

# Aminokiselinski profil makroalgi roda *Cystoseira*

---

**Potočar, Anita**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:301874>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#)/[Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

REPOZITORIJ

**PTF**

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**dabar**  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Anita Potočar**

**AMINOKISELINSKI PROFIL MAKROALGI RODA  
*CYSTOSEIRA***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, prosinac, 2023.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za ispitivanje hrane i prehrane  
Katedra za kakvoću hrane  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Kontrola kakvoće hrane  
**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Ivana Flanjak*  
**Komentor:** prof. dr. sc. *Stela Jokić*

**Aminokiselinski profil makroalgi roda *Cystoseira***  
*Anita Potočar, 0113142124*

### Sažetak:

Cilj diplomskog rada bio je istražiti aminokiselinski sastav u pet vrsta smeđih makroalgi roda *Cystoseira* (*C. corniculata*, *C. compressa*, *E. amentacea*, *G. barbata* i *C. spicata*) u svrhu utvrđivanja potencijalne primjene proteina spomenutih algi u prehrambenoj, kozmetičkoj i/ili farmaceutskoj industriji. Udio bjelančevina određen je indirektno iz količine dušika metodom po Kjeldahl-u, a sastav i sadržaj aminokiselina u ispitivanim uzorcima smeđih makroalgi određen je HPLC metodom uz fluorescencijski detektor. Udio bjelančevina u odabranim vrstama makroalge roda *Cystoseira* kretao se u rasponu od 5,35 do 6,79 %, a najviši udio izmjeren je u algi *C. compressa*, a najmanji u *G. barbata*. Omjer esencijalnih prema neesencijalnim aminokiselinama (EAK/NEAK) bio je u rasponu od 0,15 do 0,82, što ukazuje da je sadržaj NEAK bio viši u odnosu na EAK u svim ispitanim vrstama. Najviši omjer izmjeren je u makroalgi *C. compressa*, što ukazuje na viši sadržaj esencijalnih aminokiselina u odnosu na ostale ispitane makroalge, a najmanji u *E. amentacea*. Najzastupljenije neesencijalne aminokiseline u svim analiziranim makroalgama bile su asparaginska i glutaminska kiselina, alanin i glicin, a od esencijalnih aminokiselina histidin, fenilalanin i treonin.

**Ključne riječi:** aminokiseline, proteini, makroalge, rod *Cystoseira*

**Rad sadrži:** 45 stranica  
23 slike  
6 tablica  
0 priloga  
43 literaturne reference

**Jezik izvornika:** hrvatski

### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>doc. dr. sc.</i> Blanka Bilić Rajs   | predsjednik   |
| 2. <i>izv. prof. dr. sc.</i> Ivana Flanjak | član-mentor   |
| 3. <i>prof. dr. sc.</i> Stela Jokić        | član-komentor |
| 4. <i>doc. dr. sc.</i> Krunoslav Aladić    | zamjena člana |

**Datum obrane:** 20. prosinca 2023.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Food and Nutrition Research  
Subdepartment of Food Quality  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Course title:** Food Quality Control  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X held on July 17, 2023.  
**Mentor:** *Ivana Flanjak*, PhD, associate prof.  
**Co-mentor:** *Stela Jokić*, PhD, full prof.

### **Amino Acids Profile of Macroalgae of the Genus *Cystoseira*** *Anita Potočar, 0113142124*

#### **Summary:**

The aim of the study was to investigate the amino acid composition of five species of brown macroalgae of the genus *Cystoseira* (*C. corniculata*, *C. compressa*, *E. amentacea*, *G. barbata* and *C. spicata*) in order to determine the potential application of the proteins of the aforementioned algae in food, cosmetic and/or or the pharmaceutical industry. The protein content was determined indirectly from the amount of nitrogen using the Kjeldahl method, and the composition and content of amino acids in the tested samples of brown macroalgae was determined using the HPLC method with a fluorescence detector. The protein content in the selected macroalgae species of the genus *Cystoseira* ranged from 5.35 to 6.79 %, and the highest content was measured in the macroalgae *C. compressa*, and the lowest in *G. barbata*. The ratio of essential to non-essential amino acids (EAK/NEAK) was in the range from 0.15 to 0.82, which indicates that the NEAK content was higher compared to EAK in all tested species. The highest ratio was measured in the macroalgae *C. compressa*, which indicates a higher content of essential amino acids compared to the other examined macroalgae, and the lowest in *E. amentacea*. The most abundant non-essential amino acids in all analyzed macroalgae were aspartic and glutamic acid, alanine and glycine, and from essential amino acids histidine, phenylalanine and threonine.

**Key words:** amino acids, proteins, macroalage, genus *Cystoseira*

**Thesis contains:** 45 pages  
23 figures  
6 tables  
0 supplements  
43 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. <i>Blanka Bilić Rajs</i> , PhD, assistant prof. | chair person  |
| 2. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof.     | supervisor    |
| 3. <i>Stela Jokić</i> , PhD, full prof.            | co-supervisor |
| 4. <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, assistant prof.  | stand-in      |

**Defense date:** December, 20, 2023.

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

*Prvenstveno zahvaljuem svojoj mentorici izv. dr. sc. Ivani Flanjak koja mi je svojim znanjem, ukazanim povjerenjem i sugestijama pomogla pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Također, veliko hvala mag. ing. Katarini Gal, na nesebičnoj pomoći, pristupačnosti, savjetima i ugodnoj atmosferi tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.*

*Posebno HVALA mojim roditeljima, koji su uvijek bili uz mene, poticali me, motivirali, i omogućili mi školovanje. Hvala Vam za ljubav i podršku koju ste mi nesebično davali.*

*Neizmjernu zahvalnost uvijek ću dugovati svojoj braći, sestri, rodbini i prijateljima koji su uvijek vjerovali u mene, i kolegama bez kojih studiranje ne bi bilo isto. Hvala na divnim uspomnama*



**BIOPROSPECTING  
JADRANSKOG MORA**  
Projekt sufinancira Europska unija iz  
Europskog fonda za regionalni razvoj



Republika Hrvatska  
Ministarstvo znanosti i  
obrazovanja



Europska unija  
Zajedno do fondova EU



Republika Hrvatska  
Ministarstvo regionalnoga razvoja  
i fondova Europske unije



**EUROPSKI STRUKTURNI  
I INVESTICIJSKI FONDovi**

Operativni program  
**KONKURENTNOST  
I KOHEZIJA**

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

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. MAKROALGE</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Klasifikacija makroalgi .....	4
2.1.2. Primjena makroalgi .....	5
<b>2.2. SMEĐE MAKROALGE</b> .....	<b>8</b>
2.2.1. Kemijski sastav smeđih makroalgi .....	9
2.2.2. Proteini i aminokiseline u smeđim makroalagama .....	13
<b>2.3. ROD CYSTOSEIRA</b> .....	<b>19</b>
2.3.1. Cystoseira corniculata .....	20
2.3.2. Cystoseira compressa .....	21
2.3.3. Ericaria amentacea .....	21
2.3.4. Gongolaria barbata .....	22
2.3.5. Cystoseira spicata .....	23
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>25</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>25</b>
3.2.1. Uzorci makroalgi .....	25
3.2.2. Kemikalije .....	25
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>26</b>
3.3.1. Priprema uzoraka .....	26
3.3.2. Određivanje udjela bjelančevina metodom po Kjeldahl-u .....	26
3.3.3. Određivanje aminokiselinskog profila .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>42</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

3-MPA 3-merkaptopropionska kiselina (eng. 3-mercaptopropionic acid)

ACE angiotenzin-konvertirajući enzim (eng. Angiotensin-converting enzyme)

ACN acetonitril

AK aminokiselina

EAK esencijalna aminokiselina

EAK/NEAK omjer esencijalnih aminokiselina prema neesencijalnim aminokiselinama

FMOC 9-fluorenilmetil kloroformat (eng. 9-fluorenylmethyl chloroformate)

Gly glicin (eng. Glycine)

HPLC tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High performance liquid chromatography)

L-Ala alanin (eng. Alanine)

L-Arg arginin (eng. Arginine)

L-Asp asparaginska kiselina (eng. Aspartic acid)

L-Cys cistein (eng. Cysteine)

L-Glu glutaminska kiselina (eng. Glutamic acid)

L-His histidin (eng. Histidine)

L-Ile izoleucin (eng. Isoleucine)

L-Leu leucin (eng. Leucine)

L-Lys lizin (eng. (Lysine)

L-Met metionin (eng. Methionine)

L-Phe fenilalanin (eng. Phenylalanine)

L-Pro prolin (eng. Proline)

L-Ser serin (eng. Serine)

L-Thr treonin (eng. Threonine)

L-Trp triptofan (eng. Tryptophan)

L-Tyr tirozin (eng. Tyrosine)



L-Val valin (eng. Valine)

MetOH metanol

NEAK neesencijalna aminokiselina

OPA orto-ftalaldehid (eng. ortho-phthalaldehyde)

OPA/3MPA o-ftalaldehid/3-merkaptopropionska kiselina

## **1. UVOD**

Makroalge su fascinantna i raznolika skupina organizama poznata kao 'morske alge', a žive u morskom okolišu. Klasificiraju se u tri glavne skupine temeljem prisutnih pigmenata, a to su zelene alge (*Chlorophyta*), smeđe alge (*Phaeophyta*) i crvene alge (*Rhodophyta*). Što se tiče ukupne tržišne vrijednosti, prema izvješću Seafood-a, prehrambena industrija bazirana na makroalgama procjenjuje se na oko 5 milijardi USD godišnje, a predviđa se da će globalno tržište makroalgama dosegnuti vrijednost od 22,1 milijardu USD do 2024. godine (Rao i Ravishankar, 2022.). Vrlo je važno naglasiti da biotehnološka iskorištenost morskih algi u našem vremenu postaje neosporna, jer njihovo bogatstvo i raznolikost osigurava ljudima i životinjama kontinuirani izvor hrane bez zagađivača, za razliku od kemijskih tvari koje uništavaju okoliš. Iz tog su razloga provedeni mnogi pokusi i izvješća o raznolikosti, ekologiji, kemijskom sastavu, funkciji i drugim raznolikim karakteristikama morskih algi, a znanstvenici još uvijek istražuju utjecaj ove vrste vodenih biljaka na život na Zemlji. Biomasa makroalgi sadrži obilje hranjivih tvari i niz bioaktivnih spojeva. Ne samo da su bogate ugljikohidratima, proteinima, lipidima, vitaminima i vlaknima, već sadrže i esencijalne aminokiseline i minerale. Konkretno, najveći sektor tržišta morskih algi pripisuje se hidrokolidima kao što su agar, alginat i karagenan. Zahvaljujući bogatom nutritivnom sastavu, pronašle su primjenu u različitim industrijama, prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj, također u poljoprivrednom sektoru, mogu se koristiti za pročišćavanje otpadnih voda, te za proizvodnju biogoriva, bioetanola i biougļjena. Njihovi polisahardi se ne probavljaju u ljudskom probavnom traktu, stoga se mogu smatrati dijetalnim vlaknima i djelovati kao prebiotici, uključivanjem morskih algi u namirnice koje se konzumiraju svakodnevno, dodaju vrijednost takvim namirnicama kao funkcionalna hrana (Kim, 2011.). Morske alge, bogate su bjelančevinama, sadrže do 40 % bjelančevina s izvrsnim profilom aminokiselina (AK) i visokom probavljivošću koja je usporediva ili čak bolja od izvora životinjskih bjelančevina. Proteinska frakcija morskih algi sadrži brojne bioaktivne komponente, uključujući aminokiseline, slobodne aminokiseline (osobito taurin, laminin, kainsku i domoičnu kiselinu), peptide, fikobiliproteine (fikoeritrin i fikocijanin) i lektine. Ovi bioaktivni spojevi imaju mnoge zdravstvene prednosti, uključujući antihipertenzivne, antioksidativne, antidijabetičke, antiaterosklerozne, protuupalne, antitumorske, antimikrobne, antivirusne i neuroprotektivne učinke (Thiviya i sur., 2022.).

Cilj ovog rada je odrediti udio neesencijalnih i esencijalnih aminokiselina, njihov omjer, te udio bjelančevina odabranih vrsta smeđih morskih algi roda *Cystoseira*: *Cystoseira corniculata*, *Cystoseira compressa*, *Ericaria amentacea*, *Gongolaria barbata*, *Cystoseira spicata*, kako bi se mogao utvrditi njihov potencijal u prehrambenoj industriji, za poboljšanje hranjivih, teksturalnih i drugih aspekata kvalitete prehrambenih proizvoda.

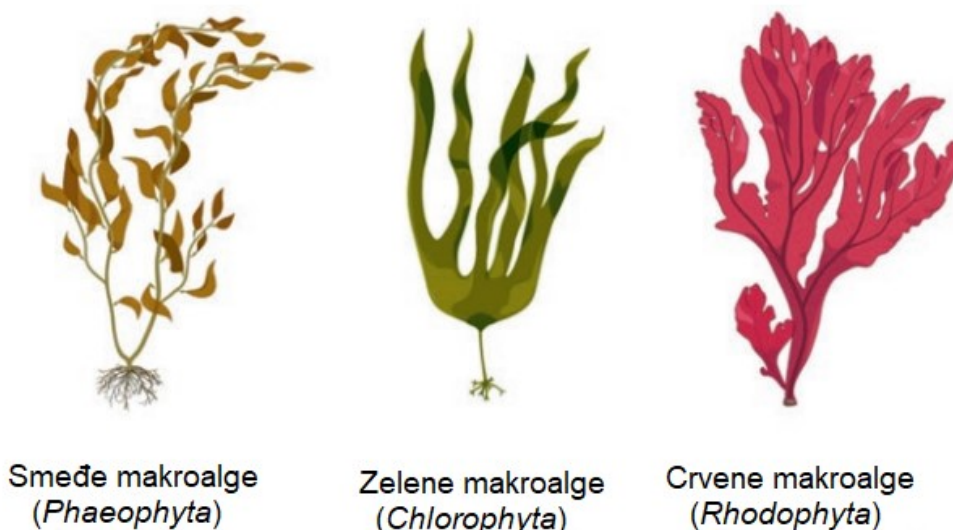
## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. MAKROALGE

Morske alge, poznate kao makroalge, heterogene su biljke koje rastu u slanim vodama i na čvrstim kamenim podlogama u dubinama od 180 m. Od davnina u zemljama istočne Azije, posebno u kineskoj i japanskoj kuhinji, makroalge su bile dio njihove svakodnevne prehrane, a migracijom stanovnika istočnoazijskih zemalja, makroalge su se uvele kao namirnica i u kuhinjama pojedinih dijelova Sjeverne i Južne Amerike. Također, kao hrana poslužile su i pomorcima diljem svijeta, i ljudima koji su živjeli uz obalu. Danas ih Zapadne zemlje iskorištavaju za dobivanje vrijednih polisaharida; agara, karagenana i alginata, kao sredstva za stabilizaciju, zgušnjavanje i želiranje u prehrambenoj industriji. Francuska je također odobrila njihovo uvođenje u ljudsku prehranu kao povrće i začini, što je otvorilo nove mogućnosti u prehrambenoj industriji europskih zemalja (Rao i Ravishankar, 2022.). Danas je globalna industrija makroalgi vrijedna više od 6 milijardi USD godišnje, od čega 85 % čine prehrambeni proizvodi, a dobiveni ekstrakti (karagenan, agar, alginat) čine gotovo 40 % svjetskog tržišta hidrokoloida. Posebnu pozornost potrošača su dobile zbog povećane privlačnosti prema održivim resursima, bogate nutritivne vrijednosti i dobrobiti za zdravlje, i upravo zbog toga se očekuje da će globalno tržište makroalgi porasti na 22,1 milijardu USD do 2024. godine, prema izvješću Seafood Source (Rao i Ravishankar, 2022.).

