodina region as source of phycobiliprotein pigments as potential natural colorants, *Food and Feed Research*, 39(1), 23-31.
- Simeunović, J. (2005), Cyanobacterial Culture Collection (in serbian: Kolekcija kultura cijanobakterija), *Biblioteka Academia Zadužbina Andrejević*, Belgrade, 102.
- Singh S., Kate B. N., Banerjee U. C. (2005), Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An Overview, *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 73-95.
- Singleton V. L., Orthofer R., Lamuela Raventós R. M. (1999), Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Siro I., Kapolna E., Kapolna B., Lugasi A. (2008), Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review, *Appetite*, 51, 456–467.
- Sirtori C., Galli C., Anderson J., Arnoldi A. (2009), Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins, *Atherosclerosis*, 203, 8–17.

- Sivonen K., Jones G. (1999), Cyanobacterial toxins. Toxic cyanobacterial in water: A guide to their public health consequences monitoring and management, 1999 WHO, Chapter 3.
- Skidelsky R. (2009), *The Return of the Master*, Allen Lane, London, Velika Britanija.
- Smith J. L., Boyer G. L., Zimba P. V. (2008), A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: Impacts and management alternatives in aquaculture, *Aquaculture*, 280, 5-20.
- Soong P. (1980), Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, *Algae Biomass*, (ed) Shelef G., Soeder C.J. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 97-115.
- Spies J. R. (1967), Determination of tryptophan in proteins, *Analytical Chemistry*, 39(12), 1412-1416.
- Spolaore P., Joannis Cassan C., Duran E., Isambert A. (2006), Commercial applications of microalgae, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Stahl W., Sies H. (2003), Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular Aspects of Medicine*, 24, 345-351.
- Stanton C., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Van Sinderen D. (2005), Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 198-203.
- Stewart I., Falconer I. R. (2008), Cyanobacteria and cyanobacterial toxins, pp. 271-296 in *Oceans and human health: risks and remedies from the seas*, Eds: Walsh PJ, Smith SL, and Fleming LE, Academic Press, Elsevier inc., Amsterdam, Netherlands.
- Stokić E., Mandić A., Sakač M., Mišan A., Pestorić M., Šimurina O., Jambrec D., Jovanov P., Nedeljković N., Milovanović I. and Sedej I. (2015), Quality of buckwheat-enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients, *LWT-Food Science and Technology*, 63(1), 556-561.
- St-Onge M. P., Lamarche B., Mauger J. F., Jones P. J. (2003 a), Consumption of a functional oil rich in phytosterols and medium-chain triglyceride oil improves plasma lipid profiles in men, *Journal of Nutrition*, 133, 1815-1820.
- St-Onge M. P., Ross R., Parsons W. D., Jones P. J. H. (2003 b), Medium-chain triglycerides increase energy expenditure and decrease adiposity in overweight men, *Obesity Research*, 11, 395-402.

- Sudha S., Karthic R., Naveen R., Rengaramanujam J. (2011), Anti hyperlipidemic activity of *Spirulina platensis* in Triton x-100 induced hyperlipidemic rats, *Hygeia journal for drugs and medicines*, 3(2), 32-37.
- Sugiura N., Iwami N., Inamori Y., Nishimura O., Sudo R. (1998), Significance of attached cyanobacteria relevant to the occurrence of musty odor in lake Kasumigaura, *Water Research*, 32(12), 3549-3554.
- Svirčev Z. (2005), Mikroalge i cijanobakterije u biotehnologiji, Prirodno matematički fakultet, Novi Sad.
- Swan G. (2004), Findings from the latest National Diet and Nutrition Survey, *Proceedings of the Nutrition Society*, 63, 505-512.
- Takachi R., Inoue M., Ishihara J., Kurahashi N., Iwasaki M., Sasazuki S., Iso H., Tsubono Y., Tsugane S. (2008), Fruit and vegetable intake and risk of total cancer and cardiovascular disease - Japan public health center-based prospective study, *American Journal of Epidemiology*, 167(1), 59-70.
- Takaichi S., Mochimaru M. (2007), Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 2607-2619.
- Takeuchi H., Kasai M., Taguchi N., Tsuji H., Suzuki M. (2002), Effect of triacylglycerols containing medium- and long-chain fatty acids on serum triacylglycerol levels and body fat in college athletes, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 48, 109-114.
- Tamaru S., Suzuki Y., Sakono M., Fukuda N., Ikeda I., Konno R., Shimizu T., Suzuki K. (2006), Dietary 5-campestenone (campest-5-en-3-one) enhances fatty acid oxidation in perfused rat liver, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo)*, 52, 127-133.
- Tepić A., Zekovic Z., Kravic S., Mandic A. (2009), Pigment content and fatty acid composition of paprika oleoresins obtained by conventional and supercritical carbon dioxide extraction, *CyTA - Journal of Food*, 7(2), 95-102.
- Thielecke F., Boschmann M. (2009), The potential role of green tea catechins in the prevention of the metabolic syndrome - A review, *Phytochemistry*, 70, 11-24.
- Tilman D., Fargione J., Wolff B., D'Antonio C., Dobson A., Howarth R., Schindler D., Schlesinger W. H., Simberloff D., Swackhamer D. (2001), Forecasting agriculturally driven global environmental change, *Science*, 292(5515), 281-284.

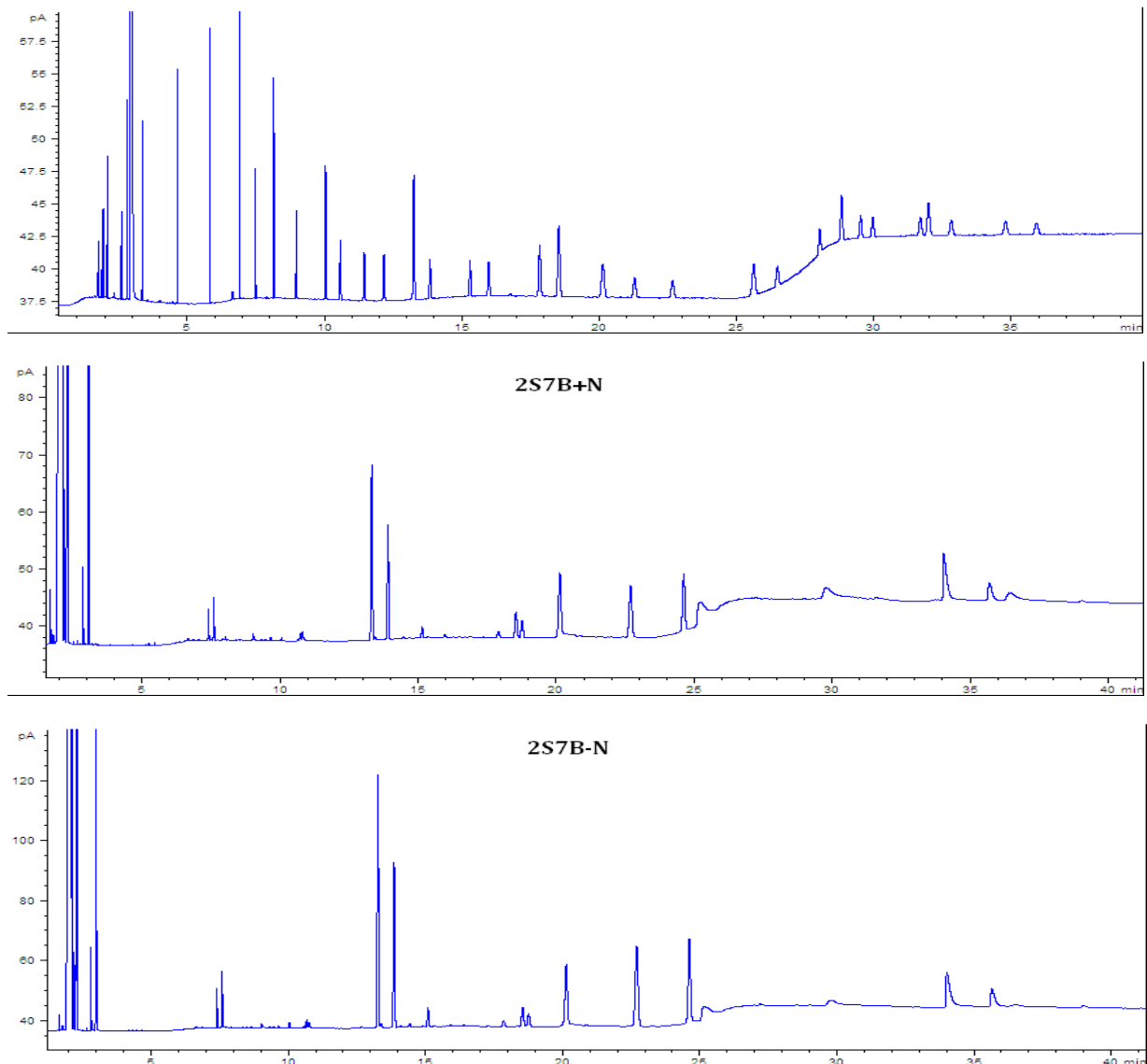
- Tokusoglu Ö., Ünal M. K. (2003), Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*, *Journal of Food Science*, 68(4), 1144-1148.
- Tomitani A., Knoll A. H., Cavanaugh C. M., Ohno T. (2006), The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular phylogenetic and paleontological perspectives, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 5442-5447.
- Torres-Duran P. V., Ferreira-Hermosillo A., Juarez-Oropeza M. A. (2007), Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of mexican population: A preliminary report, *Lipids in Health and Disease*, 6, 1-8.
- Touyz R. M. (2012), Adipocytes produce aldosterone through calcineurin-dependent signaling pathways: implications in diabetes mellitus-associated obesity and vascular dysfunction, *Hypertension*, 59(5), 1069- 1078.
- Trayhurn P., Wood I. S. (2004), Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue, *British Journal of Nutrition*, 92(3), 347-355.
- Van Trijp H. (2007), Consumer understanding and nutritional communication, *International developments in science & health claims*, ILSI international symposium on functional foods in Europe (9-11 May, Valletta, Malta).
- Vargas M. A., Rodriguez H., Moreno H., Olivares J., Del Campo A., Rivas J., Guerrero M. G. (1998), Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria, *Journal of Phycology*, 34, 812-817.
- Volkman H., Imianovsky U., Oliveira J., Sant Anna E. (2008), Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile, *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 98-101.
- Vonshak A. (2002), *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology, *Taylor & Francis Ltd*, 1 Gunpowder Square, London (UK).
- WHO (2003), Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases, WHO technical report series 916. Geneva, Switzerland. [http:// www.fao.org/docrep /005/AC911E/ AC911E00.HTM#Contents](http://www.fao.org/docrep/005/AC911E/AC911E00.HTM#Contents).
- Wilson P. W. F., D'Agostino R. B., Parise H., Sullivan L., Meigs J. B. (2005), Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, *Circulation*, 112 (20), 3066-3072.

