

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Sanja M. Milović

**Nutritivna, hemijska i biološka karakterizacija morskih
algi *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira
barbata* i morske trave *Cymodocea nodosa* iz Jadranskog
mora**

Doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Sanja M. Milović

**Nutritional, chemical and biological characterisation of
seaweeds *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira
barbata* and seagrass *Cymodocea nodosa* from the Adriatic
Sea**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Doktorska disertacija je urađena na Katedri za bromatologiju i Katedri za farmakognoziju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Deo eksperimenata je urađen na Institutu za medicinsku hemiju i farmakognoziju, Koledž za farmaciju, Univerzitet u Čikagu i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Mentor:

Dr sc. Ivan Stanković (mentor), redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Članovi Komisije:

Dr sc. Tatjana Kundaković-Vasović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Dr sc. Tatjana Stanojković, viši naučni saradnik
Institut za onkologiju i radiologiju Srbije

Dr sc. Slavica Petović, viši naučni saradnik
Univerzitet Crne Gore, Institut za biologiju mora

Datum odbrane: _____

Najveću zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Ivanu Stankoviću i prof. dr Tatjani Kundaković-Vasović na poverenju i idejama u toku formulisanja eksperimentalnog dela doktorke disertacije, kao i na konstantnoj podršci i sugestijama prilikom pisanja doktorske teze.

Posebnu zahvalnost dugujem i dr sc. Tatjani Stanojković iz Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, na ispitivanju citotoksične aktivnosti ekstrakata i izolovanog jedinjenja, kao i na savetima prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i :

- kolegama iz Instituta za biologiju mora, iz Kotora (Univerzitet Crne Gore), dr sc. Vesni Mačić i dr sc. Slavici Petović na savetima na polju biologije algi i morskih trava, kao i na informacijama o njihovom biodiverzitetu.*
- dr sc. Dejanu Nikoliću iz Instituta za medicinsku hemiju i farmakognoziju, Koledž za farmaciju, Univerzitet u Čikagu i mag. farm. Violeti Milutinović sa Katedre za farmakognoziju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na snimanju HR-MS spektra izolovanog jedinjenja, kao i na pomoći u obradi i prezentaciji navedenih spektara.*
- dipl. biol. Nađi Grozdanić, sa Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije, na ispitivanju anti α -glukozidazne i citotoksične aktivnosti ekstrakata i izolovanog jedinjenja.*
- dr sc. Ivani Đuričić sa Katedre za bromatologiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na pomoći u ispitivanju sadržaja masnih kiselina u ispitivanim uzorcima.*
- mag. farm. Jeleni Radović i mag. farm. Marini Kolundžić na tehničkoj i savetodavnoj pomoći u izvođenju eksperimentalnog dela disertacije urađenog na Katedri za farmakognoziju.*
- dr sc. Milošu Petkoviću sa Katedre za organsku hemiju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na snimanju NMR spektara izolovanog jedinjenja.*
- prof. dr Vesni Nikolić sa Instituta za organsku hemiju, Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, na analizi mineralnog sastava izabranih uzoraka.*
- prof. dr Jeleni Antić Stanković i dr sc. Brankici Filipić na pomoći i savetima prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti odabranih uzoraka.*

Zaposlenima na Katedri za bromatologiju i zaposlenima na Katedri za farmakognoziju, Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, izražavam veliku zahvalnost na podršci i razumevanju prilikom izrade doktorske disertacije.

Svojim najbližima i svojoj porodici, dugujem najveću zahvalnost na podršci, ljubavi i konstantnoj motivaciji ka uspehu.

Nutritivna, hemijska i biološka karakterizacija morskih algi *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* i morske trave *Cymodocea nodosa* iz Jadranskog mora

Sažetak

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije su tri morske alge: *Halimeda tuna* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux (Halimedaceae), *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh (Codiaceae), *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh (Sargassaceae) i morska trava *Cymodocea nodosa* (Urcia) Ascherson (Cymodoceaceae) iz Jadranskog mora.

Nutritivna vrednost odabranih uzoraka je ispitivana korišćenjem zvaničnih AOAC (Association of Official Analytical Chemists) metoda. Najveću energetska vrednost, u navedenim ispitivanjima, imala je zelena alga *C. bursa* (490,4 kcal).

Metodom hladne maceracije u trajanju od 48 sati, dobijena su tri polarna ekstrakta: dihlormetan : metanolni (1:1) (DME), 70% metanolni i vodeni ekstrakt. Suvi ekstrakti su dalje korišćeni za biološka *in vitro* ispitivanja kao što su: antioksidativna, antimikrobna, anti α -glukozidazna i citotoksična aktivnost. DME ekstrakt *H. tuna* je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost prema ćelijama humanog karcinoma kolona, LS174 ($IC_{50}=17,92 \pm 1,54 \mu\text{g/ml}$). DME ekstrakt *C. nodosa* je pokazao snažnu citotoksičnu aktivnost prema ćelijama humanog adenokarcinoma, HeLa ($IC_{50}=13,28 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$) i prema ćelijama humane hronične mijelogene leukemije, K562 ($IC_{50}=19,64 \pm 1,55 \mu\text{g/ml}$). Najbolju anti α -glukozidaznu aktivnost ($IC_{50}=9,98 \pm 3,34 \mu\text{g/ml}$) i najbolju antibakterijsku aktivnost (MIC 100 $\mu\text{g/ml}$) prema *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis* je ispoljio DME ekstrakt *C. barbata*.

Razvojom odgovarajuće HPLC metode, kao i primenom odgovarajućih metoda detekcije identifikovana su tri jedinjenja (diosmetin-7-sulfat, kaftarinska i kutarinska kiselina) u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*.

Sadržaj β -glukana, masnih kiselina, sterola i mikro- i makroelemenata je ispitivan u svim navedenim uzorcima. Najveći sadržaj β -glukana bio je u morskoj travi *C. nodosa* ($13,04 \pm 0,42 \text{ g/100 g}$). *C. nodosa*, morska trava, pokazala je najviši sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA, 7,157 mg/g). Značajan sadržaj sterola (fukosterol, $21,76 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$) i najbolji odnos polinezasićenih i zasićenih (SFA) masnih kiselina, PUFA/SFA (0,08) pokazan je kod mrke alge *C. barbata*. Zelene alge, *C. bursa* i *H. tuna*, imale su najveći sadržaj sterola (β -sitosterol, $95,21 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ i $73,90 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$, respektivno). Najviši sadržaj kalcijuma (Ca), u količini od 55125 $\mu\text{g/g}$, detektovan je kod alge *H. tuna*.

Ključne reči: *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata*, *Cymodocea nodosa*, alge, morska trava

Naučna oblast: Farmacija.

Uža naučna oblast: Bromatologija.

UDK broj:

Nutritional, chemical and biological characterisation of seaweeds *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata* and seagrass *Cymodocea nodosa* from the Adriatic Sea

Abstract

The research subject of doctoral dissertation were three seaweeds: *Halimeda tuna* (J. Ellis & Solander) J.V. Lamouroux (Halimedaceae), *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh (Codiaceae), *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh (Sargassaceae) and the one seagrass *Cymodocea nodosa* (Urcia) Acherson (Cymodoceaceae) from the Adriatic Sea.

Nutritional value of selected samples were investigated by official AOAC (Association of Official Analytical Chemists) methods. The highest energy value had the green seaweed *C. bursa* (490,4 kcal).

Using the cold maceration extraction, lasting 48 h, the three polar extracts were obtained: dichlorometan: methanol (1:1) (DME), 70 % methanol and aqueous extracts. The dry extracts were further used for biological *in vitro* investigations, such as: antioxidative, antimicrobial, anti α -glucosidase and cytotoxic activity.

DME extract of *H. tuna* has shown the best cytotoxic activity against human colon carcinoma cell line, LS174 ($IC_{50}=17,92 \pm 1,54 \mu\text{g/ml}$). DME extract of *C. nodosa* had strong cytotoxicity against human adenocarcinoma cell line, HeLa ($IC_{50}=13,28 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$) and human chronic myelogenous leukaemia cell line, K562 ($IC_{50}=19,64 \pm 1,55 \mu\text{g/ml}$). The best anti α -glucosidase ($IC_{50}=9,98 \pm 3,34 \mu\text{g/ml}$) and best antibacterial activity (minimal inhibitory concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$) for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* was demonstrated in DME extract of seagrass *C. nodosa*.

Developing the appropriate HPLC method, accompanied with the appropriate detection methods, the three compounds were identified (diosmetin-7-sulfate, caftaric and coumaric acid) in the DME extract of seagrass *C. nodosa*.

The content of β -glucan, fatty acids, sterols and micro- and macroelements were investigated in all samples. The highest content of β -glucan was detected in *C. nodosa* seagrass ($13,04 \pm 0,42 \text{ g/100 g}$). *C. nodosa* had also the highest level of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ($7,157 \text{ mg/g}$). Significant sterol content (fucosterol, $21,76 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$) and the best ratio of polyunsaturated and saturated (SFA) fatty acids, PUFA/SFA (0,08) was shown in *C. barbata*, brown seaweed. Green algae, *C. bursa* and *H. tuna*, showed the highest level of sterols (β -sitosterol, $95,21 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ and $73,90 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$, respectively). *H. tuna* had the highest content of calcium (Ca) in amount of $55125 \mu\text{g/g}$.

Key words: *Halimeda tuna*, *Codium bursa*, *Cystoseira barbata*, *Cymodocea nodosa*, seaweeds, seagrass.

Academic expertise: Pharmacy.

Major in: Bromathology.

UDC number:

UVOD	1
1. Morske alge	1
1.1 Ispitivani predstavnici morskih algi.....	2
2. Morske trave	5
2.1 Ispitivani predstavnik morskih trava.....	5
3. Primena morskih algi i morskih trava u ishrani i farmaciji	6
3.1 Morske alge i morske trave u ishrani	7
3.1.1 Ugljeni hidrati u algama i morskim travama	8
3.1.2 Proteini i aminokiseline u algama i morskim travama.....	9
3.1.3 Lipidi u algama i morskim travama	10
3.1.4 Mikro- i makroelementi u algama i morskim travama	11
3.1.5 Vitamini u algama i morskim travama	12
3.2 Sekundarni metaboliti u algama i morskoj travi.....	13
3.3 Biološke aktivnosti ekstrakata algi i morske trave	19
3.3.1 Antioksidativna aktivnost	19
3.3.2 Antimikrobna aktivnost	20
3.3.3 Antitumorska aktivnost	20
3.3.4 Antikoagulantna aktivnost	21
3.3.5 Hipoholesterolemijska i antihipertenzivna aktivnost	21
3.3.6 Anti α -glukozidazna aktivnost	22
CILJ RADA	23
MATERIJALI I METODE	24
1. Biljni materijal	24
1.1 Priprema biljnog materijala i ekstrakcija	26
2. Nutritivna i hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka	27
2.1 Određivanje energetske vrednosti	27
2.1.1 Određivanje sadržaja vlage	27
2.1.2 Određivanje sadržaja pepela	28
2.1.3 Određivanje sadržaja lipida	28
2.1.4 Određivanje ukupnih proteina	28
2.1.5 Određivanje sadržaja celuloze	30
2.1.6 Određivanje ukupnih ugljenih hidrata	30
2.1.7 Određivanje ukupnih dijetnih vlakana	31

2.2. Hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka	34
2.2.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza slobodnih aminokiselina (LC-MS)	34
2.2.2 Priprema uzoraka, kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina i sterola (GC-FID/MS)	36
2.2.3 Priprema uzoraka, kvalitativna i kvantitativna analiza mikro- i makroelemenata metodom ICP-OES.....	40
2.2.4 Kvantitativna analiza β -glukana	43
3. Biološke aktivnosti ekstrakata ispitivanih uzoraka algi i morske trave	48
3.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave	48
3.1.1 Testirani mikroorganizmi	48
3.1.2 Hranljive podloge	48
3.1.3 Postupak pripreme rastvora za analizu i postupak ispitivanja antimikrobne aktivnosti	49
3.2 Antioksidativna aktivnost ekstrakata algi i morske trave	50
3.3 Analiza citotoksične aktivnosti	52
3.3.1 Izabrane ćelijske linije	52
3.3.2 Tretman ćelijskih linija	53
3.3.3 Test određivanja ćelijskog preživljavanja (MTT test)	53
3.4 Ispitivanje anti α -glukozidazne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave	54
4. Hemijska analiza biološki aktivnih ekstrakata	55
4.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina (GC-FID)	55
4.2 Kvantitativna analiza ukupnih polifenola, metodom po Folin-Ciocalteu, iz ekstrakata	56
4.3 Ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja LC-MS hromatografijom iz ekstrakata	57
5. Izolacija jedinjenja semipreparativnom HPLC hromatografijom	58
6. LC/MS analiza izolovanog jedinjenja iz ekstrakta morske trave <i>C. nodosa</i>.....	58
7. NMR analiza izolovanog jedinjenja	59
REZULTATI I DISKUSIJA	60
1. Hemijska karakterizacija izabranih uzoraka algi i morske trave	61
1.1 Sadržaj ugljenih hidrata, lipida, proteina, celuloze i energetska vrednost izabranih uzoraka algi i morske trave	61
1.2. Sadržaj mikro- i makroelemenata u uzorcima algi i morske trave	63
1.3. Sadržaj dijetnih vlakana u uzorcima algi i morske trave	68
1.4. Sadržaj masnih kiselina u uzorcima algi i morske trave	69

1.5. Sadržaj sterola u uzorcima algi i morske trave	72
1.6. Sadržaj β -glukana u uzorcima algi i morske trave	74
1.7. Sadržaj slobodnih aminokiselina u uzorcima algi i morske trave	75
2. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata algi i morske trave	76
2.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina u ekstraktima algi i morske trave	76
2.2. Antioksidativna aktivnost i sadržaj polifenola u ekstraktima algi i morske trave	81
2.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata algi i morske trave	82
2.4. Citotoksična aktivnost ekstrakata algi i morske trave	84
2.5. Anti α -glukozidazna aktivnost ekstrakata algi i morske trave	85
2.6. Ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja u ekstraktima algi i morske trave LC-MS hromatografijom	87
2.7. HR-MS analiza i NMR spektar jedinjenja izolovanog iz morske trave <i>C. nodosa</i>	91
2.8. Ispitivanje citotoksične aktivnosti jedinjenja izolovanog iz morske trave <i>C. nodosa</i>	96
3. Nutritivni potencijal izabranih algi i morske trave	97
ZAKLJUČAK	101
LITERATURA	103
BIOGRAFIJA	119

UVOD

Alge i morske trave predstavljaju biljne organizme čiji je život vezan za vodenu sredinu (Jančić i Lakušić, 2017).

U Jadranskom moru je identifikovano preko 660 vrsta morskih algi, od toga: 125 mrkih algi (*Phaeophyta*), 105 zelenih algi (*Chlorophyta*), 300 vrsta pripada crvenim algama (*Rhodophyta*) i oko 130 modrozelenim algama (*Cyanophyta*) (Ercegović, 1960).

Među mrkim algama, u Jadranskom moru, najzastupljenije su alge roda *Cystoseira*, među kojima je i nekoliko endemo-jadranskih vrsta. U Jadranskom moru se mogu pronaći i predstavnici mrkih algi roda *Fucus*, među kojima je najznačajniji, endemični - *Fucus virsoides*. Kao glavni stanovnik stenovite obale izdvaja se mrka alga *Padina pavonica*, bogat izvor kalcijum karbonata, a takođe su zastupljene i vrste roda *Sargassum* (Blaženčić, 1994).

Među zelenim algama zabeleženi su predstavnici roda *Ulva* (*Ulva lactuca*), a takođe su identifikovani i predstavnici roda *Halimeda* (*Halimeda tuna*) i *Codium* (*Codium bursa*, *C. fragile*) (Blaženčić, 1994).

U bentosnoj flori dubinskih zona Jadranskog mora dominantne su crvene alge (*Sebdenia dichotoma*, *Polysiphonia indigena*, *Gracilaria corallicola* i druge) (Ercegović, 1960).

U Jadranskom moru identifikovane su četiri vrste morskih trava kao što su: *Posidonia oceanica*, *Zostera subg. Zostera marina*, *Zostera noltei* i *Cymodocea nodosa* (Antolić, 2011).

1. Morske alge

Morske alge imaju veliku ulogu kao primarni proizvođači hrane u morskom ekosistemu. Svaka ćelija talusa (tela alge) vrši fotosintezu, upijajući mineralne materije i vodu iz spoljašnje sredine. Telo algi može biti: jednoćelijsko, višećelijsko (listoliko ili končasto), sifonalno ili kolonijalno, različite veličine, od nekoliko mikrometara do više desetina metara. Neke alge mogu slobodno da lebde ili plivaju, a druge mogu biti pričvršćene za morsko dno (bentos), ili pričvršćene za druge alge ili morske trave (Jančić i Lakušić, 2017).

Alge su klasifikovane u 10 osnovnih grupa - razdela, u skladu sa pigmentima koje poseduju, kao: modrozelenene alge (*Cyanophyta*), crvene alge (*Rhodophyta*), vatrene alge (*Pyrrophyta*), žutozelene alge (*Xanthophyta*), zlatne alge (*Chrysophyta*), silikatne alge (*Bacillariophyta*), mrke alge (*Phaeophyta*), euglenofita (*Euglenophyta*), zelene alge

(*Chlorophyta*) i pršljenčice (*Charophyta*) (Blaženčić, 1994). U svetu je opisano više od 10000 vrsta algi (oko 6500 crvenih, 2000 mrkih, 1500 zelenih) (Collins, 2016).

Zelene alge su prisutne u priobalnim vodama i sposobne su da apsorbuju veliku količinu sunčeve svetlosti zbog prisustva hlorofila a i b, luteina, violaksantina, neoksantina i enteroksantina. Crvene morske alge sadrže hlorofil a i d, fikoeritrin i fikobilin. Obzirom da su crvene alge prilagođene životu na većim dubinama, penetracija sunčeve svetlosti do njih je ograničena. Mrke alge su pronađene u dubokim okeanskim vodama i njihovi pigmenti su: hlorofil a i c, karoteni i ksantofili, među kojima su najznačajniji: fukoksantin i flavoksantin (Bocanegra, 2009; Hong, 2014).

Zelene alge (*Chlorophyceae*), podeljene su u klase: *Volvocophyceae*, *Tetrasporophyceae*, *Protococcophyceae*, *Ulothrichophyceae*, *Siphonophyceae* i *Conjugatophyceae*. U okviru klase *Siphonophyceae*, i reda *Siphonales*, izdvojene su familije *Caulerpaceae*, *Bryopsidaceae* i *Codiaceae*. U okviru familije *Caulerpaceae* poznati su rodovi *Caulerpa*, *Udotea* i *Halimeda*. Familija *Codiaceae*, ima samo rod *Codium*, koji obuhvata oko 50 vrsta (Blaženčić, 1994).

Razdeo mrkih algi (*Phaeophyta*) prepoznaje više klasa: *Ectocarpophyceae*, *Laminariophyceae*, *Fucophyceae*. Klasa *Fucophyceae* razlikuje redove: *Fucales*, *Cystoseira* i *Sargassum* (Blaženčić, 1994).

U okviru ove doktorske disertacije ispitane su dve zelene alge: *Halimeda tuna* i *Codium bursa* i jedna mrka alga, *Cystoseira barbata*.

1.1 Ispitivani predstavnici morskih algi

Halimeda tuna (J. Ellis & Solander) J. V. Lamouroux, Halimedaceae - rod *Halimeda* J. V. Lamouroux, spada u razdeo zelenih algi (*Chlorophyta*). Talus je građen od srcastih ili bubrežastih članaka koji su manje ili više spljošteni i ispunjeni kalcijum karbonatom (**Slika 1**). Sa bočnih članaka polazi grupa sporangija u kojima se obrazuju zoospore. Zoospore su ovalne, sa po dva biča, a njihovo klijanje i dalje razviće su nepoznati. Za ovu algu, koja se može naći na dubinama i do 70 m, smatra se da je jedan od najznačajnijih stvaraoca sedimenta, pa čak i da je po pitanju stvaranja kalcijum karbonata značajnija od brojnih korala (Ballesteros i Sagarra, 1981).

Rod *Halimeda* obuhvata oko 15 vrsta. *H. tuna*, rasprostranjena je u Sredozemnom moru i okolnim morima (Blaženčić, 1994), a pronađena je i u Atlanskom i Indijskom okeanu (Costello, 2001).



Slika 1. *Halimeda tuna* (J. Ellis & Solander) J. V. Lamouroux, Halimedaceae

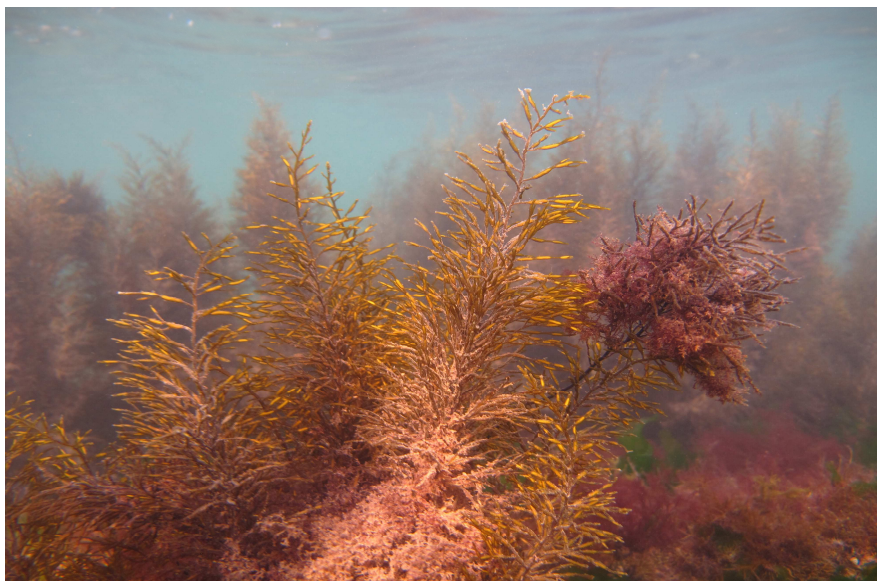
Codium bursa (Olivi) C. Agardh, Codiaceae - rod *Codium* Stackhouse je široko rasprostranjen u svim svetskim morima, pokazuje veliku varijabilnost vrsta i nalazi se na različitim staništima (**Slika 2**). Spada u razdeo zelenih algi (*Chlorophyta*). Poznato je oko 150 *Codium* vrsta. Telo alge (talus) je najočiglednija i najrazličitija karakteristika ove vrste. Talus *Codium* vrsta može da se širi po čvrstom tlu, može da formira sferne oblike ili da raste u visinu, cilindričnih, pljosnatih grana (Verbruggen, 2007).

Vrsta *C. bursa* je rasprostranjena u Sredozemnom moru i Atlanskom okeanu. Identifikovana je na obalama Portugalije, Nemačke i Irske. Talus biljke se može pronaći u različitim veličinama od 8-40 cm. Alga ima sunderast, sferni, često izduvani izgled i prijatan morski miris (**Slika 2**). *C. bursa* boravi na kamenitom dnu dubine do 50 m i često je praćena morskom travom *Posidonia oceanica* (L.) Delile (Verbruggen, 2007).



Slika 2. *Codium bursa* (Olivi) C. Agardh, Codiaceae

Cystoseira barbata (Stackhouse) C. Agardh, Sargassaceae - spada u razdeo mrkih algi (*Phaeophyta*). Talus predstavnika *Cystoseira* vrsta visok je i do 1 m. Talus je žbunast, razgranat, sa cilindričnim granama, za tlo pričvršćen pločastim proširenjima ili rizoidima (**Slika 3**). *C. barbata*, indikator je dobrog kvaliteta morske vode, a poznata je njena velika tolerancija na promene temperature i saliniteta (Rodríguez Prieto i sar, 2015). U Jadranskom moru prisutno je nekoliko endemo-jadranskih oblika roda *Cystoseira*, kao što su: *C. amentacea*, *C. pelagosae*, *C. montagnei* i dr. *C. barbata* je takođe pronađena i u Severnoatlanskom okeanu i Sredozemnom moru (Costello, 2001).



Slika 3. *Cystoseira barbata* (Stackhouse) C. Agardh, Sargassaceae

2. Morske trave

Morske trave predstavljaju grupu pravih biljaka koje su se potpuno prilagodile životu u moru. Za razliku od algi, morske trave, imaju habitus na kome se jasno razlikuju koren, stablo, list i cvet (Hogarth, 2007). U literaturi se može naći i alternativni naziv - morske cvetnice. Pripadaju grupi skrivenosemnica (*Angiospermae*) (Nikolić, 2013).

Stanište morskih trava je specifično po pitanju rastresitosti i nestabilnosti podloge, saliniteta i male količine svetlosti neophodne za fotosintezu (mogu naći i na dubinama do 90 metara). Rizomi morskih trava imaju više korenova kojima su pričvršćeni za morsko tlo, obrazujući podvodne livade. Morske trave imaju ulogu zadržavanja i smanjenja pokretljivosti sedimenta i protoka vode, čineći na taj način sredinu pogodnu za razvoj drugih morskih organizama (Hemminga i Duarte, 2000).

Cvetovi, ukoliko postoje, mali su i dvopolni. Oko 50-60% biomase morskih trava nalazi u rizomu i korenu (Hogarth, 2007).

2.1 Ispitivani predstavnik morskih trava

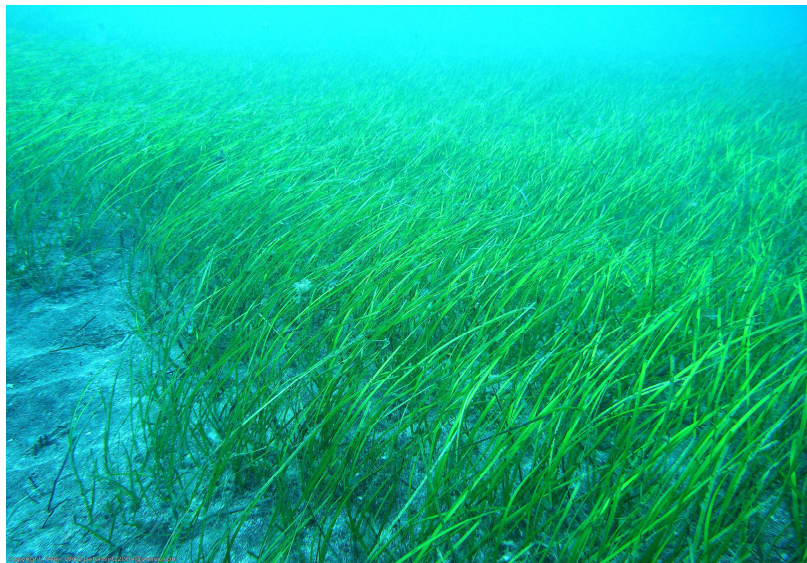
Cymodocea nodosa (Urcia) Acherson, Cymodoceaceae - spada u red *Alismatales* koji sadrži 14 porodica sa 166 rodova i 4490 vrsta. Red *Alismatales* se izdvojio kao nezavisna evolucionarna linija još pre 131 miliona godina, a još veća podela se dogodila pre 128 miliona

godina. Red obuhvata male porodice koje mogu biti prilagođene životu u slatkoj vodi, ali u ovaj red spadaju i jedine žive morske skrivenosemenice (Nikolić, 2013).

Familija Cymodoceaceae, kojoj pripada ispitivana morska trava *C. nodosa* (Slika 4), zajedno sa familijama Potamogetonaceae, Zosteraceae, Zannichelliaceae, Ruppiaceae, Posidoniaceae, odlikuje polen bez apertura ili ređe izostanak egzine. Takođe, pripadnike ovih porodica karakterišu i krunični listići sa jednim provodnim snopićem, kratki prašnici, kao i slabo razvijen primarni koren. Cymodoceaceae je mala familija morskih cvetnica koja sadrži 5 rodova sa 16 vrsta, rasprostranjena je u tropskim krajevima, a pripadnici ove familije uspevaju i na dubinama od 0,5 do 40 m. (Nikolić, 2013).

C. nodosa često raste udružena sa drugim morskim travama kao što su *Zostera noltei* i *Posidonia oceanica* (Ballesteros i Sagarra, 2015).

C. nodosa je pronađena u Severnoatlanskom okeanu i Sredozemnom moru (Costello, 2001).



Slika 4. *Cymodocea nodosa* (Urcia) Acherson, Cymodoceaceae

3. Primena morskih algi i morskih trava u ishrani i farmaciji

Iz algi i morskih trava je do sada izolovano preko 10000 metabolita sa izraženom farmakološkom aktivnošću. Pokazan je širok spektar farmakoloških aktivnosti, kao što su: antibakterijska, anitifungalna, hipoglikemijska, citotoksična, neurotoksična, hipolipemijska, antimitotska, antivirusna i antineoplastična aktivnost. U poslednje vreme se ispituju imunosupresivna i antiinflamatorna aktivnost, kao i primena algi u tretmanu Alchajmerove

bolesti i u tretmanu oboljenja izazvanog virusom humane imunodeficijencije (HIV) (Freeman, 2008; Tierney, 2010; Mohamed, 2012).

Makroalge su bogat izvor proteina, minerala, vitamina, antioksidanasa, polinezasićenih masnih kiselina, neskrobnih polisaharida (kao što su karagenan i alginat) i drugih prirodnih proizvoda (Mohamed, 2012; Miyashita, 2013). Enzimi sisara nemaju mogućnost razlaganja neskrobnih algalnih polisaharida, pa se oni mogu tretirati uglavnom kao rastvorna dijetna vlakna. Morske alge sadrže visok nivo esencijalnih aminokiselina, a proteinski sadržaj algi je sličan povrću (Mabeau, 1993; Wong, 2003). Alge su dobar izvor minerala, kao što su jod (I), magnezijum (Mg), gvožđe (Fe), cink (Zn) i kalcijum (Ca) (Lange, 2015).

3.1 Morske alge i morske trave u ishrani

U brojnim kulturama, postoji duga tradicija primene algi u ishrani. U zapadnim zemljama, alge su izvor fikokoloida, supstanci za geliranje i učvrćivanje, koje imaju različitu primenu u industriji hrane. Vlada Francuske je 1990. godine objavila izveštaj u kome se alge prihvataju kao povrće i začini, što je uticalo na njihovu povećanu eksploataciju (De La Santé, 2004). Morske alge su bogat izvor polisaharida koji se široko eksploatišu u industriji hidrokoloida: alginati iz mrkih algi, karagenan i agar iz crvenih algi. Drugi, manje zastupljeni polisaharidi, pronađeni u ćelijskom zidu algi su sulfonovana fukoza (mrke alge), ksilani (zelene i crvene alge) i celuloza (prisutna kod svih vrsta algi i morskih trava).

Alge su bogat izvor polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i sadrže esencijalne masne kiseline neophodne u ishrani ljudi (Floreto, 1996). Pored masnih kiselina, alge i morske trave su prepoznat izvor fitosterola (Floreto, 1996). Brojne kliničke studije su pokazale vezu između konzumacije fitosterola i smanjenja nivoa holesterola u serumu (Lichtenstein, 2000; Sánchez-Machado, 2004). Kod mrkih algi, dominantni steroli koji su identifikovani su fukosterol i njegovi derivati (Piovetti, 1991).

Visok sadržaj mineralnih materija u algama je dobro poznat (8-40%) (Serge, 1993). Morske trave su bogate esencijalnim mineralnim materijama i elementima u tragovima, koje je teško pronaći u terestičnim biljkama (Omar, 2015).

3.1.1 Ugljeni hidrati u algama i morskim travama

Zastupljenost i tip ugljenih hidrata u algama je jako varijabilan i zavisi pre svega od vrste algi. Alge su specifične po tome što je sadržaj polisaharida u njima daleko viši nego kod većine voća i povrća. Konzumiranje algi, zbog visokog sadržaja dijetnih vlakana, ima povoljan uticaj na zdravlje, a neki od literaturno dokumentovanih efekata su: povoljno dejstvo na rast korisnih bakterija intestinalne flore (Goni i sar, 2001), hipoglikemijsko dejstvo, uz smanjenje resorpcije glukoze iz intestinuma (Goñi i sar, 2000), povećanje volumena stolice i smanjenje rizika od kancera kolona (Urbano i Goni, 2002), i povoljan uticaj na kontrolu nivoa holesterola u krvi (Jiménez-Escrig i Sánchez- Muniz, 2000).

Kod zelenih algi identifikovani su skrob, celuloza, ksilani, manani i jonizovani polisaharidi koji u svom sastavu sadrže sulfatne grupe i uronsku kiselinu. Kod ove grupe algi, identifikovani su i sledeći šećeri: ramnoza, ksiloza, galaktoza i arabinoza (Lahaye i sar, 1991). Kod pojedinih predstavnika roda *Codium*, identifikovan je β -(1,4)-D-manan, kao glavna gradivna komponenta ćelijskog zida, koja zamenjuje celulozu, za koju je uobičajeno da se nalazi u ćelijskom zidu drugih vrsta algi (Fernández i sar, 2012).

Tipični ugljeni hidrati, zastupljeni kod različitih vrsta mrkih algi su: fukoidan, laminarin (β -1,3-glukan), celuloza, alginati i manitol. Vlakna, prisutna u mrkim algama su uglavnom nerastvorna dijetna vlakna uključujući celulozu. Alginati su 1,4-polimeri β -D-manuronske kiseline i α -L-guluronske kiseline, koji se najčešće nalaze u obliku soli kalcijuma, magnezijuma i natrijuma. Glavni rezervni polisaharidi kod mrkih algi su laminarin (β -(1,3)-D-glukoza sa nekoliko 1,6-glikozidnih veza i redukcionim krajevima koji su zamenjeni manitolom) i manitol, a ne skrob, kao što je slučaj kod drugih vrsti algi (Van Den Hoek i sar, 1993). Grupa sulfonovanih polisaharida, fukani, identifikovana je kod mrke alge *C. barbata*. Za fukane je poznato da imaju dobru antioksidativnu aktivnost (Sellimi, 2014).

Kod crvenih algi, karakterističan je takozvani, floridinski skrob (eng. floridean starch) po strukturi α -1,4-glukan, a prisutni su i celuloza i manan. Frakcija hidrosolubilnih dijetnih vlakana, kod crvenih algi, se sastoji iz sulfonovanih polisaharida - galaktana, kao što su agar i karagenan (Van Den Hoek i sar, 1993; Jiménez-Escrig i Sánchez-Muniz, 2000).

Morske trave, sadrže uobičajene ugljene hidrate koji su karakteristični i za terestične biljke, kao što su saharoza, glukoza i galaktoza. Za morske trave, karakteristični su i ciklitoli, polihidroksilni derivati cikloheksana, koji sadrže inozitol u svojoj strukturi. Najprisutniji ciklotol u ovim organizmima je mionozitol (Drew, 1983). Kod morske trave *C. nodosa*, koja

je ispitivana u ovoj doktorskoj disertaciji, glavni rezervni šećer je saharoza, koja se u najvećoj količini nalazi u rizomu. U listovima ove morske trave, dominantan ugljeni hidrat je 1-hiro-inozitol (Pirc, 1989). Postoje podaci, da sulfonovani polisaharidi, prisutni kod morske trave *C. nodosa*, ispoljavaju značajnu anti α -glukozidaznu aktivnost i imaju veliki potencijal u kontroli dijabetesa (Kolsi i sar, 2015).

3.1.2 Proteini i aminokiseline u algama i morskim travama

Sadržaj proteina u algama je različit i najviše zavisi od sezone i uslova sredine u kojoj se alge razvijaju. Poznato je da je sadržaj proteina u algama nešto viši u zimskom i prolećnom periodu (Galland-Irmouli, 1999). Proteinski sadržaj zavisi i od vrste algi, a poznato je da crvene alge imaju viši sadržaj ukupnih proteina (21-47 g/100 g), nego mrke alge (7-16 g/100g) (Dawczynski i sar, 2007). Sadržaj proteina u jestivim algama kao što su nori (*Pyropia tenera*) i dulce (*Palmaria palmata*) kreće se između 35% i 47%, izraženo na suhu materiju (Morgan i sar, 1980; Arasaki i Arasaki, 1983).

Sadržaj esencijalnih aminokiselina (EAK) u algama kao što je *Porphyra sp.*, može da se uporedi sa sadržajem EAK u soji ili jajima (Fleurence i sar, 1995; Galland-Irmouli i sar, 1999). Kod mrkih algi roda *Fucus*, dokumentovane su dve dominantne aminokiseline, aparaginska i glutaminska kiselina, u koncentraciji od 22% do 44% u odnosu na ukupne aminokiseline. U zelenim algama sadržaj navedenih aminokiselina se kreće od 26-32% u odnosu na ukupne aminokiseline (Fleurence i sar, 1995).

Rezultati *in vitro* ispitivanja digestibilnosti proteina algi, sprovedenih u prisustvu enzima pepsina, pankreatina i pronaze, ukazuju da crvene alge kao što su dulce i nori, pokazuju bolju digestibilnost u poređenju sa mrkom algom *Undaria pinnatifida* i zelenom algom, *Ulva australis* (Dawczynski i sar, 2007).

Morske trave, generalno, ne predstavljaju bogat izvor proteina. Sadržaj proteina je varijabilan u zavisnosti od dela biljke koji se ispituje (rizom ili list) i u zavisnosti od godišnjeg doba. Pradheeba i sar. (2011), ispitivali su nekoliko vrsta morskih trava među kojima su i dva predstavnika roda *Cymodocea*, pri čemu su zaključili da je najviši sadržaj proteina pronađen u rizomu tokom letnjih meseci.

3.1.3 Lipidi u algama i morskim travama

Alge se mogu smatrati niskoenergetskom hranom, jer sadrže malo masti (1-5%), a bogate su dijetnim vlaknima (Khotimchenko, 2005). Sadržaj ukupnih lipida je varijabilan i zavisi od vrste algi, razlika u tkivu iz kog se lipidi ispituju, godišnjeg doba, ali i uslova okruženja i lokaliteta u kojima se alge nalaze.

Neutralni lipidi i glikolipidi su glavne klase lipidnih jedinjenja prisutnih u svim morskim algama. Takođe, identifikovani su i fosfolipidi u koncentraciji od 4-10% (Miyashita i sar, 2013).

Masne kiseline, prisutne u algama, generalno su linearne strukture, mogu biti zasićene, ali i nezasićene, sa jednom ili više dvostrukih veza (Shameel, 1990). Alge i morske trave, generalno predstavljaju bogat izvor polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), koje imaju značajan uticaj na zdravlje kardiovaskularnog sistema (Kris-Etherton i sar, 2004). Sadržaj PUFA u algama, poreklom iz hladnijih klimatskih podneblja, daleko je viši u poređenju sa algama iz tropskih podneblja, a generalni sadržaj PUFA je viši nego u terestičnim biljkama (Miyashita i sar, 2013).

Sadržaj ukupnih lipida, ispitivan kod 6 vrsta roda *Codium*, kretao se od 7,3% do 21,1% (Xu i sar, 1998). Isti autori su pokazali i da kod četiri uzorka alge *C. duthieae*, postoji velika varijacija u sadržaju ukupnih lipida (12,2-20,7%) što se pripisuje različitim uslovima podneblja u kojima su alge, navedene vrste, sakupljane (Xu i sar, 1998). Najzastupljenije masne kiseline kod zelenih algi roda *Codium*, dokumentovane u literaturi su: palmitinska (16:0), oleinska (18:1, n-9) i linolna (18:3, n-3) (Xu i sar, 1998; Goecke i sar, 2010).

