

Дисертационният труд се състои от 143 страници, включващи 51 фигури, 24 таблици. Цитирани са 237 литературни източника, 230 от които на латиница и 7 на кирилица.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на г. от ч.
в.....аудитория на Медицински Университет “Проф. Д-р Параскев Стоянов” -
Варна.

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПРОФ. Д-Р ПАРАСКЕВ СТОЯНОВ” – ВАРНА

ФАКУЛТЕТ ПО ФАРМАЦИЯ

КАТЕДРА ХИМИЯ

Веселина Здравкова Панайотова

**ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
В ЧЕРНОМОРСКИ ВОДОРАСЛИ**

АВТОРЕФЕРАТ

**на дисертация за присъждане на образователната
и научна степен „Доктор”**

**по научна специалност „Биоорганична химия, химия на природните и
физиологично активни вещества”**

Научен ръководител: Проф. Мона Станчева, дхн

Рецензенти: Проф. Ирина Караджова, дх

Доц. Гинка Антова, дх

**Варна
2014**

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

GC/MS	Газова хроматография с масдетекция
TLC	Тънкослойна хроматография
HPLC	Високоэффективна течна хроматография
ОЛ	Общи липиди
НМК	Наситени мастни киселини
МНМК	Мононенаситени мастни киселини
ПНМК	Полиненаситени мастни киселини
МЕМК	Метилови естери на мастните киселини
ALA	алфа-линоленова киселина
EPA	ейкозапентаенова киселина
DHA	докозахексаенова киселина
LA	линолова киселина
ARA	арахидонова киселина
n-3	омега 3 полиненаситени мастни киселини
n-6	омега 6 полиненаситени мастни киселини
АИ	Атерогенен индекс
ТИ	Тромбогенен индекс
ФХ	фосфатидилхолин
ФЕА	фосфатидилетаноламин
ФИ	фосфатидилинозитол
СЗО	Световна здравна организация

ВЪВЕДЕНИЕ

Морските водорасли играят важна роля във функционирането на крайбрежните морски екосистеми, като първични продуценти на органични вещества. Според размерите си, те могат да бъдат класифицирани в две основни групи – микроводорасли и макроводорасли, а според пигментите, които съдържат – червени (Rhodophyta), кафяви (Phaeophyta) и зелени водорасли (Chlorophyta). Химическият им състав варира според вида и зависи от много фактори, като географски произход и местообитание, сезон, околна среда и физиологични особености. Голяма част от морските водорасли се развиват в разнообразни местообитания, понякога изложени на екстремни условия. В резултат на това те синтезират голямо разнообразие от специфични метаболити (също биологично активни), които не се откриват в други организми. Поради това водораслите са един много интересен естествен източник на нови съединения с биологична активност, които могат да бъдат използвани като компоненти в различни хранителни добавки, функционални храни и други хранителни продукти, както и за производство на козметични и фармацевтични продукти. Водораслите представляват едни истински природни реактори за синтез на редица биологично активни съединения поради голямото разнообразие от видове и възможностите за контролирано отглеждане.

Поради възможността водораслите да акумулират и различни замърсители, особено токсични елементи, наред с химичния състав, е необходимо да се изследва и тяхната безопасност. Те могат да бъдат използвани като биоиндикатори за състоянието на водните екосистеми, както и да служат за биологично пречистване на отпадни води.

В съвременния свят водораслите и техните продукти намират все по-широко и все по-разнообразно приложение в редица области. Съществуват няколко направления при изследванията на морските ресурси: от производство на биопродукти и храни до използването им като биоиндикатори за оценка на състоянието на екосистемите. Към момента с търговска цел в света се използват около 250 вида водорасли, а около 150 вида се консумират като храна. Търсенето на хранителни добавки от водорасли се увеличава. В Европа има засилен интерес за използване на морските водорасли като храна, въпреки че в момента не съществуват регламенти в Европейския съюз относно използването им за консумация от човека.

Съвременните изследвания на водорасли са насочени предимно в търсене на вещества с антимикробно, антитуморно, антиоксидантно и противовъзпалително действие. Морските водорасли са богат природен източник на редица съединения с висока биологична активност и биогенни елементи. Те съдържат в талусите си множество ценни органични вещества. В световен мащаб, морските водорасли са активно изследвани като потенциални източници на

протеини (фикобилипротеини, ензими и олигопептиди), полизахариди (агар, карагенан, алгинати, фукоидан и др.), биологично активни вещества, като полиненаситени мастни киселини (омега 3 и омега 6), фосфолипиди, витамини (А, В₁, В₁₂, С, D, Е), каротеноиди (β-каротен, лутеин, астаксантин, фукоксантин и др.), стероли (ситостерол, фукостерол и др.), биогенни елементи (Са, Р, Na, К, I и др.) и много други.

В България изучаването на черноморските водорасли започва през 80-те години на миналия век. През последните 30 години са извършени някои анализи за определяне на стероли, липиди, терпеноиди и други вещества в няколко вида черноморски водорасли. Публикуваните в литературата данни са твърде ограничени, като липсват данни за замърсяването им.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Цел: Изследване на различни видове черноморски водорасли за съдържание на биологично активни вещества и биогенни елементи във връзка с използването им за производството на хранителни, фармацевтични и козметични продукти.

За постигане на целта на дисертационния труд ще бъдат разработени следните задачи:

1. Пробонабиране, идентифициране и охарактеризиране на различни видове черноморски водорасли, които ще се анализират.
2. Разработване и прилагане на аналитична процедура.
3. Определяне на общи липиди и мастнокиселинен състав.
4. Адаптиране и прилагане на методики за определяне на фосфолипиди, стероли, мастноразтворими витамини и каротеноиди.
5. Определяне на биогенни и токсични химични елементи.
6. Оценка на потенциала на черноморските водорасли като източници на биологично активни вещества и биогенни елементи за производството на хранителни, фармацевтични и козметични продукти.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНА ЧАСТ, РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Понастоящем морската макроалгофлора в България се отнася към 3 отдела, които наброяват 165 вида. Най-многобройни са червените водорасли, представени от 90 вида, следвани от зелените с 39 вида и кафявите с 36 вида. За определяне съдържанието на различни биологично активни вещества и биоогенни елементи са избрани 5 вида черноморски водорасли – *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*, които принадлежат към трите отдела – Chlorophyta (Отдел Зелени водорасли), Rhodophyta (Отдел Червени водорасли) и Phaeophyta (Отдел Кафяви водорасли) и са широко разпространени по българското черноморско крайбрежие (Димитрова-Конаклиева, 2000; Petrova et al., 2012). Морските водорасли са събрани с помощта на водолази по брега на Черно море, в района на нос Галата (гр. Варна) през месец юли 2012 г. В таблица 1 е представена класификация на макрофитите. Образци от *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* са депозиранни в Института по океанология към Българска академия на науките, град Варна, България.

Таблица 1. Таксономия на изследваните водорасли

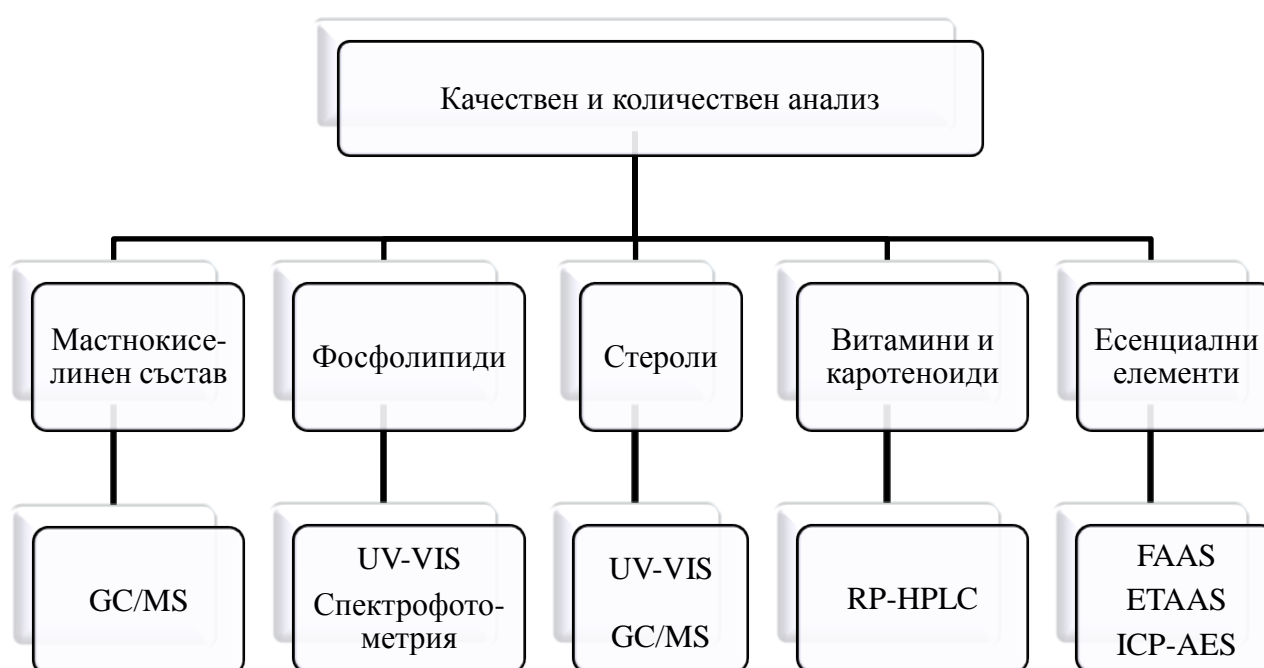
	<i>Ulva rigida</i>	<i>Chaetomorpha linum</i>	<i>Gelidium crinale</i>	<i>Cystoseira crinita</i>	<i>Cystoseira barbata</i>
Отдел	Chlorophyta	Chlorophyta	Rhodophyta	Phaeophyta	Phaeophyta
Клас	Ulvophyceae	Cladophorophyceae	Florideophyceae	Phaeophyceae	Phaeophyceae
Разред	Ulvales	Cladophorales	Gelidiales	Fucales	Fucales
Семейство	Ulvaceae	Cladophoraceae	Gelidiaceae	Cystoseiraceae	Cystoseiraceae
Род	Ulva	Chaetomorpha	Gelidium	Cystoseira	Cystoseira

След транспорт на пробите до лабораторията в хладилни чанти с лед са изготвени средни лабораторни проби и пробите за анализ. Отделните методи за пробоподготовка включват:

- Общи липиди и мастнокиселинен състав – подготовката на пробата включва екстракция на общи липиди по метода на Bligh and Dyer, 1959, гравиметрично определяне на общото липидно съдържание и получаване на метилови естери на мастните киселини
- Фосфолипиди – подготовката на пробата включва екстракция по метода на Folch et al., 1957, изолиране на индивидуалните фосфолипиди, разделяне на индивидуалните фосфолипиди посредством тънкослойна хроматография, хидролиза на фосфолипидите и получаване на метилови естери на мастните киселини

- Стероли – подготовката на пробата включва екстракция по метода на Folch et al., 1957, изолиране на свободните и свързаните стероли, хидролиза на стеролови естери и получаване на метилови естери на мастните киселини
- Мастноразтворими витамини и каротеноиди – подготовката на пробата включва екстракция и пречистване
- Биогенни елементи – подготовката на пробата включва екстракция и минерализация

На фиг. 1 е представена принципна схема на аналитичните определяния и използваните инструментални методи.



Фиг. 1

Схема на аналитичните определяния и използваните инструментални методи

За контрол на качеството на отделните анализи са използвани метод на вътрешния стандарт и метод на стандартната добавка. За статистическата обработка на експерименталните данни е използвана програмата Graph Pad Prism 5.0. Резултатите от отделните анализи са представени като средна стойност \pm стандартно отклонение.

РЕЗУЛТАТИ

1. Съдържание на общи липиди

В таблица 2 са представени резултатите за сухо тегло (представени като %) и съдържанието на общи липиди (представени като g на 100g свежо тегло) в изследваните видове водорасли.

Таблица 2. Суха маса и съдържание на общи липиди

Вид	Суха маса* %	Общи липиди* g/100g fw
Зелени водорасли		
<i>Ulva rigida</i>	22,1 ± 0,1 ^a	1,00 ± 0,22 ^{ab}
<i>Chaetomorpha linum</i>	9,2 ± 0,8 ^b	1,07 ± 0,12 ^b
Червени водорасли		
<i>Gelidium crinale</i>	19,2 ± 3,8 ^a	0,99 ± 0,04 ^{ab}
Кафяви водорасли		
<i>Cystoseira crinita</i>	20,9 ± 0,9 ^a	0,70 ± 0,50 ^a
<i>Cystoseira barbata</i>	19,9 ± 0,9 ^a	0,67 ± 0,12 ^a

*Резултати, получени от три паралелни опита, fw – свежо тегло;

Стойностите в една колона с различен горен индекс са статистически отличими ($p < 0,05$).

Получените резултати за суха маса на изследваните водорасли показват, че не се наблюдават съществени разлики във влагосъдържанието на пробите. Единствено при зелените водорасли *Chaetomorpha linum* са установени значително по-високи стойности за влагосъдържание от останалите – 90,8%.

Като цяло водораслите се характеризират със сравнително ниско съдържание на липиди в сравнение със сухоземните маслодайни култури, като соя, слънчоглед и др. (Khotimchenko, 2005; Ortiz et al., 2006; Dawczynski et al., 2007). Количеството на липидите зависи от редица фактори, като вид, местоположение, сезон, температура, соленост и др. Определените стойности на общите липиди в изследваните видове водорасли са в интервала от 0,67 g/100g fw до 1,07 g/100g fw. С изключение на зелените водорасли *Chaetomorpha linum* не се наблюдават значителни различия в липидното съдържание на анализиранияте проби. Зеленото водорасло *Chaetomorpha linum* показва най-високо съдържание на общи липиди, следват другото зелено водорасло *Ulva rigida* и червените *Gelidium crinale*. Кафявите водорасли *Cystoseira crinita* и *Cystoseira barbata* са с най-ниско липидно съдържание.

2. Маснокиселинен състав на общите липиди

Маснокиселинният състав на водораслите зависи не само от вида на водораслите, а и от условията на околната среда – местообитание, сезон, температура, осветеност, соленост, наличие на замърсяване (Curtain et al., 1983; Pettit et al., 1989; Kim et al., 1996; Allakhverdiev et al., 2001; Azachi et al., 2002; Ratana-arporn and Chirapart, 2006; Ortiz et al., 2006; Yaich et al., 2011). Въпреки това повечето проучвания показват, че палмитиновата киселина (C16:0) е преобладаваща (Khotimchenko et al., 2002; Li et al., 2002; Gressler et al., 2010; El-shoubaku et al., 2008; Pereira et al., 2012).