Winefield C., Davies K., Gould K. (2009), *Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications*, Springer, New York, SAD.

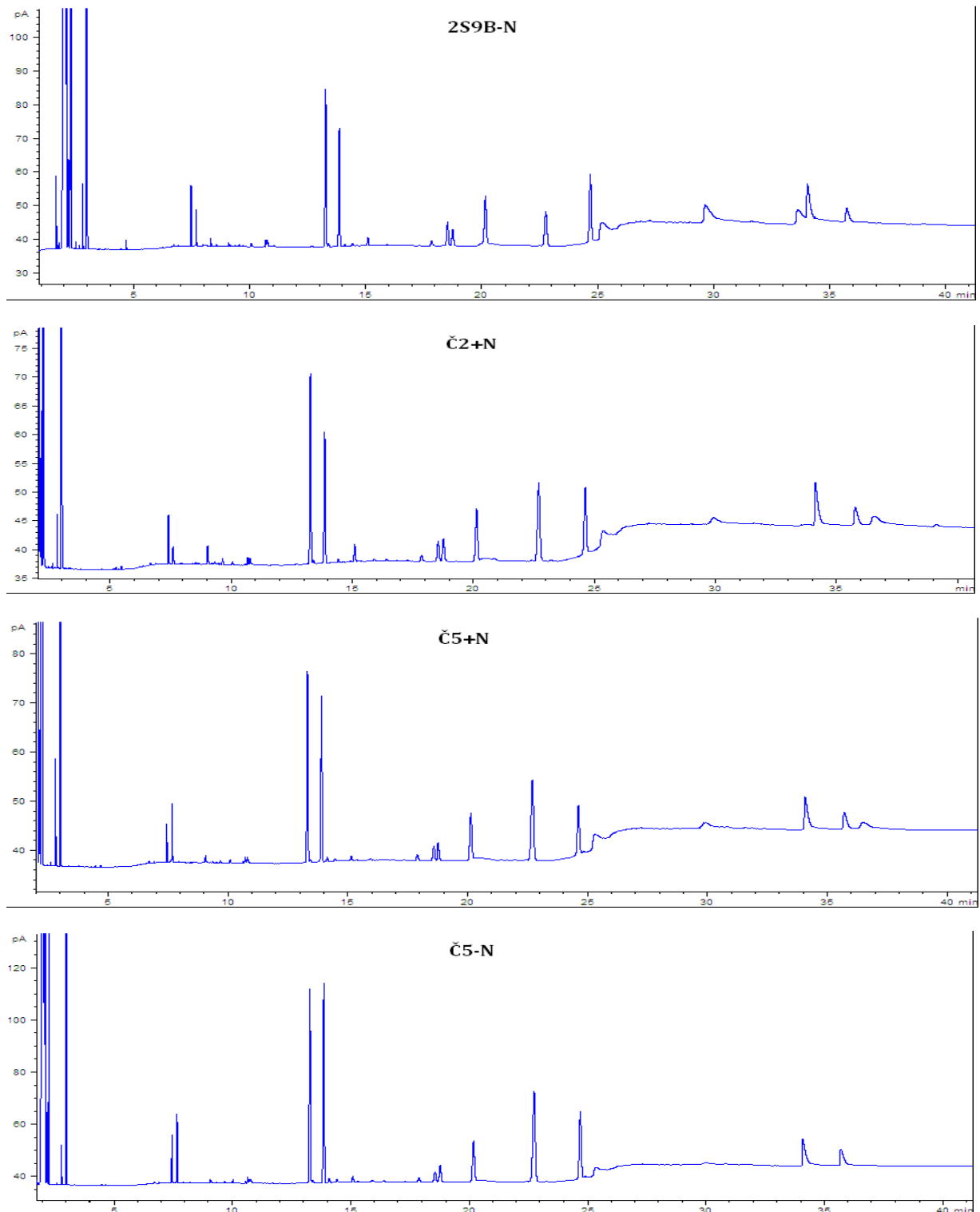
Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., Huges, S. I., Whittington, F. M. (2008), Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review, *Meat Science*, 78, 343-358.

World Health Organization (2012), *Action Plan for Implementation of the European Strategy for the Prevention and Control of Non Communicable Diseases, 2012–2016*; WHO: Geneva, Switzerland.