Kod braon alge *C. barbata*, iz Crnog mora (Bugarska) sadržaj ukupnih lipida se kretao između 0,66-0,98% računato u odnosu na svežu masu. Najzastupljenije masne kiseline su bile zasićene masne kiseline (62-71%), a palmitinska kiselina (16:0) je bila dominantna (41-57%) (Ivanova i sar, 2012). U radu, istog autora (Ivanova i sar, 2012), zelena alga *Cladophora vagabunda* je pokazala najviši sadržaj C18 i C20 PUFA.

Sadržaj lipidnih komponenti kod morskih trava, koristi se kao biomarker za praćenje doprinosa morskih trava u lancu ishrane morskog ekosistema (Nichols i sar, 1982). Analizom sadržaja masnih kiselina u morskim travama utvrđeno je da su dominantne masne kiseline bile: palmitinska (16:0), α -linolenska (18:3, n-3), linolna (18:2, n-6) i oleinska kiselina (18:1, n-9) (Nichols i sar, 1982). Kod familije morskih trava Zosterioideae, poreklom iz Japanskog mora, identifikovano je prisustvo glikolipida i fosfolipida. Dominantni glikolipidi su

monogalaktozildiacylglicerol, digalaktozildiacylglicerol i sulfokinovozildiacylglicerol, a dominantni fosfolipidi, identifikovani kod ove vrste morskih trava su: fosfatidilholin (41,8-43,8%) i fosfatidiletanolamin (22,4-24,3%) (Khotimchenko, 1993).

Pored masnih kiselina, neosapunjiva frakcija algi sadrži i karotenoide, kao što je β -karoten, lutein, violaksantin (kod crvenih i zelenih algi) i fukoksantin (mrke alge). Takođe, u navedenoj frakciji, prisutni su i tokoferoli, fitosteroli i terpenoidi (Jensen, 1969).

Fitosteroli imaju veliki značaj u humanoj ishrani, a poznato je dnevni unos 2 g fitosterola, snižava nivo LDL holesterola za 10% (Ostlund, 2002). Dominantan sterol, identifikovan kod mrkih algi je fukosterol. Većina mrkih algi ima prisutan holesterol, u svom sastavu, kao prekursor fukosterola (Sánchez-Machado i sar, 2004a). Crvene alge, sadrže holesterol i dezmosterol. Sadržaj sterola kod zelenih algi je sličan kao kod viših biljaka, a kod ove grupe algi okarakterisani su: stigmasterol, kampesterol, β -sitosterol i holesterol (Sánchez-Machado i sar, 2004b). Kod algi roda *Codium*, identifikovan je klerosterol, karakterističan samo za ovu vrstu zelenih algi (De Napoli i sar, 1982). Takođe je i kod mrkih algi roda *Sargassum*, pronađen saringasterol, specifičan za ovu vrstu (Milkova i sar, 1997).

U radu Gillan i sar (1984), ispitivan je sadržaj sterola u sedam vrsti morskih trava (*Cymodocea serrulata*, *Enhalus acoroides*, *Halodule uninervis*, *Halophila ovalis*, *H. ovata*, *H. spinulosa* i *Thalassia hemprichii*). Prema navedenim podacima, dominantni steroli u ispitivanim morskim travama su sitosterol i stigmasterol (60-90% svih identifikovanih sterola), dok je *izo*-fukosterol identifikovan samo kod *Halophila* vrste (Gillan i sar, 1984).

3.1.4 Mikro- i makroelementi u algama i morskim travama

Morske alge generalno imaju visok sadržaj pepela, što ukazuje na izuzetno visok sadržaj mineralnih materija. Sadržaj mineralnih materija u algama je u proseku oko 36% suve materije, a mineralni sastav zavisi od vrste i podneblja u kom se alge razvijaju. Dominantni minerali su: natrijum (Na), kalcijum (Ca), magnezijum (Mg), kalijum (K), hlor (Cl), sumpor (S) i fosfor (P). Što se tiče mikroelemenata, u algama se uglavnom mogu naći: jod (I), gvožđe (Fe), cink (Zn), bakar (Cu), selen (Se), molibden (Mo), fluor (F), mangan (Mn), bor (B), nikl (Ni) i kobalt (Co) (Kumar i sar, 2008).

Među svim navedenim mineralima, kalcijum se nalazi u proseku od 4-7% suve materije algi. U uobičajenoj dnevnoj porciji algi, od oko 8 g suve materije, nalazi se oko 7% kalcijuma, što je oko 560 mg kalcijuma. Ova informacija je značajna, imajući u vidu

preporučeni dnevni unos (PDU) kalcijuma između 800 i 1000 mg. Kalcijum se u algama nalazi u obliku kalcijum-fosfata, koji pokazuje dobru biološku iskoristljivost (Kumar i sar, 2008).

Alge predstavljaju važan izvor joda, i njegov sadržaj u dnevnoj porciji prevazilazi PDU (150 µg/dnevno). Najviši sadržaj joda pokazan je kod mrkih algi (1500-8000 ppm), a crvene i zelene alge imaju nešto niži sadržaj ovog minerala (Burtin, 2003).

Sadržaj gvožđa i bakra je značajno viši u algama nego što je to slučaj kod uobičajenih namirnica kao što su meso i spanać (Holland i sar, 1993). Takođe, normalna porcija mrkih algi *Laminaria* i *Undaria*, obezbeđuju preko 50% PDU za magnezijum (Kumar i sar, 2008).

Zelena alga *H. tuna* predstavlja jedan od najbogatijih izvora kalcijuma, u poređenju sa drugim algama, sa 22,42% kalcijuma, izraženo na suvu materiju (Biligin i Ertan, 2002).

Morske trave, takođe imaju interesantan mineralni sastav, raznovrsniji nego kod terestričnih biljaka. Immaculate i sar (2018), upoređivali su mineralni sastav 3 morske trave: *Cymodocea serrulata*, *Syringodium isoetifolium* i *Halodule uninervis*. Kod morske trave *C. serrulata* sadržaj magnezijuma je bio visok (1015 mg/100 g), dok su kod *S. isoetifolium* i *H. uninervis* dominantni minerali bili natrijum i kalcijum. Kod morske trave *C. nodosa*, kalcijum i magnezijum bili su dominantni (7000,38 ± 0,48 mg/100 g i 3412,53 ± 0,86 mg/100 g, respektivno) (Kolsi i sar, 2016).

3.1.5 Vitamini u algama i morskim travama

Vitamini su pronađeni u mnogim vrstama algi kao hidrosolubilni vitamini, grupe B i vitamin C i liposolubilni vitamini kao što su vitamin A i vitamin E. Kod mrke alge, *Undaria pinnatifida*, ispitan je sadržaj vitamina E (14,5 mg/100 g) koji se pokazao kao značajno veći u poređenju sa kikirikijem (Rajapakse i Kim, 2011). Crvene i mrke alge su bogat izvor karotenoida, provitamina vitamina A, vitamina C, ali i vitamina B12 što predstavlja značajan biljni izvor ovog vitamina (Bender, 1980).

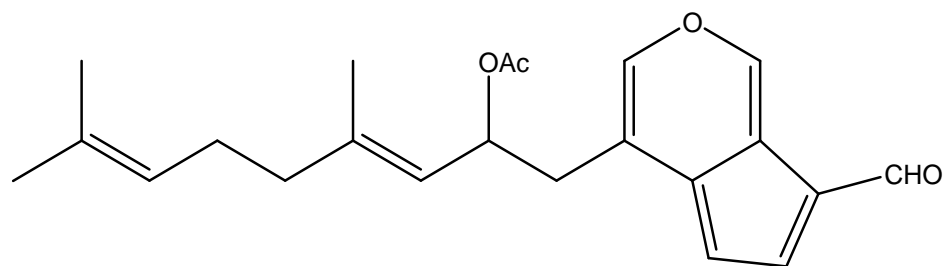
U morskim travama roda *Cymodocea*, u delovima kao što su rizom i koren, identifikovano je prisustvo vitamina A, C i E (Jeevitha i sar, 2013).

3.2 Sekundarni metaboliti u algama i morskoj travi

Brojna istraživanja su pokazala prisustvo sekundarnih metabolita u morskim organizmima (Grignon Dubois, 2013). Sekundarni metaboliti predstavljaju biološki aktivna jedinjenja koja se prema hemijskoj strukturi mogu podeliti na: alkaloide, heterozide, tanine, terpene i smole. Pokazane su brojne biološke aktivnosti sekundarnih metabolita poreklom iz morskih organizama, a neke od njih su: antioksidativna (Lim, 2002), citotoksična, neurotoksična, hipolipemijska, antimikrobna, antiinflamatorna (Mohamed i sar, 2012).

U vrstama roda *Halimeda* identifikovano je nekoliko sekundarnih metabolita kao što su flavanoni i fenolkarboksilne kiseline (Yoshie i sar, 2002), diterpenoidi (Paul i Fenical, 1984) i diterpenski aldehidi (Koehn i sar, 1991) što je prikazano u **Tabeli 1**.

Halitunal, diterpenski aldehyd, izolovan je iz alge *H. tuna* i sadrži jedinstveni ciklopentadieno[c]piranski prsten. Halitunal pokazuje *in vitro* antivirotsku aktivnost protiv mišjeg korona virusa A59 (Koehn i sar, 1991). Struktura jedinjenja halitunal, prikazana je na **Slici 5**.



Slika 5. Halitunal, diterpenski aldehyd izolovan iz alge *Halimeda tuna*

Tabela 1. Identifikovani sekundarni metaboliti u vrstama roda *Halimeda*.

Sekundarni metabolit	Naziv vrste	Literatura
Epigalokatehin	<i>H. macroloba</i> <i>H. opuntia</i>	Yoshie i sar, 2002
Kafena kiselina	<i>H. macroloba</i>	
Katehol	<i>H. macroloba</i> <i>H. opuntia</i>	
Hesperidin	<i>H. macroloba</i>	
Miricetin	<i>H. macroloba</i> <i>H. opuntia</i>	
Morin	<i>H. macroloba</i> <i>H. opuntia</i>	
Halimedatrial	<i>H. tuna</i> <i>H. opuntia</i> <i>H. incrassata</i> <i>H. monile</i> <i>H. discoidea</i> <i>H. scabra</i>	Paul i Fenical, 1984
Halimedalakton	<i>H. tuna</i> <i>H. scabra</i>	
Halimedatrial tetraacetat	<i>H. tuna</i> <i>H. opuntia</i> <i>H. incrassata</i> <i>H. monile</i> <i>H. discoidea</i> <i>H. scabra</i> <i>H. macroloba</i>	
<i>Bis-nor</i> diterpenoid	<i>H. discoidea</i> <i>H. macroloba</i> <i>H. scabra</i>	
Halitunal	<i>H. tuna</i>	Koehn i sar, 1991

Rod *Codium* broji preko 150 vrsta, i praktično u literaturi ne možemo naći podatke o prisustvu i aktivnosti tipičnih sekundarnih metabolita u vidu alkaloida, heterozida, terpena i sl.

U vrstama roda *Cystoseira*, u literaturi su identifikovani meroditerpeni (Valls i sar, 1996), ali i isparljivi halogenovani ugljovodonici i monoterpenoidi (Milkova i sar, 1997). Meroditerpeni iz *Cystoseira* vrsta pokazuju antioksidativnu i antiinflamatornu aktivnost (Fisch i sar, 2003; de los Reyes i sar, 2013). Iz alge *C. baccata*, izolovani su meroditerpeni i identifikovana je njihova karakteristična struktura biciklo[4.3.0]nonanskog prstena (Mokrini i sar, 2008).

U mrkim algama su identifikovani i florotanini (polimeri floroglucinola (1,3,5-trihidroksibenzen), polifenolna jedinjenja, karakteristična jedino za mrke alge, sa izraženom antioksidativnom aktivnošću (Chkhikvishvili i Ramazanov, 2000).

Identifikovani sekundarni metaboliti kod mrkih algi roda *Cystoseira* prikazani su u **Tabeli 2.**

Tabela 2. Identifikovani sekundarni metaboliti u vrstama roda *Cystoseira*.

Sekundarni metabolit	Naziv vrste	Literatura
Halogenovani ugljovodonici: 1-hloro-2-bromoetan 1,1,2-trihloretan Dimetilformamid 1,1,2,2-tetrahaloroetan 1-hloro-2-bromoetanol heksahlorobutadien	<i>C. barbata</i>	Milkova i sar, 1997
Monoterpenoidi: dihidroaktinidiolid	<i>C. crinita</i>	Milkova i sar, 1997
Meroditerpeni: Cistoketal Cistoketal hroman 4'-demetoksi-cistoketal	<i>C. amentacea</i>	Valls i sar, 1995
Florotanini: Floroglucinol triacetat	<i>C. usneoides</i>	Glombitza i sar, 1985

Morske trave generalno predstavljaju bogat izvor sekundarnih metabolita, koji su po svojoj hemijskoj strukturi raznovrsniji u poređenju sa sekundarnim metabolitima algi. Kontiza i sar (2008) kod morske trave *C. nodosa* identifikovali su jedinjenja iz grupe diarilheptanoida, meroditerpenoida i briaranski diterpen (**Tabela 3**), za koje je dokazano da imaju dobru antibakterijsku aktivnost na *Staphylococcus aureus*, kao i na brzorastuće mikobakterije: *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* i *Mycobacterium fortuitum*. Briaranski diterpeni imaju karakterističnu strukturu *trans*-biciklo[8.4.0]tetradekana (Moon i Harned, 2018).

Prisustvo flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina dokumentovano je kod morskih trava kao što su *C. nodosa* i *Zostera noltei* (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013), što je prikazano u **Tabeli 3**. Prisustvo navedenih jedinjenja je značajno jer je poznata njihova antioksidativna aktivnost (Lim, 2002).

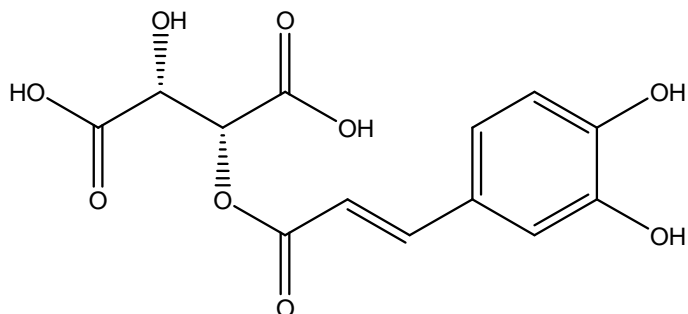
Za morske trave, kao što su *Zostera* vrste, dokazano je prisustvo sulfatnih konjugata flavonoida, kao što su luteolin-7,3'-disulfat i hrizoeriol-7-sulfat (Enerstvedt i sar, 2016), apigenin-7-sulfat i diosmetin-7-sulfat (Grignon Dubois i Rezzonico, 2018). Smatra se da su flavonoidni sulfati u biljkama imaju ulogu u regulaciji rasta, kao i da je njihovo prisustvo rezultat adaptacije na morsku sredinu i salinitet. U morskoj travi *C. nodosa*, pored sulfata, pronađeni su i glukozidi, rutinozidi, kao i peracetil-glukozidi (Enerstvedt i sar, 2018), što je prikazano u **Tabeli 3**.

Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline detektovane u morskim travama i algama imaju ulogu zaštitnih sekundarnih metabolita od herbivora i mikroorganizama. Takođe, obzirom na antioksidativni potencijal navedenih polifenolnih jedinjenja, uočena je i njihova značajna uloga u skladištenju i zaštiti rezervi masnih kiselina i lipida u biljkama, kao i zaštiti algi i morskih trava od štetnog UV zračenja (Subhashini i sar, 2013). U procesu adaptacije morskih biljaka na uslove sredine kao što su: promene saliniteta vode, temperaturni uslovi, izloženost UV svetlosti, prisustvo morskih životinja, alge i morske trave proizvode različite odbrambene metabolite. Sve je više dokaza da sulfatni metaboliti flavonoida povećavaju verovatnoću preživljavanja morskih biljaka u stresnim uslovima morskog ekosistema (Grignon Dubois i Rezzonico, 2018).

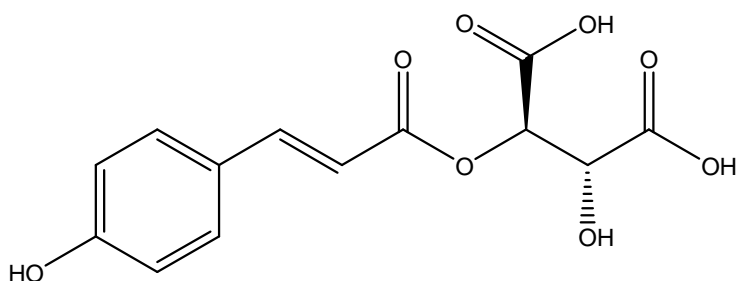
Tabela 3. Sekundarni metaboliti prisutni u morskoj travi *C. nodosa*

Naziv sekundarnog metabolita	Literatura
<p>Diarilheptanoidi: Deoksicimodienol Izocimodien</p> <p>Meroterpenoid: Nodozol</p> <p>Briaranski diterpen: (1S*, 2S*, 3S*, 7R*, 8S*, 9R*, 11R*, 12S*, 14R*)-7-bromo-tetradekahidro-12-hidroksi-1-izoprenil-8,12-dimetil-4-metilenfenantren-9,14-il diacetat</p>	<p>Kontiza i sar, 2008</p>
<p>Diarilheptanoidi: Cimodienol Cimodien</p>	<p>Kontiza i sar, 2008</p>
<p>Fenolkarboksilne kiseline: Cihorijumska kiselina Kaftarinska kiselina Kutarinska kiselina</p>	<p>Grignon Dubois i Rezzonico, 2013</p>
<p>Izoramnetin-3-glukozid Izoramnetin-3-rutinozid Izoramnetin-3-(peracetil)-glukozid Kvercetin-3-glukozid Kvercetin-3-rutinozid Kvercetin-3-(peracetil)-glukozid Skutelarein-7-glukozid</p> <p>Fenolkarboksilne kiseline: Kaftarinska kiselina Kutarinska kiselina Cihorijumska kiselina Dikumarol-tartarna kiselina</p>	<p>Enerstvedt, 2018</p>

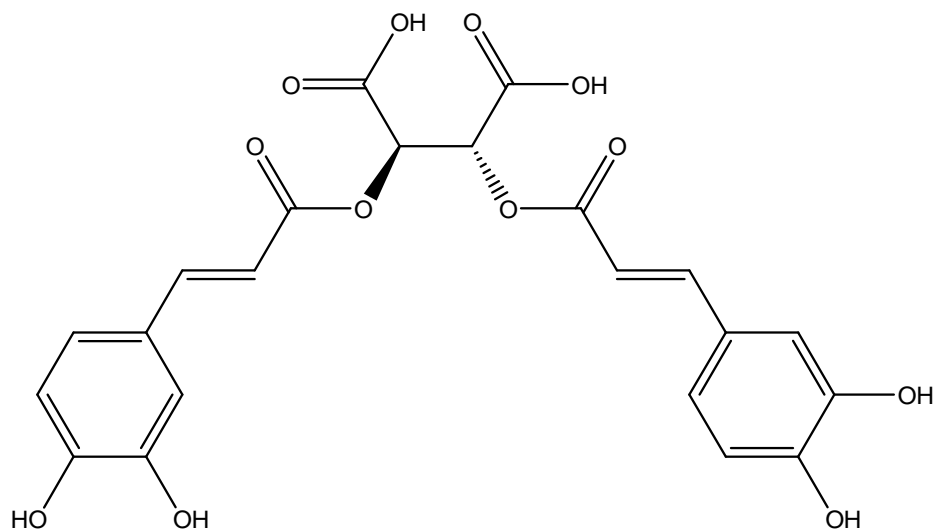
Hemijske formule fenolkarboksilnih kiselina koje su pronađene u morskoj travi *C. nodosa* prikazane su na **Slici 6**.



Kaftarinska kiselina



Kutarinska kiselina



Cihorijumska kiselina

Slika 6. Hemijske formule fenolkarboksilnih kiselina koje su identifikovane u morskoj travi *C. nodosa*.

3.3 Biološke aktivnosti ekstrakata algi i morske trave

Alge i morske trave predstavljaju važan izvor bioaktivnih jedinjenja i dobijaju sve veću naučnu pažnju u cilju pronalaženja novih supstanci koje mogu imati primenu u medicini, farmaciji ili suplementaciji.

3.3.1 Antioksidativna aktivnost

Slobodni radikali predstavljaju visoko reaktivne molekule, koji najčešće nastaju kao posledica radijacije, ali mogu nastati i u toku određenih prirodnih metaboličkih procesa. Ovi molekuli izazivaju lančane reakcije koje dovode do dezintegracije ćelijske strukture uključujući razgradnju lipida, proteina i nukleinskih kiselina. Antioksidansi imaju sposobnost uklanjanja slobodnih radikala i na taj način snižavaju nivo oksidativnog stresa i preveniraju ili usporavaju razvoj različitih oboljenja koja nastaju kao posledica oksidativnog stresa (kancer, dijabetes, smanjen odgovor imunskog sistema). Brojni sintetski antioksidansi, kao što su propil galat (PG), butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluen (BHT), ispoljavaju toksične i mutagene efekte, pa se teži pronalaženju antioksidanasa prirodnog porekla, sa što manje neželjenih efekata (Chen i sar, 1992).

Kod algi je identifikovano prisustvo brojnih antioksidanasa kao što su: askorbat i askorbinska kiselina, glutation, karotenoidi, aminokiseline, katehini, galati, florotanini i tokoferoli (Lim i sar, 2002; Fisch i sar, 2003; Zubia i sar, 2009).

Alge, *Laminaria digitata* i *Himantalia elongata* su pokazale antioksidativnu aktivnost koja može da se upoređi sa aktivnošću vitamina E i butilhidroksitoluena (BHT) (Le Tutour, 1990; Le Tutour i sar, 1998). Astaksantin, nađen kod zelene alge *Haematococcus pluvialis* nalazi se prometu, kao dijetetski suplement (Life extension Vitamin Supplies and Life Extension Institute, Inc.1997).

Brojne studije su pokazale antioksidativnu aktivnost ekstrakata morskih trava (*Zostera subg. Zostera marina*, *Z. noltei*, *Posidonia oceanica*, *C. nodosa*, *Thalassia hemprichii*) i prisustvo antioksidativnih supstanci u njima kao što su: kafena, kaftarinska, ferulinska, galna, rozmarinska i zosterinska kiselina (Rajeshwari i sar, 1990; Athiperumalsami i sar, 2008).

3.3.2 Antimikrobna aktivnost

U algama su pronađeni i identifikovani bromofenoli, bioaktivne supstance koje pokazuju brojne biološke aktivnosti, kao što su antioksidativna, antitumorska, antidiabetična, ali i antimikrobna aktivnost kao najizraženija biološka aktivnost za ovu grupu jednjena (Liu i sar, 2011).

Ekstrakti algi *C. barbata*, *Halopteris filicina*, *Cladostephus spongiosus*, *Chylocladia verticillata* i *Ulva rigida* su pokazale antimikrobnu aktivnost protiv *Staphylococcus aureus* (Taskin i sar, 2007).

Ekstrakti algi *Halimeda opuntia*, *H. tuna*, *Ulva australis* i *Caulerpa racemosa* pokazale su antibakterijsku aktivnost protiv sledećih bakterijskih sojeva: *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* i jednog soja gljivice *Candida albicans* (Mtolera i Semesi, 1996). Pored antibakterijske i antifungalne aktivnosti, kod zelene alge *H. tuna* pokazano je i prisustvo jedinjenja halitunala koji poseduje antivirusnu aktivnost (Koehn i sar, 1991).

Sulfonovani polisaharidi, identifikovani kod određenih crvenih algi, pokazali su antivirusnu aktivnost protiv virusa humane imunodeficijencije (HIV) i *Herpes simplex* virusa (HSV). Karagenan, polisaharid koji se uobičajeno nalazi u ćelijskom zidu crvenih algi, pokazao je inhibitorno dejstvo protiv HIV-a (Neushul i sar, 1990).

Terpeni izolovani iz morske trave *C. nodosa* pokazali su antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, i protiv brzorastućih mikobakterija kao što su *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis* i *M. fortuitum* (Kontiza i sar, 2008).

3.3.3 Antitumorska aktivnost

Većina antikancerskih lekova, koji se primenjuju u konvencionalnoj medicini i lečenju, citotoksični su za zdrave ćelije i izazivaju imunotoksičnost. Supstance koje su identifikovane da poseduju citotoksičnu aktivost, a poreklom su iz morskih algi, pokazale su značajnu selektivnost prema tumorskim ćelijama, sa minimalnim negativnim dejstvom na zdrave ćelije (Harada i sar, 1997).

Sulfonovani polisaharidi poreklom iz algi, uključujući karagenan i fukoidane, inhibirali su rast i razvoj metastatskih oblika tumora, u ispitivanju na pacovima (Parish i sar, 1987). Za karagenane je dokazano da ispoljavaju citotoksičnost protiv Hep-2 humane

epifaringealne tumorske ćelijske linije (Perl i sar, 1983), a fukoidani izolovani iz alge *Sargassum thunbergii* pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost protiv metastaza ćelija karcinoma pluća (Itoh i sar, 1995).

Ulvan, sulfonovani polisaharid izolovan iz zelenih algi roda *Ulva sp.* pokazao je značajnu citotoksičnost protiv ćelija karcinoma kolona (Kaeffer i sar, 1999), dok su fukosteroli, izolovani iz alge *Turbinaria conoides* pokazali citotoksičnu aktivnost protiv različitih humanih i mišjih tumorskih ćelijskih linija (Sheu i sar, 1999).

Ekstrakti morskih trava *Halodule uninervis* i *Thalassia hemprichii* pokazali su blagu antitumorsku aktivnost protiv ćelijske tumorske linije Erlihovog ascitesa, sa značajno manje neželjenih efekata u poređenju sa vinkristinom (Ghandourah i sar, 2019).

Cimodienol i cimodien, diarilheptanoidi, izolovani iz morske trave *C. nodosa*, pokazali su citotoksičnu aktivnost NSCL-N6 i A549 ćelija tumora pluća (Kontiza i sar, 2005).

3.3.4 Antikoagulantna aktivnost

Polisaharidi, L-sulfonovani fukani, poreklom iz algi, pokazali su značajnu antikoagulantnu aktivnost, koja je prvi put pokazana za algu *Mazzaella laminarioides* (Chargaff i sar, 1936). Sulfonovani fukani iz algi *Fucus vesiculosus* i *Ascophyllum nodosum* su patentirani kao antikoagulantne supstance (Trento i sar, 2001). Fukan sulfati, izolovani iz algi *Ecklonia kurome* i *Spatoglossum schroederi* pokazuju antitrombotsku aktivnost, tj. sprečavaju agregaciju trombocita (Nishino i sar, 1991; Almeida-Lima i sar, 2011).

3.3.5 Hipoholesterolemijska i antihipertenzivna aktivnost

Dokazano je da karagenan i drugi sulfonovani polisaharidi imaju hipoholesterolemijsku aktivnost (Ershoff i sar, 1962). Nažalost, visoke doze ovih polisaharida, neophodne radi ostvarivanja hipoholesterolemijskog efekta, teško se tolerišu kod ljudi. Takođe, poznato je da polisaharidi algi, kao što su alginat, karagenan, funoran, fukoidan, laminarin, porfiran i ulvan, smanjuju resorpciju holesterola u tankom crevu i na taj način ispoljavaju hipoholesterolemijski i hipoglikemijski efekat (Kiryama i sar, 1969).

Sulfonovani polisaharidi iz alge *Monostroma nitidum*, porfiran iz alge *Pyropia yezoensis*, funoran iz alge *Gloiopeltis tenax*, fukoidan iz *Sargassum ringoldianum*, natrijum

alginat iz alge *Analipus japonicus*, kao i komercijalno dostupan agar pokazali su značajan hipoholestrolemijski i antihipertenzivni efekat, ispitivan na pacovima (Ren i sar, 1994).

Sulfonovani polisaharidi izolovani iz morske trave *C. nodosa*, koji imaju pretežno 6-O-sulfonovane (1 → 4) galaktozidne veze, pokazali su značajnu antihipertenzivnu aktivnost u *in vitro* testu sa sintetskim supstratom N-hipuril-His-Leu hidratom (HHL) (Kolsi i sar, 2016).

3.3.6 Anti α -glukozidazna aktivnost

Polisaharidi i proteini izolovani iz alge *Himanthalia elongata*, pokazali su sposobnost redukcije nivoa glukoze u krvi za 50%, 8 h nakon intravenske primene, kod pacova sa eksperimentalno izazvanim dijabetesom (Lamela i sar, 1968). Nakon kontinuirane peroralne primene, fukoidan-galaktozan sulfata (20 dana), izolovanog iz alge *Saccharina japonica*, uočen je značajan efekat snižavanja nivoa glukoze u krvi, do 82,3%, kod pacova kod kojih je dijabetes izazvan aloksanom (Fuchuan i sar, 2000).

Inhibicija enzima α -glukozidaze predstavlja efikasan terapijski pristup u snižavanju postprandijalne hiperglikemije. Fukoidani, polisaharidi izolovani iz braon alge *Fucus vesiculosus*, pokazali su značajan efekat inhibicije α -glukozidaze (IC_{50} = 67,9 μ g/ml) (Shan i sar, 2016).

Metanolni ekstrakt morske trave *Halophila beccarii*, pokazao je značajan efekat inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze i α -amilaze. Ekstrakt navedene morske trave pokazao je i efekat usporavanja resorpcije glukoze u testu membranske difuzije glukoze (Vani i sar, 2018). Etanolni ekstrakti morskih trava, *Enhalus acoroides*, *Thalassia hemprichii* i *Cymodocea rotundata* su takođe pokazali značajan efekat *in vitro* inhibicije enzima α -glukozidaze i α -amilaze (Widiyanto i sar, 2018).

CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- 1) Preliminarna procena biološke aktivnosti izolovanih ekstrakata morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*);
- 2) Određivanje nutritivnog potencijala i energetske vrednosti izabranih uzoraka morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*);
- 3) Hemijska karakterizacija i izolacija dominantnih jedinjenja iz ekstrakata i uzoraka morskih algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*), kao i procena potencijalne biološke aktivnosti izolovanih jedinjenja.

MATERIJALI I METODE

1. Biljni materijal

Uzorci algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) sakupljeni su iz Bokokotorskog zaliva u Crnoj Gori. Datumi uzorkovanja, lokalitet i kataloški brojevi, dati su u **Tabeli 4**. Ispitivanja koja su vršena sa pomenutim uzorcima prikazana su u **Tabeli 5**.

Uzorci algi i morske trave su sakupljeni i identifikovani od strane obučениh ronilaca, biologa, iz Instituta za biologiju mora, Kotor, Univerzitet Crne Gore. Katalog uzoraka se nalazi u Prirodnjačkom muzeju Crne Gore u Podgorici.

Tabela 4. Prikaz datuma uzorkovanja, lokaliteta, kataloških brojeva iz odabranih algi i morske trave

Ispitivani uzorak	Datum uzorkovanja	Lokalitet	Kataloški broj uzorka
<i>Halimeda tuna</i>	Novembar, 2013	Kotorski zaliv, Perast	9740
	Jul, 2016		
<i>Codium bursa</i>	Novembar, 2013	Kotorski zaliv, Perast	9741
	Jul, 2016		
<i>Cystoseira barbata</i>	Novembar, 2013	Tivat, Opatovo	9739
	Jul, 2016		
<i>Cymodocea nodosa</i>	Novembar, 2013	Tivat, Opatovo	9742
	Jul, 2016		

Tabela 5. Prikaz ispitivanja koja su sprovedena sa odabranim uzorcima algi i morske trave u odnosu na datum uzorkovanja

<p style="text-align: center;">Ispitivani uzorak/ Ispitivanja koja su vršena</p>	<p style="text-align: center;"><i>Halimeda tuna</i></p>	<p style="text-align: center;"><i>Codium bursa</i></p>	<p style="text-align: center;"><i>Cystoseira barbata</i></p>	<p style="text-align: center;"><i>Cymodocea nodosa</i></p>
<p><u>Izračunavanje ukupne energetske vrednosti</u> zvaničnim AOAC metodama (Association of Official Analytical Chemists) preko određivanja sadržaja: vlage, pepela, lipida, ukupnih proteina, ukupnih ugljenih hidrata, celuloze i ukupnih dijetnih vlakana)</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>
<p><u>Ispitivanje bioloških aktivnosti</u> ekstrakta: Antimikrobna aktivnost Antioksidativna aktivnost Antitumorska aktivnost Anti α-glukozidazna aktivnost</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>	<p style="text-align: center;">Novembar, 2013</p>
<p><u>Hemijska karakterizacija</u> ekstrakata: - Kvantitativna analiza ukupnih polifenola, metodom po Folin-Ciocalteu, iz ekstrakata - Ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja HPLC metodom iz ekstrakata - Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina (GC-FID) iz ekstrakata - Kvalitativna i kvantitativna analiza: slobodnih aminokiselina (LC-MS), masnih kiselina (GC-FID/MS), analiza sterola (GC-MS) i mikro- i makroelemenata metodom ICP-OES; - Kvantitativna analiza β-glukana (komercijalni kit)</p>	<p style="text-align: center;">Jul, 2016</p>	<p style="text-align: center;">Jul, 2016</p>	<p style="text-align: center;">Jul, 2016</p>	<p style="text-align: center;">Jul, 2016</p>

1.1 Priprema biljnog materijala i ekstrakcija

Sirovi uzorci algi (*H. tuna*, *C. bursa* i *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) su nakon prikupljanja oprani morskom vodom, radi uklanjanja ostataka peska, kamenja i morskih organizama i zapakovani u plastične kese. Nakon pripreme i identifikacije, uzorci su dobro oprani česmenskom vodom, radi odstranjivanja soli i nečistoća, sušeni ubrusom i čuvani u zamrzivaču do transporta u laboratoriju. U laboratoriji Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, uzorci su odmrznuti i sušeni na vazduhu radi dobijanja suvog biljnog materijala koja će kasnije biti korišćen u ispitivanju. Prinos suvog materijala je bio oko 10% u odnosu na svež materijal.

Osušeni uzorci su pulverizovani, korišćenjem električnog mlina. Deo osušenih algi i morske trave korišćen je za dobijanje ekstrakata, a drugi deo, suve droge, korišćen je za određivanje nutritivne i energetske vrednosti, kao i za određivanje sadržaja nutritivnih i nenutritivnih supstanci.

Za ispitivanje biološke aktivnosti, izrađena su 3 različita polarna ekstrakta, a rastvarači korišćeni za ekstrakciju su: dihlormetan: metanol (1:1), 70% metanol i prečišćena voda.

Ekstrakti su pripremljeni postupkom hladne maceracije koji podrazumeva:

- 1) prelivanje osušenog, pulverizovanog biljnog materijala rastvaračem za ekstrakciju u odnosu 1:5;
- 2) ekstrakcija na sobnoj temperaturi, u trajanju od 48 h, uz mešanje;
- 3) filtriranje;
- 4) uparavanje na vakuum uparivaču na temperaturi do 40°C.

Prinosi ekstrakata dati su u **Tabeli 6**.

Tabela 6. Prinosi ekstrakata (izraženo u procentima, %) dobijenih iz odabranih algi i morske trave

Naziv uzorka	DME	70% Met	AqE
<i>Halimeda tuna</i>	6,11	0,74	8,34
<i>Codium bursa</i>	3,47	12,11	6,00
<i>Cystoseira barbata</i>	4,80	12,64	1,68
<i>Cymodocea nodosa</i>	3,71	11,93	3,31

2. Nutritivna i hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka

2.1 Određivanje energetske vrednosti

U cilju određivanja energetske vrednosti u skladu sa zvaničnim AOAC metodama izvršili smo sledeća hemijska ispitivanja:

- određivanje sadržaja vlage i pepela;
- određivanje sadržaja lipida;
- određivanje ukupnih proteina;
- određivanje ukupnih ugljenih hidrata;
- određivanje sadržaja celuloze;
- određivanje ukupnih dijetnih vlakana.

Energetska vrednost se izračunava za 100 g pulverizovanog uzorka prema sledećoj formuli:

Energetska vrednost, kcal/100 g = 9*(sadržaj lipida, g) + 4*(sadržaj proteina, g + sadržaj ugljenih hidrata, g) + 2*(sadržaj ukupnih dijetnih vlakana, g)

2.1.1 Određivanje sadržaja vlage

Određivanje sadržaja vlage, pulverizovanih uzoraka izvršeno je gravimetrijskom tehnikom, merenjem mase uzorka pre i nakon sušenja u sušnici do konstantne mase, na temperaturi od 105 °C, pri čemu se određuje količina vode koja je isparila (Đorđević i sar, 2011). Sadržaj vlage se izražava kao procenat vode koja je isparila, korišćenjem sledeće formule:

$$\text{Vlaga (\%)} = a * 100 / p$$

a - razlika mase posude pre i nakon sušenja

p - masa uzorka (g)

2.1.2 Određivanje sadržaja pepela

Određivanje sadržaja pepela (suve materije) je izvršeno korišćenjem prethodno dobijenog rezultata za sadržaj vlage, pomoću sledeće formule:

$$\text{Pepeo (\%)} = 100 - \text{Vlaga (\%)}$$

2.1.3 Određivanje sadržaja lipida

Lipidi u uzorcima algi i morske trave su određeni gravimetrijskom metodom koja se zasniva na principu da se iz prethodno homogenizovanog uzorka, tretiranog hlorovodoničnom kiselinom, ekstrahuju lipidne materije pomoću organskog rastvarača. Rastvarač se ukloni destilacijom, a dobijeni lipidni ekstrakt se suši i meri.

Postupak pripreme uzoraka algi i morske trave za ispitivanje sadržaja ukupnih lipida:

Određivanje sadržaja ukupnih lipida je izvršeno prema metodi po Weibull-Stoldt-u korišćenjem aparature po Soxhlet-u (Đorđević i sar, 2011). Po 20 g pulverizovanih uzoraka odmereno je sa tačnošću od $\pm 0,01$ g i preliveno sa po 100 ml hladne vode i po 60 ml konc. hlorovodonične kiseline. Ovako pripremljeni uzorci u čašama, prekriveni su sahatnim staklom i zagrevani na temperaturi od 100 °C, 20 minuta. Nakon grejanja, uzorci su filtrirani preko filter papira, a filter papiri sa uzorcima su sušeni u sušnici na 105 °C. Nakon sušenja, filter papir sa uzorkom se prebaci u čauru i koristi za ekstrakciju po Soxhlet-u. Za ekstrakciju korišćen je hloroform. Rastvarač se prikuplja u odgovarajući tarirani balon i uparava na vakuum uparivaču, na temperaturi od 50 °C. Ostatak u balonu se suši u sušnici do konstantne mase.

Rezultati su izraženi kao procenat lipida u suvom uzorku ispitivanih algi i morske trave.

2.1.4 Određivanje ukupnih proteina

Ukupni proteini su određeni metodom po Kjeldahl-u (Đorđević i sar, 2011). Princip metode zasniva se na činjenici da u toku zagrevanja uzoraka sa sumpornom kiselinom, uzorak gubi vodu i oksiduje. Ugljenik se oksiduje do CO₂, vodonik oksiduje do vode, a sumporna kiselina se redukuje do SO₂. Nastali SO₂ vrši redukciju azota u amonijak, a amonijak u reakciji sa sumpornom kiselinom prelazi u amonijum-sulfat.