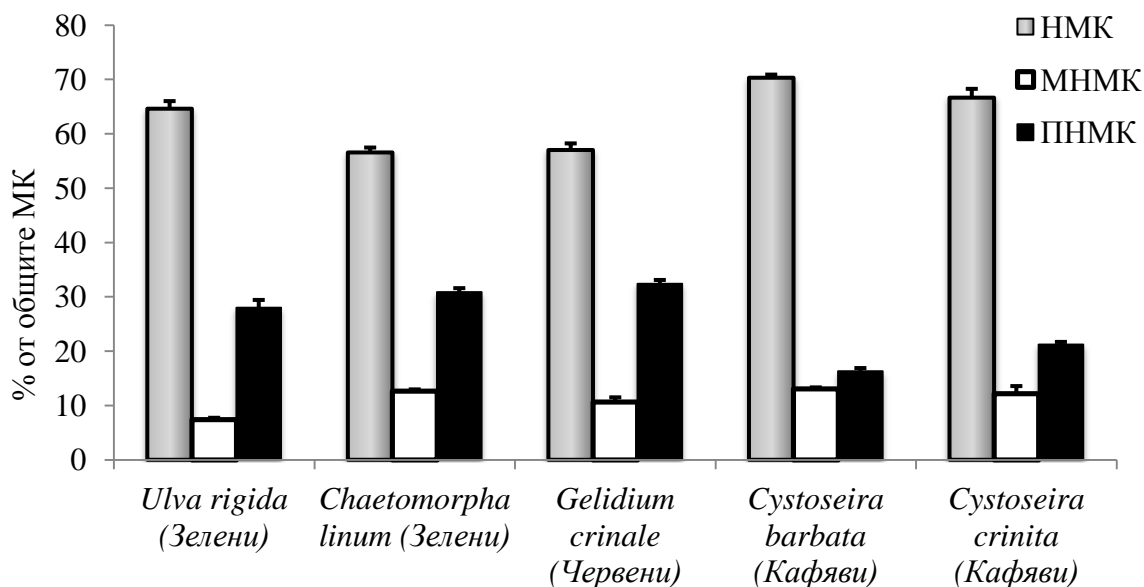
Определен е маснокиселинният състав и маснокиселинният профил на петте вида черноморски водорасли. Идентифицирани са 34 вида МК, като количествено са определени 30 вида МК, които са класифицирани в три групи: наситени (НМК), мононенаситени (МНМК) и полиненаситени (ПНМК). Определените стойности за НМК са в диапазона от 56,55% (*Chaetomorpha linum*) до 70,30% (*Cystoseira barbata*). *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum* принадлежат към отдел Chlorophyta (зелени водорасли). И при двата вида в най-големи количества е палмитиновата киселина (C16:0). Тя представлява повече от половината от общите мастни киселини при *Ulva rigida* (58,50%) и 28,56% при *Chaetomorpha linum*. За разлика от *Ulva rigida*, където общото количество наситени мастни киселини се дължи основно на палмитиновата киселина, то *Chaetomorpha linum* съдържа и значителни количества лигноцеринова (C24:0), бехенова (C22:0), арахидинова (C20:0) и миристинова (C14:0) киселина.

При червените водорасли *Gelidium crinale* сумата от наситени мастни киселини представлява 57,00% от общото количество мастни киселини, като от тях 39,05% е съдържанието на палмитинова киселина (C16:0).

Количествата на лигноцеринова (C24:0), бехенова (C22:0), арахидинова (C20:0), стеаринова (C18:0) и миристинова (C14:0) киселини са разпределени почти по равно. Подобни резултати, посочващи палмитиновата и миристиновата киселини като основни МК в групата на НМК са докладвани в литературата за други видове червени водорасли от Жълто море (Li et al., 2002; Vaskovski et al., 1996) и бреговете на остров Кинг Джордж (Антарктида) (Graeve et al., 2002).

Cystoseira barbata и *Cystoseira crinita* принадлежат към отдел Phaeophyta (кафяви водорасли). Както при останалите анализирани видове, палмитиновата киселина (C16:0) е в най-големи количества. Съдържанието на НМК е 70,63% при *Cystoseira barbata* и 66,63% при *Cystoseira crinita*. При всички анализирани проби полиненаситените мастни киселини преобладават над мононенаситените при всички видове водорасли, а наситените мастни

киселини преобладават над останалите две групи. Наблюдава се следното разпределение на групите: НМК > ПНМК > МНМК (Фиг. 2).



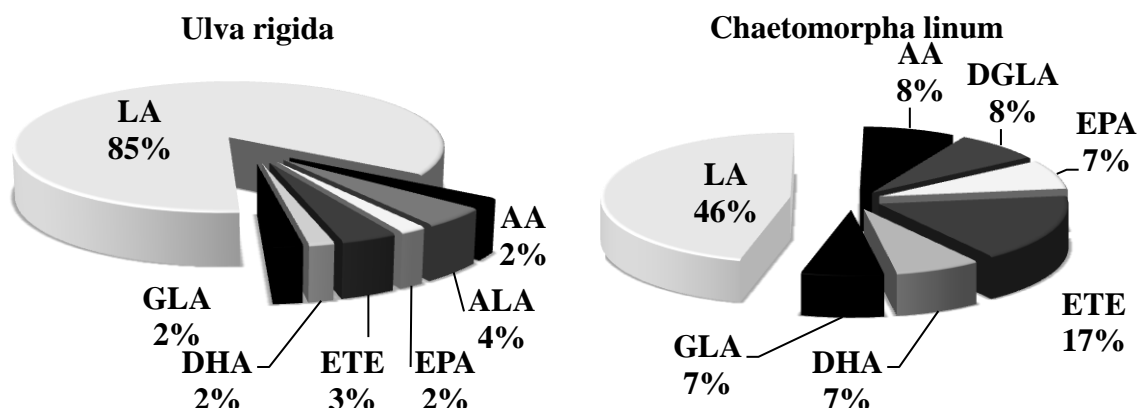
Фиг. 2

Мастнокиселинен профил на *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*

Определените стойности за МНМК са в диапазона от 7,42% (*Ulva rigida*) до 13,08% (*Cystoseira barbata*). Общото съдържание на МНМК при зелените *Ulva rigida* представлява 7,42% от общите мастни киселини, а при зелените *Chaetomorpha linum* – 12,61%. И при двата вида в най-големи количества в тази група се открояват олеиновата (C18:1 n-9) и палмитолеиновата (C16:1 n-7) киселини. Съдържанието на МНМК в червените *Gelidium crinale* е 10,62%, половината от което се дължи на олеиновата киселина (C18:1 n-9). Общото съдържание на МНМК при *Gelidium crinale* представлява 10,62% от общите мастни киселини, като в най-големи количества е олеиновата киселина (C18:1 n-9). Подобно на представителите на отдел Chlorophyta в групата на МНМК при *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* преобладават олеиновата (C18:1 n-9) и палмитолеиновата (C16:1 n-7) киселини. При всички анализирани проби съдържанието на олеинова киселина (C18:1 n-9) е по-високо от това на палмитолеинова (C16:1 n-7), с изключение на *Chaetomorpha linum*, където C18:1 n-9 \approx C16:1 n-7.

Най-големи различия се наблюдават в групата на ПНМК. Определените стойности за общо съдържание на ПНМК са в диапазона от 16,29% (*Cystoseira barbata*) до 32,38% (*Gelidium crinale*). В сравнение с останалите анализирани видове кафявите водорасли съдържат по-малки количества ПНМК и повече НМК и МНМК. На фиг. 3 е представен детайлен мастнокиселинен

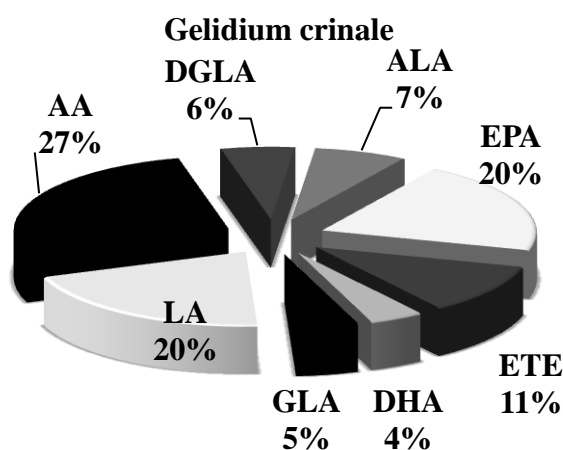
профил на ПНМК при изследваните видове зелени водорасли – *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*.



Фиг. 3

Мастнокиселинен профил на ПНМК при зелени водорасли *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; DHA – C22:6n3; LA – C18:2n6; GLA – C18:3n6; DGLA – C20:3n6; AA – C20:4n6)

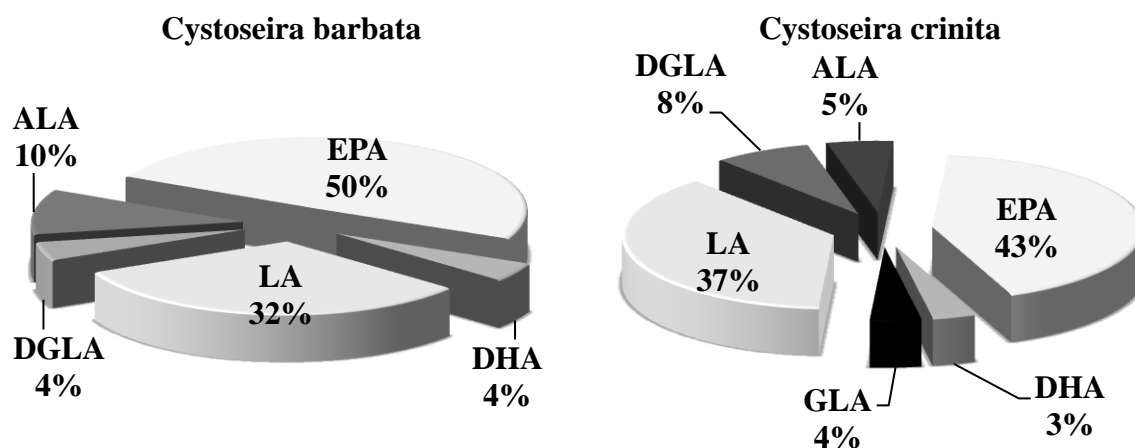
При двата вида зелени водорасли в най-високи количества е линоловата киселина (C18:2 n-6, LA). Сред полиненаситените мастни киселини зелените водорасли *Chaetomorpha linum* съдържат и значителни количества от ейкозатриенова киселина (C20:3 n-3, ETE). Останалите ПНМК анализирани в този вид, с изключение на α -линоленова (C18:3 n-3, ALA) и C22:2, са разпределени по равни количества (между 2 и 3 % от общото количество МК). На фиг. 4 е представен детайлен мастнокиселинен профил на ПНМК при червения вид водорасли – *Gelidium crinale*.



Фиг. 4

Мастнокиселинен профил на ПНМК при червени водорасли *Gelidium crinale* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; DHA – C22:6n3; LA – C18:2n6; GLA – C18:3n6; DGLA – C20:3n6; AA – C20:4n6)

Общото съдържание на ПНМК в *Gelidium crinale* достига до 32,38%, което е най-високото количество в сравнение с останалите анализирани видове. За разлика от зелените водорасли в групата на ПНМК линоловата киселина (C18:2 n-6) не е основната МК. В най-големи количества са арахидоновата киселина (C20:4 n-6, AA) – 7,72% и ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3, EPA) – 5,89% от общото съдържание на МК. Тези две киселини обикновено преобладават във видовете червени водорасли (Johns et al., 1979; Vaskovski et al., 1998; Khotimchenko et al., 2002; Li et al., 2002; Galloway et al., 2012). В изследвания вид сумарно те представляват около 50% от съдържанието на ПНМК. Установено е, че представителите на отдел червени водорасли продуцират високи количества ейкозапентаенова киселина, затова в литературата те често се разглеждат като потенциални източници на тази незаменима полиненаситена мастна киселина (Fleurence et al., 1994; Johns et al., 1979; Vaskovski et al., 1998; Li et al., 2002; Graeve et al., 2002). На фиг. 5 е представен детайлен мастнокиселинен профил на ПНМК при изследваните видове кафяви водорасли – *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*.



Фиг. 5

Мастнокиселинен профил на ПНМК при кафяви водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; DHA – C22:6n3; LA – C18:2n6; GLA – C18:3n6; DGLA – C20:3n6; AA – C20:4n6)

В групата на ПНМК в най-големи количества и при двата вида кафяви водорасли е ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3), следвана от линоловата киселина (C18:2 n-6). Ейкозапентаеновата киселина представлява около 50% от общото количество ПНМК. Типичната за кафяви водорасли арахидонова киселина (C20:4 n-6, AA) (Bhaskar and Miyashita, 2005; Khotimchenko et al., 2002; Li et al., 2002; Kumari et al., 2010) не се открива и в двата представителя на Phaeophyta. Съдържанието на α -линоленова киселина (C18:3 n-3) при *Cystoseira barbata* е значително по-ниско от докладваните по-рано данни за мастнокиселинен състав на същия вид водорасли от Черно море (Stefanov et al., 1988).

Наблюдават се различия в мастнокиселинния профил на ПНМК между видовете, които ги отличават един от друг. Тук доминиращи са три мастни киселини: линоловата (C18:2 n-6) – при зелените водорасли *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*; арахидонова (C20:4 n-6) – при червените *Gelidium crinale* и ейкозапентаенова (C20:5 n-3) – при кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*. Не всички полиненаситени мастни киселини са свързват с благоприятни ефекти върху здравето. Например, при възпалителните процеси, ейкозаноидите, получени от n-6 ПНМК притежават възпалително действие, докато за производните на n-3 полиненаситените мастни киселини се счита, че притежават по-малко възпалителни, а дори и противовъзпалително действие (Bagga et al., 2003; Robinson and Stone, 2006; Schmitz and Ecker, 2008). На база на определения мастнокиселинен състав е изчислено общото съдържание на омега-3 (n-3) и омега-6 (n-6) полиненаситени мастни киселини, както количествата на ПНМК с 18 въглеродни атома и ПНМК с 20 въглеродни атома за петте вида черноморски водорасли. Резултатите са представени в таблица 3.

Таблица 3. Общо съдържание на n-3 и n-6 ПНМК, C18 и C20 ПНМК в изследваните водорасли

% от общите МК	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Chaetomorpha linum</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)	<i>Cystoseira crinita</i> (кафяви)
n-6	23,85 ± 1,80	19,19 ± 1,39	16,52 ± 0,55	5,51 ± 0,26	9,52 ± 0,27
n-3	3,04 ± 0,39	8,84 ± 0,58	12,27 ± 0,46	9,76 ± 0,55	9,97 ± 0,20
C18 ПНМК	24,54 ± 1,98	14,88 ± 1,66	9,20 ± 1,19	6,42 ± 0,70	9,06 ± 0,19
C20 ПНМК	2,49 ± 0,54	13,88 ± 0,91	20,29 ± 0,56	9,22 ± 0,30	10,75 ± 0,29

Общото съдържание на омега-6 ПНМК е от 5,51% при кафявите *Cystoseira barbata* до 23,85% при зелените *Ulva rigida*. Съдържанието на омега-3 е в границите 3,04% при зелените *Ulva rigida* до 12,27% при червените *Gelidium crinale*. Анализираните видове черноморски водорасли са добри източници на омега-3 полиненаситени мастни киселини, особено червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*. При тези три вида водорасли сумата от n-3 ПНМК представлява от 9,76% при *Cystoseira barbata* и 9,97% при *Cystoseira crinita* до 12,27% при *Gelidium crinale*.