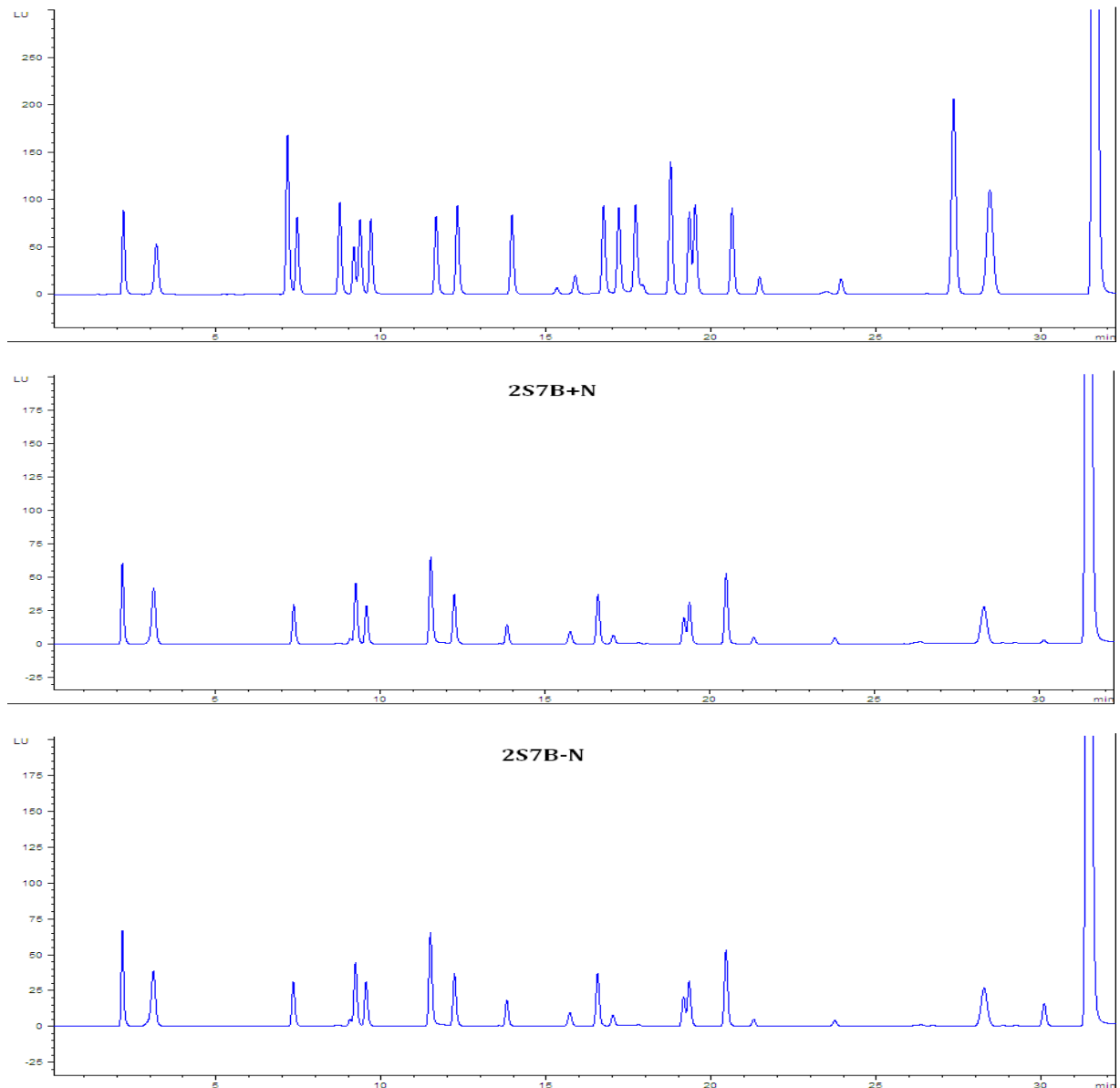
7. Prilog



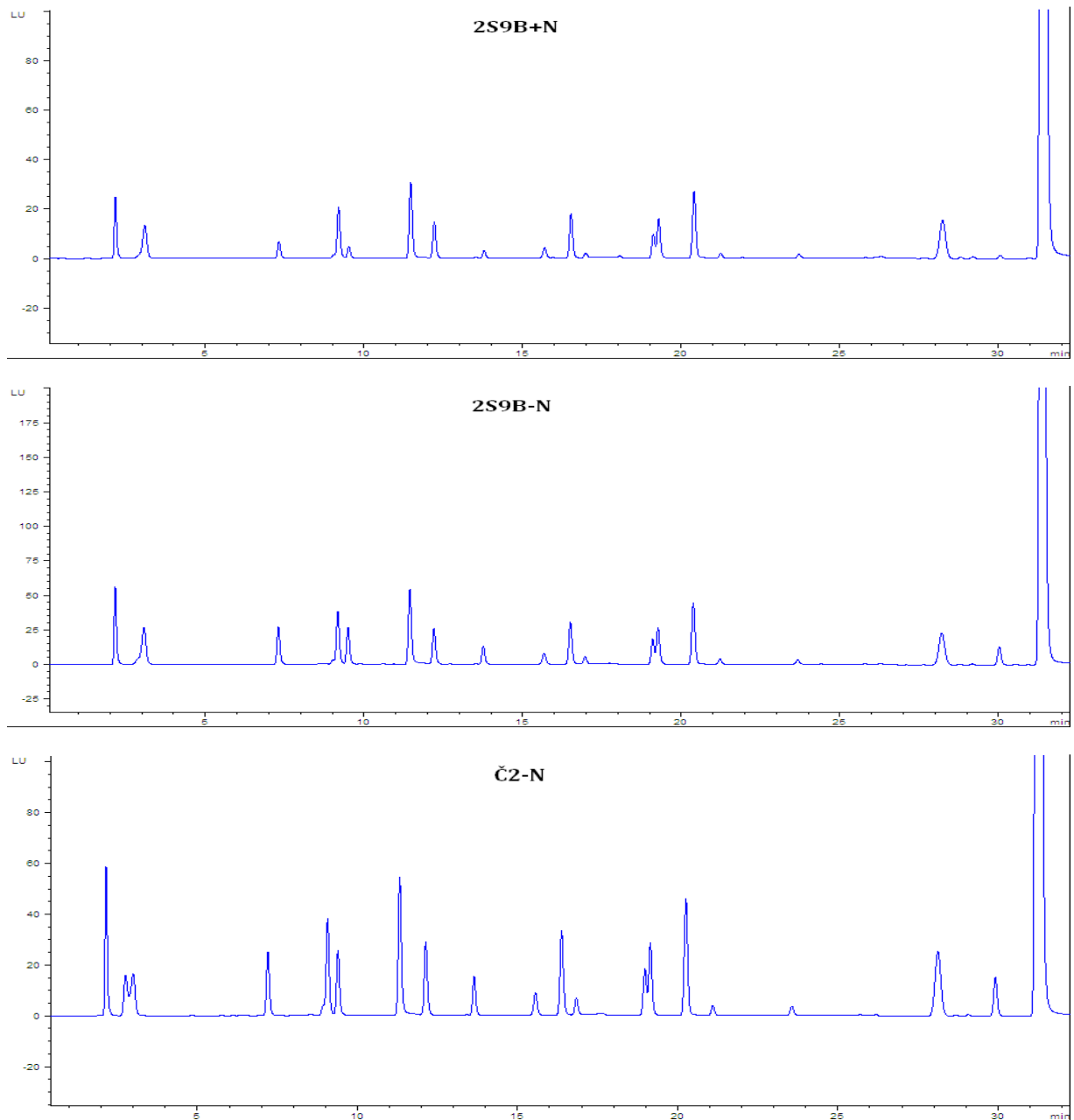
Slika 7.1. GC-FID hromatogrami standarda masnih kiselina i masnih kiselina u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