### 2.1.1. Klasifikacija makroalgi

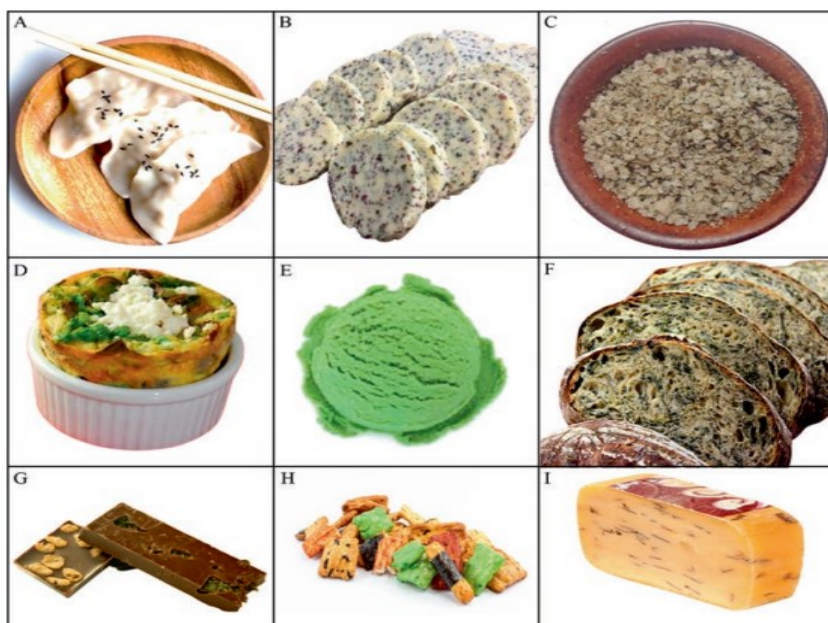
Morske alge dijele se na osnovu njihove fizičke veličine, a to su mikroalge i makroalge. Morske makroalge općenito se nazivaju morskim algama. Na temelju prisutnosti određenog fitopigmenta, morske alge klasificiraju se na crvene (*Rhodopyta*), smeđe (*Phaeophyta*) i zelene (*Chlorophyta*) alge (**Slika 1**). Osim na osnovu pigmentacije, morske alge mogu se podijeliti i na osnovu njihovog rezervnog polimera dobivenog fotosintezom (Rao i Ravishankar, 2022.). Crvene i zelene morske alge su uglavnom duljine od nekoliko centimetara do otprilike jednog metra, dok duljina smeđih algi može doseći od nekoliko centimetara do čak nekoliko metara. Prisutnost crvenih i plavih pigmenata, fikocijanina i fikoeritrina, odgovorni su za crvenu boju makroalgi, a budući da crvene makroalge imaju raznolik raspon biljnih oblika, te pokazuju različite životne cikluse, imaju široku raznolikost vrsta u odnosu na smeđe i zelene makroalge. Za smeđu boju makroalgi odgovorni su fuksoksantin i pigment feofitin, a kod zelenih makroalgi su to klorofil a i b, i zelene alge predstavljaju uobičajenu morsku travu koja se može uzgajati i u slatkoj i slanoj vodi (Rao i Ravishankar, 2022.).



**Slika 1** Podjela morskih alge na osnovu pigmentacije (Rao i Ravishankar, 2022.)

### **2.1.2. Primjena makroalgi**

Svojim bogatim nutritivnim sastavom makroalge su našle široku primjenu u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim industrijama, a budući da mogu povećati produktivnost farme bez negativnog utjecaja na okoliš, pronašle su mjesto i u poljoprivrednoj proizvodnji. Hvataju ugljik, dušik i fosfor, što znači da njihov uzgoj dovodi do smanjenja emisije CO<sub>2</sub>, i time se dokazuje održivo ulaganje (Rao i Ravishankar, 2022.). Ubrajaju se u tzv. “super hranu” zbog svojih iznimnih nutritivnih svojstava, jer predstavljaju kombinaciju niskokalorične hrane s visokom gustoćom hranjivih tvari. Upravo zbog toga, te sve veće svijesti potrošača o utjecaju prehrane na njihovo zdravlje, makroalge postaju važna namirnica u promicanju zdravlja potrošača. Mogu se jesti sirove, kuhane, pečene, tostirane, pasirane, sušene, u prahu ili pržene, same ili kombinirane s drugim toplim ili hladnim sastojcima. Smeđe morske alge se najviše koriste u ljudskoj prehrani (66,5 %), zatim ih slijede crvene morske alge (33 %), te zelene morske alge (5 %) (Rao i Ravishankar, 2022.). **Slika 2** predstavlja raznoliku primjenu makroalgi u pripremi jela.



**Slika 2** Primjena algi u pripremi jela (A-knedla od algi, B-maslac od algi, C-sol od algi, D-soufflé od algi, E-sladoleg od algi, F-kruh od algi, G-čokolada od algi, H-keksi od algi, I-sir od algi) (Rao i Ravishankar, 2022.)

Nutritivni sastav može varirati ovisno o vrsti alge, godišnjem dobu, mjestu uzgoja, klimatskim uvjetima, te tehnikama i vremenu skupljanja. Imaju visoku koncentraciju esencijalnih vitamina, elemenata u tragovima, proteina, lipida, enzima i minerala u usporedbi s biljkama s kopna (Rao i Ravishankar, 2022.). Zbog visokog sadržaja joda, konzumacijom algi može se osigurati dnevna potreba za jodom, a budući da su bogat izvor vitamina B skupine, posebice vitamina B1 i B12, nudi jednu od rijetkih vegetarijanskih alternativa za cijanokobalaminom (vitaminom B12). Jedini su održivi resursi za agar, alginat, karagenan, fukoidan, laminarin, ulvan, manitol, fukoksantin, florotanin i druge važne bioaktivne spojeve, koji se koriste za razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda koji poboljšavaju, nutritivna i teksturalna svojstva namirnice (Rao i Ravishankar, 2022.). Morske alge pronašle su primjenu kao prebiotici zahvaljujući polisaharidima koji se ne probavljaju u ljudskom probavnom traktu, stoga se mogu smatrati prehrambenim vlaknima. Sadržaj prehrambenih vlakana u jestivim morskim algama kreće se od 25 do 75 % suhe tvari, gdje sadržaj topivih vlakna varira od 50 do 85 % ukupnih prehrambenih vlakana (Kim, 2011.). Prehrana koja uključuje morske alge ima svoje zdravstvene dobrobiti ne samo kao prebiotici, već i kao probiotici, gdje se polisaharidi morskih algi koriste za zarobljavanje mikroba. Za mikrokapsulaciju bakterija najčešće se koristi kalcijev alginat, gdje se monomeri alginata povezuju kalcijevim ionima kroz vezanje uzastopnih blokova guluronske kiseline u obliku polimerne mreže. Mikrokapsulirane bakterije trebale bi tolerirati jako kisele i alkalne uvjete probavnog sustava putujući do debelog crijeva, kako bi ondje djelovale kao probiotici, a neprobavljivi polisaharidi

pružaju dobro zaštitu za bakterije od enzimskog djelovanja u ljudskom probavnom traktu (Kim, 2011.). Morske alge su jedne od najbogatijih izvora prirodnih antioksidansa. Nekoliko sulfatnih polisaharida pokazuje bolju antioksidacijsku aktivnost od komercijalno dostupnih sintetskih antioksidansa. Antioksidativna aktivnost sulfatnih polisaharida ovisi o sadržaju sulfata, poziciji sulfata, molekularnoj težini, vrsti, te o vrsti otapala za ekstrakciju. Polifenoli smeđih algi su snažniji antioksidansi s višenamjenskim antioksidacijskim djelovanjem od analognih polifenola dobivenih iz kopnenih biljaka. Osim sulfatiranih polisaharida i polifenola, antioksidacijsko djelovanje primjećeno je kod aminokiselina poput mikosporina (MAK), manitola, alkaloida, terpena, askorbinske kisleine, tokoferola i karotenoida, uključujući astaksantin i fukoksantin. Primjena navedenih spojeva s antioksidacijskim djelovanjem prirodnog podrijetla mogu se inkorporirati u namirnice kako bi se spriječili oksidacijski procesi kvarenja i poboljšala sigurnost hrane (Kim, 2011.). Alginati i karagenan se koriste kao fikokoloidi u raznim industrijama, uključujući prehrambenu industriju, zbog svojih svojstava, a to su: povećanje viskoznosti, sposobnost stvaranja gela, stabiliziranje vodenih masa, disperzija i emulzija. Koriste se za proizvodnju pića (voćni napitci, kava, kakao, čaj, mlijeko, alkoholna pića), mliječnih proizvoda (fermentirano mlijeko, mlijeko u prahu, jogurt, sladoled), deserta (puding i šerbeti), namaza (džem, marmelada, proizvodi od meda), konditorskih proizvoda (bomboni, keksi, biskviti, čokolada) i pekarskih proizvoda (kruh i peciva) (Kim, 2011.). Alginat i karagenan koriste se i za pripremu jestivih namaza, koji čine tanki sloj na površini proizvoda, i na taj način produljuju rok trajanja, sprečavaju gubitak vode i djeluju kao barijera za plinove i druge hlapljive spojeve (Theagarajan i sur., 2019.). Osim u prehrambenoj industriji, fikokoloidi morskih algi primjenjuju se i u kozmetičkoj industriji, kao zgušnjivač, i za održavanje pravilne teksture kozmetičkih proizvoda, što je potrebno za ravnomjernu raspodjelu aktivnih sastojaka (Kim, 2011.). Fukoidani dobiveni iz algi imaju višestruke uloge kao što su antioksidansi, inhibitori metaloproteinaze matriksa (MMP) i pojačivači sinteze prokolagena u prevenciji fotostarenja kože izazvanog UV zračenjem, povećavajući potencijalnu primjenu fukoidana kao kozmetičkih sredstava protiv fotostarenja. Nadalje, neke druge tvari kao što su karotenoidi, MAK i polifenoli, koji se proizvode kao sekundarni metaboliti u makroalgama, mogu se primijeniti kao sredstva za apsorpciju UV zraka i antioksidansi u kozmetičkoj industriji (Kim, 2011.). U poljoprivrednoj proizvodnji, primjena ekstrakta morske alge na usjevima pokazala je korisne učinke, kao što je rano klijanje i uspostava sjemena, poboljšani prinos, povećana otpornost na biotički i abiotički stres i produženi rok trajanja sirovina nakon žetve. Zbog svoje sposobnosti asimilacije hranjivih tvari, posebno dušika i fosfora, te drugih elemenata kao što su teški metali, mogu se koristiti za postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i integrirane akvakulturne sustave. Također, mogu se koristiti za proizvodnju biogoriva, bioetanol i biougljena (Kim, 2011.).



## 2.2. SMEDE MAKROALGE

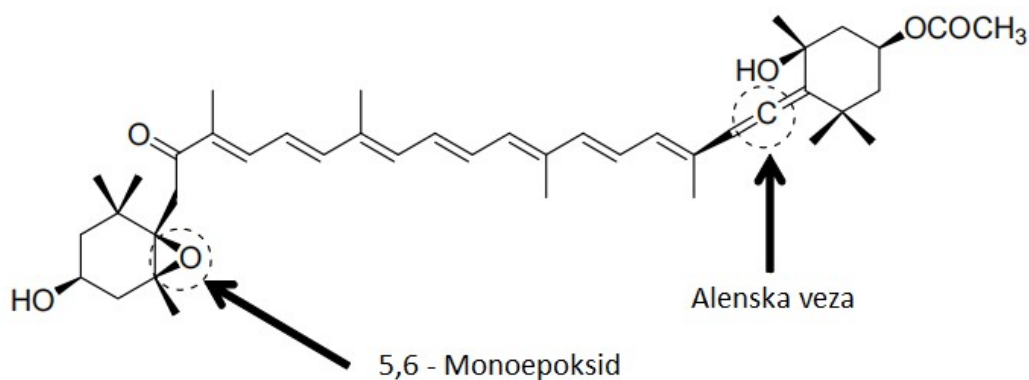
Razred *Phaeophyta* obuhvaća oko 265 rodova i 2040 vrsta raspotranjenih u hladnim do umjereno toplim vodama. Predstavljaju raznoliku grupu koja može varirati od malih nitastih do velikih složenih morskih algi (Aly i sur., 2023.). Uglavnom su morski organizmi, a samo je za nekoliko rodova poznato da obitavaju u slatkovodnim staništima (Kawai i Henry, 2017.). Oni su fotosintetski organizmi, glavni fotosintetski pigmenti su klorofili a i c, i fukoksantin, a proizvode i laminarin kao skladišni polisaharid. Sve vrste su višestanične, sa staničnom stijenkom koja se sastoji od alginata, fukoidana i celuloze, kroz koje prolaze plazmodezmijske (Kawai i Henry, 2017.). Do sada je otkriveno 13 - 17 redova smeđih algi: *Ascoseirales*, *Chordariales*, *Cutleriales*, *Desmarestiales*, *Dictyosiphonales*, *Dictyotales*, *Discosporangiales*, *Durvillaeales*, *Ectocarpales*, *Fucales*, *Laminariales*, *Ralfsiales*, *Scytosiphonales*, *Sphacelariales*, *Sporochneales*, *Syringodermatales*, i *Tilopteridales* (Kawai i Henry, 2017.). Istraživanje smeđih makroalgi posljednjih godina dobilo je veliku pozornost istraživača radi vrlo bitne značajke mnogih vrsta ovih makroalgi, to je snažna tolerancija na promjenu temperature i svjetlosne uvjete. Tijekom povijesti koristile su se kao izvor biomase za stočnu hranu u obalnim područjima sjeverne hemisfere, a danas se osim za stočnu hranu koriste kao namirnica za pripremu različitih jela, kao dodatak prehrani, te kao izvor bioaktivnih spojeva. Posjeduju veliki broj fitosastojaka i nutraceutika koji izazivaju niz bioloških aktivnosti, poput antimikrobnih, antioksidativnih, protuupalnih, citotoksičnih, hepatoprotektivnih i mnogih drugih (Aly i sur., 2023).

