

Identifikacija bioaktivnih spojeva i peptida dobivenih iz mikroalge *Arthrospira platensis* primjenom proteomskog i metabolomskog pristupa

Švegović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:687221>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

Dora Švegović

**IDENTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH
SPOJEVA I PEPTIDA DOBIVENIH
IZ MIKROALGE *Arthrospira*
platensis PRIMJENOM
PROTEOMSKOG I
METABOLOMSKOG PRISTUPA**

Rad je izrađen pod mentorstvom doc. dr. sc. Anite Horvatić u Laboratoriju za fizikalnu kemiju i koroziju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za proteomiku Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod komentorstvom doc. dr. sc. Josipe Kuleš.

Puno hvala mentorici, doc. dr. sc. Aniti Horvatić, na uloženom vremenu i trudu, savjetima i pomoći tijekom izrade diplomskog rada. Također se zahvaljujem doc. dr. sc. Josipi Kuleš na velikoj pomoći tijekom provedbe eksperimentalnog dijela diplomskog rada, kao i prof. dr. sc. Antoniu Starčeviću na pomoći pri bioinformatičkoj analizi bioaktivnih metabolita.

Hvala mojim roditeljima i sestrama, na bezuvjetnoj podršci i pomoći tijekom cijelog školovanja, na tome što su me "tjerali" dalje i nisu dali da odustanem od svog cilja. Bez njih ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Hvala mojem Mislavu, na beskrajnom strpljenju, podršci i ohrabrivanju koje mi svakodnevno pruža.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za fizikalnu kemiju i koroziju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

IDENTIFIKACIJA BIOAKTIVNIH SPOJEVA I PEPTIDA DOBIVENIH IZ MIKROALGE
Arthrospira platensis PRIMJENOM PROTEOMSKOG I METABOLOMSKOG PRISTUPA

Dora Švegović, univ. bacc. ing. biotechn.
0058213740

Sažetak: Mikroalga *Arthrospira platensis* (komercijalnog naziva spirulina) sve se češće koristi kao dodatak prehrani, nutraceutik, sastojak kozmetičkih preparata i lijekova te sirovina za proizvodnju biogoriva. Cilj ovog rada bio je proteomskim i metabolomskim pristupom temeljenim na spektrometriji masa u kombinaciji s najsuvremenijim bioinformatičkim alatima identificirati bioaktivne spojeve i peptide koji se mogu dobiti iz mikroalge *Arthrospira platensis*, kao i alergene, budući da su alergije na hranu u sve većem porastu. Koristeći rezultate proteomske analize, pomoću servera PeptideRanker predviđene su potencijalne bioaktivnosti identificiranih peptida, dok je pomoću baze Allergome identificiran alergen C-fikocijanin. Rezultati metabolomske analize korišteni su za pretraživanje baze COCONUT, pri čemu je identificirano 68 bioaktivnih metabolita. Na osnovu dobivenih rezultata zaključeno je da, zbog bioaktivnih molekula koje sadrži, *Arthrospira platensis* ima pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje pri čemu se ističu antioksidativno, protuupalno i antibakterijsko djelovanje. S druge strane, ova mikroalga može predstavljati prijetnju za zdravlje kod preosjetljivih pojedinaca.

Glavne riječi: spirulina, bioaktivni peptidi, proteomika, metabolomika, spektrometrija masa

Rad sadrži: 47 stranica, 6 slika, 4 tablice, 101 literaturni navod, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: doc. dr. sc. Anita Horvatić

Komentor: doc. dr. sc. Josipa Kuleš, VEF

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Antonio Starčević (predsjednik)
2. doc. dr. sc. Anita Horvatić (mentor)
3. doc. dr. sc. Josipa Kuleš (član)
4. izv. prof. dr. sc. Mojca Čakić Semenčić (zamjenski član)

Datum obrane: 27. rujna 2023. godine

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Physical Chemistry and Corrosion

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology
Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND PEPTIDES OBTAINED FROM MICROALGAE *Arthrospira platensis* BY APPLICATION OF PROTEOMIC AND METABOLOMIC APPROACH

Dora Švegović, univ. bacc. ing. biotechn.

0058213740

Abstract: The microalga *Arthrospira platensis* (commonly called spirulina) is increasingly used as a food supplement, nutraceutical, ingredient in cosmetics and medicines, and raw material in production of biofuel. The aim of this thesis was to identify bioactive compounds and peptides that can be extracted from *Arthrospira platensis*, using mass spectrometry-based proteomics, metabolomics and sophisticated bioinformatic tools, as well as allergens, since the constant growth of allergies frequency could be observed. Using the results of proteomic analysis and the PeptideRanker server, the potentially bioactive peptides were predicted. Furthermore, C-phycocyanin was identified as allergen by Allergome database search. Metabolomics results were used for COCONUT database search, enabling the identification of 68 bioactive metabolites. Finally, it can be concluded that, because of the bioactive molecules it contains, the microalga *Arthrospira platensis* has a positive impact on human health, showing antioxidant, antitumor and antibacterial activities. However, it can pose a potential threat for sensitive individuals.

Keywords: *spirulina, bioactive peptides, proteomics, metabolomics, mass spectrometry*

Thesis contains: 47 pages, 6 figures, 4 tables, 101 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Anita Horvatić, PhD, Assistant professor

Co-mentor: Josipa Kuleš, PhD, Assistant professor

Reviewers:

1. Antonio Starčević, PhD, Full professor (president)
2. Anita Horvatić, PhD, Assistant professor (mentor)
3. Josipa Kuleš, PhD, Assistant professor (member)
4. Mojca Čakić Semenčić, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: 27th September 2023

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. ALGE	3
2.1.1. Modrozelenne alge	3
2.2. SPIRULINA	4
2.2.1. Faktori rasta	4
2.2.2. Uzgoj i industrijska proizvodnja	5
2.2.3. Nutritivna vrijednost, utjecaj na zdravlje i toksičnost	7
2.2.3.1. Proteini	7
2.2.3.2. Lipidi	8
2.2.3.3. Ugljikohidrati	8
2.2.3.4. Mikronutrijenti	8
2.2.3.5. Pozitivan utjecaj na zdravlje	9
2.2.3.6. Toksične tvari	9
2.2.3.7. Alergeni	10
2.2.4. Upotreba u prehrani i preparatima	10
2.2.5. Proizvodnja biodizela	10
2.3. MULTI-OMIKA METODE U PROUČAVANJU MIKROALGI	11
2.3.1. Proteomika	12
2.3.2. Metabolomika	13
2.4. SPEKTROMETRIJA MASA	14
2.4.1. Ionizacija	14
2.4.2. Analizatori	15
2.4.3. Analiza proteina	16
2.4.4. Analiza metabolita	16
2.4.5. Identifikacija proteina i metabolita primjenom baza podataka	17
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Ispitivani uzorak algi	18
3.1.2. Kemikalije	18
3.1.3. Komercijalni set	18
3.1.4. Uređaji i oprema	19
3.1.5. Računalni programi	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina	20

3.2.2. Digestija proteina korištenjem filtera za ultrafiltraciju (FASP)	20
3.2.3. Proteomska analiza korištenjem sustava LC-MS.....	21
3.2.4. Identifikacija bioaktivnih peptida <i>in silico</i>	22
3.2.5. Identifikacija alergena pretraživanjem baza podataka	22
3.2.6. Ekstrakcija metabolita.....	22
3.2.7. Metabolomska analiza primjenom LC/MS sustava	23
3.2.8. Identifikacija bioaktivnih spojeva pretraživanjem baze COCONUT.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA	25
4.2. PROTEOMSKA ANALIZA	27
4.2.1. Alergeni.....	28
4.3. BIOINFORMATIČKA ANALIZA	28
4.4. METABOLOMSKA ANALIZA.....	29
4.5. RASPRAVA.....	32
4.5.1. Bioaktivni spojevi	33
4.5.1.1. Metabolička svojstva.....	33
4.5.1.2. Antioksidativno i protuupalno djelovanje.....	33
4.5.2. Digliceridi	34
4.5.3. Alergeni.....	34
4.5.4. Bioaktivni peptidi.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	37
6. LITERATURA	38

1. UVOD

Upotreba algi, zahvaljujući njihovom bogatom kemijskom sastavu i sadržaju bioaktivnih tvari, postala je uobičajena u raznim granama industrije (Scieszka i Klewicka, 2018). Alge su pretežno vodeni fotosintetski eukarioti, čija veličina ovisno o vrsti može varirati od mikroskopskih organizama do algi veličine 60 metara. Karakteristične su po tome što sadrže brojne pigmente, koji se razlikuju za svaku vrstu pojedinačno te su na osnovu sadržanog pigmenta svrstane u različite (pod)skupine (Andersen i Lewin, 2023).

Podskupinu algi čine i mikroalge, mikroskopski organizmi koji naseljavaju vrlo različite teritorije te samim time žive u širokom rasponu okolišnih uvjeta (Rizwan i sur., 2018). Mikroalge posjeduju biološke sustave koji mogu proizvoditi razne organske tvari koristeći sunčevu svjetlost (Richmond, 2004). Mikroalge proizvode važne spojeve kao što su antioksidansi, karotenoidi, enzimi, lipidi, polinezasićene masne kiseline, peptidi, toksini i steroli, koji se komercijalno koriste u proizvodima za ljudsku prehranu, stočnoj hrani, biogorivima, gnojivima, kozmetici te lijekovima (Rizwan i sur., 2018). Također, mikroalge imaju sve veću ulogu u biorafinerijama, gdje se koriste u proizvodnji biogoriva s manjim negativnim utjecajem na okoliš od goriva proizvedenog petrokemijskim putem (Radmer, 1996). Biomasa potrebna za proizvodnju navedenih proizvoda dobiva se u procesu sastavljenom od nekoliko tehnoloških faza, a to su: uzgoj, berba i ekstrakcija. Mikroalge se uzgajaju u otvorenim jezerima ili u kontroliranim okolišnim uvjetima zatvorenih fotobioreaktora. Mjesto i uvjeti uzgoja imaju velik utjecaj na konačno iskorištenje procesa, kao i na sastav kemijskih spojeva. Nakon uzgoja slijedi berba, odnosno odvajanje biomase od medija u kojem je uzgojena pomoću različitih tehnoloških operacija (filtracija, centrifugiranje, sedimentacija i slično). Ovaj dio jedan je od skupljih na putu k dobivanju proizvoda te prethodi ekstrakciji koja je specifičan proces ovisan o vrsti i namjeni krajnjeg proizvoda (Rizwan i sur., 2018).

Spirulina je komercijalni naziv za nekoliko mikroalgi iz roda *Arthrospira*, najčešće *Arthrospira platensis* i *Arthrospira maxima*. Prirodno stanište ovih mikroalgi su alkalna jezera čiji pH seže do 11, s visokom koncentracijom soli. Međutim, neke vrste izolirane su i iz kopnenih staništa što dokazuje njihovu veliku prilagodljivost (Grosshagauer i sur., 2020). Smatra se izvrsnim dodatkom prehrani, nije toksična, ima antikancerogena, antivirusna i antioksidativna svojstva te pozitivno djeluje na imunološki sustav (Ali i Saleh, 2012).

U ovom radu naglasak je stavljen na proteomsku i metabolomsku analizu spiruline, točnije vrste *Arthrospira platensis*, nitaste višestanične cijanobakterije (modrozelenne alge) u svrhu određivanja bioaktivnih spojeva (peptida i metabolita), kao i identifikaciju potencijalnih alergena (proteina). Korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije i spektrometrije masa (LC-MS) u kombinaciji sa specifičnim bioinformatičkim alatima provedena je proteomska analiza spiruline (u ovom radu se spirulina isključivo odnosi na vrstu *Arthrospira platensis*) u svrhu identifikacije bioaktivnih peptida, dok su metabolomskom analizom utvrđena pojedina bioaktivna svojstva ekstrahiranih metabolita. Proteomika je najsuvremeniji pristup za kvalitativno i kvantitativno profiliranje proteina, njihovih interakcija i modifikacija koristeći znanja iz biokemije, analitičke kemije, računalne analize i dostupnih baza podataka (Sinha i Mann, 2020).

Kao važan sastojak odgovoran za biološku aktivnost spiruline, prepoznati su bioaktivni peptidi. Aktivnost bioaktivnih peptida proizlazi iz primarne strukture peptida (tj. slijeda i sastava aminokiselina), dok se u najznačajnije aktivnosti ubrajaju antioksidativna, antimikrobna i antihipertenzivna (Nielsen i sur., 2017). Većina do danas poznatih bioaktivnih peptida dostupna je u bazi BIOPEP-UWM, u kojoj se podaci redovno ažuriraju i omogućuju pretraživanje bioaktivnih sekvenci i potencijalne bioaktivnosti peptida koristeći *in silico* strategije (Minkiewicz i sur, 2019).

Nadalje, metabolomska analiza temeljena na spektrometriji masa u kombinaciji s pretraživanjem dostupnih baza podataka i primjenom bioinformatičkih alata omogućuje profiliranje metabolita te predikciju njihove biološke aktivnosti.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ALGE

Alge su skupina fotosintetskih organizama koji pripadaju u carstvo biljaka. One su autotrofni organizmi koji naseljavaju vrlo različita staništa (Sahoo i Seckbach, 2015). Većinom rastu u vodi (vodene alge), na kopnu (kopnene alge), ali također mogu rasti kao epifitne biljke što znači da rastu pričvršćene na nekoj drugoj biljci (Petruzzello, 2020), kao endofiti koji žive između stanica u biljnim tkivima (Montana State University, 2023) te u ekstremnim staništima (Sahoo i Seckbach, 2015).

Ovu skupinu organizama krase velika raznolikost. Njihova veličina kreće se od jednostaničnih algi veličine nekoliko mikrometara do velikih morskih višestaničnih algi koje mogu narasti do više od 60 metara (Sahoo i Seckbach, 2015). Alge možemo definirati kao eukariotske organizme, od kojih većina ima sposobnost provođenja fotosinteze. One ne posjeduju specijalizirane višestanične reproduktivne strukture biljaka, pravi korijen, lisnate izdanke ni provodni sustav (Andersen i Lewin, 2023).

Njihova podjela koja se najčešće koristi datira u početak 19. stoljeća i bazirana je na osnovi boje – crvene, smeđe i zelene. Navedene boje rezultat su prisutnosti tri glavna pigmenta kloroplasta – karotenoida, klorofila i fikobilina. U algama se, naravno, nalazi puno više od ove tri vrste pigmenta te svaka vrsta algi sadrži svoj jedinstveni set pigmenata koji je razlikuje od ostalih vrsta (Andersen i Lewin, 2023).

Osim algi koje su eukariotski fotosintetski organizmi, također postoje i prokariotske alge koje u svojim stanicama nemaju jezgru. One su okupljene pod imenom modrozelenih algi ili cijanobakterije (Britannica, 2023).

2.1.1. Modrozelenih algi

Modrozelenih algi ili cijanobakterije su skupina organizama koji u svojoj strukturi nemaju organele odijeljene membranom, kao što su jezgra, mitohondriji, Golgijevo tijelo, endoplazmatski retikulum i kloroplasti. To svojstvo karakteristika je prokariota, odnosno bakterija. Ono što ih razlikuje od bakterija je prisutnost klorofila, a i fikobilina, što znači da mogu provoditi fotosintezu i proizvoditi kisik, dok bakterije, ako su fotosintetske, imaju neke druge pigmente i ne proizvode kisik (Fogg i sur., 1973). Upravo je prisutnost klorofila, a i fikobilina, koja rezultira karakterističnom modrozelenom bojom, zaslužna za ime ove skupine

organizama. Međutim, nisu svi pripadnici ove skupine isključivo modrozeleno boje (Britannica, 2023).

