

# Antimikrobni učinak Padina pavonica i odabranih fenolnih spojeva na patogene bakterije

---

Periša, Karmen

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:733723>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**ANTIMIKROBNI UČINAK *PADINA PAVONICA* I ODABRANIH  
FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**KARMEN PERIŠA**

**Matični broj: 37**

**Split, svibanj 2023.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE**

**ANTIMIKROBNI UČINAK *PADINA PAVONICA* I ODABRANIH  
FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE**

**DIPLOMSKI RAD**

**KARMEN PERIŠA**

**Matični broj: 37**

**Split, svibanj 2023.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF FOOD TECHNOLOGY**

**ANTIMICROBIAL EFFECT OF *PADINA PAVONICA* AND  
SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS OF PATHOGENIC  
BACTERIA**

**DIPLOMA THESIS**

**KARMEN PERIŠA**

**Parent number: 37**

**Split, May 2023.**

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Studij: Diplomski studij Prehrambene tehnologije

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Tema rada je prihvaćena** je prihvaćena na 25. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta.

**Mentor:** Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza

**Komentor:** Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat

### ANTIMIKROBNI UČINAK PADINE PAVONICE I ODABRANIH FENOLNIH SPOJEVA NA PATOGENE BAKTERIJE

Karmen Periša, 37

**Sažetak:** Hrana koja se stavlja na tržište mora biti dobre kvalitete i zdravstveno ispravna. Na putovanju „od polja do stola“ odnosno prije nego hrana dođe do potrošača, uslijed kvarenja izgubi se 1/3 od ukupno proizvedene količine. Zahtjevi za sigurnom i kvalitetnom hranom rastu kao i briga zbog učestale uporabe sintetskih konzervansa koji to osiguravaju, stoga se sve veća pažnja pridaje prirodnim konzervansima kao alternativni. Potencijalne prirodne konzervanse predstavljaju i morske alge zbog svog kemijskog sastava. Alge sadrže spojeve s visokom biološkom aktivnošću od kojih se najviše ističu fenolni spojevi, sekundarni biljni metaboliti koji su jedna od najvećih skupina fitokemikalija koji pridonose antimikrobnoj i antioksidacijskom djelovanju algi. U ovom istraživanju ispitana je antimikrobna aktivnost smjese ekstrakta smeđe alge *Padina pavonica* i odabranih fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na patogene bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*). Ispitivanje je provedeno metodama određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimum inhibitory concentration*, MIC) i određivanja minimalne baktericidne koncentracije (engl. *Minimum bactericidal concentration*, MBC). Interakcijski antimikrobni učinak između ekstrakta i spoja u smjesi određen je računanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (engl. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI). Ekstrakt smeđe alge *P. pavonica* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5 mg/mL, pokazao je najbolji antimikrobni učinak protiv bakterije *S. aureus*, dok su MIC i MBC vrijednosti prema ostalim bakterijama iznosile 5 ili 10 mg/mL. Sve binarne smjese ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva pokazale su vrlo dobru antimikrobnu aktivnost, ali su uglavnom ukazivale na aditivno djelovanje. Najlošiji interakcijski učinak i najveće FICI vrijednosti ( $\geq 2$ ) zabilježene su za smjese ekstrakta *P. pavonica* i katehina, rutina i vanilinske kiseline prema *L. monocytogenes*.

**Ključne riječi:** alge, *P. pavonica*, antimikrobna aktivnost, fenolni spojevi, MIC

**Rad sadrži:** 32 stranica, 12 slika, 10 tablica, 76 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Generalić Mekinić – predsjednik
2. Izv. prof. dr. sc. Vida Šimat - član
3. Izv. prof. dr. sc. Danijela Skroza - član-mentor

**Datum obrane:**

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 33

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

**University of Split**  
**Faculty of Chemistry and Technology Split**  
**Study:** Graduate study of Food Technology

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Thesis subject was approved** by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 25.

**Supervisor:** Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor

**Co-supervisor:** Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor

### ANTIMICROBIAL EFFECT OF PADINA PAVONICA AND SELECTED PHENOLIC COMPOUNDS OF PATHOGENIC BACTERIA

Karmen Periša, 37

**Abstract:** The food placed on the market must be of good quality and healthy. On the way "from field to table", i.e. before the food reaches the consumer, one third of the total production quantity is lost due to spoilage. Demand for safe, high-quality food is growing, as is concern about the frequent use of synthetic preservatives to ensure this. Because of their chemical composition, algae are also suitable natural preservatives. Algae contain compounds with high biological activity, the best known of which are phenolic compounds, secondary plant compounds that represent one of the largest groups of phytochemicals contributing to the antimicrobial and antioxidant activity of algae. In this study, the antimicrobial activity of a mixture of *Padina pavonica* algae extract and selected phenolic compounds (vanillic acid, catechin, rutin, apigenin, and oleuropein) against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis*) was tested. The test was performed using methods of determining the minimum inhibitory concentration (*Minimum inhibitory concentration*, MIC) and determining the minimum bactericidal concentration (*Minimum bactericidal concentration*, MBC) methods. The antimicrobial interaction between the extract and the compound in the mixture was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The extract of *P. pavonica* algae mixture with MIC and MBC values of 2.5 mg/mL showed the best antimicrobial activity against the *S. aureus* bacteria, while the MIC and MBC values for other bacteria were 5 or 10 mg/mL. All binary mixtures of *P. pavonica* extract and selected phenolic compounds showed very good antimicrobial activity, but mostly indicated an additive effect. The worst interaction effect and the highest FICI values ( $\geq 2$ ) were observed for mixtures of *P. pavonica* extract and catechin, rutin, and vanillic acid against *L. monocytogenes*.

**Keywords:** algae, *P. pavonica*, antimicrobial activity, phenolics, MIC

**Thesis contains:** 32 pages, 12 figures, 10 tables, 76 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. Ph. D. Ivana Generalić Mekinić, Associate Professor - chairperson
2. Ph. D. Vida Šimat, Associate Professor - member
3. Ph. D. Danijela Skroza, Associate Professor - supervisor

**Defence date:**

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 33

*Diplomski rad izrađen je u Zavodu za prehrambenu tehnologiju i biotehnologiju, Kemijsko tehnološkog fakulteta u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Skroza, u razdoblju od rujna do prosinca 2022. godine.*

*Ovaj rad je sufinanciran sredstvima projekta BioProMedFood (Reference Number: 1467; 2019-SECTION2-4).*



## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Skroza na iznimnom strpljenju, izuzetnoj susretljivosti, danim savjetima, idejama, i vremenu koje je pružila prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela istraživanja kao i prilikom pisanja diplomskog rada. Veliko hvala i komisiji izv. prof. dr. sc. Ivani Generalić Mekinić i izv. prof. dr. sc. Vidi Šimat koje su odvojile vrijeme za pregled ovog rada te me savjetovale i ukazale na pogreške.*

*Posebno hvala i mag. ing. agr. Martini Čagalj na savjetima i pomoći prilikom provođenja eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama bez kojih cijeli ovaj period studiranja ne bi prošao tako lako i zabavno.*

*I na kraju, od srca posebno zahvaljujem svojoj obitelji koja me uvijek podržavala i imala razumijevanja te me uputila na pravi put.*

**HVALA SVIMA!**

## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

Zadatak ovog diplomskog rada bio je:

- Ispitati antimikrobnu aktivnost smjese ekstrakta smeđe alge *Padina pavonica* i odabranih fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na patogene bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*).
- Antimikrobnu aktivnost ispitati metodom određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i metodom minimalne baktericidne koncentracije (MBC).
- Analizirati dobivene rezultate te donijeti zaključke o interakcijskom učinku ekstrakta alge *Padina pavonica* i fenolnog spoja u smjesi korištenjem frakcionalnog inhibitornog koncentracijskog indeksa (FICI faktor).

## SAŽETAK

Hrana koja se stavlja na tržište mora biti dobre kvalitete i zdravstveno ispravna. Na putovanju „od polja do stola“ odnosno prije nego hrana dođe do potrošača, uslijed kvarenja izgubi se 1/3 od ukupno proizvedene količine. Zahtjevi za sigurnom i kvalitetnom hranom rastu kao i briga zbog učestale uporabe sintetskih konzervansa koji to osiguravaju, stoga se sve veća pažnja pridaje prirodnim konzervansima kao alternativni. Potencijalne prirodne konzervanse predstavljaju i morske alge zbog svog kemijskog sastava. Alge sadrže spojeve s visokom biološkom aktivnošću od kojih se najviše ističu fenolni spojevi, sekundarni biljni metaboliti koji su jedna od najvećih skupina fitokemikalija koji pridonose antimikrobnoj i antioksidacijskom djelovanju algi. U ovom istraživanju ispitana je antimikrobna aktivnost smjese ekstrakta smeđe alge *Padina pavonica* i odabranih fenolnih spojeva (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) na patogene bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* i *Salmonella enteritidis*). Ispitivanje je provedeno metodama određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (engl. *Minimum inhibitory concentration*, MIC) i određivanja minimalne baktericidne koncentracije (engl. *Minimum bactericidal concentration*, MBC). Interakcijski antimikrobni učinak između ekstrakta i spoja u smjesi određen je računanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (engl. *Fractional Inhibitory Concentration Index*, FICI). Ekstrakt smeđe alge *P. pavonica* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5 mg/mL, pokazao je najbolji antimikrobni učinak protiv bakterije *S. aureus*, dok su MIC i MBC vrijednosti prema ostalim bakterijama iznosile 5 ili 10 mg/mL. Sve binarne smjese ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva pokazale su vrlo dobru antimikrobnu aktivnost, ali su uglavnom ukazivale na aditivno djelovanje. Najlošiji interakcijski učinak i najveće FICI vrijednosti ( $\geq 2$ ) zabilježene su za smjese ekstrakta *P. pavonica* i katehina, rutina i vanilinske kiseline prema *L. monocytogenes*.