### 2.2.1. Kemijski sastav smeđih makroalgi

U smeđim algama, fukoksantin je dominantan karotenoid, posjeduje osebujnu strukturu zbog alenske veze, 5,6-monoepoksida, devet konjugiranih dvostrukih veza i acetilnih skupina vezanih za polienski lanac (**Slike 3 i 4**) (Din i sur., 2022.). Odgovoran je za smeđu boju ovih makroalgi, a feofitin a, derivat pigmenta klorofila a, za maslinasto-smeđu boju.



**Slika 3** Fukoksantin (Rao i Ravishankar, 2022.)

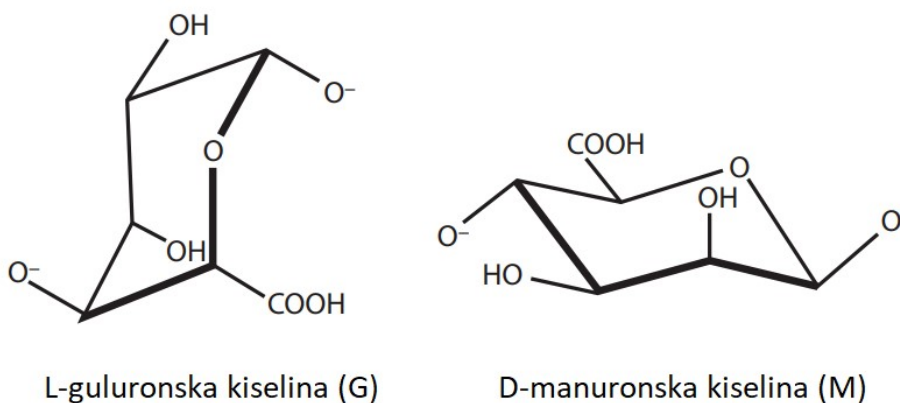


**Slika 4** Kemijska struktura fukoksantina (prilagođeno iz: Din i sur., 2022.)

Osim navedenih pigmentata, smeđe makroalge sadrže i  $\beta$ -karoten u manjim koncentracijama, te klorofil a, koji je odgovoran za fotosintezu, te klorofil c koji je služi kao pomoćni pigment (Rao i Ravishankar, 2022.). Fukoksantin je poznat po svojim terapijskim aktivnostima zbog čega se primjenjuje u hrani, kozmetici i lijekovima. Provedena su brojna istraživanja vezana za dodavanje ili ugradnju fukoksantina u hranu, koja pokazuju da na kvalitetu hrane formulirane s fukoksantinom utječe nekoliko aspekta, uključujući kemijski, organoleptički, bioraspoloživost i stabilnost, istraživanja pokazuju i da se funkcionalna hrana dobivena iz

fukoksantina može plasirati na tržište (Din i sur., 2022.). Također, ima i antioksidativno djelovanje za koje je odgovorna alenska veza (**Slika 4**), zbog čega fukoksantin sprječava rak jetre, kože, te indukcijom apoptoze inhibira rak dojke i prostate (Yesuraj i sur., 2022.). Može se zaključiti da je fukoksantin obećavajući karotenoid za upotrebu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

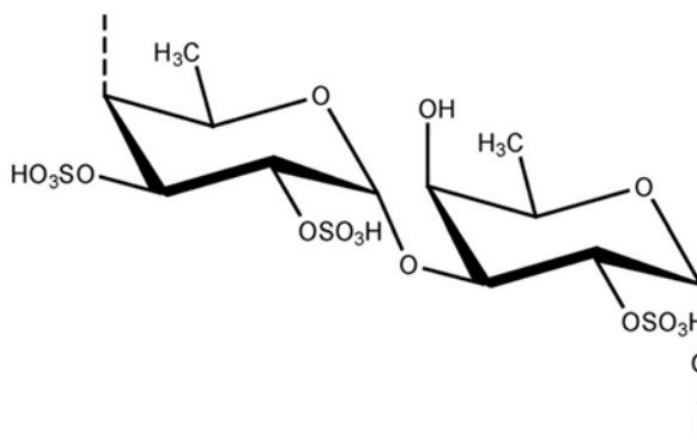
Polisahardi imaju važnu ulogu u algama, poput skladištenja i čuvanje energije, a služe kao i strukturne molekule, i uglavnom nastaju fotosintezom. Imaju značajnu bioaktivnost zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava (visoke razine fukoze, galaktoze, uronske kiseline, i sulfata). Najznačajniji polisaharidi u smeđim algama su sulfatni polisaharidi; aginati, fukoidini i laminarini, koji u svom sastavu imaju vezanu sulfatnu skupinu i djeluju kao dijetalna vlakna (Kim i sur., 2022.). Alginati su linearni biopolimeri 1,4-povezanih ostataka  $\beta$ -D-manuronske kiseline (M) i 1,4  $\alpha$ -L-guluronske kiseline (G) organizirani u homogene (poli-G, poli-M) ili heterogene (MG) uzorke poput blokova (**Slika 5**) (Liu i sur., 2022.).



**Slika 5** Struktura ALG monomera (L-guluronska kiselina i D-manuronska kiselina) (Liu, i sur., 2022)

U smeđim algama polisaharidi se proizvode kao skeletna komponenta staničnih stijenki, čineći 40 % suhe tvari. Imaju stabilnu strukturu, netoksični su, biorazgradljivi, i biokompatibilni, te se danas zbog svojih spomenutih svojstava primjenjuje u biomedicini (zavoji za rane, tablete i u stomatologiji), u prehrambenoj industriji (u proizvodnji sladoleda, želea, mliječnih napitaka, piva), za proizvodnju stočne hrane, tekstilnoj industriji, proizvodnji papira, kozmetičkoj industriji, te za pročišćavanje otpadnih voda i kemikalija. Imaju visoku primjenu u industrijama zbog sposobnosti zadržavanja vode, svojstva geliranja, viskozifikacije i stabilizacije (Vijayalakshmi i sur., 2017.). Koriste se i za proizvodnju biopolimera za pakiranje hrane, imaju dobro svojstvo stvaranja filma, i pomažu u zadržavanju vlage, a poboljšavaju i senzorska svojstva prehrambenih proizvoda. Alginatni premazi mogu smanjiti broj mikroorganizama i usporiti oksidativne reakcije kojima nastaju neželjeni produkti koji utječu na okus proizvoda (Theagarajan i sur., 2019.). Glavni lanac fukoidana

prvenstveno se sastoji od  $\alpha$ -(1,3)- i/ili  $\beta$ -(1,4)-povezane fukoze i C-2, C-4 i/ili C-3 položaja na ostatku L-fukoze jednostavno su supstituirani sulfatom (**Slika 6**) (Yesuraj i sur., 2022.).



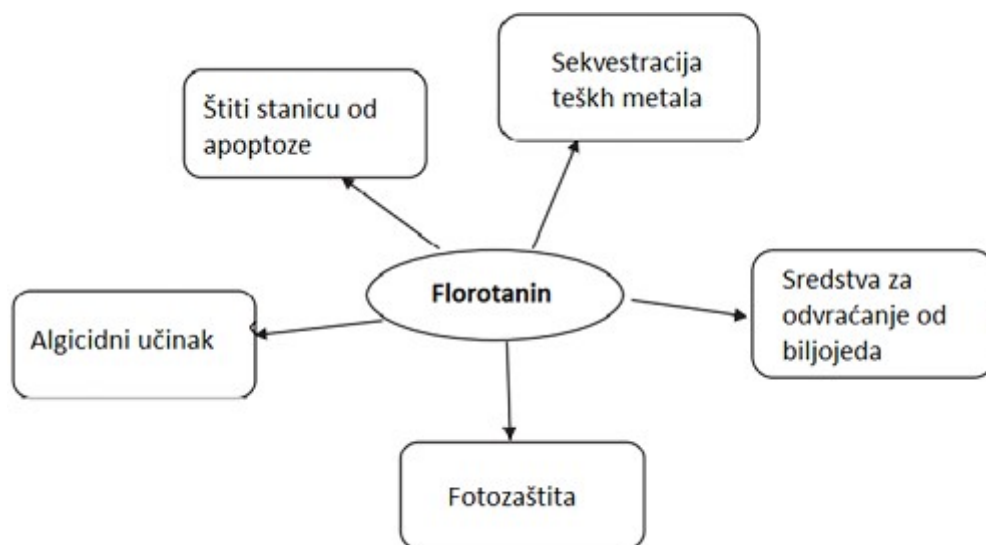
**Slika 6** Kemijska struktura fukoidana (Yesuraj i sur., 2022.)

Sa svojom složenom strukturom, i svojstvima koji promiču zdravlje, fukoidani pokazuju brojna terapijska djelovanja, poput smanjenja razine kolesterola, prevencije raka i druge biološke aktivnosti (antitrombotičko, antivirusno i antiinflamatorno djelovanje). Na prevenciju raka djeluje na način da induciraju citotoksičnost različitih stanica raka, induciraju apoptozu i inhibiraju invaziju, metastaze i angiogenezu stanica raka (Kalimuthu i Kim, 2015.). Također, koriste se u kozmetičkoj industriji zbog dobrog hidratantnog učinka, te izraženog protuupalnog i regenerirajućeg učinka (Ptak i Fretté, 2021.). Laminaran je  $\beta$ -glukan niske molekularne težine (približno 20-30 glukozilnih ostataka), sastavljen od  $\beta$ -1,3-povezanih D-glukopiranoznih jedinica. Ima antioksidativno, protuupalno, i antikoagulacijsko djelovanje, zahvaljujući navedenim biološkim potencijalom predstavlja dobar potencijal za formuliranje funkcionalne hrane, kozmetičkih preparata i nutraceutika (Yesuraj i sur., 2022.).

Morske alge sadrže visok udio pepala, a u smeđim morskim algama udio pepela kreće se od 20,71 % do 42,40 % (Rao i Ravishankar, 2022.). Minerali koju se mogu pronaći u smeđim algama u dovoljnim količinama su kalcij, magnezij, željezo, natrij, kalij, bakar, cink, jod, fosfor, i mangan (Kim i sur., 2022.). Morske alge u najvećim količinama sadrže mineral jod, ali ga u smeđim algama ima nešto više u odnosu na crvene i zelene morske alge (Rao i Ravishankar, 2022.). Dobar su izvor vitamina E (tokoferola), vitamina B, posebno vitamina B1 i B12, te vitamina A.

Polifenoli su sekundarni metaboliti smeđih algi, kao i terpenoidi, steroli, alkaloidi, flavonoidi i tanini (Aly i sur., 2023.). Jedan od najvažnijih polifenola je florotanin, koji ima snažni antioksidativni potencijal jer posjeduje izrazito hidrofilne komponente i OH skupine koje mogu stvarati vodikove veze s molekulama vode (Kim i sur., 2022.). Izravno sudjeluju u

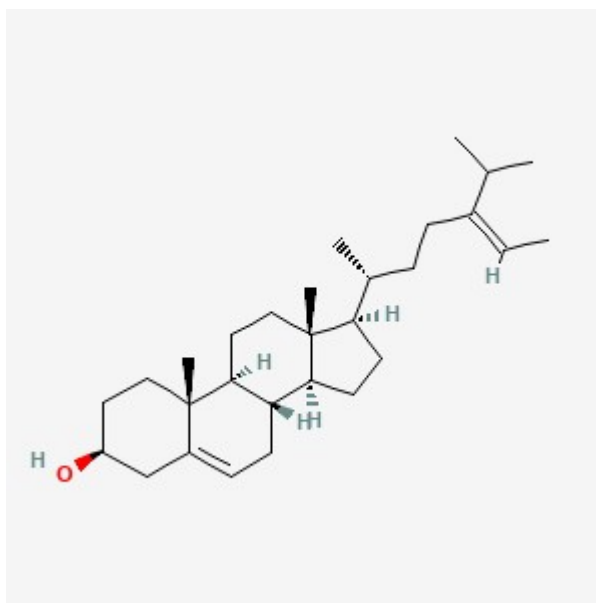
sekvestraciji teških metala, posebno iona dvovalentnih metala kao što su cirkonij, magnezij, kalcij, mangan, kobalt, cink, kadmij, bakar, olovo i nikal, a imaju i druga funkcionalna svojstva (**Slika 7**). Također, pokazuje supresivnu aktivnost prema *tert*-butil hidroperoksidom induciranom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva u epitelnim stanicama i lipopolisaharidima induciranom faktorom nekroze tumora alfa i oslobađanjem interleukina 6 u makrofagima. Florotanin pojačava nuklearnu aktivnost proteina sirtuin 1 (SIRT1) epitelnih stanica. Time pridonosi njegovoj uporabi u topikalnim terapijskim formulacijama protiv starenja, kao i u dermatologiji, kozmetologiji i oftalmologiji (Kim i sur., 2022.).



**Slika 7** Funkcionalna svojstva florotanina (Kim i sur., 2022.)

Morske alge se smatraju niskokaloričnom hranom, imaju visoke količine nutritivno važnih polinezasićenih masnih kiselina (PUFA), kao što je linolna kiselina, linolenska kiselina, arahidonska kiselina, eikosapentaenska kiselina (EPA), i dokozaheksaenska kiselina (DHA). U smeđim morskim algama PUFA su najdominantnije masne kiseline čiji je udio kreće u rasponu od 43,47 % do 48,19 %, zbog čega alge postaju potencijalni alterantivni izvor istih. Slijede ih zasićene masne kiseline (SFA) i mononezasićene masne kiseline (MUFA). Polinezasićene masne kiseline, posebno  $\omega$ -3 masne kiseline (EPA i DHA) mogu sniziti LDL-kolesterol i smanjiti rizik od koronarnih bolesti srca. Također, sadrže i esencijalne masne kiseline, koje naš organizam ne može sam sintetizirati, već ih moramo unositi putem hrane (Yesuraj i sur., 2022.). Vrlo važna skupina lipida u smeđim morskim algama su i steroli, koji mogu biti esterificirani s masnim kiselinama ili uključeni u glikozirane konjugate. U smeđim morskim algama značajan je fukosterol (**Slika 8**), koji je poznat po svojim različitim korisnim biološkim aktivnostima, i po velikoj raznolikosti jedinstvenih spojeva fitosterola, kao što su brasikasterol, sitosterol i stigmasterol (Matanić, 2018.; Kim i sur., 2022.). Na temu primjene

lipida u proizvodnji biodizela, provedena su brojna istraživanja čiji su se rezultati pokazali pozitivni i korisni, zbog čega je industrija biodizela postala brzo rastuća, čak i na globalnoj razini.