Отличителна характеристика на отделните видове водорасли е съдържанието на мастни киселини с различна дължина на въглеводородната верига. Представителите на отдел Chlorophyta (Отдел Зелени водорасли) се отличават със съдържание на по-големи количества ПНМК с 18 въглеродни атома (C18 ПНМК), отколкото с 20 въглеродни атома (Galloway et al., 2012; Khotimchenko et al., 2002; Kumari et al., 2010; Kumari et al., 2013; Li et al., 2002). Този

модел се наблюдава при *Ulva rigida*, където количеството на С18 ПНМК е около 10 пъти повече от това на С20 ПНМК. За разлика от *Ulva rigida*, мастнокиселинният състав на *Chaetomorpha linum* не следва този модел. При този вид водорасли количеството на С18 ПНМК и С20 ПНМК е почти равно, което е по-скоро характерно за представителите на отдел Phaeophyta (Отдел Кафяви водорасли) (Galloway et al., 2012; Khotimchenko et al., 2002; Kumari et al., 2010; Kumari et al., 2013; Li et al., 2002). Въпреки това в литературата съществуват данни за такива високи количества С20 ПНМК и в други видове зелени водорасли (Khotimchenko, 1993; Khotimchenko, 2003; Carbelleira et al., 1999; Goecke et al., 2010). *Gelidium crinale* като представител на Rhodophyta (Отдел Червени водорасли) съдържа значително по-високи количества ПНМК с 20 въглеродни атома (С20 ПНМК), отколкото с 18 въглеродни атома (Galloway et al., 2012; Khotimchenko et al., 2002; Kumari et al., 2010; Kumari et al., 2013; Li et al., 2002). За разлика от представителите на Chlorophyta и Rhodophyta, кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* съдържат почти равно количества от ПНМК с 18 и 20 въглеродни атома, което е характерно за видовете от отдел Phaeophyta (Galloway et al., 2012; Khotimchenko et al., 2002; Kumari et al., 2010; Kumari et al., 2013; Li et al., 2002).

3. Обобщение на резултатите за мастнокиселинния състав

Определените стойности за общи липиди в изследваните видове водорасли са в интервала от 0,67 g/100g fw до 1,07 g/100g fw. С най-високо съдържание общи липиди са зелените водорасли *Chaetomorpha linum*, следват зелените *Ulva rigida* и червените *Gelidium crinale*. Кафявите водорасли *Cystoseira crinita* и *Cystoseira barbata* са с най-ниско липидно съдържание.

Идентифицирани са 34 мастни киселини. Количествено са определени 30 на брой, които са класифицирани в три групи: наситени (НМК), мононенаситени (МНМК) и полиненаситени (ПНМК). При всички анализирани проби се наблюдава разпределението: НМК > ПНМК > МНМК. В групата на наситените мастни киселини при петте вида водорасли доминираща е палмитиновата киселина С16:0, следвана от стеариновата С18:0, арахидиновата С22:0, лигноцериновата С24:0 и миристиновата С14:0.

В групата на мононенаситените мастни киселини с най-високи стойности са олеиновата С18:1 n-9 и палмитолеиновата киселина С16:1 n-7. При зелените *Chaetomorpha linum*, червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira crinita* С18:1 n-9 > С16:1 n-7, докато при останалите два вида С18:1 n-9 ≈ С16:1 n-7. По-големи различия се наблюдават в мастнокиселинния профил на полиненаситените мастни киселини. Доминиращи са три мастни киселини: линоловата (С18:2 n-6) – при зелените водорасли *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*; арахидонова (С20:4 n-6) – при

червените *Gelidium crinale* и ейкозапентаенова (C20:5 n-3) – при кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*.

Омега-6 мастните киселини са в най-големи количества при зелените водорасли *Ulva rigida*. Сред изследваните видове черноморски водорасли с най-високи количества n-3 се откроява представителя на Rhodophyta – *Gelidium crinale*, следван от представителите на Phaeophyta – *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*. При тези три вида водорасли сумата от n-3 ПНМК представлява от 9,76% при *Cystoseira barbata* и 9,97% при *Cystoseira crinita* до 12,27% при *Gelidium crinale*.

ФОСФОЛИПИДИ И СТЕРОЛИ

Анализите за съдържанието на фосфолипиди (ФЛ) и стероли са извършени за три вида черноморски водорасли, принадлежащи към трите отдела – *Ulva rigida* (Отдел Зелени водорасли), *Gelidium crinale* (Отдел Червени водорасли) и *Cystoseira barbata* (Отдел Кафяви водорасли).

1. Резултати за съдържанието на фосфолипиди

Анализите за съдържанието на фосфолипиди и техния мастнокиселинен състав са извършени за три вида черноморски водорасли, принадлежащи към трите отдела – *Ulva rigida* (Отдел Зелени водорасли), *Gelidium crinale* (Отдел Червени водорасли) и *Cystoseira barbata* (Отдел Кафяви водорасли). Фосфолипидите обикновено представляват около 10-20% от общите липиди при водораслите (Dembitsky and Rozentsvet, 1990; Dembitsky and Rozentsvet, 1996). В таблица 4 е представено общото съдържание на фосфолипиди в изследваните видове водорасли.

Таблица 4. Съдържание на общи липиди и фосфолипиди

	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)
Общи липиди*	1,00 ± 0,22	0,99 ± 0,04	0,67 ± 0,12
Фосфолипиди**	3,58 %	10,65 %	18,34 %

*g/100g свежо тегло; **% от общите липиди

Общото съдържание на фосфолипиди варира значително в отделните видове водорасли. Най-ниско е съдържанието при зелените *Ulva rigida* – едва 3,58% от общите липиди, следват червените *Gelidium crinale* – 10,65%. Най-големи количества фосфолипиди се установяват при представителите на Отдел Кафяви водорасли *Cystoseira barbata* (18,34%). Получените данни за индивидуалния фосфолипиден състав на изследваните водорасли са представени в таблица 5.

Таблица 5. Индивидуален състав на фосфолипидната фракция на *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*

Фосфолипиди, %	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)
Фосфатидилхолин ФХ	17,4	49,4	4,1
Фосфатидилинозитол ФИ	19,6	9,7	2,8
Фосфатидилетаноламин ФЕА	20,1	8,2	84,9
Лизофосфатидилхолин ЛФХ	13,7	22,6	6,3
Лизофосфатидилетаноламин ЛФЕА	12,5	6,9	1,8
Фосфатидилсерин ФС	следи	1,2	следи
Сфингомиелин СМ	следи	1,4	следи
Фосфатидни киселини ФК	следи	следи	следи
ДифосфатидилглицеролДФГл	9,7	0,7	следи

Разпределението на фосфолипидните класове се различава значително между представителите на трите отдела. При червените водорасли *Gelidium crinale* преобладават фосфатидилхолинът (ФХ) и лизофосфатидилхолинът (ЛФХ), които са характерни за този вид водорасли. Фосфатидилхолин представлява повече от 50% от фосфолипидната фракция и при друг черноморски представител на род *Gelidium* – червените *Gelidium latifolium* (Nechev et al., 2002). Фосфолипидната фракция на кафявите водорасли *Cystoseira barbata* се състои основно от фосфатидилетаноламин (ФЕА). При зелените водорасли *Ulva rigida* индивидуалните фосфолипиди са разпределени почти по равно, като на ФХ, ФИ и ФЕА се падат около 20% за всеки. Nechev et al., 2002 са установили, че фосфолипидната фракция на *Ulva rigida* от Черно море съдържа предимно фосфатидни киселини (ФК).

С изключение на фосфатидилглицеролът, останалите фосфолипиди са локализиращи във външните мембрани на хлоропластите. Клетките използват амфотерния характер на фосфолипидите за поддържане на цялостта и пропускливостта на клетъчните мембрани. Установено е, че преобладаващата фракция от фосфолипиди при червени водорасли се дължи на фосфатидилхолин (често над 60% от общото съдържание на фосфолипиди), докато при кафяви водорасли доминират, както фосфатидилхолинът, така и фосфатидилетаноламинът (като на всеки се падат от 11% до 30% от общите фосфолипиди. Фосфатидилсерин и фосфатидилинозитол се откриват в значителни количества, докато дифосфатидилглицерол и фосфатидните киселини са в незначителни количества (Dembitsky et al. , 1990; Dembitsky and Rozentsvet, 1996; Illijas et al., 2009; Jones and Harwood, 1992; Khotimchenko et al., 1990; Kulikova

and Khotimchenko, 2000; Vackovsky et al., 1996). Редица проучвания с експериментални животни показват, че мастните киселини се усвояват по-бързо, когато са свързани с фосфолипиди (особено под формата на фосфатидилхолин), отколкото под формата на триглицериди. Това най-вероятно се дължи на факта, че триглицеридите първо трябва да се емулгират от жлъчните киселини, докато фосфолипидите благодарение на двойствения си характер, директно образуват мицели и се абсорбират в тънките черва (Murru et al., 2013; Awada et al., 2013).

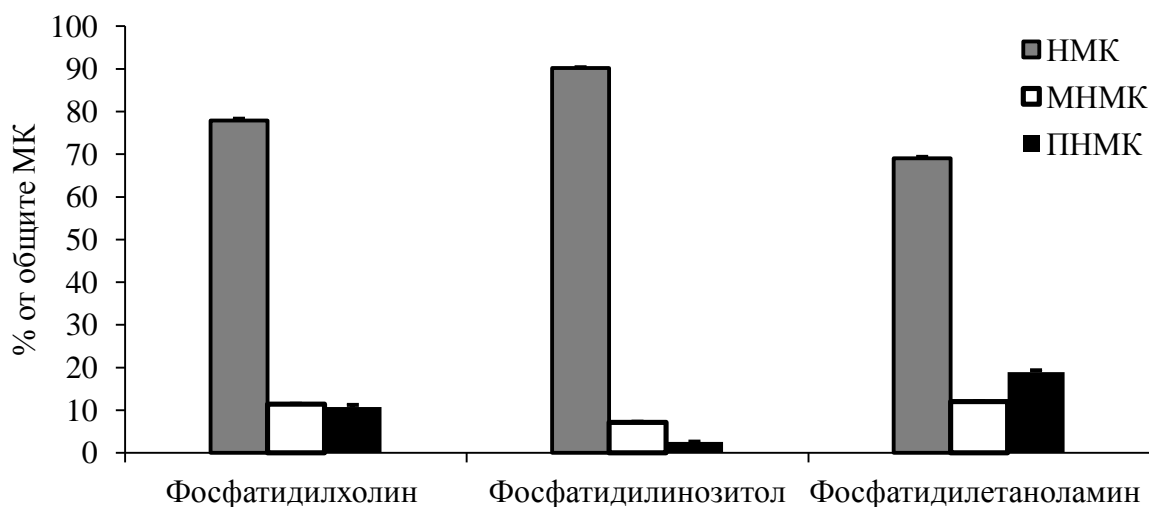
2. Мастнокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди при зелени водорасли *Ulva rigida*

Анализиран е мастнокиселинният профил на трите класа ФЛ, които се откриват в най-големи количества в изследваните водорасли (ФХ – фосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФЕА – фосфатидилетаноламин). За разлика от общите липиди, фосфолипидите съдържат значително по-високи количества наситени мастни киселини. При сравняване на мастнокиселинния състав на отделните липидни класове се наблюдават съществени разлики. И тук в най-големи количества е палмитиновата киселина (С16:0). Тя представлява около 50% от мастните киселини на фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин при зелените водорасли *Ulva rigida* и 77,5% от мастните киселини на фосфатидилинозитол.

При общите липиди на *Ulva rigida* общото количество наситени мастни киселини се дължи основно на палмитиновата киселина, докато при фосфолипидите се откриват високи количества миристинова (С14:0) киселина. В групата на МНМК в най-големи количества се открояват олеиновата (С18:1 n-9) и палмитолеиновата (С16:1 n-7) киселини. Подобно на общите липиди, съдържанието на олеинова киселина (С18:1 n-9) е по-високо от това на палмитолеинова (С16:1 n-7). Олеиновата киселина е около 3 пъти повече при фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин и около 2 пъти повече във фосфатидилинозитол в сравнение с общите липиди. Палмитолеиновата киселина е в около 2 пъти по-високи количества при фосфатидилетаноламин, въпреки че като цяло не се наблюдават различия в общото съдържание на мононенаситени мастни киселини в отделните липидни класове.

Най-големи различия се наблюдават в групата на полиненаситените мастни киселини. Разпределението на ПНМК намалява в реда: Общи липиди > ФЕА > ФХ > ФИ. Характерната за представителите на Отдел Зелени водорасли линолова киселина (С18:2 n-6, LA), която представлява 22,86% от общите липиди не се открива във фосфолипидите. Ейкозатриеновата киселина (С20:3 n-3, ETE) е в най-високи количества при фосфатидилхолин, α -линоленовата (С18:3 n-3, ALA) – при фосфатидилетаноламин. Съдържанието на полиненаситени мастни киселини при фосфатидилинозитол е едва 2,6% от мастните киселини. На фиг. 6 е представен

мастнокиселинният профил, като % от общото съдържание на мастни киселини на индивидуалните фосфолипиди на зелените водорасли *Ulva rigida*.



Фиг. 6

Мастнокиселинен профил на отделните фосфолипидни класове при *Ulva rigida*

Моделът на разпределение, характерен за общите липиди: НМК > ПНМК > МНМК при *Ulva rigida* се наблюдава единствено при мастнокиселинния състав на фосфатидилетаноламин. При останалите фосфолипидни класове разпределението е следното: НМК >> МНМК > ПНМК, като НМК представляват над 70% от общото количество мастни киселини. Тези високи стойности се дължат основно на палмитиновата и миристиновата киселина.