**Ključne riječi:** alge, *P. pavonica*, antimikrobna aktivnost, fenoli, MIC

## ABSTRACT

The food placed on the market must be of good quality and healthy. On the way "from field to table", i.e. before the food reaches the consumer, one third of the total production quantity is lost due to spoilage. Demand for safe, high-quality food is growing, as is concern about the frequent use of synthetic preservatives to ensure this. Because of their chemical composition, algae are also suitable natural preservatives. Algae contain compounds with high biological activity, the best known of which are phenolic compounds, secondary plant compounds that represent one of the largest groups of phytochemicals contributing to the antimicrobial and antioxidant activity of algae. In this study, the antimicrobial activity of a mixture of *Padina pavonica* algae extract and selected phenolic compounds (vanillic acid, catechin, rutin, apigenin, and oleuropein) against pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enteritidis*) was tested. The test was performed using methods of determining the minimum inhibitory concentration (*Minimum inhibitory concentration*, MIC) and determining the minimum bactericidal concentration (*Minimum bactericidal concentration*, MBC) methods. The antimicrobial interaction between the extract and the compound in the mixture was determined by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The extract of *P. pavonica* algae mixture with MIC and MBC values of 2.5 mg/mL showed the best antimicrobial activity against the *S. aureus* bacteria, while the MIC and MBC values for other bacteria were 5 or 10 mg/mL. All binary mixtures of *P. pavonica* extract and selected phenolic compounds showed very good antimicrobial activity, but mostly indicated an additive effect. The worst interaction effect and the highest FICI values ( $\geq 2$ ) were observed for mixtures of *P. pavonica* extract and catechin, rutin, and vanillic acid against *L. monocytogenes*.

**Keywords:** algae, *P. pavonica*, antimicrobial activity, phenolics, MIC

## SADRŽAJ

UVOD .....	1
1. OPĆI DIO .....	2
1.1 Morske alge .....	2
1.2. Kemijski sastav i primjena algi .....	4
1.3. Smeđe alge .....	6
1.3.2. Biološki potencijal <i>Padine pavonica</i> .....	12
2. EKSPERIMENTALNI DIO .....	13
2.1. Materijal .....	13
2.2. Reagensi i uređaji .....	14
2.3. Bakterijske kulture.....	14
2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti.....	14
2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma .....	15
2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).....	15
2.4.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC) .....	17
2.4.4. Antimikrobna interakcija odabranih mješavina ekstrakta i fenola .....	17
3. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
4. ZAKLJUČCI .....	25
5. LITERATURA .....	26

## UVOD

Morski sustav privukao je pozornost istraživača obzirom da mnogi organizmi posjeduju ili proizvode spojeve s dokazanom biološkom aktivnošću. Alge predstavljaju široko rasprostranjenu skupinu vodenih, fotosintetskih, autotrofnih organizama koji mogu biti jednostanični, višestanični ili kolonijalni. Morske makroalge razvile su se u kasnom prekambriju, a mogu biti litofilne (raste na tvrdim podlogama), epifitske (na drugim algama ili morskim travama) i endofitne (unutar drugih algi). (1) Kao najraznolikija skupina živih bića na Zemlji, s oko 40 000 vrsta, alge se uvelike koriste u industriji, a u posljednje vrijeme sve više i u prehrani. (2)

Korištenje morskih algi kao hrane i terapeutika u nekim azijskim zemljama, uključujući Japan, Kinu, Tajland i Koreju, je već dugo poznato. Također, poznato je da alge predstavljaju savršene namirnice zbog idealnih omjera hranjivih tvari (polisaharidi, minerali, višestruko nezasićene masne kiseline i vitamini), a uz to imaju nizak sadržaj lipida i bioaktivne molekule. (3) Bioaktivni spojevi u algama koji su najviše istraživani uključuju sulfatirane polisaharide, florotanine i diterpene te je dokazano da ovi spojevi posjeduju jaka antioksidacijska, antimikrobna, antitumorska, antikancerogena i dr. svojstva. (4)

*Padina pavonica* je makroalga koja pripada skupini smeđih algi *Dichtyophyceae*, rasprostranjena od toplih umjerenih do tropskih obala. Dobro je proučavana od početka prošlog stoljeća te se smatra ekološki i medicinski važnom. Poznato je da se intenzivno koristi kao sirovina za proizvodnju biodizela, u biosorpciji teških metala, kao bioindikator onečišćenja, biomonitor metala u tragovima, lijek protiv raka (potiče apoptozu stanica raka), koristi se kao antibakterijsko i antioksidacijsko sredstvo te bioinsekticid. Novija istraživanja ukazuju na sve veću mogućnost iskorištenja *P. pavonica* u prehrambenoj industriji. Obzirom da hrana predstavlja pogodan medij za rast i razvoj mikroorganizama koji uzrokuju njezino kvarenje, izuzetno je važno naći prirodne spojeve i/ili njihove izvore koji bi svojim učinkom doprinijeli očuvanju svojstva i produljenju roka trajnosti hrane.

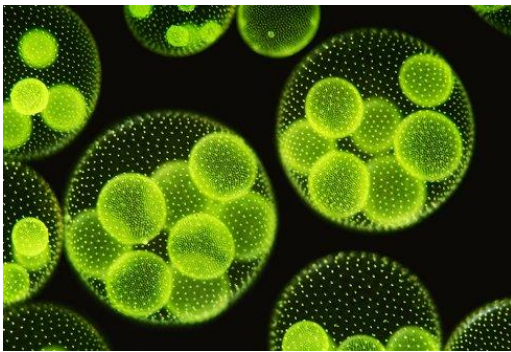
Zbog navedenih potencijalnih svojstva alge *P. pavonica*, cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost smjese odabranih fenolnih spojeva u kombinaciji s ekstraktom alge na patogene bakterije koje se mogu naći u hrani.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1 Morske alge

Morske alge su organizmi nalik biljkama koji se obično nalaze fiksirani na stijenama ili drugim tvrdim podlogama u obalnim područjima, a čine osnovnu biomasu u međuplimnoj zoni. U svijetu je prisutno oko 25 000 vrsta algi, a najveći udio pronalazimo u morskoj vodi. (5) Alge koje su pričvršćene za dno nazivaju se bentos, dok su alge koje plutaju u vodi planktoni. Alge su heterotrofni organizmi koji su u stanju rasti i u ekstremnim uvjetima kao što su promjene saliniteta, temperature, nutrijenata, UV-VIS zračenje, itd., što sve ima utjecaj na njihov kemijski sastav. (6, 7)

Prema morfologiji, alge se mogu razvrstati u dvije skupine, mikroalge i makroalge. (8, 9)



Slika 1. Mikroalge (10)



Slika 2. Makroalge (11)

Smatra se da mikroalge postoje na Zemlji oko 3,5 milijardi godina. Sposobne su provoditi proces fotosinteze gdje uz dovoljno svjetla i vode pretvaraju ugljikov dioksid i vodu u organske tvari i kisik. Jedna od njihovih glavnih značajki je da mogu rasti u nepovoljnim uvjetima okoline za što je zaslužna njihova jednostavna stanična građa. Makroalge ili trave su višestanični, makroskopski, eukariotski i autotrofni organizmi, čija klasifikacija ovisi o različitim svojstvima: pigmentaciji, kemijskoj prirodi produkta fotosintetskog skladištenja, organizaciji fotosintetskih membrana i drugim morfološkim obilježjima. (8)

Makroalge se najčešće klasificiraju na temelju njihovih kemijskih i morfoloških karakteristika, posebice prisutnosti specifičnih pigmenata. Makroalge su brzorastuće morske i slatkovodne biljke koje za razliku od mikroalgi mogu doseći visinu i do 60 m. U usporedbi s kopnenim biljkama, makroalge apsorbiraju hranjive tvari kroz samu strukturu stanica jer nemaju korijenski sustav. (12)

Tradicionalna podjela makroalgi je prema pigmentima koje sadrže na **Chlorophyta** (zelene alge), **Phaeophyta** (smeđe alge) i **Rhodophyta** (crvene alge) (tablica 1). (13) Crvene i smeđe alge nalazimo u moru, dok se zelene alge mogu naći i u slatkim vodama (rijeke, jezera). Pigmenti koji su zastupljeni kod svih vrsta algi su klorofili i karotenoidi. Kod zelenih morskih algi zelena boja je izražena zbog prisutnosti klorofila a i b u istim omjerima, beta-karotena (žuti pigment) te karakterističnih ksantofila (žućkasti ili smećkasti pigmenti). Za smeđu boju morskih algi odgovoran je fukoksantin, dok su fikobilini značajni samo za crvene alge. (14)

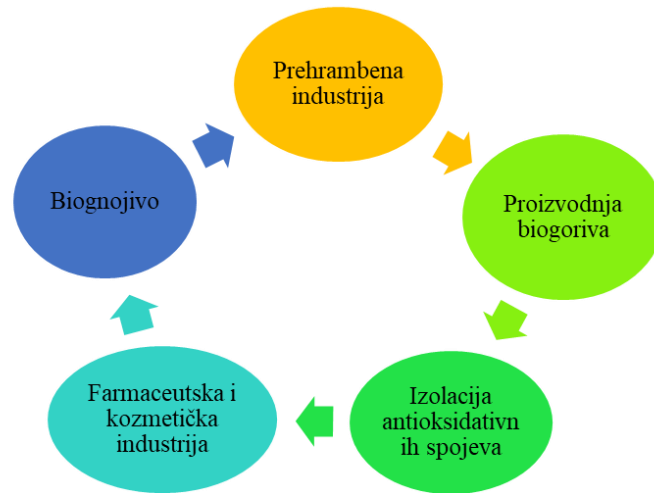
Tablica 1. Podjela makroalgi obzirom na pigmente (13, 15)

<b>Koljeno</b>	<b>Razred</b>	<b>Rod</b>
Chlorophyta	Ulvophyceae	<i>Caulerpa, Enteromorpha, Monostroma, Ulva</i>
Phaeophyta	Phaeophyceae	<i>Ascophyllum, Chorda, Durvillea, Ecklonia, Eisenia, Fucus, Laminaria, Lessonia, Macrocystis, Sargassum, Undaria</i>
Rhodophyta	Bangiophyceae Florideophyceae	<i>Porphyra, Ahnfeltia, Anatheca, Caloglossa, Dilsea, Eucheuma, Furcellaria, Gelidiella, Gelidium, Gigartina, Gloiopeltis, Gracilaria, Gynmogongrus, Hypnea, Iridaea</i>



## 1.2. Kemijski sastav i primjena algi

Alge se koriste u različitim industrijama, kao npr. u kemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj industriji i sl. (slika 3).