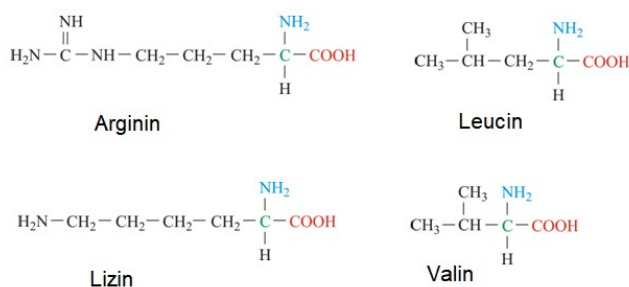


**Slika 8** Kemijska struktura fukosterola (Web1)

### 2.2.2. Proteini i aminokiseline u smeđim makrolagama

Svaka  $\alpha$ -aminokiselina se sastoji od središnjeg ugljikovog atoma ( $\alpha$ -ugljik), na koji su vezani amino-skupina, karboksilna skupina, vodikov atom, te specifična skupina R, koja se naziva bočni ogranak. Zbog četiri različite skupine vezane na središnji ugljikov atom,  $\alpha$ -aminokiseline su kiralne molekule, odnosno mogu postojati u dvama zrcalno simetričnim oblicima, kao L-izomeri i D-izomeri. Bočni ogranci razlikuju se oblikom, veličinom, nabojem, kemijskom reaktivnošću i sposobnošću stvaranja vodikovih veza (Zdjelarević, 2022.). U prirodi postoji 100-tinjak različitih aminokiselina koje se dijele na  $\alpha$ ,  $\beta$  ili  $\gamma$ -aminokiseline obzirom na položaj amino skupine u odnosu na karboksilnu skupinu. 20 standardnih  $\alpha$ -aminokiselina se ugrađuje u proteine peptidnom vezom. Od 20 standardnih  $\alpha$ -aminokiselina, njih 9 su esencijalne aminokiseline, što znači da ih naš organizam ne može sam sintetizirati, već ih moramo unositi putem hrane, a to su fenilalanin, metionin, valin, leucin, izoleucin, triptofan, treonin, lizin i histidin (Zdjelarević, 2022). Proteini su kompleksni organski spojevi, koji nastaju povezivanjem aminokiselina peptidnim vezama, formirane između  $\alpha$ -amidnih i  $\alpha$ -karboksilnih skupina susjednih aminokiselina. Polipeptidni lanac koji nastaje međusobnim povezivanjem aminokiselina peptidnom vezom u procesu translacije ima svoju trodimenzionalnu strukturu, što znači da dolazi do uvijanja lanca u prostoru, a to nazivamo

konformacijom proteina. U sklopu proteinske molekule razlikujemo primarnu (slijed aminokiselina u proteinu), sekundarnu (lokalno uvijanje polipeptidnog lanca nastalog zbog vodikovih veza između amino i karboksilnih skupina u okosnici polipeptidnog lanca), tercijarnu (interakcija i prostorni raspored bočnih ogranaka u polipeptidnom lancu) i kvarternu strukturu (posjeduju samo proteini građeni od više polipeptidnih lanaca, a veze nastaju između bočnih ogranaka podjedinica proteina). Proteini su prisutni u algama u različitim oblicima i na različitim mjestima kao komponente staničnih stijenki, kao enzimi i vezani za pigmente i ugljikohidrate. Osim standardnih  $\alpha$ -aminokiselina neke vrste morskih algi sadrže neuobičajne aminokiseline i spojeve slične aminokiselinama, kao što su  $\gamma$ -homocisteinska kiselina, aminomaslačna kiselina, ornitin, citrulin, hidroksiprolin, taurin i kainska kiselina. U smeđim morskim algama u većim količinama se nalazi fosfoferin, ester serina i fosforne kiseline koji nastaje kao rezultat posttranslacijske modifikacije proteina (Domínguez, 2013). Morske alge sadrže do 47 % proteina, što je blizu sadržaja proteina tradicionalnih izvora proteina kao što su meso, jaja, soja i mlijeko (Thiviya i sur., 2022.). Smeđe makroalge imaju niži sadržaj proteina ( $3 \pm 15$  % suhe tvari) u odnosu na crvene i zelene alge, ali imaju viši udio kiselih aminokiselina (Glu i Asp) (Yada, 2018.; Rao i Ravishankar, 2022.). Kvaliteta proteina može se odrediti sastavom aminokiselina (udjelom ili omjerima), probavljivošću i bioraspoloživošću (Thiviya i sur., 2022.). U svom istraživanju Yada (2018.) je objavio da se udio aminokiselina kreće od 18 % do 44 % u makroalgama *Fucus* sp., *Sargassum* sp., *Laminaria digitata* i *Ascophyllum nodosum*. U smeđim morskim algama zastupljenije aminokiseline bile su alanin i glutamin ili glutaminska kiselina, dok  $\beta$ -alanin, citrulin, histidin i metion nisu uopće prisutni ili su se nalaze u tragovima. Alge roda *Undaria* sp. u većim količinama sadrže alanin, glicin i prolin. U algi *Eisenia bicyclis* zastupljenije su sljedeće aminokiseline: arginin, asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, glicin, alanin, valin i leucin. **Slika 9** prikazuje kemijske strukture najzastupljenijih esencijalnih aminokiselina u smeđim morskim algama, a to su arginin (esencijalna aminokiselina za djecu), leucin, lizin i valin (Yada, 2018.).



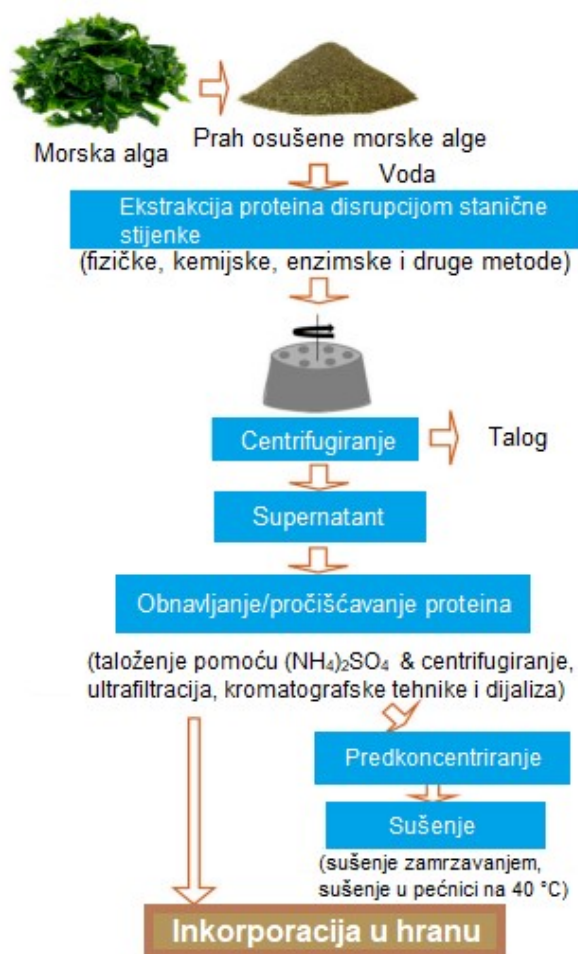
**Slika 9** Kemijska struktura amonikiselina arginin, leucin, lizin i valin (Web2)

Aminokiseline su vrlo važne za zdravlje obzirom da obavljaju važne zadaće u ljudskom organizmu: služe kao esencijalni prekursori za sintezu tvari niske molekularne težine (npr. NO, poliamini, glutation, kreatin, karnitin, karnozin, hormoni štitnjače, serotonin, melatonin, melatonin i hem) s ogromnim fiziološkim ulogama, uključujući regulaciju transporta nutrijenata i metabolizam, međustaničnu komunikaciju, ekspresiju gena, fosforilaciju proteina, antioksidativnu obranu, imunološku funkciju, reprodukciju, laktaciju, fetalni i postnatalni rast i razvoj, regeneraciju tkiva, neurotransmisiju, acidobaznu ravnotežu, homeostazu, rast crijevnih mikroba i metabolizam (Thiviya i sur., 2022.).

Identificirane su i jodaminokiseline kao što su monojodtirozin (MIT), dijodtirozin (DIT), trijodtironin (T3) i tiroksin (T4). T3 i T4 isti su hormoni koje proizvodi štitnjača koja ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma i imaju značajnu ulogu u Graveovoj bolesti i Hashimotovom tireoiditisu, što znači da jodoaminokiseline iz smeđih algi mogu utjecati na rad štitnjače i pridonijeti tradicionalno promatranim farmakološkim učincima kod bolesti štitnjače (Domínguez, 2013.). Prisutnost nekih slobodnih rijetkih aminokiseline kao što je taurin u raznim morskim algama može biti dodatni poticaj za razvoj ekstrakata algi za ljudsku prehranu. U smeđim algama *Undaria pinnatifida* i *Sargassum confasum*, sadržaj aminokiseline taurina iznosi 11,8 mg/100 g suhe tvari, odnosno 9,7 mg/100 g suhe tvari (Yada, 2018.). Na aminokiselinski sastav utječu različiti čimbenici, kao što su vrsta alge, metoda očuvanja, metoda ekstrakcije, sezonske varijacije i okoliš u kojem rastu. Omjeri koji se određuju su omjer esencijalnih prema neesencijalnim aminokiselinama ili ukupnim aminokiselinama (EAK/NEAK ili EAK/ukupne AK). Omjer EAK/NEAK koristi se za procjenu distribucije aminokiseline u proteinima morskih algi (Thiviya i sur., 2022.). Na prehranenu vrijednost proteina osim aminokiselinskog profila utječe i probavljivost proteina. Na probavljivost proteina utječu određeni fizički, fermentacijski i enzimski procesi. Protein može imati nižu hranjivu vrijednost ako je probavljivost niska zbog slabe raspoloživosti, stoga je bioraspoloživost proteina bitan čimbenik u određivanju kvalitete proteina, a može se opisati kao stupanj do kojeg se aminokiseline ili mali peptidi iz testiranog proteina apsorbiraju i transportiraju kroz cijevnu membranu konzumenta (Thiviya i sur., 2022.). Probavljivost proteina može se odrediti in vivo i in vitro metodama. In vivo metoda temelji se mjerenju količine apsorbiranog dušika (razlika između unosa dušika i dušika iz prikupljenog iz fecesa), a in vitro metoda uključuje korištenje proteolitičkih enzima kao što su pepsin, tripsin, kimotripsin, ili mješavina ovih enzima (Thiviya i sur., 2022.). Iako morske alge sadrže veću količinu proteina, inhibicijski učinak spojeva makroalgi poput glikoproteina i drugih antinutritivnih čimbenika (fenolnih spojeva i polisaharida) smanjuje probavljivost. Polisaharidi, posebno topiva vlakna i njihova interakcija s proteinima ili proteolitičkim enzimima smanjuje hidrolizu proteina u morskim algama (Thiviya i sur., 2022.). Na probavljivost proteina smeđih



morskih algi dokazano utječu fizički učinci, poput sušenja i liofilizacije (sušenje zamrzavanjem) (Yada, 2018.). Zbog visokog sadržaja fenola u smeđim morskim algama (katehin, flavanoli i florotanin), dostupnost proteina in vivo bi mogla biti ograničena, što nije slučaj kod crvenih i zelenih morskih algi, koje imaju niži udio polifenola i viši sadržaj proteina (Domínguez, 2013.). Polifenoli, poput polisaharida imaju inhibitorni učinak na aktivnost enzima pepsin što utječe na smanjenu dostupnost i probavljivost proteina (Yada, 2018.). In vitro metode daju samo približnu procjenu probavljivosti proteina, dok in vivo metoda služi za točno predviđanje nutritivne vrijednosti proteina (Thiviya i sur., 2022.). Sadržaj i kvaliteta proteina, te aminokiselinski sastav ovise o vrsti alge, životnom ciklusu, godišnjim dobima i okolišnim čimbenicima (Domínguez, 2013.; Sangeetha i Thangadurai, 2023.). Dokazani su utjecaji saliniteta na razinu pojedinih aminokiselina, u slatkovodnom soju njihova razina je bila viša u usporedbi s morskim sojem, i zabilježen je porast amonijaka i nitrata u aminokiselinskom sastavu. Također, zabilježen je porast sadržaja proteina zimi, što je povezano sa zrelošću algi (Domínguez, 2013.). Kako bi se poboljšala probavljivost proteina potrebno je ekstrahirati proteine iz morskih algi. Protein se može ekstrahirati iz praha osušene morske alge konvecionalnim ili klasičnim metodama, uključujući fizičke, kemijske, enzimske metode, ili se protein može izdvojiti centrifugiranjem ili filtracijom. Otopljeni protein može se dobiti različitim tehnikama obnavljanja i pročišćavanja, kao što su ultrafiltracija, kromatografske tehnike, dijaliza i/ili taloženje pomoću amonijevog sulfata ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), a nakon taloženja slijedi centrifugiranje. Proteini visoke čistoće nisu potrebni za proizvodnju hrane i stočne hrane, ali su neophodni za razvoj funkcionalne hrane, a glavna tehnika pročišćavanja je kromatografija. Ekstrahirani proteini mogu se sačuvati tehnikama predkoncentriranja i sušenja (sušenje smrzanjem i sušenjem na 40°C) (Thiviya i sur., 2022.). **Slika 10** prikazuje osnovne korake ekstrakcije proteina iz morske alge.



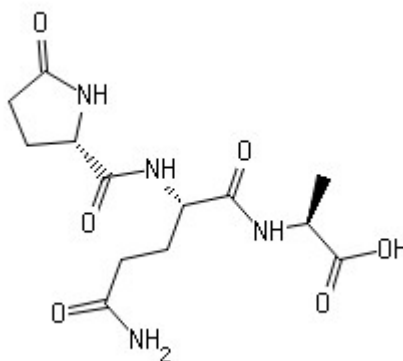
**Slika 10** Osnovni koraci uključeni u ekstrakciju proteina iz morske alge (Thiviya i sur., 2022.)