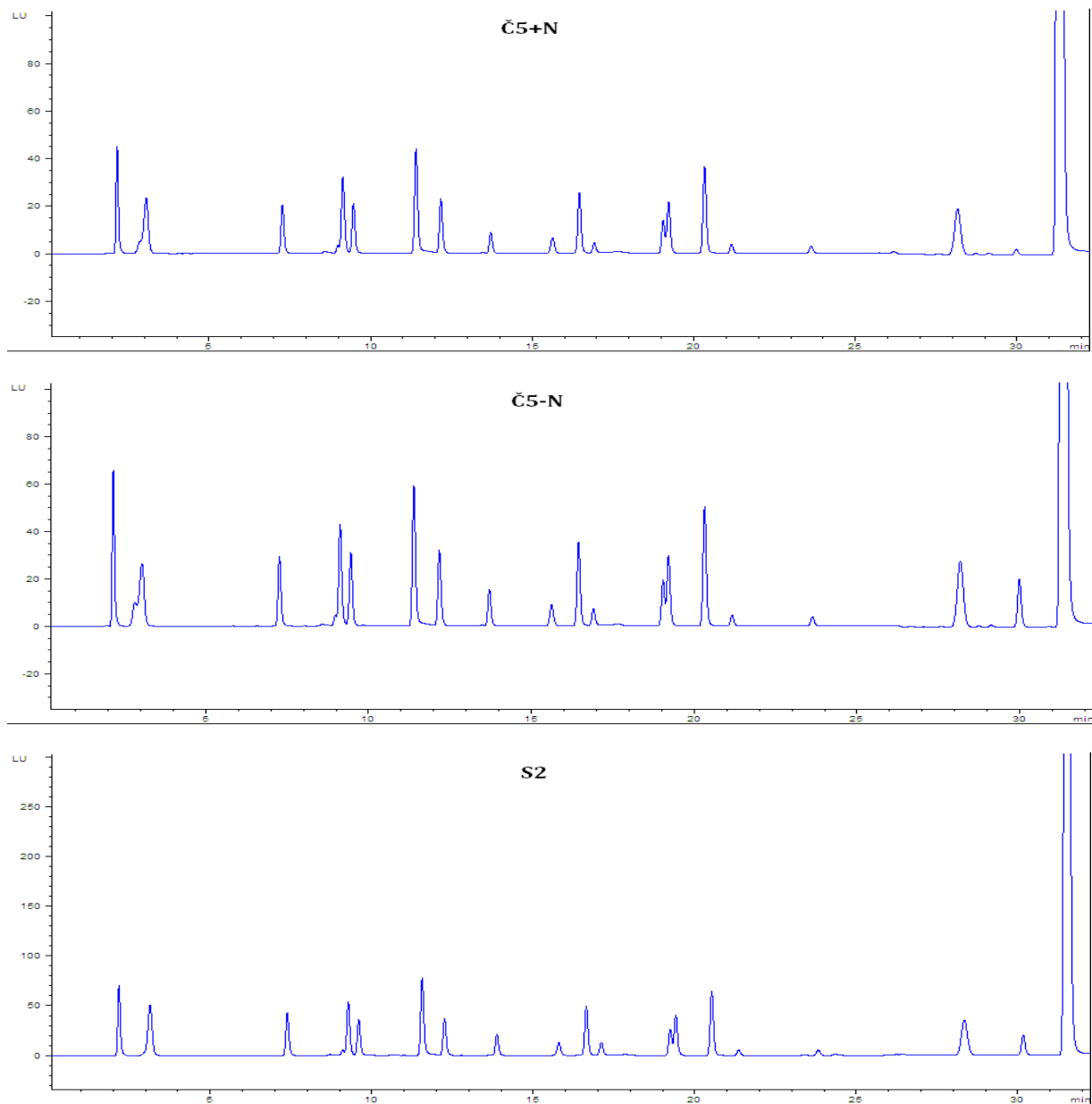
Slika 7.2. GC-FID hromatogrami masnih kiselina u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



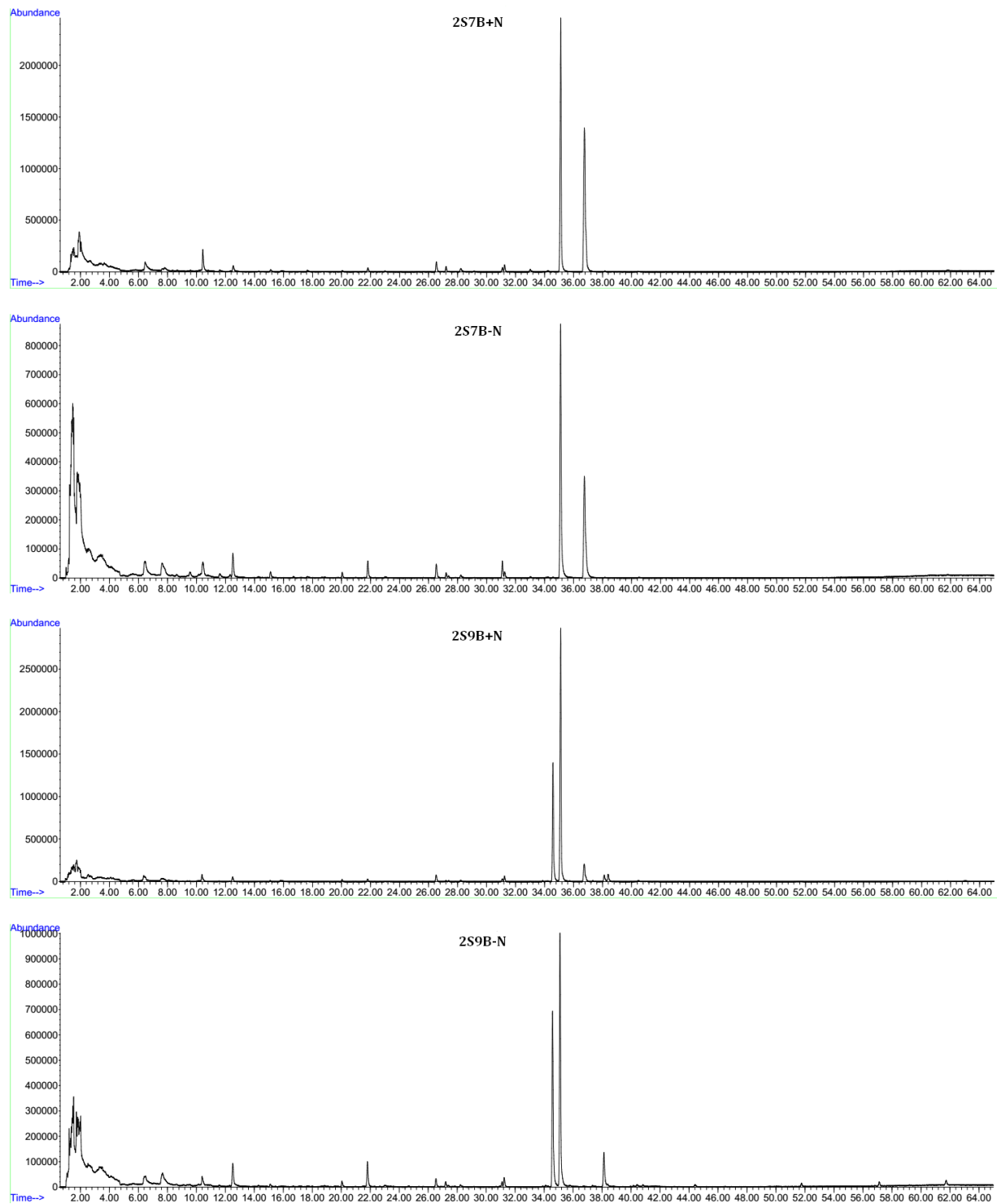
Slika 7.3. HPLC-DAD hromatogrami standarda aminokiselina i aminokiselina u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



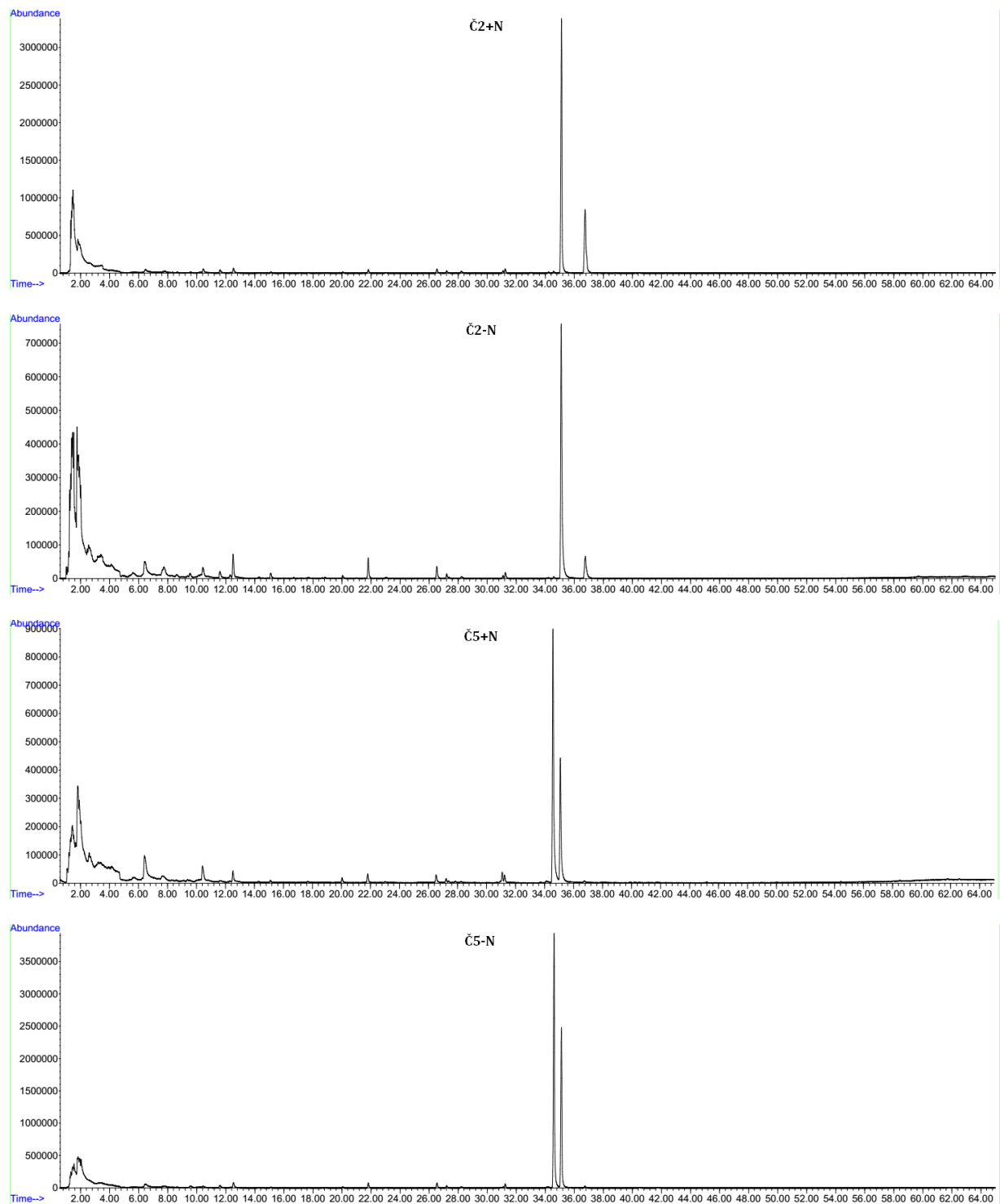
Slika 7.4. HPLC-DAD hromatogrami aminokiselina u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