Slika 3. Primjena algi u industriji (16, 17)

Alge su primarni proizvođači kisika o kojima ovise vodeni ekosustavi, pa se stoga primjerice koriste za uklanjanje organskih zagađivača, teških metala i patogena iz okoliša. Nafta koju trenutno iskorištavamo dolazi iz naslaga morskih algi. Postoje mnoga istraživanja koja ukazuju na moguću upotrebu algi za proizvodnju biogoriva. Ulje iz mikroalgi može se koristiti u proizvodnji biodizela, a bioetanol se dobiva nakon saharifikacije i fermentacije algi. (18, 19)

Jestive morske alge sadrže i različite bioaktivne spojeve sa zdravstvenim prednostima, tako da se otvara mogućnost njihove uporabe kao funkcionalnih sastojaka u preradi hrane. Štoviše, alge se koriste u prehrambenoj industriji kao dodatak prehrani i sastojak funkcionalne hrane, a neke od primjena prikazane su u tablici 2. (20, 21)

Tablica 2. Primjena makroalgi u prehrambenim proizvodima (22)

<b>Prehrambeni proizvod</b>	<b>Izolirani spoj/ ekstrakt iz makroalgi</b>
Kruh	karagenan, alginat
Mesni proizvodi	prah različitih vrsta makroalgi
Sladoled	alginat i $\omega$ -3 masne kiseline
Tjestenina	prah smeđe makroalge
Hrana za dojenčad	dokosaheksaenska kiselina
Zrnati sir	prah smeđe makroalge

Crvena alga *Chondrus crispus*, poznata kao Irska mahovina, koristi se kao zgušnjivač i stabilizator (E407 i E407b) ili pročišćivač (u pivskoj industriji). Kao funkcionalna hrana koriste se i  $\omega$ -3 masne kiseline iz makroalgi u različitim proizvodima poput hrane za dojenčad, zdravijim varijantama grickalica te u sladoledima. (22)

Morske alge imaju visoku nutritivnu vrijednost. Ipak njihov kemijski sastav znatno varira zbog uvjeta okoliša (intenzitet svjetlosti, stanište rasta, salinitet, temperatura, itd.) i genetskih razlika među vrstama. (23)

Makroalge sadrže proteine (7-31% suhe tvari), lipide (2-13% suhe tvari), značajnu količinu ugljikohidrata (32-60% suhe tvari), te imaju vrlo mali sadržaj lipida (1-5% suhe tvari). Zelene alge imaju viši sadržaj oleinske i  $\alpha$ -linolenske kiseline u odnosu na ostale vrste algi, dok crvene alge imaju visok sadržaj  $\omega$ -3 masne kiseline (EPA, eikozapentaenska kiselina). (24) Morske alge su vrijedne zbog visokog sadržaja spojeva s različitim biološkim djelovanjem, uključujući i složene organske spojeve te primarne i sekundarne metabolite. Među najznačajnijim skupinama spojeva izdvajaju se fitopigmenti (ksantofili i karotenoidi), višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) koje uključuju dokozaheksaensku kiselinu (DHA), fenolni spojevi, peptidi, terpenoidi i dr. (25)

Polisaharidi izolirani iz makroalgi najčešće se primjenjuju u prehrambenim proizvodima zbog sposobnosti vezanja vode, te služe kao sredstva za želiranje, stabilizatori emulzija i pjena, a također imaju važnu ulogu i kao dijetalna vlakna. Polisaharidi koji se koriste u prehrambenoj industriji, a u velikim količinama su prisutni u makroalgama su hidrokoloidi alginat, agar, karagenan i fukoidan. Agar se koristi u različitim proizvodima kao što su slastice, meso i proizvodi od peradi, za pripremu namaza, krema, glazura, itd.. Karagenan se koristi u salatnim umacima, dijetetskoj hrani i kao konzervans u mesnim i ribljim proizvodima, te mliječnim i pekarskim proizvodima. (25)

Što se tiče udjela mikronutrijenata u algama, one su dobar izvor vitamina, posebice predstavnika B skupine (B1, B12), kao i lipofilnih vitamina A i E (tokoferol). Osim vitamina alge su i prirodni izvor minerala, a unutar mineralnog sastava, najznačajniji mikroelementi su kalij, natrij, magnezij i kalcij, koji čine više od 97% ukupnog mineralnog sadržaja. Druge mikroelemente poput bakra, željeza, mangana i cinka nalazimo u malim količinama (0,001-0,094% suhe tvari morskih algi). (26)

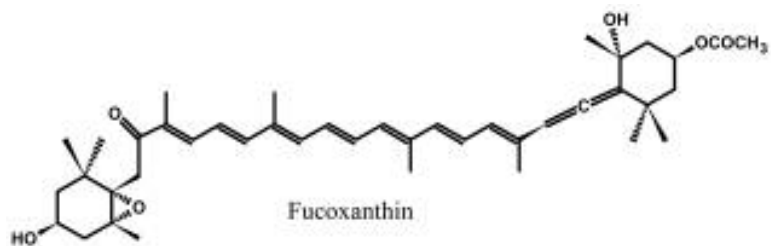
### **1.3. Smeđe alge**

Smeđe alge (Phaeophyceae) su često pričvršćene za stijene ili druge tvrde površine na morskom dnu pomoću posebnih struktura poput rizoida ili krakova. Međutim, neke smeđe alge mogu se pričvrstiti i za mekušce koji su sami pričvršćeni za obalu, morske trave ili druge morske alge. Ova raznolikost u načinu pričvršćivanja omogućuje smeđim algama da prežive u različitim okruženjima i staništima u oceanima diljem svijeta.

Prema dosadašnjim istraživanjima dokazano je da smeđe makroalge s 59% zauzimaju najveći udio u proizvodnji od ukupne količine makroalgi, nakon čega slijede crvene alge s 40% te zelene s manje od 1%. (27)

Ljudi smeđe alge konzumiraju već stotinama godina, a današnje studije pokazuju da su one bogat izvor bioaktivnih spojeva izvrsne nutritivne vrijednosti. (28, 29) Spojevi smeđih algi povezuju se s različitim farmaceutskim svojstvima koja ih čine korisnima u prevenciji i liječenju širokog spektra poremećaja i/ili bolesti. (29, 30)

Fukoksantin (slika 4) je morski karotenoid, pigment odgovoran za boju smeđih algi. Prisutan je u većoj količini tako da prekriva gotovo cijeli klorofil. (12, 31)



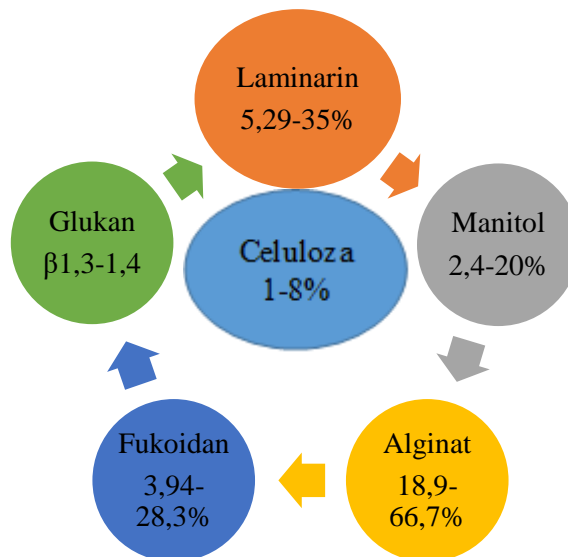
Slika 4. Struktura fukoksantina (31)

Tablica 3. Kemijski sastav smeđih algi (32)

KOMPONENTA	UDIO (%)
Proteini	4,3-24
Minerali	17-44
Lipidi	0,3-4,5
Makrominerali	1,3-7
Ugljikohidrati	12,2-56,4

Većina smeđih algi sadrži posebnu skupinu hidrofilnih fenolnih spojeva koji se nazivaju florotanini ( engl. *Phlorotannins*, PHT) koji pokazuju jaku sklonost vezanju za polisaharide, proteine, biopolimere te imaju širok spektar farmakoloških svojstava. PHT su heterogena i visokomolekulska skupina spojeva koja je važna u svim stadijima rasta i razvoja algi, od ranih razvojnih stadija do odraslih biljaka. PHT se dobivaju polimerizacijom floroglucinola (1,3,5-trihidroksibenzena) putem acetat malonatnog puta. Ova skupina fenolnih spojeva ima 10 do 100 puta jače antioksidativno djelovanje u odnosu na druge polifenole. (33)

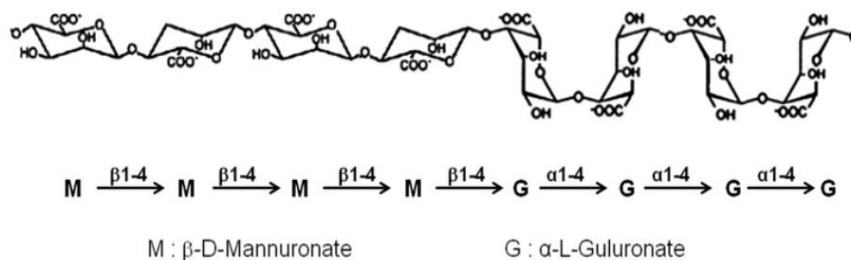
Smeđe alge obiluju i polisaharidima od kojih se najviše ističu fukoidan, alginat i laminarin (tablica 3, slika 5). (34)



Slika 5. Kemijski sastav smeđih algi (33)

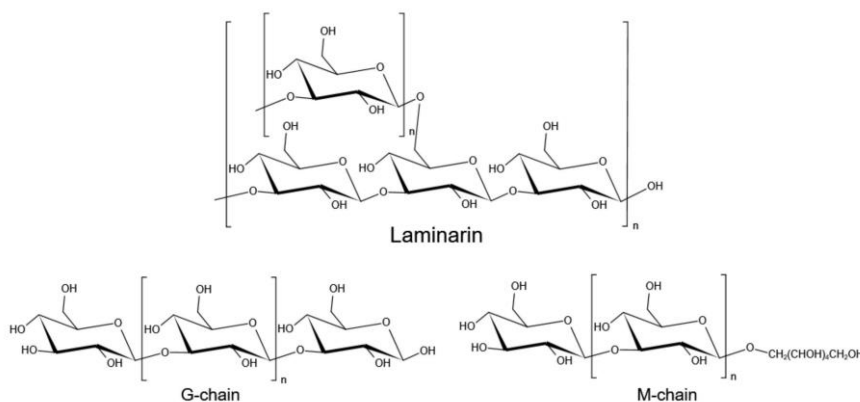
Fukoidani su složeni sulfatirani polisaharidi bogati fukozom čije su jedinice povezane  $\alpha$ -(1,3) ili naizmjeničnim  $\alpha$ -(1,3) i  $\alpha$ -(1,4) glikozidnim vezama te rijetko  $\alpha$ -(1,2) vezama. Uz fukozu prisutne su i galaktoza, glukoza, manoza, ramnoza, ksiloza i uronska kiselina čiji udio ovisi o vrsti alge i godišnjem dobu. Fukoidani su uglavnom karakteristični za smeđe alge i čine od 40 do 80% njihove ukupne suhe tvari, a nalaze u fibrilarnim staničnim stjenkama i međustaničnim prostorima. (35) Iako su poznati od 1913. g. njihova struktura je još uvijek nepotpuno određena zbog njihove složenosti, heterogenosti i nepravilnosti (36). Dokazano je da fukoidani posjeduju različite biološke aktivnosti, uključujući antioksidacijsko, antibakterijsko, antitumorsko, antikoagulantno i protuupalno djelovanje. (37)