S druge strane, modrozeleno alge imaju puno sličnosti s eukariotskim algama, uključujući morfološke karakteristike i ekološke niše, te su zbog toga u prošlosti bile klasificirane kao alge. Osim toga, one također dijele sličnosti i sa životinjskim carstvom, s obzirom da njihove stanične membrane sadrže šećerne ostatke slične glikogenu (Usharani i sur., 2012).

2.2. SPIRULINA

Spirulina je komercijalno ime za višestanične filamentozne modrozeleno alge iz porodice *Arthrospira* sp. (Ali i Saleh, 2012). Vrste iz porodice *Arthrospira* sp. koje su u većini slučajeva obuhvaćene pod imenom spirulina su *Arthrospira maxima* i *Arthrospira platensis* (Grosshagauer i sur., 2020). Ove modrozeleno alge pažnju su privukle zbog svoje tradicionalne upotrebe kao hrana i trenutne komercijalne proizvodnje u velikom mjerilu radi hrane, funkcionalne hrane, dodataka prehrani, nutraceutika i hrane za životinje (Belay, 2013). Staništa u kojima su pronađene su područja tropske i subtropske regije u toplim vodama s visokim alkalitetom gdje pH seže do 11 i visokim udjelom karbonata/bikarbonata (Ali i Saleh, 2012).

Ove vrste karakterizirane su višestaničnim, filamentoznim i nerazgranatim rastom u obliku malih zelenih filamenata utkanih u spiralne oblike različite čvrstoće i broja, ovisno o soju. Takvi filamenti nazivaju se trihome. Veličina nastalih oblika može biti do 0,1 mm širine (Usharani i sur., 2012).

2.2.1. Faktori rasta

Uzgoj spiruline u velikom mjerilu provodi se u područjima s prikladnim klimatskim uvjetima tijekom godine. Životni ciklus spiruline je vrlo jednostavan. Do reprodukcije dolazi fragmentacijom zrele trihome u nekoliko kraćih segmenata pri čemu dolazi do uništavanja specijaliziranih stanica iz unutrašnjosti strukture koje se nazivaju nekridije. Novonastali kratki segmenti sastavljeni su od svega nekoliko stanica te će se potom elongirati binarnom diobom u jednoj ravnini okomitoj na duhu os filamenata (AlFadhly i sur., 2022). Na morfologiju

novonastalih filamenata utječu okolišni uvjeti, kao što su temperatura, svjetlost i nutrijenti (Usharani i sur., 2012).

Tijekom rasta, spirulina zahtijeva različit intenzitet svjetlosti. Optimalan intenzitet kreće se između 20 i 30 klux (Usharani i sur., 2012). Učinkovitost iskorištenja svjetlosti na specifičnu stopu rasta različitih vrsta modrozelenih algi razlikuje se ovisno o specifičnom soju, kao i o uvjetima rasta te se kreće od otprilike 3 do 30 %. Veće iskorištenje zabilježeno je pri višim koncentracijama nastale biomase, odnosno pri većoj optičkoj gustoći uz osigurano dobro miješanje u bioreaktorima (Belay, 2013). Upravo je učinak zasićenosti svjetlošću jedan od glavnih problema koji se javlja prilikom uzgoja algi u velikim bazenima na otvorenom, te onemogućava maksimalno iskorištenje procesa fotosinteze (Belay, 2013). Vonshak i Guy (1992) u svojem istraživanju u kojem su uspoređivali dva različita soja vrste *Arthrospira platensis* pri rastu na otvorenom, otkrili su da je fotosintetska aktivnost bila veća kod soja koji je uzgajan u 50 %-tnoj sjeni za razliku od onog koji je uzgajan nezasjenjen. U svojem kasnijem radu, Vonshak i suradnici (1996) uočili su da fotoinhibiciju pospješuju utjecaj visokih i niskih temperatura, visoka koncentracija soli, kisika i niska koncentracija ugljikovog dioksida.

Osim svjetlosti, veliki utjecaj na rast *Arthrospira* sp. također imaju i temperatura i pH. Optimalna temperatura varira ovisno o vrsti, ali također i među sojevima unutar iste vrste. Utvrđeno je da za rast i provođenje fotosinteze optimalna temperatura iznosi od 35 do 38 °C (Vonshak, 1997). Dnevne fluktuacije temperature mogu biti i do 20 °C, a optimalna temperatura za uzgoj spiruline na otvorenom postiže se tek u poslijepodnevnim satima tijekom ljeta. Zbog toga, poželjno je prilikom uzgoja koristiti sojeve čiji je temperaturni optimum za rast vrlo širok (Vonshak, 1988.). Održavanje odgovarajuće vrijednosti pH važno je za topljivost izvora ugljika i minerala u kulturama. Spirulina je pokazala najbolji rast pri vrijednostima pH od 9 do 11, a tijekom rasta dolazi do pada vrijednosti pH zbog prisutnosti bikarbonatnih i natrijevih iona (Usharani i sur., 2012). Pritom, važno je pH pri uzgoju održavati na vrijednosti iznad 9,5 kako bi se spriječio rast drugih algi (Belay, 2013).

2.2.2. Uzgoj i industrijska proizvodnja

Spirulina se smatra ekonomski vrlo važnom cijanobakterijom s godišnjom proizvodnjom iznad 10000 tona, što njenu kultivaciju čini najvećom mikroalgalnom kultivacijskom industrijom u svijetu (Usharani i sur., 2012). Prva komercijalna proizvodnja započela je 1970-tih godina berbom stalnog cvata alge *Arthrospira maximum* iz jezera Texcoco

u Meksiku, dok je prva proizvodnja u umjetnim jezerima započela 1978. godine u glavnom gradu Tajlanda, Bangkoku od strane tvrtke Dainippop Ink & Chemicals Inc. (Belay, 2013). U prethodnom odjeljku navedeni su uvjeti rasta potrebni za dobivanje zadovoljavajućih prinosa spiruline koji su doista ekstremni. Zbog toga, proizvođači spiruline svoje su proizvodne pogone locirali u tropskim i subtropskim područjima, čiji klimatski uvjeti omogućavaju proizvodnju tijekom cijele godine (Belay, 2013).

Postoje mnoge metode za uzgoj spiruline, ali najčešće se koriste otvoreni sustavi kao što su uzgoj u ribnjacima i jezerima te zatvoreni fotonaponski bioreaktori. Potonji se smatraju boljom opcijom s aspekta kontrole procesa jer je lakše regulirati uvjete uzgoja kao što su temperatura, vlaga, koncentracija ugljikovog dioksida, pH, intenzitet svjetlosti i sl. (Islam i sur., 2018). Spirulina koja je rasla u kontroliranom okruženju ne sadrži kontaminante što znatno olakšava kasnije procese u obradi biomase (AlFadhly i sur., 2022). S druge strane, uzgoj u otvorenim ribnjacima ili jezerima je jeftiniji od kultivacije u zatvorenim fotobioreaktorima. Međutim, limitiran je malim brojem vrsta algi koje u takvim uvjetima mogu rasti i dati dobar prinos te je ovisan o okolišnim faktorima (El-Sayed i El-Sheekh, 2018). Komercijalna proizvodnja spiruline može se podijeliti u četiri koraka: uzgoj algi, žetva biomase, sušenje biomase i pakiranje biomase (Belay, 2013).

Sam uzgoj može se provoditi kao šaržni ili polukontinuirani proces, a potonji se češće koristi u komercijalnoj proizvodnji ovih algi. Svaki uzgoj je specifičan jer ovisi o produktivnosti, troškovima nutrijenata i operacija te također i o konzistentnosti kvalitete proizvoda (Belay, 2013). Sojevi koji se koriste pri uzgoju izoliraju se iz prirodnih staništa ili se kupuju iz mikrobioloških zbirki, a Vonshak (1987) navodi pet kriterija koji su važni kako bi se *Arthrospira* sp. mogle koristiti u masovnoj proizvodnji, a to su rezistencija na fotoinhibiciju, slaba respiracija bez prisutnosti svjetlosti, visoka tolerancija na otopljeni kisik, velik temperaturni optimum i tolerancija na visoke koncentracije soli (Belay, 2013).

Uzgoj *Arthrospira* sp. u laboratorijskim uvjetima je jednostavan, te se mogu postići prinosi i od $50 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. S druge strane, uzgoj u velikom mjerilu ne daje zadovoljavajuće rezultate već se mogu postići prinosi od otprilike $25 \text{ g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$. Uvećanje procesa (tzv. *scaling up*) proizvodnje smatra se vrlo izazovnim upravo zbog teške kontrole cijelog uzgoja u velikom mjerilu. Također, uočena je i povezanost učestalosti kontaminacije kultura s povećanjem gustoće medija, odnosno kod većih koncentracija biomase (Belay, 2013).

Nakon uzgoja slijedi “berba” algi. Berba je kritičan dio procesa jer njena uspješnost posljedično utječe i na ukupnu efikasnost procesa. Može se provoditi na različite načine ovisno o metodi uzgoja i o soju uzgajanog organizma. U većini slučajeva provode se gravitacijske metode uz dodatak fluktuacijskih agenasa koje su gotovo univerzalne. Jedna od najkorištenijih metoda je također i takozvano samočišćenje, gdje se dobiveni mulj algi pumpa u tankove te se omogućava kontinuirani rad pumpe kroz ventile. Voda koja je u tom procesu drenažirana, reciklira se za daljnji uzgoj (El-Sayed i El-Sheehk, 2018).

Zadnji koraci u proizvodnji spiruline su sušenje i pakiranje. Važno je da se provedu pravilno kako ne bi došlo do kvarenja i kako bi se željena kvaliteta proizvoda održala. Konačni sadržaj vlage u proizvodu mora biti manji od 7 % kako bi se minimizirali utjecaj vode i mogućnost rasta bakterija. U industriji se, ovisno o željenom finalnom proizvodu i količini biomase, koriste razne metode sušenja. Neke od tih metoda su sušenje u bubanj sušionicima, sprej sušenje, solarno sušenje, unakrsno sušenje, vakumsko sušenje i sušenje smrzavanjem – liofilizacija (Becker, 1994). Proizvodi dobiveni od spiruline pakiraju se pod vakuumom kako bi se tijekom skladištenja te na putu do kupca očuvala njena svojstva. Tako pakirani proizvodi mogu biti uskladišteni i do 4 godine te pritom ne mijenjaju svoja svojstva (Belay, 2013).

2.2.3. Nutritivna vrijednost, utjecaj na zdravlje i toksičnost

Spirulina je poznata kao jedna od nutritivno najbogatijih namirnica na svijetu. Sadrži velike količine proteina građenih od svih esencijalnih aminokiselina. Također, sadrži visoke koncentracije B vitamina, željezo, magnezij, kalij i mnoge druge vitamine i minerale, te antioksidanse i lipide (Jung i sur., 2019). Istraživanjima je također dokazano da je teško generalizirati nutritivni sastav spiruline, zbog njegove velike ovisnosti o okolišnim uvjetima te o uvjetima uzgoja i procesima dobivanja gotovog proizvoda (Grosshagauer i sur., 2020).

2.2.3.1. *Proteini*

Proteinski sastav spiruline varira između 55 % i 70 % mase suhe tvari (Jung i sur., 2019). Ovaj tip mikroalge sadrži izrazito visoke koncentracije proteina u odnosu na ostale izvore proteina iz biljaka koje se koriste u prehrani (AlFadhly i sur., 2022). Gledajući kvalitativni sastav proteina, oni se smatraju kompletnima jer sadrže sve esencijalne aminokiseline u optimalnoj količini i omjeru, dok su prisutne manje koncentracije aminokiselina metionina, cisteina i lizina u odnosu na ostale izvore proteina iz hrane (Jung i sur., 2019).

2.2.3.2. Lipidi

Istraživanja su pokazala da lipidni sastav *Arthrospira* sp. može iznositi čak do 11 % korištenjem naprednih ekstrakcijskih sustava. Ukupni lipidi mogu se podijeliti na saponifikacijsku i nesaponifikacijsku frakciju, koja uključuje parafine, pigmente, terpene i sterole. Saponifikacijsku frakciju čine digliceridi, glicerol, mali udio triglicerida te neidentificirani fosfolipidi (AlFadhly i sur., 2022). Kao i kod proteinskog sastava, lipidni sastav također varira ovisno o okolišnim i uzgojnim uvjetima (Grosshagauer, 2020).

Analizama sadržaja masnih kiselina u *Arthrospira* sp., otkrivene su značajne koncentracije omega-6-masnih kiselina, posebice linolenske i gama-linolenske kiseline, dok su razine omega-3-masnih kiselina bile neznatne (Aouir i sur., 2017). S obzirom na ovaj podatak, spirulina se može smatrati vrijednim dijetetskim suplementom (Grosshagauer, 2020).

2.2.3.3. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati, u globalu, čine 15-25 % mase suhe tvari kod *Arthrospira* sp. Koncentracije pojedinačnih ugljikohidrata nisu velike, a oni koji se najčešće javljaju su jednostavni, poput glukoze, fruktoze i saharoze, ali također su prisutni i glicerol, manitol i sorbitol (AlFadhly i sur., 2022).

S obzirom na građu stanične stijenke kod *Arthrospira* sp., koja podsjeća na onu Gram-pozitivnih bakterija, prisutnost određene količine ugljikohidrata je logična. Stanične stijenke sastavljene su od glukozamina i muraminske kiseline, koji su povezani s peptidima (AlFadhly i sur., 2022).

2.2.3.4. Mikronutrijenti

Vitamini su esencijalni mikronutrijenti koje ljudski organizam ne može sam proizvoditi u dovoljnim količinama, pa ih je potrebno unositi hranom i suplementima. (Mikro)alge su poznate kao vrste bogate vitaminima, a spirulina se među njima posebno ističe te je radi toga najčešće korištena mikroalga u proizvodnji funkcionalne hrane (Mahmoud i sur., 2018). U sastavu spiruline nalaze se vitamini A (β -karoten), D, E, K i C te vitamini B kompleksa, kao što su tiamin (vitamin B₁), riboflavin (vitamin B₂), niacin (vitamin B₃), pantotenska kiselina (vitamin B₅), piridoksin (vitamin B₆), folatna kiselina (vitamin B₉) i kobalamin (vitamin B₁₂) (AlFadhly i sur., 2022).

Osim vitamina, spirulina također sadrži i različite minerale važne za funkcioniranje ljudskog organizma, kao što su kalij, kalcij, krom, bakar, željezo, magnezij, mangan, fosfor, selen, natrij, bor, molibden i cink (AlFadhly i sur., 2022).

2.2.3.5. Pozitivan utjecaj na zdravlje

Spirulina je proglašena idealnim prehrambenim i dijetetskim suplementom 21. stoljeća od strane Organizacije za prehranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (engl. *Food and Agriculture Organization*, FAO) (Pelizer i sur., 2003). Smatra se netoksičnom, nutritivnom hranom koja zbog svog bogatog sastava kojeg čine proteini, ugljikohidrati, esencijalne masne kiseline, vitamini, minerali i pigmenti, pozitivno djeluje na pojedina zdravstvena stanja, ali i na ukupno zdravlje čovjeka (Ali i Saleh, 2012).