$C \rightarrow CO_2$ (oksidacija)

$H \rightarrow H_2O$ (oksidacija)

$H_2SO_4 \rightarrow SO_2$ (redukcija)

$N_2 + 3SO_2 + 6H_2O \rightarrow 2 NH_3 + 3 H_2SO_4$

$2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$

Dodavanjem $CuSO_4$, kao katalizatora i K_2SO_4 , radi povećanja tačke ključanja u procesu razaranja, dobija se bistar uzorak, bez tragova ugljenika, a azot iz proteina i prisutnih neproteinskih azotnih jedinjenja se nalazi u obliku amonijum-sulfata ili tetraaminokuprosulfata, ukoliko se kao katalizator koristi $CuSO_4$.

Destilacija amonijaka se vrši u aparaturi po Parnas-Wagneru. NaOH koji se dodaje u uzorak ima ulogu istiskivanja amonijaka, kao slabije baze, a oslobođeni amonijak se hvata u definisanu zapreminu kiseline poznatog titra. Višak kiseline je retitiran bazom (NaOH) poznatog titra. Paralelno sa uzorkom se titrira i slepa proba. Iz razlike utroška NaOH za titraciju slepe probe i analize dobija se količina NaOH koja je ekvivalentna količini destilisanog NH_3 u uzorku. Iz ovako određene količine NH_3 izračunava se % azota, koji se množi faktorom 6,25. Faktor za izračunavanje sadržaja proteina je određen na osnovu činjenice da je prosečni sadržaj azota u proteinima 16%.

Postupak pripreme uzoraka algi i morske trave za ispitivanje sadržaja ukupnih proteina:

Za ispitivanje je odmereno tačno po 0,1 g pulverizovanih uzoraka algi i morske trave sa tačnošću od $\pm 0,001$ g. Odmereni uzorak je prenet u suv balon po Kjeldahl-u u koji se dodaju i sledeći reagensi: 1 g $CuSO_4$, 1 g K_2SO_4 i 3-4 ml konc. sumporne kiseline. Uzorak je zagrevan na plameniku, a razaranja uzorka se smatra završenim kada sadržaj u balonu postane bistar, plavo-zelene boje. Nakon razaranja, ohlađeni sadržaj u balonu je preliven sa 20 ml destilovane vode i kvantitativno prenesen u balon aparature po Parnas-Wagneru. U balon se sipa 30% rastvor NaOH sve dok reakcija ne postane alkalna, što se proverava lakmus papirom. Rastvor NaOH (30%) se dodaje u cilju istiskivanja amonijaka iz razorenog uzorka. Destilat sa oslobođenim amonijakom je prikupljen u prijemni sud od 100 ml u kome se nalazi 25 ml 0,01 M HCl i 2 kapi indikatora (metiloranž). Crveni lakmus papir se koristi radi provere da li je sav amonijak predestilisao iz uzorka (ukoliko ne dolazi do promene boje lakmus

papira - destilacija je završena). Višak kiseline se retitrira 0,01 M rastvorom NaOH. Razlika utroška 0,01 M NaOH za titraciju slepe probe i analize se koristi za obračun.

Sadržaj proteina se obračunava korišćenjem faktora za sadržaj azota u proteinima, 6,25. Rezultati su izraženi kao % proteina u suvom uzorku ispitivanih algi i morske trave.

2.1.5 Određivanje sadržaja celuloze

Sadržaj celuloze je procenjen korišćenjem metode po Scharrer-Kürshner-u (Đorđević i sar, 2011). Korišćeni reagens za celulozu se sastoji od 75 ml 70 % sirćetne kiseline, 5 ml konc. azotne kiseline i 2 g trihlorsirćetne kiseline. Po 1 g pulverizovanog uzoraka se kvantitativno prenese u normalni sud, prelije reagensom za celulozu i zagreva 30 minuta. Vreo rastvor se kvantitativno prenese na tarirani levak od sinterovanog stakla, guč (G3). Guč se suši, zajedno sa uzorkom, u sušnici na 105 °C u trajanju od 1 sata, i nakon hlađenja se pristupa merenju.

Sadržaj celuloze se određuje pomoću formule:

$$\text{Celuloza (\%)} = [(a-b)*100]/p$$

a- masa guča sa celulozom

b- masa praznog guča

p- masa uzorka

2.1.6 Određivanje ukupnih ugljenih hidrata

Sadržaj ukupnih ugljenih hidrata se izražava kao % i izračunava prema sledećoj formuli:

$$\text{Ugljeni hidrati (\%)} = 100 - \text{voda (\%)} - \text{pepeo (\%)} - \text{lipidi (\%)} - \text{proteini (\%)} - \text{celuloza (\%)}$$

2.1.7 Određivanje ukupnih dijetnih vlakana

Za određivanje sadržaja ukupnih dijetnih vlakana primenjena je enzimsko-gravimetrijska metoda AOAC, korišćenjem komercijalnog kita (Megazyme, Ireland, K-TDFR).

Po 1 g (\pm 0,005 g) usitnjenih uzoraka tretirano je termostabilnim enzimima α -amilazom, amiloglukozidazom i proteazom, pri definisanim vrednostima temperature i pH 8,2. α -Amilaza razlaže skrob i prevodi ga u tečno stanje, optimizujući uslove za katalitičku hidrolizu amiloglukozidaze. Završna faza je delovanje proteaze koja hidrolizuje proteine do aminokiselina i kratkolančanih peptida. Nakon enzimskog tretmana vrši se korekcija eventualno zaostalih minerala i azotnih materija.

Za određivanje ukupnih dijetnih vlakana (engl. *total dietary fibers*, TDF), nakon enzimske digestije, rastvor se tretira alkoholom u cilju taloženja rastvornih dijetnih vlakna pre filtriranja, a TDF ostatak se ispira acetonom i alkoholom, suši i meri. Za pojedinačno određivanje rastvornih (engl. *soluble dietary fibers*, SDF) i nerastvornih (engl. *insoluble dietary fibers*, IDF) dijetnih vlakana, nakon enzimske digestije, rastvor se filtrira. Za određivanje SDF filtrati i ispirci se skupljaju i talože alkoholom, filtriraju, suše i mere. Nerastvorna dijetna vlakna se računaju iz razlike TDF i SDF.

Korišćena oprema:

1. Levak od sinterovanog stakla, guč, veličine pora: 40-60 μ m
2. Hemijske čaše od 400 ml

Priprema guča: Guč je preko noći spaljivan na temperaturi peći od 525 °C. Temperatura peći je podešena na 130 °C, pre nego što je guč izvađen iz nje. Potom, guč je potopljen u 2 % rastvor za čišćenje (1 sat na sobnoj temperaturi), ispran dejonizovanom vodom, acetonom i osušen na vazduhu. Potom se doda 1 g celita i suši na temperaturi od 130 °C, do postizanja konstantne mase. Guč je ohlađen u eksikatoru i odmeren, zajedno sa celitom, sa tačnošću od 0,1 mg.

1. Vakuum pumpa
2. Analitička vaga, Pioneer PA 413 CM (Ohaus, Nemačka)
3. Vodeno kupatilo WNB 14 (Mettler, Nemačka)
4. Peć za žarenje (Iskraterm, Srbija)

5. Sušnica (Thermo Heraeus 600 Vacutherm)
6. pH metar (pH/Ion Meter Ion 510, Eutech, Holandija)
7. Mikropipetor (Epindorf)
8. Magnetna mešalica (Thys 2, Nemačka)
9. Eksikator

Reagensi:

1. Etanol, 78%. U normalni sud od 1 L odmereno je 821 ml 95% etanola i normalni sud dopunjen dejonizovanom vodom.

2. Etanol, 85%. U normalni sud od 1 L odmereno je 895 ml 95% etanola i normalni sud dopunjen dejonizovanom vodom.

3. Kiselo isprani Celite 545

4. Termostabilna α -amilaza.

5. Amiloglukozidaza

6. Proteaza (50 mg/ml, u MES/TRIS puferu)

7. MES (2-(N-Morfolino)etansulfonska kiselina)

8. TRIS (Tris(hidroksimetil)aminometan)

9. MES-TRIS puferski rastvor- 0,05 M MES, 0,05 M TRIS, pH 8,2 na 24 °C

Postupak pripreme MES-TRIS puferskog rastvora: 19,52 g MES i 12,2 g TRIS, rastvoreno je u 1,7 L vode. pH vrednost pufera je podešena na 8,2 pomoću 6N NaOH i rastvor razblažen dejonizovanom vodom do 2 L.

10. Hlorovodonična kiselina, 0,561 N. U normalni sud od 1 L, dodato je 93,5 ml 6 N HCl. Prvobitno je dodato dodato je u 700 ml vode, mešano do homogenizacije i normalni sud dopunjen dejonizovanom vodom do crte.

Postupak pripreme uzoraka:

U hemijskim čašama od 400 ml, odmereno je po 1 g pulverizovanih uzoraka algi i morske trave sa tačnošću od 0,005 g. Eksperimenti su rađeni u duplikatu. U uzorak je, potom dodato po 40 ml MES-TRIS pufera pH 8,2 i smeša mešana na magnetnoj mešalici do potpune homogenizacije. Po 50 μ l rastvora α -amilaze je dodato u čaše sa uzorcima. Uzorci su potom

podvrgnuti ključanju u trajanju od 15 minuta, pa prekriveni aluminijumskom folijom i ostavljeni da se inkubiraju 30 minuta na vodenom kupatilu, na temperaturi od 100 °C. Nakon inkubacije, u ohlađene uzorke je dodato po 100 µl proteaze i čaše su prekrivene aluminijumskom folijom. Smeša je ponovo inkubirana na 60 °C, 30 minuta. Nakon hlađenja, uzorcima je podešena pH na $4,5 \pm 0,2$, pomoću 0,561 M HCl. U uzorke je potom dodato po 300 µl amiloglukozidaze i izvršena inkubacija na vodenom kupatilu, 30 minuta na 60 °C.

Priprema uzoraka i određivanje ukupnih dijetnih vlakana (TDF):

U rastvore dobijene nakon enzimske digestije dodato je po 225 ml zagrejanog 95% etanola (60 °C) i ostavljeno da odstoji 1 sat. Sadržaj iz čaše prenesen je na tarirani guč (G-2) i filtriran pomoću vakuuma. Ostatak na guču, ispran je sa po 15 ml 78% etanola, 95% etanola i acetona (3 puta). Gučevi sa uzorcima, ostavljeni su na 105 °C više od 12 sati. Nakon što su gučevi odmereni (M), sadržaj iz jednog guča (M₁) se koristio za određivanje rezidua proteina, metodom po Kjeldahl-u, a sadržaj iz drugog guča - za određivanje rezidua pepela, žarenjem u trajanju od sati na 525 °C (M₂).

Sadržaj ukupnih dijetnih vlakana se izračunava iz sledeće formule:

$$\mathbf{TDF = M - M_1 - M_2}$$

gde je:

M - masa guča sa suvim ostatkom

M₁ - sadržaj ostataka proteina

M₂ - sadržaj ostataka pepela

Priprema uzoraka i određivanje rastvornih dijetnih vlakana (SDF):

Rastvori koji su dobijeni nakon enzimske digestije, profiltrirani su kroz gučeve u posude za filtriranje. Čaše u kojima je vršena digestija su isprane dejonizovanom vodom. Ostatak na gučevima je ispiran sa po 10 ml tople vode (70 °C), 2 puta. Tečnosti od ispiranja čaša i gučeva, prebačene su u čaše od 600 ml. Sadržaj u čašama je dopunjen vodom do 80 ml. U čaše je dodato 320 ml zagrejanog 95% etanola (60 °C). Rastvori su ostavljeni da se talože u intervalu od 60 minuta. Nakon stajanja, smeša je profiltrirana kroz tarirani guč (G-2) uz pomoć vakuum pumpe. Ostaci na gučevima su isprani sukcesivno rastvorima 78% etanola, 95% etanola i acetona, po 3 puta. Gučevi sa sadržajem su ostavljeni u sušnici na 105 °C, preko 12 sati. Nakon vaganja gučeva (M) sadržaj iz jednog guča (M₁) se koristio za

određivanje rezidua proteina, metodom po Kjeldahl-u, a sadržaj iz drugog guča - za određivanje rezidua pepela, žarenjem u trajanju od sati na 525 °C (M₂).

Sadržaj rastvornih dijetnih vlakana se izračunava iz sledeće formule:

$$\text{SDF} = \text{M} - \text{M}_1 - \text{M}_2$$

gde je:

M - masa guča sa suvim ostatkom

M₁ - sadržaj ostataka proteina

M₂ - sadržaj ostataka pepela

Izračunavanje sadržaja nerastvornih dijetnih vlakana (IDF) se računa iz sledeće formule:

$$\text{IDF} = \text{TDF} - \text{SDF}$$

2.2. Hemijska karakterizacija ispitivanih uzoraka

2.2.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza slobodnih aminokiselina (LC-MS)

Metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sadržaja slobodnih aminokiselina iz liofilizata algi i morske trave rađena je metodom tečne hromatografije uz masenu detekciju (LC-MS) (Ribeiro i sar, 2008).

Priprema liofilizata iz uzoraka algi i morske trave:

Po 10 g pulverizovanih uzoraka algi i morske trave, kuvano je 30 minuta na 100 °C u 500 ml destilovane vode, na vodenom kupatilu, uz povratni hladnjak. Uzorci su nakon hlađenja, filtrirani i zamrznuti na – 20 °C u liofilizatoru (Alpha 1-4 LD plus, Martin Christ, Nemačka). Prinos liofilizata je u proseku bio 8,5 g. Liofilizovani ekstrakti su čuvani u eksikatoru, na tamnom mestu, do analize.

Priprema liofilizata za LC-MS analizu i prekolonska derivatizacija slobodnih masnih kiselina

Za LC-MS analizu slobodnih aminokiselina, liofilizati su rastvoreni u 0,1 M hlorovodoničnoj kiselini u koncentraciji od 10 mg/ml. Opseg koncentracija standarda za kalibracionu krivu je bio 12,5 g/mol do 2500 g/mol. Jednačine kalibracione krive za svaku aminokiselinu su date u **Tabeli 7**.

Tabela 7. Jednačine kalibracionih kriva aminokiselina

Naziv aminokiseline	Retenciono vreme (Rt)	Jednačina prave	R ²
Arginin	27,479	$y = 2791x + 172516$	0,9973
Lizin	28,606	$y = 613,69x + 13299$	0,9988
Serin	29,543	$y = 2333,2x + 112124$	0,9992
Asparaginska kiselina	29,754	$y = 3073,7x - 205212$	0,9912
Glutamin	33,714	$y = 2218,9x + 120432$	0,9995
Tirozin	34,936	$y = 2650,1x + 16565$	0,9982
Glicin	35,421	$y = 4820,3x + 161755$	0,9983
Alanin	35,937	$y = 5118,3x + 160571$	0,9993
Tirozin	37,685	$y = 3663,1x + 7530,4$	0,9969
Prolin	39,497	$y = 7171,3x - 77488$	0,9986
Metionin	41,245	$y = 7031x - 97402$	0,9936
Valin	43,131	$y = 9894,2x - 74975$	0,9991
Leucin/Izoleucin	43,847	$y = 10411x - 262806$	0,9949
Fenilalanin	44,448	$y = 6250,6x - 155434$	0,9977

Reagensi:

- 1. Rastvor dabsil hlorida (12,4 mM).** 40 mg dabsil hlorida je rastvoren u 10 ml acetona, filtriran i čuvan zamrznut na – 20 °C.
- 2. Pufer za eluiranje.** Pufer se sastoji od 9 mM natrijum fosfata, 4% dimetilformamida i 0,15 % trietilamina (pH 6,55 podešena sa fosfornom kiselinom)
- 3. Reakcioni pufer (0,15 mol/L NaHCO₃, pH 8,6).** 630 mg natrijum bikarbonata se rastvori u 50 ml dejonizovane vode, a pH 8,6 se podešava pomoću razblaženog rastvora NaOH.
- 4. Dilucioni pufer.** Dilucioni pufer predstavlja smešu 50 ml acetonitrila, 25 ml etanola i 25 ml pufera za eluiranje.

20 µl rastvora standarda rastvorenog u 0,1 M HCl i po 20 µl alikvota rastvorenih liofilizata uzorka algi i morske trave, u 0,1 M HCl, razblaženo je sa 180 µl reakcionog pufera. Nakon mešanja, smeši je dodato 200 µl rastvora dabsil hlorida. Viale su dobro promešane i inkubirane na vodenom kupatilu na temperaturi od 70 °C, 15 min. Reakcija je zaustavljena

stavljanjem viala na led, 5 minuta. Potom je dodato 400 µl dilucionog pufera, uz mešanje i centrifugiranje (5 min, 5000 rpm). Bistri supernatanti su čuvani na – 20 °C.

LC-MS analiza slobodnih aminokiselina

Za analizu slobodnih aminokiselina korišćen je LC-MS-ESI aparat (Agilent LC/MS System 1260/6130), opremljen degazerom, autosemplerom i odgovarajućim softverom (ChemStation), kvarternom pumpom, DAD (Diode Array Detector) detektorom. Parametri metode su bili sledeći:

- Kolona: Agilent Zorbax SB-Aq, 3,0 x 150 mm, 3,5 µm
- Temperatura kolone: 25 °C
- Mobilna faza A: 0,1% amonijumformijat u vodi
- Mobilna faza B: 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu
- Brzina protoka mobilne faze: 0,3 ml/min
- Volumen injektovanja: 3 µl
- Gradijent: 3' - 15% B; 63' - 85% B; 70' - 85% B; 74' - 15% B.
- Aminokiseline su identifikovane u pozitivnom modu, sa opsegom masa od 50 do 600.

Identifikacija aminokiselina u ispitivanim uzorcima algi i morske trave izvršena je na osnovu retencionih vremena (Rt) i masenog spektra uzorka u odnosu na retencionna vremena i masene spektre odgovarajućih standarda, određivanih pod istim hromatografskim uslovima. Kvantifikacija sadržaja aminokiselina izvršena je na osnovu površine ispod pika i kalibracionih kriva standarda aminokiselina.

2.2.2 Priprema uzoraka, kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina i sterola (GC-FID/MS)

a) Priprema uzoraka za kvalitativnu i kvantitativnu analizu masnih kiselina

Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina izvršena je iz cikloheksanskih ekstrakata, dobijenih iz 1 g pulverizovanih uzorka algi i morske trave. Analiza je vršena metodom gasne hromatografije (GC) uz plameno-jonizacioni detektor (FID) koji je spregnut

sa masenim detektorom (MS). U cilju GC-FID i GC-MS analize, masne kiseline su prevedene u isparljive metilestre.

Kvantitativno preneseni cikloheksanski ekstrakti, u balonu okruglog dna, pomešani su sa po 30 ml 95% etanola i 5 ml 50% kalijum hidroksida. Smeša je zagrevana na 90 °C uz povratni hladnjak, 60 min. Ohlađeni sadržaj je prebačen u levak za odvajanje, uz dodatak 10 ml 95% etanola i vode do zapremine 80 ml. Kako bi se odvojila neosaponifikovana frakcija, smeša u balonu se ispira 3 puta sa po 50 ml petroletra. Nakon odvajanja petroletarskih slojeva, u vodenu fazu je dodato nekoliko kapi koncentrovane hlorovodonične kiseline do postizanja kisele reakcije, u cilju istiskivanja masnih kiselina iz sapuna. Ekstrakcija slobodnih masnih kiselina izvršena je dietiletrom, u levku za odvajanje (prvi put sa 150 ml, a potom sa 100 ml). Dietiletarski slojevi su sakupljeni, spojeni, a rastvarač uparen do suva. Dobijeni ostatak je esterifikovan dodatkom 150 ml metanola (čistoće $\geq 99,9\%$) i 1 ml koncentrovane sumporne kiseline, a zatim, u trajanju od 60 minuta, uzorak je zagrevan na 80 °C uz povratni hladnjak. Ohlađena smeša je potom prebačena u levak za odvajanje u koji je dodato 250 ml petroletra i 100 ml vode. Ispiranje smeše petroletrom je ponovljeno 3 puta sa po 250 ml. Petroletarski slojevi su spojeni, vodom ispirani u levku za odvajanje do postizanja neutralne reakcije, a nakon toga filtrirani preko bezvodnog natrijum sulfata. Petroletar je uparen do suva. Prinosi frakcija metilestra masnih kiselina u uzorcima algi i morske trave (% , m/m) prikazani su u **Tabeli 8.**

Tabela 8. Prinosi frakcija metilestara masnih kiselina u uzorcima algi i morske trave (% , m/m) i neosapunjive sterolske frakcije (% , m/m)

Naziv uzorka	Prinos frakcije metilestara masnih kiselina (% , m/m)	Prinos neosapunjive sterolske frakcije (% , m/m)
<i>Halimeda tuna</i>	6,75	1,89
<i>Codium bursa</i>	4,51	2,63
<i>Cystoseira barbata</i>	2,18	1,70
<i>Cymodocea nodosa</i>	5,44	0,69

b) Priprema uzoraka za kvalitativnu i kvantitativnu analizu sterola

Steroli iz nesaponifikovanih frakcija cikloheksanskih ekstrakata algi i morske trave, u cilju GC-FID i GC-MS analize, prevedeni su u isparljive trimetilsililestre. Nakon ispiranja polarne smeše, dobijene saponifikacijom cikloheksanskih ekstrakata petroletrom, nepolarni slojevi su sakupljeni i ispirani po 3 puta 10% etanolom (50 ml). Slojevi su profiltrirani preko bezvodnog natrijum sulfata, upareni i osušeni u eksikatoru. 0,5 ml dobijene nesaponifikovane frakcije je rastvoreno u dihlormetanu, tako da koncentracija bude 10 mg/ml. U ovu smešu se potom doda 50 µl reagensa za silanizaciju (bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamid i trimetilhlorsilan (99 % BSTFA + 1 % TMCS)). Smeša se potom zagreva na 60 °C u intervalu od 45 min. Dobijeni uzorci se, nerazblaženi, analiziraju u toku 6 h. Prinos nesaponifikovanih frakcija u uzorcima algi i morske trave (% , m/m) su prikazani u **Tabeli 8**.

c) Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina i sterola GC-FID/MS

Analiza masnih kiselina i sterola urađena je na gasnom hromatografu, tip Agilent 6890N. Hromatograf je opremljen FID i Agilent 5975C MS detektorima. Korišćeni eksperimentalni uslovi prikazani su u **Tabeli 9**.

Svi eksperimenti su vršeni u duplikatu. Identifikacija masnih kiselina je izvršena poređenjem njihovih retencionih vremena (Rt), retencionih indeksa (RI) i masenih spektara sa komercijalnim standardom koji sadrži smešu metilestra masnih kiselina (Supelco TM 37 Component FAME Mix). Identifikacija sterola izvršena je poređenjem masenih spektara iz uzoraka sa podacima iz računarske baze (NIST/NBS 05, Wiley 8th Edition) i literature.

Tabela 9. Eksperimentalni uslovi za GC-FID/MS analizu masnih kiselina i sterola

Eksperimentalni parametri za GC-FID/MS analizu	Analiza masnih kiselina	Analiza sterola
Temperatura injektora (split-splitless)	200 °C	250 °C
Kolona	HP-88 (100 m × 0,25 mm; debljina filma stacionarne faze 0,20 µm)	HP-5MS (30 m × 0,32 mm; debljina filma stacionarne faze 0,25 µm)
Noseći gas	Helijum (He)	Helijum (He)
Brzina protoka	1,2 ml/min	1,3 ml/min
Temperaturni program	140-240 °C uz promenu od 4 °C/min i održavanjem konačne temperature 10 min	60-315 °C sa promenom od 3 °C/min i održavanjem konačne temperature 15 min
Temperatura FID detektora	260 °C	300 °C
Temperatura MSD transfer linije	250 °C	315 °C
Elektronska jonizacija	70 eV	70 eV
Koncentracija uzoraka	1% V/V frakcije metilestara masnih kiselina u dihlormetanu	Nerazblažen rastvor
Volumen injektovanja	2 µl u split modu 1:25	1 µl u split modu 1:10

2.2.3 Priprema uzoraka, kvalitativna i kvantitativna analiza mikro- i makroelemenata metodom ICP-OES

a) Priprema uzoraka

Priprema uzoraka za kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikro- i makroelemenata u algama i morskoj travi, izvršena je metodom vlažne digestije u prisustvu azotne kiseline.

Priprema uzoraka (*H. tuna*, *C. nodosa* i *C. bursa*): Odmerena količina pulverizovanog uzorka (0,01 g) prelivena je sa 1 ml koncentrovane azotne kiseline i ostavljena da odstoji 24 sata. Nakon 24 sata, uzorak je zagrevan na temperaturi ključanja azotne kiseline (83 °C) do prestanka formiranja para azot oksida, braon boje. Nakon digestije, uzorak je filtriran, filtrat prenesen u normalni sud i dopunjen destilovanom vodom do 10 ml.

Priprema uzorka (*C. barbata*): Odmerena količina pulverizovanog uzorka alge *C. barbata* (0,01 g) prelivena sa 1 ml azotne kiseline i ostavljena da odstoji 24 sata. Nakon stajanja, smeša je zagrevana na temperaturi ključanja azotne kiseline (83 °C), do prestanka formiranja para azot oksida, braon boje. Nakon zagrevanja, uzorak je tretiran sa 4 ml koncentrovane hlorovodonične kiseline i ostavljen 48 sati da odstoji. Nakon digestije, uzorak je filtriran i filtrat prenesen u normalni sud. Normalni sud je dopunjen vodom do 10 ml.

Za razblaživanje uzoraka korišćena je prečišćena voda (Fisher Chemical- HPLC grade).

b) Kvalitativna i kvantitativna analiza mikro- i makroelemenata metodom ICP-OES

Sva merenja su izvršena na ICP-OES aparatu (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry, ARCOS FHE12, SPECTRO, Nemačka), metodom kvantitativne analize, prema uputstvima proizvođača. Radni uslovi ICP-OES instrumenta i parametri za određivanje koncentracije odabranih elemenata su dati u **Tabeli 10**.

Tabela 10. Operativni uslovi za ICP-OES

Snaga plazme (W)	1400
Protok gasa (L/min) <i>-Coolant</i> <i>-Auxiliary</i>	13 0,80
Tip nebulajzera	Cross flow
Protok nebulajzera (L/min)	0,95
Brzina pumpe (rpm)	30
Stabilizaciono vreme (s)	0
Broj proba za svako merenje	3
Pravac posmatranja plazme	aksijalni

Standardni rastvori i reagensi

Za pripremu standardnih rastvora za kalibraciju korišćen je Multistandard IV – multielementarni standardni rastvor (Merck) u koncentraciji od 1000 ppm. Pored Multistandarda IV korišćeni su dodatni standardni rastvori (Regacon) u koncentraciji od 1000 ppm, za arsen, fosfor, živu i silicijum. Kao noseći gas korišćen je argon 5,0 (čistoće 99,999%).

U **Tabeli 11**, prikazane su odabrane talasne dužine detekcije za svaki analizirani element, korelacioni koeficijent (R^2), limit detekcije (LOD), kao i opseg linearnosti.

Sva merenja su vršena u triplikatu.

Tabela 11. Parametri kalibracione prave za određivanje mikro- i makroelemenata.

Element	Talasna dužina detekcije (nm)	Korelacioni koeficijent (R^2)	Limit detekcije ($\mu\text{g/L}$)	Opseg linearnosti (mg/L)
As	197,262	0,99982	2,550	$2,55 \times 10^{-3}$ –3,60
Ag	224,641 328,068	0,99993 0,99995	0,390	$1,45 \times 10^{-2}$ –12,00 $3,99 \times 10^{-4}$ –12,00
B	182,641 249,773	0,99999 0,99999	6,430	$7,37 \times 10^{-3}$ –12,00 $6,43 \times 10^{-3}$ –12,00
Ba	233,527	0,99995	0,183	$1,83 \times 10^{-4}$ –12,00
Bi	190,241 223,061	0,99991 0,99996	3,530	$3,53 \times 10^{-3}$ –12,00 $3,68 \times 10^{-3}$ –12,00
Ca	183,801 396,847	0,99995 0,99946	2,140	1,6–480,00 $2,14 \times 10^{-3}$ –2,41
Cd	214,438	0,99994	0,127	$1,27 \times 10^{-4}$ –12,00
Co	228,616	0,99980	0,327	$3,27 \times 10^{-4}$ –12,00
Cr	283,563	0,99998	0,435	$4,35 \times 10^{-4}$ –12,00
Cu	224,700 324,754	0,99999 0,99999	0,259	$9,07 \times 10^{-4}$ –12,00 $2,59 \times 10^{-4}$ –12,00
Fe	259,941	0,99997	0,118	$1,18 \times 10^{-4}$ –12,00
In	325,609	1,00000	4,000	4×10^{-3} –12,00
K	404,721 766,491	0,99998 0,99999	0,378	0,798–300,00 $3,78 \times 10^{-4}$ –1,20
Li	323,261 670,780	1,00000 0,99997	0,058	$7,98 \times 10^{-2}$ –12,00 $5,75 \times 10^{-5}$ –1,20
Mg	279,553 285,213	0,99997 0,99994	0,115	$1,15 \times 10^{-4}$ –6,04 4,03–120,00
Mn	257,611	0,99992	0,036	$3,57 \times 10^{-5}$ –12,00
Na	330,237 598,592	0,99994 0,99989	4,750	7,98–480,00 $4,75 \times 10^{-3}$ –12,00
Ni	231,604	0,99994	0,474	$4,74 \times 10^{-4}$ –12,00
Pb	220,353	0,99998	1,780	$1,78 \times 10^{-3}$ –12,00
Sr	407,771	0,99998	$6,23 \times 10^{-3}$	$6,23 \times 10^{-6}$ –2,41
Tl	190,864	0,99998	1,72	$1,72 \times 10^{-3}$ –12,00
Si	288,158	0,99998	1,600	$1,6 \times 10^{-3}$ –120
Zn	213,856	0,99997	0,082	$8,2 \times 10^{-5}$ –12,00
P	214,914	0,99992	3,500	$3,5 \times 10^{-3}$ –240,00
Hg	184,950	0,9993	0,626	$6,26 \times 10^{-4}$ –6

2.2.4 Kvantitativna analiza β -glukana

Alge se smatraju bogatim izvorom β -glukana (1,3:1,6- β -D-glukana), pored ovs, kvasaca i pečuraka (Bobadilla i sar, 2018). Obzirom da je za pečurke i kvasce, takođe, karakterističan 1,3:1,6- β -D-glukan i 1,3- β -D-glukan, komercijalni kit koji se koristi za ispitivanje sadržaja β -glukana u pečurkama i kvascima (K-YBGL, Megazyme International, Irska), smatra se pogodnim.

Princip metode određivanja β -glukana se zasniva na činjenici da se 1,3:1,6- β -D-glukani, 1,3- β -D-glukani i α -glukani rastvore u ledenoj 12 M H_2SO_4 i nakon rastvaranja potpuno hidrolizuju rastvorom 2 M H_2SO_4 . Preostali fragmenti glukana se potom kvantitativno hidrolizuju korišćenjem smeše visoko prečišćene *egzo*-1,3- β -glukanaze i β -glukozidaze. Na ovaj način se određuju ukupni glukani. α -Glukani se specifično određuju i mere, predhodnom hidrolizom glukana do glukoze u prisustvu enzima amiloglukozidaze i α -amilaze. Sadržaj glukoze se određuje u priustvu GOPOD reagensa (Glucose Determination Reagent). Sadržaj β -glukana se određuje iz razlike ukupnih glukana i α -glukana.

a) Priprema reagenasa

Komercijalni YGBL kit se sastoji od sledećih reagenasa:

Bočica br. 1: *Egzo*-1,3- β -glukanaza (100 U/ml) i β -glukozidaza (20 U/ml), amonijum sulfatna suspenzija, 2 ml

Bočica br. 2: Rastvor amiloglukozidaze (1,630 U/ml) i invertaze (500 U/ml) u 50% (v/v) glicerolu, 20 ml.

Bočica br. 3: Pufer za GOPOD reagens; pufer (50 ml, pH 7,4). p-hidroksibenzoeva kiselina i natrijum azid (0,095%)

Bočica br. 4: Enzimi za GOPOD reagens; glukoza oksidaza, peroksidaza i 4-aminoantipirin. Prašak sušen zamrzavanjem.

Bočica br. 5: Standardni rastvor D-glukoze (5 ml, 1,00 mg/ml) u 0,2 % (w/v) benzojevoj kiselini.

Bočica br. 6: Kontrolni preparat β -glukana iz kvasca (~ 2 g β -glukana je deklarirano na bočici).

Priprema reagenasa prisutnih u komercijalnom YGBL kit-u:

- 1) U bočicu br. 1, dodato je 9 ml 200 mM natrijum acetatnog pufera (pH 5,0). Pripremljeni reagens je podeljen na alikvote jednake količine i deo ostavljen da se čuva u polipropilenskim epruvetama na - 20°C, između dve upotrebe. U toku izvođenja eksperimenta, reagens je čuvan na ledu. Kada se jednom razblaži, reagens je stabilan više od 2 godine na temperaturi - 20°C.
- 2) Sadržaj iz bočice br. 2 je korišćen u originalnom rastvoru.
- 3) Sadržaj bočice br. 3, je razblažen dejonizovanom vodom do 1 litra, do potpunog rastvaranja kristala. Razblaženje je rađeno u digestoru. Ovaj rastvor je označen kao **Rastvor 1**.
- 4) Sadržaj iz bočice br. 4 je rastvoren u približno 20 ml **Rastvora 1** i kvantitativno prenesen u bočicu br. 3 koja je sadržala preostali **Rastvor 1**. Bočica je prekrivena aluminijumskom folijom kako bi se reagens zaštitio od svetlosti. Ovaj reagens je označen kao **GOPOD reagens**, tj. reagens za određivanje glukoze. Reagens je stabilan ~ 3 meseca na 2-5°C ili > 12 meseci na - 20 °C.
- 5) Sadržaj iz bočice br. 5 je korišćen u originalu, bez dodatne pripreme. Rastvor je stabilan > 5 godina na sobnoj temperaturi.
- 6) Sadržaj iz bočice br. 6 je korišćen u originalu, bez dodatne pripreme. Rastvor je stabilan > 5 godina na sobnoj temperaturi.

Priprema reagenasa koji nisu dostupni u komercijalnom YGBL kit-u

1. Natrijum acetatni pufer (200 mM, pH 5,0). 11,6 ml glacijalne sirćetne kiseline (1,05 g/ml) je dodato u 900 ml dejonizovane vode i pH 5,0 podešena korišćenjem 4 M (16 g/100 ml) NaOH. Zapremina rastvora je podešena na 1 litar. Ovako pripremljen rastvor je stabilan ~ 1 godinu na temperaturi od 4 °C.

2. Natrijum acetatni pufer (1,2 M, pH 3,8). 69,6 ml glacijalne sirćetne kiseline (1,05 g/ml) dodati u 800 ml dejonizovane vode i podesiti pH na 3,8 korišćenjem 4M NaOH. Zapremina rastvora je podešena na 1 litar. Rastvor je stabilan 2 godine na sobnoj temperaturi.

3. Kalijum hidroksid (10 M). Priprema reagensa se vrši u digestoru. 561 g KOH je dodato u 700 ml destilovane vode uz mešanje do potpunog rastvaranja. Nakon

hlađenja, sud je dopunjen destilovanom vodom do 1 litra. Ovako pripremljen rastvor je stabilan više od 2 godine na sobnoj temperaturi.

4. Sumporna kiselina (12 M, 72 % m/m). U digestoru, rastvor je pripremljen pažljivim dodavanjem 640 ml koncentrovane kiseline (98%, specifična gustina = 1,835) u 300 ml destilovane vode. Rastvor je razblažen, dodavanjem dejonizovane vode do zapremine od 1 litra uz mešanje. Rastvor je stabilan na sobnoj temperaturi više od 4 godine.

Korišćena oprema:

1. Staklene epruvete: 16 x 100 mm, zapremine 14 ml
2. Epruvete za kultivaciju: 20 x 125 mm, sa zatvaračem
3. Vodeno kupatilo (JP Selecta, Spain)
4. Mikro-pipetor, 100 μ l
5. Magnetna mešalica, MM-530 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
6. Analitička vaga, CPA224S-0CE (Sartorius, Nemačka)
7. Centrifuga (LC-320 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
8. UV-Vis Spektrofotometar Evolution 300 (Thermo Scientific, USA)
9. *Vortex* mešalica (IKA-WERKE, Nemačka)

b) Određivanje sadržaja 1,3:1,6- β -glukana iz uzoraka algi i morske trave

Priprema uzoraka i određivanje ukupnih glukana (α -glukani i β -glukani) plus određivanje D-glukoze u oligosaharidima i saharozi i slobodna D-glukoza:

a) Priprema uzoraka: Rastvaranje i parcijalna hidroliza ukupnih glukana (α -glukani i β -glukani) plus D-glukoza u oligosaharidima i saharozi i slobodna D-glukoza:

1. U epruvetama za kultivaciju, sa visokom tačnošću je odmereno po 90 mg, pulverizovanih uzoraka algi i morske trave. Epruvete su zatvorene poklopcem i prašak je uklonjen sa zidova epruvete tapkanjem o podlogu.
2. U svaku epruvetu je potom dodato po 2,0 ml ledene 12 M sumporne kiseline, epruvete zatvorene zatvaračem i sadržaj mešan na *Vortex* mešalici. Zatim, epruvete su postavljene na led i ostavljene da odstoje 2 sata. U toku ovog perioda, 3-4 puta,

epruvete su mešane, u intervalu od 10-15 sekundi na *Vortex* mešalici, kako bi rastvaranje β -glukana bilo potpuno.

3. Po 4 ml vode dodato je u svaku epruvetu i sadržaj je intenzivno mešan na *Vortex* mešalici 10 sekundi. Potom je u epruvete dodato po još 6 ml vode. Zatvorene epruvete su mešane na *Vortex* mešalici još po 10 sekundi.

4. Otvorene epruvete su potom stavljene u vodeno kupatilo na temperaturi od približno 100°C i nakon 5 minuta, epruvete su ponovo zatvorene i ostavljene 2 sata radi inkubacije.

5. Nakon zagrevanja, epruvete su ohlađene na sobnoj temperaturi, a zatvarači sa epruveta uklonjeni.

6. Sadržaj iz svake epruvete je kvantitativno prebačen u normalne sudove od po 100 ml, korišćenjem 200 mM natrijum acetatnog pufera (pH 5) za ispiranje.

7. Po 6 ml 10 M rastvora KOH dodato je u normalne sudove sa uzorcima i zapremina podešena pomoću 200 mM natrijum acetatnog pufera (pH 5). Rastvore intenzivno promešati do homogenizacije. Manja količina rastvora je prebačena u epruvetu od polipropilena i centrifugirana na 1500 g, 10 minuta.

b) Određivanje ukupnih glukana plus D-glukoza u saharozi i slobodna D-glukoza

1. Po 0,1 ml alikvota, u duplikatu, centrifugiranih i filtriranih ekstrakata, preneto je na dno staklenih epruveta.

2. Po 0,1 ml smeše egzo-1,3- β -glukanaze (20 U/ml) i β -glukozidaze (4 U/ml) u 200 mM natrijum acetatnom puferu (pH 5,0) dodato je u svaku epruvetu sa uzorkom. Svaka epruveta je intenzivno mešana na *Vortex* mešalici i inkubirana po 60 minuta na temperaturi od 40°C.