Alginat je dominantna polisaharidna komponenta koja se nalazi u stjenkama stanica i u međustaničnom matriksu smeđih makroalgi (slika 6). To je linearni polisaharid sastavljen od dva konformacijski izomerna ostatka:  $\beta$ -D-manuorata (M) i njegovog C-5 epimera  $\alpha$ -L-guluronata (G) povezanih preko 1,4-glikozidnih veza. Proizvode ga također i neke bakterije iz rodova *Pseudomonas* i *Azotobacter*. U smeđim algama, alginat je zastupljen od 30 do 60%, a pronalazimo ga i u crvenim algama. (38) Njegova jedinstvena fizikalna svojstva omogućuju mu upotrebu kao stabilizator, viskozator i sredstvo za želiranje u hrani i piću, u proizvodnji papira i kod tiskanja, industriji biomaterijala, te farmaceutskoj industriji. (39)



Slika 6. Kemijska struktura alginata (40)

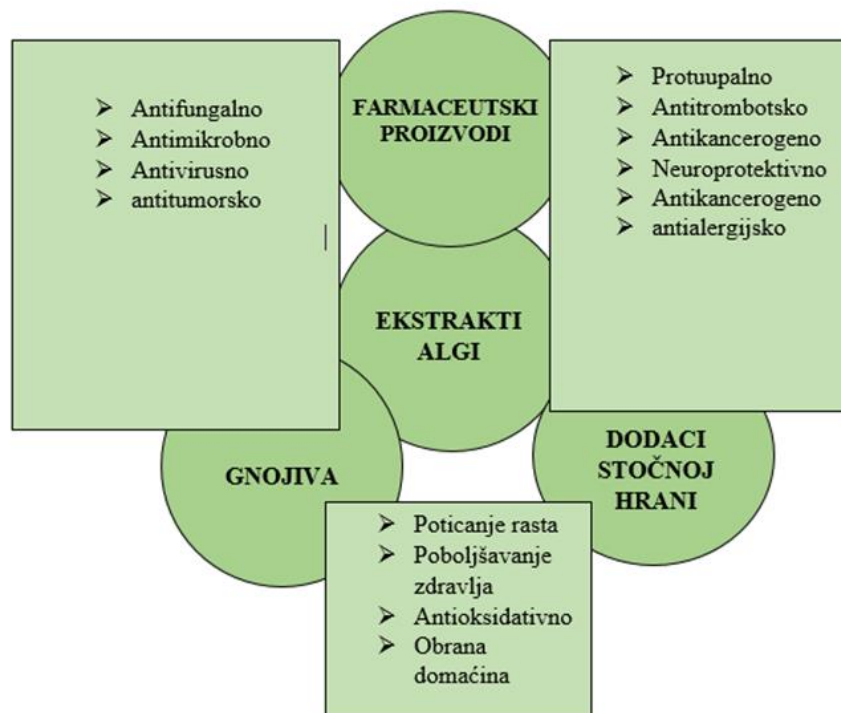
Laminarin (slika 7) je glukan koji se nalazi u morskim smeđim algama. Smatra se jednim od glavnih skladišnih ugljikohidrata smeđih makroalgi. (41) Najčešće ga pronalazimo u listovima makroalgi *Laminaria* i *Saccharina*, uključujući *Ascophyllum*, *Fucus* i *Undaria*. Također, koristi se u tradicionalnoj kineskoj medicini, a pokazalo se da ima nekoliko bioloških aktivnosti od kojih se posebno ističe antikancerogeno djelovanje. Laminarin je  $\beta$ -glukan, uglavnom sastavljen od ostataka  $\beta$ -1,3-D-glukopiranoze; većina glukoze je 6-O-razgranata, dok dio ima  $\beta$ -1,6-intranlančane veze. Laminarin vezan za D-manitol na reducirajućem kraju lanca naziva se M lanac, dok se laminarin bez manitola na reducirajućem kraju naziva G lanac. (42)



Slika 7. Struktura Laminarina (42)

Relativno visoka koncentracija fenolnih spojeva u brojnim vrstama morskih algi doprinosi njihovim biološkim svojstvima. Trenutačni dokazi snažno podupiru doprinos fenolnih spojeva u prevenciji kardiovaskularnih bolesti i raka te sugeriraju njihovu ulogu u prevenciji neurodegenerativnih bolesti i dijabetes melitusa. Antioksidativna aktivnost otkrivena u morskim algama povezana je s potencijalnim učincima protiv starenja, protuupalnim, antibakterijskim, antifungalnim, citotoksičnim, antimalarijskim, antiproliferativnim i antikancerogenim učincima. (43-49)

Mayer i sur proveli su istraživanje o morskim spojevima ( ekstrakti morskih algi, morske bakterije, morski krastavci, spužve, gljive) s antibakterijskim, antikoagulantnim, antidiabetičkim, antifungalnim, protuupalnim, antimalarijskim, antitrombocitnim, antituberkuloznim i antivirusnim djelovanjem; koji utječu na kardiovaskularni, imunološki i živčani sustav i druge razne mehanizme djelovanja. Zaključili su da je morski sustav bogat sa vrlo vrijednim spojevima uključujući i alge koje imaju dobro antioksidacijsko djelovanje tako što neutraliziraju štetne učinke slobodnih radikala. (45)



Slika 8. Biološke aktivnosti ekstrakta algi (46, 47)

### 1.3.1. *Padina pavonica*

*P. pavonica* (slika 9) je smeđa alga poznata i kao paunov rep, a rasprostranjena je u Indijskom, Tihom i Atlantskom oceanu te Sredozemnom i Jadranskom moru. Klasifikacija *P. pavonica* prikazana je u tablici 4. (50)



Slika 9. *Padina pavonica* (51)

Tablica 4. Klasifikacija smeđe alge *P. pavonica* (52)

Domena	Eukaryota
Carstvo	Chromalveolata
Odjeljak	Ochrophyta
Razred	Phaeophyceae
Podrazred	Dictyotophycidae
Red	Dictyotales
Obitelj	Dichthyophyceae
Rod	<i>Padina</i>
Vrsta	<i>Padina pavonica</i>

*P. pavonica* živi u stjenovitim područjima, a za stijenu je pričvršćena rizoidima. Talus je kalcificiran na jednoj ili obje površine. Na donjoj površini nalaze se koncentrične linije od tankih bjelkastih niti. Donja površina alge je tamno-smeđe, svijetlo-smeđe ili maslinasto-zelene boje, dok je gornja površina obično prekrivena tankim slojem mulja. (50,52)

Danas postoje 72 vrste koje pripadaju rodu *Padina*, od kojih je većina tek omedavno taksonomski prihvaćena. (52)



*P. pavonica* je prilično jedinstvena jer je jedna od dvije kalcificirane smeđe alge koje su danas. Taloži  $\text{CaCO}_3$  u mikroskopskom obliku aragonitnog igličastog oblika koji se makroskopski vidi kao okomite trbušne pruge. (53-55)

### 1.3.2. Biološki potencijal *Padine pavonica*

Poznato je da su antioksidansi aktivne tvari prisutne u hrani, koji imaju važnu ulogu u zaštiti ljudskog organizma od slobodnih radikala. *Padina* predstavlja potencijalni izvor biološki aktivnih metabolita što je potvrđeno mnogim provedenim istraživanjima. Antioksidativni spojevi *P. pavonica* proizvode se u njezinim tjelesnim tkivima kao odgovor na nepovoljne uvjete okoliša u kojima živi. (56) U istraživanju koje su proveli Alam i suradnici korišteno je nekoliko najpoznatijih metoda pomoću kojih se određuje antioksidacijski potencijal (DPPH, FRAP, ORAC i dr.). Autori su naglasili važnost primjene više antioksidacijskih testova kojima bi se opisala antioksidacijska aktivnost ekstrakta obzirom na razlike u mehanizmu djelovanja pojedinih metoda. (57)

Znanstvenici ističu i antimikrobna svojstva algi prema mnogih gram-negativnim i gram-pozitivnim bakterijskim patogenima vrstama. Izdvaja se istraživanje antimikrobnog djelovanja flavonoidnih ekstrakata dviju smeđih algi, *P. pavonica* i *Cystoseira compressa* koje su proveli Alghazeer i suradnici. Ovo istraživanje ističe antibakterijski potencijal prema rezistentnim gram-pozitivnim i negativnim bakterijskim izolatima, uključujući MRSA. (58)

Ertürk i suradnici u svojoj studiji analizirali su etanolne ekstrakte iz sedam vrsta morskih algi među kojima je *P. pavonica* pokazala antibakterijsko djelovanje protiv *E. coli* i *S. aureus*. Osim antibakterijskog djelovanja *P. pavonica* pokazala je i antifungalnu aktivnost prema *Aspergillus niger*. Minimalne koncentracije inhibicije (MIC) ekstrakta bile su u rasponu od 1,25 do 10 mg/mL. (59)

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Materijal

U eksperimentalnom dijelu diplomskog rada korišteni su uzorci smeđe alge *P. pavonica* iz porodice Dictyotaceae prikupljeni na području Dalmacije u rujnu 2021. godine. Ekstrakti su pripremljeni korištenjem mikrovalova u uređaju Ethos X (Milestone, Italija) u trajanju od 15 min 600 W (10 g uzorka i 100 mL 50%-tnog etanola). Po završetku ekstrakcije uzorak je filtriran preko naboranog filter papira, potom liofiliziran i do trenutka analize skladišten na sobnoj temperaturi. Neposredno prije analize 40 mg liofiliziranog ekstrakta otopljeno je u 1 mL 4%-tnog DMSO i tako pripremljen ekstrakt je korišten u daljnjim analizama i pripreman binarnih smjesa.

U tablici 5 prikazani su korišteni fenolni spojevi te fenolna podskupina kojoj pripadaju. Fenolni spojevi su pripremljeni u različitim koncentracijama: vanilinska kiselina, katehin i rutin pri koncentraciji 10 mg/mL, apigenin 4,09 mg/mL te oleuropein pri koncentraciji 11,06 mg/mL. Binarne smjese su pripremljena miješanjem 2 mL ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* i 2 mL otopine fenolnog spoja.