Korištenje pripravaka od spiruline može doprinijeti gubitku kilograma te borbi protiv kardiovaskularnih bolesti, kod kojih snižava krvni tlak (Zeinalian, 2017). Osim toga, dokazano je da primjena spiruline izaziva značajnu redukciju razine kolesterola, lipoproteina niske gustoće te triglicerida (Grosshagauer, 2020).

U svom sastavu spirulina ima sve potrebne nutrijente za izgradnju zdravog imunskog sustava (Ali i Saleh, 2012). Ekstrakti spiruline pokazali su, između ostalog, antioksidativna, protuupalna, antitumorna, detoksifikacijska, antivirusna, antibakterijska i antidijabetička svojstva (Jung i sur., 2019).

2.2.3.6. Toksične tvari

Vrste spirulina spadaju u grupu cijanobakterija koje uobičajeno proizvode sekundarne metabolite, dok neke vrste proizvode i toksine kao što su mikotoksini, nodularini, saksitoksini, anatoksini i ostali (Grosshagauer i sur., 2020). Toksini su tvari koje stvaraju živi organizmi i štetni su za druge organizme kada ulaskom u tijelo djeluju kao antigeni te potiču stvaranje protutijela (antitoksina), koja ih mogu neutralizirati ako su u krvi u maloj količini. Veće količine toksina u krvi izazivaju taksemiju (Hrvatska enciklopedija, 2021).

Opasnost od prisutnosti citotoksina povećava se kod uzgoja *Arthrospira* sp. u nekontroliranom i nenadziranom uzgoju, kao što je uzgoj u otvorenim ribnjacima i jezerima. Kvalitetu i potencijalnu opasnost od toksičnosti jednostavnije je pratiti tijekom kultivacije u kontroliranim uvjetima, na primjer u zatvorenim fotobioreaktorima (Soni i sur., 2017).

Osim toksina, opasnost u sastavu spiruline predstavljaju i teški metali kao što su živa i kadmij te u nešto manjim koncentracijama arsen i aluminij (Rzymiski i sur., 2019).

2.2.3.7. Alergeni

Alergeni su tvari koje uzrokuje alergijsku reakciju pri čemu imunološki sustav pokreće stvaranje IgE protutijela za obranu od stranih tvari. Pretražujući literaturu, uočena je dokumentirana alergenost spiruline kod pojedinaca, što ukazuje na potrebu za provođenjem procjene rizika od alergenosti, uključujući ispitivanje potencijalne križne reaktivnosti s već poznatim alergenima radi eventualnog postojanja homologije slijeda aminokiselina (Le i sur., 2014; James i sur., 2023). Od alergena spiruline, poznat je C-fikocijanin beta podjedinica (Uniprot šifra P72508).

2.2.4. Upotreba u prehrani i preparatima

Još od davnih vremena poznata je upotreba spiruline kao dodatka prehrani kod ljudi koji su živjeli u blizini alkalnih jezera gdje je prvo pronađena. Koristili su je Azteci u Meksiku i ostali stanovnici srednje Amerike kao hranu, a stanovnici Čada jeli su je pod imenom „*dibe*” što je predstavljalo sušeni kruh. Ni ostatku svijeta nisu bile nepoznate njezine nutritivne vrijednosti, pa se tako koristila i u Africi i Aziji kao izvor proteina. Osim kod ljudi, spirulina se također koristi kao dodatak prehrani i kod uzgoja riba, škampi i peradi (Jung i sur., 2019).

Zbog svog bogatog sastava i nutritivne vrijednosti, spirulina se osim u prehrani koristi i u kozmetici, ali također i u novijoj grani kozmetike, nutrikozmetici. Nutrikozmetika obuhvaća suplemente koji, osim što djeluju na pozitivno na zdravlje nekog organizma, također poboljšavaju izgled kože, kose i noktiju (Ragusa i sur., 2021). Također, prilikom provedbe istraživanja potencijala upotrebe spiruline u kozmetici, dokazano je da posjeduje „*anti-age*” svojstva, odnosno da djeluje na pomlađivanje kože, da je hidratizira i posvjetljuje te djeluje antioksidativno. Osim toga, spirulina je pokazala pozitivne rezultate i u zacjeljivanju rana (Ragusa i sur., 2021).

2.2.5. Proizvodnja biodizela

Biomasa mikroalgi izvrstan je izvor za proizvodnju obnovljivih izvora energije, a prednost pred neobnovljivim izvorima je prvenstveno puno manja emisija stakleničkih plinova u atmosferu (Sumprasit i sur., 2016). Mikroalge zapravo pretvaraju solarnu energiju u biomasu

obogaćenu biomolekulama, kao što su lipidi, proteini i ugljikohidrati, s većim prinosima i manjim troškovima uzgoja nego biljke uljarice. Iz takve biomase proizvode se biogoriva, najčešće biodizel, bioplin i bioetanol (Vieira Costa i sur., 2019).

Biodizel je alkilni ester masnih kiselina koji se proizvodi iz obnovljivih izvora (Sumprasit i sur., 2016). On je biorazgradiv, netoksičan i obnovljiv izvor energije (Nautiyal i sur., 2014). Izgaranjem biodizela nastaje manje ugljikovog monoksida, ugljikovodika, čestica tvari i sumporovog dioksida u usporedbi s petrokemijskim gorivima. Međutim, nastaju povećane koncentracije dušikovih oksida te je biodizel slabe oksidacijske stabilnosti (Nautiyal i sur., 2014).

Međutim, biodizel proizveden iz algi još uvijek je otprilike dva puta skuplji od dizela dobivenog petrokemijskom industrijom. Zbog toga, potreban je razvoj novih i efektivnijih metoda koje bi omogućile konkurentnost biodizela na tržištu goriva (Chia i sur., 2018).

2.3. MULTI-OMIKA METODE U PROUČAVANJU MIKROALGI

Multiomika je novi pristup koji prikuplja velike količine podataka dobivene raznim „omikama”, kako bi se dobila jasnija i sveobuhvatnija slika o na primjer biološkim procesima, patologiji bolesti, ciljnim mjestima djelovanja za lijekove, biomarkerima i sl. Ovakav pristup naziva se multi-omički pristup, te služi za povezivanje genoma i epigenoma, transkriptoma i proteoma te za premošćivanje jaza između genotipa i fenotipa (Little, 2023). Osim genoma, epigenoma, transkriptoma i proteoma, multi-omika također obuhvaća i znanja o mikrobiomu (News Medical Life Sciences, 2019). Korištenje „omika” tehnologija revolucioniralo je znanost i njezinu primjenu. Kombinacija genomike, metabolomike i proteomike trenutno je „glava” biotehnologije (Fajardo i sur., 2019).

Većina izazova tijekom uzgoja mikroalgi sastoji se u razumijevanju njihove genetike, biologije i biokemije. Na primjer, proces uzgoja i optimizacije mikroalgi u laboratoriju kao izvora alternativnih proteina i/ili raznih nutrijenata zahtijeva razumijevanje biologije i biokemije mikroalgi. Spomenuti proces je vrlo složen te zahtijeva dugotrajno ulaganje kao i skupe i intenzivne eksperimente uzgoja i sistemske analitičke pristupe. Potrebno je identificirati sojeve sigurne za hranu, procijeniti kapacitet za proizvodnju proteina/mikronutrijenata, kao i njihovu sposobnost rasta u laboratorijskim/bioreaktorskim uvjetima (Helmy i sur., 2022). Dok metagenomika pomaže u identifikaciji i praćenju mikrobne zajednice, transkriptomika, proteomika i metabolomika koriste se u proučavanju odgovora

stanica (mikro)algi na hranjive tvari, okolišne uvjete i kontaminante (Nagarajan i sur., 2022). Nadalje, bioinformatički pristupi sistemske biologije, koji uključuju korištenje *in silico* modela omogućuju razumijevanje i mogućnost predviđanja u istraživanju mikroalgi olakšavajući i smanjujući troškove izvedbe eksperimenata (Helmy i sur., 2022). Uz pomoć ovih sustava, povećana je preciznost predviđanja biološke aktivnosti pojedinih molekula (Maghembe i sur., 2020). Također, dobiveni podaci mogu se koristiti za identifikaciju korelacija kod ekspresije gena, koregulacije genskih klastera i različito aktiviranih gena, proteina ili metabolita između uzoraka (Helmy i sur., 2022). Navedene moderne omika tehnike omogućavaju bolje razumijevanje biologije mikroalgi, otkrivaju ključne molekule i puteve važne za kvalitetu i kvantitetu proizvedenih proteina (Helmy i sur., 2022).

U ovom radu, detaljnije će biti objašnjene proteomika i metabolomika, međutim prilikom rješavanja nekih kompliciranih istraživačkih pitanja, jasno je kako je potrebno sveobuhvatno znanje „omika“ metoda kako bi se dobio odgovor i omogućilo razumijevanje problema (News Medical Life Sciences, 2019).

2.3.1. Proteomika

Proteomika je dio multi-omike koja se bavi karakterizacijom proteoma, uključujući ekspresiju, strukturu, funkcije, interakcije i modifikacije proteina (Aslam i sur., 2016). To je fundamentalna tehnika za otkrivanje molekularne dinamike uključene u sve biološke procese, dajući funkcionalne informacije osigurane od strane proteoma (Carrasco-Reinado i sur., 2022). Proteom je skup svih proteina u stanici organizma (Rogers, 2022). Proteini su efektori bioloških funkcija i njihove koncentracije nisu samo ovisne o koncentraciji mRNA već također ovise i o kontroli translacije i regulacije kod domaćina. Zbog toga, proteomika se smatra najrelevantnijim pristupom za razumijevanje bioloških sustava (Aslam i sur., 2016). Visokoučinkovite proteomske tehnologije kombinirane s naprednim bioinformatičkim alatima intenzivno se koriste za identifikaciju molekularnih znakova nastanka bolesti baziranih na molekularnim putevima i kaskadama signalnih molekula (Cho, 2007). Razvijen je koncept primijenjene proteomike koji je pokazao da se pretraživanjem dostupnih baza podataka mogu identificirati proteini te se primjenom kvantitativnih proteomskih pristupa može kvantificirati „cijeli“ proteom ili samo ciljani proteini (Carrasco-Reinado i sur., 2022).

Osnovna strategija u proteomskim analizama bazirana je na ekstrakciji proteinske komponente iz uzorka, razgradnji proteina kako bi se iz njih dobili peptidi koji se zatim razdvajaju kromatografskim metodama i identificiraju spektrometrijom masa visoke rezolucije

(Fernández-Acero i sur., 2019). Priprema uzoraka najvažniji je korak u proteomskim analizama te značajno utječe na rezultate eksperimenta (Aslam i sur., 2016). Određena stanica može imati od nekoliko kopija do nekoliko milijuna kopija proteina. Predanalitička obrada uzoraka uključuje razne metode frakcioniranja i obogaćivanja proteinima (Bodzon-Kulakowska i sur., 2007). Osim toga, koriste se razne fizikalne i kemijske tehnike kao što su zamrzavanje, sonikacija, centrifugiranje te korištenje lizirajućih pufera (Islam i sur., 2004).

U okvirima molekularnih tehnologija, proteomika je važna za istraživanje potencijala mikroorganizama za proizvodnju od industrijskog interesa (Fernández-Acero i sur., 2011). Na temelju informacija dobivenih proteomskom analizom kreiraju se strategije u genetičkom inženjerstvu (Vaudel i sur., 2016).

Osim toga, proteomika je najefikasnija za dobivanje informacija o funkcioniranju, odnosno životu mikroalgi (Fernández-Acero i sur., 2011) što je osobito važno za usporedbu proteinskog sastava mikroalgi uzgojenih u različitim uvjetima, odnosno za otkrivanje korelacije između sastava i ponašanja mikroalgi ovisno o uvjetima u kojima su uzgojene (Carrasco-Reinado i sur., 2022). Ispitivanje navedenih karakteristika mikroalgi povećat će njihovu upotrebu u biotehnološkoj proizvodnji što će u konačnici dovesti do razvoja novih mikroalgi sa selektivnim poželjnim karakteristikama, a sve s ciljem optimiziranja biotehnološke proizvodnje molekule od interesa (Carrasco-Reinado i sur., 2022).

2.3.2. Metabolomika

Metabolomika je sveobuhvatna analiza endogenih metabolita s nastojanjem sistematske identifikacije i kvantifikacije metabolita u biološkom sustavu (Zhang i sur., 2012). Metaboliti su male molekule koje su produkti ili međuprodukti metabolizma (Struna, 2011). Oni zapravo predstavljaju biološke faktore koji se smatraju indikatorima normalnih bioloških i patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapiju (Yanes i sur., 2011).

Osim toga, metabolomika je zaslužna za istraživanje kompleksnih interakcija između samih metabolita, ali također i regulatorne uloge metabolita u interakciji s genima i proteinima, odnosno takozvane alosteričke regulacije (Zhang i sur., 2012). Ona se fokusira na kompleksne interakcije mikro- i makromolekula, a ne na individualne molekule i na taj način pruža jasan uvid u staničnu homeostazu (Liu i sur., 2010).

Iako je metabolomika završna točka takozvane „omičke” kaskade i najbliža je definiranju fenotipa, još uvijek ne postoji instrument ni metoda koja bi analizirala sve metabolite istovremeno (Dettmer i sur., 2006).

Trenutno, dva su pristupa u upotrebi pri metaboličkim analizama: metaboličko profiliranje i metabolički otisak prsta (Dettmer i Hammock, 2004). Metaboličko profiliranje bavi se analizom grupe metabolita koji su povezani ili sa specifičnim metaboličkim putem ili vrstom komponenti (Fiehn, 2002). Rezultati metaboličkog profiliranja su kvalitativni i kvantitativni te omogućuju integraciju dobivenih rezultata s rezultatima ostalih „omika” (Dettmer i sur., 2006). Kod metaboličkog otiska prsta, cilj nije identificirati svaki promatrani metabolit, već usporediti uzorke odnosno „otiske” metabolita koji se mijenjaju kao odgovor na bolest, izloženost toksinima ili neke promjene u okolišu ili genomu (Dettmer i sur., 2006).

2.4. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa je analitička tehnika kod koje se kemijske supstance identificiraju na temelju raspodjele iona u plinovitom stanju u električnom i magnetskom polju, na temelju njihovih omjera mase i naboja (m/z). Uređaji koji se koriste za provođenje spektrometrije masa nazivaju se spektrometri masa (Beynon i Brown, 2023).

Spektrometar masa sastoji se od izvora ionizacije, koji prevodi molekule analita u ione u plinovitom stanju, analizatora koji razdvaja ionizirane analite na osnovu njihovog omjera mase i naboja (m/z) te detektora koji bilježi broj iona iste vrijednosti omjera mase i naboja (m/z) (Han i sur., 2008). Dvije najčešće korištene tehnike ionizacije su matriksom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI) i ionizacija elektroraspršenjem (ESI). MALDI se većinom koristi za analiziranje relativno jednostavnih smjesa proteina, dok ESI spregnut s tekućinskom kromatografijom služi za analizu kompleksnih uzoraka (Aebersold i Mann, 2003). Analizatori mase razlikuju se prema principu kojeg koriste za razdvajanje iona. Najčešće korišteni analizator je kvadrupolni analizator, te se najčešće kombinira s analizatorom vremena proleta (TOF, engl. *time of flight*) ili Orbitrap analizatorom (Sinha i Mann, 2020).