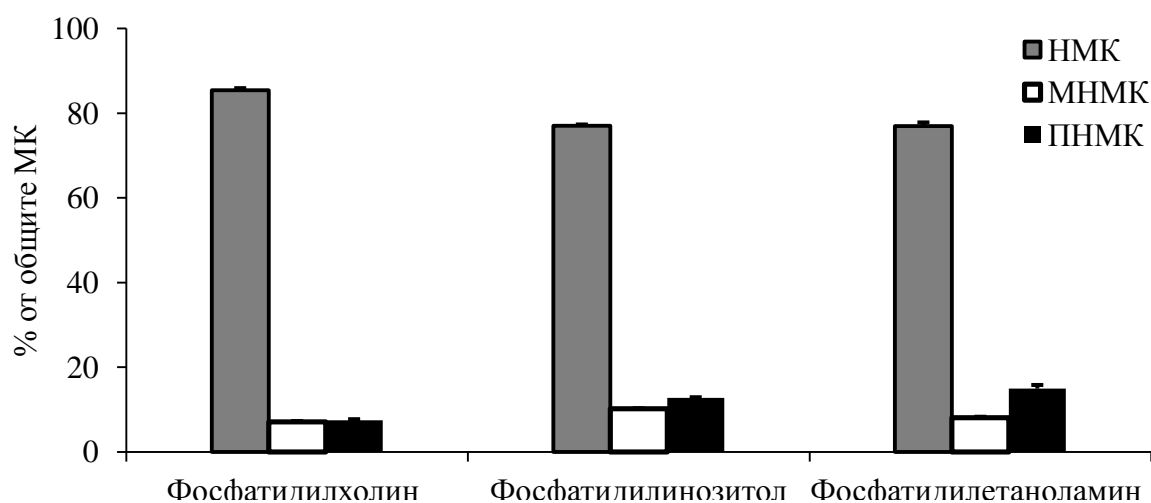
3. Мастнокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди при червени водорасли *Gelidium crinale*

При сравняване на мастнокиселинния състав на отделните липидни класове се наблюдават съществени разлики. И тук в най-големи количества е палмитиновата киселина (C16:0) – тя представлява около 50% от мастнокиселинния състав на фосфолипидните класове. Както при зелените *Ulva rigida* фосфолипидите на *Gelidium crinale* съдържат високи количества миристинова (C14:0) киселина. Тя представлява почти 15% от общите мастни киселини в състава фосфатидилхолина, около 8% – в състава на фосфатидилетаноламина и 5% - при фосфатидилинозитол. В значителни количества във фосфолипидните фракции се откриват още лигноцеринова (C24:0), бехенова (C22:0), арахидинова (C20:0) и стеаринова (C18:0) киселина. В групата на мононенаситените мастни киселини в най-големи количества се откроява олеиновата киселина (C18:1 n-9).

Най-големи различия се наблюдават в групата на полиненаситените мастни киселини. Характерните за червени водорасли полиненаситени мастни киселини – арахидоновата (C20:4

n-6) и ейкозапентаеновата (C20:5 n-3) не се откриват във фосфолипидните класове. Изключение прави фосфатидилетаноламинът, който съдържа незначителни количества ейкозапентаенова киселина (по-малко от 2%). Сред полиненаситените мастни киселини в изследваните фосфолипидни класове в най-високи количества се открива ейкозатриеновата киселина (C20:3n-3). Тя представлява над 4% от мастните киселини и при трите групи анализирани фосфолипидни класове.

На фиг. 7 е представен мастнокиселинният профил, като % от общите мастни киселини на отделните фосфолипидни класове на червените водорасли *Gelidium crinale*.



Фиг. 7

Мастнокиселинен профил на отделните фосфолипидни класове при *Gelidium crinale*

При червените водорасли *Gelidium crinale* се наблюдава характерния модел на разпределение: НМК >> ПНМК > МНМК, с изключение на фосфатидилхолин, където НМК >> ПНМК \approx МНМК. НМК тук представляват почти 90% от общите мастни киселини, а количеството на МНМК е приблизително равно на количеството на НМК. Разпределението на ПНМК намалява в реда: Общи липиди > ФЕА > ФИ > ФХ.

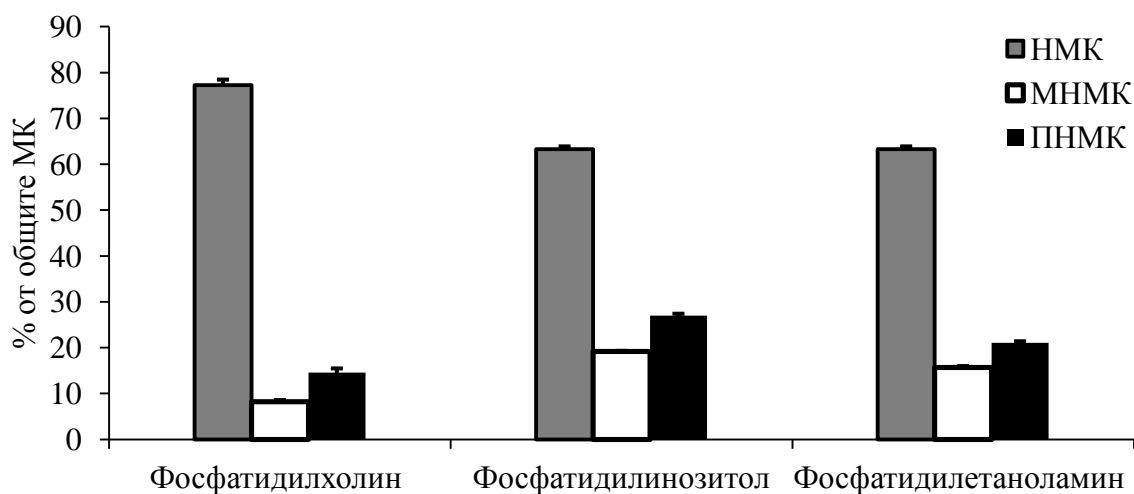
4. Мастнокиселинен състав на индивидуалните фосфолипиди при кафяви водорасли *Cystoseira barbata*

Подобно на общите липиди, мастнокиселинният състав на фосфолипидните класове съдържа над 60 % наситени мастни киселини. Забелязва се, обаче, че това количество не се дължи основно на високо съдържание на палмитинова киселина (C16:0). Тя представлява 38,48% при фосфатидилхолин и само 13,78% и 7,06% при фосфатидилинозитол и съответно фосфатидилетаноламин. В групата на НМК при фосфатидилхолин се наблюдава разпределението C16:0 > C22:0 \approx C14:0 > C18:0 > C12:0. Лауриновата киселина (C12:0)

представлява почти 6% от мастнокиселинния състав на ФХ при *Cystoseira barbata*. При НМК на фосфатидилинозитол се наблюдава профила $C16:0 > C24:0 \approx C22:0 > C18:0 > C20:0 \approx C14:0 > C12:0$, докато при фосфатидилетаноламин – $C20:0 \approx C14:0 > C12:0 > C16:0 \approx C10:0$. В последният липиден клас основните мастни киселини са арахидинова ($C20:0$), миристинова ($C14:0$) и лауринова ($C12:0$) киселина, които общо представляват почти 50% от общите мастни киселини. Тук лауриновата киселина ($C12:0$) е почти 11% от мастните киселини. Тази киселина представлява около 50% от мастнокиселинния състав на кокосовото масло. Съдържа се и в майчиното мляко. Тя притежава антибактериални свойства и висока активност срещу бактериите, причинители на възпалително акне (Hoffman et al., 2001; Lieberman et al., 2006; Yang et al., 2009).

В групата на мононенаситените мастни киселини не се наблюдава съществени разлики между отделните липидни класове, като преобладаваща е олеиновата киселина ($C18:1 n-9$). Тя представлява 17,15% от мастните киселини на фосфатидилетаноламин, 8,19% от мастните киселини на фосфатидилинозитол и едва 2,88% от мастните киселини на фосфатидилхолин.

В групата на полиненаситените мастни киселини се установяват съществени разлики. Ейкозапентаеновата и линоловата киселина, които се явяват основни мастни киселини в общите липиди при кафявите водорасли *Cystoseira barbata*, не се откриват при останалите фосфолипидни класове. В най-големи количества при фосфатидилинозитол (9,03%) и фосфатидилетаноламин (18,55%) е ейкозатриеновата киселина ($C20:3n-3$). Значителни количества докозахексаенова киселина ($C22:6 n-3$) се открива в класовете фосфатидилхолин (4,35%) и фосфатидилинозитол (3,91%). На фиг. 8 е представен мастнокиселинният профил на отделните фосфолипидни класове на *Cystoseira barbata*, като % от общите мастни киселини.



Фиг. 8

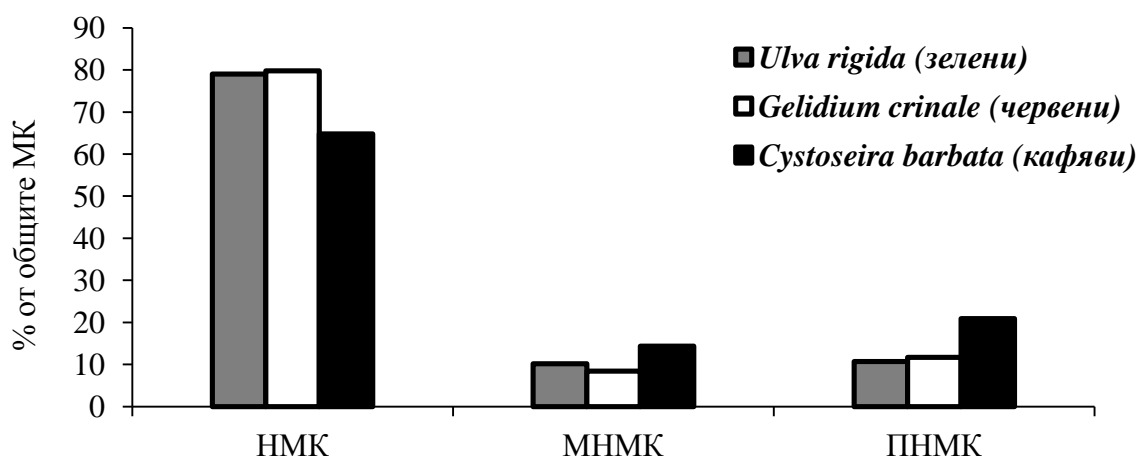
Мастнокиселинен профил на отделните фосфолипидни класове при *Cystoseira barbata*

При всички анализирани липидни класове на кафявите водорасли *Cystoseira barbata* се наблюдава характерния модел на разпределение: НМК > ПНМК > МНМК. Наситените мастни киселини представляват от 63,28% до 77,23%, МНМК – от 8,22% до 15,68% и съответно ПНМК – от 14,71% до 21,04%. Тук общото съдържание на ПНМК намалява в реда: ФИ > ФЕА > Общи липиди > ФХ.

5. Обобщение на резултатите за фосфолипиди и мастнокиселинен състав

Общото съдържание на фосфолипиди нараства в реда *Ulva rigida* (зелени) < *Gelidium crinale* (червени) < *Cystoseira barbata* (кафяви). При *Gelidium crinale* преобладават фосфатидилхолинът (ФХ) и лизофосфатидилхолинът (ЛФХ), фосфолипидната фракция на *Cystoseira barbata* се състои основно от фосфатидилетаноламин (ФЕА). При зелените водорасли *Ulva rigida* индивидуалните фосфолипиди са разпределени почти по равно, като на фосфатидилхолин, фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин се падат около 20% за всеки.

В сравнение с общите липиди, фосфолипидите съдържат значително по-високи количества наситени мастни киселини. На фиг. 9 са представени обобщени резултатите за разпределението на групите НМК, МНМК и ПНМК при общите фосфолипиди.



Фиг. 9

Мастнокиселинен профил на общите фосфолипиди

Най-общо фосфолипидите при зелените *Ulva rigida* и червените *Gelidium crinale* се открояват с по-високо съдържание на наситени мастни киселини в сравнение с общите липиди за сметка на полиненаситените мастни киселини. Кафявите водорасли *Cystoseira barbata* показват еднакъв профил НМК > ПНМК > МНМК и за двата липидни класа, като количеството на полиненаситените мастни киселини във фосфолипидите превишава незначително съдържанието им в общите липиди.

Мастнокиселинният състав на фосфолипидите също се различава значително от този на общите липиди. Във фосфолипидната фракция на зелените водорасли *Ulva rigida* преобладават палмитиновата (C16:0), миристинова (C14:0), олеиновата (C18:1 n-9), ейкозатриеновата (C20:3 n-3, ETE) и α -линоленовата (C18:3 n-3, ALA) киселина. Характерната за зелени водорасли линолова киселина (C18:2 n-6, LA) не се открива във фосфолипидите. При червените водорасли *Gelidium crinale* фосфолипидната фракция съдържа главно палмитиновата (C16:0), миристинова (C14:0), лигноцеринова (C24:0), бехенова (C22:0), олеиновата (C18:1 n-9) и ейкозатриеновата (C20:3n-3) киселина. За разлика от всички профили, съдържанието на палмитинова киселина (C16:0) във фосфолипидната фракция на кафявите *Cystoseira barbata* е сравнително ниско (особено при фосфатидилинозитол и фосфатидилетаноламин). В значителни количества се откриват лауринова (C12:0), миристинова (C14:0), олеинова (C18:1 n-9) и ейкозатриенова (C20:3 n-3, ETE) киселина. Последните две особено високи стойности са установени при фосфатидилетаноламин.

СТЕРОЛИ

1. Общо съдържание на стероли

Анализите за съдържанието на стероли (свободни и естерифицирани) и техния мастнокиселинен състав са извършени за три вида черноморски водорасли, принадлежащи към трите отдела – *Ulva rigida* (Отдел Зелени водорасли), *Gelidium crinale* (Отдел Червени водорасли) и *Cystoseira barbata* (Отдел Кафяви водорасли).

Свободните и естерифицираните стероли при *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* не са анализирани досега. Получените резултати за общото съдържание на стероли, свободни и естерифицирани са представени в таблица 6.

Таблица 6. Общо съдържание на стероли в изследваните водорасли*

	<i>Ulva rigida</i> (Зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (Червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (Кафяви)
Общи липиди, g/100g свежо тегло	1,00 ± 0,22	0,99 ± 0,04	0,67 ± 0,12
Общо съдържание	0,54	1,61	1,47
Свободни стероли	90,75	88,82	78,23
Естерифицирани стероли	9,25	11,18	21,77

* резултатите са представени като % от общите липиди

Общото съдържание на стероли варира значително в отделните видове водорасли. Най-ниско е съдържанието при зелените *Ulva rigida* – едва 0,54% от общите липиди, следват кафявите *Cystoseira barbata* – 1,47%. Най-големи количества стероли се установяват при представителите на Отдел Червени водорасли *Gelidium crinale* (1,61%). Съдържанието на свободни стероли значително надвишава това на естерифицирани стероли. Около 90% от общото съдържание на стероли при *Ulva rigida* и *Gelidium crinale* се падат на свободните стероли. При *Cystoseira barbata* свободните стероли са в по-малки количества – 78,23%, а естерифицираните – 21,77%.

2. Съдържание на индивидуални стероли *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*

Посредством GC и GC/MS е изследван стероловият състав на *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*. Индивидуалният стеролов състав на свободните стероли на *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* е представен в таблици 7.