3. Po 3 ml GOPOD reagensa dodato je u svaku epruvetu i inkubirano po 20 minuta na 40°C. Prelazak boje iz žute u crvenu označavao je kraj inkubacije.

4. Istovremeno sa uzorcima, za inkubaciju je postavljena i slepa proba (smeša reagenasa: 0,2 ml natrijum acetatnog pufera (0,1 ml natrijum acetatnog pufera (200 mM, pH 5,0) + 3,0 ml GOPOD reagensa) i kontrola (0,1 ml standard D-glukoze (1

mg/ml) + 0,1 ml natrijum acetatnog pufera (200 mM, pH 5,0) + 3,0 ml GOPOD reagensa).

5. Apsorbanca je merena na 510 nm, u odnosu na slepu probu.

Priprema uzoraka i određivanje α -glukana (fitoglikogen i skrob) plus D-glukoza u saharozi i slobodna D-glukoza

a) Priprema uzoraka: rastvaranje, hidroliza i određivanje α -glukana (fitoglikogen i skrob) plus D-glukoza u saharozi i slobodna D-glukoza

1. U epruvetama za kultivaciju, sa visokom tačnošću je odmereno po 100 mg, pulverizovanih uzoraka algi i morske trave. Epruvete su zatvorene poklopcem i tapkanjem o podlogu, prašak je uklonjen sa zidova epruvete.

2. U svaku epruvetu je dodato po 2 ml 2 M rastvora KOH. U epruvetu je dodat magnet, a epruveta sa uzorkom je stavljena u čašu sa ledenom vodom, koja je stajala na magnetnoj mešalici. Mešanje je vršeno oko 20 minuta.

3. U epruvetu je potom dodato 8 ml 1,2 M rastvora natrijum acetatnog pufera (pH 3,8) uz mešanje na magnetnoj mešalici. Neposredno je dodato 0,2 ml amiloglukozidaze (1,630 U/ml) i invertaza (500 U/ml). Smeša je dobro promešana i epruveta postavljena na vodeno kupatilo na 40 °C. Postupak je ponovljen za svaki uzorak.

4. Epruvete sa uzorcima su inkubirane 30 minuta na temperaturi od 40 °C, uz povremeno mešanje na *Vortex* mešalici.

5. Epruvete su odmah nakon hlađenja postavljene na centrifugu na 1,500 g, 10 minuta.

6. Po 0,1 ml alikvota svakog uzorka, u duplikatu, pomešano je sa po 0,1 ml natrijum acetatnog pufera (200 mM, pH 5,0) + 3 ml GOPOD reagensa i inkubirano 20 minuta na 40 °C. Istovremeno sa uzorcima, postavljena je slepa proba (smeša reagenasa: 0,2 ml natrijum acetatnog pufera (0,1 ml natrijum acetatnog pufera (200 mM, pH 5,0) + 3,0 ml GOPOD reagensa). Prelazak boje iz žute u crvenu označava kraj inkubacije.

7. Apsorbancija je izmerena na 510 nm, u odnosu na slepu probu.

Izmerene količine uzoraka za određivanje ukupnih glukana i α -glukana date su u

Tabeli 12.

Tabela 12. Odmerena masa uzoraka algi i morske trave za kvantitativnu analizu ukupnih glukana i α -glukana (mg)

Uzorak	Odmerena masa uzoraka za određivanje ukupnih glukana (mg)	Odmerena masa uzoraka za određivanje α-glukana (mg)
<i>Halimeda tuna</i>	90,3	100,6
<i>Codium bursa</i>	90,2	100,2
<i>Cystoseira barbata</i>	90,5	100,4
<i>Cymodocea nodosa</i>	89,9	99,9

3. Biološke aktivnosti ekstrakata ispitivanih uzoraka algi i morske trave

3.1. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave

3.1.1 Testirani mikroorganizmi

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave korišćen je jedan soj gljive, *Candida albicans* ATCC 24433 i četiri bakterijska soja: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 i *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Sojevi bakterija su održavani na čvrstim podlogama kao što je Müller-Hinton-ov bujon (Torlak, Srbija), a soj gljivice je održavan na Sabouraud agaru (Torlak, Srbija) na temperaturi od 4 °C i presejavani jednom mesečno.

3.1.2 Hranljive podloge

Prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave korišćene su sledeće podloge:

a) Müller-Hinton-ov bujon (Torlak, Srbija), za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata. Bujon se sastoji od: 17,5 g kiselog kazein hidrolizata, 2,0 g mesnog ekstrakta i 1,5 g skroba. Podloga se priprema tako što se odmeri 21 g praha podloge i doda 1000 ml hladne prečišćene vode. Podloga se pažljivo zagrevana do ključanja, u cilju potpunog rastvaranja praška. Rastvorena podloga je razlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

b) Sabouraud bujon (Torlak, Srbija), za ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata, koji se sastoji od: 10,0 g peptona (Torlak) i 2,0 g dekstroze. Podloga se priprema na sledeći način: u 30 g praha podloge se doda 1000 ml hladne prečišćene vode. Podloga je pažljivo zagrevana do ključanja, u cilju potpunog rastvaranja praška. Rastvorena podloga je rezlivena u epruvete i sterilisana u autoklavu 15 minuta na 121 °C.

3.1.3 Postupak pripreme rastvora za analizu i postupak ispitivanja antimikrobne aktivnosti

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti zasnovano je na određivanju minimalne inhibitorne koncentracije ekstrakata (MIC), tačnije određivanje najniže koncentracije ekstrakta koja ne pokazuje vidljiv rast mikroorganizama. Test se izvodi mikrodilucionom tehnikom (Eloff, 1998) na mikrotitracionim pločama sa 96 mesta (Spektar, Čačak).

Priprema rastvora za analizu (osnovni rastvor):

Odmerena količina suvog ekstrakta algi ili morske trave rastvorena je u dimetil sulfoksidu (DMSO) tako da koncentracija osnovnog rastvora bude 50 mg/ml. Za pripremu razblaženja (0,1 – 1,6 mg/ml) izdvojeno je 5 sterilnih epruveta. U prvu epruvetu je uneto tačno 4 ml hranljive podloge (Müller-Hinton-ov bujon-za ispitivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata, a Sabouraud bujon- za ispitivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata), a u preostale 4 epruvete je uneteo tačno po 2 ml potrebne hranljive podloge.

Postupak razblaženja štok rastvora (5 epruveta):

- iz prve epruvete je pipetom odmereno i izbačeno 128 µl hranljive podloge i uneto 128 µl osnovnog rastvora. Sadržaj u epruveti je izmešan na *Vortex* mešalici do homogenizacije. Koncentracija ekstrakta u prvoj epruveti je bila: $50 \text{ mg} \cdot 0,128 \text{ ml} / 4 \text{ ml} \cdot 1 \text{ ml} = 1,6 \text{ mg/ml}$;
- iz prve epruvete je preneto 2 ml rastvora u drugu epruvetu i izmešano na *Vortex* mešalici, tako da je koncentracija ekstrakta u drugoj epruveti bila 0,8 mg/ml;

- iz druge epruvete je preneto 2 ml rastvora u treću epruvetu i izmešano na *Vortex* mešalici, tako da je koncentracija ekstrakta u trećoj epruveti bila 0,4 mg/ml;
- iz treće epruvete je preneto 2 ml rastvora u četvrtu epruvetu i izmešano na *Vortex* mešalici, tako da je koncentracija ekstrakta u četvrtoj epruveti bila 0,2 mg/ml;
- iz četvrte epruvete je preneto 2 ml rastvora u petu epruvetu i izmešano na *Vortex* mešalici, tako da je koncentracija ekstrakta u petoj epruveti bila 0,1 mg/ml;

Postupak pripreme suspenzije mikroorganizama:

U veliku, sterilnu epruvetu je uneto 10 ml odgovarajuće podloge i pomoću eze, preneti jedna kolonija bakterija ili gljivice. Sadržaj u epruveti, zajedno sa ezom i kolonijom je homogenizovan na *Vortex* mešalici. U 5 ml bakterijske suspenzije, dodato je 100 µl rastvora 2,3,5-trifenil-tetrazolijum hlorida (TTC, Fluka, Nemačka), u cilju detekcije rasta bakterija. Za praćenje rasta gljivice, rastvor je pripremljen tako što je u 10 ml suspenzije gljivica dodato 300 µl rastvora TTC. TTC predstavlja indikator žive ćelije, i u prisustvu živih ćelija mikroorganizama ovaj reagens se oboji u crveno.

Postupak ispitivanja antimikrobne aktivnosti:

Na mikrotitracionu ploču je uneto: 100 µl bakterijske suspenzije sa TTC-jem i 100 µl rastvora uzorka određene koncentracije (1,6-0,1 mg/ml) u triplicatu.

Zajedno sa uzorcima je postavljena i pozitivna kontrola (200 µl suspenzije mikroorganizama u koju je dodat TTC) i negativna kontrola, koja predstavlja 200 µl rastvora koji je pripremljen tako što je u 1 ml rastvora ispitivanog ekstrakta dodato 20 µl TTC-ja.

Inkubacija mikrotitracionih ploča za ispitivanje antibakterijske aktivnosti je izvršena u trajanju od 24 h, u inkubatoru (CO2CELL 48, MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, Nemačka) na 37 °C. Inkubacija mikrotitracionih ploča sa ekstraktima algi i morske trave u cilju ispitivanja antifungalne aktivnosti, izvršena je u inkubatoru na 37 °C, u trajanju od 48 h.

3.2 Antioksidativna aktivnost ekstrakata algi i morske trave

Antioksidativna aktivnost ekstrakata algi i morske trave je ispitivana testom neutralizacije DPPH radikala uz modifikacije prema radu Marxen i sar (2007).

Priprema reagenasa:

0,5 mM rastvor DPPH: 9,86 mg DPPH je rastvoreno u 50 ml metanola na ultrazvučnom kupatilu, *ex tempore*.

Priprema ekstrakta za analizu:

Različite odvage ekstrakata algi i morske trave rastvorene su u metanolu, tako da se nakon dodatka DPPH reagensa postigne raspon koncentracija do vizuelnog prikaza promene obojenja iz ružičaste u žutu. Paralelno sa uzorcima postavljana je i slepa proba koja se sastojala od istih koncentracija ekstrakata, kao za analizu, razblaženih metanolom, samo bez dodatog DPPH.

Postupak:

Različite zapremine uzorka podobne koncentracije (10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 90 µl i 110 µl) se dopune metanolom do 2 ml i tom rastvoru je dodato 500 µl DPPH reagensa. Pripremljeni rastvori su homogenizovani na *Vortex* mešalici i nakon mešanja inkubirani 30 minuta na sobnoj temperaturi, na tamnom mestu. Slepa proba je pripremljena tako što su različite zapremine uzorka (10 µl, 30 µl, 50 µl, 70 µl, 90 µl i 110 µl) dopunjene metanolom do 2,5 ml. Apsorbancija je očitavana na 550 nm, uz slepu probu. 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH razblažen sa 4 ml metanola predstavlja kontrolu.

Inhibicija DPPH radikala se izračunava probit analizom prema jednačini:

$$\text{probit(I)} + 5 = k \cdot \log(c) + n$$

gde je:

I – inhibicija neutralizacije DPPH radikala

$$I = (A_{\text{kontrola}} - A_{\text{ekstrakt}}) / A_{\text{kontrola}}$$

c – koncentracija ekstrakta

k – nagib krive

n – odsečak na y-osi

Rezultati su izraženi kao IC₅₀, tj. kao koncentracija ekstrakta koja je potrebna za neutralizaciju 50% DPPH radikala, što se izračunava iz regresione krive za vrednost $\text{probit(I)}=0$.

Kao poredbeni standard je korišćena askorbinska kiselina (vitamin C) i galna kiselina u koncentracijama prikazanim u **Tabeli 13**.

Tabela 13: Koncentracije ekstrakata i standarda pripremljenih za DPPH test

Ispitivani uzorak	Opseg koncentracija DME (dihlormetan:metanol (1:1) ekstrakta)
<i>Halimeda tuna</i>	60,0 µg/ml; 181,0 µg/ml; 302,0 µg/ml; 422,0 µg/ml; 543,6 µg/ml; 664,4 µg/ml
<i>Codium bursa</i>	28,8 µg/ml; 86,4 µg/ml; 144,0 µg/ml; 230,4 µg/ml; 316,8 µg/ml
<i>Cystoseira barbata</i>	21,9 µg/ml; 65,6 µg/ml; 109,4 µg/ml; 175,0 µg/ml; 240,7 µg/ml
<i>Cymodocea nodosa</i>	31,6 µg/ml; 94,8 µg/ml; 158,0 µg/ml; 252,8 µg/ml; 347,6 µg/ml
Vitamin C (standard)	2,0 µg/ml; 4,0 µg/ml; 5,0 µg/ml; 6,0 µg/ml; 7,9 µg/ml
Galna kiselina (standard)	0,8 µg/ml; 1,0 µg/ml; 1,2 µg/ml; 1,5 µg/ml; 1,7 µg/ml; 2,1 µg/ml

3.3 Analiza citotoksične aktivnosti

3.3.1 Izabrane ćelijske linije

Za ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata algi i morske trave korišćene su četiri humane ćelijske linije:

- ćelije karcinoma grlića materice (HeLa);
- ćelije karcinoma kolona (LS174);
- ćelije humane hronične mijelogene leukemije (K562);
- nekancerogene ćelije fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5).

Navedene ćelijske linije su održavane u okviru monosloja u hranljivom medijumu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) na pH vrednosti od 7,2, u koji su dodate sledeće supstance: 10% fetalni goveđi serum, inaktivisan na 56 °C, 30 min; L- glutamin (3 mmol/l), penicilin (100 IU/ml), streptomycin (100 mg/ml) i HEPES (4-(2-hidroksil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina, 25 mmol/l. Ćelijske linije su čuvane na temperaturi od 37 °C, u sredini obogaćenoj 5% CO₂.

3.3.2 Tretman ćelijskih linija

Ekstrakti algi i morske trave, rastvoreni su u DMSO do koncentracije od 100 mg/ml a potom razblaženi pomoću hranljivog medijuma do odgovarajućih koncentracija. Ćelijske linije su ravnomerno zasejane u mikrotracione ploče sa 96 mesta u sledećim gustinama: HeLa u gustini od 2000 ćelija; LS174 u gustini od 7000 ćelija; K562 u gustini od 5000 ćelija; MRC-5 ćelije u gustini od 5000 ćelija. Nakon toga je dodato po 100 µl podloge. Istovremeno je sa ćelijskim linijama postavljena i slepa proba, koju predstavlja čist hranljivi medijum. Nakon 24 sata inkubacije, došlo je do potpune ćelijske adherencije za podlogu i u ćelijske linije je dodato po 50 µl pet različitih koncentracija ekstrakata, tako da su finalne koncentracije ekstrakata bile: 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml. Ćelijske linije su potom inkubirane 72 h, na 37 °C, u sredini obogaćenoj 5% CO₂.

3.3.3 Test određivanja ćelijskog preživljavanja (MTT test)

Citotoksična aktivnost ekstrakata algi i morske trave određena je kolorimetrijskim MTT testom (Microculture Tetrazolium Test) po metodi koju je definisao Mosman (1983), uz modifikacije koje su opisali Ohno i Abe (1991). Princip metode se zasniva na redukciji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromida (MTT reagensa) u ćelijskim mitohondrijama, pomoću enzima sukcinat dehidrogenaze, u vijabilnim ćelijama do nerastvornog formazana, ljubičaste boje. Nakon inkubacije ćelija u trajanju od 72 h u mikrotitracione ploče je dodato po 20 µL MTT reagensa, predhodno rastvorenog u fosfatnom puferu u koncentraciji od 5 mg/ml.

Uzorci su potom inkubirani još 4 h pod predhodno navedenim uslovima, nakon čega je u svaki bunarčić dodato po 100 µl 10% rastvora natrijum-dodecilsulfata (SDS) u cilju rastvaranja formiranog formazana. Nakon 24 h inkubacije, apsorbancija je merena na ELISA čitaču na 570 nm. Procenat preživljavanja ćelija, S (%) je izračunat korišćenjem sledeće formule:

$$S (\%) = (A_t - A_s) \times 100 / (A_k - A_s)$$

A_t – apsorbancija ispitivanih uzoraka

A_s – apsorbancija slepe probe

A_k – apsorbancija kontrolnih uzoraka

Rezultati su izraženi kao IC₅₀ vrednosti, odnosno koncentracije ekstrakata koje inhibiraju 50% preživljavanja ćelija u odnosu na netretiranu kontrolu.

3.4 Ispitivanje anti α -glukozidazne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave

Anti α -glukozidazna aktivnost ekstrakata algi i morske trave je određena korišćenjem testa inhibicije aktivnosti α -glukozidaze, enzima koji ima ulogu u razgradnji α -glikozidnih veza u molekulima ugljenih hidrata (Lordan i sar, 2013). Rastvor enzima je bio podešen na 400 IU/ml α -glukozidaze u 0,1 M fosfatnom puferu (pH 6,7). Test je rađen na mikrotitracionoj ploči sa 96 mesta.

Ekstrakti su rastvoreni u DMSO i dodatno razblaženi 0,1 M fosfatnim puferom (pH 6,7) tako da su finalne koncentracije ekstrakata bile: 166,67; 83,33; 41,67; 20,83; 10,42; 5,21 μ g/ml.

U mikrotitracione ploče, uneto je po 50 μ l rastvora analize, za svaku od 6 različitih koncentracija ekstrakata i po 50 μ l rastvora enzima. Smeša je inkubirana na 37 °C, 15 minuta. Reakcija je započeta dodatkom 50 μ l rastvora substrata, p-nitrofenil- α -D-glukopiranozida (1,5 mg/ml PNP-G u fosfatnom puferu) i neposredno nakon mernja apsorbancije na 405 nm, smeša je inkubirana još 15 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, drugi put je merena apsorbancija na 405 nm. Paralelno se sa uzorcima postavlja i slepa proba (smeša fosfatnog pufera, DMSO, rastvor enzima, rastvor PNP-G). Kao pozitivna kontrola korišćen je rastvor akarboze. Procenat enzimske inhibicije, I (%) je izračunat iz sledeće jednačine:

$$I (\%) = 100 \times (A_{2S} - A_{1S}) / (A_{2B} - A_{1B})$$

A_{1B} – apsorbancija slepe probe, prvo merenje

A_{2B} - apsorbancija slepe probe, drugo merenje

A_{1S} – apsorbancija analize, prvo merenje

A_{2S} - apsorbancija analize, drugo merenje

Eksperiment je urađen u duplikatu, a IC₅₀ je određena metodom linearne regresione krive. IC₅₀ vrednost predstavlja koncentraciju ekstrakta koji izaziva 50% inhibicije α -glukozidazne aktivnosti.

4. Hemijska analiza biološki aktivnih ekstrakata

4.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina (GC-FID)

Analiza sastava masnih kiselina u biološki aktivnim DME izvršena je metodom gasne hromatografije sa plameno-jonizacionim detektorom (GC-FID) po metodi Ichihara i Fukubayashi (2010).

Priprema reagensa za metilaciju masnih kiselina:

85% metanol (v/v): 85 ml metanola je pomešano sa 15 ml dejonizovane vode.

8% HCl (w/v): 9,7 ml conc. HCl je pomešano sa 41,5 ml 85% metanola (v/v).

Priprema uzoraka:

1 mg DME tretiran je sa 0,2 ml toluena, 1,5 ml metanola i 0,3 ml 8% HCl (w/v). Ovako pripremljen rastvor je zagrevan na 100 °C, 90 minuta. Nakon hlađenja do sobne temperature, u smešu je dodato 1 ml heksana i 1 ml vode. Uzorak je promešan na *Vortex* mešalici. Gornji heksanski sloj je izdvojen i direktno korišćen za GC analizu.

Analiza masnih kiselina GC-FID

Dobijeni estri masnih kiselina (*eng.* fatty acid methyl esters - FAMES) iz ekstrakata algi i morske trave, analizirani su gasnom hromatografijom na aparatu tipa Agilent Technologies 7890A, uz plameno jonizacionu detekciju (FID). Razdvajanje FAMES je izvršeno na kapilarnoj koloni tipa CP-Sil 88 (100 m × 0,25 mm × 0,2 μm) uz helijum, kao gas nosilac. Protok helijuma je bio 105 ml/min. Uzorci su injektovani na početnoj temperaturi od 80°C. Temperatura injektora je bila 250°C, a temperatura detektora 270°C. Temperaturni program je bio sledeći: porast temperature sa 80°C, 4°C/min na 220°C, 5 min, 4°C/min do 240°C, 10 min.

FAMES su identifikovani poređenjem njihovih retencionih vremena sa retencionim vremenima FAMES u standardu (FAME Mix, Supelco (USA)). Rezultati su izraženi kao procenat pojedinačne masne kiseline u ukupnom DME.

4.2 Kvantitativna analiza ukupnih polifenola, metodom po Folin-Ciocalteu, iz ekstrakata

Reagensi:

- 60 g/l Na₂CO₃ u vodi: 60 g bezvodnog Na₂CO₃ rastvoriti u 1l vode
- FC reagens: Folin-Ciocalteu reagens se razblaži vodom 10 puta.
- rastvor suvog ekstrakta (koncentracije ekstrakata algi i morske trave su date u **Tabeli 14**).

Tabela 14. Koncentracije ekstrakata algi i morske trave za određivanje sadržaja ukupnih polifenola (mg suvog ekstrakta/ml)

Naziv uzorka	DHM	70% Met	Aq
<i>Halimeda tuna</i>	12,40	10,30	10,00
<i>Codium bursa</i>	9,90	10,70	10,00
<i>Cystoseira barbata</i>	5,45	11,50	5,10
<i>Cymodocea nodosa</i>	2,58	6,15	10,00

Postupak:

100 µl rastvora uzorka se pomeša sa 750 µl rastvora FC reagensa, snažno se promućka na *Vortex* mešalici i posle 5 minuta u svaki uzorak se doda 750 µl rastvora Na₂CO₃. Rastvori se snažno promućkaju i inkubiraju 90 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se meri na 725 nm, u poređenju sa slepom probom. Slepa proba se priprema na identičan način kao i analiza, samo se umesto uzorka koristi 100 µl rastvarača.

Sadržaj polifenola se izražava kao % galne kiseline koja se koristila kao standard.

Kalibraciona kriva:

U normalni sud od 100 ml odmeriti 10 mg standarda galne kiseline i dopuniti vodom do crte. Šema razblaženja za pripremu rastvora standarda za konstruisanje kalibracione krive je data u **Tabeli 15**.

Tabela 15. Šema za pripremu rastvora standarda za konstruisanje kalibracione krive za analizu ukupnih polifenola

GA (µl)	Voda (µl)	FC reagens (µl)	Na ₂ CO ₃ (µl)
10	90	750	750
20	80	750	750
30	70	750	750
40	60	750	750
60	40	750	750
80	20	750	750
100	0	750	750

Postupak pripreme rastvora je isti kao i pri radu sa uzorcima. Rezultati se izražavaju kao broj mg GA/mg suvog ekstrakta.

4.3 Ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja LC-MS hromatografijom iz ekstrakata

Priprema uzoraka:

Suvi DME, 70% Met i AqE ekstrakti su za HPLC analizu, rastvoreni u acetonitrilu, metanolu i dejonizovanoj vodi, tako da koncentracije ekstrakata budu 10 mg/ml. Rastvori su pre injektovanja, filtrirani kroz membranske filtre 0,45 µm.

LC-MS analiza ekstrakata:

LC-MS analiza polifenolnih jedinjenja je izvršena na Agilent LC/MS System 1260/6130 aparatu (Agilent Technologies, Nemačka), koji je opremljen DAD (diode array detector) detektorom i masenim detektorom (single quadrupole API-ESI mass selective detector, MSD). Za razdvajanje je korišćena Zorbax SB-C18 analitička kolona (250 x 4,6 mm; veličina čestica 5 µm). Mobilna faza A je bila 0,1% rastvor mravlje kiseline u dejonizovanoj vodi, a kao mobilna faza B je korišćen acetonitril. Primenjen je sledeći gradijent: 0 min -10 % B; 60 min -100% B; 6 min -100% B. Brzina protoka je bila 0,8

ml/min, a volumen injektovanja 10 µl. Temperatura kolone je bila 25 °C. DAD detektor je podešen da snima u opsegu talasnih dužina od 210-380 nm. Podaci za ESI (Electrospray ionization detector) maseni spektar su snimljeni u negativnom modu uz nebulizaciju u prisustvu azota na protoku od 10 ml/min, na pritisku od 40 psi i na temperaturi od 350 °C. Kapilarni napon je bio podešen na 3500 V. Signali deprotonovanih molekula su registrovani na naponu fragmentora od 100 V. Dodatni fragmenti su snimljeni na naponu fragmentora od 170 V i 250 V. Opseg masa je bio podešen u rasponu od 100- 1200 m/z.

Jedinjenja su identifikovana korišćenjem elektronske baze podataka masenih spektara NIST/NBS 05 and Wiley (8th edition), spektralnom analizom (poređenjem UV i NMR spektara) nakon izolacije jedinjenja i poređenjem sa literaturnim podacima (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013; Subhashini i sar, 2013; Enerstvedt i sar, 2016).

5. Izolacija jedinjenja semipreparativnom HPLC hromatografijom

Semipreparativna ekstrakcija je korišćena za izolaciju dominantnog jedinjenja detektovanog u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*.

Za semipreparativnu hromatografiju korišćen je Agilent LC/MS System 1260/6130 uređaj (Agilent Technologies, Nemačka), opremljen autosemplerom i frakcionim kolektorom. Za ekstrakciju je korišćena: kolona Zorbax SB C18 (9,4 x 250 nm, veličina čestica 5 µm), temperature kolone od 25 °C, protok od 3,3 ml/min, volumen injektovanja od 70 µl i DAD detektor u opsegu talasnih dužina od 210-380 nm. Kao mobilna faza A je korišćena dejonizovana voda, a acetonitril kao mobilna faza B u gradijentu: 0 min- 35% B, 20 min - 100% B, 25 min- 100% B, post time: 5 minuta. Frakcioni kolektor je bio podešen da sakuplja jednu dominantnu frakciju (2- 2,3 min). Prinos jedinjenja nakon uparavanja je bio 2,0 mg.

6. LC/MS analiza izolovanog jedinjenja iz ekstrakta morske trave *C. nodosa*

U cilju identifikacije izolovanog jedinjenja snimljen je maseni spektar visoke rezolucije (*eng.* high resolution mass spectra- HR/MS) na LC-MS instrumentu (Waters Alliance 2695) spregnutim sa Q-TOF (*eng.* quadrupole/time-of-flight) masenim spektrometrom (Waters SYNAPT). Eksperimentalni uslovi, dati su u **Tabeli 16**.

Tabela 16. Eksperimentalni uslovi LC/MS metode za identifikaciju jedinjenja izolovanog iz morske trave *C. nodosa*

Eksperimentalni uslovi (LC/MS)	
Kolona	YMC AQ C18 (2×100 mm, veličina čestica 3 μm)
Temperatura kolone	30 °C
Mobilna faza A	0,1% rastvor mravlje kiseline u dejonizovanoj vodi
Mobilna faza B	Acetonitril
Brzina protoka mobilne faze	0,2 ml/min
Gradijent	0'- 6% B; 30'- 65% B; 40'- 100% B
Snaga razdvajanja masa	10 000
Lock mass	Leukenkefalin
Kolizioni gas	Argon
Kolizionna energija	15 eV

7. NMR analiza izolovanog jedinjenja

Radi identifikacije izolovanog jedinjenja iz morske trave *C. nodosa*, snimljen je jednodimenzionalni ^1H NMR spektar (*eng.* nuclear magnetic resonance), korišćenjem magnetna od 400 MHz, na instrumentu tipa Avance AVIII 400, opremljen 5 mm PABBO BBO probom. Izolovano jedinjenje je pre analize rastvoreno u dimetilsulfoksidu (DMSO). Konstante kuplovanja (J) su izražene u Hz a hemijska pomeranja (δ) u ppm.

REZULTATI I DISKUSIJA

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršena je nutritivna, hemijska i biološka karakterizacija morskih algi *H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata* i morske trave *C. nodosa* iz Jadranskog mora. Iz navedenih uzoraka pripravljena su tri ekstrakta: dihlormetan: metanolni (1:1) (DME), 70% metanolni (70% Met) i vodeni ekstrakt (AqE), metodom hladne maceracije u trajanju od 48 sati.

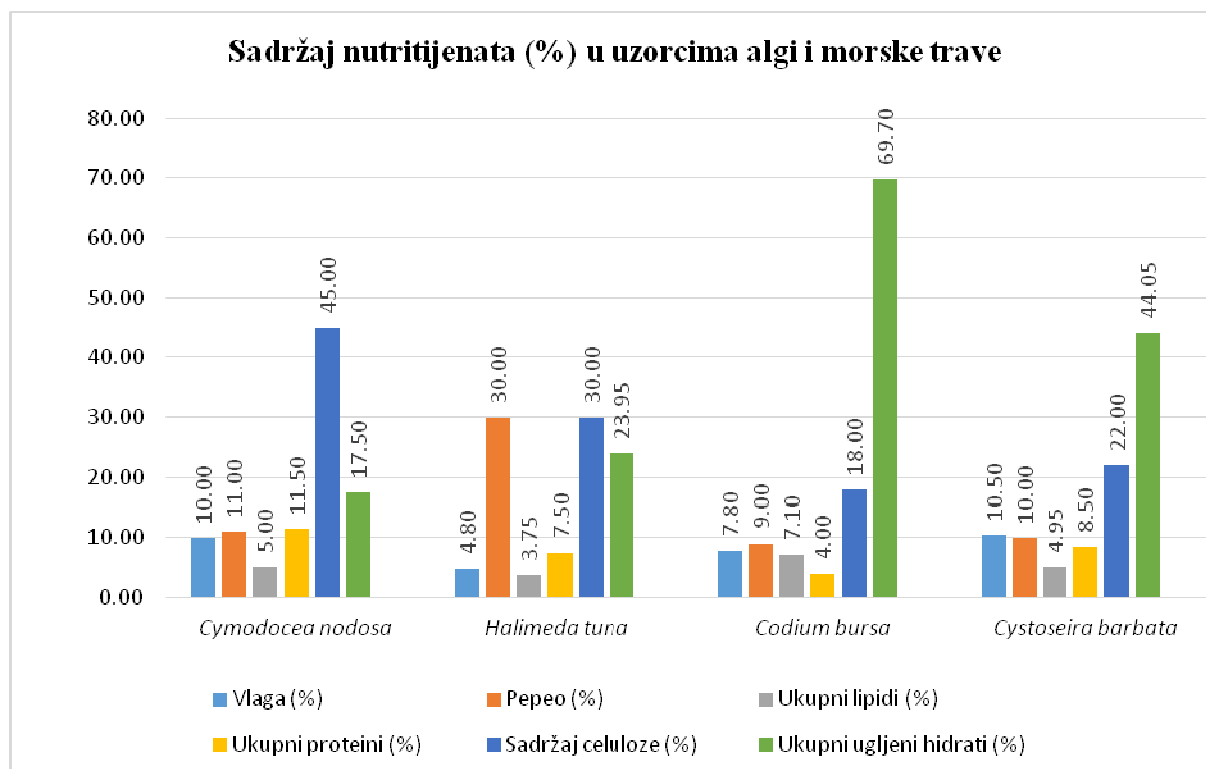
Dobijeni ekstrakti korišćeni su za dalja *in vitro* ispitivanja bioloških aktivnosti (antioksidativna, citotoksična, antimikrobna i anti α -glukozidazna aktivnost) i izvršena je njihova hemijska karakterizacija (analiza ukupnih polifenola, analiza profila prisutnih polifenolnih jedinjenja i analiza masnih kiselina).

Osušeni materijal navedenih uzoraka algi i morske trave, korišćeni su za dalju nutritivnu karakterizaciju (u skladu sa zvaničnim AOAC metodama) i hemijsku karakterizaciju (analiza masnih kiselina i sterola, analiza aminokiselina, analiza mikro- i makroelemenata, određivanje sadržaja β -glukana).

1. Hemijska karakterizacija izabranih uzoraka algi i morske trave

1.1 Sadržaj ugljenih hidrata, lipida, proteina, celuloze i energetska vrednost izabranih uzoraka algi i morske trave

U izabranim uzorcima algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*) izvršena je analiza hemijskog sastava nutrijenata, tačnije određivanje sadržaja: proteina, lipida i ugljenih hidrata, a uz njih i određivanje sadržaja vlage, pepela, celuloze i dijetnih vlakana. Na slici 7, prikazani su rezultati hemijske analize nutritivnih komponenti izabranih uzoraka algi i morske trave.



Slika 7. Sadržaj nutrijenata (%) u izabranim uzorcima algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*)

U izabranim uzorcima algi i morske trave, dokazan je generalno nizak sadržaj masti (< 7,1%). Najviši sadržaj ukupnih lipida identifikovan je kod alge *C. bursa* (7,1%) što je uporedivo sa literaturnim podacima za sadržaj lipida u algama roda *Codium*, koji je izuzetno varijabilan (7,3- 21,1%) i zavisi od različitih uslova i podneblja u kojima su alge sakupljane

(Xu i sar, 1998). Kod alge *C. barbata*, prijavljen je sadržaj ukupnih lipida koji se kretao između 0,66-0,98% računato u odnosu na svežu masu (Ivanova i sar, 2012). Uzevši u obzir da je prinos suve mase uzoraka, odabranih algi i morske trave korišćenih u ovoj disertaciji, bio oko 10% u odnosu na svežu sirovinu, dobijeni rezultat ukupnih lipida za algu *C. barbata* (4,95% u odnosu na suhu materiju), iznosi približno 0,495% u odnosu na svežu masu, što je neznatno niže u odnosu na rezultat navedenih autora, Ivanova i sar (2012).

Sadržaj proteina, u uzorcima izabranih algi i morske trave, takođe je bio nizak (< 11,5%) u poređenju sa jestivim algama koje se široko primenjuju u ishrani, kao što je nori (oko 35% u odnosu na suhu masu) i dulse (oko 47% suve mase) (Morgan i sar, 1980; Arasaki i sar, 1983).

Nasuprot ovoj činjenici, zbirni sadržaj ukupnih ugljenih hidrata i celuloze je generalno visok u svim uzorcima, a kreće se od 53,95% kod alge *H. tuna* i 87,70% kod *C. bursa*.

Najveći sadržaj lipida i ukupnih ugljenih hidrata (**Slika 7**) identifikovan je kod zelene alge *C. bursa*, što je u skladu sa najvišom energetsom vrednošću (490,4 kcal/100 g) izračunatom kod navedene alge (**Tabela 17**). Najniži sadržaj celuloze (18%), kao i najniži sadržaj pepela (9%) je takođe, određen kod alge *C. bursa*, što ovu algu čini najsvarljivijom. U poređenju sa jestivom algom iz roda *Codium* (*C. tomentosum*), alga *C. bursa* je pokazala veći sadržaj ukupnih ugljenih hidrata (69,70%) u odnosu na 32,8% određenih kod *C. tomentosum* (Rodrigues i sar, 2015). Sadržaj ukupnih masti kod alge *C. bursa* (7,1%) je takođe bio viši nego kod *C. tomentosum* (3,6%), ali sadržaj proteina kod *C. bursa* (4%) se pokazao značajno niži u poređenju sa *C. tomentosum* (18,8%) (Rodrigues i sar, 2015).

Imajući u vidu navedene rezultate, zelena alga *C. bursa* ima najveću šansu za primenu u ishrani, među svim uzorcima izabranih algi i morske trave.

Tabela 17. Energetska vrednost odabranih uzoraka algi i morske trave

Naziv uzorka	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Halimeda tuna</i>	<i>Codium bursa</i>	<i>Cystoseira barbata</i>
Energetska vrednost (kcal/100 g suve mase)	293,16	234,01	490,4	394,85

H. tuna je u ispitivanjima pokazala najnižu energetska vrednost (243,01 kcal/100 g), što je u kombinaciji sa visokim sadržajem celuloze (30 %) i visokim sadržajem pepela (30 %) ne svrstava u grupu algi koje bi bile hranljive za ljude. Uprkos ovoj činjenici, postoje navodi, da alga *H. tuna* ima prijatan ukus u kombinaciji sa solju i sirćem (Hills-Colinvaux i sar, 1980). Imajući u vidu visok sadržaj pepela koji ukazuje na visok sadržaj minerala, navodi na razmatranje potencijalne primene ove alge u mineralnim dijetetskim suplementima.

Morska trava *C. nodosa* je u navedenom ispitivanju imala nisku energetska vrednost (293,16 kcal/100 g), sa najvišim sadržajem celuloze (45%) što je ne može svrstati u nutritivno vredne namirnice.

1.2. Sadržaj mikro- i makroelemenata u uzorcima algi i morske trave

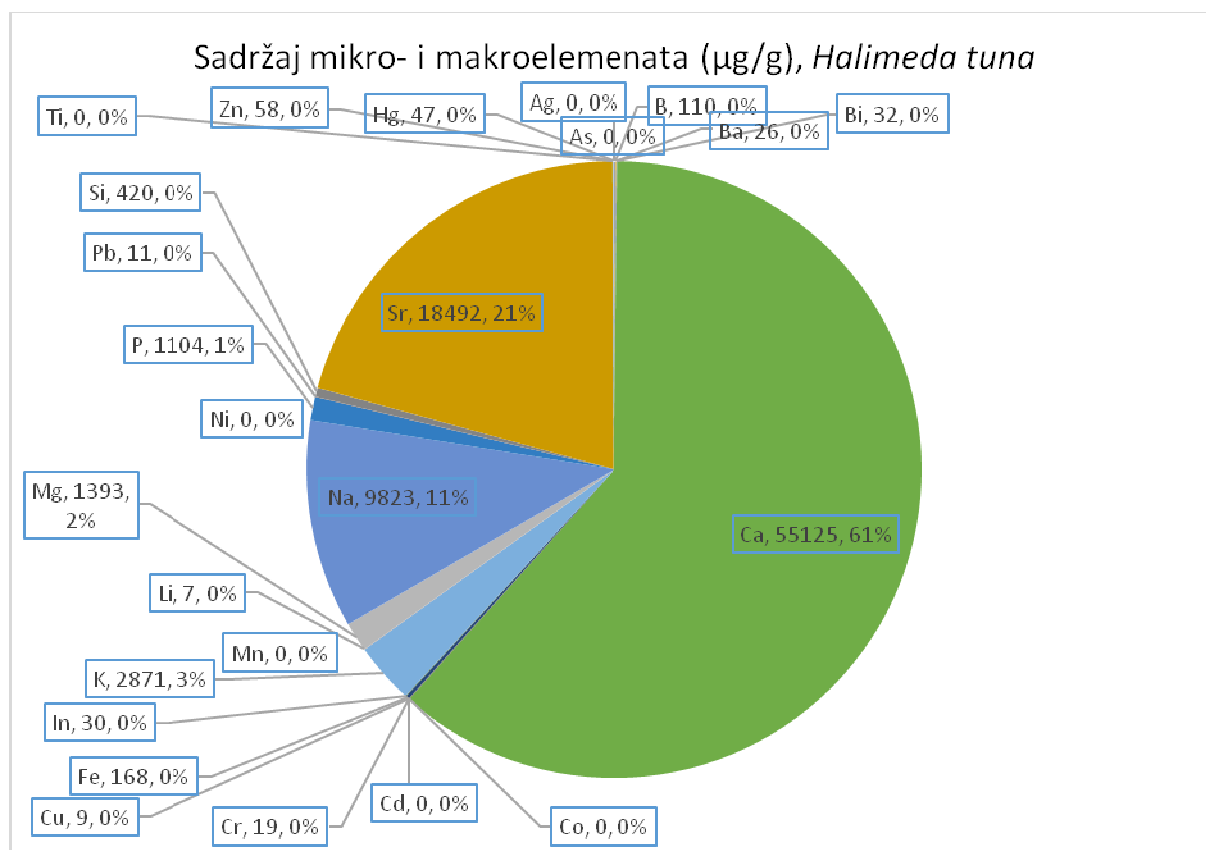
Visok sadržaj mineralnih materija u algama i morskim travama je generalno viši u poređenju sa sadržajem minerala u terestičnim biljkama (Omar i sar, 2015). Uslovi okoline, sezona, fiziološke karakteristike kao i geografsko poreklo morskih biljaka diktira mineralni sastav ovih vrsta (Keiji i Hori, 1989). Prema podacima Ministarstva poljoprivrede SAD (*eng.* United States Department of Agriculture) sadržaj pepela u povrću se kreće od 5- 10 g/100 g suve mase, dok se u algama ovaj opseg kreće od preko 30 g/100 g suve mase (Sánchez-Machado i sar, 2004).