2.4.1. Ionizacija

Kod ionizacije elektroraspršenjem nastaju višestruko nabijeni ioni korištenjem potencijala tekućine koja protječe kroz kapilaru pod naponom. Odvija se pri atmosferskom tlaku u struji dušika i temperaturama višim od 100 °C (Cindrić i sur., 2009). Nakon ulaska u

ionizator kroz kapilaru formira se takozvani „sprej” malih kapljica sastavljenih od analita i otapala. Slijedi uklanjanje otapala primjenom topline ili nekog drugog oblika energije, na primjer prilikom kolizije s plinom. Kapljice se sve više smanjuju i sadržavaju višestruko nabijene ione, te s vremenom dostižu kritičnu veličinu za trenutnu količinu naboja i eksplodiraju u još sitnije kapljice. Pritom se postiže elektrostatsko odbijanje dovoljno veliko da izazove desorpciju iona analita, koji se zatim usmjeravaju do analizatora (Cho, 2007). S obzirom da su formirani ioni najčešće višestruko nabijeni, matematičkim transformacijama nastaju spektri masa iz kojih se može očitati molekularna masa iona ili iona fragmenata (Smith i sur., 2007).

Druga najkorištenija tehnika ionizacije je MALDI. To je pulsna tehnika kojom većinom nastaju jednostruko nabijeni ioni (Galić i Cindrić, 2008). Za ionizaciju ovom tehnikom protein/peptid mora biti otopljen u matrici koju sačinjavaju male organske molekule koje apsorbiraju UV-zračenje. Takva kristalična struktura apsorbira zračenje iste valne duljine koju emitira laser. Energija lasera će izazvati brzo pobuđivanje matriksa i ionizaciju proteina/peptida te će matriks i ioni analita prijeći u plinovitu fazu. Takvi ionizirani proteini će biti ubrzani od strane električnog polja do analizatora (Cho, 2007).

2.4.2. Analizatori

Kvadrupolni analizatori (engl. *Quadrupole*, Q) razdvajaju ione korištenjem oscilirajućeg električnog polja. Sastoje se od četiri cilindrična metalna štapića, od kojih su dva i dva nasuprotna jednakog naboja. Svaki od tih parova proizvodi radiofrekvencijsko električno polje s faznim pomakom (Sinha i Mann, 2020). Ovisno o tome koja je struja korištena u sustavu, kroz analizator će prolaziti samo ioni određene vrijednosti omjera mase i naboja (Cindrić i sur., 2009).

TOF (engl. *Time of flight*) analizatori ili analizatori vremena proleta analiziraju razdvojene ione na osnovu njihovih razlika u brzinama nakon ubrzanja do otprilike 20 kV te posljedično tome, različitog vremena dolaska do detektora (Sinha i Mann, 2020). Njihova brzina obrnuto je proporcionalna njihovoj masi pa će tako ioni manje mase postizati veće brzine (Cindrić i sur., 2009).

Postoji i kombinacija navedena dva analizatora koja se naziva Q TOF, odnosno kvadrupolni analizator vremena proleta. Ona spaja svojstva odabira iona kvadrupolnog analizatora s visokom razlučivošću mase i preciznošću TOF-a u jednom sustavu. Omjer mase

i naboja određuje se mjerenjem vremena proleta ubrzanih iona u električnom polju poznate jakosti na poznatoj udaljenosti, pri čemu će teži ioni putovati sporije od lakših (Henry Royce Institute, 2023).

Orbitrap analizator razlikuje ione na temelju njihovih oscilacija u frekvencijama. Ioni se tangencijalno injektiraju, a zatim ostanu zarobljeni u Orbitrapu i kreću se duž osi centralne metalne osovine. Iako je cijeli analizator dugačak samo nekoliko centimetara, ioni zarobljeni u njemu velikim brzinama prevalit će put i do nekoliko kilometara, pritom dajući veliku rezoluciju i veliku preciznost mase (Sinha i Mann, 2020).

2.4.3. Analiza proteina

Analizu proteina spektrometrijom masa moguće je provoditi na dva načina: odozgo prema dolje (engl. *top-down*) i odozdo prema gore (engl. *bottom-up*). Kod načina odozgor nadolje analizira se potpuni primarni slijed aminokiselina i posttranslacijskih modifikacija intaktnog proteina unutar samog instrumenta. On zahtijeva točno mjerenje masa i vrlo često provođenjem navedenog postupka dolazi do gubitka strukturne informacije. Način odozdo nagore češći je način analize i obuhvaća enzimsku ili kemijsku razgradnju, odnosno cijepanje proteina u gelu ili otopini pomoću proteinaze, glikozidaze, hidrolirajućih reagensa ili nekih drugih enzima i kombinacija. Nastali fragmenti se analiziraju nekom od tehnika masene spektrometrije te se dobivaju podaci o strukturi (Galić i Cindrić, 2008).

2.4.4. Analiza metabolita

Glavni zadatak metabolomike je provesti sveobuhvatnu kvalitativnu ili kvantitativnu analizu metabolita prisutnih u uzorku (Goodacre i sur., 2004). Najvažniji dio analize je priprema uzorka, jer svaka promjena može dovesti do netočnih krajnjih rezultata (Riekeberg i Powers, 2017). Za razliku od proteomske i genomske analize, kod kojih se uzorci mogu pripremiti korištenjem jedinstvenog ekstrakcijskog protokola, metaboliti su vrlo različiti po svom kemijskom sastavu te ih je teško ekstrahirati korištenjem jednog otapala (Fernie i sur., 2004). U većini slučajeva, metaboliti će se ekstrahirati po principu „slično otapa slično”, pa će se tako polarni ekstrahirati pomoću hidrofilnih otapala, a nepolarni pomoću hidrofobnih otapala. Izabrani ekstrakcijski protokol mora omogućavati brzu i efikasnu ekstrakciju što većeg dijela metabolita iz uzorka, s visokom preciznošću i točnošću (Salem i sur., 2020)

Postupci analize metabolita raznoliki su, a među četiri najčešće korištena pristupa su plinska kromatografija (engl. *Gas Chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC) u kombinaciji sa spektrometrijom masa (Salem i sur., 2020). Kombinacija plinske kromatografije i spektrometrije masa koristi se za analizu hlapivih i djelomično hlapivih organskih komponenata. Polarni metaboliti se prvo derivatiziraju kako bi postali hlapivi i zatim se razdvoje pomoću plinske kromatografije (Fiehn, 2002). Razdvojeni metaboliti ulaze u spektrometar masa, gdje se ioniziraju i analiziraju čime nastaju spektri masa koji se zatim analiziraju pomoću različitih računalnih programa. Prednost ove metode je osjetljivost, ponovljivost i mogućnost analize velikog broja uzoraka (Salem i sur., 2020). Drugi često korišteni pristup je kombinacija tekućinske kromatografije i spektrometrije masa, koja može analizirati širok raspon različitih metabolita. Prednost naspram kombinacije s plinskom kromatografijom je što ne zahtijeva prethodnu kemijsku obradu uzorka, te se uzorci dobiveni nakon ekstrakcije mogu odmah analizirati. Razdvajanje metabolita u ovoj metodi temelji se na njihovim različitim kemijskim svojstvima. Unaprjeđenje ove metode dovelo je do razvoja tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *Ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) koja posjeduje veću rezoluciju, osjetljivost i kapacitet analize uzorka (Salem i sur., 2020).

2.4.5. Identifikacija proteina i metabolita primjenom baza podataka

Proteomika i metabolomika zahtijevaju upotrebu različitih računalnih (statističkih i bioinformatičkih) alata, kao i baza podataka kako bi se efektivno detektirali i klasificirali proteini i metaboliti usporedbom eksperimentalno dobivenih podataka s podacima u bazama podataka, na temelju njihove specifične funkcije i metaboličkih puteva (Vo i sur., 2021). Kod proteomske analize, pretraživanje proteina/peptida ograničeno je biologijom (postojanje sekvenciranog genoma određene vrste) i kemijom (mogućnošću detekcije peptidnih iona ili njihovih fragmenata). Proteinske baze podataka za mnoge vrste su javno dostupne, na primjer baza Uniprot ili NCBI. S druge strane, pretraživanje baza podataka metabolita je kompleksnije zbog puno veće strukturne raznolikosti, te time i raznolikih rezultata fragmentacije u odnosu na peptide kod kojih se peptidna veza cijepa na predvidljiv način. Zbog toga, nastoje se kompilirati baze podataka koje će sadržavati empirijski izvedene ili simulirane spektre metabolita, zajedno s odgovarajućim informacijama o kemijskom sastavu, strukturi i ostalim važnim parametrima. Neke od ovih baza su PubChem, HMDB i METLIN (Blum i sur., 2018).

3.MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Ispitivani uzorak algi

U eksperimentalnom dijelu rada korišten je liofilizirani uzorak mikroalge *Arthrospira platensis*, jedne od vrsta algi okupljenih pod zajedničkim imenom spirulina. Spirulina je uzgojena u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi Instituta Ruđer Bošković, te je dobivena biomasa liofilizirana i pohranjena na –20 °C do analize.

3.1.2. Kemikalije

- Acetonitril, LC-MS čistoće, Honeywell Internacional Inc., Morris-Plains, SAD
- Acetonitril, za LC, Honeywell, Charlotte, NC, USA
- Ditiotreitol, DTT, P.A. čistoće, Sigma, Steinhem, Njemačka
- Izopropanol, LC-MS čistoće, Honeywell, Charlotte, NC, SAD
- Jodoacetoamid, IAA, P.A. čistoće, Sigma, Steinhem, Njemačka
- Kloroform, za LC, Honeywell, Charlotte, NC, USA
- Metanol, za LC, Honeywell, Charlotte, NC, USA
- Metanska kiselina, LC-MS čistoće, Sigma, Steinhem, Njemačka
- MilliQ voda, LC-MS čistoće, Honeywell, Selsze, Njemačka
- Mravlja kiselina, za LC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Natrijev dodecilsulfat, SDS, P.A. čistoće, Sigma, Steinhem, Njemačka
- Trietilamonijev bikarbonat, TEAB, LC-MS čistoće, Honeywell Internacional Inc., Morris-Plains, SAD
- Tripsin Gold, LC-MS čistoće, Promega, Madison, SAD
- Urea, P.A. čistoće, Sigma, Steinhem, Njemačka
- Voda, LC-MS čistoće, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.1.3. Komercijalni set

- RC-DC set za određivanje koncentracije proteina, Bio-Rad, Dreieich, Njemačka

3.1.4. Uređaji i oprema

- Centrifuga (Universal 320, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Njemačka)
- Vakuum koncentrator Speedvac (DNA Speedvac System, ThermoScientific Fisher, Waltham, Massachusetts, SAD)
- Ultrazvučna kupelj (Wisd, Wisd Laboratory Elements, Werdheim, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Bandelin electronic, Njemačka)
- Ultrazvučna sonda (Osonica, Newtown, SAD)
- Termostatirani inkubator (Eppendorf, Njemačka)
- Analitička vaga (WBA-220, Wisd Laboratory Elements, Werdheim, Njemačka)
- Spektrofotometar, mikročitač (Tecan, Austria GmbH, Salzburg, Austrija)
- Filteri za ultrafiltraciju (10 kDa MWCO, Millipore, Njemačka)
- Kolone za tekućinsku kromatografiju: InfinityLab Poroshell 120EC-C18 (2,1 x 50 mm, 1,9 μ m) (Agilent Technologies, SAD) i nano analitička kolona (75 μ m x 20 cm) ručno pakirana punilom RP ReproSil-Pur C18-AQ 1.9- μ m (Dr. Maisch GmbH)
- Vezani sustav EASY-nLC™ 1200 System i spektrometar masa Q Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD)
- Vezani sustav 1290 Infinity II UHPLC i spektrometar masa 6546 LC/QTOF (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, SAD)

3.1.5. Računalni programi

- Agilent MassHunter Acquisition Software (V.10.1) (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, SAD)
- Agilent MassHunter Mass Profiler (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, SAD)
- Peptide Ranker <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/> (pristupljeno 20.07.2023.)
- Proteome Discoverer, verzija 2.3. (Thermo Fisher Scientific, Rockford, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina

Uzorci algi (20 mg) otopljeni su u 1 ml pufera za lizu (8 M urea, 2 % natrijev dodecil sulfat, 0,05 M DTT u 0,1 M TEAB-u) te su sonicirani na ledu (3 ciklusa maksimalne amplitude, 10 s), zatim vorteksirani 1 minutu na 2700 rpm, ponovno 2 puta sonicirani te centrifugirani 5 minuta na 13000 $\times g$ na 4 °C. Supernatant je odvojen i premješten u nove tubice i u njemu je određena koncentracija ukupnih proteina, a ostatak supernatanta je iskorišten za proteomsku analizu koristeći sustav LC-MS, čemu je prethodila digestija proteina.

Za određivanje koncentracije proteina korišten je komercijalni set RC-DC. RC-DC je set za kolorimetrijsku analizu. Set se sastoji od kompatibilnih reducirajućih agenasa (RC), Reagens I i Reagens II, te od kompatibilnih detergenata (DC). Provođen je protokol za mikroeprovete (volumen uzorka 1,5 ml) te je provedeno dvostruko ispiranje zbog uree koja interferira spektrofotometrijskoj analizi. Kao standard je korišten fetalni goveđi serumski albumin. U kivetu volumena 50 ml dodano je 1,5 μ l DC Reagens A za svakih 250 μ l DC Reagens B koji će biti potreban za analizu. Ta otopina je nazvana Reagens A'. Svakom pripremljenom standardu i uzorku dodano je 127 μ l Reagens A'. Pripremljeno je 7 razrjeđenja proteinskog standarda u koncentracijama od 0,125 mg/ml do 2 mg/ml proteina, jedna slijepa proba te 3 uzorka spiruline od kojih je jedan bio razrijeđen 10 puta, a jedan 100 puta. Pipetirano je 25 μ l standarda i uzoraka u čiste i suhe mikrocentrifugalne epruvete. U svaku epruvetu dodano je 125 μ l RC Reagens I te su iste vorteksirane. Slijedila je inkubacija 1 minutu na sobnoj temperaturi. Nakon toga u svaku epruvetu dodano je 125 μ l RC Reagens II te su epruvete vorteksirane, nakon čega je slijedilo centrifugiranje 5 minuta na 15000 $\times g$. Okretanjem epruveta na čist i suh papirnati ručnik uklonjen je supernatant. Navedeni postupak ispiranja ponovljen je još jednom. Zatim je dodano 127 μ l Reagens A' u svaku epruvetu i one su vorteksirane te inkubirane na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga su još jednom vorteksirane i dodano je 1 ml DC Reagens B. Ponovno je uslijedilo vorteksiranje te inkubacija pri sobnoj temperaturi 15 minuta. Poslije 15 minuta standardima i uzorcima izmjerena je apsorbancija pri 750 nm.

3.2.2. Digestija proteina korištenjem filtera za ultrafiltraciju (FASP)

FASP (engl. *Filter-Aided Sample Preparation*) je metoda koja služi za pročišćavanje i ukoncentriravanje proteina, odnosno njihovu digestiju korištenjem filtera za ultrafiltraciju.