Tablica 5. Odabirani fenolni spojevi

Skupina	Fenolni spoj
Derivat benzojeve kiseline	Vanilinska kiselina
Flavan-3-oli	(+)-Katehin
Flavonoli	Rutin
Flavoni	Apigenin
Monoterpen	Oleuropein

## **2.2. Reagensi i uređaji**

Reagensi korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti su kemikalije odgovarajuće analitičke čistoće. Proizvođači korištenih reagensa su Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Njemačka); Fluka (Buchs, Švicarska); Kemika (Zagreb, Hrvatska); Merck (Darmstadt, Njemačka).

Uređaji korišteni u eksperimentalnom dijelu istraživanja su: ultrazvučna kupelj (Transsonic 310/H, Elma, Njemačka); analitička vaga (Mettler P1210, SAD); Thermomixer comfort, Eppendorf, Njemačka); liofilizator (FreeZone 2,5L, Labconco, Kansas City, SAD); mikrovalna pečnica (Gorenje, Hrvatska)

## **2.3. Bakterijske kulture**

Za određivanje antimikrobne aktivnosti korišteni su bakterijski sojevi ATCC (engl. *American Type Culture Collection*): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Enterococcus faecalis* ATCC 29219, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 i *Escherichia coli* ATCC 25922. Bakterijske kulture su prenesene s dubokog agara na hranjivi agar te inkubirane u aerobnim uvjetima pri 37 °C. Ovako uzgojeni sojevi čuvani su u hladnjaku pri +4 °C.

## **2.4. Metode određivanja antimikrobne aktivnosti**

Antimikrobna aktivnost smeđe alge *P. pavonica*, odabranih fenolnih spojeva i njihovih smjesa ispitana je i određena pomoću MIC i MBC metoda.

Eksperiment se izvodio u sterilnim uvjetima, korišteno posuđe i pribor prethodno je sterilizirano, a otapala korištena u eksperimentu pročišćena su prema standardnim uvjetima.

### 2.4.1. Priprema i kontrola inokuluma

Prije početka eksperimenta bakterijske kulture su revitalizirane na hranjivom Mueller-Hinton agaru (MHA) nakon čega su se koristile za pripremu inokuluma.

Ezom je uzeta jedna kolonija kulture s krute podloge (MHA) i prenesena u 3-5 mL Mueller-Hinton bujona (MHB) kako bi se pripravila prekonoćna kultura (37 °C; 14-16 h). Nakon inkubacije otpipetirano je 3 mL kulture u 27 mL MHB-a i smjesa je stavljena na inkubaciju 1-1,5 h (ovisno o bakteriji), uz miješanje (110 rpm/s) pri 37 °C. Gustoća bakterija očitana je pomoću dezitometra te se na osnovu umjerenih krivulja napravio izračun za pripravu željene koncentracije radnog inokuluma. U sterilnu posudicu s MHB otpipetiran je određeni volumen kulture, a pripremljeni radni inokulum imao je koncentraciju od  $1-2 \times 10^5$  CFU/mL (engl. *Colony Forming Units*).

Kao potvrda koncentracije bakterijskih stanica u radnom inokulumu koristila se metoda po Kochu. Od radnog inokuluma se pripravila serija decimalnih razrjeđenja u puferu te se po 10 µL nakapalo na hranjivu MHA podlogu i inkubiralo pri 37 °C tijekom 24 h. Nakon provedene inkubacije izbrojane su porasle kolonije na hranjivoj podlozi te je izračunat broj živih stanica po mililitru uzorka, gdje CFU predstavlja broj živih stanica.

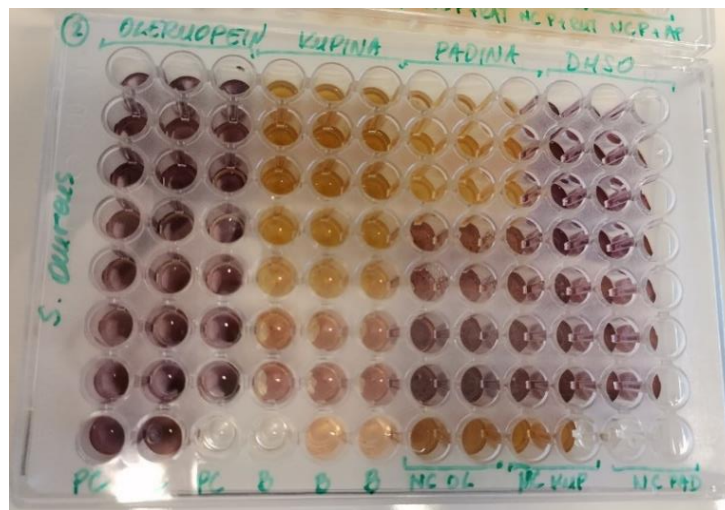
$$\text{CFU/ mL} = \frac{\text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja}}{\text{volumen uzorka}}$$

### 2.4.2. Metoda određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC)

Test minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) provodi se korištenjem MHA, koji je najbolji medij za rutinske testove osjetljivosti. Vrlo jednostavno se reproducira, ima nizak udio sulfonamida, trimetoprima i tetracikličnih inhibitora te daje zadovoljavajući rast većine patogenih bakterija. (60)

MIC predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog agensa koja u potpunosti inhibira rast mikroorganizama, a izražava se u µg/mL ili mg/L. (61, 62)

Testirani uzorak ekstrakta alge serijski se razrijedio duž pločice na način da se 50  $\mu$ L uzorka prenijelo u sljedeći otvor na pločici, u kojem je bilo 50  $\mu$ L MHB-a te izmiješalo. Postupak se ponavljao do kraja pločice te je ovim načinom razrjeđivanja svaka sljedeća koncentracija, odnosno jažica, sadržavala koncentraciju uzorka upola nižu od one u prethodnoj. Konačni volumen u svakoj jažici nakon razrjeđivanja bio je 50  $\mu$ L. U svrhu kontrole rezultata na svakoj pločici pripremljena je slijepa proba (100  $\mu$ L MHB), pozitivna kontrola (50  $\mu$ L MHB + 50  $\mu$ L bakterijske kulture) te negativne kontrole za uzorak (50  $\mu$ L MHB + 50  $\mu$ L ekstrakta smeđe alge *P. pavonica*, fenolnog spoja ili binarne smjese). Nakon toga, u sve otvore pločice, osim u slijepu probu i negativne kontrole se dodalo 50  $\mu$ L ispitivanih kultura bakterija (radni inokulum), izmiješalo i inkubiralo 24 h pri 37 °C. Nakon inkubacije i dodatka INT reagensa došlo je do promijene boje u jažicama u kojima je nastavljen rast bakterijskih stanica, a usporedbom promjene boje pozitivne kontrole, slijepa probe i negativne kontrole s obojenjima u jažicama s uzorcima odredila se MIC vrijednost. MIC vrijednost je ona koncentracija antimikrobnog agensa prisutna u prvom ne obojanom otvoru pločice, odnosno otvoru u kojem je inhibiran rast bakterijskih stanica.



Slika 10. Izgled mikrotitarske pločice nakon dodatka INT-a (vlastita fotografija)

### 2.4.3. Metoda određivanja minimalne baktericidne koncentracije (MBC)

MBC ili minimalna baktericidna koncentracija definirana je kao najniža koncentracija antimikrobnog agensa potrebna da se ubije 99,9% konačnog inokuluma nakon inkubacije tijekom 24 sata pod standardnim uvjetima.

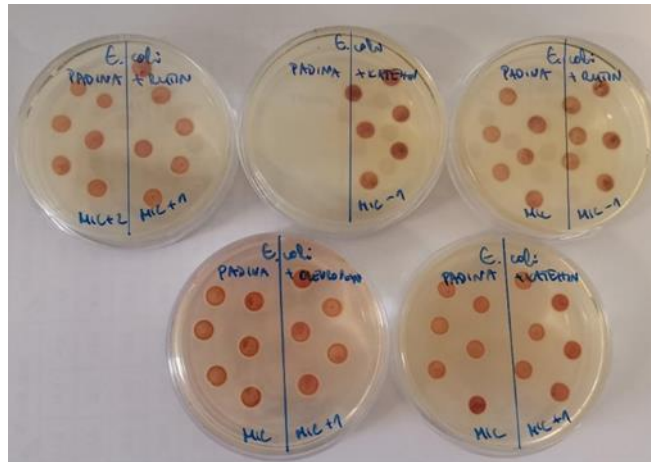
Uzorci iz mikrotitarske pločice, odnosno iz jažica za koje je utvrđeno da predstavljaju MIC vrijednosti, nasijani su na neselektivne MHA pločice. Pločice su potom stavljene na inkubaciju tijekom 24 h pri 37 °C. Nakon inkubacije odredio se broj preživjelih stanica mikroorganizma (CFU/mL) i MBC vrijednost za pojedini mikroorganizam. Primjer agar pločice korištene pri određivanju MBC vrijednosti nakon inkubacije prikazan je na slici 21. Fotografija prikazuje kombinaciju ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* s oleuropeinom te je vidljivo da ova kombinacija potpuno inhibira rast bakterije *E. coli* (jažica s MIC vrijednosti i jažica u kojoj je koncentracija smjese bila veća od MIC vrijednosti).



Slika 11. Izgled agar pločica nakon 24-satne inkubacije (vlastita fotografija)

### 2.4.4. Antimikrobna interakcija odabranih mješavina ekstrakta i fenola

U eksperimentalnom dijelu rada istraživana je i antimikrobna aktivnost ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* u kombinaciji s odabranim fenolnim spojevima (vanilinska kiselina, katehin, rutin, apigenin i oleuropein) protiv najčešćih patogena koji se prenose hranom: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, te *Salmonella enteritidis*.



Slika 12. Antimikrobna interakcija ekstrakta *Padine pavonice* s odabranim fenolnim spojevima (vlastita fotografija)

Interakcija između spojeva u smislu antibakterijskog djelovanja određena je izračunavanjem frakcijskog inhibitornog koncentracijskog indeksa (FICI), koji je za svaku smjesu izračunat prema sljedećoj formuli:

$$FIC_A + FIC_B = FICI,$$

gdje je  $FIC_A = MIC$  alge (spoja A) u mješavini fenola i alge/  $MIC$  same alge, te  $FIC_B = MIC$  fenolnog spoja (spoja B) u smjesi fenola i alge/  $MIC$  samog fenola. Sinergistička interakcija definirana je kada FICI iznosi 0,5 ili manje, a antagonistička interakcija kada je FICI veći od 4. FICI vrijednosti između 0,5 i 1 tumačene su kao aditivna interakcije, a između 1 i 4 kao indiferentne interakcije.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

U tablicama 6 i 7 prikazane su MIC i MBC vrijednosti čistih fenolnih spojeva i ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* prema testiranim G(+) i G(-) patogenim bakterijama. Čisti ekstrakt smeđe alge *P. pavonica* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5 mg/mL, pokazao je najbolji antimikrobni učinak protiv bakterije *S. aureus*, dok su MIC i MBC vrijednosti prema ostalim bakterijama iznosile 5 ili 10 mg/mL. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima studije koju su proveli Erturk i suradnici (59) u kojima je *P. pavonica* pokazala MIC vrijednosti u rasponu od 1,25-10 mg/mL.