Morske trave, imaju interesantan mineralni sastav, daleko raznovrsniji od terestičnih biljaka. Immaculate i sar (2018), upoređivali su mineralni sastav 3 morske trave: *Cymodocea serrulata*, *Syringodium isoetifolium* i *Halodule uninervis*. Kod morske trave *C. serrulata* sadržaj magnezijuma je bio visok (1015 mg/100 g), dok su kod *S. isoetifolium* i *H. uninervis* dominantni minerali bili natrijum i kalcijum.

Mineralni profil alge *H. tuna* dat je na **Slici 8**, gde se može videti da je sadržaj Ca dominantan u koncentraciji 55125 µg/g, tačnije 61% u odnosu na ukupan mineralni sastav i 5,51% u odnosu na suhu materiju, što je oko četiri puta manje nego 22,42 % Ca, u odnosu na suhu materiju alge *H. tuna*, prijavljeno u radu Biligin i Ertan (2002). Visok sadržaj Ca kod alge *H. tuna* je očekivan, obzirom da je poznato da je ova alga jedan od glavnih tvoraca sedimenta u tropskim zonama (Johns i Moore, 1988). Prisustvo depoa kalcijum karbonata u tkivu talusa alge *H. tuna* čini ovu algu teško svarljivom za herbivore. Redosled mineralnih materija u algi *H. tuna* je sledeći: Ca>Na> K> Mg> P> Si> B> Zn> Bi> Ba> Cr> Cu> Li. Kod alge *H. tuna* je takođe primećeno da je sadržaj strncijuma (Sr) trideset puta veći nego kod

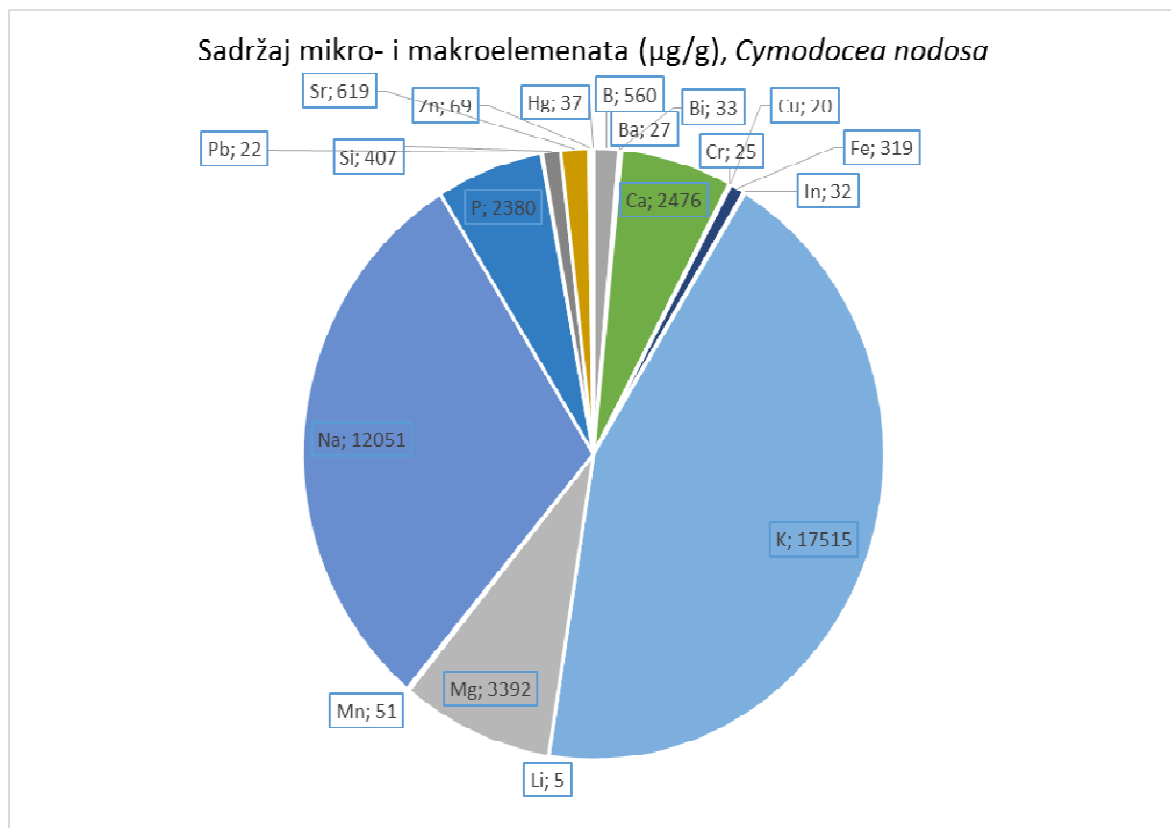
morske trave *C. nodosa* i četrdesetosam puta veći nego kod *C. bursa*. Visok stepen akumulacije Sr kod *H. tuna* može se objasniti visokim sadržajem Ca i činjenicom da Sr ima visok afinitet za plazma membranske transportere za K i Ca (Jureša i Blanuša, 2003; Fukuda i sar, 2014; Burger i Lichtscheidl, 2019).

Ca se generalno u algama nalazi u proseku od 4-7% suve materije. Imajući u vidu prosečnu količinu od 8 g suve materije algi u porciji, to bi generalno značilo unos od 560 mg Ca. Imajući u vidu dobru iskoristljivost Ca iz algi, u kojima se Ca nalazi u obliku fosfata, i činjenicu da je preporučeni dnevni unos Ca između 800 i 1000 mg, alge predstavljaju značajan izvor ovog minerala u ishrani (Kumar i sar, 2008).



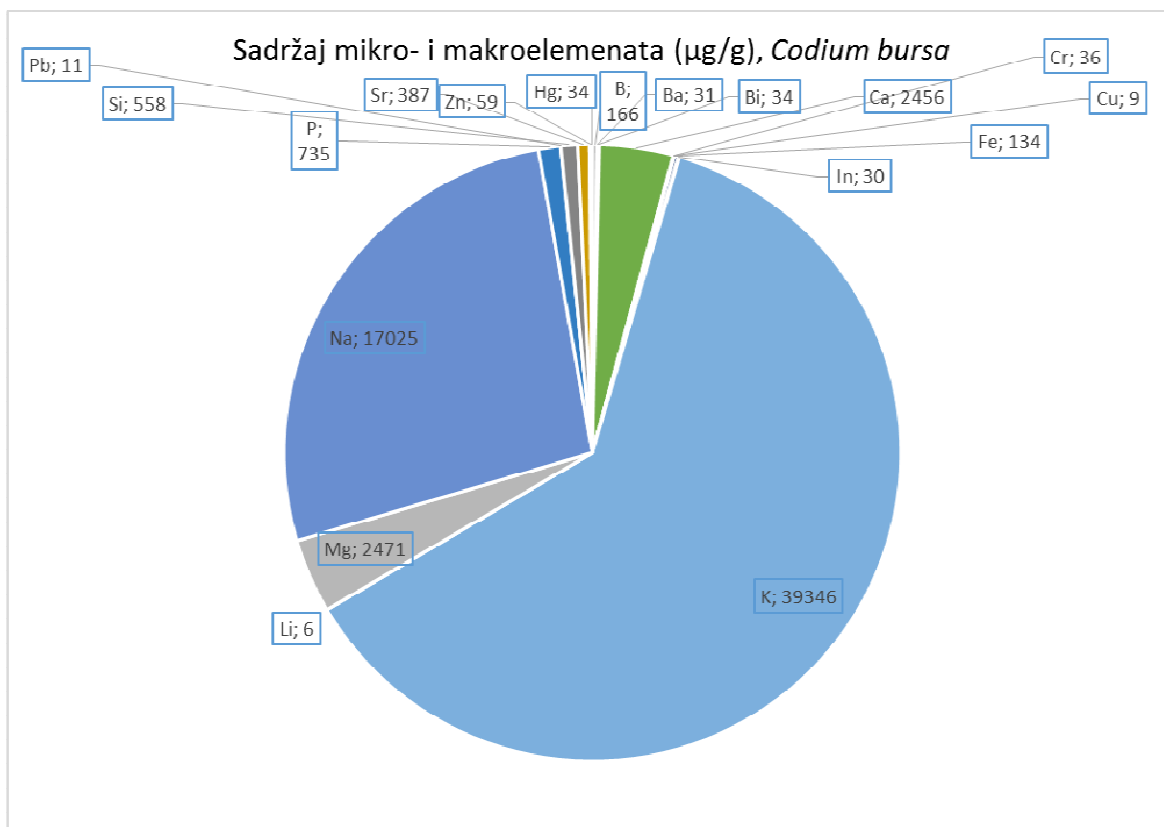
Slika 8. Sadržaj mikro- i makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) identifikovan kod alge *H. tuna*

Kod uzoraka *C. nodosa*, *C. bursa*, i *C. barbata* sadržaj kalijuma kao makroelementa je na prvom mestu i kreće se od 17515 $\mu\text{g/g}$ do 42420 $\mu\text{g/g}$. Opadajući redosled koncentracija minerala kod *C. nodosa* i *C. bursa* je bio sledeći: K > Na > Mg > Ca > P > Si > Zn > Bi > Ba > Cr > Cu > Li (Slika 9 i Slika 10). Kod braon alge *C. barbata* redosled koncentracija minerala u uzorku je bio: K > Na > P > Si > Mg > Bi > In > Zn > Ba > Ag, dok je sadržaj Ca bio ispod limita detekcije (Slika 11).

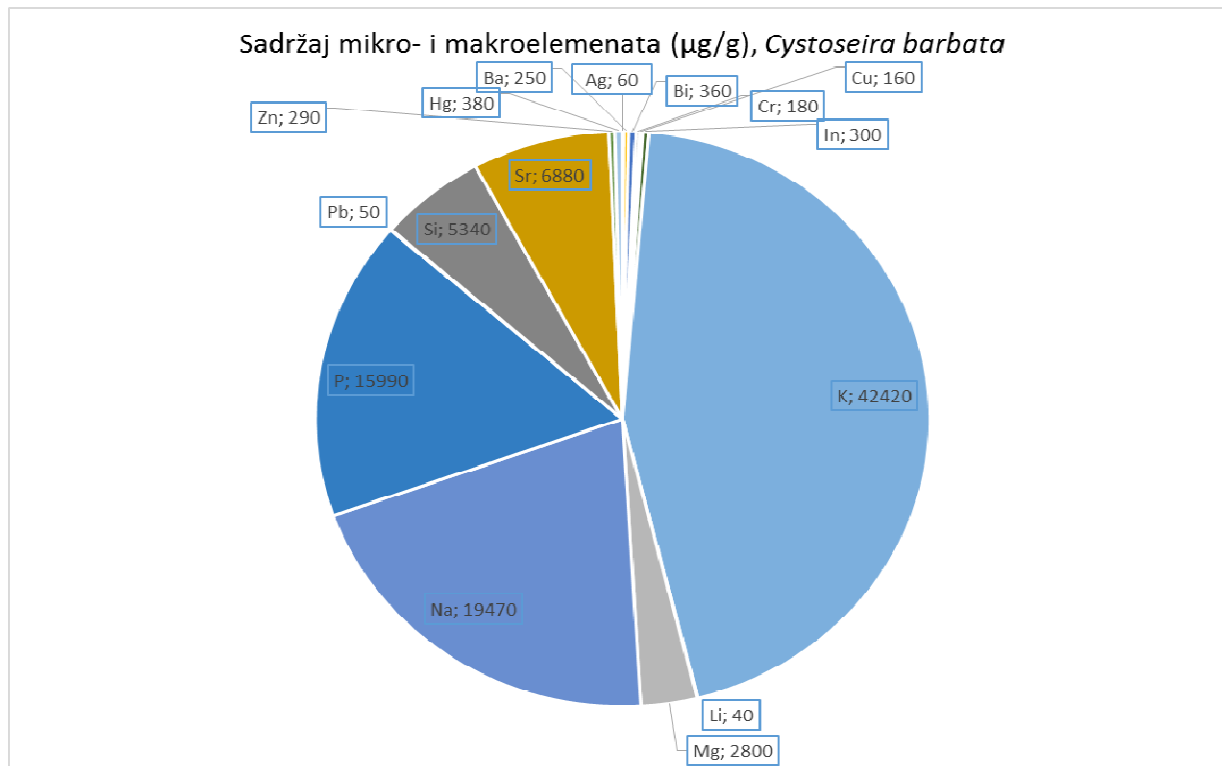


Slika 9. Sadržaj mikro- i makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) identifikovan kod morske trave *C. nodosa*

U rezultatima Kolsi i sar (2016) kod morske trave *C. nodosa*, Ca i Mg bili su dominantni ($7000,38 \pm 0,48 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$ i $3412,53 \pm 0,86 \mu\text{g} / 100 \text{ g}$, respektivno), dok su u našim rezultatima, kod iste morske trave dominantni minerali bili K i Na ($17515 \mu\text{g/g}$ i $12051 \mu\text{g/g}$, respektivno).



Slika 10. Sadržaj mikro- i makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) identifikovan kod alge *C. bursa*



Slika 11. Sadržaj mikro- i makroelemenata ($\mu\text{g/g}$) identifikovan kod alge *C. barbata*

Sadržaj fosfora kod alge *C. barbata* je bio najviši u poređenju sa ostalim ispitivanim uzorcima (15990 µg/g). Fosfor u algama postoji kao organski vezan (u vidu monoestara i diestara) i neorganski vezan (u obliku ortofosfata i pirofosfata). Glavni oblik prisutnog fosfora u algama je organski monoestar, β-glicerofosfat, detektovan u koncentraciji od 22,6% u odnosu na ukupan fosfor (Feng i sar, 2019). Inetresantno je da je glavni izvor fosfora u namirnicama zapravo poreklom iz fosfatnih konzervanasa koji su sami po sebi štetni, pogotovu kod pacijenata sa renalnim oboljenjima (Sullivan i sar, 2007), pa bi se koristan izvor fosfora mogao potražiti u morskim organizmima.

Prema Američkoj asocijaciji za kardiovaskularne bolesti (eng. American Heart Association) odnos Na/K je izuzetno važan u tretamanu hipertenzije. Kod algi *C. bursa*, *C. barbata* i morske trave *C. nodosa*, ovaj odnos je bio nizak, što ukazuje na potencijalno uključivanje ovih algi u ishranu pacijenata sa visokim krvnim pritiskom (**Tabela 18**).

Tabela 18. Odnos Na/K u uzorcima algi i morske trave

	<i>Halimeda tuna</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Codium bursa</i>
Na/K	3,42	0,46	0,69	0,43

U Pravilniku o maksimalnim količinama određenih kontaminenata u hrani (“Službeni glasnik RS, broj 81/19) nisu jasno definisane referentne vrednosti za maksimalno dozvoljene količine teških metala u morskim algama, pa će se radi komentarisanja rezultata prikazanih u ovoj disertaciji za sadržaj žive (Hg) i olova (Pb), koristiti referentne vrednosti date za meso riba i proizvode ribarstva.

Maksimalan dozvoljeni sadržaj Hg u proizvodima ribarstva i mesu riba prema gore navedenom Pravilniku je 0,5 mg/kg vlažne mase. Uzevši u obzir prinos suve materije nakon sušenja vlažne mase algi i morske trave od 10%, sadržaj Hg u našim uzorcima se kreće od 3,4 mg/kg vlažne mase (*C. bursa*) do 38 mg/kg vlažne mase (*C. barbata*) što je značajno više u poređenju sa referentnom vrednošću datom u Pravilniku (**Slike 8-11**).

Dozvoljeni sadržaj Pb u mesu riba je u Pravilniku definisan kao 0,30 mg/kg vlažne mase, a u našim uzorcima se kretao od 1,1 mg/kg vlažne mase (*C. barbata* i *H. tuna*) do 5 mg/kg vlažne mase kod *C. bursa* (**Slike 8-11**).

Visoke vrednosti Hg i Pb u ispitivanim uzorcima su zabrinjavajuće i ukazuju na visok stepen kontaminacije sredine i ekosistema Jadranskog mora.

Takođe, visok sadržaj stroncijuma (Sr) koji je određen u ovoj disertaciji (387- 18492 µg/kg suve materije) takođe ukazuje na visok stepen zagađenosti Jadranskog mora, što se mora imati na umu ukoliko bi se navedeni uzorci eksploatisali u industriji životnih namirnica (Burger i Lichtscheidl, 2019).

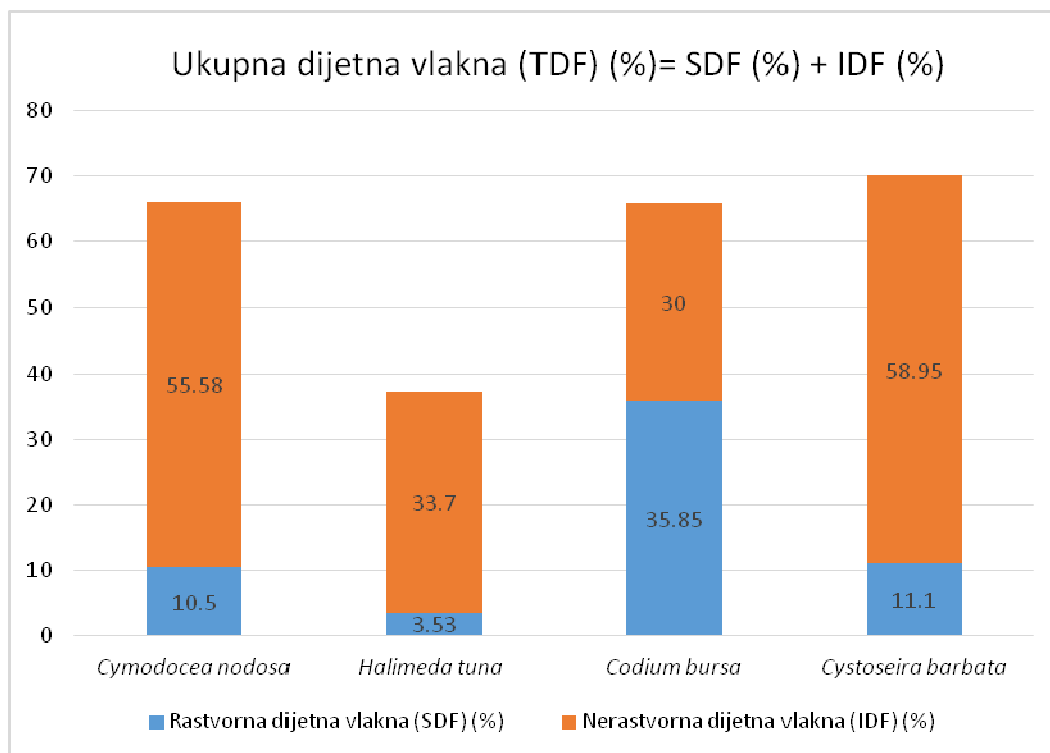
1.3. Sadržaj dijetnih vlakana u uzorcima algi i morske trave

Dokazano je da su morske alge značajan izvor dijetnih vlakana, među kojima dominira sadržaj rastvornih dijetnih vlakana (Lahaye, 1991).

Rastvorna dijetna vlakna imaju ulogu prebiotika, povećavaju osećaj sitosti, mogu da budu korisna u redukciji telesne mase, smanjuju rizik od kardiovaskularnih oboljenja, preveniraju razvoj kancera kolona i povoljno deluju u prevenciji konstipacije (Dreher, 1987; Ye i sar, 2015). Rastvorna dijetna vlakna, takođe imaju i hipoholesterolemijsku i hipoglikemijsku ulogu (Mabeau i sar, 1993). Nerastvorna dijetna vlakna su metabolički inertna, ne rastvaraju se u vodi, ali zato imaju sposobnost bubrenja, mogu biti prebiotici i da fermentišu u debelom crevu. Nabubrela vlakna olakšavaju pokretanje sadržaja kroz gastrointestinalni trakt, olakšavajući defekaciju. SDF (pektin, guar guma i sl.), imaju sposobnost rastvaranja u vodi, a u kolonu, brzo fermentišu u gasove i druge bioaktivne proizvode.

Ovo su prvi rezultati određivanja sadržaja dijetnih vlakana u uzorcima algi poreklom iz Jadranskog mora. U poređenju sa sadržajem dijetnih vlakana u uzorcima jestivih morskih algi sa obale Čilea (Ortiz i sar, 2006), kao što su *Ulva lactuca* i *Durvillaea antarctica*, alga *C. bursa* je pokazala veći sadržaj SDF (35,85% u odnosu na $27,2 \pm 1,2\%$ i $27,7 \pm 1,2\%$, respektivno) i niži sadržaj IDF (30% u odnosu na $33,3 \pm 0,3\%$ i $47,7 \pm 0,3\%$, respektivno) što ide u prilog njenoj potencijalnoj primeni u ishrani.

Najviši sadržaj SDF, među ispitivanim uzorcima algi i morske trave, dokazan je kod alge *C. bursa* (35,85%) što je prikazano na **Slici 12**.



Slika 12. Sadržaj ukupnih, rastvornih (SDF) i nerastvornih dijetnih vlakana (IDF) u izabranim uzorcima algi *H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*)

Kod *C. barbata* je dokazan najveći sadržaj ukupnih dijetnih vlakana (70,05%) i najviši sadržaj IDF u poređenju sa svim ispitivanim uzorcima (58,95%).

Kod alge *H. tuna*, sadržaj IDF je bio 10 puta veći nego sadržaj SDF.

Pokazani su povoljni zdravstveni efekti dijetnih vlakana u tretmanu dijabetesa, jer povećavaju osetljivost tkiva na insulin (Li i Uppal, 2010). Dijetna vlakna takođe imaju sposobnost smanjenja rizika od kardiovaskularnih oboljenja, gojaznosti, dislipidemije, hipertenzije i inflamacije udružene sa metaboličkim sindromom (Galisteo i sar, 2008).

1.4. Sadržaj masnih kiselina u uzorcima algi i morske trave

Alge i morske trave, generalno nisu bogate lipidima. Uprkos tome, brojni istraživači su u algama i morskim travama pokazali visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje imaju niz povoljnih zdravstvenih efekata (Kumari i sar, 2010).

U svim ispitivanim uzorcima palmitinska kiselina (C16:0) je dokazana u najvišoj koncentraciji (**Tabela 19**). Miristinska (C14:0) i stearinska kiselina (C18:0) su dokazane u svim ispitivanim uzorcima. Među mononezasićenim masnim kiselinama (MUFA),

najzastupljenija je bila oleinska kiselina (C18:1 n-9 *cis*) u svim ispitivanim uzorcima, a najviši sadržaj oleinske kiseline je detektovan kod morske trave *C. nodosa* (12,768 mg/g). Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima Xu i sar (1998), koji su u uzorcima algi roda *Codium*, pokazali da su najzastupljenije masne kiseline bile: palmitinska, oleinska i α -linolenska masna kiselina.

Najviši sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) među ispitivanim uzorcima algi i morske trave je pokazan kod morske trave *C. nodosa* (7,157 mg/g).

Svi testrani uzorci sadrže značajnu količinu omega-3 masnih kiselina kao što je α -linolenska kiselina (ALA) u širokom opsegu koncentracija od 0,029 do 3,291 mg/g. Za masne kiseline kao što su α -linolenska kiselina, eikozapentaenska (EPA) i dokozaheksaenska kiselina (DHA) je dokazano da imaju zaštitnu ulogu od kardiovaskularnih oboljenja (Wijendran i Hayes, 2004). Interesantno je da je sadržaj α -linolenske kiseline pokazan kod morske trave *C. nodosa* (3,291 mg/g tj. 0,33%) viši nego sadržaj iste masne kiseline prijavljen kod jestive alge nori (0,23 %) (Sánchez-Machado i sar, 2004). Takođe, u radu Jeevitha i sar (2013) kod kojih je između 4 ispitivane vrste morskih trava, *Syringodium isoetifolium* pokazala najbogatiji profil masnih kiselina, naš uzorak morske trave *C. nodosa* je pokazala do 3 puta veći sadržaj oleinske (12,768 mg/g u odnosu na 4,1 mg/g) i palmitinske (11,580 mg/g u odnosu na 4,5 mg/g) masne kiseline.

C. barbata, *C. nodosa* i *C. bursa* sadrže neparne masne kiseline (*eng.* odd chain fatty acids), tj. masne kiseline sa neparnim brojem C atoma, kao što su heptadekanska (C 17:0) i pentadekanska kiselina (C 15:0), a istraživanja su pokazala vezu između ovih masnih kiselina i smanjenog rizika od kardiovaskularnih i metaboličkih oboljenja (Jenkins i sar, 2015).

Najzastupljenija masna kiselina među n-6 masnim kiselinama, u ispitivanim uzorcima je bila linolna kiselina (C 18:2 n-6), za koju je poznato da je jedna od glavnih masnih kiselina koja reguliše nivo LDL (*eng.* low density lipoproteins) holesterola u humanom organizmu (Wijendran i Hayes, 2004).

Tabela 19. Sadržaj masnih kiselina u odabranim uzorcima algi i morske trave (mg/g)

Masna kiselina, mg/g	<i>Halimeda tuna</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Codium bursa</i>
C 12:0	0	0	0,137	0
C 14:0	0,171	0,741	0,466	0,316
C 15:0	0	0,068	0,148	0,037
C 16:0	0,717	6,376	11,580	3,638
C 17:0	0	0,050	0,193	0
C 18:0	0,146	0,471	1,071	0,736
C 20:0	0	0,064	0	0
C 22:0	0	0,089	0,326	0,187
C 23:0	0	0	0,209	0
C 24:0	0,019	0	0,306	0
∑ SFA	1,053	7,859	14,436	4,914
C 16:1	0,056	0,452	0	0,227
C 18:1 n-9 <i>cis</i>	0,070	2,170	12,768	0,895
C 18:1 n-9 <i>trans</i>	0,085	0	0	0
∑ MUFA	0,211	2,622	12,768	1,122
C 18:2 n-6	0,138	0,355	3,866	0
C 18:2 n-9 <i>trans</i>	0,085	0	0	0
C 18:3 n-3	0,029	0,272	3,291	0,240
∑ PUFA	0,167	0,627	7,157	0,490
PUFA/SFA	0,159	0,080	0,496	0,100

1.5. Sadržaj sterola u uzorcima algi i morske trave

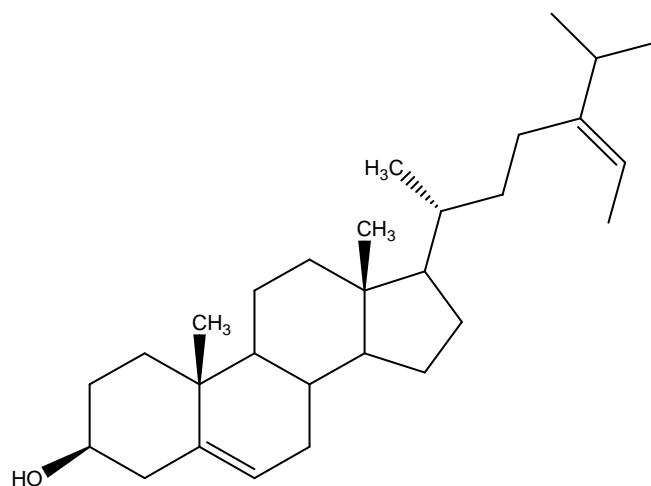
Steroli predstavljaju važnu komponentu membrane eukariotskih ćelija. Imaju ulogu u kontroli membranske propustljivosti i utiču na viskozitet ćelijske membrane (Piironen i sar, 2000). Sadržaj sterola, identifikovanih u izabranim uzorcima algi i morske trave prikazan je u **Tabeli 20**.

Tabela 20. Sadržaj sterola u izabranim uzorcima algi i morske trave ($\mu\text{g/g}$)

Sterol, $\mu\text{g/g}$	<i>Halimeda tuna</i>	<i>Cystoseira barbata</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Codium bursa</i>
β -Sitosterol	$73,90 \pm 0,08$	0	$5,70 \pm 0,03$	$95,21 \pm 0,16$
β -Stigmasterol	0	0	$6,04 \pm 0,08$	0
Fukosterol	0	$21,76 \pm 0,1$	0	0
Kampesterol	$3,78 \pm 0,12$	0	0	0

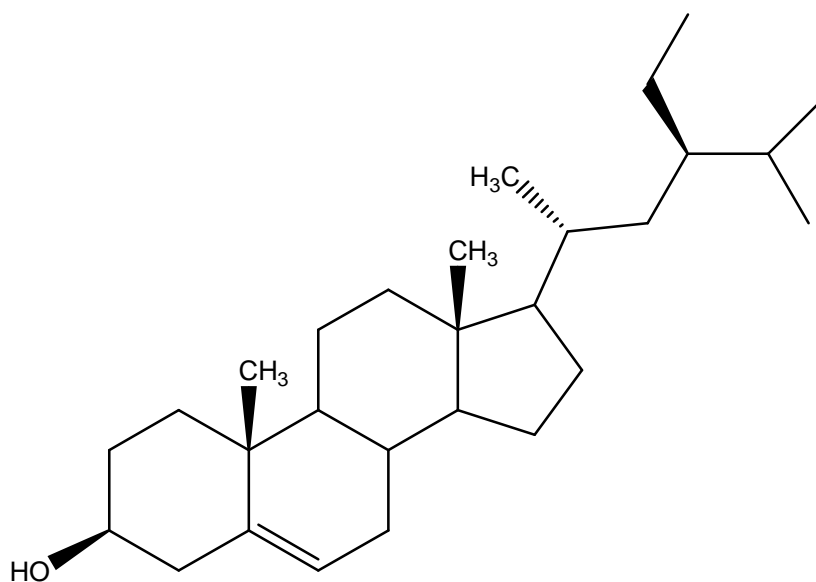
Broj nezavisnih eksperimenata $n=2$. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna devijacija

Kod mrke alge *C. barbata*, fukosterol (**Slika 13**) je detektovan u koncentraciji od $21,76 \pm 0,1 \mu\text{g/g}$ (**Tabela 20**). Prisustvo fukosterola u mrkim algama prvi je dokumentovao Patterson (1971). Relativno nizak sadržaj fukosterola može se pripisati sezoni u kojoj su uzorci sakupljeni (jul), što je u skladu sa istraživanjem Boulom i sar (2014), koji su prijavili da fukosterol i 24-metilenholesterol pokazuju jako visoke vrednosti u algama u zimskom periodu, verovatno kao prirodni mehanizam zaštite od niskih temperatura. Značajno smanjenje 24-metilenholesterola i fukosterola je identifikovano u letnjem periodu (Boulom i sar, 2014). Ispitivanja Honya i sar (1994), podržava činjenicu varijabilnog sadržaja fukosterola u mrkim algama (*Saccharina japonica*), koji dostiže maksimalni sadržaj u zimskim mesecima. Fukosterol je pokazao brojne biološke aktivnosti kao što su: antikancerogena, antioksidativna, antihiperглиkemijska, aktivnost u sniženju nivoa holesterola i aktivnost u prevenciji venske tromboze (Abdul i sar, 2016).



Slika 13. Fukosterol, sterol identifikovan kod mrke alge *Cystoseira barbata*

Sadržaj sterola, prijavljen u zelenim algama je kompleksniji i razlikuje se značajno u poređenju sa drugim vrstama algi (Patterson, 1997). U obe ispitivane zelene alge (*H. tuna* i *C. bursa*) nađena je značajna količina β -sitosterola (**Slika 14**). Poznato je da β -sitosterol smanjuje rizik od benigne hiperplazije prostate, da ima ulogu u prevenciji kolorektalnog karcinoma i srčanih oboljenja, kao i ulogu regulaciji imunskog sistema, u tretmanu tuberkuloze, hiperholesterolemije, reumatoidnog artritisa i cervikalnog kancera (Saeidnia, 2014).



Slika 14. β -sitosterol, sterol identifikovan kod zelenih algi *Codium bursa*, *Halimeda tuna* i morske trave *Cymodocea nodosa*

Kampesterol je detektovan u veoma maloj koncentraciji ($3,78 \pm 0,12 \mu\text{g/g}$) kod alge *H. tuna*. Postoje brojna istraživanja koja ukazuju na različite biološke aktivnosti kampesterola, a najznačajnije su snižavanje nivoa holesterola i antikancerogeni efekat (Choi i sar, 2007).

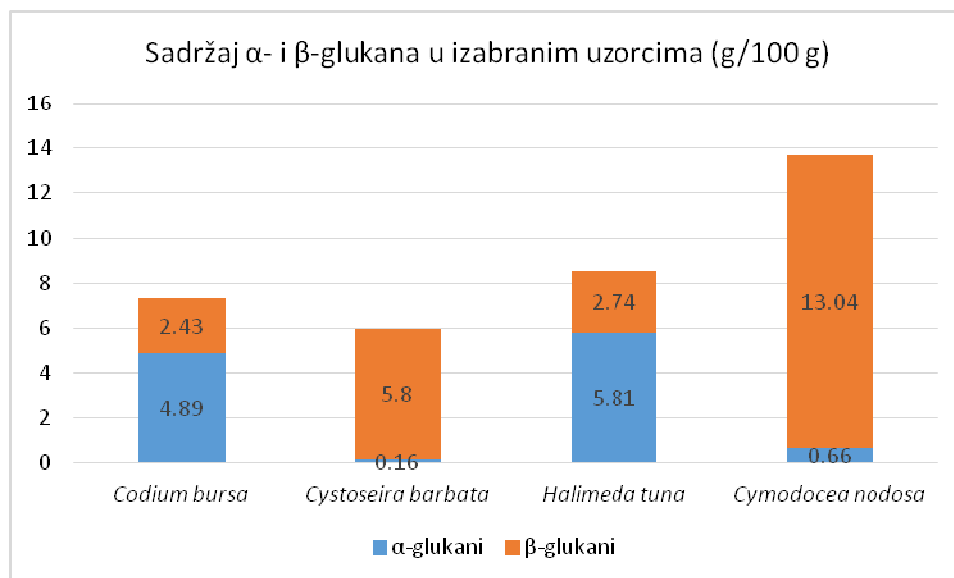
Morska trava *C. nodosa*, sadrži β -sitosterol i β -stigmasterol u koncentracijama od $5,70 \pm 0,03$ i $6,04 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$, respektivno. Dobijeni rezultati se slažu sa istraživanjem Gillan i sar (1984), koji su ispitali različite vrste morskih trava i pokazali da se β -sitosterol i β -stigmasterol nalaze u koncentraciji od 60-90% u poređenju sa drugim prisutnim sterolima. β -Stigmasterol je dobro poznat kao prekursor kortikosteroida i seksualnih hormona (androgena i estrogena), ali i prekursor u sintezi vitamina D₃ (Kaur i sar, 2011). Mnogi naučnici ukazuju na značajne biološke aktivnosti β -stigmasterola, kao što su: citotoksičnost, hipoglikemijska aktivnost, antimutagena, antihiperholesterolemijska, anti-inflamatorna, antioksidativna aktivnost, kao i povoljan uticaj na funkcije CNS-a (Kaur i sar, 2011).

1.6. Sadržaj β -glukana u uzorcima algi i morske trave

Najviši nivo β -glukana pronađen je kod morske trave *C. nodosa* ($13,04 \pm 0,42 \text{ g/100 g}$), a najniži sadržaj β -glukana je utvrđen kod zelene alge *C. bursa* ($2,43 \pm 0,23 \text{ g/100 g}$) (**Slika 15**). Bobadilla i sar (2013), kod alge *Durvillaea antarctica* ustanovili su značajnu imunomodulatornu aktivnost zbog visokog sadržaja 1,3:1,6- β -D-glukana ($4-15 \text{ g/100 g}$). U ovom istraživanju *C. barbata* je pokazala značajan sadržaj β -glukana ($5,8 \pm 0,31 \text{ g/100 g}$), kao i *C. nodosa* ($13,04 \pm 0,42 \text{ g/100 g}$), pa bismo na osnovu ovih rezultata mogli da pretpostavimo da navedena dva uzorka mogu da ispolje značajnu imonomodulatornu aktivnost.

Pored uloge u regulaciji imuniteta, β -glukani mogu imati ulogu u snižavanju nivoa holesterola u serumu (Davidson i sar, 1991).

Laminarin (1,3- β -D-glukan) je najviše proučavan polisaharid, izolovan iz mrkih algi, koji je prvenstveno energetska rezerva, lokalizovana u ćelijskim vakuolama algi (Burtin i sar, 2003). Literaturni podaci ukazuju da upotreba mrkih algi (*Laminaria*) u ishrani pozitivno utiče na prevenciju razvoja karcinoma dojke, preko nekoliko mehanizama, a jedan od njih se pripisuje prisustvu 1,3- β -D-glukana, koji imaju sposobnost ubrzanja enzimske aktivnosti fekalne flore, pri čemu dolazi do stimulacije imunog odgovora (Teas, 1982).



Slika 15. Grafički prikaz sadržaja α - i β -glukana u izabranim uzorcima algi (*H. tuna*, *C. bursa*, *C. barbata*) i morske trave (*C. nodosa*)

1.7. Sadržaj slobodnih aminokiselina u uzorcima algi i morske trave

Slobodne aminokiseline nisu detektovane u liofilizatima ispitivanih uzoraka, osim kod zelene alge *H. tuna*, gde su identifikovane jedino L-asparaginska kiselina i L-glutaminska kiselina u veoma malom procentu.

U radu Tsekos i sar (1975), koji su ispitivali 39 vrsta morskih algi sa teritorije Grčke, zaključili su da sadržaj slobodnih aminokiselina u algama jako varijabilan, da ne zavisi od podneblja i sezone, nego da rezultati generalno zavise od ubiranja reprezentativnog uzorka (Tsekos i sar, 1975). U navedenom radu je ispitivan i sadržaj slobodnih aminokiselina kod alge *H. tuna* i pokazano je prisustvo sledećih aminokiselina: Ala> Glu >Gly> Lys> Cys> Arg.