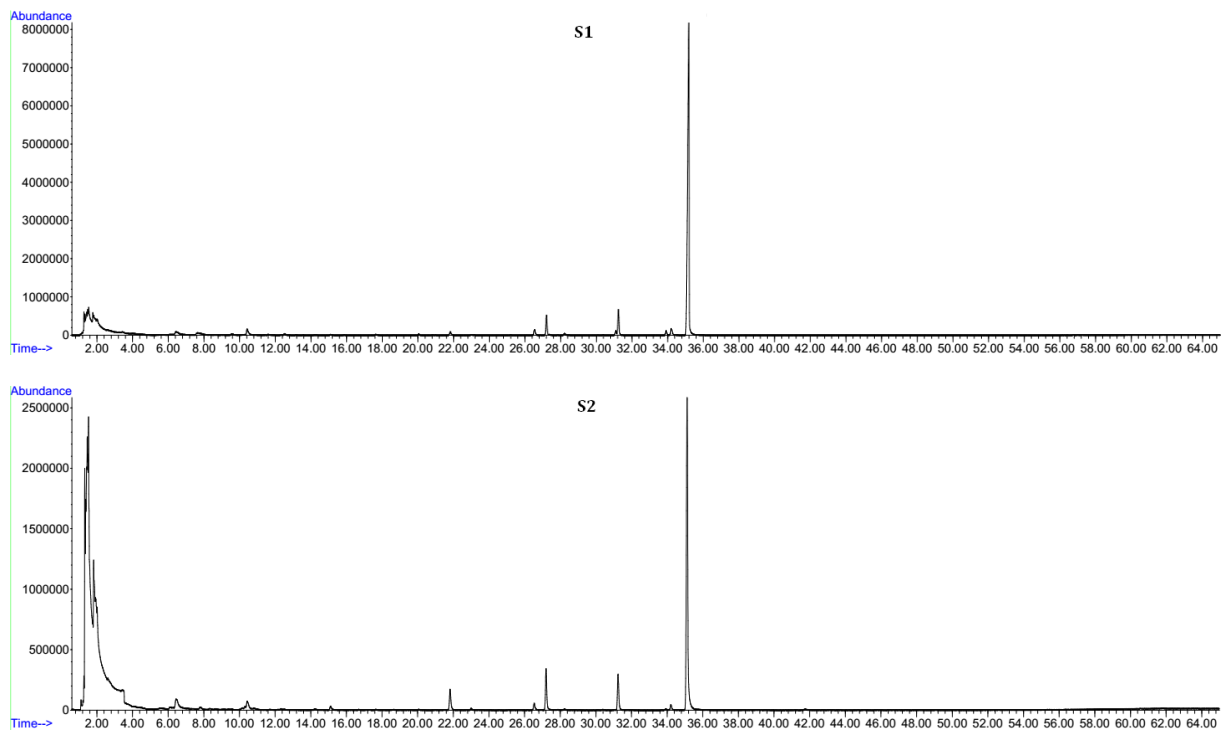
Slika 7.5. HPLC-DAD hromatogrami aminokiselina u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



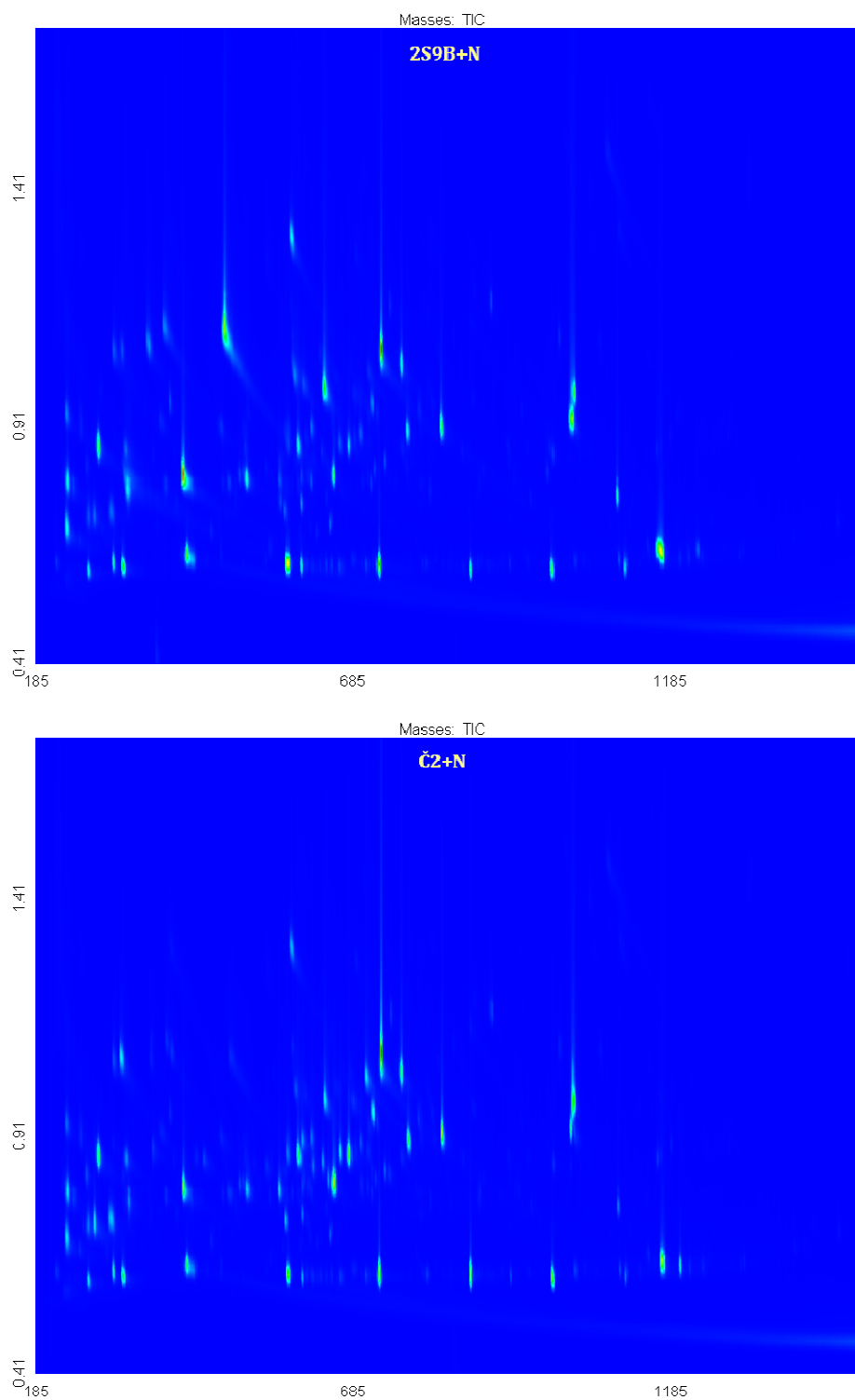
Slika 7.6. GC-MSD hromatogrami lakoisparljivih jedinjenja u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