Dobiveni rezultati antimikrobne aktivnosti čistih fenolnih spojeva ukazuju na sličnu aktivnost testiranih spojeva prema odabranim bakterijama, s MIC vrijednostima oko 1,25 mg/mL, uz iznimku apigenina koji je pokazao najbolju aktivnost i najnižu MIC vrijednost (0,51 mg/mL) prema *E. faecalis* te katehina s najnižom MIC vrijednosti (0,63 mg/mL) prema *L. monocytogenes*.

Tablica 6. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) smeđe alge *P. pavonica* i čistih fenolnih spojeva za G(+) bakterije

UZORAK	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>P. pavonica</i>	2,5	2,5	>10	/	10	10	5	5
Vanilinska kiselina	>1,25	/	>1,25	/	>1,25	/	>1,25	/
Katehin	>1,25	/	1,25	>1,25	1,25	>1,25	0,63	>1,25
Rutin	>1,25		1,25	>1,25	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Apigenin	>0,51	/	>0,51	/	0,51	>0,51	>0,51	/
Oleuropein	>1,45	/	>1,45	/	>1,45	/	>1,45	/



Tablica 7. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta *P. pavonica* i čistih fenolnih spojeva za G(-) bakterije

UZORAK	<i>E. coli</i>		<i>S. enteridis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>P. pavonica</i>	10	10	10	10
Vanilinska kiselina	>1,25	/	>1,25	/
Katehin	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Rutin	1,25	>1,25	1,25	>1,25
Apigenin	>0,51	/	>0,51	/
Oleuropein	>1,45	/	>1,45	/

U uvodnom dijelu ovog rada već je istaknuta nutritivna vrijednost makroalgi kao i sve veći interes istraživača u otkrivanju kemijskog profila i biološkog potencijala algi iz različitih staništa. Brojna istraživanja fokusirana su na korištenje različitih metoda ekstrakcije kao i otapala za dobivanje bioaktivnih spojeva specifičnog biološkog djelovanja. Rezultati nekih studija ukazuju na značajan utjecaj metode i parametara ekstrakcije na fenolni profil ekstrakata algi. U dostupnoj literaturi izdvajaju se znanstvena istraživanja kojima je cilj bio optimizirati metodu ekstrakcije smeđe alge *P. pavonica* korištenjem ultrazvuka, mikrovalova, organskih otapala i primjenom različitih temperaturnih režima. (57, 59, 63, 64). Također, studije ističu kako različiti spojevi izolirani iz morskih algi, poput alkaloida i fenola, imaju dobro antimikrobno djelovanje. (65)

Veliki broj studija ističu vodu i alkohol kao dva najbolja i najkorištenija ekstrakcijska otapala zbog ekonomskih, toksikoloških i ekoloških razloga, pri čemu se uglavnom navodi da etanolni ekstrakti sadržave više koncentracije fenola (fenolnih kiselina, floroglucinola i dr.). (66, 67).

U znanstvenim radovima se uz zaključak da *P. pavonica* obiluje fenolnim spojevima stalno pojavljuje činjenica da ekstrakti posjeduju i brojna biološka svojstva poput antioksidacijske aktivnosti, antifungalnog i insekticidnog djelovanja, antialergijske, antikancerogene i antimikrobne aktivnosti.

Istraživanja koja su provedena na acetonskim ekstraktima *Dictyota dichotoma*, *P. pavonica* i *Sargassum vulgare* s jadranske obale u Crnoj Gori pokazala su da sve testirane alge imaju, osim visokog fenolnog sadržaja, antioksidativni, antimikrobni i citotoksični potencijal. Prema navedenim podacima, može se zaključiti da je ekstrakt *P. pavonica* pokazao jaču aktivnost u hvatanju slobodnih radikala u usporedbi s ekstraktima *D. dichotoma* i *S. vulgare*. Konkretnije, vrijednost IC50 za ekstrakt *P. pavonica* iznosi 691,56 µg/L, dok se vrijednosti IC50 za ekstrakte *D. dichotoma* i *S. vulgare* ne spominju, pa se ne može izvesti usporedba s tim ekstraktima. Važno je napomenuti da se IC50 odnosi na koncentraciju tvari koja je potrebna za inhibiciju polovice slobodnih radikala u uzorku, stoga se može smatrati da što je niža vrijednost IC50, to je jača aktivnost u hvatanju slobodnih radikala. (68)

Tuney i suradnici u svojoj studiji proučavali su dietil eter, aceton i etanolni ekstrakt 11 vrsta algi, uključujući i *P. pavonica*. Ispitali su antimikrobno djelovanje prema *Candida sp.*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *E. coli* metodom disk difuzije. Kao rezultat usporedbe antimikrobne aktivnosti ekstrakta dobivenog iz suhe i svježe alge, utvrđeno je da su svi testirani organizmi bili osjetljiviji na ekstrakte iz svježe alge. (69)

Istraživanje koje su proveli Khaled i suradnici (70) obuhvaćalo je alge *P. pavonica* i *Sargassum vulgare*. Proveli su dvije različite metode ekstrakcije metanolom, potom frakcioniranje (petrol eter, etil acetat, butanol i vodena otopina). DPPH metodom ispitali su antioksidativnu aktivnost. Na temelju dobivenih rezultata autori su donijeli zaključak da *P. pavonica* obiluje fenolnim spojevima zbog kojih ima dobro antioksidacijsko i antimikrobno djelovanje, što je potvrđeno rezultatima gdje je etil acetatna frakcija alge *P. pavonica* pokazala značajno antifungalno djelovanje prema *Candida glabrata* i *Candida krusei*.

Dulger i Dulger proučavali su antimikrobni učinak dviju smeđih algi *P. pavonica* i *C. compressa* prema meticilin rezistentnom *S. aureus*. Testirali su antibakterijsku sposobnost etanolno-vodenog ekstrakta (7,2% za etanolni ekstrakt i 6,8% za vodeni ekstrakt) *P. pavonica* i rezultati su bili pozitivni za *S. aureus*, međutim rezultati nisu pokazali antifungalnu aktivnost. (71)

Istraživanje antimikrobnog učinka endemskih vrsta koje je samostalno proveo Dulger pokazalo je da etanolni ekstrakt *P. pavonica* ima slabu aktivnost protiv *Candida sp.*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *E. coli*. (72)

Za razliku od alge *P. pavonica*, antimikrobna aktivnost pojedinih fenolnih spojeva je već ispitana i brojni radovi ukazuju na njihova dobra antimikrobna svojstva. Tako npr. Ibrahim i suradnici potvrđuju MIC vrijednosti prema G(+) *S. aureus* u iznosu od 2 mg/mL za vanilinsku kiselinu i 1,25 mg/mL za katehin. (73) Araruna i suradnici proučavali su antimikrobno djelovanje rutina prema različitim sojeva bakterija, *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*. Rezultati njihovih istraživanja pokazali su visoki stupanj inhibicije rasta bakterija *E. coli*, dok su s druge strane rutin nije inhibirao rast *S. aureusa*. (74) Arima i suradnici u svom istraživanju također su ispitali rutin koji je sinergistički pojačao antibakterijsko djelovanje drugih flavonoida prema *B. cereus* i *S. enteritidis*. U svojoj studiji ističu kempferol, čija je MIC vrijednost bila značajno smanjena dodatkom rutina u smjesu. (75) Osim rutina dokazan je i dobar antimikrobni učinak oleuropeina što su potvrdili Caturla i suradnici. (76) U svom istraživanju zaključili su da oleuropein ima snažno antimikrobno djelovanje prema G(+) i G(-) bakterijama, te da se njegov antibakterijski učinak temelji na oštećenju bakterijske membrane i/ili ometanju staničnih peptidoglikana. Oleuropein i drugi testirani fenolni spojevi (*p*-hidroksibenzojeva, vanilijeva i *p*-kumarinska kiselina) potpuno su inhibirali razvoj *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* i *B. cereus*. (76)

Iako brojni autori proučavaju mehanizam djelovanja fenolnih spojeva na bakterijske stanice, točan mehanizam antimikrobnog djelovanja još uvijek nije poznat. Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost smjesa ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva na patogene bakterije. Istraživanjem koje se provelo pokušalo se dokazati hoće li dodatak fenolnog spoja utjecati na bolji antimikrobni učinak ekstrakta smeđe alge *P. pavonica*.

Rezultati koji su dobiveni provedenim istraživanjem prikazani su u tablicama 8 i 9 iz kojih se jasno uočava da su smjese ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva uglavnom pokazale aditivno djelovanje ili indiferentnu interakciju.

Tablica 8. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva za G(+) bakterije.

<i>P. pavonica</i> +	<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>L.monocytogenes</i>		<i>E. faecalis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Vanilinska kiselina	2,5+0,63	>5+1,25	>5+1,25	/	>5+1,25	/	5+1,25	>5+1,25
Katehin	2,5+0,63	5+1,25	5+1,25	>5+1,25	5+1,25	>5+1,25	5+1,25	5+1,25
Rutin	2,5+0,63	5+1,25	5+1,25	>5+1,25	5+1,25	>5+1,25	5+1,25	>5+1,25
Apigenin	3,3+0,34	≥3,3+0,34	>3,3+0,34	/	>3,3+0,34	/	>5+1,25	/
Oleuropein	2,5+0,73	5+1,45	>5+1,45	/	5+1,25	>5+1,45	5+1,45	5+1,45

Tablica 9. Rezultati minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, mg/mL) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC, mg/mL) ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva za G(-) bakterije.

<i>P. pavonica</i> +	<i>E. coli</i>		<i>S. enteridis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Vanilinska kiselina	5+1,25	≥5+1,25	>5+1,25	/
Katehin	5+1,25	>5+1,25	5+1,25	5+1,25
Rutin	5+1,25	>5+1,25	>5+1,25	/
Apigenin	>5+1,25	/	5+1,25	>5+1,25
Oleuropein	5+1,25	>5+1,45	5+1,45	>5+1,45

Promatrajući rezultate antimikrobne aktivnosti pojedinih fenola i ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* s rezultatima dobivenim za smjese, uočava se da binarne smjese imaju gotovo jednak učinak. Interakcijska aktivnost između pojedinih komponenti u smjesi može se interpretirati pomoću FICI faktora. U tablici 10 vidljivo je da binarne smjese imaju poprilično jednak učinak kao i individualni uzorci.