2. Hemijska i biološka karakterizacija ekstrakata algi i morske trave

2.1 Kvalitativna i kvantitativna analiza masnih kiselina u ekstraktima algi i morske trave

Sadržaj masnih kiselina u algama je varijabilan i predstavlja indikator filogenetskog razvoja i trofičke strukture morskih organizama, pa je od izuzetnog značaja za biološka istraživanja morskog ekosistema (Graeve i sar, 2002).

Pored izražene energetske vrednosti i esencijalnog značaja u ishrani ljudi i životinja, masne kiseline su pokazale i brojne biološke aktivnosti.

Arahidonska kiselina (C 20:4, n-6), esencijalna masna kiselina u humanom organizmu je značajna kao prekursor eikozanoida, za koje je poznato da imaju značajne funkcije kao što su: regulacija vaskularne homeostaze, zaštita gastrične mukoze, agregacija trombocita, regulacija imunopatoloških procesa (remodelovanje tkiva, kancer, astma, reumatoidni artritis i autoimune bolesti) (Smith, 1989; Harizi i sar, 2008).

Među svim ispitivanim DME ekstraktima algi i morske trave, najzastupljenija masna kiselina bila je palmitinska (C16:0) u opsegu od 29,41% do 32,6% (**Tabela 21**). Oleinska kiselina (C18:1 n-9) je po sadržaju na drugom mestu u opsegu 6,04% do 21,23%. Najveći sadržaj n-3 masnih kiselina je identifikovan kod morske trave *C. nodosa* (α -linolenska kiselina, 27,11%), kao i najviši nivo PUFA (44,71%).

Za PUFA je poznato da imaju brojne zdravstvene efekte, a najznačajnija su saznanja o smanjenju rizika od kardiovaskularnih i inflamatornih oboljenja, kao i poboljšanje cerebralne i mentalne funkcije (Ruxton i sar, 2007). Visok nivo SFA u hrani je direktan faktor rizika za povećanje ukupnog holesterola i LDL holesterola (eng. low density cholesterol) u serumu. Zamena od 3% SFA u ishrani pomoću PUFA ili MUFA snižava nivo LDL holesterola za 2% (Sanders, 2013). Iz navedenog razloga odnos PUFA/SFA bi trebalo da bude što niži (< 1) kako bi se namirnica smatrala korisnom za primenu u ishrani pacijenata sa rizikom od kardiovaskularnih oboljenja i moždanog udara (Yamori i sar, 1994).

DME ekstrakt zelene alge *C. bursa* je imao najniži sadržaj zasićenih masnih kiselina u poređenju sa drugim DME ekstraktima (34,92%) i dobar odnos PUFA/SFA (0,97), što ponovo ide u prilog najvećem potencijalu ove alge za primenu u ishrani.

U DME ekstraktu zelene alge *H. tuna* identifikovan je najveći sadržaj dokozaheksaenske (DHA, C22:6 n-3) i eikozapentaenske (EPA, C 20:5 n-3) masne kiseline (2,83 % i 4,97%). Poznato je da EPA i DHA poreklom iz riba, mogu da smanje rizik od fatalne koronarne bolesti (Mozaffarian, 2008) i kolorektalnog karcinoma (Roynette i sar, 2004).

Najzastupljenija n-6 masna kiselina u ispitivanim uzorcima je linolna kiselina (C18:2 n-6) koja je identifikovana u svim ispitivanim ekstraktima u opsegu od 5,28% do 17,6%. Linolna kiselina je jedna od glavnih masnih kiselina koja reguliše metabolizam lipoproteina niske gustine (LDL-c), smanjujući sintezu LDL-c i ubrzavajući njihov klirens (Wijendran i sar, 2004). Linolna kiselina takođe može da poveća osetljivost tkiva na insulin, poseduje antimikrobnu aktivnost i citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora (Sagar i sar, 1992).

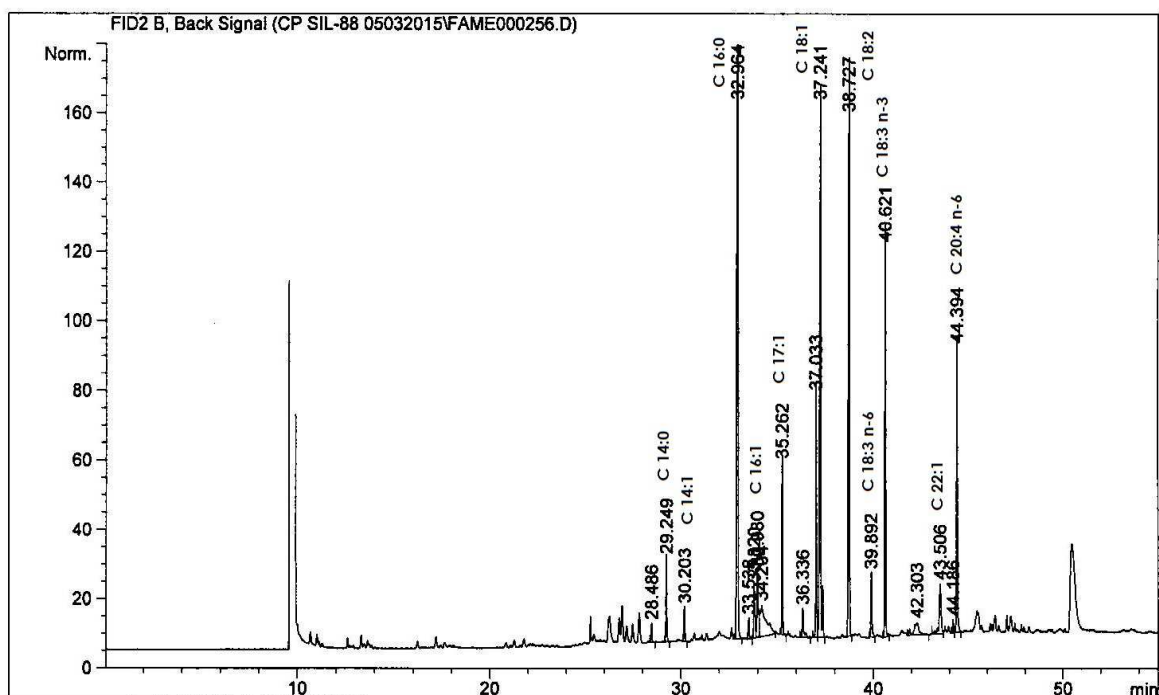
Razmatrajući profil masnih kiselina kod mrke alge *C. barbata* uočeno je prisustvo neparnih masnih kiselina kao što su C15:0 i C15:1, za koje je utvrđeno da smanjuju rizik od kardiovaskularnih oboljenja (Jenkins i sar, 2015). Takođe, najbolji odnos PUFA/SFA (0,64) je pokazan kod alge *C. barbata*.

Tabela 21. Sadržaj masnih kiselina u DME ekstraktima odabranih algi i morske trave (izražene kao % masne kiseline u ekstraktu)

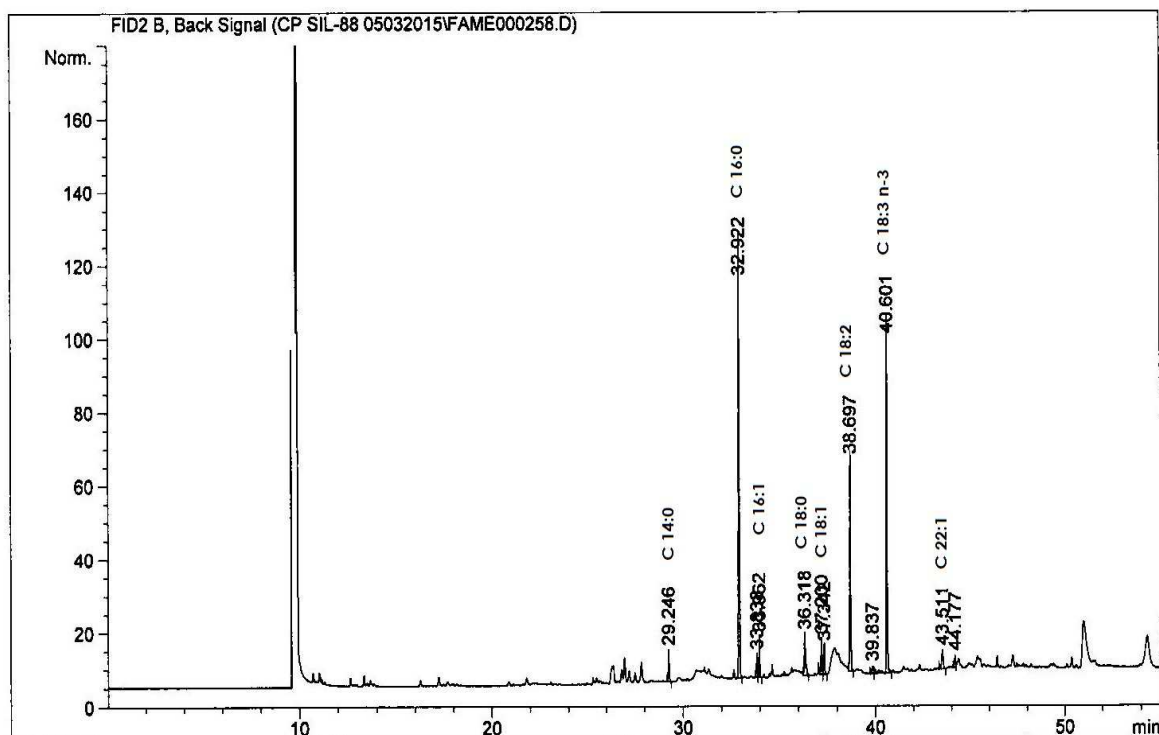
Masne kiseline, % u DME	<i>H. tuna</i>	<i>C. barbata</i>	<i>C. nodosa</i>	<i>C. bursa</i>
C 14:0	7,72	7,63	2,38	1,87
C 15:0	^a nd	0,3	^a nd	^a nd
C 16:0	32,6	29,41	33,11	32,07
C 17:0	7,24	^a nd	^a nd	^a nd
C 18:0	0,7	1,2	2,85	0,98
C 20:0	^a nd	^a nd	^a nd	^a nd
C 22:0	0,79	7,06	^a nd	^a nd
Σ SFA	49,05	45,6	38,34	34,92
C 14:1	0,4	0,57	^a nd	0,79
C 15:1	^a nd	0,87	^a nd	^a nd
C 16:1	3,31	3,66	5,66	1,14
C 17:1	1,53	^a nd	^a nd	3,9
C 18:1 n-9 <i>cis</i>	10,97	15,37	6,04	21,23
C 18:1 n-9 <i>trans</i>	^a nd	0,84	^a nd	^a nd
C 20:1	^a nd	^a nd	^a nd	^a nd
C 22:1 n-9	1,67	1,26	1,79	1,98
C 24:1	2,38	0,77	1,58	0,38
Σ MUFA	20,26	23,34	15,07	29,42
C 18:2 n-6 <i>cis</i>	13,63	5,28	17,6	15,32
C 18:2 n-6 <i>trans</i>	0,4	^a nd	^a nd	^a nd
C 18:3 n-6	0,75	0,8	^a nd	1,92
C 18:3 n-3	3,15	6,55	27,11	9,72
C 20:2	0,6	^a nd	^a nd	^a nd
C 20:4 n-6	3,76	12,44	^a nd	6,77
C 20:5 n-3	4,97	3,24	^a nd	^a nd
C 22:2	0,61	0,75	^a nd	^a nd
C 22:6 n-3	2,83	0,32	^a nd	^a nd
Σ PUFA	32,3	29,38	44,71	33,73
PUFA/SFA	0,66	0,64	1,16	0,97
n-6	18,54	18,52	17,6	24,1
n-3	7,8	10,11	27,11	9,72

^a nd – nije detektovano

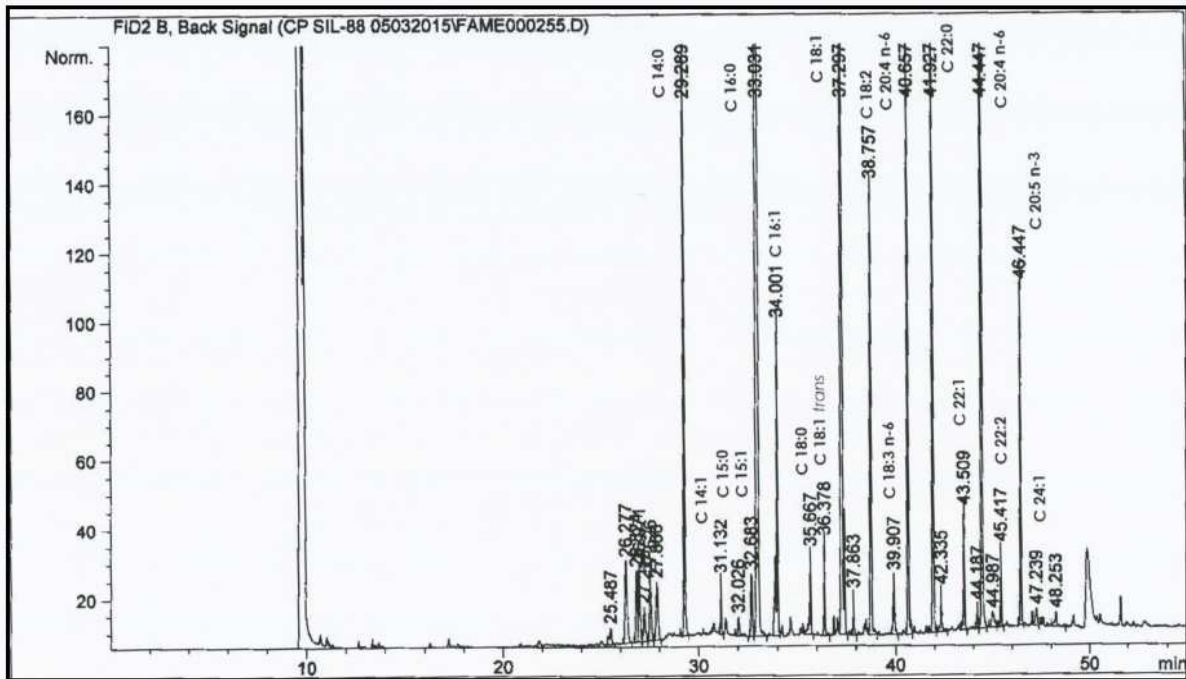
GC hromatogrami masnih kiselina DME ekstrakata odabranih algi i morske trave su dati na slikama ispod (Slike 16-19).



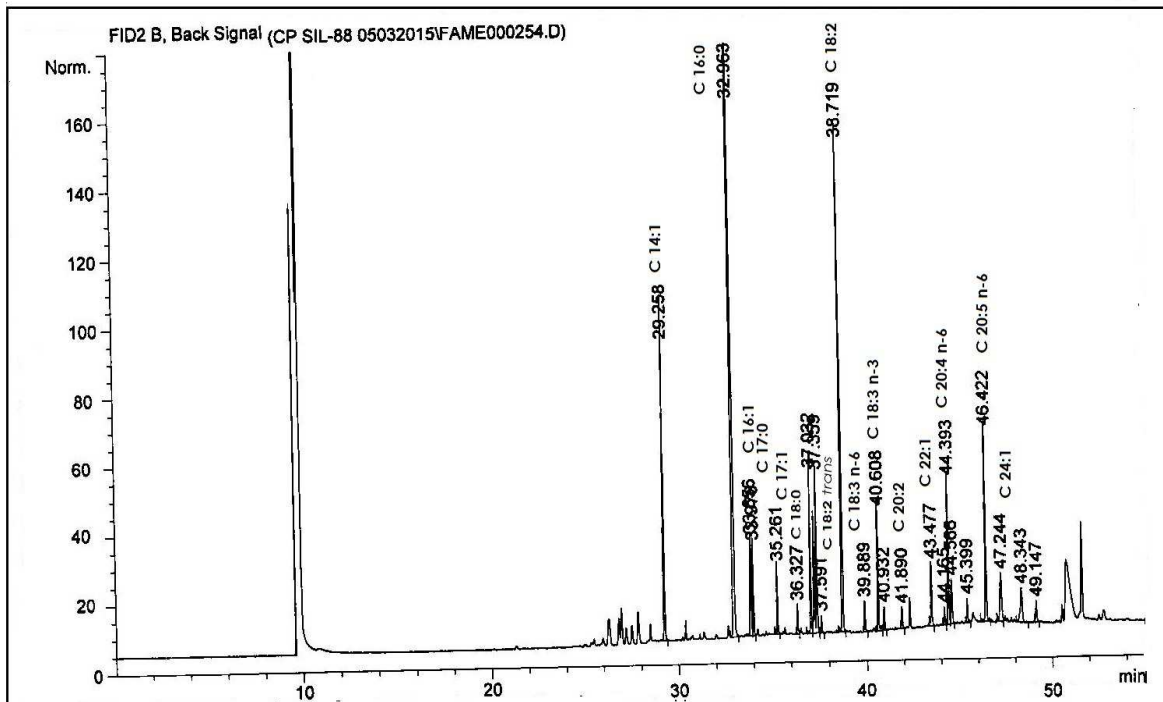
Slika 16. GC hromatogram DME ekstrakta alge *C. bursa*, analiza masnih kiselina



Slika 17. GC hromatogram DME ekstrakta alge *C. nodosa*, analiza masnih kiselina



Slika 18. GC hromatogram DME ekstrakta alge *C. barbata*, analiza masnih kiselina



Slika 19. GC hromatogram DME ekstrakta alge *H. tuna*, analiza masnih kiselina

2.2. Antioksidativna aktivnost i sadržaj polifenola u ekstraktima algi i morske trave

Za ispitivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata algi i morske trave korišćen je test neutralizacije DPPH radikala, a sadržaj polifenola u ekstraktima je okarakterisan metodom po Folin Ciocalteu.

Najbolju *in vitro* antiradikalnu aktivnost pokazao je DME ekstrakt morske trave *C. nodosa* ($IC_{50} = 112,73 \pm 2,051 \mu\text{g/ml}$) što je u skladu sa najvišim sadržajem ukupnih polifenola, $37,82 \pm 1,23 \mu\text{g GA/mg DME}$ (**Tabela 22**). *C. nodosa* je prepoznata kao dobar izvor fenolkarboksilnih kiselina, koje poseduju visoku antioksidativnu aktivnost (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013), što najverovatnije i objašnjava dobijeni rezultat (Kuda i sar, 2014).

C. barbata DME je takođe pokazao visoku antiradikalnu aktivnost ($IC_{50} = 367,21 \pm 3,621 \mu\text{g/ml}$) sa sadržajem polifenola od $14,94 \pm 0,6 \mu\text{g GA/mg DME}$. Slabu aktivnost u DPPH testu pokazali su DME ekstrakti algi *H. tuna* ($IC_{50} = 839,44 \pm 5,482 \mu\text{g/ml}$) i *C. bursa* ($IC_{50} = 1369,72 \pm 7,351 \mu\text{g/ml}$) sa niskim sadržajem ukupnih polifenola.

Tabela 22. *In vitro* antioksidativna aktivnost (neutralizacija DPPH radikala) i ukupan sadržaj polifenola u DME ekstraktu algi i morske trave

Uzorak	DPPH test IC_{50}^a , $\mu\text{g/ml}$	Sadržaj polifenola ^b ($\mu\text{g GA/mg DME}$)
<i>Cymodocea nodosa</i>	$112,73 \pm 2,051$	$37,82 \pm 1,23$
<i>Cystoseira barbata</i>	$367,21 \pm 3,621$	$14,94 \pm 0,6$
<i>Halimeda tuna</i>	$839,44 \pm 5,482$	$9,03 \pm 0,4$
<i>Codium bursa</i>	$1369,72 \pm 7,351$	$7,43 \pm 0,02$

^a IC_{50} - vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD određena iz rezultata DPPH testa u 3 nezavisna merenja

^b- vrednosti sadržaja ukupnih polifenola su prikazane kao srednja vrednost \pm SD određena iz rezultata DPPH testa u 3 nezavisna merenja.

Neutralizacija DPPH radikala ispitivana je i na 70% Met i AqE ekstraktima odabranih algi i morske trave. Navedeni ekstrakti nisu pokazali antioksidativnu aktivnost u testu neutralizacije DPPH radikala u koncentracijama nižim od 1000 µg/ml.

Sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja u 70% MetE i AqE, metodom po Folin Ciocalteu dat je u **Tabeli 23**.

Tabela 23. Sadržaj ukupnih polifenola u 70%Met i AqE (µg GA/mg DME)

Uzorak	Sadržaj polifenola* (µg GA/mg 70% MetE)	Sadržaj polifenola* (µg GA/mg AqE)
<i>Cymodocea nodosa</i>	10,2	5,2
<i>Cystoseira barbata</i>	3,7	11,2
<i>Halimeda tuna</i>	7,7	17,5
<i>Codium bursa</i>	1,8	2,6

* vrednosti sadržaja ukupnih polifenola su prikazane kao srednja vrednost ± SD određena iz rezultata DPPH testa u 3 nezavisna merenja

Sadržaj ukupnih polifenola u DME ekstraktima odabranih algi i morske trave je generalno bio veći u poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima. Jedini izuzetak je vodeni (AqE) ekstrakt *H. tuna* koji je pokazao skoro dvostruko veći sadržaj ukupnih polifenola nego DME ekstrakt *H. tuna*.

2.3. Antimikrobna aktivnost ekstrakata algi i morske trave

Ispitivanje antimikrobne aktivnosti izvršeno je na sva tri pripremljena ekstrakta (DME, 70%Met, AqE). 70% Met i AqE nisu pokazali antimikrobnu aktivnost u sprovedenom testu.

DME ekstrakti *H. tuna* i *C. barbata* su ispoljile najbolju antimikrobnu aktivnost protiv bakterijskog soja *B. subtilis* (MIC 100 µg/ml). *C. albicans* i *S. aureus* su takođe bile osetljive na DME ekstrakt *H. tuna* (**Tabela 24**). Otkriće diterpenskog aldehida, halitunala (**Slika 5**), koji je ispoljio antivirotsku aktivnost protiv mišjeg korona virusa (Harada i Kamei, 1997), zajedno sa literaturnim dokazima o antibakterijskoj i antifungalnoj aktivnosti dietiletarskog ekstrakta *H. tuna* protiv *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* i *C. albicans*, ukazuje da *H. tuna* poseduje veliki antimikrobni potencijal među ispitivanim algama (Mtolera i Semesi, 1996).

Svi ispitivani uzorci ispoljavaju značajnu antifungalnu aktivnost protiv soja gljivice *C. albicans*, a *C. barbata* je bila najaktivnija u navedenom ispitivanju (MIC 200 µg/ml). *C. barbata* je takođe pokazala najbolju antibakterijsku aktivnost (MIC 100 µg/ml) za *S. aureus* i *B. subtilis* (MIC 100 µg/ml). Istraživanja usmerena ka otkrivanju aktivnih supstanci koje ispoljavaju antimikrobnu aktivnost sugerišu da alginati (Na-alginat i Mg-alginat) mogu biti odgovorni za antimikrobnu aktivnost alge *C. barbata* protiv *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* i *Klebsiela sp.* (Badea i sar, 2009). Isparljive komponente identifikovane kod alge *C. barbata*, kao što su dokozan i tetratriakontan, nisu pokazala značajnu antimikrobnu aktivnost (Ozdemir i sar, 2006).

Tabela 24. Antimikrobna aktivnost DME ekstrakata izabranih algi i morske trave

Uzorak	Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC), µg/ml				
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Cymodocea nodosa</i>	^a nd	200	^a nd	^a nd	400
<i>Cystoseira barbata</i>	^a nd	100	100	^a nd	200
<i>Halimeda tuna</i>	^a nd	800	100	^a nd	400
<i>Codium bursa</i>	^a nd	400	200	^a nd	400

^a nd – eng. non demonstrated (nije pokazana antimikrobna aktivnost)

DME ekstrakt morske trave *C. nodosa* je pokazao značajnu antibakterijsku aktivnost protiv bakterije *S. aureus* (MIC 200 µg/ml). Naš rezultat je u skladu sa istraživanjem u kome je pokazano su diarilheptanoidi, izolovani iz morske trave *C. nodosa*, pokazali antibakterijsku aktivnost protiv multi rezistentnih patogena kao što su *S. aureus*, *Mycobacterium phlei*, *M. smegmatis* i *M. fortuitum* (Kontiza i sar, 2008).

DME ekstrakt *C. bursa* je pokazao nešto slabiju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa drugim ispitivanim uzorcima, a antifungalna aktivnost protiv *C. albicans* je bila ista kao i kod DME ekstrakat *H. tuna* i *C. nodosa* u navedenom ispitivanju (MIC 400 µg/ml). Pretragom literature, utvrđeno je da u par ispitivanja različitih ekstrakata alge *C. bursa*, navedena alga nije pokazala nikakvu antimikrobnu, niti antifungalnu aktivnost (Salvador i sar, 2007; Ibtissam i sar, 2009).

2.4. Citotoksična aktivnost ekstrakata algi i morske trave

H. tuna je pokazala najbolju citotoksičnu aktivnost prema LS174, ćelijama kolorektalnog karcinoma, i visoku citotoksičnu aktivnost na HeLa, ćelije humanog cervikalnog karcinoma (**Tabela 25**). Svetska zdravstvena organizacija (eng. World Health Organization, WHO) je objavila da EPA i DHA u kombinaciji, smanjuju rizik od kolorektalnog kancera i smanjuju rizik od raka dojke (Volpato i Hull, 2018). Uzevši u obzir preventivnu ulogu EPA i DHA, koje su identifikovane u DME ekstraktu alge *H. tuna*, kao i ispoljenu citotoksičnu aktivnost navedenog ekstrakta, trebalo bi nastaviti dalja istraživanja antikancerskog potencijala alge *H. tuna*. Kurt i sar, 2014, takođe su pokazali citotoksičnu aktivnost alge *H. tuna* na MCF-7 ćelijsku liniju kancera (Kurt i sar, 2014).

Tabela 25. Koncentracije DME ekstrakata izabranih algi i morske trave koji izazivaju preživljavanje 50% HeLa, LS174 i K562 malignih ćelija i MRC5 normalnih ćelija (izraženo kao IC₅₀ (µg/ml))

Uzorak	IC ₅₀ ^a (µg/ml)			
	HeLa	LS174	K562	MRC5
<i>Cymodocea nodosa</i>	13,28 ± 0,39	62,09 ± 1,24	19,64 ± 1,55	>200
<i>Cystoseira barbata</i>	22,85 ± 1,36	66,51 ± 0,92	36,27 ± 2,41	>200
<i>Halimeda tuna</i>	17,92 ± 1,54	25,34 ± 2,37	29,53 ± 1,29	>200
<i>Codium bursa</i>	57,42 ± 1,73	88,52 ± 1,43	75,29 ± 1,42	>200
<i>cis-DDP</i>	0,83 ± 0,19	2,58 ± 0,16	3,21 ± 0,41	13,21 ± 0,37

^a IC₅₀ vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD određena iz rezultata MTT testa u tri nezavisna eksperimenta

C. barbata, pokazala je dobru citotoksičnu aktivnost, pogotovu protiv HeLa i K562 ćelijske linije u navedenom MTT testu. Napominjemo da *C. barbata* sadrži pigment fukoksantin za koga je pokazano da ispoljava antitumorsku, antimikrobnu i antioksidativnu aktivnost (D'Orazio i sar, 2012).

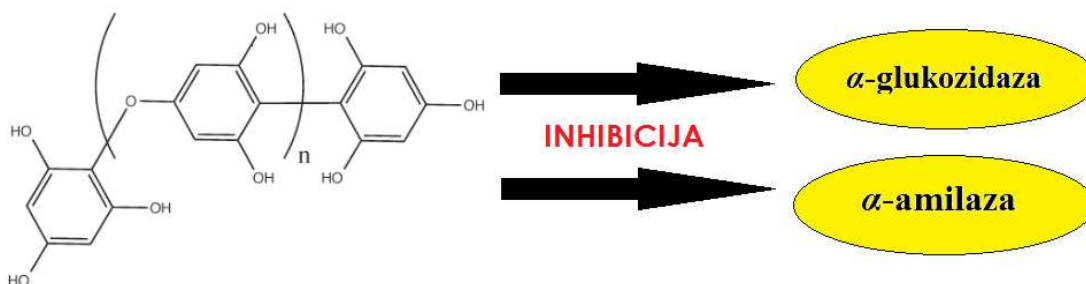
Dobijeni podaci ukazuju da DME ekstrakt morske trave *C. nodosa*, pokazuje značajnu citotoksičnu aktivnost na HeLa (IC₅₀= 13,28 ± 0,39 µg/ml) i K562 (IC₅₀= 19,64 ± 1,55 µg/ml) ćelijama. Kontiza i sar (2005), dokazali su da diarilheptanoidi identifikovani u morskoj travi *C. nodosa* (cimodienol i cimodien) pokazuju značajnu citotoksičnu aktivnost protiv dve

ćelijske linije karcinoma pluća (Kontiza i sar, 2005). Najviši sadržaj linolne kiseline (17,6%) u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*, takođe može da objasni visoku citotoksičnu aktivnost navedenog ekstrakta protiv HeLa ćelijske linije tumora, obzirom da su Sagar i sar (1992), dokazali visoku citotoksičnost linolne kiseline protiv HeLa ćelijske linije tumora.

U poređenju sa DME ekstraktima drugih ispitivanih uzoraka, *C. bursa* je pokazala najmanje značajne vrednosti svih bioloških aktivnosti.

2.5. Anti α -glukozidazna aktivnost ekstrakata algi i morske trave

U testu ispitivanja anti α -glukozidazne aktivnosti, DME ekstrakt mrke alge *C. barbata* je pokazao najbolju aktivnost od $IC_{50} = 9,98 \pm 3,34 \mu\text{g/ml}$ (Tabela 26). Mrke alge predstavljaju bogat izvor polifenolnih jedinjenja koja se zovu florotanini (oligomeri floriglucinola), koja su pokazala antidijabetičnu aktivnost kroz različite mehanizme inhibicije α -glukozidaze i α -amilaze (Slika 20), što ukazuje na potencijalnu primenu navedene alge kao funkcionalne hrane koja bi se mogla preporučivati u ishrani ili suplementaciji dijabetičara (Sun i Chen, 2012; Lee i Jeon, 2013).



Slika 20. Florotanini, polimeri floriglucinola, poreklom iz mrkih algi inhibiraju aktivnost enzima α -glukozidaze i α -amilaze

U prilog antidijabetske aktivnosti mrke alge *C. barbata*, pored izražene anti α -glukozidazne aktivnosti DME ekstrakta, ide i činjenica da je navedena alga ima najviše ukupnih dijetnih vlakana (Slika 12), za koje je poznato da imaju povoljne zdravstvene efekte u tretmanu dijabetesa, povećavajući osetljivost na insulin (Li i Uppal, 2010).

Visok sadržaj dijetnih vlakana u kombinaciji sa izraženom anti α -glukozidaznom aktivnošću pokazan je i kod DME ekstrakta morske trave *C. nodosa* ($11,48 \pm 3,57 \mu\text{g/ml}$), što bi mogla da nas navede na zaključak o potencijalnoj primeni morske trave *C. nodosa* u tretmanu dijabetesa.

Svi ispitivani DME ekstrakti su pokazali bolju anti α -glukozidaznu aktivnost u poređenju sa akarbozom, koja je korišćena kao stadard (**Tabela 26**). Takođe, u poređenju sa acetonskim ekstraktom jestive alge *Undaria pinnatifida*, čija je anti α -glukozidazna aktivnost bila $\text{IC}_{50} = 80 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ (Zaharudin i sar, 2019), uzorci korišćeni u našem ispitivanju su pokazali od 4 do 8 puta izraženije aktivnosti.

Tabela 26. Anti α -glukozidazna aktivnost DME ekstrakata odabranh algi i morskih trava (izražene kao IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$))

Uzorak	Anti α -glukozidazne aktivnosti; IC_{50}^a , $\mu\text{g/ml}$
<i>Cymodocea nodosa</i>	$11,48 \pm 3,57$
<i>Cystoseira barbata</i>	$9,98 \pm 3,34$
<i>Halimeda tuna</i>	$19,16 \pm 0,65$
<i>Codium bursa</i>	$13,85 \pm 1,41$
Akarboza	$59,8 \pm 12,3$

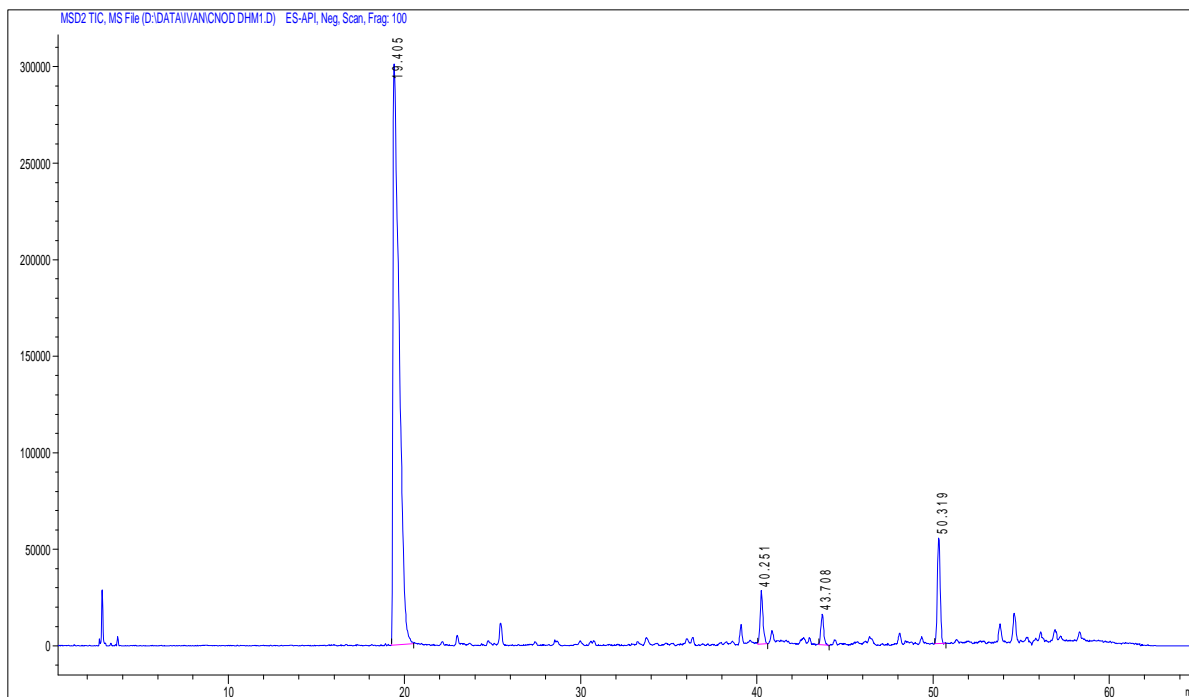
^a IC_{50} - vrednosti su prikazane kao srednja vrednost \pm SD određena iz rezultata određivanja anti α -glukozidazne aktivnosti u 2 nezavisna merenja

2.6. Ispitivanje profila polifenolnih jedinjenja u ekstraktima algi i morske trave LC-MS hromatografijom

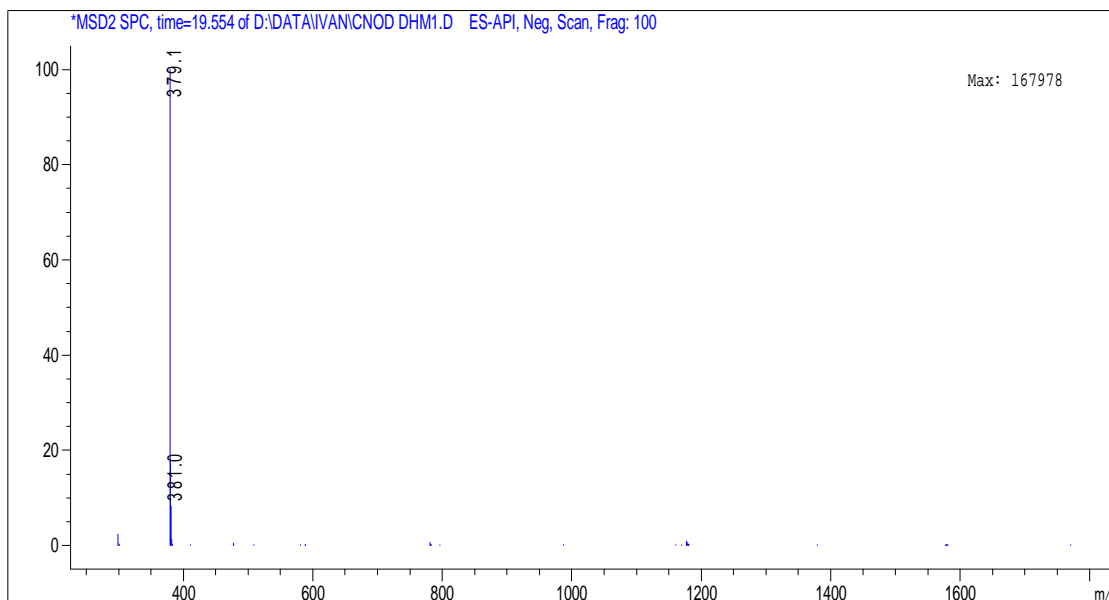
Među svim ispitivanim DME ekstraktima, ekstrakt alge *C. nodosa* je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora ($IC_{50} = 13,28 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$). *C. nodosa* je takođe pokazala i najbolju antioksidativnu aktivnost u testu neutralizacije DPPH radikala i najviši sadržaj ukupnih polifenola. Imajući u vidu navedene činjenice, dalja ispitivanja išla su u pravcu ispitivanja hemijske strukture DME ekstrakta morske trave *C. nodosa*.

U morskoj travi su identifikovane 3 supstance: diosmetin-7-sulfat (**1**) (86,992%), kaftarinska kiselina (**2**) (5,801%) i kutarinska kiselina (**3**) (7,207%) što je prikazano na **Slici 21**.