Таблица 7. Индивидуален стеролов състав на свободните стероли на *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* (% от тоталната стеролова фракция)

Стероли	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)
Холестерол (холеста-5-ен-3 β -ол)	90,4	59,6
Кампестерол (24-метилхолеста-5-ен-3 β -ол)	следи	5,7
β -ситостерол (24-етилхолеста-5-ен-3 β -ол)	1,6	34,7
24-метилдендесмостерол (ергоста-5,24-диен-3 β -ол)	1,0	–
((22E,24S)-криностерол ((24S)-ергоста-5,22(E)-диен-3 β -ол)	1,6	–
Холестанон (холест-4-ен-3-он)	0,7	–
Епоксихолестерол (5 α ,6 α) (холестан-5 α ,6 α -епокси-3 β -ол)	следи	–
4,6-холестадиенон (холеста-4,6-диен-3-он)	3,1	–
26-хидроксихолестерол (холест-5-ене-3 β ,26-диол)	1,6	–

В анализиранияте проби от зелени водорасли *Ulva rigida* не се открива нито един от анализиранияте стероли. При *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* в най-големи количества е холестерола. Кафявите водорасли *Cystoseira barbata* съдържат и значителни количества β -

ситостерол (34,7%). Характерният за кафяви водорасли фукостерол не се открива. За разлика от животинските организми и сухоземните растения, водораслите съдържат голямо разнообразие от стероли (Lohr et al., 2012). Установено е, че представителите на отдел Phaeophyta (кафяви водорасли) съдържат главно фукостерол и негови производни, докато представителите на Rhodophyta (червени водорасли) съдържат основни холестерол и негови производни. Представителите на отдел Зелени водорасли (Chlorophyta) показват сравнително разнообразен стеролов състав, като по-често съдържат главно ергостерол и 24-етилхолестерол (Al Ease et al., 1995; Sanchez-Machado et al., 2004). Индивидуалният стеролов състав на естерифицираните стероли в *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* е представен в таблици 8.

Таблица 8. Стеролов състав на естерифицираните стероли на *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* (% от тоталната стеролова фракция)

Стероли	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)
Холестерол (холеста-5-ен-3 β -ол)	4,5	93,2	5,9
Кампестерол (24-метилхолеста-5-ен-3 β -ол)	–	0,8	–
β -ситостерол (24-етилхолеста-5-ен-3 β -ол)	54,2	2,5	2,7
Фукостерол (24-етилхолеста-5,24(28)Е-диен-3 β -ол)	41,2	–	91,4
Изофукостерол (24-етилхолеста-5,24(28)Z-диен-3 β -ол)	следи	–	–
Десмостерол (холест-5,24-диен-3 β -ол)	–	3,6	–

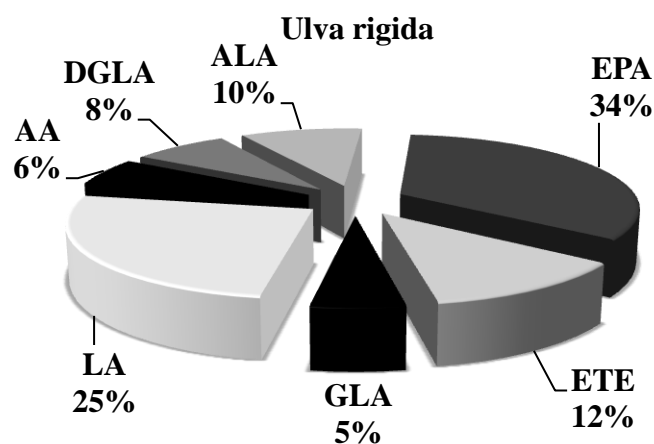
Като цяло се наблюдават значителни разлики в стероловия състав на свободните и естерифицираните стероли в изследваните видове водорасли. *Gelidium crinale* показва характерен за червени водорасли модел, като холестеролът е основният стерол и в двете фракции. Високото съдържание на холестерол е характерно за червените водорасли, тъй като те се считат за по нисши в еволюционно отношение организми (Kamenarska et al., 2002; Kamenarska et al., 2005; De Rosa et al., 2003). Алкилираните при С-24 стероли, както и стеролите с двойна връзка при С-22 са в малки количества при червени водорасли. При *Ulva rigida* се откриват съществени разлики между двете стеролови фракции – свободни и естерифицирани. Докато в първата не се открива нито един от изследваните стероли, при втората се наблюдават високи концентрации 24-етилхолеста-5-ен-3 β -ол (β -ситостерол) и 24-етилхолеста-5,24(28)Е-диен-3 β -ол (фукостерол). Бета-ситостеролът е характерен за зелени водорасли и сухоземните

растения (Kamenarska et al., 2004; Elenkov et al., 1995; Toivo et al., Zlatanov et al., 2012). Фукостерол е откриван в значителни количества и преди в *Ulva rigida* от Черно море (Popov et al., 1985) и в *Ulva lactuca* от Адриатическо море (Karpetanovic et al., 2005).

Както при *Ulva rigida*, така и при *Cystoseira barbata* се наблюдават съществени разлики между състава на свободите и естерифицираните стероли. При свободните стероли се откриват предимно холестерол и β -ситостерол, докато характерният за кафяви водорасли фукостерол отсъства. При естерифицираните стероли, обаче той представлява повече от 90% от съдържанието на стероли.

3. Маснокиселинен състав на стероловите естери

Маснокиселинният състав на естерифицираните стероли на изследваните водорасли не е анализиран досега. И при трите вида в групата на наситените мастни киселини в най-големи количества е палмитиновата киселина (C16:0). Тя представлява почти 30% от общите мастни киселини при зелените *Ulva rigida* и малко над 40% при червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata*. *Ulva rigida* съдържа и сравнително високи количества миристинова киселина (C14:0). Тя представлява почти 15% от общото количество мастни киселини при зелените водорасли и 5% от общите мастни киселини при *Gelidium crinale*. В групата на мононенаситените мастни киселини характерният модел C18:1 n-9 > C16:1 n-7 се наблюдава само при зелените *Ulva rigida*. При червените *Gelidium crinale* съдържанието на палмитолеинова киселина (C16:1 n-7) е около 5 пъти повече от съдържанието на олеинова киселина (C18:1 n-9). При кафявите водорасли *Cystoseira barbata* съотношението палмитолеинова:олеинова е 2:1. На фиг. 10 е представен детайлен маснокиселинен профил на ПНМК на естерифицираните стероли при зелените водорасли *Ulva rigida*.

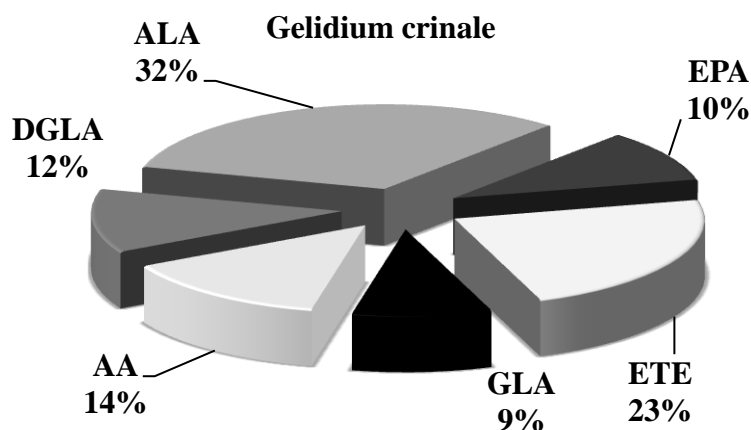


Фиг. 10

Маснокиселинен профил на ПНМК при зелени водорасли *Ulva rigida* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; GLA – C18:3n6; LA – C18:2n6; AA – C20:4n6; DGLA – C20:3n6)

В групата на ПНМК се наблюдават съществени разлики в мастнокиселинния състав на стероловите естери. За разлика от останалите липидни класове при зелените *Ulva rigida*, при които ейкозапентаеновата киселина е в много ниски концентрации или дори отсъства, тук тя представлява 6,1% от общото количество мастни киселини. Това количество е около една трета от общото количество ПНМК в този вид (34% от ПНМК). Характерната за зелени водорасли линолова киселина (C18:2 n-6, LA) е една четвърт от ПНМК. Моделът на разпределение следва: EPA > LA > ETE > ALA. Сумарно тези четири мастни киселини допринасят до 81% от ПНМК.

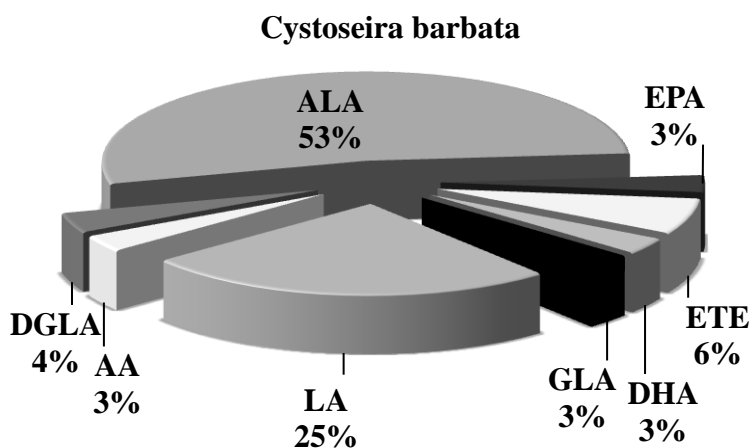
На фиг. 11 е представен детайлен мастнокиселинен профил на ПНМК на естерифицираните стероли при червените водорасли *Gelidium crinale*. В най-големи количества са α -линоленовата киселина (C18:3 n-3, ALA) – 32% от ПНМК и ейкозатриеновата киселина (C20:3 n-3) – 23% от ПНМК. Моделът на разпределение следва: ALA > ETE > AA > DGLA. Сумарно тези четири мастни киселини наброяват до 81% от ПНМК.



Фиг. 11

Мастнокиселинен профил на ПНМК при зелени червени водорасли *Gelidium crinale* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; GLA – C18:3n6; AA – C20:4n6; DGLA – C20:3n6)

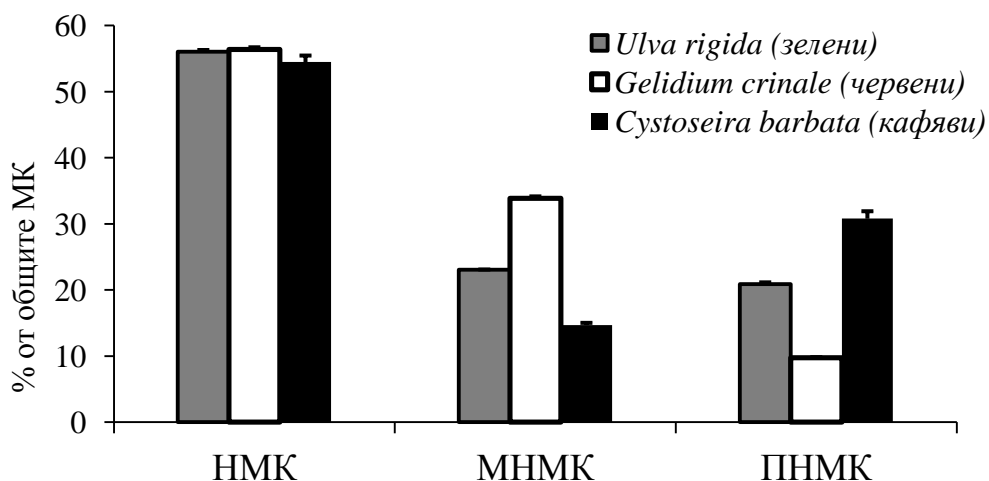
На фиг. 12 е представен детайлен мастнокиселинен профил на ПНМК на естерифицираните стероли при кафяви водорасли *Cystoseira barbata*. При стероловите естери на кафявите водорасли *Cystoseira barbata* преобладава α -линоленовата киселина (C18:3 n-3) – над 50% от ПНМК, за разлика от мастнокиселинния състав на общите липиди, където в групата на ПНМК в най-големи количества е ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3).



Фиг. 12

Маснокиселинен профил на ПНМК при кафяви водорасли *Cystoseira barbata* (ALA – C18:3n3; EPA – C20:5n3; ETE – C20:3n3; DHA – C22:6n3; GLA – C18:3n6; LA – C18:2n6; AA – C20:4n6; DGLA – C20:3n6)

Тук ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3) е едва 3% от ПНМК или около 1% от масните киселини. На второ място е линоловата киселина (C18:2 n-6) – 25% от ПНМК. Сумарно двете киселини (C20:5 n-3 и C18:2 n-6) представляват 78% от ПНМК. На фиг. 13 е представен маснокиселинният профил на естерифицираните стероли на *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*, като % от общите МК.



Фиг. 13

Маснокиселинен профил на естерифицираните стероли на *Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*

Съдържанието на НМК в трите вида водорасли е почти еднакво – около 56,5% при *Ulva rigida*, 56,4% при *Gelidium crinale* и 54,5% при *Cystoseira barbata*. Въпреки това се наблюдават

съществени различия в разпределението на групите мастни киселини на стероловите естери. *Cystoseira barbata* следва характерния за общите липиди модел: НМК > ПНМК > МНМК, докато при *Gelidium crinale* и *Ulva rigida* разпределението е НМК > МНМК > ПНМК. *Gelidium crinale* се отличава с много ниско съдържание на ПНМК – едва 9,74%.

4. Обобщение за съдържанието на стероли и мастнокиселинен състав на стероловите естери

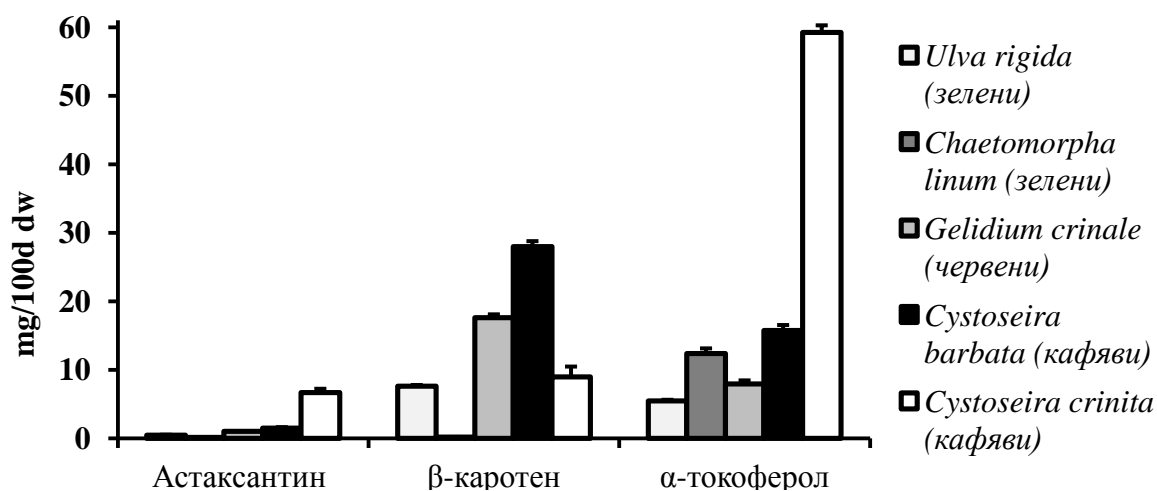
Свободните и естерифицираните стероли при *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* не са анализирани досега. Общото съдържание на стероли нараства в реда *Ulva rigida* (зелени) < *Cystoseira barbata* (кафяви) < *Gelidium crinale* (червени). Съдържанието на свободни стероли значително надвишава това на естерифицирани стероли. При анализа на съдържанието на свободни стероли в червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata* в най-големи количества се откроява холестерола. *Cystoseira barbata* съдържа значителни количества β -ситостерол. При естерифицираните стероли на *Ulva rigida* преобладават β -ситостерол и фукостерол, при *Gelidium crinale* – холестерол, а за *Cystoseira barbata* е установено 90% съдържание на фукостерол. При анализът на мастнокиселинния състав на стероловите естери се наблюдават следните модели на разпределение на групите мастни киселини: за *Cystoseira barbata* – НМК > ПНМК > МНМК, за *Gelidium crinale* и *Ulva rigida* – НМК > МНМК > ПНМК. Съдържанието на НМК в трите вида водорасли е почти еднакво, докато количеството на МНМК намалява в реда: *Gelidium crinale* (червени) > *Ulva rigida* (зелени) > *Cystoseira barbata* (кафяви). Групата на ПНМК показва разпределение: *Cystoseira barbata* (кафяви) > *Ulva rigida* (зелени) > *Gelidium crinale* (червени). Мастнокиселинният състав на стероловите естери на изследваните водорасли не е анализиран досега. И при трите вида в групата на НМК в най-големи количества е палмитиновата киселина (C16:0). В групата на МНМК при зелените *Ulva rigida* преобладава олеиновата (C18:1 n-9), а при *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata* палмитолеиновата (C16:1 n-7) киселина. В групата на ПНМК ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3) преобладава при *Ulva rigida*, а α -линоленовата (C18:3 n-3) – при червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata*.