Pomoću ove metode, dobiveni su denaturirani proteini koji se zadržavaju na filteru veličine pora od 10 kDa gdje se vrši digestija tripsinom i ispiranje soli koje nisu kompatibilne s analizom spektrometrijom masa. Ova metoda daje čiste triptičke peptide, a uklanja nedigestirane proteine i nukleinske kiseline. Pri provođenju ove metode koriste se komercijalno dostupni filteri za ultrafiltraciju (Wisniewski i sur., 2009).

Uzorak volumena koji odgovara masi od 100 µg proteina dopunjen je do volumena od 100 µl urea puferom te prenesen na 10 kDa filtere. Uslijedilo je centrifugiranje 20 minuta pri 13000 xg pri 20 °C i ponovno ispiranje urea puferom, te su proteini zatim alkilirani pomoću 50 mM jodoacetamida 20 minuta pri sobnoj temperaturi u mraku, dva puta isprani urea puferom te dva puta pomoću 100 µl TEAB-a. Digestija na filteru provedena je dodatkom tripsina (γ (tripsin) = 1 mg/ml), nakon čega je uslijedila inkubacija preko noći pri 37 °C. Sljedeći dan, peptidi su eluirani uz dodatak 50 µl smjese TEAB/acetonitrila (1:1,v/v).

3.2.3. Proteomska analiza korištenjem sustava LC-MS

Uzorci (N=3) su analizirani pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa visoke rezolucije postupkom podatkovno ovisne akvizicije (DDA, engl. *Data Dependent Acquisition*) koristeći metodu Top12 kao što je prethodno opisano (Cvetešić i sur., 2016). Ukratko, analiza visoke rezolucije LC-MS/MS provedena je korištenjem EASY-nLC™ 1200 sustava vezanog sa spektrometrom masa Q Exactive Plus. Pročišćeni peptidi su razdvojeni na koloni (75 µm x 20 cm, ReproSil-Pur C18-AQ, 1.9 µm) pri temperaturi 40 °C korištenjem linearnog gradijenta od 130 min. Mobilna faza A se sastojala od 0,1 % metanske kiseline u vodi, a mobilna faza B od 0,1 % metanske kiseline, 80 % ACN, a ostatak je činila MilliQ voda. Spektar masa snimljen je u rasponu od 300,0 m/z do 1750,0 m/z pri rezoluciji od 60000 i AGC vrijednošću 3×10^6 . Fragmentacija je provedena koristeći normaliziranu kolizijsku energiju (NCE) 28 % s rezolucijom 30 000 i AGC vrijednošću 1×10^5 . Za identifikaciju peptida korišten je algoritam SEQUEST integriran u programu Proteome Discoverer. Provedena je pretraga baze podataka *Spirulina* sp., koja je preuzeta iz baze podataka UniprotKB.

3.2.4. Identifikacija bioaktivnih peptida *in silico*

Peptidi koji su identificirani korištenjem programa Proteome Discoverer korišteni su za predviđanje potencijalne bioaktivnosti *in silico* primjenom mrežnog alata PeptideRanker <http://distilldeep.ucd.ie/PeptideRanker/> (pristupljeno 20.07.2023.). PeptideRanker je server za predviđanje bioaktivnosti peptida. Korisnici mogu unijeti popis peptida od interesa u PeptideRanker i kao rezultat dobiti peptide rangirane prema vjerojatnosti da su bioaktivni. Važno je napomenuti da ovaj server ne predviđa stupanj bioaktivnosti peptida. Dostupne su i brojne baze podataka za predviđanje bioaktivnosti peptida, kao što su BIQPEP ili PeptideDB. Iako postoje preklapanja između ovih baza, svaka od njih je fokusirana na određenu vrstu peptida/proteina. BIQPEP je baza podataka biološki aktivnih sekvenci i procjenu proteina kao prekursora bioaktivnih peptida. Grupe aktivnosti proteina koje se nalaze u BIQPEP bazi uključuju antitrombotičke peptide, antiamnesticke, hemolitičke peptide, toksine celijakije, neuropeptide, antibakterijske peptide, opioidne peptide, heparinske vežuće, antikancerogene, imunomodularne, antioksidativne i peptide označene kao inhibitori, regulacijski i stimulirajući. Baza podataka PeptideDB uključuje citokine i faktore rasta, peptidne hormone, antimikrobne peptide, peptide toksina/otrova i proteine protiv smrzanja. Ipak, ne postoje metode predviđanja koje pokrivaju ove grupe peptida (Nardo i sur., 2018).

3.2.5. Identifikacija alergena pretraživanjem baza podataka

Za identifikaciju alergena korišten je algoritam SEQUEST integriran u programu Proteome Discoverer. Provedena je pretraga baze podataka alergena preuzeta iz baze podataka Allergome (<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=Allergome#>) koja je integrirana u bazi podataka UniprotKB prema parametrima kao što je opisano u literaturi (Bianco i sur. 2022). Za pretraživanje su korišteni tandemni spektri masa dobiveni analizom proteomskog ekstrakta spiruline. Rezultati dobiveni u Proteome Discovereru provjereni su pretražujući dostupnu objavljenu znanstvenu literaturu.

3.2.6. Ekstrakcija metabolita

Metaboliti su iz liofiliziranog uzorka spiruline ekstrahirani smjesom otapala ψ (CHCl_3 , CH_3OH , H_2O) = 1:3:1. Nakon dodatka otapala, smjesa biomase i otapala sonicirana je na ledu (3 ciklusa maksimalne amplitude, 10 s), vorteksirana 1 min na 2700 rpm i ponovno sonicirana 2 puta. Svi su uzorci centrifugirani na 13 000 xg u trajanju od 5 minuta na 4 °C. Volumen od

200 µL odvojenog supernatanta filtriran je u analitičke tubice i pohranjen na -80 °C do daljnje analize.

3.2.7. Metabolomska analiza primjenom LC/MS sustava

Ekstrakti spiruline (N=3) analizirani su korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (UHPLC) i spektrometrije masa (MS)-1290 Infinity II UHPLC i 6546 LC/QTOF, za što je razvijena nova LC-MS/MS metoda kako bi se omogućila identifikacija što većeg broja metabolita. Za analizu je korištena kolona InfinityLab Poroshell 120EC-C18 (2,1x50mm, 1,9 µm) s odgovarajućom predkolonom grijana na temperaturi od 40 °C uz protok 0,4 ml/min. Injektirano je 3 µl uzorka. Ekstrahirani spojevi eluirani su koristeći linearni gradijent od 20-100 % B, pri čemu je mobilna faza A bila sastavljena od smjese acetonitrila i 0,1 % mravlje kiseline (1:9, v/v), a B od smjese izopropanola i acetonitrila (1:1, v/v) uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline. Kao detektor korišten je spektrometar masa u pozitivnom i negativnom načinu rada. Parametri MS analize bili su sljedeći: napon kapilare 3500 V, fragmentor 175, raspon masa 100-1400 m/z , temperatura plina 225 °C, protok plina 13 L/min. Fragmentacija je postignuta pri kolizijskoj energiji od 20 i 35. Iz fragmentacije su izuzeti ioni postojani u slijepoj probi pri početnim uvjetima gradijenta. Za internu kalibraciju korištena je referentna otopina spojeva poznatih omjera mase i naboja (m/z) 121,0509 (purin) i 922,0098 (heksakis (1H, 1H, 3H-tetrafluorpropoksi) fosfazin u pozitivnom te referentna otopina spojeva poznatih omjera mase i naboja (m/z) 112,985587 (TFA) i 1033,988109 (heksakis (1H, 1H, 3H-tetrafluorpropoksi) fosfazin) u negativnom načinu rada. Po završetku analize dobiveni sirovi podaci eksportirani su u .mgf formatu koristeći program Agilent MassHunter (v.10.1) u svrhu identifikacije biološki aktivnih spojeva.

3.2.8. Identifikacija bioaktivnih spojeva pretraživanjem baze COCONUT

Za identifikaciju prirodnih spojeva iz ekstrakata spiruline s unaprijed određenom biološkom aktivnošću korištena je baza podataka COCONUT (engl. *COllection of Open Natural prodUCts*) <https://coconut.naturalproducts.net/>. COCONUT je skupni repozitorij označenih i predviđenih prirodnih proizvoda prikupljenih iz različitih otvorenih izvora. On nudi pregledavanje, pretraživanje i preuzimanje podataka povezanih s prirodnim proizvodima te na taj način omogućava izradu vlastitog repozitorija prirodnih proizvoda (Sorokina i sur.,

2021). Postupak je detaljno opisan u literaturi (Vadlja i sur., 2022), a sastoji se u usporedbi eksperimentalno dobivenih tandemnih spektara masa (MS/MS) s postojećim podacima u bazi COCONUT primjenom algoritma DEREPLIKATOR +. Algoritam je korišten za dereplikaciju spektara masa i identifikaciju metabolita koji uključuju prirodne peptide, poliketide, terpene, benzenoide, alkaloidne, flavonoide i druge klase prirodnih proizvoda (Mohinami i sur., 2018).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu napravljena je identifikacija peptida, proteina i metabolita u uzorku alge *Arthrospira platensis* proizvedene u laboratoriju. Pomoću komercijalnog seta RC-DC određena je koncentracija proteina u uzorku. Uslijedila je digestija proteina tripsinom koristeći filtere za ultrafiltraciju (engl. *Filter Assited Sample Preparation*, FASP), nakon čega su provedene proteomska i bioinformatička analiza.

Peptidi i proteini su identificirani korištenjem algoritma SEQUEST integriranog u program Proteome Discoverer pretraživanjem FASTA preuzetih iz baze podataka UniprotKB. Potencijalna bioaktivnost predviđena je *in silico* pomoću programa PeptideRanker, a identifikacija alergena iz baze Allergome pomoću Proteome Discoverera.

Nadalje, metaboliti spiruline dobiveni ekstrakcijom smjesom vode, kloroforma i metanola korišteni su u metabolomskoj analizi koristeći tehnike LC-MS nakon čega je uslijedila bioinformatička analiza dobivenih podataka. Provođenjem metabolomske analize dobiveni su tandemni spektri masa koji su zatim korišteni za pretraživanje baze podataka COCONUT, te je dobiven sadržaj bioaktivnih spojeva u uzorku kao i njihove aktivnosti.

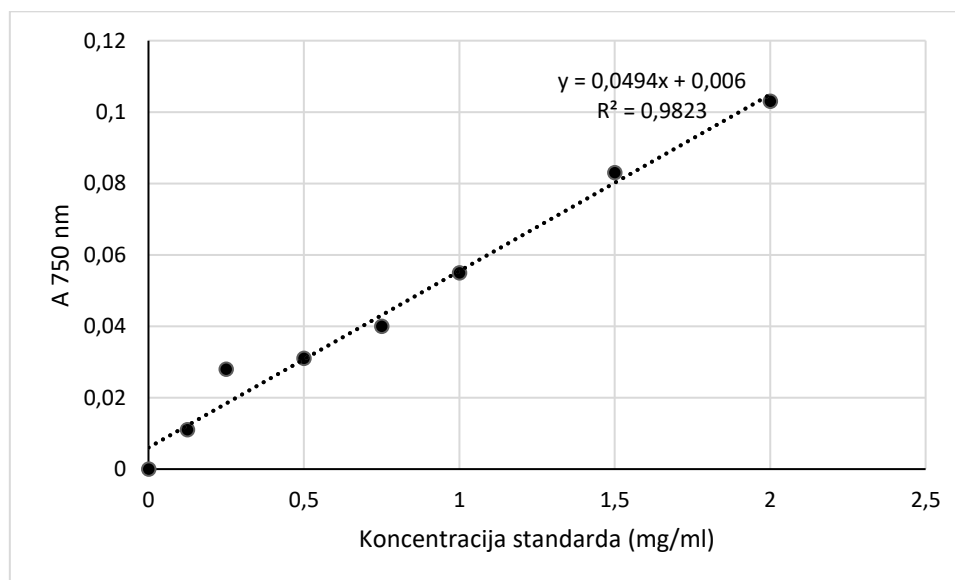
4.1. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Uz pomoć komercijalnog seta RC-DC provedeno je određivanje koncentracije proteina u uzorku. Analizirano je 7 razrjeđenja proteinskog standarda iz seta i jedna slijepa proba te tri uzorka od kojih je jedan bio razrijeđen 10 puta, a jedan 100 puta. Nakon provedenog postupka prema protokolu proizvođača, uzorcima i standardima je izmjerena apsorbancija pri 750 nm, a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Izmjerena apsorbancija standarda (goveđeg seruma albumina A) i proteinskih ekstrakata dobivenih iz mikroalge *Arthrospira platensis* pri 750 nm

Naziv	γ (mg ml ⁻¹)	A ($\lambda=750$ nm)
Standard 1	2,00	0,166
Standard 2	1,50	0,146
Standard 3	1,00	0,118
Standard 4	0,75	0,103
Standard 5	0,50	0,094
Standard 6	0,25	0,091
Standard 7	0,125	0,074
Slijepa proba	0,00	0,063
Uzorak 1	nepoznata	0,144
Uzorak 2 (10x razrijeđen)	nepoznata	0,143
Uzorak 3 (100x razrijeđen)	nepoznata	0,0725

Nakon toga je grafičkim putem prikazan omjer dobivene vrijednosti apsorbancije i poznate koncentracije standarda (slika 1). Dobivena je jednačba pravca (jednačba 1), te je pomoću dobivene vrijednosti nagiba pravca, uzevši u obzir vrijednost apsorbancije slijepe probe, izračunata koncentracija proteina u uzorku što je prikazano računski.



Slika 1. Ovisnost apsorbancije (A) o koncentraciji (γ) standarda goveđeg serumskog albumina pri 750 nm

Izračun:

$$A(\text{slijepa proba})=0,063$$

$$A(\text{Spirulina})=0,143$$

$$A(\text{Spirulina } 10x)=0,141$$

$$\underline{A(\text{Spirulina } 100x)=0,071}$$

Za izračun (jednadžba 2) je u obzir uzeta vrijednost apsorbancije uzorke spiruline razrijeđenog 10 puta (ozn. Spirulina 10x).

$$\text{Jednadžba pravca :} \quad y = 0,0494x + 0,006 \quad [1]$$

$$A(\text{uzorak}) = A(\text{Spirulina } 10x) - A(\text{slijepa proba}) \quad [2]$$

$$A(\text{uzorak}) = 0,143 - 0,063 = 0,08$$

$$\gamma(10x) = \frac{A(\text{uzorak}) - b}{a} = \frac{0,08 - 0,006}{0,0494} = 1,498 \text{ mg ml}^{-1}$$

$$\gamma = \gamma(10x) \cdot 10 = 14,98 \text{ mg ml}^{-1}$$

4.2. PROTEOMSKA ANALIZA

Za identifikaciju proteina sadržanih u ekstraktima iz liofilizi prahu mikroalgi ekstrahiranih u puferu (sastava) korišten je pristup odozdo prema gore (tzv. engl. *bottom-up*) koji se temelji na digestiji tripsinom i analizi dobivenih peptida tehnikama LC-MS/MS. Koristeći programe Proteome Discoverer, provedena je pretraga baze podataka *Spirulina* spp. preuzete s baze podataka UniProtKB (preuzeto 18. srpnja 2023.) prema parametrima: dozvoljena dva promašena mjesta cijepanja tripsinom, tolerancija pogreške izmjerene mase prekursora i fragmenata od 10 ppm i 0,05 Da, karbomidometil (C) kao fiksna modifikacija peptida, oksidacija (M) i deamidacija (N, Q) kao dinamičke modifikacije peptida. Udio krivih pogodaka (FDR, engl. *False Discovery Rate*) automatski je izračunat pomoću algoritma Percolator u Proteome Discoverer-u te je maksimalna vrijednost iznosila 1 %. Samo proteini s

barem dva jedinstvena peptida i 5 % FDR su prikazani kao valjani za identifikaciju. Identificirano je 883 peptida i 449 proteinske grupe (449 tzv. „master“ proteina identificiranih na temelju 2 jedinstvena peptida). Peptidi su korišteni za daljnju bioinformatičku analizu ispitivanja potencijalne bioaktivnosti. Proteini su razmatrani kao potencijalni alergeni.