Unatoč niskom sadržaju proteina u smeđim algama, ova frakcija predstavlja zanimljive molekule kao što su peptidi i slobodne aminokiseline s atraktivnim biološkim djelovanjima. Bioaktivni peptidi smeđih algi obično sadrže 3 - 16 aminokiselinskih ostataka i pokazuju različite biološke aktivnosti, uključujući antioksidativne, antihipertenzivne (ACE inhibitore) i imunomodulatorne učinke (Kim i sur., 2022.). Također, pokazuju antitumorsko, antimikrobno, antivirusno, antikoagulacijsko, antitrombotičko, prebiotičko, hipokolesterolemično, inhibitorno djelovanje na tirozinazu, vežu minerale, te imaju funkciju antidijabetika (Thiviya i sur., 2022.). Sažetak nekih proteinskih molekula iz smeđih algi i njihove biološke aktivnosti prikazani su u **Tablici 1.**

**Tablica 1** Biološke aktivnosti proteinskih molekula iz smeđih morskih algi (Domínguez, 2013.)

Smeđa makroalga	Molekula	Sekvenca aminokiseline	Svojstva
<b>19 vrsta smeđih makroalgi</b>	Hidrolizati		Inhibitorna aktivnost ACE, smanjenje kolesterola u plazmi/jetri
<b><i>Analipus japoniaus</i></b>	Pentapeptid: analipin	Glutaminska kiselina, Asparaginska kiselina ili njihovi amidi	
<b><i>Eisenia bicyclis</i></b>	Eisenin	L-pyroGlu-L-Gln-L-Ala	Imunološka aktivnost za povećanje prirodne citotoksičnosti limfocita periferne krvi u ljudi
<b><i>Laminaria angustata</i></b>	Aminokiselina	Laminin	Hipotenzivni učinak, može potisnuti kontrakciju glatkih mišića
<b><i>Sargassum pallidum</i></b>	Dipeptidi	Aurantiamid, Aurantiamid acetat, Dia-aurantiamid	Antibiotska aktivnost <i>in vitro</i> protiv <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b><i>Sargassum thunbergii</i></b>	Jodoaminokiseline: MIT, DIT, T3, T4	MIT, DIT >> T3, T4	Pomaže kod funkcioniranja štitnjače
<b><i>Undaria pinnatifida</i></b>	Dipeptidi	Tyr-His, Lys-Trp, Lys-Tyr, Lys-Phe, Phe-Tyr; Val-Trp, Val-Phe, Ile-Tyr, Ile-Trp, Val-Tyr	Antihipertenzivno djelovanje (inhibicija enzima koji pretvara angiotenzin I, ACE)
	Dipeptidi	Val-Tyr, Ile-Tyr, Ala-Trp, Phe-Tyr, Val-Trp, Ile-Trp, Leu-Trp	Inhibicija ACE
	Tetrapeptidi	Ala-Ile-Tyr-Lys, Tyr-Lys-Tyr-Tyr, Lys-Phe-Tyr-Gly, Tyr-Asn-Lys-Leu	Inhibicija ACE

Eisenin izoliran iz *Eisenia bicyclis*, je tripeptid koji pokazuje imunološku aktivnost za povećanje prirodne citotoksičnosti perifernih krvnih limfocita kod ljudi. Za povećanje citotoksičnosti odgovorna je kemijska struktura aminokiseline eisenina, struktura L-piroglutaminske kiseline i L-alanina prikazana na **Slici 11** (Kojima i sur., 1993.).



**Slika 11** Kemijska struktura aminokiseline eisenina (Web3)

Laminin, bazična aminokiselina slična kolinu izolirana iz alge *Chondria armata*, može potisnuti kontrakciju uzbuđenih glatkih mišića, dok se pokazalo da laminin monocitrat ima prolazni hipotenzivni učinak (Domínguez, 2013.). Peptidni hidrolizati, pojedini dipeptidi i tetrapeptidi makroalgi inhibiraju ACE. ACE je ključni enzim u sustavu renin-angiotenzina (RAS) koji ima ključnu ulogu u regulaciji perifernog krvnog tlaka, stoga je inhibicija ACE jedan od ključnih terapijskih pristupa u liječenju hipertenzije. Upravo zbog svih navedenih bioloških aktivnosti, proteini smeđih morskih alge i njegove bioaktivne komponente, uključujući slobodne aminokiseline, i peptide, koriste se u posljednjem desetljeću za razvoj nove visokovrijedne funkcionalne hrane zbog sve veće svijesti potrošača o važnosti unosa bioaktivnih sastojaka za njihovu prehranu i zdravlje.

### 2.3. ROD CYSTOSEIRA

*Cystoseira* je rod smeđih algi iz porodice *Sargassaceae* i reda *Fucales* (Kawai i Henry, 2017.). Sastoji se od 45 vrsta, od kojih je većina endemična u Sredozemnom moru, čak 19 od 29 zastupljenih vrsta (Amico, 1995.). To je rod sa svjetskom distribucijom od oko 80 % vrsta koje se javljaju duž mediteranske i susjedne atlantske obale, a nalazi se uglavnom u subtropskim područjima, s najvećom koncentracijom na Mediteranu (Amico, 1995.). Alge roda *Cystoseira* obitavaju na stjenovitim podlogama inflaratorne zone gdje imaju važnu ekološku ulogu u pružanju staništa, hrane i skloništa za razne organizme, a kako su osjetljive na utjecaje izazvane djelovanjem čovjeka, identificirane su kao pouzdani ekološki pokazatelji (Katić, 2022.; Amico i sur., 1997.; Amico, 1995.). Međutim, posljednjih godina alge iz roda *Cystoseira* su značajno smanjene ili nestale zbog uništavanja staništa, onečišćenja i eutrofikacije Sredozemlja nastale prirodnim i antropogenim djelovanjem, zbog čega su mediteranske vrste ovog roda zaštićene Barcelonskom konvencijom (Bruno de Sousa i sur., 2019.). Bogate su ugljikohidratima, proteinima, mineralima, uljima i mastima, kao i

bioaktivnim komponentama (polifenoli, tokoferoli, vitamin C) te pigmentima karotenoidima (karoten i kasntofil), klorofilom i fikobilinima (fikocijanin i fikoeritrin). Imaju pozitivno djelovanje na zdravlja čovjeka jer sadrže polisaharide, koji su kao izvori vlakana vrlo bitnih u regulaciji prehrane (Michalak i Chojnacka, 2015.). U prehrambenoj industriji, makroalge ovog roda koriste se kao punila, sredstva za zgušnjavanje, također mogu se koristiti i kao stabilizatori, a dokazana su i prebiotička svojstva. U farmaceutskoj industriji značajnu primjenu imaju steroli, odnosno fitosteroli koji se koriste za proizvodnju lijekova, funkcionalnih proizvoda i kozmetike (Michalak i Chojnacka, 2015.).

### **2.3.1. *Cystoseira corniculata***

Ova vrsta raste na dubinama od 1,5 metara i karakteristična je za istočna Sredozemna mora (Baggini i sur., 2014.). Alga je na osnovi pričvršćena za male široke ovalne ili okruglaste i kompaktne bazalne pločice. Iz pločice raste debelo krivudavo stablo, koje ostaje u cijeloj dužini podjednako tanko te se ne udiže uvis nego ostaje trajno povaljano na osnovi, za raziku od ostalih jadranskih oblika, koji uvijek imaju po jednu ili više uspravih stabala. Povaljano stablo je kratko i iz njega rastu postrane stablove grane, koje su okomito na stablu smještene i u svemu se ravnaju kao glavno stablo (Ercegović, 1952.). Boja talusa je smeđe-maslinaste do zeleno-maslinaste boje (Grgić, 2023.). Osjetljiva je na antropogeni utjecaj, degradirana područja, slabo osvjetljenje, prebrzi pad temperature i snažno kretanje morskih masa (**Slika 12**) (Baggini i sur., 2014.)



**Slika 12** *Cystoseira corniculata* (Web4)

### 2.3.2. *Cystoseira compressa*

Vrsta *C. compressa* jedna je od najrasprostranjenijih algi u Jadranskom moru (Šarić, 2022). Ima vrpčasto spljošteni oblik s razgranatim rastom, te sadrži spremnike s grupiranim ogranelima konceptakulama koje sadrže reproduksijske organe, a prosječna veličina ove vrste iznosi 15-30 cm (Markulinčić, 2022.; Šarić, 2022.). Morfologija ovisi o godišnjem dobu, u zimi poprima oblik rozete s kratkim granama, a u proljeće bujniji oblik sa raširenim uspravnim granama (Markulinčić, 2022.). Poput drugih morskih algi karakterizira je povoljan kemijski sastav za ljudsku prehranu budući da je bogata mineralima, vlaknima te ima povoljan omjer  $\omega$ -3 i  $\omega$ -6 masnih kiselina, kao i odnos natrija i kalija (**Slika 13**) (Šarić, 2022.).



**Slika 13** *Cystoseira compressa* (Web4)

### 2.3.3. *Ericaria amentacea*

Vrsta *E. amentacea* je vrlo niska alga, može rasti do 15 cm visine, vrlo gusto raste, žučkaste je boje i bodljikavog izgleda, nalik sukulentnoj biljci. Raste u skupinama, s vrlo velikim uporištem s brojnim, čvrsto zbijenim osovinama. Plodna je u proljeće i rano ljeto. Ove vrsta raste u međuplimnim i plitkim subplimnim staništima, povremeno u dubljim područjima (do 10 m), ali u drugom, višem obliku (**Slika 14**) (Web4).



**Slika 14** *Ericaria amentacea* (Web4)

#### **2.3.4. *Gongolaria barbata***

Visoka, tamnosmeđa alga koja podsjeća na stablo, može narasti do 1 m visine. Grane su cilindrične i dobro razvijene, ali sve se gube tijekom razdoblja estivacije od ljeta do jeseni. Plodna od zime do ranog ljeta. Preferira plitke subplimna staništa, rijetko raste u dubljim područjima (do 40m) (Web4). Prihvaća se za podlogu čvrstom bazom iz koje izlazi više cilindričnih grana na kojima se nalaze ovalne ili okrugle aerociste koje služe za održavanje vertikalne pozicije u vodi (**Slika 15**) (Dobroslavić, 2020).



**Slika 15** *Gongolaria barbata* (Web4)

### 2.3.5. *Cystoseira spicata*

Na osnovi pričvršćena pomoću puzajućeg stabla, koje se sastoji od nešto spljoštenih grana. Grane se susreću i sraščuju u pločicu prihvatiljku, koja nije potpuno kompaktna i obično je tako čvrsto prirasta uz podlogu da se od nje ne može odvojiti u cjelini (Ercegović, 1952.). Karakterisitčna je po tome što što u ljetnom periodu otpušta dijelove i zaostaje samo kratko stablo. Nalazi se u izobilju u obalnim područjima Boke Kotarske i Crne Gore (**Slika 16**) (Stanojković i sur., 2014).



**Slika 16** *Cystoseira spicata* (Web5)



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj diplomskog rada bio je ispitati sadržaj proteina i pojedinačnih aminokiselina u smeđim makroalgama: *Cystoseira corniculata*, *Cystoseira compressa*, *Ericaria amentacea*, *Gongolaria barbata*, *Cystoseira spicata*, u svrhu mogućnosti njihove primjene u proizvodnji prehrambenih, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda.

Zadatak rada je uključivao pripremu uzorka pojedine makroalge, derivatizaciju i HPLC metodu za identifikaciju i kvantifikaciju aminokiselina, te određivanje udjela bjelančevina metodom po Kjeldahl-u.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Uzorci makroalgi

- *Cystoseira corniculata* (Turner) Zanardini izronjena je u uvali Luka na Dugom Otoku (43°58'54" N; 15°05'37" E) u srpnju 2021. godine, na dubini od 8 m, temperaturi mora 24°C i salinitetu 38 ‰;
- *Cystoseira compressa* (Esper) Gerloff & Nizamuddin izronjena je u Zadru, na lokaciji Kolovare II (44°07'00" N; 15°14'00" E) u ožujku 2021. godine, na dubini od 0,5 m, temperaturi mora 13°C i salinitetu 38 ‰;
- *Ericaria amentacea* (C. Agardh) Molinari & Guiry (ex. *Cystoseira amentacea*) izronjena je na pučinskoj strani Dugog Otoka, 1 km sjeverozapadno od uvale Brbišćica (44°03'16" N; 14°59'14" E) u travnju 2021. godine, na dubini od 0,5 m, temperaturi mora 16°C i salinitetu 38 ‰;
- *Gongolaria barbata* (Stackhouse) Kuntze (ex. *Cystoseira barbata*) izronjena je u Šepurinama kraj Zadra (44°12'42" N; 15°09'23" E) u studenom 2020. godine, na dubini od 6-7 m, temperaturi mora 17°C i salinitetu 38 ‰;
- *Cystoseira spicata* Ercegovic izronjena je pučinskoj strani Dugog Otoka, 1 km sjeverozapadno od uvale Brbišćica (44°03'16" N; 14°59'14" E) u svibnju 2021. godine, na dubini od 0,5 m, temperaturi mora 18°C i salinitetu 38 ‰

#### 3.2.2. Kemikalije

Za postupak derivatizacije korišteni su borna kiselina (GRAM-MOL, Hrvatska) za pripremu boratnog pufera, 9-fluorenil metil kloroformat (FMOC) (Sigma-Aldrich, SAD) i acetonitril (J.T. Baker, Nizozemska) za pripremu FMOC reagensa, a za pripremu OPA reagensa korišteni su 3-merkaptopropionska kiselina (3-MPA) (Sigma-Aldrich, SAD), o-ftaldialdehid (Sigma-

Aldrich, SAD) i metanol (J.T. Baker, Nizozemska). Kao mobilna faza za provedbu HPLC metode korištena su dva eluenta: 40 mmol NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (Thermo Scientific, Španjolska), te otopina acetonitrila, metanola i vode (45:45:10). Za identifikaciju aminokiselina korišten je Amino Acid Standard (AKS18) od proizvođača Sigma-Aldrich, SAD. Za provedbu analize bjelančevina korišteni su sljedeći reagensi: koncentrirana sumporna kiselina (KEFO, Slovenija), smjesa soli bezvodnog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O (GRAM-MOL, Hrvatska), 35 %-tna otopina natrijevog hidroksida (Kemika, Hrvatska), 0,1 mol/L otopina kloridne kiseline i 0,1 mol/L otopina natrij hidroksida proizvođača GRAM-MOL, Hrvatska, 30 %-tna otopina vodikovog peroksida (Carlo Erba Reagents, Francuska) i Tashiro indikator.