МАСТНОРАЗТВОРИМИ ВИТАМИНИ И КАРОТЕНОИДИ

1. Съдържание на мастноразтворими витамини и каротеноиди

Както съдържанието на мастни киселини, така и количеството на витамини и каротеноиди във водораслите зависи от множество фактори, като вид, етап на развитие,

местообитание, соленост, сезон, температура и степен на осветеност (Mabeau and Fleurence, 1993; Norziah and Ching, 2000). Резултатите за съдържанието на астаксантин, β -каротен и α -токоферол (витамин Е), представени като mg/100g сухо тегло са представени на фиг. 14. Количествата на мастноразтворимите витамини и каротеноидите варират значително в зависимост от вида на водораслите.



Фиг. 14

Съдържание на астаксантин, β -каротен и α -токоферол във водорасли

Съдържанието на астаксантин е в границите от 0,17 до 6,68 mg/100g сухо тегло и варира значително в отделните видове, с изключение на *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*. В двата вида зелени водорасли астаксантинът е в най-ниски количества. В най-високи количества той се открива в кафявите водорасли *Cystoseira crinita* и *Cystoseira barbata*. Количеството на астаксантин намалява в реда *Cystoseira crinita* (кафяви) > *Cystoseira barbata* (кафяви) > *Gelidium crinale* (червени) > *Ulva rigida* (зелени) > *Chaetomorpha linum* (зелени). Въпреки че основен източник на естествен астаксантин са сладководните зелени микроводорасли *Haematococcus pluvialis*, този каротеноид се синтезира в значителни количества и от различни видове макроводорасли (Jaswir and Monsur, 2011; Banerjee et al., 2009a; Banerjee et al., 2009b).

Съдържанието на астаксантин в изследваните видове черноморски водорасли не е анализирано досега. В три вида водорасли от бреговете на Бенгалския залив астаксантин представлява от 112,72 до 186,11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ сухо тегло при различни проби от *Enteromorpha intestinalis* и съответно от 102,40 до 150,68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ сухо тегло при *Ulva lactuca*. Тези стойности са значително по-високи от установените за зелените черноморски водорасли – *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*. В червените водорасли *Catenella repens*, астаксантинът е от 97,73 до 181,99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ сухо тегло (Banerjee et al., 2009b).

Съдържанието на β -каротен в изследваните видове водорасли е сравнително високо. Изключение се наблюдава при *Chaetomorpha linum*, където β -каротен е едва 0,18 mg/100g dw. В най-високи количества той се открива в кафявите водорасли *Cystoseira barbata*. Количеството на β -каротен в изследваните проби намалява в реда *Cystoseira barbata* > *Gelidium crinale* > *Cystoseira crinita* > *Ulva rigida* > *Chaetomorpha linum*. Съдържанието на β -каротен в изследваните видове черноморски водорасли не е анализирано досега. Високи стойности за β -каротен са характерни за кафяви и червени водорасли. Относително високи стойности за съдържанието на β -каротен са установени за червените водорасли *Gracilaria changgi* от западния бряг на Малайзия (5,2 mg/100g dw) и *Kappaphycus alvarezii* от западния бряг на Индия (5,26 mg/100g dw) (Fayaz et al., 2005; Norziah and Ching, 2000). В ядливите видове кафяви водорасли *Laminaria digitata* (комбу), закупени от търговската мрежа в Япония, стойностите за β -каротен са 2,99 mg/100g dw (Kolb et al., 2004). Тези стойности са сравнително ниски в сравнение със съдържанието на β -каротен в червените *Gelidium crinale* (17,62 \pm 0,48 mg/100g dw) и кафявите *Cystoseira barbata* (28,01 \pm 0,77 mg/100g dw) и *Cystoseira crinita* (8,99 \pm 1,49 mg/100g dw) от Черно море. При зелените водорасли съдържанието на този каротеноид е 7,63 \pm 0,16 mg/100g dw в *Ulva rigida* и съответно 0,18 \pm 0,03 mg/100g dw в *Chaetomorpha linum*. Значително по-ниски стойности са определени в два вида ядивни зелени водорасли – *Caulerpa lentillifera* и *Ulva reticulata* от бреговете на Тайланд (Ratana-Arporn and Chirapart, 2006).

Въпреки ниското съдържание на липиди (от 3,3 до 11,7% от сухото тегло на изследваните видове) водораслите съдържат високи количества α -токоферол (витамин Е). Кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* показват значително по-високи количества α -токоферол от червените *Gelidium crinale* и зелените *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*. Количеството на α -токоферол в изследваните проби намалява в реда *Cystoseira barbata* > *Cystoseira crinita* > *Chaetomorpha linum* > *Gelidium crinale* > *Ulva rigida*. Съдържанието на витамин Е във видовете *Chaetomorpha linum* и *Gelidium crinale* от Черно море не е анализирано досега. Получените резултати за съдържанието на α -токоферол в изследваните видове водорасли са в границите от 5,50 до 59,24 mg/100g сухо тегло.

Турски автори изследват съдържанието на α -токоферол в *Ulva spp.* и *Cystoseira spp.* събрани от бреговете на Синоп, Черно море (Durmaz et al., 2008). Установените стойности за α -токоферол са 9,1 \pm 0,5 μ g/g dw за *Ulva spp.* и съответно 17,1 \pm 0,1 μ g/g dw за *Cystoseira spp.* Съдържанието на α -токоферол в кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* е сравнително високо – 15,77 \pm 0,77 mg/100g dw и съответно 59,24 \pm 1,03 mg/100g dw. В сравнение с тези стойности други видове кафяви водорасли, като *Himanthalia elongata*, традиционно консумирани във Франция и Ирландия, водораслите от вид *Cystoseira* съдържат значително по-

високи количества витамин Е. Съдържанието на α -токоферол в изсушени *Himanthalia elongata* е 33,3 $\mu\text{g/g dw}$, докато при консервираните проби – 12,0 $\mu\text{g/g dw}$ (Sanchez-Machado et al., 2002).

2. Обобщение за съдържанието на мастноразтворими витамини и каротеноиди

Количествата мастноразтворими витамини и каротеноиди варират значително между отделните видове. Съдържанието на астаксантин е най-високо в кафявите водорасли *Cystoseira crinita* (6,68 mg/100g dw) и *Cystoseira barbata* (1,49 mg/100g dw), следват червените *Gelidium crinale* (1,02 mg/100g dw), а в най-ниски количества е при зелените *Ulva rigida* (0,49 mg/100g dw) и *Chaetomorpha linum* (0,17 mg/100g dw).

Съдържанието на β -каротен е в границите от 0,17 mg/100g dw и 7,63 mg/100g dw при зелените *Chaetomorpha linum* и *Ulva rigida*, 8,99 mg/100g dw при кафявите *Cystoseira crinita* до 17,62 mg/100g dw в *Gelidium crinale* (червени) и 28,01 mg/100g dw в *Cystoseira barbata* (кафяви).

Изследваните видове водорасли съдържат и сравнително високи количества α -токоферол (витамин Е). Кафявите водорасли *Cystoseira barbata* (15,77 mg/100g dw) и *Cystoseira crinita* (59,24 mg/100g dw) показват значително по-високи количества α -токоферол от червените *Gelidium crinale* (7,97 mg/100g dw) и зелените *Ulva rigida* (5,50 mg/100g dw) и *Chaetomorpha linum* (12,40 mg/100g dw).

ХИМИЧНИ ЕЛЕМЕНТИ

1. Съдържание на биогенни и токсични елементи

Резултатите за съдържанието на химични елементи в *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* са представени в таблица 9. Установени са значителни разлики в съдържанието на биогенни и токсични елементи в различните видове водорасли. Сред макроелементите (Ca, Mg, Na и K) в най-големи количества се откриват K и Ca. Количеството Ca представлява от 5,52 mg/g от сухото тегло на зелените водорасли *Ulva rigida* до 21,40 mg/g от сухото тегло на кафявите водорасли *Cystoseira barbata*. Изследваните видове водорасли са богат източник на калций. Водораслите притежават голям потенциал за разработване на хранителни добавки като източник на калций не само поради високите концентрации, но и поради лесното му усвояване. Във водораслите той е свързан под формата на калциев карбонат, докато в кравето мляко – под формата на калциев фосфат (Mendis and Kim, 2011). Съдържанието на K варира от 4,60 mg/g dw в *Ulva rigida* до 17,95 mg/g dw в *Cystoseira crinita*, а на Na – от 1,92 mg/g dw в *Cystoseira barbata* до 5,90 mg/g dw в *Ulva rigida*. Във всички проби, с изключение на *Ulva rigida* количеството на K е по-високо от това на Na.

Съдържанието на Mg е в диапазона от 2,31 mg/g dw в *Gelidium crinale* до 7,85 mg/g dw в *Ulva rigida*.

Таблица 9. Съдържание на химични елементи в *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita**

Елемент	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Chaetomorpha linum</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)	<i>Cystoseira crinita</i> (кафяви)
mg/g dw					
Ca	5,52 ± 0,79 ^a	7,30 ± 0,28 ^a	8,68 ± 0,70 ^a	21,40 ± 2,40 ^b	19,93 ± 1,60 ^b
Mg	7,85 ± 0,70 ^a	2,50 ± 0,25 ^b	2,31 ± 0,28 ^b	4,14 ± 0,71 ^c	4,22 ± 0,19 ^c
Na	5,90 ± 0,09 ^a	3,09 ± 0,31 ^b	5,32 ± 0,27 ^a	1,92 ± 0,04 ^c	5,16 ± 0,54 ^a
K	4,60 ± 0,28 ^a	15,44 ± 0,97 ^b	5,57 ± 0,11 ^a	11,93 ± 2,51 ^d	17,95 ± 0,69 ^{bc}
Sr	0,05 ± 0,01 ^a	0,05 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,01 ^a	1,18 ± 0,13 ^b	1,02 ± 0,13 ^b
mg/100g dw					
Mn	3,20 ± 0,10 ^a	29,40 ± 3,56 ^b	19,03 ± 0,40 ^c	4,77 ± 0,35 ^a	1,60 ± 0,26 ^a
Fe	24,53 ± 3,01 ^a	105,97 ± 3,95 ^b	89,27 ± 2,10 ^c	33,43 ± 3,43 ^e	6,10 ± 0,92 ^d
Zn	1,30 ± 0,26 ^a	1,87 ± 0,21 ^a	3,80 ± 0,30 ^b	1,43 ± 0,29 ^a	1,63 ± 0,06 ^a
Se	0,004 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,03 ^b	0,16 ± 0,04 ^b	0,05 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,03 ^a
Co	0,05 ± 0,01 ^{ac}	0,15 ± 0,03 ^b	0,09 ± 0,02 ^c	0,06 ± 0,01 ^{ac}	0,02 ± 0,00 ^a
Cr	0,13 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,02 ^b	0,19 ± 0,02 ^a	0,14 ± 0,03 ^a	0,01 ± 0,00 ^c
Cu	0,82 ± 0,10 ^a	0,76 ± 0,18 ^a	0,91 ± 0,07 ^a	0,77 ± 0,10 ^a	0,24 ± 0,06 ^b
Ni	0,07 ± 0,00 ^{abc}	0,07 ± 0,01 ^{bc}	0,10 ± 0,04 ^b	0,11 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,00 ^c
Ba	0,20 ± 0,05 ^a	0,76 ± 0,20 ^b	0,45 ± 0,16 ^{ab}	0,01 ± 0,00 ^d	1,95 ± 0,13 ^c

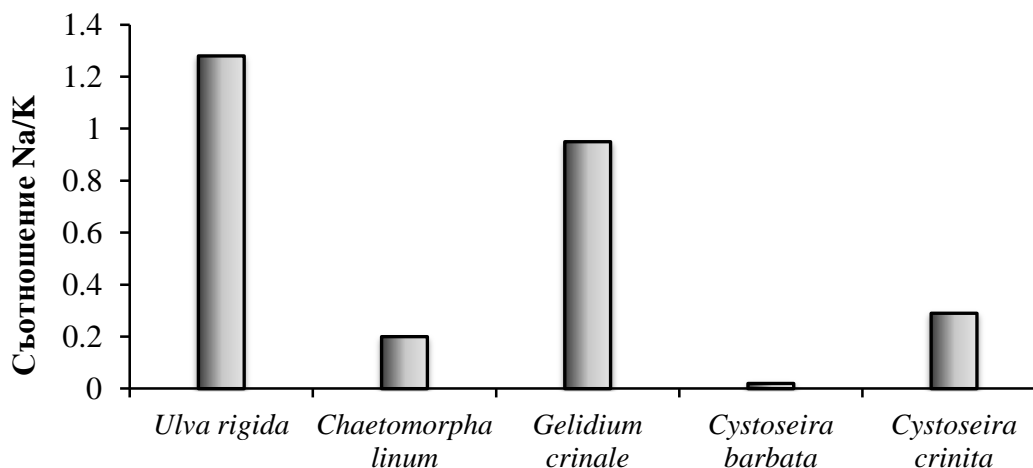
* резултати, получени от три паралелни опита. Стойностите в един ред с различен горен индекс са статистически различни ($P < 0,05$).