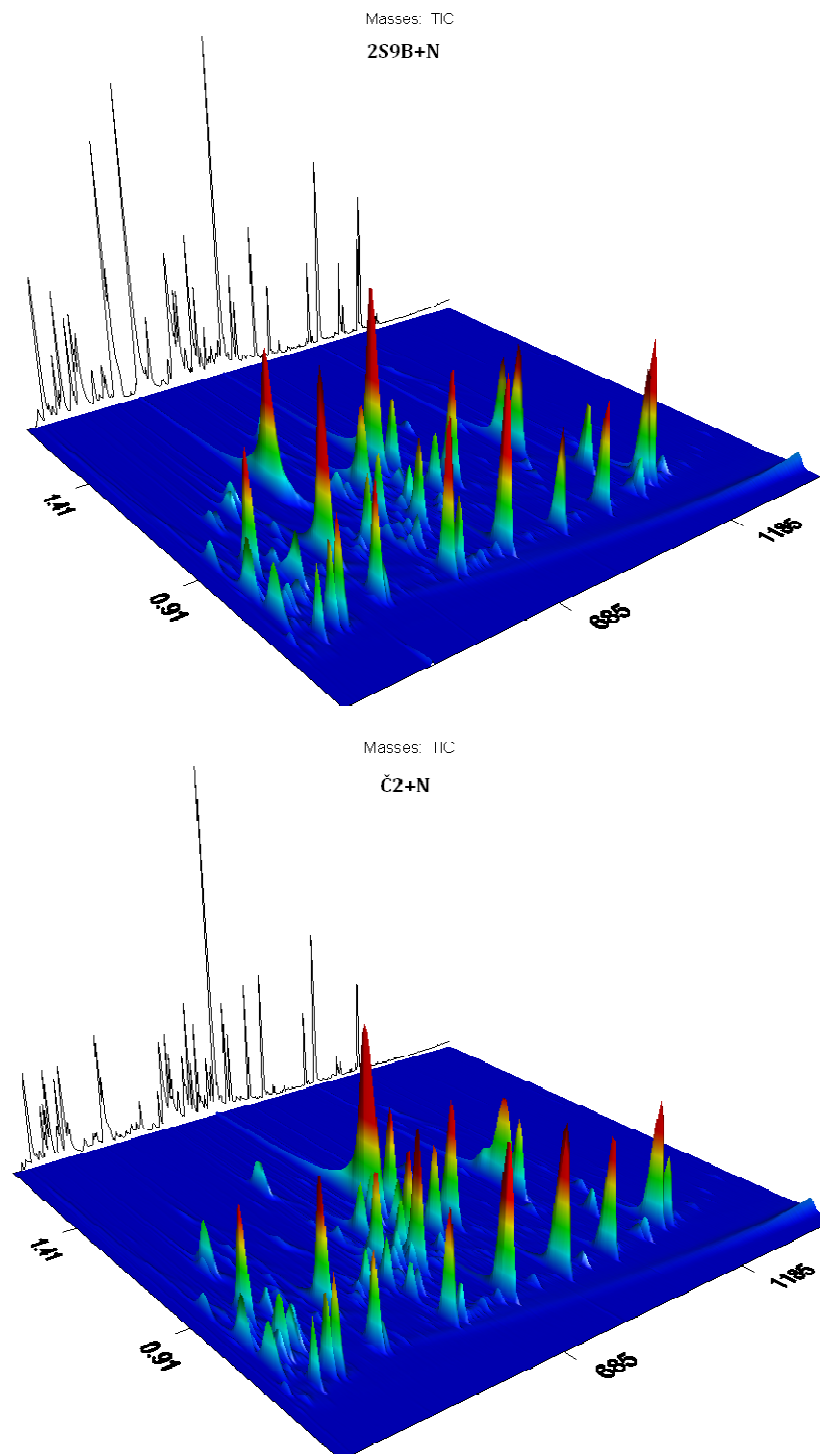
Slika 7.7. GC-MSD hromatogrami lakoisparljivih jedinjenja u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



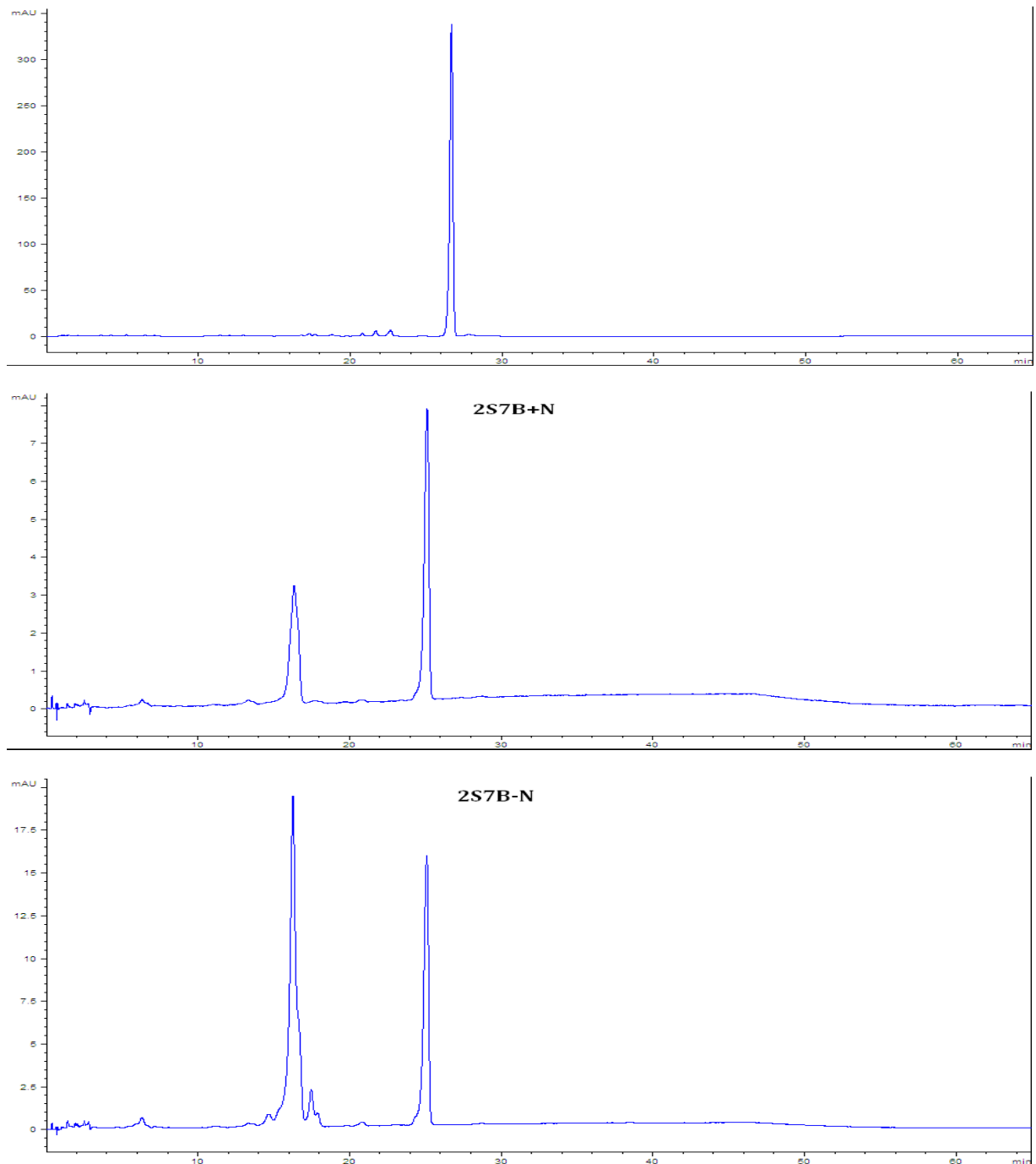
Slika 7.8. GC-MSD hromatogrami lakoisparljivih jedinjenja u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