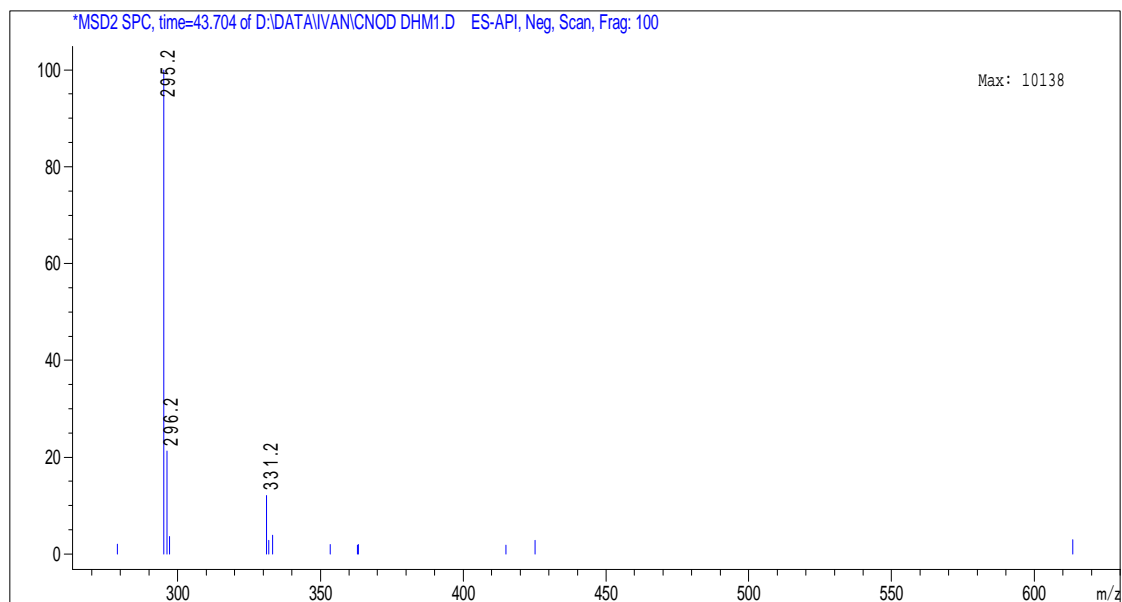
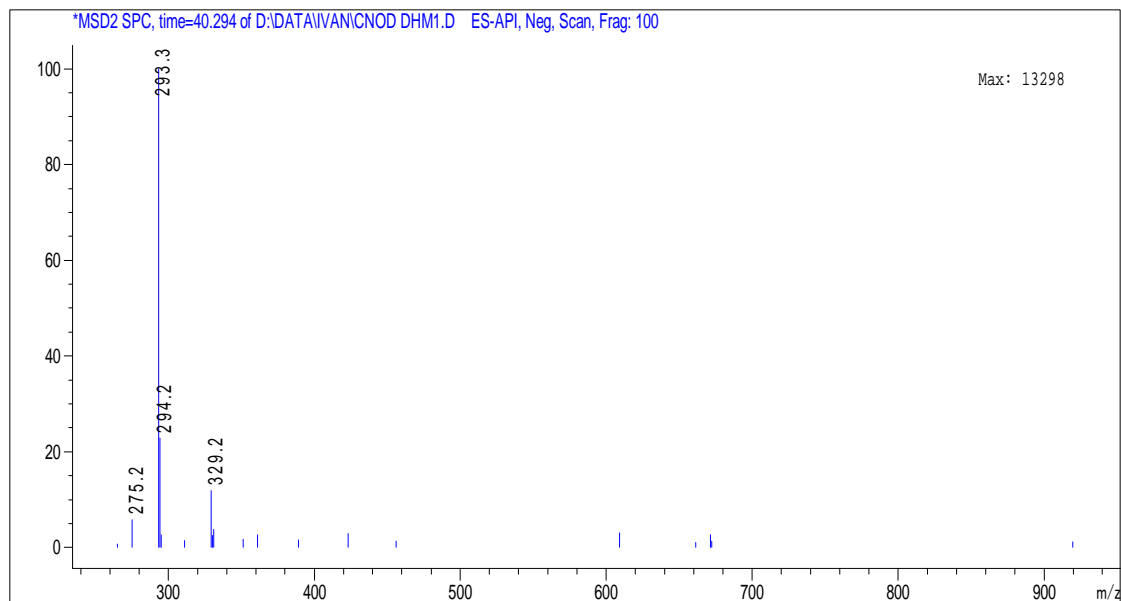
Na retencionom vremenu (R_t) 19,405 identifikovano je jedinjenje **1**, za koga se na osnovu detaljne spektralne analize, koja je data u nastavku teksta, pretpostavlja da je diosmetin-7-sulfat. Na $R_t=40,251$ i $R_t=43,7$, identifikovani su fragmenti kutarinske kiseline (**2**). Fragment 1 (293 m/z), u koncentraciji od 3,636% i Fragment 2 (295 m/z), u koncentraciji od 2,165%. Na $R_t=50,319$ identifikovana je kaftarinska kiselina (311 m/z), u koncentraciji od 7,207%. Maseni spektri jedinjenja **1**, **2** i **3** data su na **Slikama 22**, **23** i **24**. Maseni spektri snimljeni su u negativnom modu.



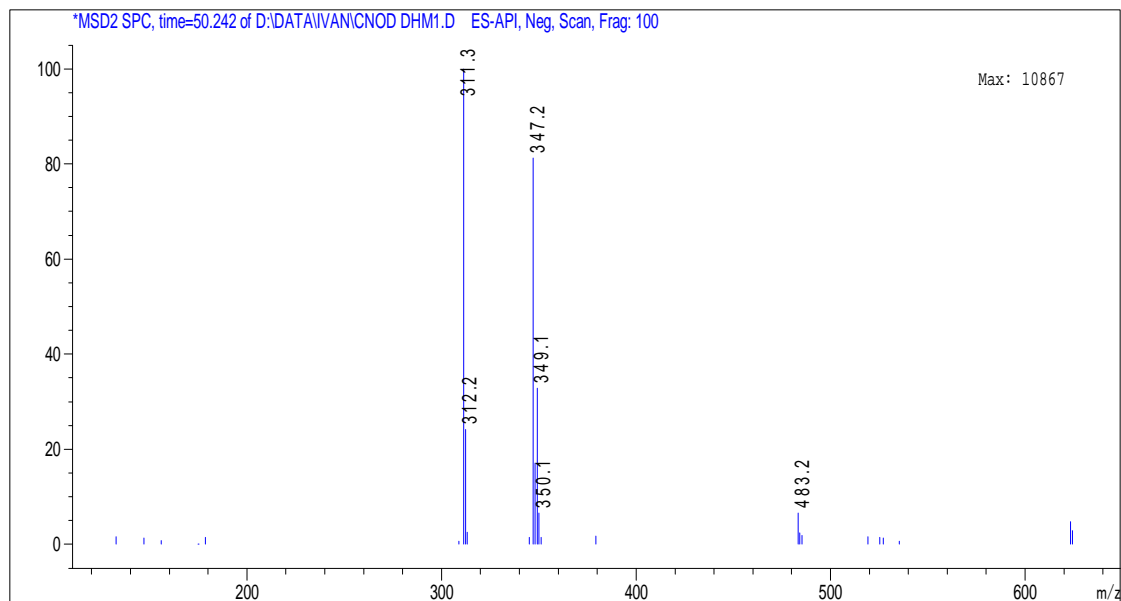
Slika 21. LC-MS hromatogram DME ekstrakta morske trave *C. nodosa* (Rt=19,405, jedinjenje br. **1** (diosmetin-7-sulfat); Rt=40,251, Fragment 1 jedinjenja br. **2** (kutarinska kiselina) i Rt=43,7, Fragment 2 jedinjenja br. **2** (kutarinska kiselina); Rt=50,319, jedinjenje br. **3** (kaftarinska kiselina))



Slika 22. Maseni spektar u negativnom modu, jedinjenja br. **1** (diosmetin-7-sulfat) Rt=19,405 (379 m/z) iz DME ekstrakta morske trave *C. nodosa*

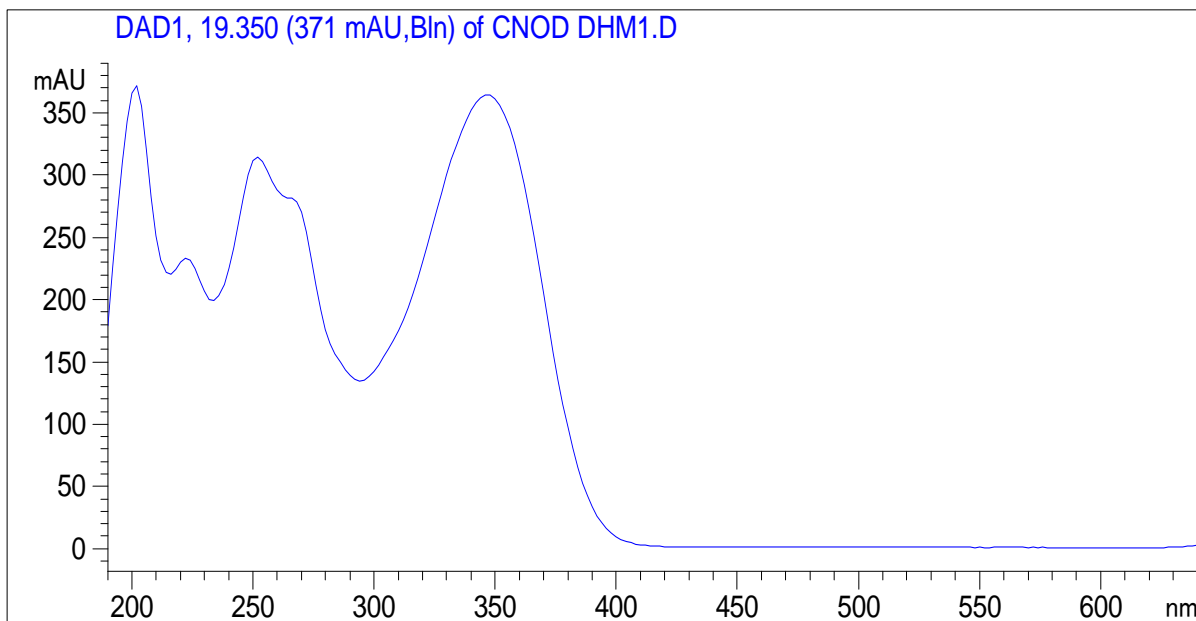


Slika 23. Maseni spektar u negativnom modu, jedinjenje br. **2** (kutarinska kiselina); Fragment 1 (gore), $R_t= 40,251$ (293 m/z) i Fragment 2 (dole), $R_t= 43,7$ (295 m/z) iz DME ekstrakta morske trave *C. nodosa*



Slika 24. Maseni spektar u negativnom modu, jedinjenje br. **3** (kaftarinska kiselina) $R_t=50,319$ (311 m/z)

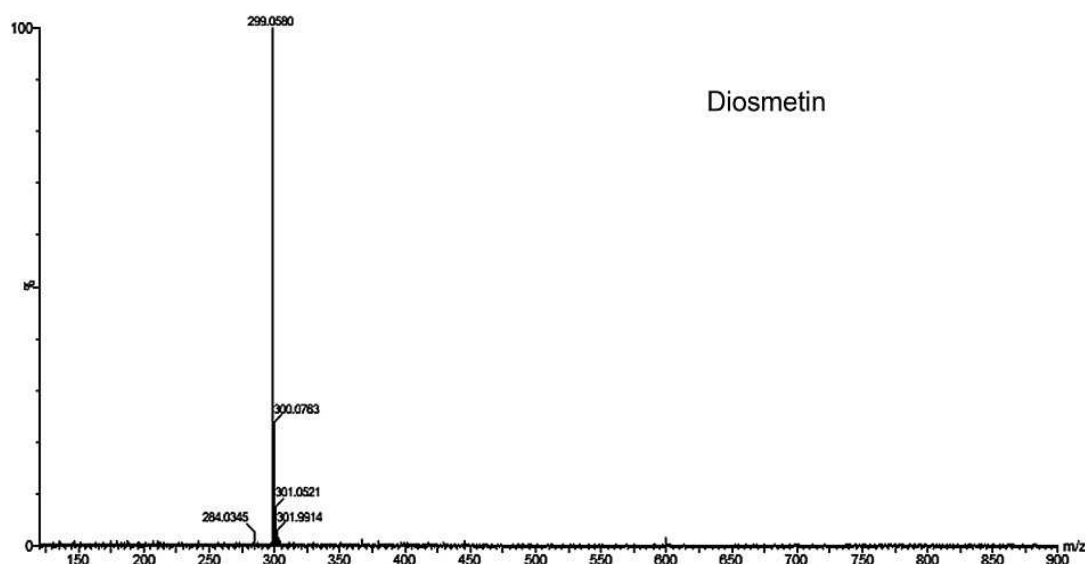
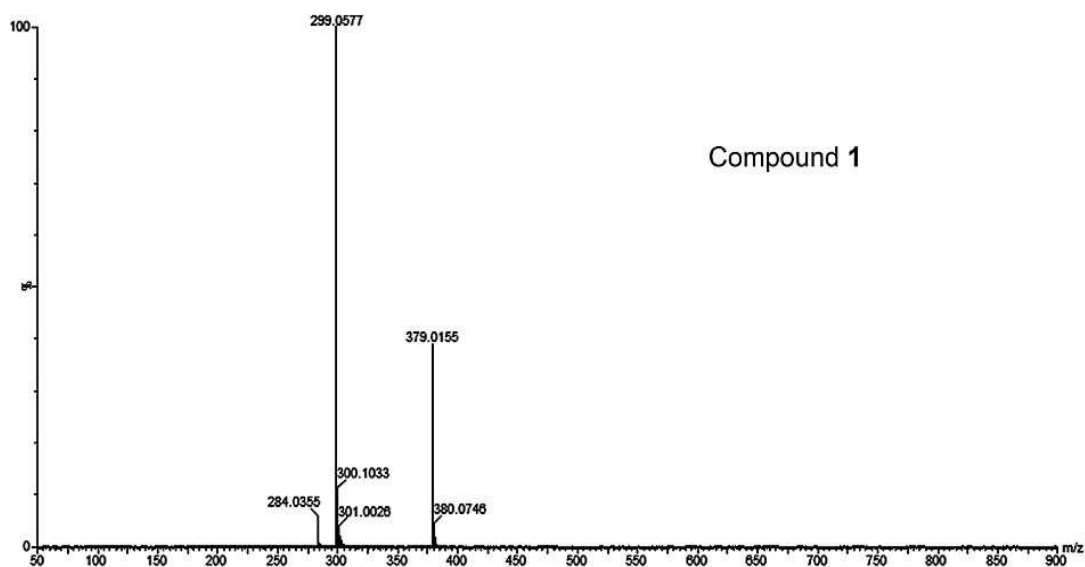
Dominantno jedinjenje je bilo jedinjenje br. **1** (86,992%), pa smo pristupili njegovoj detaljnoj analizi, praćenjem raspada jedinjenja pri povećanju energije jonizacije. U negativnom modu, na naponu fragmentora od 100 V, jedinjenje br. **1** ima molekulsku masu 379 (M⁻). Pri povećanju energije jonizacije na 170 V, dobijeni jon je imao molekulsku masu od 299 (M⁻). Neutralni gubitak mase od 80 Da, u skladu sa literaturnim podacima, ukazuje na gubitak sulfatnog jona (Cuyckens i Claeys, 2004). Na višoj energiji jonizacije od 250 V, dobili smo dominantan jon sa molekulskom masom od 285 (M⁻). Gubitak od 15 Da, u skladu sa literaturnim podacima (Cuyckens i Claeys, 2004), ukazuje na gubitak metil grupe. Jedinjenje br. **1** ima HPLC-DAD λ_{\max} (band I) 347 nm (band II) 252 nm, 268 nm (sh) što dodatno potvrđuje da je aglikon diosmetin (**Slika 25**).



Slika 25. UV/VIS spektar dobijen HPLC-DAD detekcijom jedinjenja br. **1** (diosmetin-7-sulfat)

2.7. HR-MS analiza i NMR spektar jedinjenja izolovanog iz morske trave *C. nodosa*

U cilju dobijanja dodatnih podataka, jedinjenje br. **1** je izolovano semipreparativnom HPLC hromatografijom, a dodatni HR-MS spektri su snimljeni na Q-TOF-MS/MS detektoru. Molekulska formula $C_{16}H_{11}O_9S$ je dobijena iz deprotonizovanog molekula na m/z 379,0155 $[M - H]^-$ (calcd 379,0167 za $[M - H]^- C_{16}H_{11}O_6S$, $\Delta ppm = -3,69$). Glavni jonski fragment Q-TOF-MS/MS spektra je bio m/z 299,0577 ($C_{16}H_{11}O_6$), dobijen gubitkom SO_3 jona (-80 Da). Manji fragment od m/z 284,0355 ($C_{15}H_8O_6$), određen je dodatnom demetilacijom deprotonovanog molekula. Nakon hidrolize jedinjenja br. **1**, korišćenjem enzima sulfataze, identifikovan je aglikon diosmetin, koji je takođe potvrđen pomoću komercijalno dostupnog standarda diosmetina (**Slika 26**).

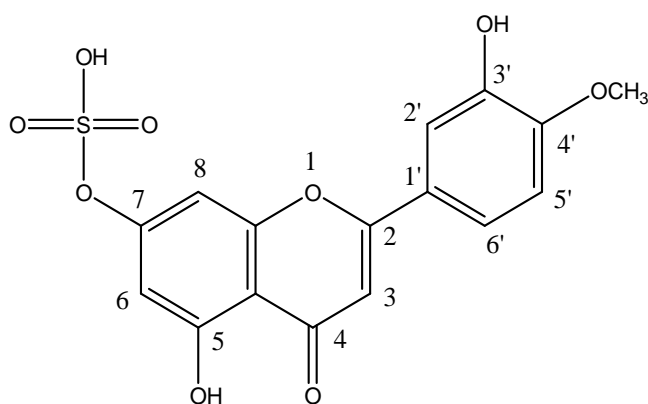


Slika 26. HR-MS spektar jedinjenja br. **1** (diosmetin-7-sulfata) i diosmetina

Pozicija sulfatne grupe je pretpostavljena na osnovu UV spektralne analize i na osnovu podataka dobijenih analizom $^1\text{H-NMR}$ spektra, a skladu sa podacima objavljenim u radu Enerstvedt i sar (2016), koja je analizirala sulfonovane heterozide luteolina. U navedenoj publikaciji, UV apsorpcioni spektar luteolin-7-sulfata i luteolina su bili relativno slični, dok je značajno hipsohromno pomeranje uočeno za UV_{max} luteolin-7,3-sulfata, što izričito ukazuje na prisustvo sulfatnih grupa na položajima 3'- ili 4'- u B prstenu aglikona luteolina. Uvođenje sulfatne grupe u A prsten flavonoida ne dovodi do značajnih promena u UV spektru u odnosu na aglikon, a uvođenje sulfatne grupe na položaje 3'- ili 4'- u B prstenu, bi izazvalo veliko

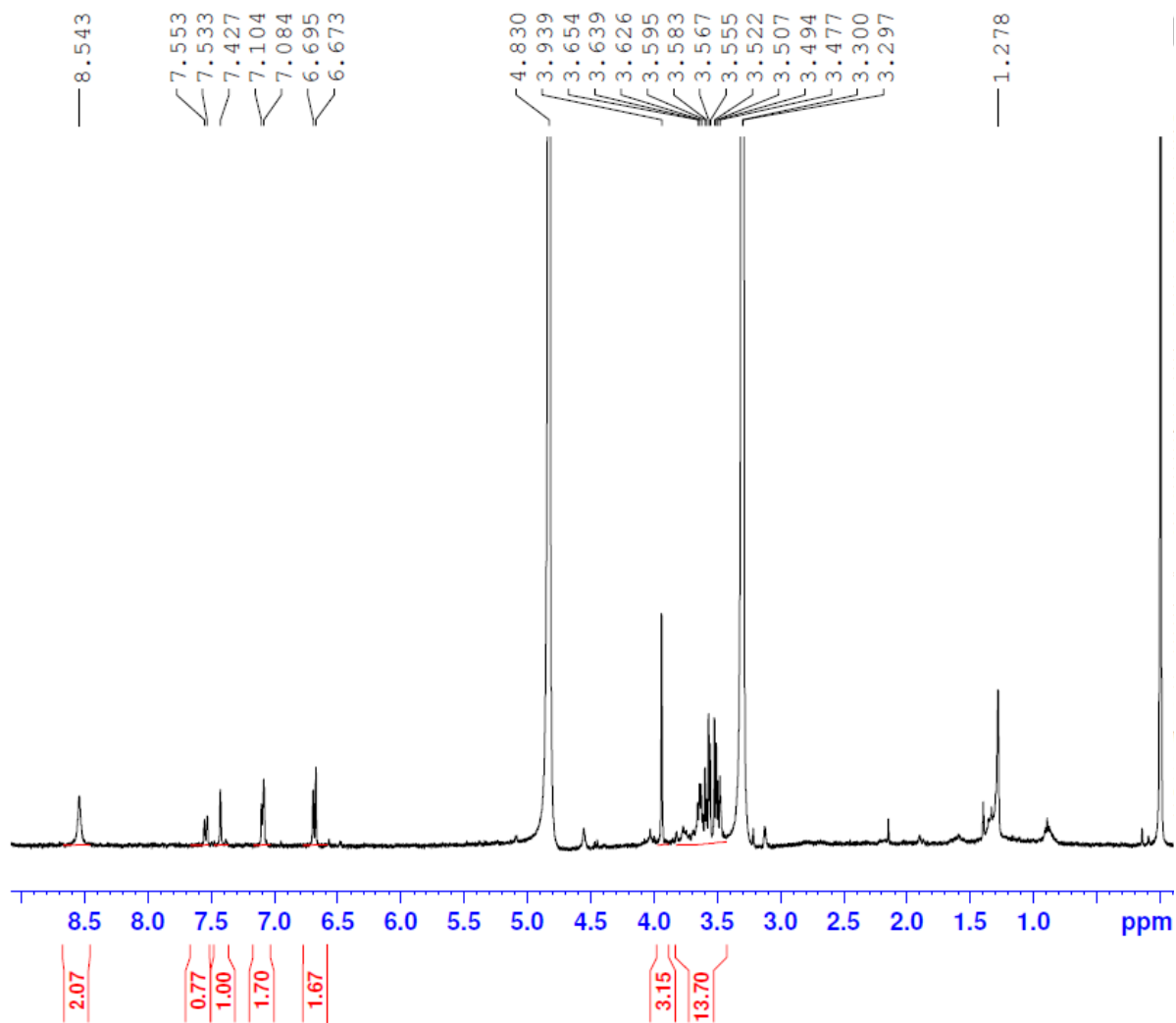
hipsohromno pomeranje u traci I (*eng.* band I), a traka II (*eng.* band II) bi se pojavila kao jedan pik.

U našim rezultatima, jedinjenje br. **1** je imalo UV spektar relativno sličan spektru diosmetina, a uz traku II se javlja dodatni maksimum (*engl.* *shoulder*) što je karakteristično za diosmetin (**Slika 26**). Hipsokromno pomeranje na traci I nije uočeno (HPLC-DAD λ_{\max} (band I) 347 nm (band II) 252 nm, 268 nm (sh)). U skladu sa navedenim, mogli bismo da pretpostavimo da je navedeno jedinjenje br. **1**, diosmetin-7-sulfat (**Slika 27**).



Slika 27. Strukturna formula izolovanog jedinjenja br. **1** (diosmetin-7-sulfat)

$^1\text{H-NMR}$ podaci za jedinjenje br. **1** su u korelaciji sa rezultatima objavljenim u radu Grignon Dubois i Rezzonico, 2018, za diosmetin-7-sulfat (**Slika 28**).



Slika 28. $^1\text{H-NMR}$ spektar jedinjenja br **1** (diosmetin-7-sulfat)

Specifični podaci identifikovanih jedinjenja u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*, dati su ispod:

Jedinjenje br. 1 (Diosmetin-7-sulfat):

HPLC-DAD λ_{\max} (nm): (band I) 347, (band II) 252, 268 nm (sh); LC-MS-ESI m/z: 379 (M-1), 299 (M-1-80, 100%); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO): 3,94 (s, OCH₃); 6,67 (d, J $\frac{1}{4}$ = 1,67, H-6); 6,69 (s, H-3); 7,08 (d, J $\frac{1}{4}$ = 1,43, H-8); 7,10 (d, J $\frac{1}{4}$ = 8,58, H-5'); 7,43 (d, J $\frac{1}{4}$ = 2,13, H-2'); 7,58 (dd, J $\frac{1}{4}$ = 8,59 and 2,15, H-6'); HR-MS m/z: 379,0155 [M-H]⁻ (calcd 379,0167 za [M-H]⁻ C₁₆H₁₁O₆S), qTOF-MS/MS (15 eV) m/z (rel. int.): 379,0155 (40), 299,0577 (100), 284,0355 (7);

Jedinjenje br. 2 (Kutarinska kiselina):

HPLC-DAD λ_{\max} (nm): 314; LC-MS-ESI m/z: 295 (M-1);

Jedinjenje br. 3 (Kaftarinska kiselina):

HPLC-DAD λ_{\max} (nm): 328; LC-MS-ESI m/z: 311 (M-1).

Kaftarinska i kutarinska kiselina su prethodno identifikovane kod morske trave *C. nodosa* (Grignon Dubois i Rezzonico, 2013), a diosmetin-7-sulfat je detektovan jedino kod morskih trava roda *Zostera*, kao što je *Zostera noltei* (Grignon Dubois i Rezzonico, 2012) i *Zostera subg. Zostera marina* (Enerstvedt i sar, 2016), tako da je ovo prvi izveštaj o prisustvu diosmetin-7-sulfata u morskoj travi *C. nodosa*.

U prirodnim uslovima flavonoidi se mogu pronaći kao aglikoni koji su vezani za glukozu ili druge šećere, mogu biti acetilovani, metilovani, prenilovani, ali i vezani za sulfatni anjon, što predstavlja jednu od najmanje prisutnih oblika flavonoida u prirodi (Teles i sar, 2018). Sulfatni konjugati flavonoida se mogu pronaći kao mono-sulfatni estri, kao di-sulfati, a sulfatni jon se može pronaći vezan i za šećernu jedinicu molekula flavonoida (Teles i sar, 2015). Navedena grupa flavonoida je pronađena u morskim i terestičnim biljkama čije je stanište vezano za zemljište bogato mineralnim materijama, pa se prisustvo sulfatnih flavonoida u biljkama smatra odgovorom na adaptaciju na uslove sredine (Harborne, 1975). Sulfat je treći najprisutniji jon u morskoj sredini, pa Harborne (1975), smatra da sulfatni flavonoidi imaju značajnu ulogu u preuzimanju soli iz morske sredine u tkivo biljke i da imaju

metaboličku ulogu. Iako uloga sulfatnih flavonoida u biljkama nije još uvek jasno ustanovljena, poznato je da sulfatni konjugati flavonoida (apigenin-7-sulfat, luteolin-7-sulfat i diosmetin-7-sulfat) nastaju kao posledica ekskrecije, eliminacije i detoksikacije u morskim travama (Grignon Dubois i Rezzonico, 2012).

Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline imaju ulogu signalnih molekula i faktora rasta u biljkama, a poznata je njihova uloga u zaštiti biljaka od patogena i herbivora, kao i adaptacija na stresne faktore sredine (Chaves i sar, 1997). Takođe, prijavljene su brojne biološke i farmakološke aktivnosti flavonoida i fenolkarboksilnih kiselina, kao što su antioksidativna, antimikrobna, antivirotska, antiinflamatorna i antikancerska aktivnost (Caprioli i sar, 2016).

2.8. Ispitivanje citotoksične aktivnosti jedinjenja izolovanog iz morske trave *C. nodosa*

Obzirom da je jedinjenje br. **1** bilo dominantno u DME ekstraktu morske trave *C. nodosa*, koji je pokazao najjaču citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora ($IC_{50} = 13,28 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$), izolovano jedinjenje br. **1** je uključeno u dalja ispitivanja citotoksičnosti. Ispitivanje citotoksične aktivnosti jedinjenja br. **1** je izvršeno direktno na HeLa tumorskoj ćelijskoj liniji i aktivnost jedinjenja je bila izuzetno slaba ($IC_{50} = 631,42 \mu\text{g/ml}$), uprkos činjenici da su pojedini derivati diosmetina (diosmetin-7-O- β -D-acetilgalaktozid, 7-O-prenildiosmetin i 7-O-farnezil-3'-O-metildiosmetin) ipak pokazali umerenu citotoksičnu aktivnost (Cai i sar, 2012).

3. Nutritivni potencijal izabranih algi i morske trave

Jedan od vodećih ciljeva ove doktorske disertacije bila je procena nutritivnog potencijala i određivanje energetske vrednosti izabranih algi i morske trave. U **tabelama 27-30**, dat je prikaz nutritivno značajnih supstanci identifikovanih u uzorcima i ekstraktima odabranih algi i morske trave.

U prethodnim segmentima diskusije naglašen je značaj zelene alge *C. bursa* i potencijal njene primene u ishrani. Najviša energetska vrednost, najviši sadržaj ugljenih hidrata i lipida, udruženo sa niskim sadržajem celuloze, čini zelenu algu *C. bursa* značajnom za humanu ishranu (**Tabela 27**). Najbolji odnos Na/K (0,43), među svim ispitivanim uzorcima, je još jedan od argumenata za primenu ove zelene alge u ishrani kardiovaskularnih pacijenata, a visok sadržaj β -sitosterola ($95,21 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$) ukazuje na potencijalnu primenu navedene alge u prevenciji razvoja benigne hiperplazije prostate, hipoholesterolemije i hiperglikemije (Saeidnia, 2014).

Tabela 27. Tabelarni prikaz hemijskog sastava zelene alge *C. bursa*, koji je značajan za humanu ishranu

<i>Codium bursa</i> , sumarni prikaz hemijskog sastava				
Ugljeni hidrati	Proteini	Lipidi	Minerali	Sekundarni metaboliti
Ukupni: 69,7%	Ukupni: 4,0%	Ukupni: 7,1%	Ukupni pepeo: 9,0%	Ukupni polifenoli: $7,43 \pm 0,02 \mu\text{g GA/mg DME}$
Celuloza: 18% β -glukan: 2,43 g/100 g Dijetna vlakana: SDF= 35,85% IDF= 30% TDF= 65,85%	Slobodne aminokiseline: Nisu detektovane	Masne kiseline: $\Sigma\text{SFA}= 4,914 \text{ mg/g}$ (nizak sadržaj) Steroli: β-sitosterol $95,21 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$	Dominantan mineral: K Značajan sadržaj Na > Mg > Ca	Specifična jedinjenja: Nisu identifikovana
Ukupna energetska vrednost: 490,4 kcal/100 g suve materije				

C. nodosa, morska trava (**Tabela 28**) je pokazala najviši sadržaj ukupnih polifenola, a u DME ekstraktu ove morske trave identifikovana su tri sekundarna metabolita (diosmetin-7-sulfat, kaftarinska i kutarinska kiselina) sa izraženim biološkim aktivnostima, među kojima je

naznačajnija antioksidativna aktivnost. Najviši sadržaj PUFA među svim ispitivanim uzorcima, takođe ističe značaj morske trave *C. nodosa* i njenu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih oboljenja. Izuzetno visok sadržaj celuloze od 45% ukazuje na nesvarljivost i loš potencijal za primenu *C. nodosa* u ishrani, ali najviši sadržaj proteina, među svim ispitivanim uzorcima, ipak održava istraživački interes za nastavak procene nutritivnog potencijala ove morske trave. Potencijalnu primenu u ishrani i dijetetskim suplementima opravdava i najviši sadržaj β -glukana (13,4 g/100 g) i imunostimulacioni potencijal (Bobadilla i sar, 2018).

Tabela 28. Tabela prikaz hemijskog sastava zelene alge *C. nodosa* koji je značajan za humanu ishranu

<i>Cymodocea nodosa</i> , sumarni prikaz hemijskog sastava				
Ugljeni hidrati	Proteini	Lipidi	Minerali	Sekundarni metaboliti
Ukupni: 17,5%	Ukupni: 11,5%	Ukupni: 5,0%	Ukupni pepeo: 11,0%	Ukupni polifenoli: 37,82 ± 1,23 µg GA/mg DME
Celuloza: 45% β -glukan: 13,4 g/100 g Dijetna vlakana: SDF= 10,50% IDF= 55,58% TDF= 66,08%	Slobodne aminokiseline: Nisu detektovane	Masne kiseline: ΣPUFA= 7,157 mg/g Značajan sadržaj C18:2 n-9 cis Steroli: β-sitosterol 5,7±0,03 µg/g β-stigmasterol 6,04±0,08 µg/g	Dominantan mineral: K Značajan sadržaj Na>Mg>Ca	Specifična jedinjenja: Diosmetin-7-sulfat Kaftarinska kiselina Kutarinska kiselina
Ukupna energetska vrednost: 293,16 kcal/100 g suve materije				

Mrka alga *C. barbata* (Tabela 29), u ovoj disertaciji se istakla svojim izraženim biološkim aktivnostima (anti- α -glukozidazna i antimikrobna aktivnost), a sa aspekta ishrane njen značaj se ogleda u visokom sadržaju ukupnih dijetnih vlakana (70,05%) i u najboljem odnosu PUFA/SFA (0,080) među svim ispitivanim uzorcima. Prisustvo fukosterola, i njegove dokumentovane biološke aktivnosti (antikancerska, antioksidativna, antihiperlipidemijska, aktivnost u sniženju nivoa holesterola) svakako svrstavaju navedenu algu u značajne izvore supstanci koje mogu unaprediti zdravlje ljudi (Abdul i sar, 2016).

Tabela 29. Tabelarni prikaz hemijskog sastava zelene alge *C. barbata* koji je značajan za humanu ishranu

<i>Cystoseira barbata</i> , sumarni prikaz hemijskog sastava				
Ugljeni hidrati	Proteini	Lipidi	Minerali	Sekundarni metaboliti
Ukupni: 44,05%	Ukupni: 8,5%	Ukupni: 4,95%	Ukupni pepeo: 10,0%	Ukupni polifenoli: 17,94 ± 0,6 µg GA/mg DME
Celuloza: 22% β -glukan: 5,8 g/100 g Dijetna vlakana: SDF= 11,1% IDF= 58,95% TDF= 70,05%	Slobodne aminokiseline: Nisu detektovane	Masne kiseline: PUFA/SFA= 0,080 (najbolji odnos) Steroli: fukosterol 21,76 ± 0,1 g/g	Dominantan mineral: K Značajan sadržaj Na > P > Si	Specifična jedinjenja: Nisu identifikovana
Ukupna energetska vrednost: 394,85 kcal/100 g suve materije				

Zelena alga *H. tuna* svoj potencijal za primenu u ishrani i suplementaciji duguje visokom sadržaju kalcijuma (61% ukupnih minerala). Sadržaj proteina, ugljenih hidrata i masti je generalno nizak, kao i sadržaj zasićenih masnih kiselina (**Tabela 30**). Kao suplement, suva, sprášena *H. tuna* bi se mogla preporučivati kao niskokalorijska namirnica za nadoknadu kalcijuma iz prirodnih izvora, kod pacijena kojima je unos masti i ugljenih hidrata ograničen.

Tabela 30. Tabelarni prikaz hemijskog sastava zelene alge *H. tuna* koji je značajan za humanu ishranu

<i>Halimeda tuna</i> , sumarni prikaz hemijskog sastava				
Ugljeni hidrati	Proteini	Lipidi	Minerali	Sekundarni metaboliti
Ukupni: 23,95%	Ukupni: 7,50%	Ukupni: 3,75%	Ukupni pepeo: 30%	Ukupni polifenoli: 9,03 ± 0,4 µg GA/mg DME
Celuloza: 30% <i>β</i> -glukan: 2,74 g/100 g Dijetna vlakana: SDF= 3,53% IDF= 33,7% TDF= 37,23%	Slobodne aminokiseline: L-asparaginska kiselina L- glutamiska kiselina	Masne kiseline: Σ SFA= 1,053 mg/g (najniži sadržaj) Steroli: <i>β</i> -sitosterol 73,90±0,08 g/g <i>β</i> -stigmasterol 3,78 ±0,12 g/g	Dominantan mineral: Ca Značajan sadržaj Sr > Na > K	Specifična jedinjenja: Nisu identifikovana
Ukupna energetska vrednost: 234,01 kcal/100 g suve materije				

ZAKLJUČAK

Ispitivane alge i morska trava predstavljaju bogat izvor ugljenih hidrata, dijetnih vlakana i minerala, sa generalno niskim sadržajem masti, pri čemu bi mogle da nađu primenu u ishrani ljudi na energetske redukovanoj režimu ishrane.

Zelena alga *C. bursa* je pokazala namanje značajne vrednosti u testovima bioloških aktivnosti, ali je zato pokazala najvišu energetske vrednost i najoptimalniji nutritivni sastav sa aspekta humane ishrane. Kod alge *C. bursa* identifikovan je najviši sadržaj ukupnih ugljenih hidrata, najviši sadržaj ukupnih lipida i dijetnih vlakana. Sadržaj minerala je bio optimalan, uz značajan sadržaj K, Na, Mg i Ca i najoptimalniji odnos Na/K, što omogućava potencijalnu upotrebu ove alge u ishrani osoba sa hipertenzijom. Najniži sadržaj celuloze čini ovu algu najsvarljivijom, među svim ispitivanim uzorcima. Alga *C. bursa* je pokazala i najbogatiji izvor β -sitosterola i rastvornih dijetnih vlakana, pa bi trebalo razmotriti primenu navedene alge u tretmanu hiperholestolemije i hiperglikemije, kao i za smanjenje rizika od razvoja benigne hiperplazije prostate.

Zelena alga *H. tuna* je u navedenim ispitivanjima imala najnižu energetske vrednost, što u kombinaciji sa visokim sadržajem celuloze i najvišim sadržajem Ca, čini ovu algu najmanje primenljivom za humanu ishranu. Međutim, izrazito visok sadržaj Ca, biljnog porekla, bi mogao svrstati ovu algu kao sirovinu pogodnu za suplementaciju kalcijumom, pogotovu kod vegeterijanaca. Visok sadržaj β -sitosterola, identifikovan kod *H. tuna*, ukazuje na potencijalnu primenu navedene alge u tretmanu benigne hiperplazije prostate. DME ekstrakt *H. tuna* je pokazao odličnu antimikrobnu aktivnost protiv *B. subtilis*, *C. albicans* i *S. aureus*, u navedenom istraživanju. U testu ispitivanja citotoksičnosti, DME ekstrakt *H. tuna* je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost protiv LS174 ćelijske linije tumora i visoku citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora. LC-MS analizom DME ekstrakta zelene alge *H. tuna*, uočen je niz jedinjenja velike molekulske mase, za čiju je identifikaciju strukture potrebna dodatna ekspertiza, pa bi dalja istraživanja mogla da idu u pravcu izolacije i identifikacije navedenih jedinjenja, kao i ispitivanja njihove potencijalne biološke aktivnosti.

Sa nutritivnog aspekta, mrka alga *C. barbata*, može biti značajna u suplementima namenjenim redukciji nivoa glukoze u serumu, obzirom na najbolju anti α -glukozidaznu aktivnost DME ekstrakta ove alge (koja je bila 6 puta bolja u poređenju sa standardom akarboze). U prilog hipoglikemijskom potencijalu navedene alge, ide i visok sadržaj ukupnih

dijetnih vlakana, kao i prisustvo fukosterola. Fukosterol i dijetna vlakna, pored hipoglikemijske aktivnosti ima i hipoholesterolemijsku, antikancersku i antioksidativnu aktivnost. DME ekstrakt *C. barbata* je pokazao i najbolju antimikrobnu aktivnost protiv *S. aureus* i *B. subtilis*, kao i najbolju antifungalnu aktivnost protiv *C. albicans*. Sadržaj β -glukana je dosta niži u poređenju sa morskom travom *C. nodosa*, ali je dovoljan da se može zaključiti potencijalna imunomodulatorna aktivnost mrke alge *C. barbata*.