Сред микроелементите в най-големи количества е Fe – от 6,10 mg/100g dw при *Cystoseira crinita* до 105,97 mg/100g dw при *Chaetomorpha linum*. Mn варира от 1,60 mg/100g dw при *Cystoseira crinita* до 29,40 mg/100g dw при *Chaetomorpha linum*, а Zn – от 1,30 mg/100g dw при *Ulva rigida* до 3,80 mg/100g dw при *Gelidium crinale*. Най-ниските стойности за Se са установени за *Ulva rigida* – 0,004 mg/100g dw, а най-високите за *Gelidium crinale* – 0,16 mg/100g dw. Най-ниските стойности за Ba са установени за *Cystoseira barbata* – 0,01 mg/100g dw, а най-високите за *Cystoseira crinita* – 1,95 mg/100g dw. Съдържанието на останалите микроелементи е в обхвата: от 0,02 до 0,15 за Co; от 0,01 до 0,33 за Cr; от 0,24 до 0,91 за Cu; от 0,04 до 0,11 за Ni mg/100g dw. Най-ниските стойности за тези четири елемента са установени при кафявите водорасли *Cystoseira crinita*, докато най-високо е съдържанието им при зелените *Chaetomorpha*

linum – за кобалт и хром, при червените *Gelidium crinale* – за мед и при кафявите *Cystoseira barbata* – за никел.

2. Съотношение Na/K

Съотношението натрий/калий, изчислено за петте вида изследвани водорасли е представено на фиг. 15.



Фиг. 15

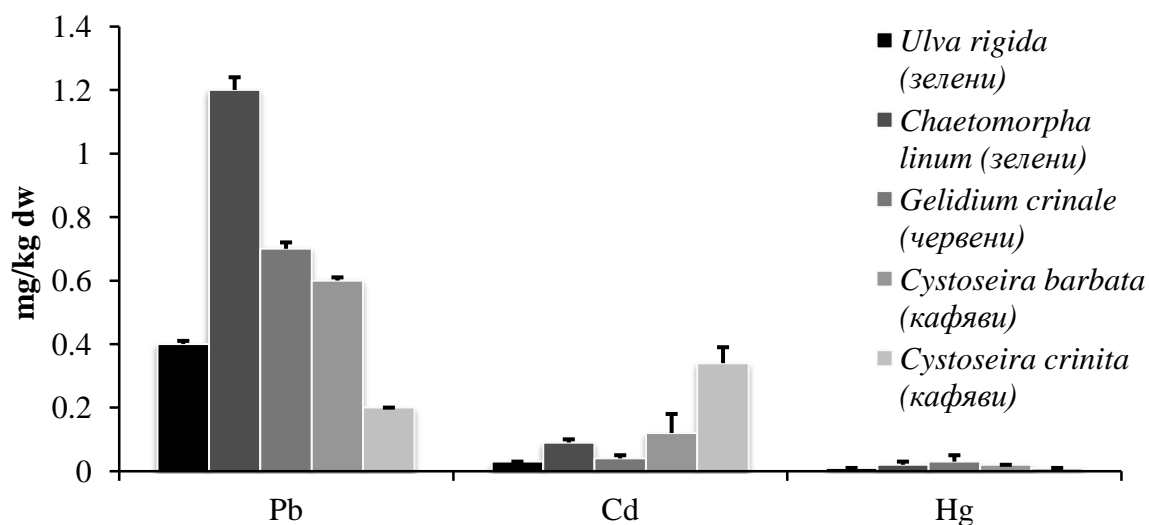
Съотношение Na/K в изследваните видове водорасли

Съотношението натрий/калий изследваните видове водорасли показва различни стойности. В петте изследвани черноморски вида водорасли това съотношение е под 1,3. Максималната получена стойност е 1,28 за *Ulva rigida*. Тя намалява в реда *Ulva rigida* > *Gelidium crinale* > *Cystoseira crinita* > *Chaetomorpha linum* > *Cystoseira barbata* (0,95 при *Gelidium crinale*; 0,29 при *Cystoseira crinita*; 0,2 при *Chaetomorpha linum* и 0,02 при *Cystoseira barbata*). Високото кръвно налягане е основен рисков фактор за развитието на коронарна болест на сърцето, както и за двете форми на инсулт (исхемичен и хеморагичен) (Van den Hoogen et al., 2000; Psati et al., 2001). Подходящият хранителен прием на калий, съответно подобряване на съотношението Na/K в ежедневната диета понижават кръвното налягане, което има благоприятен ефект за превенцията от инсулт и сърдечна аритмия. Препоръчителното съотношение Na/K е около 1.0, а препоръчителния дневен прием на калий – 70-80 mmol/ден (WHO, 2003). Като цяло водораслите показват относително ниско съотношение Na/K, обикновено <1,5 (Ruperez, 2002; Matanjun et al., 2008; Taboada et al., 2009).

3. Съдържание на As, Hg, Pb и Cd

Някои видове водорасли акумулират големи количества тежки метали и в действителност те служат като биоиндикатори за замърсяване на речни устия и крайбрежни води. Съдържанието на тежки метали във водораслите зависи силно не само от вида, но и от параметрите на околната среда (соленост, температура, рН, светлина, кислород и др.) (Chmielewska and Medved, 2001; Villares et al., 2005; Melville and Pulkownik, 2006).

Получените резултати за съдържанието на токсичните Pb, Cd и Hg в mg/kg dw са представени на фиг. 16.



Фиг. 16

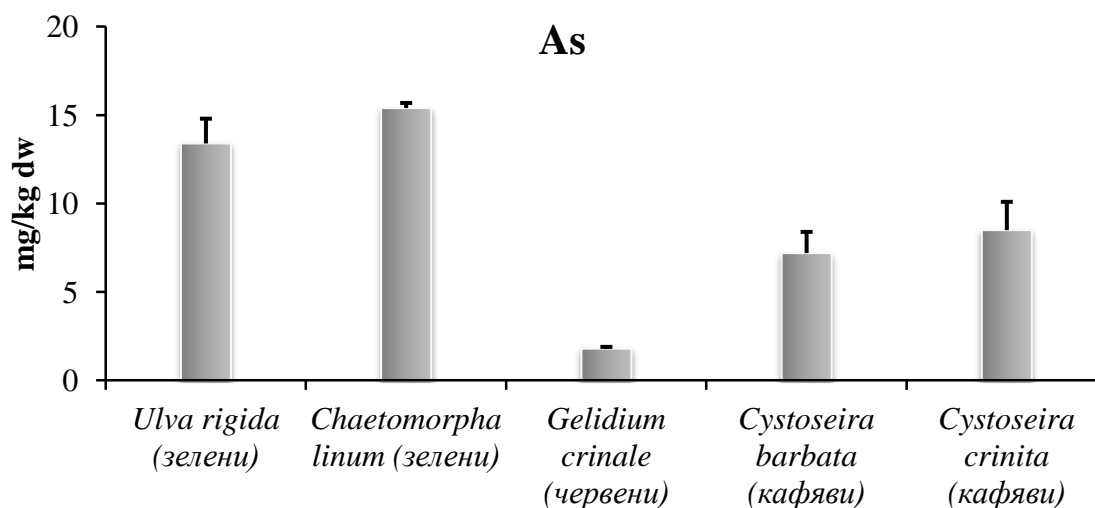
Съдържание на Pb, Cd и Hg в изследваните видове водорасли

Съдържанието на Pb е в границите от 0,2 mg/kg dw при кафявите *Cystoseira crinita* до 1,2 mg/kg dw при зелените *Chaetomorpha linum*; на Cd – от 0,03 mg/kg dw при зелените *Ulva rigida* до 0,34 mg/kg dw при кафявите *Cystoseira crinita* и на Hg – съответно от 0,01 mg/kg dw при *Ulva rigida* и *Cystoseira crinita* до 0,03 mg/kg dw при червените водорасли *Gelidium crinale*.

Поради нарастващия интерес към използването на водораслите като храна и основно като хранителни добавки, в Европейския съюз са изработени норми за максимално допустими граници за съдържанието на тежки метали в тях. Една от първите страни в Европа въвела норми е Франция. Максимално допустимата концентрация за олово във водорасли и продукти от водорасли е 5 mg/kg dw; за кадмий – 0,5 mg/kg dw; за живак – 0,1 mg/kg dw и за неорганичен арсен, съответно – 3 mg/kg dw (Besada et al., 2009). В Израел максимално допустимите стойности за съдържание на токсичните Pb, Cd, Hg и As са сравнително завишени: 5 mg/kg dw за съдържание на олово; 5 mg/kg dw – за кадмий; 2,5 mg/kg dw – за живак; 1 mg/kg dw – за неорганичен арсен и 5 mg/kg dw за общ арсен (USDA, 2011). Европейската комисия е

установила максимално допустими концентрации за кадмий, олово и живак в хранителни добавки, получени основно от водорасли. Препоръките са те да не съдържат количества по-високи от: 3 mg/kg dw – за олово; 3 mg/kg dw – за кадмий и 0,1 mg/kg dw – за живак (Commission Regulation (EC) 629/2008, 2008). От получените резултати единствено съдържанието на арсен надвишава посочените стойности.

Стойностите за As (фиг. 17) варират от 1,8 mg/kg dw при червените водорасли *Gelidium crinale* до 15,4 mg/kg dw при зелените *Chaetomorpha linum*.



Фиг. 17

Съдържание на As в изследваните видове водорасли

Сред храните с най-високо съдържание на арсен са рибата и морските дарове, хранителните продукти и добавките от и на базата на водорасли, зърнените култури и зърнените храни, особено на базата на ориз, трици и кълнове. Приблизително 98% от публикуваните в литературата данни, обаче, се отнасят до съдържанието на общ арсен и само няколко изследвания за посветени на формите му (EFSA, 2009).

Получените в настоящото изследване резултати за Pb (от 0,2 до 1,2 mg/kg dw) и Cd (от 0,03 до 0,34 mg/kg dw) са по-ниски, отколкото данни, получени за водорасли от други райони на Черно море – например зелените *Ulva rigida* показват стойности за Pb 1,6 mg/kg dw, а за Cd 0,8 mg/kg dw; кафявите *Cystoseira barbata* – 1,4 mg/kg dw за Pb и 0,32 mg/kg dw за Cd (Strezov and Nonova, 2009). Турски автори също посочват по-високи стойности за олово в зелените *Chaetomorpha linum* – 2,1 mg/kg dw и кафявите *Cystoseira barbata* – 3,5 mg/kg dw (Topcuoglu et al., 2003). Съдържанието на арсен във търговски ценните видове *Chondrus crispus*, *Undaria pinnatifida* и *Himanthalia elongate* закупени от търговската мрежа в Испания (Besada et al., 2009) е значително по-високо от резултатите получени за черноморските видове *Ulva rigida*,

Chaetomorpha linum, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* обект на настоящото изследване.

В таблица 10 са представени резултати за съдържанието на Pb, Cd, Hg и As в четири вида черноморски риби, уловени от района на Варна през 2011г. (Станчева, 2013). Подобно на водораслите, рибите натрупват арсен в най-големи количества. Съдържанието на четирите токсични елемента в изследваните водорасли намалява в реда $As > Pb > Cd > Hg$. Изключение прави кафявото водорасло *Cystoseira crinita*, което се отличава със сравнително високо съдържание на кадмий. При него концентрациите на съответните елементи намалява в реда $As > Cd > Pb > Hg$.

Таблица 10. Съдържание на Pb, Cd, Hg и As в риби

Елемент	As	Pb	Cd	Hg
Трициона (Станчева, 2013)	1,93 ± 0,17	0,03 ± 0,01	0,005 ± 0,001	0,10 ± 0,02
Сафрид (Станчева, 2013)	1,93 ± 0,17	0,04 ± 0,01	0,004 ± 0,001	0,09 ± 0,01
Чернокоп (Станчева, 2013)	1,02 ± 0,09	0,04 ± 0,01	0,003 ± 0,001	0,11 ± 0,03
Кая (Станчева, 2013)	2,46 ± 0,22	0,06 ± 0,01	0,004 ± 0,001	0,05 ± 0,01

При рибите се наблюдава тенденция към натрупване на по-високи количества живак. При тях съдържанието на четирите токсични елемента намалява в реда $As > Hg > Pb > Cd$.

4. Обобщение за съдържанието на химични елементи

Изследваните видове водорасли са богат източник на калций и калий. Тези два елемента са в най-големи количества сред анализиранияте макроелементи (Ca, Mg, Na и K). Количеството на Ca е най-високо при кафявите *Cystoseira barbata* (21,40 mg/g dw), а K – при кафявите *Cystoseira crinita*. Във всички проби, с изключение на *Ulva rigida* количеството на K е по-високо от това на Na. Препоръчителното съотношение Na/K е около 1.0. В петте изследвани черноморски вида водорасли това съотношение е под 1,3. Зелените *Ulva rigida* показват най-голямо съдържание на магнезий – 7,85 mg/g dw.

Резултатите получени за As в изследваните видове водорасли варират от 0,18 mg/100g dw до 1,54 mg/100g dw; за Pb от 0,2 до 1,2 mg/kg dw; за Cd от 0,03 до 0,34 mg/kg dw и за Hg от 0,01 до 0,03 mg/kg dw. Максимално допустимата концентрация за олово във водорасли и продукти от водорасли във Франция е 5 mg/kg dw; за кадмий – 0,5 mg/kg dw; за живак – 0,1 mg/kg dw и за неорганичен арсен, съответно – 3 mg/kg dw (Besada et al., 2009). В Израел максимално допустимите стойности за съдържание на токсичните Pb, Cd, Hg и As са съответно:

5 mg/kg dw за съдържание на олово; 5 mg/kg dw – за кадмий; 2,5 mg/kg dw – за живак; 1 mg/kg dw – за неорганичен арсен и 5 mg/kg dw за общ арсен (USDA, 2011). От получените резултати единствено съдържанието на арсен надвишава посочените стойности.

ОЦЕНКА НА ПОТЕНЦИАЛА НА ЧЕРНОМОРСКИТЕ ВОДОРАСЛИ ВЪВ ВРЪЗКА С ИЗПОЛЗВАНЕТО ИМ ЗА ПРОИЗВОДСТВОТО НА ХРАНИТЕЛНИ, ФАРМАЦЕВТИЧНИ И КОЗМЕТИЧНИ ПРОДУКТИ

В съвременния свят морските водораслите и техните продукти намират все по-широко и все по-разнообразно приложение в редица области, т.к. съдържат множество ценни вещества като протеини, въглехидрати, липиди, полиненаситени мастни киселини (омега 3 и омега 6), фитостероли, витамини (А, В₁, В₁₂, С, D, Е), каротеноиди, макро- и микроелементи (Са, Р, Na, К, I и др.), терпеноиди и др. Това ги прави богат природен източник на редица съединения и биогенни елементи с висока биологична активност, антиоксидантно, антимикробно действие и др.