### 3.3. METODE

#### 3.3.1. Priprema uzoraka

Prikupljeni uzorci algi isprani su demineraliziranom vodom tri putate usitnjeni. Nakon toga se podvrgavaju procesu liofilizacije u liofilizatoru (Martin Christ, Alpha 2-4 LSCplus, Osterode am Harz, Njemačka) tijekom 96 h pri visokim vakuumom (0,5-1,81 hPa) i primarnom temperaturom od -20 °C i sekundarnom temperaturom od 20 °C. Uzorci su samljeveni u laboratorijskom mlinu (MRC Sample Mill C-SM /450-C, Holon, Izrael) te su kao takvi spremni za provedbu analize (**Slika 17**).



**Slika 17** Liofilizirani uzorak makroalge *Cystoseira corniculata*

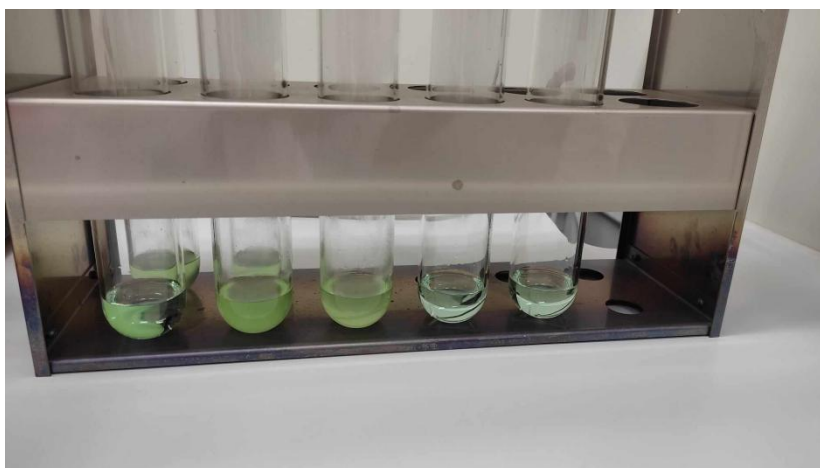
#### 3.3.2. Određivanje udjela bjelančevina metodom po Kjeldahl-u

Pripremljeni uzorak makroalge važe se na listić celofana (0,5 g), umota i ubaci u epruvetu. Zatim se na lađicu izvaže 10 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 0,1 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O i prenese u epruvetu. Doda se 15 mL koncentrirane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 1 mL 30%-tne otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> protiv pjenjenja, zatim se epruvete stave na stalak za spaljivanje i ostave 30 minuta. Nakon 30 minuta epruvete se lagano protresu, spoje na sistem za odsisavanje i sve zajedno stavi na prethodno zagrijanu (420 °C)

InKjel M jedinicu za razaranje proizvođača Bahrotest. Prvih 5 minuta razaranje se vrši na maksimalnom protoku zraka (voda na sisaljci je maksimalno otvorena), nakon čega se smanji na minimum. Razaranje traje oko 1 sat (**Slika 18**). Uzorci se izvade i ostave da se ohlade (**Slika 19**).



**Slika 18** InKjel M jedinica za spaljivanje – razaranje uzorka makroalgi (Potočar, 2023)



**Slika 19** Epruvete sa spaljenim uzorkom – hlađenje (Potočar, 2023)

Nakon postupka u bloku za spaljivanje slijedi destilacija na uređaju za destilaciju S2 proizvođača Bahrotest. Epruveta sa spaljenim uzorkom stavi se u ležište aparata za destilaciju, i Erlenmeyerova tikica sa 25 mL 0,1 M HCl i par kapi Tashiro indikatora, tako da je crijevo uronjeno u tikvicu. Uređaj prije samog postupka destilacije automatizirano dodaje 50 mL 35 %-tne otopine NaOH kako bi se oslobodio amonijak i predistilirao vodenom parom u tikvicu s kiselinom poznatog molariteta. Vršiti se destilacija (**Slika 20a**) i hvata 100 mL destilata (**Slika 20b**). Dobiveni destilat titrira se s 0,1 M NaOH, zatim se preko utrošenog NaOH izračuna količina dušika i količina bjelančevina u smeđim morskim algama. Iz utroška

0,1 M otopine NaOH za titraciju slijepog pokusa i glavne probe, faktora upotrebljenog 0,1 M NaOH, te količine uzorka izračuna se količina dušika prema **formuli (1)**, zatim se rezultat pomnoži s faktorom za preračunavanje postotka N u udio bjelančevina (6,25) i izračuna količina bjelančevina u odabranim smeđim morskim algama pomoću **formule (2)**.



**Slika 20** Destilacija: a) vrijeme destilacije b) završen postupak destilacije (Potočar, 2023)

Izračunavanje:

$$\text{Količina dušika} = \frac{(a - b) \cdot f \cdot 1,4}{c \cdot 10} \quad (1)$$

Gdje je:

a – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju slijepog pokusa (mL)

b – 0,1 M otopina NaOH upotrebljenog za titraciju glavne probe (mL)

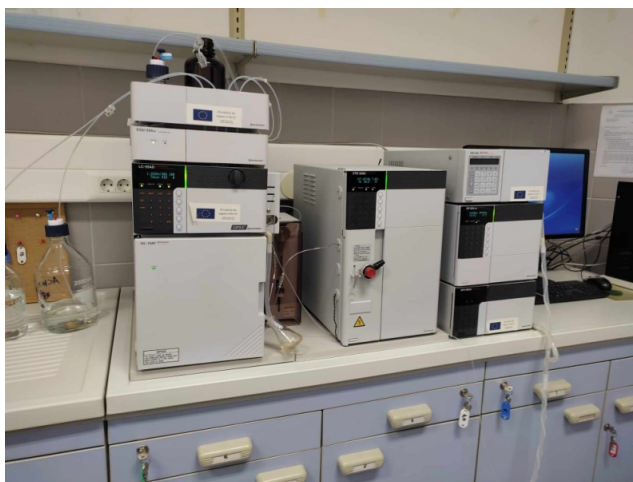
f – faktor upotrebljenog 0,1 M NaOH

c – količina uzorka (g)

$$\text{Količina bjelančevina} = \%N \times 6,25 \quad (2)$$

### 3.3.3. Određivanje aminokiselinskog profila

Identifikacija i kvantifikacija aminokiselina u odabranim smeđim makroalgama određena je HPLC metodom uz fluorescencijski detektor. Analiza je provedena na HPLC uređaju proizvođača Shimadzu (**Slika 21**). Uređaj se sastoji od kvaterne pumpe LC-20AC, pećnice CTO-20AC, RF-20A XS-fluorescencijskog detektora i autosamplera SIL-10AF. Upravljanje sustavom vrši se pomoću računala putem specijalnog računalnog programa LabSolution Lite (Release 5.52).



**Slika 21** HPLC uređaj (Potočar, 2023)

#### 3.3.3.1 Priprema uzorka

Aminokiselinski profil određen je u pet uzoraka makroalgi u tri ponavljanja. Za provedbu navedene metode, izvagano je 1 g pripremljenog uzorka makroalge u odmjernu tikvicu od 25 mL i doda se ultra čista voda do oznake. Odmjerna tikvica se zatvori čepom i promiješa nekoliko sekundi na vortex mješalici. Zatim se provodi ekstrakcija na ultrazvučnoj kupelji (Bandelin Sonorex) tijekom 15 minuta (**Slika 22**), i postupak derivatizacije.



**Slika 22** Ekstrakcija na ultrazvučnoj kupelji (Potočar, 2023)

### 3.3.3.2 Postupak derivatizacije

Postupak derivatizacije se provodi kako bi se aminokiseline prevele u fluorescirajuće derivate. Postupak započinje dodavanjem 150  $\mu\text{L}$  0,4 M boratnog pufera (pH 10,2) i 120  $\mu\text{L}$  otopine uzorka mikropipetom u plastičnu epruvetu, i sve zajedno se kratko promiješa 2x na tresilici i ostavi da stoji 30 sekundi. Nakon toga, dodaje se 30  $\mu\text{L}$  OPA reagensai promiješa se 6x, i 30  $\mu\text{L}$  FMOC reagensai i ponovno se promiješa 6x, i naposljetku dodaje se 1920  $\mu\text{L}$  ultračiste  $\text{H}_2\text{O}$  i promiješa 2x. Tako pripremljeni uzorak se prenese u vijalu preko membranskog najlonskog filtra veličine pora 45  $\mu\text{m}$ , te postavi u autosampler HPLC uređaja kako bi se odredila količina prisutnih aminokiselina u uzorcima odabranih makroalgi.

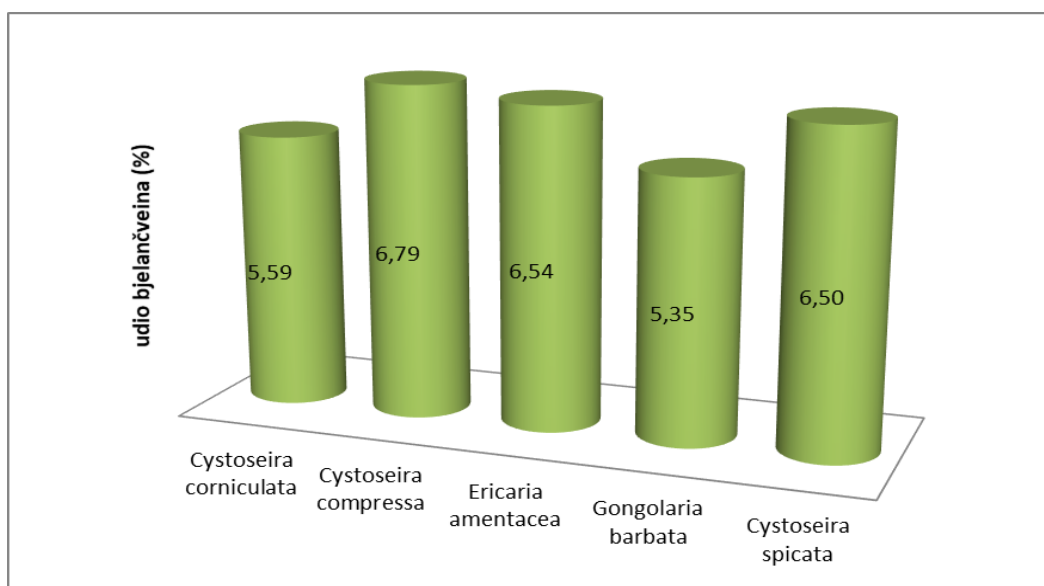
### 3.3.3.3 Parametri analize

Odjeljivanje aminokiselina provedeno je na Shimadzu Shim-pack GIST C18 koloni (150 x 4,0 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) pri temperaturi kolone od 40 °C. Mobilna faza sastoji se od dva eluensa, eluens A je 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,8), a eluens B otopina acetonitrila, metanola i vode u omjeru 45:45:10. Primijenjeno je gradijentno eluiranje s početnim udjelom eluensa B od 5 %. Udio eluensa B povećavao se linearno i u 36. minuti iznosio je 55 % . U 36,5 minuta udio eluensa B bio je 40 % te se navedeni sastav mobilne faze zadržao do 50. minute. U 55. minuti udio eluensa B iznosio je 5 %. Protok pokretne faze postavljen je na 1 mL/min, a vrijeme iznosilo je 55 min. Ekscitacijske i emisijske valne duljine fluorescencijskog detektora postavljen je na 350 nm i 450 nm za primarne aminokiseline, a za sekundarne, odnosno za aminokiselinu prolin, postavljene su na 266 nm i 305 nm. Ugradnja 3-MPA u indole smanjuje njihovu hidrofobnost, i kao rezultat, derivati OPA eluiraju prije derivata FMOC. Višak FMOC-a i produkti njegove razgradnje eluiraju nakon zadnjeg od sekundarnih AK i ne ometaju analizu. Za identifikaciju i izradu kalibracijske krivulje korišten je standard aminokiselina Amino Acid Standard (AKS18). Identifikacija odijeljenih aminokiselina provedena je usporedbom vremena zadržavanja pojedine aminokiseline u uzorku s vremenom zadržavanja iste u standardnoj otopini dok je kvantifikacija provedena metodom vanjske kalibracije.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



**Slika 23** prikazuje udio bjelančevina u odabranim vrstama smeđih makroalgi roda *Cystoseira*.



**Slika 23** Udio bjelančevina u analiziranim uzorcima makroalgi roda *Cystoseira*

Iz priloženog može se vidjeti da se udio proteina u odabranim smeđim algama kreće u rasponu od 5,35 do 6,79 %. Najveći udio bjelančevina izmjeren je u algi *C. compressa*, a namanji udio u *G. barbata*. Prema radu autora Thiviya i sur. (2022.) sadržaj proteina smeđih algi kreće se od 4 do 24 %, i taj sadržaj je često niži nego u zelenim i crvenim makroalgama. U odnosu na rezultate iz ostalih studija, raspon udjela proteina varira ovisno o vrsti alge, sezoni zrelosti i okolišnim čimbenicima, također, ovisi o temperaturi i salinitetu mora, a Sunčeva svjetlost je glavni čimbenik koji utječe na količinu dušika u algama, a posljedično utječe na sadržaj proteina i fotosintetski kapacitet (Jeliani i sur., 2021.). Selimi i sur. (2017) izmjerili su više razine proteina kod *G. barbata* koja je sakupljena s otoka Kerkennah (Sfax-Tunis), u studenom 2012. godine, udio je iznosio 9,86 %, izražen na temelju osušenih gliko-konjugata. Viši udio proteina od vrijednosti dobivene u ovom radu izmjerili su Vizetto-Duarte i sur. (2016) za algu *C. compressa* (10,16 % na suhu tvar), a vrijednost proteina za smeđe alge koje su sakupljene u srednjim/donjim međuplinskim područjima obale Algarve (Albufeira i Odeceixe, Portugal), u svibnju 2010., tijekom oseke, kretala se od 9 do 13 %. Jeliani i sur. (2021.) provodili su istraživanje na crvenim, zelenim i smeđim algama, u upravo kod smeđe alge *S. angustifolium* izmjerena je najveća količina bjelančevina u odnosu na ostale ispitivane alge u studiji. Zabilježili su nešto niži raspon proteina, od 3,7 do 4,3% na suhu tvar, a u odnosu na ostale studije u kojima je sadržaj proteina određen metodom po Kjeldahl-u, u navedenoj studiji ukupan sadržaj bjelančevina određen je Bradfordovom metodom. Različito obrađeni podaci, protokoli korišteni za procjenu proteina i faktori pretvorbe udjela dušika u

udio bjelančevina, utječu na točnost kvantifikacije bjelančevina, tako da je teško usporediti rezultate iz različitih studija.