4.2.1. Alergeni

Dobiveni sirovi podaci korišteni su i za pretraživanje baze podataka Allergome unutar programa Proteome Discoverer (preuzeto s UniProtKB 2. kolovoza 2023.). Od 4173 sekvence proteina koliko sadrži baza, protein spiruline C-fikocijanin (podjedinica beta) identificiran je kao alergen. Rezultati pretraživanja prikazani su u tablici 2.

Tablica 2. Alergen spiruline identificiran pretraživanjem baze Allergome

Pristupni broj	Naziv proteina/ vrsta	Pokrivenost [%]	# Jedinstveni peptidi	Molekulska masa [kDa]	pI	Sequest score
P72508	C-fikocijanin (podjedinica beta) <i>Arthrospira platensis</i>	62	10	18.1	5.11	1504.29

4.3. BIOINFORMATIČKA ANALIZA

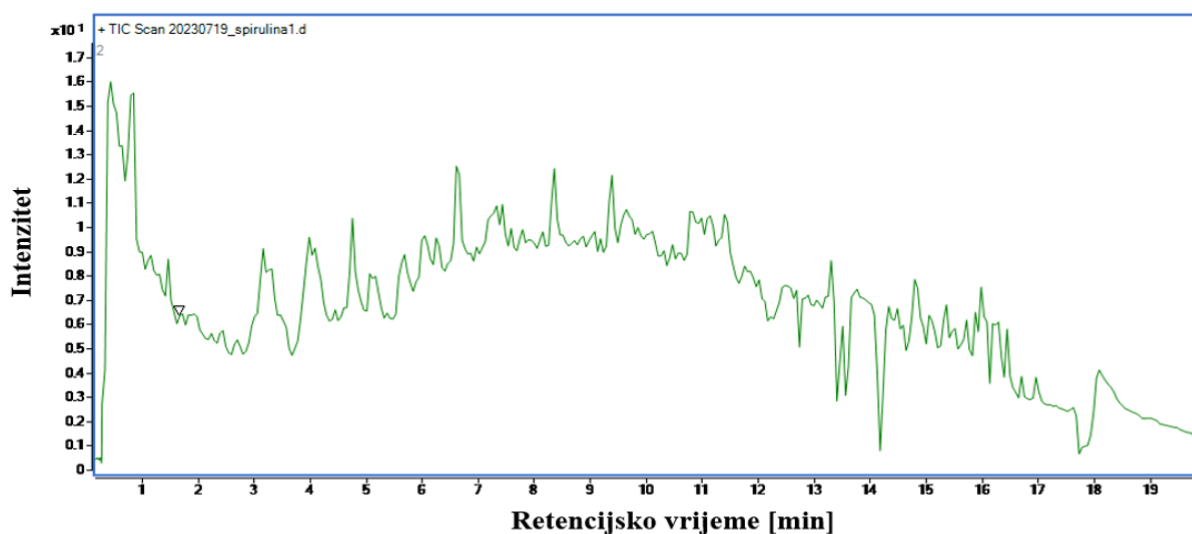
Peptidi identificirani pomoću specijaliziranog računalnog programa Proteome Discoverer korišteni su za predikciju potencijalne bioaktivnosti *in silico* primjenom mrežnog alata PeptideRanker. Utvrđeni su potencijalno bioaktivni peptidi, a kao granica Matthewsovog korelacijskog koeficijenta (engl. *Matthews Correlation Coefficient*) postavljena je vrijednost $\geq 0,8$. Rezultati su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti Matthewsovog korelacijskog koeficijenta za potencijalno bioaktivne peptide dobivene koristeći PeptideRanker

Matthewsov korelacijski koeficijent	Peptid
0,935	FPCDGPGR
0,899	GPWLEPLR
0,862	SAGAGAGLFFK
0,861	CAPGTFCGANR
0,843	APSGNFFSK
0,827	GAVFIAPGGR
0,827	DAGCACPPK
0,820	DFGYSFPCDGPGR
0,814	DPAINPGGWTR

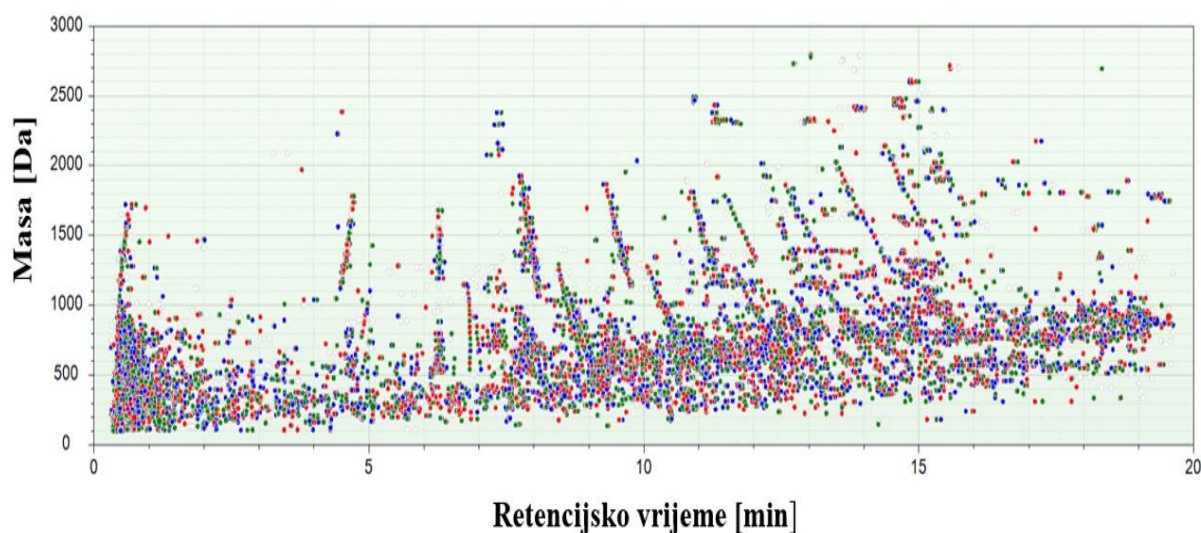
4.4. METABOLOMSKA ANALIZA

Nakon završene metabolomske analize provedene korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i spektrometrije masa, dobiveni sirovi podaci eksportirani su u .mgf formatu u svrhu identifikacije biološki aktivnih spojeva. Karakterističan kromatogram (ukupna struja iona, engl. *total ion chromatogram*) ekstrakta spiruline dobiven metabolomskom analizom temeljenom na spektrometriji masa prikazan je na slici 2.



Slika 2. Prikaz kromatograma ukupne ionske struje (TIC) ekstrakta spiruline dobiven koristeći sustav LC-MS

Koristeći specijalizirani računalni program Mass Profiler identificirano je 2017 različitih iona (tzv. „*features*“) koji predstavljaju različite adukte molekula s ionima (kao što su npr. H^+ , Na^+ , K^+ , i sl.) istih metabolita u 3 uzorka spiruline.



Slika 3. Prikaz raspona masa detektiranih ionskih vrsti u ovisnosti o retencijskom vremenu (uzorci su prikazani različitim bojama) kreirano u programu Agilent MassHunter Mass Profiler

Tandemni (MS/MS) spektri masa u .mgf formatu dobiveni metabolomskom analizom ekstrakata spiruline korišteni su za pretraživanje baze podataka COCONUT (<https://coconut.naturalproducts.net/>). Bioinformatičkim pristupom identificirano je 68 biološki aktivnih spojeva sadržanih u bazi COCONUT. Identificirani metaboliti posjeduju brojne biološke aktivnosti, uključujući antioksidativnu aktivnost, antialergijsku aktivnost, protuupalno djelovanje, antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, snizuju razinu kolesterola, imaju antitrombotičko djelovanje i tako dalje. Odabrani identificirani bioaktivni spojevi i njihova predviđena bioaktivnost prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Bioaktivni spojevi identificirani pretraživanjem baze COCONUT

Predviđena bioaktivnost	Pristupni broj (Coconut ID)	Naziv spoja/ Molekulska formula
Protuupalno djelovanje Antagonist apoptoze Antagonist hipolipidemijskog kolesterola Antifungalno djelovanje	CNP0215907	Pentadeka-1,8-dien-4,6-diin-3,10-diol $C_{15}H_{20}O_2$
Antihiperkolesteremično djelovanje Protuupalno djelovanje Antitrombotičko djelovanje	CNP0084943	Diglicerid $C_{37}H_{64}O_5$
Antipsorijazno djelovanje Radioprotektor Kemoprotektor Protuupalno djelovanje	CNP0288086	7,8-didehidro-beta,beta-karoten-3-ol $C_{40}H_{54}O$
Protuupalno djelovanje Hipolipidemijsko djelovanje Antibakterijsko djelovanje	CNP0372375	8-hidroksipentadeka-9-en-11,13-diin-2-on $C_{15}H_{20}O_2$
Antifungalno djelovanje GST A supstrat Antibakterijsko djelovanje Radiosenziter	CNP0232299	8-[1-hidroksi-2-(3-hidroksi-1-metoksibutan-2-il)-1 λ4-diazen-1-il]oktan-2-on $C_{13}H_{28}N_2O_4$
Radioprotektor Agens pri zacijeljivanju rana Imunomodulator Djelovanje u tretmanu bolesti kosti Djelovanje pri liječenju infarkta	CNP0325109	2-(2-amino-4-metilpentanamido)-5-karbamimidamidopentanoička kiselina $C_{12}H_{25}N_5O_3$

4.5. RASPRAVA

Posljednjih desetljeća jača trend konzumiranja funkcionalne hrane, bogate bioaktivnim spojevima i što manje procesirane. Spirulina, cijanobakterija koja se smatra modrozelenom mikroalgom, ističe se bogatim sastavom bioaktivnih spojeva, kao i nezasićenih masnih kiselina i esencijalnih aminokiselina. Osim navedenog, sadrži i spojeve poput fikocijanina, karotenoida, klorofila i fenolnih spojeva koji se mogu koristiti kao antioksidansi (Bortolini i sur., 2022). Spirulina je klasificirana kao nutraceutik, siguran dodatak prehrani od strane američke Uprave za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA), kategorija Općenito priznat kao siguran, zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti (bogat izvor proteina, vitamina, minerala, karotenoida i fikocijanina). Također su dokazana metabolička (hipolipidemijska, hipoglikemijska), antivirusna, hepatoprotektivna, antikancerogena, protuupalna i antioksidativna svojstva ekstrakta spiruline, uz pozitivne učinke na imunitet (Gurney i Spendiff, 2022). Zbog svog sastava, spirulina se također smatra zanimljivom sirovinom za proizvodnju višenamjenskih ambalažnih materijala iz biomakromolekula u razvoju pakiranja hrane jer većina sintetičke plastike nije biorazgradiva te ima negativan utjecaj na okoliš (Masako Nakamoto i sur., 2023).

Razvojem tehnologije, baza podataka i alata za bioinformatičku analizu, spektrometrija masa u kombinaciji sa separacijskim tehnikama (kao što su LC i/ili GC) i bioinformatikom pruža mnogobrojne mogućnosti identifikacije malih molekula, peptida i proteina kako u višestaničnim organizmima, tako i u mikroalgama/cijanobakterijama. Također, razjašnjavanje prostorne lipidne organizacije u fotosintetskim stanicama spiruline koje se može postići MALDI oslikavanjem (engl. *MALDI Imaging*) važno je za praćenje mehanizama fiziološkog odgovora tijekom rasta (Lesco i sur., 2023).

Sukladno tome, u ovom radu su korišteni proteomski i metabolomski pristupi temeljeni na spektrometriji masa u karakterizaciji bioaktivnih molekula i alergena jer upravo identifikacija novih spojeva i definiranje njihovih svojstava omogućuje razvoj inovativnih proizvoda iz ove mikroalge te može doprinijeti značajnim učincima na ljudsko zdravlje.

4.5.1. Bioaktivni spojevi

U ovom radu, za ekstrakciju bioaktivnih spojeva - metabolita korištena je smjesa metanola, kloroforma i vode kojom se ekstrahiraju polarni i nepolarni metaboliti ne bi li se dobio čim bolji uvid u metabolomski profil (tj. bolja pokrivenost metabolita) mikroalge *Arthrospira platensis* i time odredilo čim više bioaktivnih spojeva pretraživanjem baze podataka COCONUT. Identificirano je 68 bioaktivnih metabolita, od kojih su najznačajniji navedeni u tablici 4, a njihova svojstva detaljnije opisana u nastavku.

4.5.1.1. Metabolička svojstva

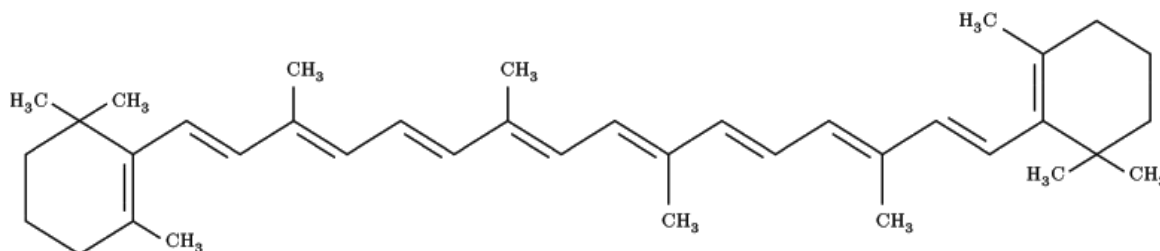
Hepatoprotektivno djelovanje spiruline povezano je s njenim antioksidativnim i protuupalnim svojstvima koja posjeduje prvenstveno zbog sadržaja C-fikocijanina, β -karotena i vitamina E, te zbog sposobnosti snižavanja koncentracije lipida u jetri (Mazokopakis i sur., 2014). Aktivni sastojci koji su razlog hipolipidemijskog djelovanja kod spiruline još nisu u potpunosti identificirani. Navedena svojstva moguće je objasniti i molekulama identificiranim u ovom radu (npr. okta-1,9-dien-4,6-dien-3-ol, elaiomicin D, fomalenična kiselina C i drugi) čija je bioaktivnost pretpostavljena temeljem strukture pretraživanjem baze COCONUT.