Tablica 10. Interakcijska aktivnost smjesa ekstrakta i fenolnih spojeva izražena kao FICI

<i>P. pavonica</i> +	<i>G (+)</i>				<i>G (-)</i>	
	<i>S.</i> <i>aureus</i>	<i>B.</i> <i>cereus</i>	<i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>S.</i> <i>enteritidis</i>
Vanilinska kiselina	1,50	1,50	2,00	1,50	1,50	1,50
Katehin	1,50	1,50	2,98	1,50	1,50	1,50
Rutin	1,50	1,50	2,00	1,50	1,50	1,50
Apigenin	1,99	1,00	1,33	1,17	1,17	1,17
Oleuropein	1,50	1,50	1,86	1,50	1,36	1,50

FICI ili frakcijska vrijednost indeksa inhibitorne koncentracije predstavlja interakciju između spojeva u smjesama, u odnosu na antibakterijsko djelovanje. Vrijednost  $\leq 0,5$  označava sinergističku interakciju, FICI 0,5-1 aditivnu, FICI 1-4 indiferentnu, a FICI  $> 4$  označava antagonističku vrijednost među ispitivanim fenolnim spojevima.

Smjesa ekstrakta alge i apigenina jedina je pokazala aditivno djelovanje dok su ostale smjese imale indiferentnu vrijednost. Najlošiji interakcijski učinak i najveće FICI vrijednosti ( $\geq$  od 2) zabilježene su za smjese ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* uz dodatak katehina, rutina i vanilinske kiseline prema testiranoj bakterijskoj vrsti *L. monocytogenes*. Zbog nedostatka informacija o sličnim studijima, interakcijski učinak ekstrakta alge i fenolnih spojeva se ne mogu usporediti s istraživanjima drugih autora.

Obzirom na navedeno možemo zaključiti da alge imaju potencijal za primjenu u prehrambenoj industriji, no potrebna su dodatna istraživanja koja bi potvrdila rezultate ovog rada. Također, prezentirani rezultati ukazuju na mogućnost korištenja i drugih koncentracija ili fenolnih spojeva, kao i brojnih drugih kombinacija fenola i ekstrakata algi u cilju pronalaska optimalnih smjesa s izraženim biološkim učinkom.

#### 4. ZAKLJUČCI

Na osnovu prezentiranih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Čisti ekstrakt smeđe alge *P. pavonica* s MIC i MBC vrijednosti od 2,5 mg/mL, pokazao je najbolji antimikrobni učinak protiv bakterije *S. aureus*, dok su MIC i MBC vrijednosti prema ostalim bakterijama bile znatno više.
- Sve binarne smjese ekstrakta *P. pavonica* i odabranih fenolnih spojeva pokazale su vrlo dobru antimikrobnu aktivnost, ali su uglavnom ukazivale na aditivno interakcijsko djelovanje.
- Najlošiji interakcijski učinak i najveće FICI vrijednosti ( $\geq$  od 2) zabilježene su za smjese ekstrakta smeđe alge *P. pavonica* i katehina, rutina i vanilinske kiseline prema *L. monocytogenes*.
- Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se dokazala mogućnosti primjene ovih smjesa u prehrambenoj industriji.

## 5. LITERATURA

1. *C. Dawes*, Seaweed in health and disease prevention, u J. Fleurence and I. Levine (ur.), Academic Press, Vol.1, (2016) 107–148, DOI: 10.1016/C2014-0-02206-X
2. *I. Hamed, F. Ozogul, Y. Ozogul, J. M. Regenstein*, Marine bioactive compounds and their health benefits, *J. Food Biochem*, **39** (4) (2015) 446-465, DOI: 10.1111/1541-4337.12136
3. *C. D. Dixit, C. R. K. Reddy, N. Balar, P. Suthar, T. Gajaria, D. K. Gadhavi*, Assessment of the nutritive, biochemical, antioxidant and antibacterial potential of eight tropical macro algae along kachchh coast, india as human food supplements, *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, **27** (1) (2018) 61-79, DOI: 10.1080/10498850.2017.1396274
4. *R. L. Chapman*, Algae: the world’s most important “plants”—an introduction, *Mitig Adapt Strateg Glob Change*, **18** (1) (2013) 5-12, DOI: 10.1007/s11027-010-9255-9
5. *L. Zhenga, Y. Liua, S. Tangb, W. Zhangb, K. L. Cheonga*, Preparation methods, biological activities, and potential applications of marine algae oligosaccharides: a review, *Food Sci. Hum. Wellness*, **12** (2) (2023) 359-370, DOI: 10.1016/j.fshw.2022.07.038
6. URL: <https://prirodahrvatske.com/bioraznolikost-2> (15.12.2022.)
7. *B. Klnc, S. Cirik, G. Turan, H. Tekogul, E. Koru*, ‘Seaweeds for Food and Industrial Applications’, *Food Industry, InTech*, (2013) DOI: 10.5772/53172
8. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7024196/> (14.12.2022.)
9. *I. Muzzalupo*, *Food Industry, InTech*, (2013) DOI: 10.5772/55834
10. URL: <https://www.boerse-online.de/nachrichten/aktien/megachance-mikroalge-20317956.html> (10.03.2023.)
11. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7601163/> (10.03.2023.)
12. *K. Chojnacka., A. Saeid, Z. Witkowska, L. Tuhy*. Biologically active compounds in seaweed extracts the prospects for the application. *OCPJ*, **3** (1) (2012) 20–28, DOI:10.2174/1876326X01203020020
13. *P. A. Blamo, H. N. T. Pham, T. H. Nguyen*, Maximising phenolic compounds and antioxidant capacity from *Laurencia intermedia* using ultrasound-assisted extraction, *AIMS Agriculture and Food*, **6** (1) (2021) 32-48, DOI: 10.3934/agrfood.2021003
14. *R. Bhateria, R. Dhaka*, Algae as biofuel, *Biofuels*, **5** (6) (2014) 607–631, DOI:10.1080/17597269.2014.1003701

15. L. Dufosse, P. Galaup, A. Yaron, S. M. Arad, P. Blanc, M. Chidambara, K. N. Ravishankar, G. A. Ravishankar, Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality, *Trends Food Sci Technol.*, **16** (9) (2005) 389–406, DOI:10.1016/j.tifs.2005.02.006
16. Y. T. Tiji, J. F. Fields, P. S. Mayfield, Microalgae as a future food source, *Biotechnol Adv*, **41** (2020), DOI: 10.1016/j.biotechadv.2020.107536.
17. M. N. Monier, M. A. Abdelrhman, S. S. Marzouk, M. Nashaat, H. A. Eissa, H. M. E. El-Din, A.M.A.S. Goda, The potential role of marine macroalgae *Padina pavonica* on growth performance, histological status, and resistance of the rabbitfish *Siganus rivulatus* to *Pseudomonas anguilliseptica* bacteria, *EJABF*, **26** (2022), 797-819, DOI:10.21608/EJABF.2022.264571
18. S. Ścieszka, E. Klewicka, Algae in food, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **59** (21) (2019) 3538-3547, DOI: 10.1080/10408398.2018.1496319
19. S. Jung, T. V. Chau, M. Kim, W. Na, Artificial seaweed reefs that support the establishment of submerged aquatic vegetation beds and facilitate ocean macroalgal afforestation, *J. Mar. Sci. Eng.*, **10** (9) 1180-1184, DOI: 10.10390/jmse10091184
20. S. Gupta, N. Abu-Ghannam, Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds, *TIFS*, **22** (6) (2004) 2158-2167, DOI: 10.1016/j.tifs.2011.03.011
21. L. X. Zheng *i sur*, Preparation methods, biological activities, and potential applications of marine algae oligosaccharides, *Food Sci Hum Wellness*, **12** (2) (2023) 359-370, DOI: 10.1016/j.fshw.2022.07.038
22. L. M. Lalić, K. Berković, The influence of algae addition on physicochemical properties of cottage cheese, *Milchwissenschaft*, (60) (2005) 151-154, DOI: 10.1016/j.fshw.2022.07.038
23. K. Ito, K. Hori, Seaweed: Chemical composition and potential food uses, *Food Rev. Int.* **1** (5) (1989) 101–144, DOI: 10.1080/87559128909540845
24. P. Setthamongkol, S. Tunkijjanukij, K. Satapornvanit, J. Salaenoi, Growth and Nutrients Analysis in Marine Macroalgae, *Agric Nat Resour*, **2** (49) (2015) 211-218.
25. S. Cofrades, I. Lopez, L. Bravo, C. Ruiz-Capillas, S. Bastida, M. T. Larrea, F. Jiménez-Colmenero, Nutritional and Antioxidant Properties of Different Brown and Red Spanish Edible Seaweeds, *Food Sci Technol Int*, **16** (5) (2010) 361–370, DOI: 10.1177/1082013210367049



26. A. Leandro, L. Pereira, A. M. M. Gonçalves, Diverse Applications of Marine Macroalgae. *Mar Drugs*, **18** (1) (2020), DOI:https://doi.org/10.3390/md18010017
27. Y. Li, Y. Zheng, Y. Zhang, Y. Yang, P. Wang, B. Imre, A. C. Y. Wong, Y. S. Y. Hsieh, D. Wang, Brown Algae Carbohydrates: Structures, Pharmaceutical Properties, and Research Challenges, *Mar Drugs*, **19** (11) (2021) 619-620, DOI: 10.3390/md19110620
28. C. Veluchamy, R. Palaniswamy, A review on marine algae and its application, *Asian J. Pharm. Clin. Res*, **13** (3) (2020), 21-27, DOI:10.22159/ajpcr.2020.v13i3.36130
29. Q. Wang, M. Giordano, u S. Vaz Jr (ur.), Biomass and Green Chemistry: Building Renewable Pathway – Microalgae for Industrial Purposes, Springer International Publ., 2018, str. 133-167, DOI: 10.1007/978-3-319-66736-2\_6
30. M. B. Ariede, T.M. Candido, A. L- M. Jacome, M. V. Robles Velasco, J. C. M. de Carvalho, A. R. Baby, Cosmetic attributes of alga, *Algal Res*, **25** (2017) 483-487, DOI: 10.1016/j.algal.2017.05.019
31. G. Englert, T. Bjørnland, S. Liaaen-Jensen, 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series, *Magn Reson Chem*, **28** (6) (1990) 519–528, DOI: 10.1002/mrc.1260280610
32. K. Ito, K. Hori, Seaweed: Chemical composition and potential food uses, *Food Rev Int.*, **5** (1) (1989) 101–144, DOI: 10.1080/87559128909540845
33. B. Li, XX. J. Wei, J. L. Sun, S.Y. Xu, Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Carbohydr Res*, **341** (9) (2006) 1135-1146, DOI: 10.1016/j.carres.2006.03.035
34. E. M. Balboa, E. Conde, A. Moure., E. Falqué, H. Domínguez, In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae, *Food Chem*, **138** (2-3) (2013) 1764–1785, DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.026
35. A. V. Skriptsova, Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russ J Mar Biol*, **41** (2015) 145–156, DOI: 10.1134/S1063074015030098
36. J. Li , C. Guo, J.Wu, Fucoidan: biological activity in liver diseases, *Am J Chin Med.*, **48** (7) 2020; 1617-1632, DIO: 10.1142/S0192415X20500809
37. Y. Wang, M. Xing, ,Q. Cao, A. Ji , H. Liang, S. Song, Biological Activities of Fucoidan and the Factors Mediating Its Therapeutic Effects: A Review of Recent Studies, *Mar Drugs*, **17** (3) (2017) 183-184, DOI: 10.3390/md17030183