Osim udjela bjelančevina, u ispitanim uzorcima odabranih smeđih morskih algi roda *Cystoseira*, određen je i aminokiselinski sastav. Profili aminokiselina pet markoalgi pokazali su prisutnost 17 aminokiselina: L-asparaginske kiseline, L-glutaminske kiseline, L-serina, L-hitidina, glicina, L-treonina, L-arginina, L-alanina, L-tirozina, L-cisteina, L-valina, L-triptofana, L-fenilalanina, L-izoleucina, L-leucina, L-lizina, L-prolina dok L-metionin nije detektiran niti u jednom makroalgi. Rezultati aminokiselinskog profila prikazani su u **Tablicama 2-6**.

**Tablica 2** Aminokiselinski sastav makroalge *Cystoseira corniculata*

Aminokiselina		Količina (mg/g liofiliziranog uzorka)	Količina (mg/g proteina)
Asparaginska kiselina	L-Asp	2,16 ± 0,01	38,63
Glutaminska kiselina	L-Glu	14,55 ± 0,64	260,26
Serin	L-Ser	0,53 ± 0,02	9,43
Histidin	L-His	6,87 ± 0,16	122,90
Glicin	Gly	3,29 ± 0,43	58,93
Treonin	L-Thr	1,48 ± 0,73	26,46
Arginin	L-Arg	0,42 ± 0,03	7,57
Alanin	L-Ala	3,79 ± 0,13	67,75
Tirozin	L-Tyr	0,20 ± 0,03	3,62
Cistein	L-Cys	0,76 ± 0,13	13,55
Valin	L-Val	0,27 ± 0,01	4,87
Metionin	L-Met	n.d.	n.d.
Triptofan	L-Trp	0,21 ± 0,05	3,72
Fenilalanin	L-Phe	0,20 ± 0,00	3,53
Izoleucin	L-Ile	0,19 ± 0,01	3,39
Leucin	L-Leu	0,17 ± 0,00	2,97
Lizin	L-Lys	0,19 ± 0,01	3,34
Prolin	L-Pro	1,73 ± 0,25	30,99
	<b>ΣEAK</b>	9,57	171,18
	<b>ΣNEAK</b>	27,43	490,73
	<b>EAK/NEAK</b>	<b>0,35</b>	<b>0,35</b>

Tablica 3 Aminokiselinski sastav makroalge *Cystoseira compressa*

Aminokiselina		Količina (mg/g liofiliziranog uzorka)	Količina (mg/g proteina)
Asparaginska kiselina	L-Asp	14,34 ± 0,36	211,14
Glutaminska kiselina	L-Glu	7,18 ± 0,20	105,68
Serin	L-Ser	0,73 ± 0,02	10,81
Histidin	L-His	25,95 ± 1,2	382,22
Glicin	Gly	0,08 ± 0,01	1,12
Treonin	L-Thr	0,21 ± 0,01	3,05
Arginin	L-Arg	0,35 ± 0,01	5,15
Alanin	L-Ala	11,26 ± 0,33	165,86
Tirozin	L-Tyr	0,42 ± 0,01	6,21
Cistein	L-Cys	1,50 ± 0,07	22,08
Valin	L-Val	0,61 ± 0,01	9,01
Metionin	L-Met	n.d.	n.d.
Triptofan	L-Trp	0,30 ± 0,01	4,39
Fenilalanin	L-Phe	0,88 ± 0,03	12,93
Izoleucin	L-Ile	0,36 ± 0,01	5,33
Leucin	L-Leu	0,58 ± 0,01	8,52
Lizin	L-Lys	0,54 ± 0,02	8,02
Prolin	L-Pro	0,19 ± 0,01	2,74
<b>ΣEAK</b>		29,43	433,48
<b>ΣNEAK</b>		36,04	530,81
<b>EAK/NEAK</b>		<b>0,82</b>	<b>0,82</b>

Tablica 4 Aminokiselinski sastav makroalge *Ericaria amentacea*

Aminokiselina		Količina (mg/g liofiliziranog uzorka)	Količina (mg/g proteina)
Asparaginska kiselina	L-Asp	4,24 ± 0,10	64,85
Glutaminska kiselina	L-Glu	16,03 ± 0,49	245,18
Serin	L-Ser	1,00 ± 0,02	15,29
Histidin	L-His	1,60 ± 0,15	24,54
Glicin	Gly	4,89 ± 0,21	74,76
Treonin	L-Thr	1,12 ± 0,03	17,06
Arginin	L-Arg	0,90 ± 0,03	13,82
Alanin	L-Ala	5,25 ± 0,12	80,20
Tirozin	L-Tyr	0,40 ± 0,01	6,07
Cistein	L-Cys	1,13 ± 0,05	17,30
Valin	L-Val	0,37 ± 0,00	5,63
Metionin	L-Met	n.d.	n.d.
Triptofan	L-Trp	0,30 ± 0,02	4,63
Fenilalanin	L-Phe	0,55 ± 0,03	8,41
Izoleucin	L-Ile	0,21 ± 0,00	3,21
Leucin	L-Leu	0,29 ± 0,01	4,49
Lizin	L-Lys	0,73 ± 0,01	11,23
Prolin	L-Pro	0,68 ± 0,06	10,35
<b>ΣEAK</b>		5,18	79,19
<b>ΣNEAK</b>		34,52	527,83
<b>EAK/NEAK</b>		<b>0,15</b>	<b>0,15</b>

Tablica 5 Aminokiselinski sastav makroalge *Gongolaria barbata*

Aminokiselina		Količina (mg/g liofiliziranog uzorka)	Količina (mg/g proteina)
Asparaginska kiselina	L-Asp	14,85 ± 0,46	277,63
Glutaminska kiselina	L-Glu	7,89 ± 0,23	147,54
Serin	L-Ser	0,54 ± 0,04	10,09
Histidin	L-His	10,68 ± 0,07	199,62
Glicin	Gly	1,38 ± 0,02	25,85
Treonin	L-Thr	0,44 ± 0,01	8,27
Arginin	L-Arg	0,26 ± 0,00	4,77
Alanin	L-Ala	2,23 ± 0,01	41,73
Tirozin	L-Tyr	0,20 ± 0,00	3,69
Cistein	L-Cys	0,54 ± 0,03	10,05
Valin	L-Val	0,26 ± 0,01	4,80
Metionin	L-Met	n.d.	n.d.
Triptofan	L-Trp	0,36 ± 0,01	6,76
Fenilalanin	L-Phe	1,01 ± 0,01	18,82
Izoleucin	L-Ile	0,24 ± 0,00	4,45
Leucin	L-Leu	0,19 ± 0,00	3,58
Lizin	L-Lys	0,41 ± 0,01	7,71
Prolin	L-Pro	0,17 ± 0,00	3,26
	<b>ΣEAK</b>	13,59	254,01
	<b>ΣNEAK</b>	28,07	524,60
	<b>EAK/NEAK</b>	<b>0,48</b>	<b>0,48</b>

**Tablica 6** Aminokiselinski sastav makroalge *Cystoseira spicata*

Aminokiselina		Količina (mg/g liofiliziranog uzorka)	Količina (mg/g proteina)
Asparaginska kiselina	L-Asp	7,10 ± 0,08	109,18
Glutaminska kiselina	L-Glu	17,91 ± 0,09	275,55
Serin	L-Ser	0,59 ± 0,08	9,02
Histidin	L-His	15,38 ± 0,28	236,58
Glicin	Gly	1,56 ± 0,02	23,97
Treonin	L-Thr	0,43 ± 0,01	6,69
Arginin	L-Arg	0,48 ± 0,02	7,35
Alanin	L-Ala	6,17 ± 0,07	94,88
Tirozin	L-Tyr	0,55 ± 0,01	8,47
Cistein	L-Cys	1,89 ± 0,27	29,05
Valin	L-Val	0,62 ± 0,11	9,48
Metionin	L-Met	n.d.	n.d.
Triptofan	L-Trp	0,32 ± 0,00	5,00
Fenilalanin	L-Phe	0,98 ± 0,02	15,12
Izoleucin	L-Ile	0,35 ± 0,01	5,37
Leucin	L-Leu	0,34 ± 0,01	5,26
Lizin	L-Lys	0,40 ± 0,01	6,08
Prolin	L-Pro	0,22 ± 0,00	3,35
	<b>ΣEAK</b>	18,82	289,57
	<b>ΣNEAK</b>	36,45	560,80
	<b>EAK/NEAK</b>	<b>0,52</b>	<b>0,52</b>

Ukupan sadržaj aminokiselina bio je u rasponu od  $37,00 \pm 2,64$  mg/g liofiliziranog uzorka u *C. corniculata* do  $65,48 \pm 2,32$  mg/g liofiliziranog uzorka u *C. compressa* (**Tablice 2-6**). Ward i Deyab (2021) proveli su istraživanje na tri vrste smeđih makroalgi, i dobili ukupni sadržaj aminokiselina koji se kretao od  $13,2 \pm 0,68$  mg/g do  $19,62 \pm 0,86$  mg/g suhe tvari, što je niže u odnosu na rezultate dobivene u ovom radu. Razlika se može pripisati vrsti smeđih algi, te postupku ekstrakcije samih algi. Prevladavajuće nesenscijalne aminokiseline (NEAK) u ispitivanim uzorcima makroalgi bile su asparaginska (L-Asp) i glutaminska kiselina (L-Glu). Makroalge *C. compressa* i *G. barbata* sadržavale su najviši udio asparaginske kiseline, u *C. compressa* udio iznosio je  $14,34 \pm 0,36$  mg/g liofiliziranog uzorka (**Tablica 3**), a u *G. barbata* udio L-Asp iznosio je  $14,85 \pm 0,46$  mg/g liofiliziranog uzorka (**Tablica 5**). U makroalgama *Cystoseira corniculata* ( $14,55 \pm 0,64$  mg/g liofiliziranog uzorka), *Ericaria amentacea* ( $16,03 \pm 0,49$  mg/g liofiliziranog uzorka) i *Cystoseira spicata* ( $17,91 \pm 0,09$  mg/g liofiliziranog uzorka) izmjeren najvišio udio glutaminske kiseline (**Tablice 2, 4 i 6**), koja je u slobodnom obliku, pored alanina (L-Ala) i glicina (Gly), vrlo bitna za okus hrane, posebice

umami okus (Moerdijk-Poortvliet i sur., 2022.). Aminokiseline glicina se najviše nalazilo u makroalgi *E. amentacea* ( $4,89 \pm 0,21$  mg/g liofiliziranog uzorka) (**Tablica 4**), a najmanje u *C. compressa*, tek  $0,08 \pm 0,01$  mg/g liofiliziranog uzorka. Najvišio udio aminokiseline L-Ala izmjeren je u makroalgi *C. compressa*, i iznosio je  $11,26 \pm 0,33$  mg/g liofiliziranog uzorka (**Tablica 3**), a najmanji u *G. barbata*,  $2,23 \pm 0,01$  mg/g liofiliziranog uzorka (**Tablica 5**).

Sve ispitivane makroalge sadržavale su osam od devet esencijalnih aminokiselina (EAK), od kojih je u najvećoj količini izmjerena aminokiselina histidin (L-His),  $25,95 \pm 1,2$  mg/g liofiliziranog uzorka, i to u makroalgi *Cystoseira compressa* (**Tablica 3**).

Za svaku vrstu odabrane smeđe makroalge roda *Cystoseira* izračunate su koncentracije svake pojedine aminokiseline, izražene po gramu proteina, ukupna koncentracija esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina, te omjer EAK/NEAK, rezultati su prikazani u **Tablicama 2 - 6**. Sve ispitivane makroalge sadržavale su veći udio NEAK u odnosu na EAK, a omjer EAK/NEAK bio je u rasponu od 0,15 (za *E. amentacea*) do 0,82 (za *C. compressa*). Budući da je *C. compressa* imala najveću vrijednost omjera EAK/NEAK, to ukazuje da je u navedenoj algi izmjerena najviša količina esencijalnih aminokiselina u odnosu na druge ispitane makroalge u ovom radu, a ukupna koncentracija esencijalnih aminokiselina u navedenoj algi iznosila je 433,48 mg/g proteina (**Tablica 3**). Ward i Deyab (2012.) izračunali su omjer EAK/NEAK koji se kretao između od 0,73 do 1,06, dok su Jeliani i sur. (2021.) za omjer EAK/NEAK izvijestili da je bio u rasponu od 1,17 do 2,65 uključujući crvene, zelene i smeđe alge, ali su pri tome omjeri bili viši u smeđim algama (u *S. angustifolium* i *C. myrica*), što smeđe morske alge čine prikladnim izvorima EAK za ljudsku prehranu. Dominantna NEAK, prisutna u svim ispitivanim vrstama smeđih makroalgi, je glutaminska kiselina, a u najvišoj koncentraciji bila je u *C. spicata* (275,55 mg/g proteina) (**Tablica 6**). U većim količinama nalazi se i asparaginska kiselina u sljedećim algama: *C. compressa*, *G. barbata*, *C. spicata*, a najviša količina asparaginske kiseline izmjerena je u *G. barbata* (277,63 mg/g proteina). Neesencijalna aminokiselina koja je prisutna u svim vrstama u većim količinama nakon glutaminske i asparaginske kiseline je alanin, čija najveća izmjerena koncentracija iznosi 165,86 mg/g proteina u makroalgi *C. compressa*. Osim navedenih neesencijalnih aminokiselina, u algama *C. corniculata* i *E. amentacea* u većoj koncentraciji izmjerena je i aminokiselina glicin (58,93 mg/g proteina u *C. corniculata* i 74,76 mg/g proteina u *E. amentacea*) (**Tablice 2 i 4**). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su najzastupljenije NEAK u odabranim smeđim makroalgama roda *Cystoseira* glutaminska i asparaginska kiselina, alanin i glicin, a od EAK koje imaju važnu ulogu u prehrani i normalnom funkcioniranju organizma najzastupljenije su bile histidin, fenilalanin i triptofan. Esencijalna aminokiselina histidin nalazi se u najvećoj količini od svih EAK (24,54 mg/g proteina – 382,22 mg/g proteina) (**Tablice 2 – 6**), a najviša koncentracija izmjerena je u algi

*C. compressa*, u kojoj je i bila i najviša ukupna količina EAK (**Tablica 3**). Osim histidina, značajan udio EAK treonina i fenilalanina izmjeren je u ispitivanim uzorcima smeđih makroalgi, no s različitim dominacijama. U algama *C. compressa*, *G. barbata* i *C. spicata* udio fenilalanina (12,93, 18,82 i 15,12 mg/g proteina) bio je veći u odnosu na udio treonina (3,05, 8,27 i 6,69 mg/g proteina) dok je kod makroalgi *C. corniculata* i *E. amentacea* izmjeren veći udio treonina (26,46 i 17,06 mg/g proteina) u odnosu na udio fenilalanina (3,53 i 8,41 mg/g proteina) (**Tablice 2 – 6**). Prisutnost esencijalne aminokiseline metionina nije zabilježena kao što je već ranije spomenuto, a neke studije u smeđim morskim algama bilježe visoke koncentracije ove aminokiseline. Jelianu i sur. (2021) su izvjestili da se najviša koncentracija metionina izmjerena upravo kod smeđe makroalge *C. myrica* (5,89/100 g ukupnih proteina), a iste rezultate za smeđe alge dobili su i Ward i Deyab (2021), dok su (Hashem i sur., 2021.) izvjestili da je leucin bila najdominantnija aminokiselina u *C. fucales* i *T. decurrens*. Razlike u aminokiselinskom profilu mogu biti posljedica upotrebe različitih otapala za ekstrakciju (Ummat i sur., 2021.).