Morska trava *C. nodosa* je u navedenom ispitivanju imala nisku energetska vrednost, sa najvišim sadržajem celuloze što je ne može svrstati u nutritivno vredne namirnice. Međutim, sadržaj nenutritivnih, bioprotektivnih polifenolnih supstanci u navedenom uzorku je bio najviši, a i biološke aktivnosti su bile izražene. DME ekstrakt *C. nodosa* je pokazao najbolju citotoksičnu aktivnost protiv HeLa i K562 ćelijskih linija tumora, što je navelo da se navedeni ekstrakt uključi u dalja istraživanja hemijskog sastava, pri čemu su identifikovana 3 jedinjenja: diosmetin-7-sulfat, kutarinska i kaftarinska kiselina. Dominantno jedinjenje u DME ekstraktu je bio diosmetin-7-sulfat, koji nije ispoljio značajnu citotoksičnu aktivnost protiv HeLa ćelijske linije tumora. Dalja istraživanja bi svakako mogla ići u pravcu identifikacije citotoksičnih jedinjenja iz morske trave *C. nodosa*. U uzorku *C. nodosa*, identifikovan je najviši sadržaj β -glukana, pa se navedena morska trava treba razmatrati u okviru suplemenata namenjenih jačanju imunog sistema. Najviši sadržaj PUFA (linolne kiseline i α -linolenske kiseline) u uzorku *C. nodosa* navodi na razmatranje primene navedene morske trave i u tretmanu hiperholesterolemije, kao i u prevenciji rizika od kardiovaskularnih oboljenja.

Ispitivane alge i morska trava predstavljaju veliki prirodni potencijal Jadranskog mora u cilju iznalaženja novih bioaktivnih jedinjenja koja će imati primenu u farmaciji, medicini, ishrani i suplementaciji. Dalja istraživanja bi mogla ići u pravcu identifikacije kompleksnih struktura molekula prisutnih u *C. nodosa*, *C. bursa*, *H. tuna* i *C. barbata*, kao i ka iznalaženju veze između njihove strukture i biološkog svojstva.

LITERATURA

1. Abdul QA, Choi RJ, Jung HA, Choi JS. Health benefit of fucosterol from marine algae: a review. *J Sci Food Agric* 2016; 96: 1856–1866.
2. Almeida-Lima J, Dantas-Santos N, Gomes DL, Cordeiro SL, Sabry DA, Costa LS, Freitas MD, Silva NB, Moura CE, Lemos TM, Leite EL. Evaluation of acute and subchronic toxicity of a non-anticoagulant, but antithrombotic algal heterofucan from the *Spatoglossum schröderi* in Wistar rats. *Rev Bras Farmacogn* 2011; 21(4): 674-679.
3. Antolić B, Nikolić V, Žuljević A. Crveni popis morskih alga i morskih cvjetnica Hrvatske. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split, 2011.
4. AOAC, Official Methods of Analysis. 16th ed, 3rd rev. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, 1997.
5. Arasaki S, Arasaki T. Low calorie, high nutrition vegetables from the sea to help you look and feel better. Japan Publications, Tokyo, 1983.
6. Athiperumalsami T, Kumar V, Jesudass LL. Survey and phytochemical analysis of seagrasses in the Gulf of Mannar, southeast coast of India. *Bot Mar* 2008; 51(4): 269-277.
7. Badea V, Balaban DP, Rapeanu G, Maria C, Badea CF. The antibacterial activity evaluation of *Cystoseira barbata* biomass and some agents upon bacteria from oropharyngeal cavity. *Rom Biotech Lett* 2009; 14(6): 4851-4857.
8. Ballesteros i Sagarra E. Contribució al coneixement algològic de la Mediterrània espanyola: algues bentòniques i litorals de Tossa de Mar (Girona). *Butll Inst Cat Hist Nat* 1981; 46(4): 55-73.
9. Bender AE. Dictionary of Nutrition and Food Technology. Butterworths, London, 1980.
10. Biligin Ş, Ertan ÖO. Selected chemical constituents and their seasonal variations in *Flabellia petiolata* (Turra) Nizam. and *Halimeda tuna* (Ellis & Sol.) JV Lamour. in the gulf of Antalya (North-eastern Mediterranean). *Turk J Bot* 2002; 26(2): 87-90.
11. Blaženčić J. Sistematika algi. DP Studentski trg, Beograd, 1994.

12. Bobadilla F, Rodriguez-Tirado C, Imarai M, Galotto MJ, Andersson R. Soluble β -1,3/1,6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr Polym* 2013; 92: 241–248.
13. Bocanegra A, Bastida S, Benedi J, Rodenas S, Sanchez-Muniz FJ. Characteristics and nutritional and cardiovascular-health properties of seaweeds. *J Med Food* 2009; 12(2): 236-258.
14. Bonanno G, Orlando-Bonaca M. Chemical elements in Mediterranean macroalgae. A review. *Ecotox Environ Safe* 2018; 148: 44-71.
15. Boulom S, Robertson J, Hamid N, Ma Q, Lu J. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem* 2014; 161: 261–269.
16. Burger A, Lichtscheidl I. Strontium in the environment: Review about reactions of plants towards stable and radioactive strontium isotopes. *Sci Tot Environ* 2019; 653: 1458-1512.
17. Burtin P. Nutritional value of seaweeds. *Elec J Env Agricult Food Chem* 2003; 2(4): 498-503.
18. Cai SL, Wu Z, Wu J, Wang Q, Shan Y. Synthesis and biological activities of natural flavonoid diosmetin and its derivatives. *Chin J Org Chem* 2012; 32: 560-566.
19. Caprioli G, Alunno A, Beghelli D, Bianco A, Bramucci M, Frezza C, Iannarelli R, Papa F, Quassinti L, Sagratini G Polar Constituents and Biological Activity of the Berry-Like Fruits from *Hypericum androsaemum* L. *Front Plant Sci* 2016; 7: 1–12.
20. Collins K, Fitzgerald G, Stanton C, Ross R. Looking beyond the terrestrial: the potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Mar Drugs* 2016; 14(3): 61-91.
21. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom* 2004; 39(1): 1-15.
22. Costello M. European register of marine species: a check-list of the marine species in Europe and a bibliography of guides to their identification. Paris: Muséum national d'histoire naturelle, 2001.

23. Chargaff E, Bancroft FW, Stanley Brown M. Studies on the chemistry of blood coagulation II. On the inhibition of blood clotting by substances of high molecular weight. *J Biol Chem* 1936; 115(1): 155-161.
24. Chen C, Pearson AM, Gray JI. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. *Food Chem* 1992; 43(3): 177-183.
25. Chaves N, Escudero JC, Gutierrez-Merino C. Role of Ecological Variables in the Seasonal Variation of Flavonoid Content of *Cistus ladanifer* Exudate. *J Chem Ecol* 1997; 23: 579–603.
26. Chkhikvishvili ID, Ramazanov ZM. Phenolic substances of brown algae and their antioxidant activity. *Appl Biochem Micro* 2000; 36(3): 289-291.
27. Choi JM, Lee EO, Lee HJ, Kim KH, Ahn KS, Shim BS, Kim N, Song MC, Baek NI, Kim SH. Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. *Phytother Res* 2007; 21: 954– 959.
28. Davidson MH, Dugan LD, Burns JH, Bova J, Story K, Drennan KB. The hypocholesterolemic effects of β - glucan in oatmeal and oat bran: a dose-controlled study. *JAMA Network* 1991; 265: 1833–1839.
29. Dawczynski C, Schubert R, Jahreis G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chem* 2007; 103(3): 891-899.
30. D’Orazio N, Gemello E, Gammone M, Girolamo M, Ficoneri C, Riccioni G. Fucoxantin: a treasure from the sea. *Mar Drugs* 2012; 10 (3): 604–616.
31. De La Santé DG. Avis du Conseil Supérieur d’Hygiène Publique de France, section des maladies transmissibles, relatif à la conduite à tenir devant un sujet atteint de pédiculose du cuir chevelu (séance du 27 juin 2003). *Annales de dermatologie et de vénéréologie* 2004; 131: 1122-1124.
32. De los Reyes C, Zbakh H, Motilva V, Zubía E. Antioxidant and anti-inflammatory meroterpenoids from the brown alga *Cystoseira usneoides*. *J Nat Prod* 2013; 76(4): 621-629.
33. De Napoli L, Magno S, Mayol L, Novellino E. Sterol composition of some Mediterranean green algae. *Phytochemistry* 1982; 21(8):1993-1994.
34. Drew EA. Sugars, cytolitols and seagrass phylogeny. *Aquat Bot* 1983; 15(4): 387-408.

35. Đorđević B, Đuričić I, Vidović B. Praktikum iz bromatologije. Farmaceutski fakultet, Beograd, 2011.
36. Dreher MI. Handbook of dietary fiber. Dekker M. and Basel Inc, New York, 1987.
37. El Din NG, El Sherif ZM. Nutritional value of *Cymodocea nodosa* and *Posidonia oceanica* along the western Egyptian Mediterranean coast. Egypt J Aquat Res 2013; 39(3): 153-165.
38. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. Planta Med 1998; 64(8): 711-713.
39. Enerstvedt KH, Jordheim M, Andersen Ø. Isolation and identification of flavonoids found in *Zostera marina* collected in Norwegian coastal waters. Am J Plant Sci 2016; 7: 1163–1172.
40. Enerstvedt KH. Analysis of polyphenolic content in marine and aquatic angiosperms from Norwegian coastal waters. PhD thesis, 2018. <https://pdfs.semanticscholar.org/c4f2/dbd2fac1f3659b973e1373aeded8b751dd5c.pdf>
41. Ercegović A. Značajne crte vegetacije alga Jadranskog mora. Acta Bot Croat, Zagreb, 1960.
42. Ershoff BH, Wells AF. Effects of Gum Guar, Locust Bean Gum and Carrageenan on Liver Cholesterol of Cholesterol-Fed Rats. Proc Soc Exp Biol Med 1962; 110(3): 580-582.
43. Fernández PV, Estevez JM, Cerezo AS, Ciancia M. Sulfated β -d-mannan from green seaweed *Codium vermilara*. Carbohydr Polym 2012; 87(1): 916-919.
44. Feng W, Li C, Zhang C, Liu S, Song F, Guo W, He Z, Li T, Chen H. Characterization of phosphorus in algae from a eutrophic lake by solution ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. Limnology 2019; 20(2): 163-171.
45. Fisch KM, Böhm V, Wright AD, König GM. Antioxidative Meroterpenoids from the Brown Alga *Cystoseira crinita*. J Nat Prod 2003; 66(7): 968-975.
46. Fleurence J, Le Coeur C, Mabeau S, Maurice M, Land-rein A. Comparison of different extractive procedures from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. J Appl Phycol 1995; 7: 577-588.

47. Floreto EA, Teshima S.I, Koshio S. The effects of seaweed diets on the lipid and fatty acids of the Japanese disc abalone *Haliotis discus hannai*. Fish Sci 1996; 62(4): 582-588.
48. Francis TGW, Hogg RA, Drew E. The sterol and fatty acid compositions of seven tropical seagrasses from North Queensland, Australia. Phytochemistry 1984; 23: 2817– 2821.
49. Freeman BC, Beattie GA. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. Plant Health Instr 2008; 226(1): 1-12.
50. Frikha F, Kammoun M, Hammami N, Mchirgui RA, Belbahri L, Gargouri Y, Miled N, Ben Rebah F. Chemical composition and some biological activities of marine algae collected in Tunisia. Cienc Mar 2011; 37(2): 113-124.
51. Fuchuan L, Zhihong T, Bowen C. Hypoglycemic Activity of Three Polysaccharides from *Laminaria japonica*. Chin J Mar Drugs 2000; 19(5): 12-15.
52. Fukuda SY, Iwamoto K, Atsumi M, Yokoyama A, Nakayama T, Ishida KI, Inouye I, Shiraiwa Y. Global searches for microalgae and aquatic plants that can eliminate radioactive cesium, iodine and strontium from the radio-polluted aquatic environment: a bioremediation strategy. J Plant Res 2014; 127: 79–89.
53. Galisteo M, Duarte J, Zarzuelo A. Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome. J Nutr Biochem 2008; 19: 71-84.
54. Galland-Irmouli AV, Fleurence J, Lamghari R, Luçon M, Rouxel C, Barbaroux O, Bronowicki JP, Villaume C, Guéant JL. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). J Nutr Biochem 1999; 10(6): 353-359.
55. Gillan FT, Hogg RW, Drew EA. The sterol and fatty acid compositions of seven tropical seagrasses from North Queensland, Australia. Phytochemistry, 1984; 23(12): 2817-2821.
56. Ghandourah M, Hawas UW, Abou El Kassem LT, Bamkhrama M, Taie HA. Antioxidant and Antitumor Metabolites of Saudi Red Sea Seagrasses *Halodule uninervis* and *Thalassia hemprichii*. Lett Org Chem 2019; 16(1): 50-58.
57. Glombitza KW, Wegner-Hambloch S, Schulten HR. Antibiotics from Algae, XXXVI. 1, 2 Phlorotannins from the Brown Alga *Cystoseira granulata*. Planta Med 1985; 51(2): 116-120.

- 58.** Goecke F, Hernández V, Bittner M, González M, Becerra J, Silva M. Fatty acid composition of three species of *Codium* (Bryopsidales, Chlorophyta) in Chile. *Rev Biol Mar Oceanog* 2010; 45(2): 325-330.
- 59.** Goni I, Urbano GM, Bravo L, Saura Calixto F. Dietary modulation of bacterial fermentative capacity by edible seaweeds in rats. *J Agric Food Chem* 2001; 49(5): 2663-2668.
- 60.** Goñi I, Valdivieso L, Garcia-Alonso A. Nori seaweed consumption modifies glycemic response in healthy volunteers. *Nutr Res* 2000; 20(10): 1367-1375.
- 61.** Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Mar Ecol Prog Ser* 2002; 231: 67-74.
- 62.** Grignon Dubois M, Rezzonico B. First phytochemical evidence of chemotypes for the seagrass *Zostera noltei*. *Plants* 2012; 1(1): 27-38.
- 63.** Grignon Dubois M, Rezzonico B. The economic potential of beach-cast seagrass-*Cymodocea nodosa*: a promising renewable source of chicoric acid. *Bot Mar* 2013; 56(4): 303-311.
- 64.** Grignon Dubois M, Rezzonico B. Phenolic chemistry of the seagrass *Zostera noltei* Hornem. Part 1: First evidence of three infraspecific flavonoid chemotypes in three distinctive geographical regions. *Phytochemistry* 2018; 146: 91-101.
- 65.** Harada H, Noro T, Kamei Y. Selective antitumor activity in vitro from marine algae from Japan coasts. *Biol Pharmacol Bull* 1997; 20(5): 541-546.
- 66.** Harborne JB. Flavonoid Sulphates: A new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochemistry* 1975, 14: 1147-1155.
- 67.** Harizi H, Corcuff JB, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; 14(10): 461-469.
- 68.** Hemminga M, Duarte C. *Seagrass Ecology*. Cambridge University Press, 2000.
- 69.** Hills-Colinvaux L, Baxter JHS, Russell Frederick S, Yonge M. Ecology and Taxonomy of Halimeda: Primary Producer of Coral Reefs. *Adv Mar Biol* 1980; 17: 17- 18.
- 70.** Hogarth PJ. *The Biology of Mangroves and Seagrasses*. Oxford University Press, 2007.

71. Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K. Seasonal variation in the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: fatty acids, sterols, β -carotene and tocopherol. *J App Phycol* 1994; 6: 25–29.
72. Hong IK, Jeon H, Lee SB. Comparison of red, brown and green seaweeds on enzymatic saccharification process. *J Ind Eng Chem* 2014; 20(5): 2687-2691.
73. Holland B, Brown J, Buss D.H. Fish and Fish Products: Third Supplement to 5th Edition of McCance and Widdowson's 'The Composition of Foods'. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1993.
74. Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *J Lipid Res* 2010; 51: 635–640.
75. Itoh H, Noda H, Amano H, Ito H. Immunological analysis of inhibition of lung metastases by fucoidan (GIV-A) prepared from brown seaweed *Sargassum thunbergii*. *Anticancer Res* 1995; 15(5B): 1937-1947.
76. Immaculate JK, Lilly TT, Patterson J. Macro and micro nutrients of seagrass species from Gulf of Mannar, India. *MOJ Food Process Technol* 2018; 6(4): 391-398.
77. Ivanova V, Stancheva M, Merdzhanova A. Fatty acids composition of macroalgae from Bulgarian Black Sea coast. *Analele Stiint Univ* 2012; 23(1): 35-40.
78. Ibtissam C, Hassane R, Jose M, Francisco DSJ, Antonio GVJ, Hassan B, Mohamed K. Screening of antibacterial activity in marine green and brown macroalgae from the coast of Morocco. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(7): 1258-1262.
79. Jančić R, Lakušić B. *Botanika farmaceutika*. Lento, Beograd, 2017.
80. Jeevitha M, Athiperumalsami T, Kumar V. Dietary fibre, mineral, vitamin, amino acid and fatty acid content of seagrasses from Tuticorin Bay, Southeast coast of India. *Phytochemistry* 2013; 90: 135-146.
81. Jenkins B, West JA, Koulman A. A review of odd-chain fatty acid metabolism and the role of pentadecanoic acid (C15:0) and heptadecanoic acid (C17:0) in health and disease. *Molecules* 2015; 20: 2425–2444.
82. Jensen A. Tocopherol content of seaweed and seaweed meal. II. Individual, diurnal and seasonal variations in some Fucaceae. *J Sci Fd Agric* 1969; 20: 454 – 458.
83. Jiménez-Escrig A, Sánchez-Muniz FJ. Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res* 2000; 20(4): 585-598.

- 84.** Johns DH, Moore C. Reef to basin sediment transport using *Halimeda* as a sediment tracer, Grand Cayman Island, West Indies. *Coral Reefs* 1988; 6: 187-193.
- 85.** Jureša D, Blanuša M. Mercury, arsenic, lead and cadmium in fish and shellfish from the Adriatic Sea. *Food Addit Contam* 2003; 20: 241–246.
- 86.** Kaeffer B, Bénard C, Lahaye M, Blottière HM, Cherbut C. Biological properties of ulvan, a new source of green seaweed sulfated polysaccharides, on cultured normal and cancerous colonic epithelial cells. *Planta Med* 1999; 65(06); 527-531.
- 87.** Kaur N, Chaudhary J, Jain A, Kishore L. Stigmasterol: a comprehensive review. *Int J Pharm Sci Res* 2011; 2: 2259-2265.
- 88.** Keiji I, Hori K. Seaweed: chemical composition and potential food uses. *Food Rev Int* 1989; 5: 101–144.
- 89.** Kiriyaama S, Okazaki Y, Yoshida A. Hypocholesterolemic effect of polysaccharides and polysaccharide-rich foodstuffs in cholesterol-fed rats. *J Nutr* 1969; 97(3): 382-388.
- 90.** Khotimchenko SV. Fatty acids and polar lipids of seagrasses from the Sea of Japan. *Phytochemistry* 1993; 33(2): 369-372.
- 91.** Khotimchenko SV. Lipids from the marine alga *Gracilaria verrucosa*. *Chem Nat Comp* 2005; 41: 285–288.
- 92.** Kris-Etherton PM, Hecker KD, Binkoski AE. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. *Nutr Rev* 2004; 62(11): 414-426.
- 93.** Koehn FE, Sarath GP, Neil DN, Cross SS. Halitunal, an unusual diterpene aldehyde from the marine alga *Halimeda tuna*. *Tetrahedron Lett* 1991; 32(2): 169-172.
- 94.** Kolsi RB, Ben Gara A, Jardak N, Chaaben R, El Feki A, El Feki L, Belghith K. Inhibitory effects of *Cymodocea nodosa* sulphated polysaccharide on α -amylase activity, liver-kidney toxicities and lipid profile disorders in diabetic rats. *Arch Physiol Biochem* 2015; 121(5): 218-227.
- 95.** Kolsi RB, Fakhfakh J, Krichen F, Jribi I, Chiarore A, Patti FP, Blecker C, Allouche N, Belghith H, Belghith K. Structural characterization and functional properties of antihypertensive *Cymodocea nodosa* sulfated polysaccharide. *Carbohydr Polym* 2016; 151: 511-522.
- 96.** Kontiza I, Stavri M, Zloh M, Vagias C, Gibbons S, Roussis V. New metabolites with antibacterial activity from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron* 2008; 64(8): 1696-1702.

- 97.** Kuda T, Goto H, Yokovama M, Fujii T. Fermentable dietary fiber in dried products of brown algae and their effects on cecal microflora and levels of plasma lipid in rats. *Fish Sci* 1998; 64(4): 582-588.
- 98.** Kumar CS, Ganesan P, Suresh PV, Bhaskar N. Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *J Food Sci Tech* 2008; 45(1): 1-13.
- 99.** Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. Tropical marinemacroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem* 2010; 120: 749–757.
- 100.** Kurt O, Özdal Kurt F, Tuğlu MI, Akçora CM. The cytotoxic, neurotoxic, apoptotic and antiproliferative activities of extracts of some marine algae on the MCF-7 cell line. *Biotec Histochem* 2014; 89(8): 568-576.
- 101.** Lahaye M. Marine algae as sources of fibres. Determination of soluble and insoluble dietary fiber contents in some sea vegetables. *J Sci Food Agric* 1991; 54: 587-594.
- 102.** Lange KW, Hauser J, Nakamura Y, Kanaya S. Dietary seaweeds and obesity. *Food Science and Human Wellness* 2015; 4(3): 87-96.
- 103.** Lamela M, Anca J, Villar R, Otero J, Calleja JM. Hypoglycemic activity op several seaweed extracts. *J Ethnopharmacol* 1989; 27(1-2): 35-43.
- 104.** Le Tutour B. Antioxidative activities of algal extracts, synergistic effect with vitamin E. *Phytochemistry* 1990; 29(12): 3759-3765.
- 105.** Le Tutour B, Benslimane F, Gouleau MP, Gouygou JP, Saadan B, Quemeneur F. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himanthalia elongata*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. *J Appl Phycol* 1998; 10(2): 121-129.
- 106.** Lee SH, Jeon YJ. Anti-diabetic effects of brown algae derived phlorotannins, marine polyphenols through diverse mechanisms. *Fitoterapia* 2013; 86: 129-136.
- 107.** Li C, Uppal M. Canadian diabetes association national nutrition committee clinical update on dietary fibre in diabetes: Food sources to physiological effects. *Can J Diabetes* 2010; 34(4): 355-361.
- 108.** Life extension Vitamin Supplies and Life Extension Institute, Inc.1997
- 109.** Lichtenstein AH. Plant Stanol/Sterol Ester□Containing Foods and Cardiovascular Disease Risk. *Nutr Clin Care* 2000; 3(5): 274-278.

- 110.** Lim S, Cheung P, Ooi V, Ang PO. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. J Agr Food Chem 2002; 50(13): 3862-3866.
- 111.** Liu M, Hansen PE, Lin X. Bromophenols in marine algae and their bioactivities. Mar Drugs 2011; 9(7): 1273-1292.
- 112.** Lordan S, Smyth JT, Soler-Vila A, Stanton C, Ross RP. The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. Food Chem 2013; 141: 2170-2176.
- 113.** Mabeau S, Fleurence J. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. Trends Food Sci Tech 1993; 4(4): 103-107.
- 114.** Manivannan K, Thirumaran G, Karthikai Devi G, Anantharaman P, Balasubramanian T. Proximate composition of different group of seaweeds from Vedalai Coastal waters (Gulf of Mannar): Southeast Coast of India. Middle East J Sci Res 2009; 4(2):72-77.
- 115.** Marxen K, Vanselow KH, Lippemeier S, Hintze Ruser A, Hansen UP. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. Sensors 2007; 7(10): 2080-2095.
- 116.** Mohamed S, Hashim SN, Rahman HA. Seaweeds: a sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends Food Sci Tech 2012; 23(2): 83-96.
- 117.** Mozaffarian D. Fish and n-3 fatty acids for the prevention of fatal coronary heart disease and sudden cardiac death. Am J Clin Nutr 2008; 87(6): 1991S-1996S.
- 118.** Milkova T, Talev G, Christov R, Dimitrova Konaklieva S, Popov S. Sterols and volatiles in *Cystoseira barbata* and *Cystoseira crinita* from the Black Sea. Phytochemistry 1997; 45(1): 93-95.
- 119.** Miyashita K, Mikami N, Hosokawa M. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: a review. J Funct Foods 2013; 5(4): 1507-1517.
- 120.** Mokrini R, Mesaoud MB, Daoudi M, Hellio C, Maréchal JP, El Hattab M, Ortalo-Magné A, Piovetti L, Culioli G. Meroditerpenoids and derivatives from the brown alga *Cystoseira baccata* and their antifouling properties. J Nat Prod 2008; 71(11): 1806-1811.

- 121.** Moon NG, Andrew MH. Synthetic explorations of the briarane jungle: progress in developing a synthetic route to a common family of diterpenoid natural products. *R Soc Open Sci* 2018; 5.5: 172-280.
- 122.** Morgan KC, Wright JLC, Simpson FJ. Review of chemical constituents of the red alga *Palmaria palmate* (Dulse). *Econ Bot* 1980; 34: 27-50.
- 123.** Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2): 55-63.
- 124.** Mtolera MS, Semesi A. Antimicrobial Activity of Extracts from Six Green Algae from Tanzania. *Curr Trends Mar Bot Res East Afr* 1996; Reg pp: 211-217.
- 125.** Neushul M. Antiviral carbohydrates from marine red algae. Thirteenth International Seaweed Symposium, Kluwer Academic Publishers. *Hydrobiologia* 1990; 204/205: 99-104.
- 126.** Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Thromb Res* 1991; 62(6): 765-73.
- 127.** Nichols PD, Klumpp DW, Johns RB. Lipid components of the seagrasses *Posidonia australis* and *Heterozostera tasmanica* as indicators of carbon source. *Phytochemistry* 1982; 21(7): 1613-1621.
- 128.** Nikolić T. Sistemska botanika raznolikost i evolucija biljnog sveta. Alfa, Zagreb, 2013.
- 129.** Ohno M, Abe T, Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J Immunol Methods* 1991; 145(1-2): 199-203.
- 130.** Omar HH, Abdullatif BM, Al Kazan MM, El Gendy AM. Various applications of seaweed improves growth and biochemical constituents of *Zea mays* L. and *Helianthus annuus* L. *J Plant Nutr* 2015; 38: 28–40.
- 131.** Ortiz J, Romero N, Robert P, Araya J, Lopez-Hernández J, Bozzo C, Rios A. Dietary fiber, amino acid, fatty acid and tocopherol contents of the edible seaweeds *Ulva lactuca* and *Durvillaea antarctica*. *Food Chem* 2006; 99(1): 98-104.
- 132.** Ostlund Jr RE. Phytosterols in human nutrition. *Ann Rev Nutr* 2002; 22(1): 533-49.
- 133.** Ozdemir G, Horzum Z, Sukatar A, Karabay Yavasoglu NU. Antimicrobial activities of volatile components and various extracts of *Dictyopteris*

membranaceae and *Cystoseira barbata* from the coast of Izmir, Turkey. *Pharm Biol* 2006; 44(3): 183-188.

134. Parish CR, Coombe DR, Jakobsen KB, Bennett FA, Underwood PA. Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases. *Int J Cancer* 1987; 40(4): 511-518.

135. Patterson GW. The distribution of sterols in algae. *Lipids* 1971; 6: 120–127.

136. Paul VJ, Fenical W. Novel bioactive diterpenoid metabolites from tropical marine algae of the genus *Halimeda* (Chlorophyta). *Tetrahedron* 1984; 40(16): 3053-3062.

137. Perl A, Gonzalez Cabello R, Gergely P. Stimulation of lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity against adherent HEP-2 cells by carrageenan. *Clin Exp Immunol* 1983; 54(2): 567-572.

138. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *J Sci Food Agric* 2000; 80: 939–966.

139. Piovetti L, Deffo P, Valls R, Peiffer G. Determination of sterols and diterpenoids from brown algae (Cystoseiraceae). *J Chromatogr A* 1991; 588(1-2): 99-105.

140. Pirc H. Seasonal changes in soluble carbohydrates, starch, and energy content in Mediterranean seagrasses. *Mar Ecol* 1989; 10(2): 97-105.

141. Pradheeba M, Dilipan E, Nobil EP, Thangaradjou T, Sivakumar K. Evaluation of seagrasses for their nutritional value. *Indian J Mar Sci* 2011; 40(1): 105-111.

141. Prosky L, Asp NG, Schweizer TF, DeVries JW, Furda I. Determination of insoluble, soluble, and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Anal Chem* 1988; 71(5): 1017-1023.

143. Rajapakse N, Kim SK. Nutritional and digestive health benefits of seaweed. *Adv Food Res* 2011; 64: 17-28.

144. Rajeshwari M. Seagrass ecosystem of Coromandel Coast. Final report submitted to Department of Chemical engineering, IIT Madras, 1990.

145. Ren D, Noda H, Amano H, Nishino T, Nishizawa K. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. *Fish Sci* 1994; 60(1): 83-88.

- 146.** Ribeiro B, Andrade PB, Silva BM, Baptista P, Seabra RM, Valentao P. Comparative study on free amino acid composition of wild edible mushroom species. *J Agric Food Chem* 2008; 56(22): 10973-10979.
- 147.** Rodríguez Prieto C, Ballesteros Sagarra E, Boisset F, Navarro Carrill D. *Algae e Fanerogame del Mediterraneo [Algae and Phanerogams of the Mediterranean]*. Edizioni il Castello, Milano, 2015.
- 148.** Rodrigues D, Ana CF, Leonel P, Teresa APRS, Marta WV, Mariana R, Luís MRA, Ana MPG, Armando CD. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chem* 2015; 183: 197-207.
- 149.** Roynette CE, Calder PC, Dupertuis YM, Pichard C. n-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention. *Clin Nutr* 2004; 23(2): 139-151.
- 150.** Ruxton C, Reed S, Simpson M, Millington K. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet Subsets* 2007; 20(3): 275-285.
- 151.** Saeidnia S. The story of beta-sitosterol – a review. *Eur J Med Plants* 2014; 4: 590-609.
- 152.** Sagar PS, Das UN, Koratkar R, Ramesh G, Padma M, Kumar GS. Cytotoxic action of cis-unsaturated fatty acids on human cervical carcinoma (HeLa) cells: relationship to free radicals and lipid peroxidation and its modulation by calmodulin antagonists. *Canc Lett* 1992; 63(3): 189-198.
- 153.** Sánchez-Machado DI, López Cervantes J, López Hernández J, Paseiro Losada P. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed Chromatogr* 2004; 18: 183–190.
- 154.** Sánchez Machado DI, López Cervantes J, Lopez Hernandez J, Paseiro-Losada P. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem* 2004; 85(3): 439-444.
- 155.** Sanders TA. Reappraisal of SFA and cardiovascular risk. *P Nutr Soc* 2013; 72(4): 390-398.
- 156.** Salvador SN, Gómez GMA, Lavelli L, Ribera SMA. Antimicrobial activity of Iberian macroalgae. *Sci Mar* 2007; 71: 101-113.
- 157.** Serge M, Fleurence J. Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends Food Sci Technol* 1993; 4: 103–107.

- 158.** Sellimi S, Kadri N, Barragan Montero V, Laouer H, Hajji M, Nasri M. Fucans from a Tunisian brown seaweed *Cystoseira barbata*: structural characteristics and antioxidant activity. *Int J Biol Macromol* 2014; 66: 281-288.
- 159.** Shameel M. Phycochemical studies on fatty acids from certain seaweeds. *Bot Mar* 1990; 33: 429-432.
- 160.** Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989; 259(2): 315-324.
- 161.** Shan X, Liu X, Hao J, Cai C, Fan F, Dun Y, Zhao X, Liu X, Li C, Yu G. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. *Int J Biol Macromol* 2016; 82: 249-255.
- 162.** Sheu JH, Wang GH, Sung PJ, Duh CY. New cytotoxic oxygenated fucosterols from the brown alga *Turbinaria conoides*. *J Nat Prod* 1999; 62(2): 224-227.
- 163.** Subhashini P, Dilipan E, Thangaradjou T, Papenbrock J. Bioactive natural products from marine angiosperms: abundance and functions. *Nat Prod Bioprospect* 2013; 3(4): 129-136.
- 164.** Sun Z, Chen F. Evaluation of the Green Alga *Chlorella pyrenoidosa* for management of diabetes. *J Food Drug Anal* 2012; 20: 246-249.
- 165.** Sullivan CM, Leon JB, Sehgal AR. Phosphorus-containing food additives and the accuracy of nutrient databases: implications for renal patients. *J Ren Nutr* 2007; 17(5): 350-354.
- 166.** Taskin E, Ozturk M, Kurt O. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *Afr J Biotechnol* 2007; 6(24): 2746-2751.
- 167.** Teas J. The dietary intake of *Laminaria*, a brown seaweed, and breast cancer prevention. *Nutr Cancer* 1982; 4: 217– 222.
- 168.** Teles YC, Souza MSR, Souza MDFVD. Sulphated flavonoids: biosynthesis, structures, and biological activities. *Molecules* 2018; 23(2): 481-491.
- 169.** Teles YCF, Horta CCR, Agra MF, Siheri W, Boyd M, Igoli JO, Gray AI, de Souza MFV. New Sulphated Flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). *Molecules* 2015; 20: 20161–20172.
- 170.** Tierney MS, Croft AK, Hayes M. A review of antihypertensive and antioxidant activities in macroalgae. *Bot Mar* 2010; 53(5): 387-408.
- 171.** Trento F, Cattaneo F, Pescador R, Porta R, Ferro L. Antithrombin activity of an algal polysaccharide. *Thromb Res* 2001; 102(5): 457-465.

- 172.** Tsekos I, Margaris NS, Haritonidis S. Pools of free amino acids in Greek marine algae. *Biochem Physiol Pflanz* 1975; 167(2): 165-172.
- 173.** Urbano MG, Goñi I. Bioavailability of nutrients in rats fed on edible seaweeds, Nori (*Porphyra tenera*) and Wakame (*Undaria pinnatifida*), as a source of dietary fibre. *Food Chem* 2002; 76(3): 281-286.
- 174.** Van den Hoek C, Hans Martin J, David G.M. *Algen*. Thieme, Stuttgart, 1993; 38-164.
- 175.** Vani M, Vasavi T, Uma MD. Evaluation of *in vitro* antidiabetic activity of methanolic extract of seagrass *Halophila beccarii*. *Evaluation* 2018; 11(8): 150-153.
- 176.** Valls R, Mesguiche V, Pioveti L, Prost M, Peiffer G. Meroditerpenes from the brown alga *Cystoseira amentacea* var. *stricta* collected off the French mediterranean coast. *Phytochemistry* 1996; 41(5): 1367-1371.
- 177.** Verbruggen H, Leliaert F, Maggs CA, Shimada S, Schils T, Provan J, Booth D, Murphy S, De Clerck O, Littler DS, Littler MM, Coppejans E. Species boundaries and phylogenetic relationships within the green algal genus *Codium* (*Bryopsidales*) based on plastid DNA sequences. *Mol Phylogenetics Evol* 2007; 44(1): 240-254.
- 178.** Volpato M, Hull MA. Omega-3 polyunsaturated fatty acids as adjuvant therapy of colorectal cancer. *Cancer Metastat Rev* 2018; 37(2-3): 545-555.
- 179.** Widiyanto A, Anwar E, Nurhayati T. *In vitro* Assay of Alpha-Glucosidase Inhibitor Activities of Three Seagrasses from Banten Bay, Indonesia. *Phcog J* 2018; 10(5): 907-910.
- 180.** Wijendran V, Hayes KC. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 597–615.
- 181.** Wong KH, Cheung PC. Effect of fiber-rich brown seaweeds on protein bioavailability of casein in growing rats. *Int J Food Sci Nutr* 2003; 54(4): 269-279.
- 182.** Xu XQ, Tran VH, Kraft G, Beardall J. Fatty acids of six *Codium* species from southeast Australia. *Phytochemistry* 1998; 48(8):1335-1339.
- 183.** Yamori Y, Nara Y, Mizushima S, Sawamura M, Horie R. Nutritional factors for stroke and major cardiovascular diseases: international epidemiological comparison of dietary prevention. *Health Rep* 1994; 6(1): 22-27.

184. Yoshie Y, Wang W, Hsieh YP, Suzuki T. Compositional difference of phenolic compounds between two seaweeds, *Halimeda spp.* J Tokyo Univ Fish 2002; 88: 21-24.

185. Ye Z, Arumugam V, Haugabrooks E, Williamson P, Hendrich S. Soluble dietary fiber (Fibersol-2) decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal. Nutr Res 2015; 35(5): 393-340.

186. Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, Le Lann K, Stiger Pouvreau V, Fauchon M, Deslandes E. Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts. Food Chem 2009; 116(3): 693-701.

187. Zaharudin N, Staerk D, Dragsted LO. Inhibition of α -glucosidase activity by selected edible seaweeds and fucoxanthin. Food Chem 2019; 270: 481-486.

BIOGRAFIJA

Sanja M. Milović, devojčako Labudović, rođena je 18. februara 1987. godine, u Kragujevcu, Republika Srbija. Drugu kragujevačku gimnaziju, u Kragujevcu, završila je sa prosečnom ocenom 5,00 kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2005. i diplomirala maja 2011. godine na Katedri za bromatologiju sa ocenom 10 na diplomskom ispitu, i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,00. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije (2005–2010). Učestvovala je u izradi studentskih naučno-istraživačkih radova na Katedri za farmakologiju. Doktorske akademske studije iz bromatologije na Univerzitetu u Beogradu-Farmaceutskom fakultetu, upisala je školske 2011/12 godine. Od avgusta 2011. godine radila je kao apotekarski pripravnik u „Apoteci Beograd“ i Kliničkom centru Republike Srbije. Od jula 2012. godine radila je kao saradnik u Nacionalnoj kontrolnoj laboratoriji Agencije za lekove i medicinska sredstva Srbije. Od oktobra 2013. godine bila je zaposlena na funkciji rukovodioca proizvodnje u firmi Bio-eliksir doo. Od decembra 2018. do danas radi kao menadžer regulatornih poslova u firmi Beocompass doo. Govori engleski, nemački i francuski jezik.

Sanja M. Milović, was born as Labudović, on February 18, 1987 in Kragujevac, Republic of Serbia. She finished the Second Grammar School in Kragujevac, with average grade 5/5 as the owner of Vuk Karadžić diploma. Faculty of Pharmacy, University of Belgrade enrolled in the school year 2005/06 and graduated in May 2011 at the Department of Bromatology with a grade of 10 for the undergraduate thesis, and a grade point average of 9/10. During studies, she had the scholarship from the Ministry of Education and Sports (2005-2010). She also participated in the student research program at the Department of Pharmacology. She started her PhD studies in the field of bromatology at the University of Belgrade-Faculty of Pharmacy, in 2011/2012. From August 2011, she worked as a pharmacy intern in the “Pharmacy Belgrade” and in the hospital pharmacy of the Clinical Center of Serbia. From July 2012, she worked as an associate in the National Control Laboratory of the Medicines and Medical Devices Agency of Serbia and from October 2013, she was employed as the Manufacturing manager in the Bio-elixir doo Company. From the December 2018 until now, she was employed as the Regulatory affairs manager at the Beocompass doo Company. She speaks English, German and French.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Сања Миловић

Број индекса 10/11

Студијски програм докторске академске студије, модул Броматологија

Наслов рада Нутритивна, хемијска и биолошка карактеризација морских алги

Halimeda tuna, Codium bursa, Cystoseira barbata и морске траве *Cymodocea*

nodosa из Јадранског мора

Ментор Др сц. Иван Станковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 31.03.2020.



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Нутритивна, хемијска и биолошка карактеризација морских алги *Halimeda tuna*,

Codium bursa, *Cystoseira barbata* и морске траве *Cymodocea nodosa* из Јадранског

мора

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 31.03.2020.



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.