4.5.1.2. Antioksidativno i protuupalno djelovanje

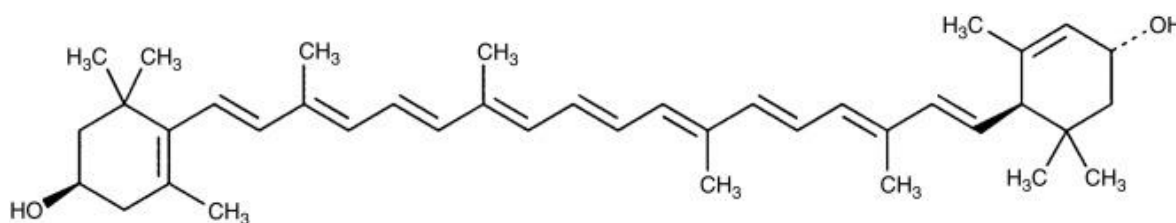
Antioksidativno i protuupalno djelovanje kod spiruline pripisuje se prisutnosti karotena i ksantofila. Karoteni su velika grupa spojeva koji pozitivno djeluju na zdravlje te se koriste u mnogim granama industrije, poput prehrambene, farmaceutske, kozmetičke, proizvodnji stočne hrane i bojila (Mapelli-Brahm i sur., 2023) (slika 4). Ksantofili su žuti do smečkasti pigmenti i oksidacijski su produkti karotena. Dobro su topljivi u mastima pa se često koriste za davanje boje jestivim uljima (Hrvatska enciklopedija, 2021) (slika 5).

Zajedno karoteni i ksantofili čine karotenoide, nezasićene komponente koje su poznate po svojoj upotrebi kao bojila i prekursori vitamina A, a postoje i indicije da su uključeni u biološke procese povoljne za zdravlje, te smanjuju rizik od pojave nekih bolesti (Mapelli-Brahm i sur., 2023). U ovom radu je također identificiran pigment 7,8-didehidro- β , β -karoten-3-ol. Brojni morski organizmi, kao što su alge, mogu sadržavati karotenoide te se smatraju njihovim prirodnim i obnovljivim izvorom (Mata-Gómez i sur., 2014). Karotenoidi su jedne od najvrijednijih komponenti sadržanih u mikroalgama te se mnogi od njih koriste u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Jedan od primjera najčešće korištenih karotenoida je β -

karoten (Russel i sur., 2022). Međutim, procesi u kojima bi se karotenoidi dobivali u dovoljnim količinama za opskrbu industrije još uvijek nisu dovoljno razvijeni i zahtijevaju daljnja istraživanja (Mapelli-Brahm i sur., 2023).



Slika 4. Prikaz strukturne formule β -karotena (prema World of molecules, 2023)



Slika 5. Prikaz strukturne formule ksantofila (prema Pund i sur., 2016)

4.5.2. Digliceridi

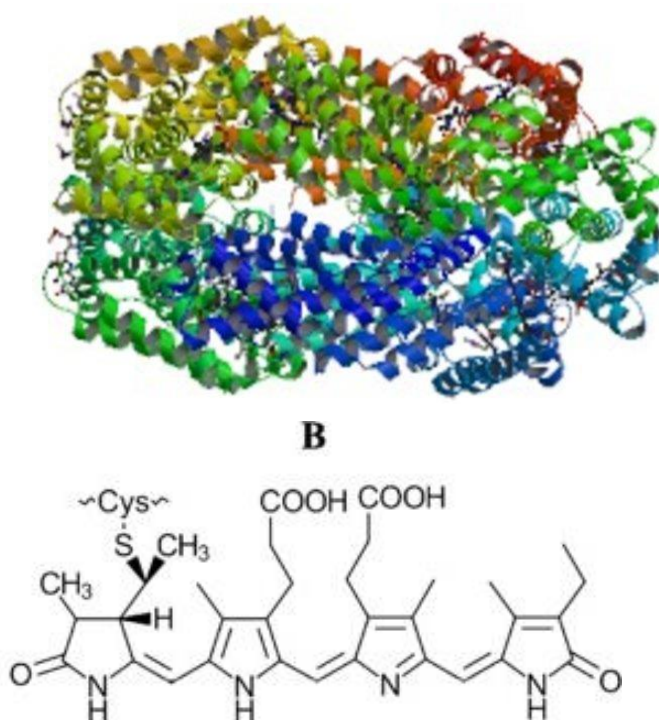
U sastavu uzoraka spiruline također je dokazano i prisustvo diglicerida, kao što je pokazano i u ovom radu (tablica 4). Digliceridi, zajedno s monogliceridima, spadaju u kategoriju glikolipida iz prirodnih izvora. Imaju široku primjenu u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Filipini Ferreira i sur., 2021).

Iako je dobivanje ovih spojeva iz algi skuplje nego iz biljnih ulja, povećana potražnja za proizvodima visoke nutritivne vrijednosti čini ulje mikroalgi potencijalnom sirovinom za proizvodnju visokokvalitetnih masnih kiselina. Također, ulje mikroalgi sadrži visoke koncentracije polinezasićenih masnih kiselina, a njihova kultivacija ima manje utjecaja na okoliš nego kultivacija biljaka (Filipini Ferreira i sur., 2021).

4.5.3. Alergeni

Alergijska reakcija nastaje kao imunološki odgovor na proteine prisutne u hrani, piću ili kozmetici. Budući da se spirulina sve više koristi u prehrani i kozmetičkoj industriji,

proteomskim pristupom ispitana je prisutnost alergena. Od 449 proteinskih skupina identificiranih u ovom radu pretraživanjem baze UniprotKB i Allergome, u sastavu uzorka spiruline, dokazano je i prisustvo C-fikocijanina (koji je alergen, a spada u grupu fotosintetskih pigmenata (Thevarajah i sur., 2022) (tablica 2, slika 6). Spirulina je komercijalni izvor C-fikocijanina koji je odobren od strane FDA kao prirodno plavo bojilo za hranu (Neves i sur., 2021). Osim toga, pokazuje protuupalna i hepatoprotektivna svojstva (Thevarajah i sur., 2022). Najvažnije svojstvo C-fikocijanina je njegovo antioksidativno djelovanje. Oksidativni stres u stanicama ima veliku ulogu u starenju i patogenezi, što u konačnici dovodi do razvoja raznih bolesti kao što su dijabetes, rak, razne neurodegenerativne bolesti i bolesti respiratornog sustava. C-fikocijanin djeluje kao antioksidans te detoksificira intermedijere reaktivnog kisika u organizmu i na taj način minimizira oksidativni stres i oštećenja koja uzrokuje (Grover i sur., 2021).



Slika 6. Kristalna struktura C-fikocijanina izoliranog iz mikroalge *Spirulina platensis* i (B) kromofor fikocijanobilin daje plavu boju (Vernès i sur., 2015)

4.5.4. Bioaktivni peptidi

Peptidi s biološkom aktivnosti koji sadrže enzimске hidrolizate predmet su brojnih istraživanja s ciljem njihovog korištenja u funkcionalnoj hrani, kozmetici i farmaceuticima. Odnedavno, spirulina je predložena kao potencijalni izvor bioaktivnih peptida. Međutim, još uvijek nije razvijena industrijska proizvodnja zbog velikih troškova procesa i manjka znanstvenih članaka koji potvrđuju ovu teoriju (Lafarga i sur., 2021)

Prednost enzimatske proizvodnje bioaktivnih peptida u industriji je potpuna kontrola procesa. Nakon hidrolize, veliki broj peptida je proizveden, međutim samo mali broj peptida posjeduje bioaktivnost i doprinosi bioaktivnosti cijelog hidrolizata. Zbog toga, potrebno je frakcioniranje hidrolizata na osnovi molekulske mase (Lafarga i sur., 2021). Iako je, zbog velikog broja peptida, raspon bioloških aktivnosti velik, najčešća djelovanja su antioksidativno, antimikrobno i antihipertenzivno (Nielsen i sur., 2017).

Mikroalge predstavljaju sirovinu bogatu proteinima iz kojih se generiraju bioaktivni peptidi. Kao najbolje proučeni predstavnik istaknula se spirulina s izuzetno visokim sadržajem proteina (Garrido-Cardenas i sur., 2018). Jedna od glavnih mana proizvodnje bioaktivnih peptida iz mikroalgi je visoka cijena mikrobne biomase, što proizvodnju čini isplativom samo za proizvode visoke vrijednosti (Garrido-Cardenas i sur., 2018). Usprkos tome, brojni proizvodi kao što su biostimulansi, biognojiva, hrana za stoku i ribu, kao i kozmetički proizvodi, nutraceutici i funkcionalna hrana, danas su dostupni na tržištu. Proizvodi s bioaktivnim peptidima proizvedeni od spiruline na tržištu se smatraju sigurnima, nutritivnima i održivima (Lafarga i sur., 2021).

U ovom radu proteomskim pristupom identificirano je 883 triptička peptida (svrstanih u 449 proteinskih grupa), od kojih je *in silico* bioinformatičkom analizom predviđena bioaktivnost kod 9 peptida kao što je prikazano u tablici 4. Navedeni peptidi nisu sadržani u bazi podataka BIOPEP koja sadrži dobro okarakterizirane bioaktivne peptide kao i bioaktivne peptide dobivene iz hrane čija je biološka aktivnost također predviđena *in silico* (Minkiewicz i sur., 2022). Da bi se potvrdila predviđena aktivnost peptida i utvrdila bioaktivna svojstva, potrebno je ispitati svojsva koristeći pročišćeni peptid sintetiziran na čvrstom nosaču (engl. *Solid phase peptide synthesis*) ili dobiven izolacijom iz kompleksne smjese peptida nakon triptičke digestije proteina iz biomase. Nakon eksperimentalno potvrđene bioaktivnosti, moguće je uvrstiti bioaktivne peptide u bazu BIOPEP.

5. ZAKLJUČCI

1. Spektrometrija masa u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom i bioinformatičkom analizom, omogućava provedbu proteomske i metabolomske analize uzorka. Na taj način dobiva se uvid u sadržaj proteina, peptida i metabolita u uzorku na osnovu čega je moguće objasniti svojstva ispitivanog uzorka.
2. Koristeći algoritam SEQUEST integriran u program Proteome Discoverer za pretraživanje baze podataka Allergome, na osnovu tandemnih spektara masa dobivenih proteomskom analizom, dokazano je da vrsta *Arthrospira platensis* sadrži alergen C-fikocijanin.
3. Usporedbom tandemnih spektara masa dobivenih metabolomskom analizom s podacima u bazi COCONUT, identificirano je 68 biološki aktivnih spojeva.
4. Identifikacijom proteina, peptida i metabolita u uzorku mikroalge *Arthrospira platensis*, dokazano je da ova vrsta, zbog svog bogatog sastava, ima brojne pozitivne učinke na ljudsko zdravlje, gdje se ističu antioksidativno, protuupalno, antifungalno i antibakterijsko djelovanje. Zbog prisutnosti alergena, ova mikroalga može predstavljati i prijetnju za zdravlje kod alergijski preosjetljivih ljudi.

6. LITERATURA

- Acero FJF, Carbú M, El-Akhal MR, Garrido C, González-Rodríguez VE, Cantoral JM (2011) Development of proteomics-based fungicides: new strategies for environmentally friendly control of fungal plant diseases. *Int J Mol Sci* **12**, 795-816. <https://doi.org/10.3390/ijms12010795>
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **422**, 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- AlFadhly N, Alhelfi N, Altemimi A, Verma D, Cacciola F, Narayanankutty A (2022) Trends and Technological Advancements in the Possible Food Applications of Spirulina and Their Health Benefits: A Review. *Molecules* **27**, 5584. <https://doi.org/10.3390/molecules27175584>
- Ali SK, Saleh AM (2012) Spirulina-an overview. *Int J Pharm Pharm Sci*, **4**, 9-15.
- Andersen RA, Lewin RA (2023) Algae. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/algae>. Pristupljeno 16. kolovoza 2023.
- Aouir A, Amiali M, Bitam A, Benchabane A, Raghavan VG (2017) Comparison of the biochemical composition of different *Arthrospira platensis* strains from Algeria, Chad and the USA. *J Food Meas Charact* **11**, 913–23. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9463-4>
- Aslam B, Basit M, Nisar MA, Khurshid M, Rasool MH (2017) Proteomics: Technologies and their applications. *J Chromatogr Sci* **55**, 182-196. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw167>
- Becker EW (1994) Microalgae: Biotechnology and Microbiology, 1.izd., Cambridge University Press, Cambridge, str. 293.
- Belay A (2013) Biology and Industrial Production of *Arthrospira* (*Spirulina*), U: Richmond A, Hu Q (ured.) Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2.izd., Wiley Online Library, str. 339–358. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch17>
- Beynon JH, Brown L (2023) Mass spectrometry. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry> Pristupljeno 16. kolovoza 2023.
- Bianco M, Ventura G, Calvano CD, Losito I, Cataldi TRI (2022) A new paradigm to search for allergenic proteins in novel foods by integrating proteomics analysis and in silico sequence

homology prediction: Focus on spirulina and chlorella microalgae. *Talanta* **240**, 123188. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.123188>

Blum BC, Mousavi F, Emili A (2018) Single-platform ‘multi-omic’ profiling: unified mass spectrometry and computational workflows for integrative proteomics–metabolomics analysis. *Mol Omics* **14**, 307-319. <https://doi.org/10.1039/C8MO00136G>

Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, i sur. (2007) Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B* **849**, 1–31. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.10.040>

Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes IDAA, Pedro AC, Rubio FTV, Brancod IG, i sur. (2022). Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. *Food Chemistry: Molecular Sciences* **5**, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100134>

Britannica (2023) Blue-green algae, *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/blue-green-algae>. Pristupljeno 20. kolovoza 2023.