38. K. I. Draget, C. Taylor, Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food Hydrocolloids*, **25** (2) (2011) 251-256, DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.10.007
39. B. Zhu, H. Yin, Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications, *Bioengineered*, **6** (3) 2015 125–131, DOI: 10.1080/21655979.2015.1030543
40. M. Yamasaki, K. Ogura, W. Hashimoto, B. Mikami, K. Murata, A structural basis for depolymerization of alginate by polysaccharide lyase family-7., *J Mol Biol*, **352** (1): 2005, 11-21, DOI: 10.1016/j.jmb.2005.06.075
41. H. K. Park, I. H. Kim, J. Kim, T. J. Nam, Induction of apoptosis and the regulation of ErbB signaling by laminarin in HT-29 human colon cancer cells, *Int J Mol Med*, **32** (2) (2013) 291-295, DOI: 10.3892/ijmm.2013.1409
42. R. V. Usoltseva, A. A. Belik, M. I. Kusaykin, O. S. Malyarenko, T. N. Zvyagintseva, S. P. Ermakova, *Int J Biol Macromol*, 11 (2020), DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.034
43. S. M. Ghanem , M. Naeem, A. A. Ansari, Brown Alga Padina: A review, *International Journal of Botany Studies*, **4** (1) (2019) 1-3, DOI: 10.22271/botany.2019.v4.i1.01
44. G. A. El Shoubaky, E. A. Salem, Active ingredients fatty acids as antibacterial agent from the brown algae *Padina pavonica* and *Hormophysa triquetra*, *J Coast Life Med*, **2** (7) (2014) 535-542, DOI: 10.12980/JCLM.2.201414B72
45. A. M. Mayer, M. T. Hamann, Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **140** (3-4) (2005) 265-286, DOI: 10.1016/j.cca.2005.04.004
46. P. Sharma, N. Sharma, Industrial and biotechnological applications of algae, *J Adv in Plant Biol*, **1** (1) (2017) 1-25, DOI: 10.14302/issn.2638-4469.japb-17-1534
47. R. Pangestuti, S. K. Kim, Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae, *J. Funct Foods*, **3** (4) (2011) 255–266, DOI: 10.1016/j.jff.2011.07.001
48. M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharm. J*, **21** (2) (2013) 143-152, DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002

49. R. Alghazeer, A. Elmansor, M. Sidati, F. Gammoudi, S. Azwai, H. Naas, A. Garbaj, I. Eldaghayes, In vitro antibacterial activity of flavonoid extracts of two selected libyan algae against multi-drug resistant bacteria isolated from food products, *J Biosci Med*, **5** (2017), 26-48.
50. M. Caruana, A. Camilleri, M. Y. Farrugia, S. Ghio, M. Jakubičková, R. J. Cauchi, N. Vassallo, Extract from the marine seaweed *Padina pavonica* protects mitochondrial biomembranes from damage by amyloidogenic peptides, *Molecules*, **26** (5) (2021) 1444-1445, DOI: 10.3390/molecules26051444
51. Paunov rep, [https://hr.wikipedia.org/wiki/Paunov\\_rep](https://hr.wikipedia.org/wiki/Paunov_rep) (12.10.2022.)
52. N. N. Win, T. Hanuda, S. G. A. Draisma, P. E. Lim, S. M. Pang, H. Kawai, u S. M. Phang, P. E. Lim (ur.), Taxonomy of the Genus *Padina* (Dictyotales, Phaeophyceae) based on morphological and molecular evidences, with key to species identification, In taxonomy of Southeast, Asian Seaweeds, University of Malaya Press, Kuala Lumpur, 2013, str 119-174.
53. A. Ismail, L. Ktari, M. Ahmed, H. Bolhuis, A. Boudabbous, L. J. Stal, M. El Bour, Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown Alga *Padina pavonica*, *Front Microb*, **7** (2016) 1072-1073, DOI: 10.3389/FMICB.2016.01072
54. A. Maggio, R. Alduina, E. Oddo, A. P. Piccionello, A. M. Mannino, Antibacterial activity and HPLC analysis of extracts from Mediterranean brown algae, *Plant Biosystems*, **156** (1) (2022) 1126-3504, DOI: 10.1080/11263504.2020.1829737
55. W. Uddin, M. Begum, M. F. Siddiqui, Seasonal growth, development and morphology of two species of *Padina* adanson: *Padina tetrastromatica* and *Padina pavonica* from the Manora Coast, Karachi, Pakistan, *Pak J Bot*, **47** (5) (2015) 2015-2021.
56. P. Sharma, N. Sharma, Industrial and biotechnological applications of algae: a review, *J Adv Plant Biol*, **1** (1) (2019) 1-25, DOI: 10.14302/issn.2638-4469.japb-17-1534
57. M. N. Alam, N. J. Bristi, M. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharm J*, **21** (2) (2013) 143-152, DOI: 10.1016/j.jsps.2012.05.002
58. R. Alghazeer, A. Elmansori, M. Sidati, F. Gammoudi, S. Azwai, H. Naas, A. Garbaj, I. Eldaghayes, In vitro Antibacterial activity of flavonoid extracts of two selected libyan algae against multi-drug resistant bacteria isolated from food products, *J Biosci Med*, **5** (1) (2017) 26-48, DOI: 10.4236/jbm.2017.51003
59. O. Erturk, B. Tas, Antibacterial and Antifungal Effects of Some Marine Algae, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **17** (1) (2011) 117-112, DOI: 10.9775/kvfd.2010.2539

60. L. Ruangpan, Minimal inhibitory concentration (MIC) test and determination of antimicrobial resistant bacteria. In manual of standardized methods for antimicrobial sensitivity tests for bacteria isolated from aquatic animals and environment, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, (2004), 31-55.
61. I. Wiegand, K. Hilpert, R. E. W. Hancock, Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity, Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, **3** (2) (2008), 163–175, DOI: 10.1038/nprot.2007.521
62. M. Ivančić, G. Kovač, Sinteza, konformacijska analiza i biološka evaluacija tripeptida izvedenih iz ferocen-1,1'-diamina s Ala-Pro sekvencom. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, (2021) 50-51.
63. A. Leyton, R. Pezoa-Conte, A. Barriga, A. H. Buschmann, P. Mäki-Arvela, J.-P. Mikkola, M. E. Lienqueo, Identification and efficient extraction method of phlorotannins from the brown seaweed *Macrocystis pyrifera* using an orthogonal experimental design. *Algal Research*, **16** (2016) 201–208, DOI:10.1016/j.algal.2016.03.019
64. I. Generalić Mekinić, V. Šimat, V. Botić, A. Crnjac, M. Smoljo, B. Soldo, I Ljubenkov, M. Čagalj, D. Skroza, Bioactive Phenolic Metabolites from Adriatic Brown Algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae), *Foods* **10** (6) (2021) 1187, DOI: 10.3390/foods10061187
65. P. Rajasulochana, R. Dhamotharan, P. Krishnamoorthy, S. Murugesan, Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. *J Am Sci*, **5** (3), (2009), 20-25.
66. I. Generalić Mekinić, D. Skroza, V. Šimat, I. Hamed, M. Čagalj, Z. Popović Perković, Phenolic content of brown algae (Pheophyceae) species: Extraction, identification, and quantification. *Biomolecules*, **9** (6) (2019) 244, DOI: 10.3390/biom9060244
67. M. Čagalj, D. Skroza, G. Tabanelli, F. Özogul, V. Šimat, Maximizing the antioxidant capacity of *Padina pavonica* by choosing the right drying and extraction methods, *Processes*, **9** (4) (2021) 587, DOI: 10.3390/
68. M. Kosanić, B. Ranković, T. Stanojković, Brown macroalgae from the Adriatic Sea as a promising source of bioactive nutrients. *Food Measure*, **13** (2019) 330–338, DOI: 10.1007/s11694-018-9948-4
69. I. Tuney, B. H. Cadirci, D. Ünal, A. Sukatar, Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla, *Turk J Biol*, **30** (3) (2006) 171-175.

70. N. Khaled, M. Hiba, C. Asma, Antioxidant and antifungal activities of *Padina pavonica* and *Sargassum vulgare* from the Lebanese Mediterranean Coast., *Adv Environ Biol*, **6** (1) (2012) 42-48.
71. G. Dulger, B. Dulger, Antibacterial activity of two brown algae (*Cystoseira compressa* and *Padina pavonica*) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Br Microbiol Res J*, **4** (8) (2014) 918-923, DOI: 10.9734/BMRJ/2014/11080
72. B. Dulger, Antimicrobial activity of some endemic scrophulariaceae from Turkey, *Pharmaceutical biology*, **44** (9) (2006) 672-676, DOI: 10.1080/13880200600997056
73. H. A. Ibrahim, H. S. Soliman, F. M. Hamed, D. A. Marrez, S. M. Othman, Antibacterial activity of vanillic acid and catechol produced by microbial biotransformation of caffeic acid, *J Pharm Sci Res*, **12** (6) (2020) 740-743.
74. M. K. Araruna, S. A. Brito, M. F. Morais-Braga, K. K. Santos, T. M. Souza, T. R. Leite, H. D. Coutinho, Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. *The Indian Journal of Medical Research*, **135** (2) (2012) 252.
75. H. Arima, H. Ashida, G. I. Danno, Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **66** (5) (2002) 1009-1014, DOI: 10.1271/bbb.66.1009
76. N. Caturla, F. L. Perez, A. Estepa, V. Micol, Differential effects of oleuropein, a biophenol from *Olea europaea*, on anionic and zwitterionic phospholipid model membranes, *Chem Phys Lipids*, **137** (2005) 2-17, DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2005.04.006