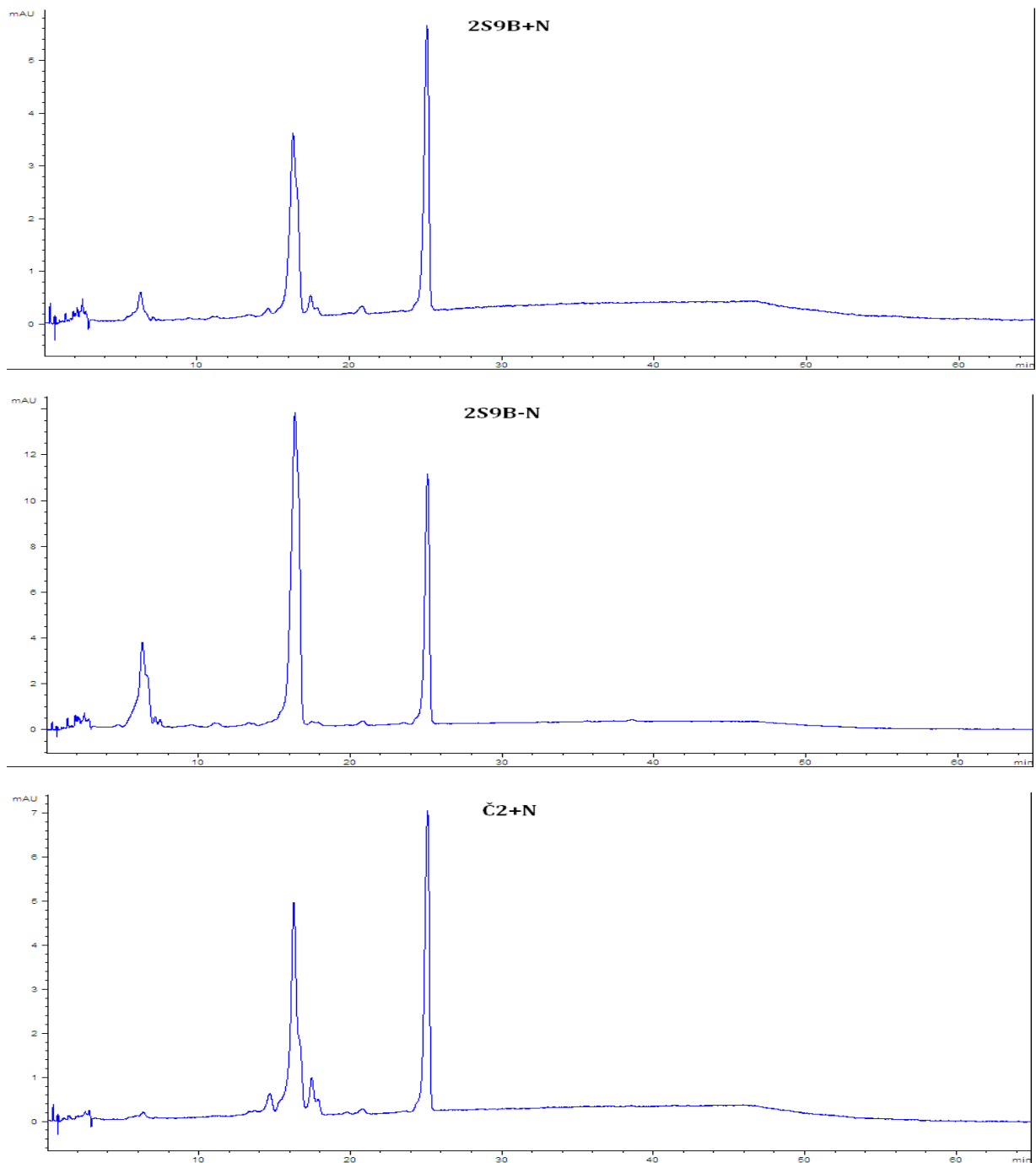
Slika 7.9. GC×GC-TOFMS hromatogrami lakoisparljivih jedinjenja u ispitivanim uzorcima cijanobakterija (dvodimenzionalni prikaz)



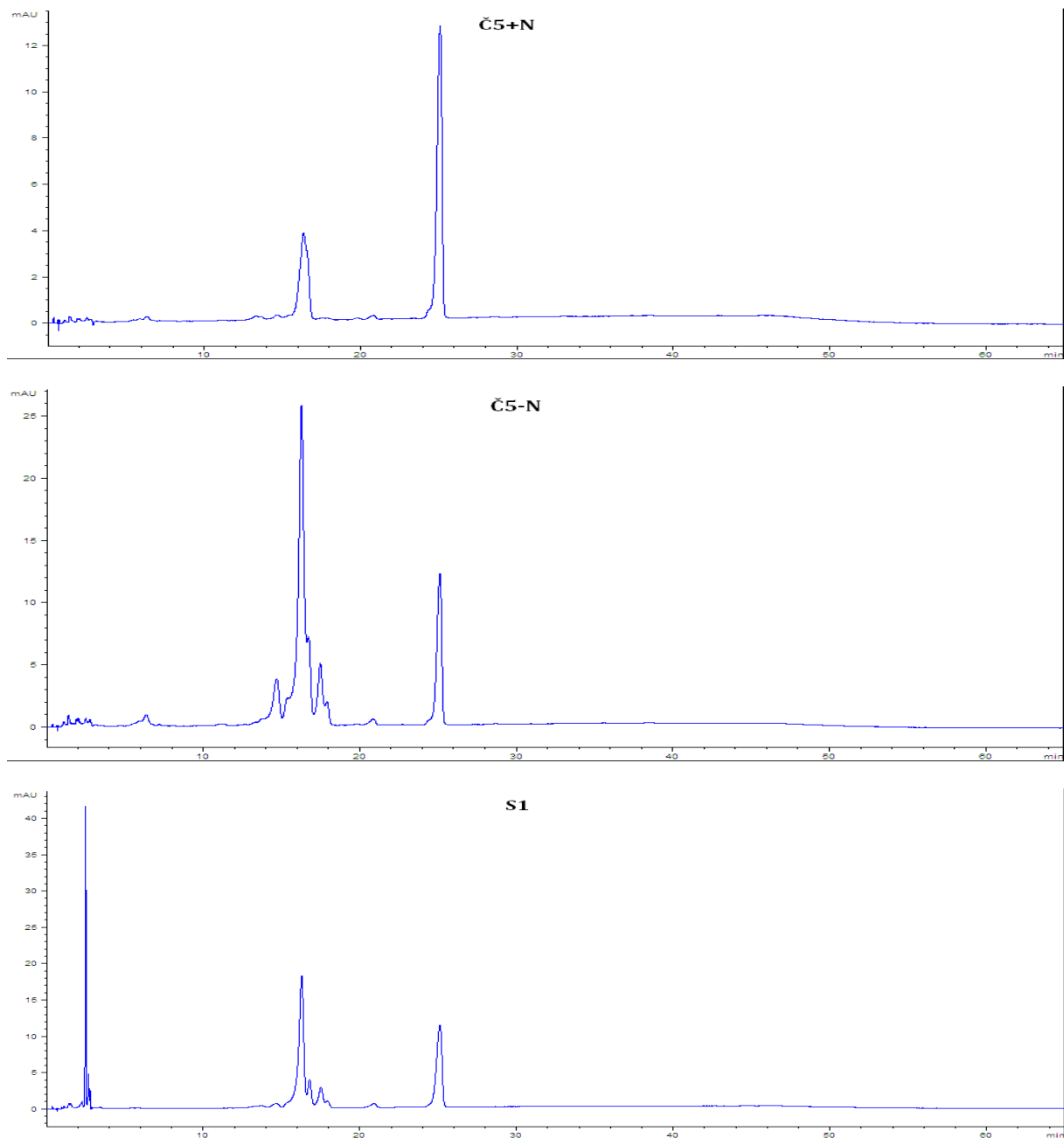
Slika 7.10. GC×GC-TOFMS hromatogrami lakoisparljivih jedinjenja u ispitivanim uzorcima cijanobakterija (trodimenzionalni prikaz)