Carrasco-Reinado R, Bermudez-Sauco M, Escobar-Niño A, Cantoral JM, Fernández-Acero FJ (2022) Development of the “Applied Proteomics” Concept for Biotechnology Applications in Microalgae: Example of the Proteome Data in *Nannochloropsis gaditana*. *Mar Drugs* **20**, 38. <https://doi.org/10.3390/md20010038>

Cho WC (2007) Proteomics technologies and challenges. *Genom proteom bioinform* **5**, 77–85. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(07\)60018-7](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(07)60018-7)

Cindrić M, Marković A, Horvatić A (2009) Spregnute tehnike tekućinski kromatograf-spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina* **45**, 218-232. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/43663>

Costa JAV, Freitas BCB, Rosa GM, Moraes L, Morais MG, Mitchell BG (2019) Operational and economic aspects of *Spirulina*-based biorefinery. *Bioresour Technol* **292**, 121946. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121946>

Cvetesic N, Semanjski M, Soufi B, Krug K, Gruic-Sovulj I, Macek B (2016) Proteome-wide measurement of non-canonical bacterial mistranslation by quantitative mass spectrometry of protein modifications. *Sci Rep* **6**, 28631. <https://doi.org/10.1038/srep28631>

- Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD (2007). Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom Rev* **26**, 51-78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- Dettmer K, Hammock BD (2004) Metabolomics--a new exciting field within the "omics" sciences. *Environ Health Perspect* **112**,396-397. <https://doi.org/10.1289/ehp.112-1241997>
- El-Sayed AEK, El-Sheekh M (2018) Outdoor Cultivation of *Spirulina platensis* for Mass Production. *Not Sci Biol* **10**, 38-44. <https://doi.org/10.15835/nsb10110177>
- Fajardo C, De Donato M, Carrasco R, Martínez-Rodríguez G, Mancera JM, Fernández-Acero FJ (2019) Advances and challenges in genetic engineering of microalgae. *Rev Aquac* **12**, 365-381. <https://doi.org/10.1111/raq.12322>
- Fernández-Acero FJ, Amil-Ruiz F, Durán-Peña MJ, Carrasco R, Fajardo C, Guarnizo P, i sur. (2019) Valorisation of the microalgae *Nannochloropsis gaditana* biomass by proteomic approach in the context of circular economy. *J proteomics* **193**, 239–242. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.10.015>
- Fernie AR, Trethewey RN, Krotzky AJ, Willmitzer L (2004) Metabolite profiling: from diagnostics to systems biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 763–769. <https://doi.org/10.1038/nrm1451>
- Ferreira GF, Pessoa JGB, Pinto LFR, Maciel Filho R, Fregolente LV (2021) Mono-and diglyceride production from microalgae: Challenges and prospects of high-value emulsifiers. *Trends Food Sci* **118**, 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.10.027>
- Fiehn O (2002) Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biol* **48**, 155–171. <https://doi.org/10.1023/A:1013713905833>
- Fogg GE, Stewart WDP, Fay P, Walsby AE (1973) *The Blue-Green Algae*, 1.izd., Academic Press, London-New York, str.1-9.
- Galić N, Cindrić M (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. *Kem Ind*, **57**, 231-243. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/23748>
- Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F, Acien-Fernandez FG, Molina-Grima E (2018) Microalgae research worldwide. *Algal research* **35**, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.08.005>

Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB (2004). Metabolomics by numbers—acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnol* **22**, 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.03.007>

Grosshagauer S, Kraemer K, Somoza V (2020) The True Value of Spirulina, *J Agric Food Chem* **68**, 4109-4115, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b08251>

Grover P, Bhatnagar A, Kumari N, Narayan Bhatt A, Kumar Nishad D, Purkayastha J (2021) C-Phycocyanin-a novel protein from *Spirulina platensis*- *In vivo* toxicity, antioxidant and immunomodulatory studies. *Saudi J biol Sci* **28**, 1853–1859. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.037>

Gurney T, Spendiff O (2022) Algae Supplementation for Exercise Performance: Current Perspectives and Future Directions for Spirulina and Chlorella. *FRONT NUTR* **9**, 865741. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.865741>

Han X, Aslanian A, Yates III JR (2008) Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol* **12**, 483-490. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.024>

Helmy M, Elhalis H, Liu Y, Chow Y, Selvarajoo K (2022) Perspective: Multiomics and Machine Learning Help Unleash the Alternative Food Potential of Microalgae. *Adv Nutr* **14**, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.advnut.2022.11.002>

Henry Royce Institute (2023) Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. <https://www.royce.ac.uk/equipment-and-facilities/quadrupole-time-flight-mass-spectrometer/>
Pristupljeno 18. kolovoza 2023.

Hrvatska enciklopedija (2021) Ksantofili <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=34333> Pristupljeno 15. kolovoza 2023.

Hrvatska enciklopedija (2021) Toksini <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=61611> Pristupljeno 29. kolovoza 2023.

Islam AA, Rahman MM, Islam MR, Shaha DC, Noman S, Akter T (2018) Use of Spirulina in Fish Culture (Master's Thesis), Department of Aquaculture, BSMRAU, Salna, Bangladesh.

Islam N, Lonsdale M, Upadhyaya NM, Higgins TJ, Hirano H, Akhurst R (2004) Protein extraction from mature rice leaves for two-dimensional gel electrophoresis and its application

in proteome analysis. *Proteomics* **4**,1903-1908.
<http://hdl.handle.net/102.100.100/189954?index=1>

James CA, Welham S, Rose P (2023) Edible algae allergenicity – a short report. *J Appl Phycol* **35**, 339–352 . <https://doi.org/10.1007/s10811-022-02880-2>

Jung F, Krüger-Genge A, Waldeck PB, Küpper JH (2019) Spirulina platensis, a super food?. *J Cell Biotechnol* **5**, 43–54. <https://doi.org/10.3233/JCB-189012>

Lafarga, T., Sánchez-Zurano, A., Villaró, S., Morillas-España, A., & Acien, G. (2021). Industrial production of spirulina as a protein source for bioactive peptide generation. *Trends Food Sci* **116**, 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.018>

Le TM, Knulst AC, Röckmann H (2014) Anaphylaxis to Spirulina confirmed by skin prick test with ingredients of Spirulina tablets. *Food Chem Toxicol* **74**, 309–310. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.10.024>

Lesco KC, Rowland SM, Ratanathanawongs Williams SK, Laurens LML (2023) Single-filament imaging mass spectrometry lipidomics in Arthrospira platensis. *Rapid commun* **37**, 9525. <https://doi.org/10.1002/rcm.9525>

Little, L. (2023) An overview of different multi-omics approaches. <https://frontlinegenomics.com/an-overview-of-different-multi-omics-approaches/>
Pristupljeno 29. kolovoza 2023.

Liu YJ, Li N, Yang J, Li N, Qiu H, Ai D, i sur. (2010) Metabolic profiling of murine plasma reveals an unexpected biomarker in rofecoxib-mediated cardiovascular events. *Proc Natl Acad Sci USA* **107(39)**, 17017–17022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011278107>

Maghembe R, Damian D, Makaranga A, Nyandoro SS, Lyantagaye SL, Kusari S, i sur. (2020) Omics for Bioprospecting and Drug Discovery from Bacteria and Microalgae. *Antibiotics* **9(5)**, 229. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050229>

Mahmoud A, Sabae SA, Helal AM (2018) Culture and Biorefinary of Two Freshwater Microalgae; Spirulina platensis and Chlorella vulgaris As Vitamins Sources. *Biosci Res* **15**, 4584–4589.

Mapelli-Brahm P, Gómez-Villegas P, Gonda ML, León-Vaz A, León R, Mildenerberger J, i sur. (2023) Microalgae, Seaweeds and Aquatic Bacteria, Archaea, and Yeasts: Sources of Carotenoids with Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Health-Promoting Actions in the Sustainability Era. *Mar Drugs* **21**, 340. <https://doi.org/10.3390/md21060340>

Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN (2014) Biotechnological Production of Carotenoids by Yeasts: An Overview. *Microb Cell Fact* **13**, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-12>

Mazokopakis EE, Starakis IK, Papadomanolaki MG, Mavroeidi NG, Ganotakis ES (2014). The hypolipidaemic effects of Spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population: a prospective study. *J Sci Food Agric* **94**, 432–437. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6261>

Minkiewicz P, Iwaniak A, Darewicz M (2019) BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *Int J Mol Sci* **20**, 5978. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>

Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2022). BIOPEP-UWM Virtual—A Novel Database of Food-Derived Peptides with In Silico-Predicted Biological Activity. *Appl Sci* **12**, 7204. <https://doi.org/10.3390/app12147204>

Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, Mikheenko A, Korobeynikov A, Cao L, i sur. (2018). Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nat Commun* **9**,4035. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06082-8>

Montana State University (2023) What is an Endophyte?. <https://plantsciences.montana.edu/facultyorstaff/faculty/strobel/endophytes.html> Pristupljeno 16. kolovoza 2023.

Nagarajan D, Lee DJ, Varjani S, Lam SS, Allakhverdiev SI, Chang JS (2022) Microalgae-based wastewater treatment–microalgae-bacteria consortia, multi-omics approaches and algal stress response. *Sci Total Environ* **845**, 157110. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157110>

Nakamoto MM, Assis M, de Oliveira Filho JG, Braga ARC. (2023). Spirulina application in food packaging: Gaps of knowledge and future trends. *Trend Food Sci* **133**, 138-147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.02.001>

- Nardo AE, Añón MC, Parisi G (2018) Large-scale mapping of bioactive peptides in structural and sequence space. *PLoS ONE* **13**, e0191063. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191063>
- Neves MIL, Silva EK, Meireles MAA (2021). Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges, and future strategies. *Trends Food Sci* **112**, 163–173. <https://doi.org/10.1016/J>
- News Medical Life Sciences (2019) What is Multiomics? <https://www.news-medical.net/life-sciences/What-is-Multiomics.aspx> Pristupljeno 29. kolovoza 2023.
- Nielsen M, Haun D, Kärtner J, Legare CH (2017) The persistent sampling bias in developmental psychology: A call to action. *J Exp Child Psychol* **162**, 31-38 . <https://doi.org/10.1016/j.jecp.2017.04.017>
- Nielsen SD, Beverly RL, Qu Y, Dallas DC (2017) Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization. *Food Chem* **232**, 673-682. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.056>
- Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel CO, Sassano CE, Carvalho JCM, Sato S, Moraes IO (2003) Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng* **56**, 371–375. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00209-1](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00209-1)
- Petruzzello M (2020) "epiphyte", Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/plant/epiphyte>. Pristupljeno 29. kolovoza 2023.
- Pund S, Joshi AG, Patravale VB (2016) Improving bioavailability of nutraceuticals by nanoemulsification. *Nutraceuticals* **13**, 481-534. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804305-9.00013-0>
- Radmer RJ (1996) Algal Diversity and Commercial Algal Products. *BioScience* **46**, 263–270. <https://doi.org/10.2307/1312833>
- Ragusa I, Nardone GN, Zanatta S, Bertin W, Amadio E (2021) *Spirulina* for skin care: A bright blue future. *Cosmetics* **8**, 7, <https://doi.org/10.3390/cosmetics8010007>
- Richmond A (2004) Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, 1. izd., Blackwell Science, Oxford, UK; Ames, USA, str.125-177.
- Riekeberg E, Powers R (2017) New frontiers in metabolomics: from measurement to insight. *F1000Research* **6**, 1148. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11495.1>

Rizwan M, Mujtaba G, Memon SA, Lee K, Rashid N (2018) Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renew Sustain Energy Rev* **92**, 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>

Rogers K (2022) Proteome. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/omics> Pristupljeno 16.kolovoza 2023.

Russell C, Rodriguez C, Yaseen M (2022) High-Value Biochemical Products & Applications of Freshwater Eukaryotic Microalgae. *Sci Total Environ* **809**, 151111. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151111>

Rzymiski P, Budzulak J, Niedzielski P, Klimaszyk P, Proch J, Kozak L, Poniedzia B (2019) Essential and toxic elements in commercial microalgal food supplements. *J Appl Phycol* **31**, 3567–3579. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1681-1>

Sahoo D, Seckbach J (2015) *The Algae World*, 1.izd., Springer, Dordrecht, Heidelberg, New York, London, str. 3-31

Salem MA, Perez de Souza L, Serag A, Fernie AR, Farag MA, Ezzat SM i sur. (2020) Metabolomics in the Context of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation to Metabolite Analysis. *Metabolites* **10**, 37. <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>

Scieszka S, Klewicka E (2018) Algae in food-a general review. *Crit Rev Sci Nutr* **59**, 3538-3547. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1496319>

Sinha A, Mann M (2020) A beginner's guide to mass spectrometry-based proteomics, *Biochem (Lond)* **42**, 64-69. <https://doi.org/10.1042/BIO20200057>

Smith SA, Blake TA, Ifa DR, Cooks RG, Ouyang Z (2017) Dual-source mass spectrometer with MALDI-LIT-ESI configuration. *J Proteome Res* **6**, 837-45. <https://doi.org/10.1021/pr060514i>

Soni RA, Sudhakar K, Rana RS (2017) Spirulina - From growth to nutritional product: A review. *Trends Food Sci Technol* **69**, 157–171. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.010>

Sorokina M, Merseburger P, Rajan K, Yirik MA, Steinbeck C (2021) COCONUT online: Collection of Open Natural Products database. *J Cheminform* **13**, 2. <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00478-9>

Struna (2011) Metaboliti <http://struna.ihjj.hr/naziv/metaboliti/3371/> Pristupljeno 18.kolovoza 2023.

Sumprasit N, Wagle N, Glanpracha, N, Annachhatre AP (2017) Biodiesel and biogas recovery from *Spirulina platensis*. *Int Biodeterior Biodegrad* **119**, 196–204. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.11.006>

Thevarajah B, Nishshanka GKSH, Premaratne M, Nimarshana PHV, Nagarajan D, Chang JS, i sur. (2022) Large-scale production of *Spirulina*-based proteins and c-phycoerythrin: A biorefinery approach. *Biochemical Engineering Journal* **185**, 108541. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108541>

Usharani G, Saranraj P, Kanchana D (2012) *Spirulina* Cultivation: A review. *Int J Pharm Biol Sci Arch* **3**, 1327-1341.

Vadlaja D, Bujak M, Čož-Rakovac R, Roje M, Čižmek L, Horvatić A, i sur. (2022), 'Bioprospecting for Microorganisms in Peloids—Extreme Environment Known for Its Healing Properties'. *Front Mar Sci* **9**, 822139. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.822139>

Vaudel M, Verheggen K, Csordas A, Raeder H, Berven FS, Martens L i sur. (2016). Exploring the potential of public proteomics data. *Proteomics* **16**, 214–225. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500295>

Vernès L, Granvillain P, Chemat F, Vian M (2015) Phycocyanin from *Arthrospira platensis*. Production, Extraction and Analysis. *Curr Biotechnol* **4**, 4 . <https://dx.doi.org/10.2174/2211550104666151006002418>

Vo KTX, Rahman MM, Rahman MM, Trinh KTT, Kim ST, Jeon JS (2021) Proteomics and Metabolomics Studies on the Biotic Stress Responses of Rice: an Update. *Rice* **14**, 30. <https://doi.org/10.1186/s12284-021-00461-4>

Vonshak A (1987) Strain selection of *Spirulina* suitable for mass production. *Hydrobiologia*, **151-152**, 75–77. <https://doi.org/10.1007/BF00046109>

Vonshak A (1997) *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): Physiology, Cell-biology and Biotechnology, 1.izd., Taylor & Francis, London, str.43-65. <https://doi.org/10.1201/9781482272970>

Vonshak A, Accola P, Tomaselli L, Torzillo G (1996) Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. *Physiol Plant* **97**, 175–179. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00494.x>

Vonshak A, Guy R (1992) Photoadaptation, photoinhibition and productivity in the blue-green alga, *Spirulina platensis* grown outdoors. *Plant Cell Environ* **15**, 613–616. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1992.tb01496.x>

Vonshak A, Richmond A (1988) Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. *Biomass* **15**, 233–247. [https://doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90059-5](https://doi.org/10.1016/0144-4565(88)90059-5)

Wiśniewski JR (2016) Quantitative evaluation of filter aided sample preparation (FASP) and multienzyme digestion FASP protocols. *Anal Chem* **88**, 5438–5443. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00859>

World of Molecules (2023) β -carotene. <https://www.worldofmolecules.com/colors/bcarotene.htm> Pristupljeno 15.kolovoza 2023.

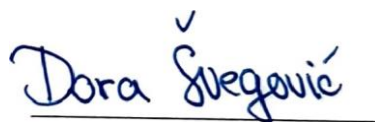
Yanes O, Tautenhahn R, Patti GJ., Siuzdak G (2011) Expanding coverage of the metabolome for global metabolite profiling. *Anal Chem* **83**, 2152–2161. <https://doi.org/10.1021/ac102981k>

Zeinalian R, Farhangi MA, Shariat A, Saghafi-Asl M (2017) The effects of *Spirulina Platensis* on anthropometric indices, appetite, lipid profile and serum vascular endothelial growth factor (VEGF) in obese individuals: a randomized double blinded placebo controlled trial. *BMC Complement Altern Med* **17**, 225. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1670-y>

Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X (2012). Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *The Analyst* **137**, 293–300. <https://doi.org/10.1039/c1an15605e>

IZJAVA O IZVORNOSTI

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



Vlastoručni potpis