Proteini su važna komponenta dnevne prehrane u smislu pravilnog rasta i poboljšanog zdravlja ljudi i životinja. Dnevni unos proteina je važan jer se za razliku od nekih komponenti ne pohranjuju u tijelu. Mnoge vrste morskih algi koriste se kao sastojci ili hrana, u tom pogledu imaju različite prednosti. Neke vrste sadrže visok udio proteina i esencijalnih aminokiselina, koje naš organizam ne može sam sintetizirati, a imaju vrlo važnu ulogu u ekspresiji gena. Ukupne esencijalne aminokiseline u ispitivanim makroalgama iznosile su 171,18 mg/g proteina (*C. corniculata*), 433,48 mg/g proteina (*C. compressa*), 79,19 mg/g proteina (*E. amentacea*), 254,01 mg/g proteina (*G. barbata*) i 289,57 mg/g proteina (*C. spicata*). Imajući u vidu da su potrebe odraslih osoba za esencijalnim aminokiselinama 265 mg/g proteina (Hashem i sur., 2021.), može se zaključiti da konzumacijom ispitanih makroalgi možemo zadovoljiti dnevne potrebe za esencijalnim aminokiselinama te na taj način doprinijeti kvaliteti života i očuvanju zdravlja. Budući da ispitani uzorci odabranih smeđih makroalgi sadrže visoke koncentracije ukupnih esencijalnih aminokiselina, zadovoljavaju potrebu odraslih za esencijalnim aminokiselinama, što ukazuje da sadrže visokokvalitetne proteine koji se mogu koristiti kao prirodni nutraceutici u razvoju funkcionalne hrane. Kako bi se mogla utvrditi potencijalna primjena istraženih vrsta makroalge roda *Cystoseira* u proizvodnjih funkcioniranih prehrambenih i kozmetičkih proizvoda, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se istražile njihove biološke aktivnosti, te sigurnost njihove primjene, odnosno potrebno je istražiti njihovu toksičnost i alergičnost, te proučiti studije o njihovoj prihvatljivosti.



## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi izmjerenih eksperimentalnih rezultata, njihove statičke obrade i rasprave, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

- Udio bjelančevina u odabranim vrstama smeđe makroalge kretao se u rasponu od 5,35 % u *G. barbata* do 6,79 % u *C. compressa*.
- U svim odabranim vrstama makroalge roda *Cystoseira* bilo je prisutno 9 neesencijalnih aminokiselina i 8 esencijalnih aminokiselina.
- Omjer EAK/NEAK bio je u rasponu od 0,15 do 0,82, što ukazuje na to da je sadržaj NEAK bio viši u odnosu na EAK u svim vrstama. Najviši omjer bio je u algi *C. compressa*, što znači da je navedena alga sadržavala najveću količinu esencijalnih aminokiselina u odnosu na ostale ispitane vrste, a ukupna koncentracija EAK u navedenoj algi iznosila je 433,48 mg/g proteina.
- Najzastupljenije neesencijalne aminokiseline u svim ispitanim uzorcima bile su aparginska i glutaminska kiselina, alanin i glicin, aminokiseline koje su odgovorne za jedinstveni okus morskih algi. Najviša koncentracija asparaginske kiseline izmjerena je u *G. barbata* (277,63 mg/g proteina), glutaminske kiseline u *C. spicata* (275,55 mg/g proteina), a najviša koncentracija alanina bila je u *C. compressa* (165,86 mg/g proteina) i glicina u *E. amentacea* (74,76 mg/g proteina).
- Najzastupljenije esencijalne aminokiseline bile su histidin, fenilalanin i treonin. U najvišoj koncentraciji od spomenutih EAK bila je aminokiselina histidin u svim ispitanim vrstama smeđih makroalgi roda *Cystoseira*, a najviša izmjerena je u algi u *C. compressa*.
- Zbog brojnih povoljnih učinaka aminokiselina na zdravlje, proteini morskih algi mogu se koristiti u razvoju novih funkcionalnih proizvoda.

## **6. LITERATURA**

- Aly SH, Elhawary EA, Elissawy AM, Mostafa NM, Eldahshan OA, Singab ANB: Brown Algae (*Phaeophyta*): A Source of Different Phytochemicals and Their Medicinal Applications". U *Aquatic Medicinal Plants*, str. 203-226. CRC Press, London, UK. 2023.
- Amico V: Marine Brown Algae of Family *Cystoseiraceae*: Chemistry and Chemotaxonomy. *Phytochemistry* 39(6):1257-1279, 1995.
- Amico V, Piattelli M, Bizzini M, Neri P: Absolute Configuration of Some Marine Metabolites from *Cystoseira* spp. *Journal of Natural Products* 60(11):1088-1893, 1997.
- Baggini, C, Salomidi M, Voutsinas E, Bray L, Krasakopoulou E, Hall-Spencer JM: Seasonality Affects Macroalgal Community Response to Increases in  $p\text{CO}_2$ . *PLoS ONE* 9(9): e106520, 2014.
- Bruno de Sousa C, Cox CJ, Brito L, Pavão MM, Pereira H, Ferreira A, Ginja C, Campino L, Bermejo R, Parente M, Varela J: Improved Phylogeny of Brown Algae *Cystoseira* (*Fucales*) from the Atlantic-Mediterranean Region Based on Mitochondrial Sequences. *PLoS ONE* 14(1):e 0210143, 2019.
- Din NAS, Mohd Alayudin S, Sofian-Seng N-S, Rahman HA, Mohd Razali NS, Lim SJ, Wan Mustapha WA: Brown Algae as Functional Food Source of Fucoxanthin: A Review. *Foods* 11(15):2235, 2022.
- Dobrosravić E: Optimizacija konvencionalne ekstrakcije polisaharida iz smeđe alge *Cystoseira barbata*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2020.
- Domínguez H: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing, 2013.
- Ercegović A: Jadranske Cistozire. Njihova Morfologija, Ekologija i Razvitak. U: *Fauna i flora Jadrana*, knjiga 2. Logos, Split, 1952.
- Grgić K: Primjena ekstrakcije na čvrstoj fazi u izolaciji pigmenata iz smeđe makroalge *Cystoseira corniculata*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2023.
- Hashem SM, El-Lahot MA, Helal AM, Massoud MI: Evaluation the Phytochemicals and Nutritional Characteristics of Some Microalgae Grown in Egypt as Healthy Food Supplements. *Egyptian Journal of Food Science* 49(1):173-185, 2021.
- Jeliani ZZ, Pirian K, Sohrabipour J, Sorahinobar M, Soltani M, Sourinejad I, Yousefzadi M: Assessment of Fatty Acid and Amino Acid Composition of Macroalgae from the Persian Gulf to Characterize Their Suitability for Nutritional Supplements. *Biology Bulletin* 48(6):752-762, 2021.
- Kalimuthu S, Kim S-K: Fucoidan, a Sulfated Polysaccharides from Brown Algae as Therapeutic Target for Cancer. U *Handbook of Anticancer Drugs from Marine Origin*, str. 145-164. Springer Cham, Switzerland, 2015.
- Katić M: Određivanje sastava masnih kiselina iz odabranih vrsta makroalgi iz Jadranskog mora. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
- Kawai H, Henry EC: Phaeophyta. U *Handbook of the Protists*, str. 267–304. Springer Cham, Switzerland, 2017.

- Kim S-K: *Handbook of Marine Macroalgae: Biotechnology and Applied Phycology*. John Wiley & Sons, UK, 2011.
- Kim S-K, Shin K-H, Venkatesan J: *Marine Antioxidants: Preparations, Syntheses, and Applications*. Academic Press, Elsevier, 2022.
- Kojima T, Koike A, Yamamoto S, Kanemitsu T, Miwa M, Kamei H, Kondo T, Iwata T: Eisenin (L-pyroGlu-L-Gln-L-Ala), a New Biological Response Modifier. *Journal of Immunotherapy with Emphasis on Tumor Immunology: Official Journal of the Society for Biological Therapy* 13(1):36-42, 1993.
- Liu W, Li H-J, Wu Y-C: Alginate Properties and Applications. U *Properties and Applications of Alginate*, str. 1-40. 2022.
- Markulinčić M: Spektrofotometrijsko određivanje florotanina i antioksidacijske aktivnosti ekstrakata alge *Cystoseira compressa* dobivenih primjenom eutektičkih otapala. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
- Matanić J: Izolacija pigmenata iz alge *Cystoseira* primjenom ubrzane ekstrakcije otapalima pri povišenom tlaku. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2018.
- Michalak I, Chojnacka K: Algae as Production Systems of Bioactive Compounds. *Engineering in Life Sciences* 15(2):160-176. 2015.
- Moerdijk-Poortvliet TCW, de Jong DLC, Fremouw R, de Reu S, de Winter JM, Timmermans K, Mol G, Reuter N, Derksen GCH: Extraction and analysis of free amino acids and 5'-nucleotides, the key contributors to the umami taste of seaweed. *Food Chemistry* 370, 131352, 2022.
- Ptak SH, Fretté XC: Algae Polysaccharides as Nutraceuticals: Isolation, Characterization and Bioactivities of Fucoidans. U *Algae for Food: Cultivation, Processing and Nutritional Benefits*, str. 211–37, CRC Press, Boca Raton, 2021.
- Rao AR, Ravishankar GA: *Sustainable Global Resources of Seaweeds Volume 2: Food, Pharmaceutical and Health Applications*. Springer Cham, Switzerland, 2022.
- Sangeetha J, Thangadurai D: *Seaweed Biotechnology: Biodiversity and Biotechnology of Seaweeds and Their Applications*. Academic Press, London, UK, 2023.
- Sellimi S, Benslimaa A, Barragan-Monterob V, Hajjia M, Nasri M: Polyphenolic-protein-polysaccharide ternary conjugates from *Cystoseira barbata* Tunisian seaweed as potential biopreservatives: Chemical, antioxidant and antimicrobial properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 105:1375-1383, 2017.
- Stanojković TP, Konić-Ristić A, Kljajić Z, Grozdanić-Stanisavljević N, Srdić-Rajić T, Zdunić G, Šavikin K: Antioxidant, Antiplatelet and Cytotoxic Activity of Extract of *Cystoseira Amentacea* from the Coast of Montenegro (South-East Adriatic Sea). *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 9(2):869-880, 2014.
- Šarić D: Izolacija bioaktivnih komponenti iz ekstrakata alge *Cystoseira compressa* primjenom makroporoznih smola. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
- Theagarajan R, Dutta S, Moses JA, Anandharamakrishnan C: Alginates for Food Packaging Applications. U *Alginates: Applications in the Biomedical and Food Industries*, str. 205-232, John Wiley & Sons, UK, 2019.

- Thiviya P, Gamage A, Gama-Arachchige N-S, Merah O, Madhujith T: Seaweeds as a Source of Functional Proteins. *Phycology* 2(2):216-243, 2022.
- Ummat V, Garcia-Vaquero M, Poojary MM, Lund MN, O'Donnell C, Zhang Z, Tiwari BK: Green extraction of proteins, umami and other free amino acids from brown macroalgae *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*. *Journal of Applied Phycology* 33:4083–4091, 2021.
- Vijayalakshmi K, Latha S, Rose MH, Sudha PN: Industrial Applications of Alginate. U *Industrial Applications of Marine Biopolymers*, str. 545-576, CRC Press, Boca Raton, 2017.
- Vizetto-Duarte C, Custódio L, Barreira L, Da Silva MM, Rauter AP, Albericio F, Varela J: Proximate Biochemical Composition and Mineral Content of Edible Species from the Genus *Cystoseira* in Portugal. *Botanica Marina* 59(4):251-257, 2016.
- Ward FM, Deyab MA: Comparative Study of Nutritional Importance of Some Marine Macroalgae as a Novel Natural Source of Amino Acids. *Russian Journal of Marine Biology* 47(1):39-46, 2021.
- Yada RY: *Proteins in Food Processing*. Woodhead Publishing, Elsevier, 2018.
- Yesuraj D, Deepika C, Ravishankar GA, Rao AR: Seaweed-Based Recipes for Food, Health-Food Applications, and Innovative Products Including Meat and Meat Analogs. U *Sustainable Global Resources of Seaweeds Volume 2: Food, Pharmaceutical and Health Applications*, str. 267-292, Springer Cham, Switzerland, 2022.
- Zdjelarević I: Aminokiselinski sastav i botaničko podrijetlo meda. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2022.
- Web izvor 1: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fucosterol#section=2D-Structure> (24.9.2023.)
- Web izvor 2: <https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr> (25.09.2023.)
- Web izvor 3: [https://fucaleanforests.com/wp-content/uploads/2023/02/Key-to-Istrian-Fuclean-algae-redone.pdf?fbclid=IwAR29uVMaG136XNXZuioorb-ujSmo4uCGXF1Ar9uIADqWILZR6kK\\_pg9hJ2Y8](https://fucaleanforests.com/wp-content/uploads/2023/02/Key-to-Istrian-Fuclean-algae-redone.pdf?fbclid=IwAR29uVMaG136XNXZuioorb-ujSmo4uCGXF1Ar9uIADqWILZR6kK_pg9hJ2Y8) (25.09.2023.)
- Web izvor 4: [https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img\\_id=35050](https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=35050) (14.12.2023.)
- Web izvor 5: <https://www.biowin.at/all/Pflanzen/systematik/abteilungen/Phaeophyta/Fucales/Cystoseira%20spicata/cystoseira.htm> (14.12.2023)