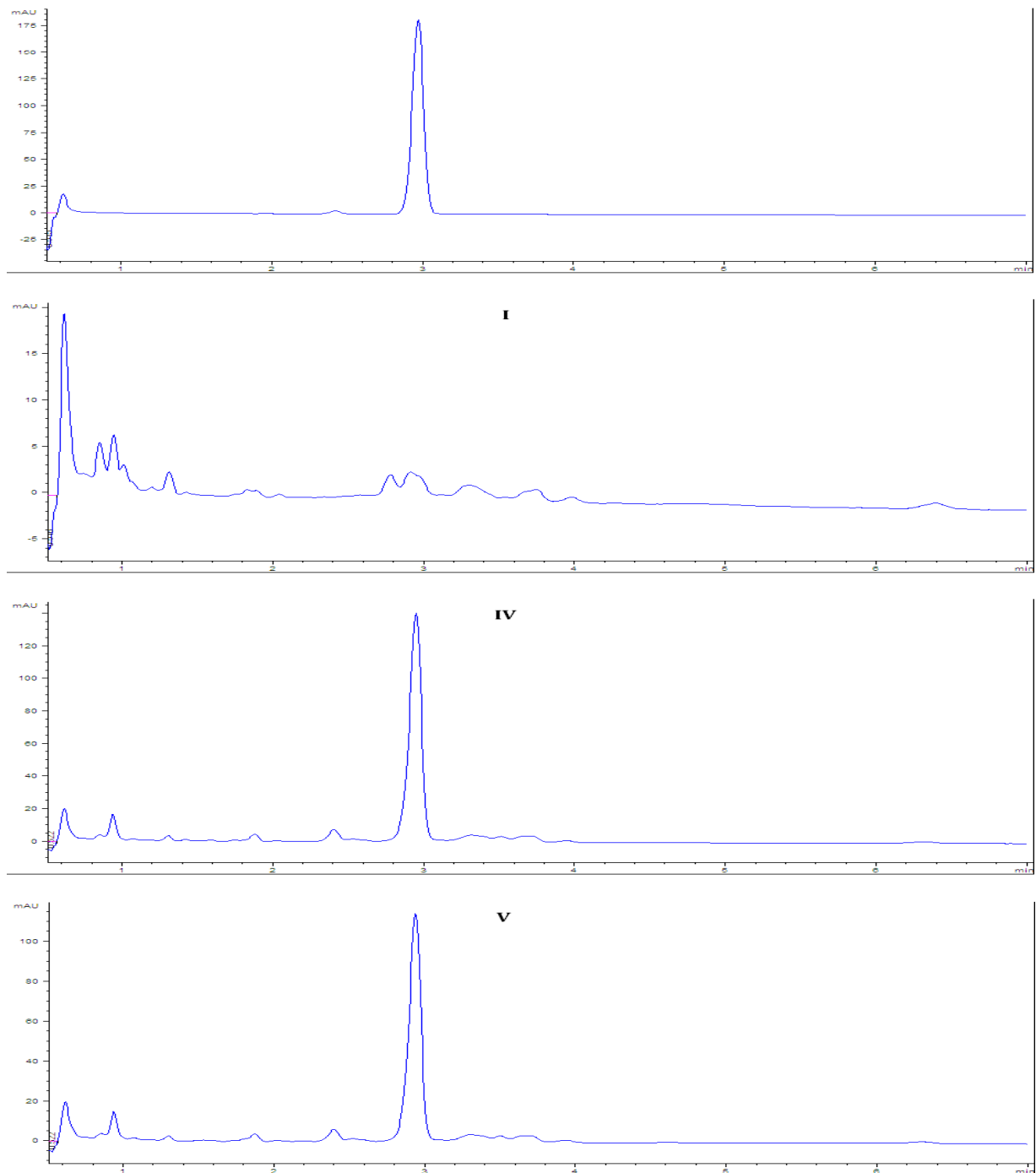
Slika 7.11. HPLC-DAD hromatogrami standarda β -karotena i karotenoida u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



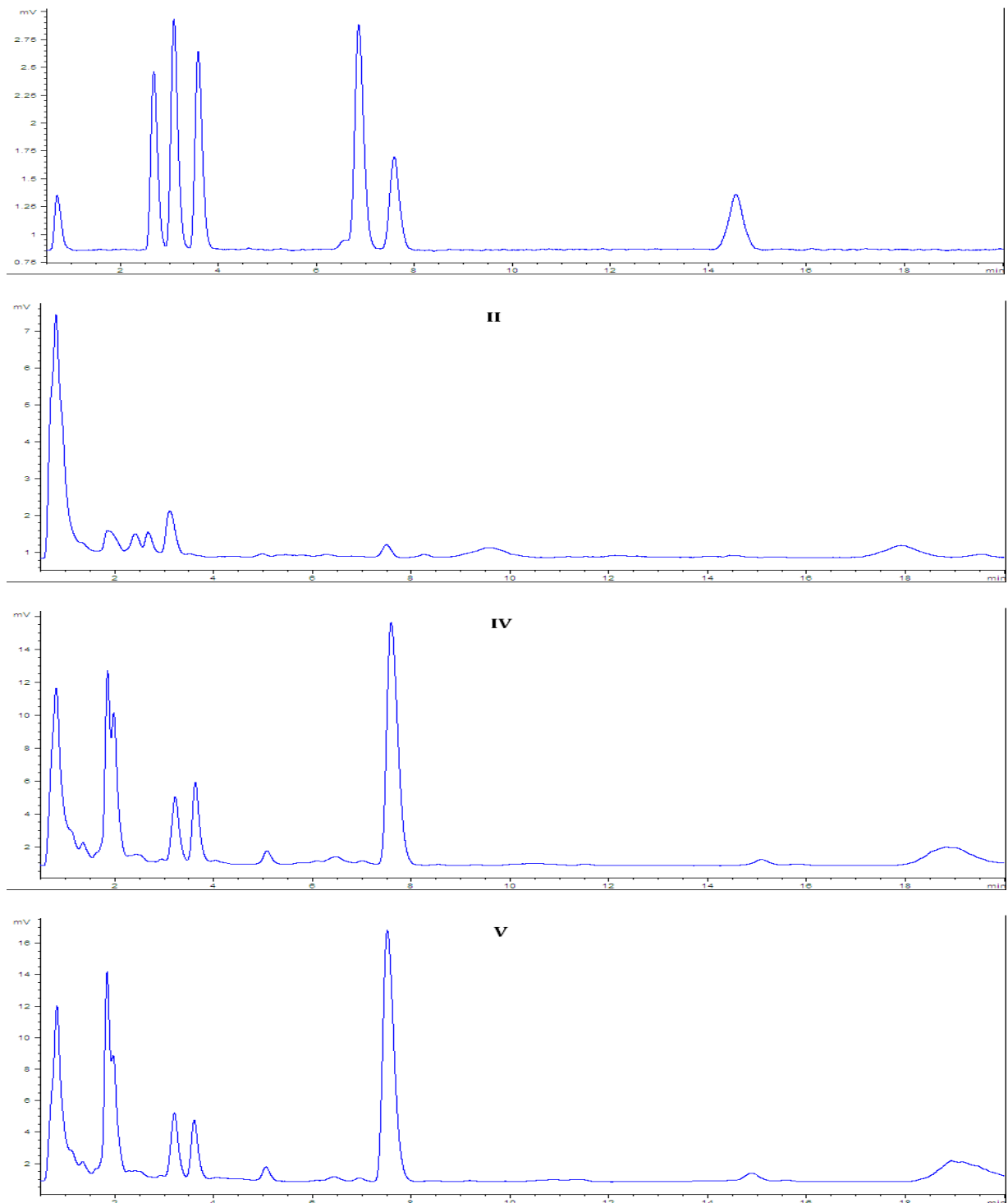
Slika 7.12. HPLC-DAD hromatogrami karotenoida u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



Slika 7.13. HPLC-DAD hromatogrami karotenoida u ispitivanim uzorcima cijanobakterija



Slika 7.14. HPLC-DAD hromatogrami standarda holesterola i holesterola u ispitivanim uzorcima fecesa eksperimentalnih grupa pacova



Slika 7.15. HPLC-ELSD hromatogrami standarda žučnih kiselina i žučnih kiselina u ispitivanim uzorcima fecesa eksperimentalnih grupa pacova