Съдържанието на общи липиди в изследваните видове черноморски водорасли е сравнително ниско. Определените стойности са в интервала от 0,67 до 1,07 g/100g свежо тегло. Въпреки това, полиненаситените мастни киселини представляват над 20% от това количество и при петте изследвани вида. Те съдържат значителни количества дълговерижни n-3 и n-6 полиненаситени мастни киселини. Тези мастни киселини са от съществено значение за правилния растеж и развитие на организмите, притежават особено благоприятен ефект при профилактика на сърдечно-съдовите заболявания, диабет, високо кръвно налягане и др. Дълговерижните ненаситени мастни киселини са обикновено с морски произход и не се срещат в сухоземните растения. Сред изследваните черноморски видове с най-високи количества n-3 се откроява представителя на Rhodophyta – *Gelidium crinale*. Червените водорасли *Gelidium crinale* и кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* се открояват с високо съдържание на арахидонова (C20:4 n-6) и ейкозапентаенова (C20:5 n-3) киселина. Ейкозапентаеновата киселина (C20:5 n-3) се превръща в докозахексаенова (C22:6 n-3) в животинския организъм много по-лесно отколкото α -линоленовата киселина (C18:3 n-3), чийто основни източници са ядките и растителните масла. Следователно тези три вида черноморски водорасли могат да се използват като източници на ейкозапентаенова (C20:5 n-3, EPA) и докозахексаенова (C22:6 n-3, DHA) киселина.

Освен за хранителни, макроводораслите могат също да се използват и за фармацевтични цели. Полиненаситените мастни киселини откривани в тях се считат за мощни средства срещу

редица заболявания и имат различни биомедицински приложения. Повечето американски и европейски здравни организации препоръчват дневен прием от 1g EPA и DHA за хора страдащи от коронарна болест на сърцето. Това количество трудно се набавя чрез рибено масло, поради неприятния му мирис и вкус, както и ниската му трайност.

В последните години консумацията на растителни масла и мазнини се е повишила съществено, което води до по-висок прием на n-6 ПНМК. Излишъкът от n-6 мастни киселини води до появата на възпалителни процеси в организма, сърдечносъдови, ракови и автоимунни заболявания (Simopoulos, 2008). Освен количествата n-3 и n-6 полиненаситени мастни киселини от съществено значение за човешкото здраве е и тяхното съотношение n-6/n-3. Световната здравна организация препоръчва съотношение n-6/n-3 по-ниско от 10:1 (Sanchez-Machado et al., 2004; Van Ginneken et al., 2011). Това съотношение днес достига до 30:1, в резултат на нарастване на приема на растителни масла, богати на линолова киселина (C18:2 n-6), и намаляване на консумацията на n-3 ПНМК. Получените стойности за съотношението n-6/n-3 в изследваните видове водорасли са в диапазона от 0,57 до 8,01 (таблица 11).

Таблица 11. Съотношение n-6/n-3 и ПНМК/НМК съотношение при *Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*

% от общите МК	<i>Ulva rigida</i> (зелени)	<i>Chaetomorpha linum</i> (зелени)	<i>Gelidium crinale</i> (червени)	<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)	<i>Cystoseira crinita</i> (кафяви)
n-6/n-3	8,01	2,19	1,35	0,57	0,95
ПНМК/НМК	0,43	0,55	0,57	0,23	0,32

Благоприятните ефекти на полиненаситените мастни киселини за човешкото здраве зависят и от съотношението n-6/n-3 ПНМК приети чрез храната, т.к. биосинтезът на n-3 и n-6 ПНМК зависи от едни и същи ензими. Направен е опит за влагане на брашно от кафяви водорасли *Undaria pinnatifada* (уакаме) към макаронени изделия. Съдържание от около 10% водорасли се оказва приемливо за консуматорите. Влагането на брашно от водорасли в макаронените изделия подобрява съотношението n6/n3 от 15,2 – при традиционната до 3,4 – при обогатената с водорасли паста (Miyashita et al., 2012). Кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita* от Черно море могат да бъдат използвани като хранителни добавки и фармацевтични продукти за подобряването на съотношението омега-6/омега-3 в човешката диета, т.к. показват най-ниски стойности 0,57 и 0,95.

Съотношението ПНМК/НМК играе важна роля за определяне на различните свойства на клетъчните мембрани като флуидност, които спомагат за поддържане на нормалния метаболизъм в клетките. За най-балансирано се счита това съотношение, при което и трите

групи НМК:МНМК:ПНМК са 1:1:1. Препоръчителното минимално съотношение ПНМК:НМК е 0,45 като за оптимално се приема $1,0 \pm 0,2$ (EFSA, 2009; WHO/FAO, 2003, 2010). Съотношението ПНМК:НМК в изследваните видове варира от 0,23 до 0,57. Най-високите стойности на съотношението (0,57) се установяват при червеното водорасло *Gelidium crinale*.

Освен съотношенията ПНМК/НМК и n-6/n-3 за оценка и сравняване на биологичната активност на липидите от различен произход (животински и растителен) се използват и т.нар. липидни индекси (атерогенен и тромбогенен). Тези индекси оценяват и влиянието на индивидуалните мастни киселини за превенция на развитието на заболявания на кръвоносната и сърдечно-съдовата система на човека. Атерогенният и тромбогенният потенциал на липидите се оценява чрез атерогенен (АИ) и тромбогенен (ТИ) липиден индекс.

Атерогенният индекс (АИ) се използва за характеризиране състава на мазнини, въз основа на ефекта на отделни мастни киселини върху концентрациите на серумния холестерол (LDL и HDL) (Ulbricht and Sautgate, 1991). Счита се че единствено НМК с дължина на веригата 12, 14 и 16 въглеродни атома благоприятстват развитието на атеросклероза, като С14:0 се счита за четири пъти по-атерогенна от другите две. Всички ненаситени МК, (независимо от броя и позицията на двойните връзки в структурата им) се приемат за еднакво ефективни за намаляване на атерогенния ефект на НМК. Атерогенният индекс показва връзката между сумата от основните наситени мастни киселини, които се считат за про-атерогенни (предизвикват повишение в нивото на холестерола в кръвта, защото лесно се отлагат върху стените на артериите) и основните класове ненаситени мастни киселини притежаващи анти-атерогенен ефект (Davidson et al, 2006; Riediger et al., 2009; Cottin et al., 2011). Различните мазнини и масла се характеризират и с различни стойности за атерогенния индекс: кокосово масло – от 13 до 20; палмово масло – около 7; какаово масло – 0,7 за, и над 0,5 за други растителни масла. Анти-атерогенните липиди инхибират натрупването на плака и намаляват нивата на естерифицирани мастни киселини и холестерол, като по този начин предотвратяват появата на микро- и макрокоронарни заболявания (Hooper et al, 2006; Sekikava et al.,2008).

Тромбогенният индекс (ТИ) определя тенденцията към тромбогенеза в кръвоносните съдове. Той се определя като съотношението между про-тромбогенните (НМК) и анти-тромбогенните (МНМК, n-3 и n-6 ПНМК) киселини (Ulbricht and Sautgate,1991; Senso et al., 2007). Тромбозата е сериозно усложнение на коронарната атеросклероза, което може да доведе до инфаркт на миокарда. Известно е, че n-3 ПНМК имат мощно антитромботично действие. Счита се, че стойности за АИ и ТИ под 1,0 са показател за по-добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства на липидите (Ulbricht and Sautgate, 1991; Wood et al.,2008). В таблица 12 са представени изчислените стойности за атерогенния и тромбогенния индекс на

изследваните видове черноморски водорасли. Стойностите са сравнени с литературни данни за водорасли (Kumar et al., 2011) и данни получени за някои видове черноморски риби (Мерджанова, 2014, дисертация).

Таблица 12. Липидни индекси (АИ и ТИ) за изследваните видове водорасли (средна стойност \pm стандартно отклонение) и стойности за други водорасли и черноморски риби от литературата

	АИ*	ТИ*	Литературен източник
<i>Ulva rigida</i> (зелени)	1,76 \pm 0,10 ^a	2,37 \pm 0,12 ^a	
<i>Chaetomorpha linum</i> (зелени)	1,08 \pm 0,04 ^b	0,83 \pm 0,04 ^b	
<i>Gelidium crinale</i> (червени)	1,18 \pm 0,08 ^b	0,84 \pm 0,07 ^b	
<i>Cystoseira barbata</i> (кафяви)	2,33 \pm 0,05 ^c	1,57 \pm 0,07 ^c	
<i>Cystoseira crinita</i> (кафяви)	1,91 \pm 0,21 ^a	1,42 \pm 0,09 ^d	
<i>Ulva rigida</i> (зелени)	1,22	1,78	Kumar et al., 2011
<i>Ulva lactuca</i> (зелени)	1,10	0,80	Kumari et al., 2013
<i>Gelidium micropterum</i> (червени)	1,61	1,83	Kumar et al., 2011
<i>Graciliaria textorii</i> (червени)	1,30	3,90	Kumari et al., 2013
<i>Cystoseira indica</i> (кафяви)	0,66	0,87	Kumar et al., 2011
<i>Scytosiphon lomentaria</i> (кафяви)	0,20	1,20	Kumari et al., 2013
Трициона	0,64	0,46	Мерджанова, 2014
Кая	0,43	0,45	Мерджанова, 2014
Сафрид	0,52	0,51	Мерджанова, 2014
Чернокоп	0,55	0,45	Мерджанова, 2014

*Стойностите в една колона с различен горен индекс са статистически отличими при $p < 0,05$

Всички стойности за атерогенния и тромбогенния индекс за изследваните видове водорасли са $< 2,5$, което ги прави сравними с тези за месо и млечни продукти. Получените данни са в интервалите: за АИ от 1,08 (*Chaetomorpha linum*) до 2,33 (*Cystoseira barbata*); за ТИ от 0,83 (*Chaetomorpha linum*) до 2,37 (*Ulva rigida*). С изключение на зелените водорасли *Ulva rigida*, където стойностите за ТИ са по-високи отколкото за АИ, при останалите видове се наблюдава обратната тенденция АИ $>$ ТИ. При зелените *Chaetomorpha linum* и червените *Gelidium crinale* стойностите на ТИ са под 1,0, което е показател за техните добри антитромбогенни свойства.

Стойностите за АИ и ТИ за петте изследвани вида черноморски водорасли са съизмерими с данни за други видове водорасли (Kumar et al., 2011; Kumari et al., 2013). Авторите, обаче, докладват значително по-ниски стойности за ТИ и особено за АИ при видовете кафяви водорасли, което се дължи главно на по-високо съдържание на ПНМК в съответните видове.

Получените експериментални резултати са сравнени с данни за някои от най-масово консумираните черноморски риби в нашата страна. Стойностите за атерогенния индекс на рибните липиди варират от 0,43 до 0,64, а за тромбогенния – от 0,45 до 0,51. Стойности за АИ и ТИ под 1,0 са показател за по-добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства на липидите. Представените данни за черноморските риби са по-ниски в сравнение с тези за водорасли, поради относително по-ниския дял на палмитинова киселина (C16:0) в мастнокиселинния профил на изследваните видове риби (Мерджанова, 2014, дисертация). Въпреки това липидите на зелените водорасли *Chaetomorpha linum* и червените водорасли *Gelidium crinale* също показват добри антиатерогенни и антитромбогенни свойства със стойности около 1,0 за АИ и съответно под 1,0 – за ТИ.

Фосфолипидите намират широко приложение в хранителната индустрия, поради голямата си стабилност срещу окисление и висока степен на бионаличност. Фосфолипидите имат емулгиращи свойства, облекчават храносмилането и подобряват усвояването на мастните киселини приети с храната. Съдържанието на фосфолипиди в изследваните видове водорасли е от 3,58 до 18,34% от липидната фракция. Два от изследваните вида водорасли – червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata* съдържат основно фосфатидилхолин и фосфатидилетаноламин във фосфолипидната си фракция. Тези две съединения са източници на холин, следователно изследваните водорасли могат да бъдат източници на този есенциален нутриент в животинската и човешката диета.

Стероловите фракции на кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и зелените *Ulva rigida* се състоят предимно от β -ситостерол и фукостерол. Основният ефект на фитостеролите е намаляване на плазмените нива на общия холестерол и липопротеините с ниска плътност (LDL-холестерола или „лошия“ холестерол). В допълнение, те притежават и антиоксидантни, антибактериални, антиканцерогенни, противовъзпалителни и противогъбични свойства. Фукостеролът изолиран от кафяви водорасли *Pelvetia siliquosa* има свойството да намалява серумните нива на глюкозата в модели с диабетно болни плъхове (Lee et al., 2004). Следователно тези два вида водорасли кафявите *Cystoseira barbata* и зелените *Ulva rigida* могат да бъдат използвани като хранителни добавки или влагани в такива за намаляване нивата на холестерол в кръвта, както и подобряване състоянието на диабетно болни пациенти.

Изследваните видове кафяви водорасли *Cystoseira crinita* и *Cystoseira barbata* и червените *Gelidium crinale* съдържат значителни количества астаксантин, β -каротен и α -токоферол (витамин Е). Наличието на значителни количества от тези биологично активни вещества в изследваните черноморски водорасли показва, че те биха могли да намерят потенциални приложения в различни козметични препарати и в хранителната индустрия. Тези

съединения намират приложение като оцветители (астаксантин и β -каротен) и като естествени антиоксиданти, които удължават живота и добрия вид на хранителните продукти. През 2010 година световната продукция на каротеноиди (основно атаксантин, β -каротен, лутеин и кантаксантин) се оценява на 1 млрд. щатски долара. Атаксантинът се използва основно при отглеждането на съомгови риби, скариди, пилета и др. Поради по-ниската си цена, обаче, по-голямата част от използвания атаксантин е синтетичен. За нуждите на животновъдството и при отглеждането на аквакултури се предпочита използването му от естествени източници. Антиоксидантната активност на атаксантина е около 10 пъти по-висока от тази на β -каротен, лутеин, зеаксантин и кантаксантин. Поради тази причина той се предлага на пазара и под формата на хранителна добавка (Sartal et al., 2012).

Изследваните видове черноморски водорасли са богат източник на калций, магнезий, калий, желязо, манган, цинк и селен. Във всички проби, с изключение на зелените *Ulva rigida* количеството на К е по-високо от това на Na. Това означава, че останалите четири вида показват стойности за съотношението Na/K под 1,0. Тези стойности се препоръчват от Световната здравна организация за поддържане на здравословна диета, понижаване на кръвното налягане и превенция развитието на сърдечно-съдови заболявания. Провеждани са опити за влагане на водорасли в различни продукти от месо. Това става или чрез директно използване на изсушени водорасли или индиректно – чрез използване на екстракти. Получените продукти се отличават с по-ниско съдържание на Na, а от там и подобро съотношение Na/K, по-ниско общо съдържание на мазнини и наситени мастни киселини за сметка на ненаситените. Повишава се и съдържанието на протеини, Mg и омега-3 полиненаситени мастни киселини (Cofrades et al., 2012).

Черноморските водорасли съдържат сравнително високи количества биологично активни вещества (полиненаситени мастни киселини, фосфолипиди, фитостероли, витамини – α -токоферол, каротеноиди – атаксантин и β -каротен) и биогенни елементи (К, Са, Mg, Mn, Fe, Se и др.). Благодарение на това изследваните видове биха могли да намерят широко приложение в хранителната и фармацевтичната индустрия, козметиката, селското стопанство и отглеждането на аквакултури.

Съдържанието на протеини, въглехидрати, липиди, фибри, биологично активни метаболити и др. в морските водорасли може да бъде повлияно от промени в заобикалящата ги среда (температура на водата, соленост, достъп на светлина и хранителни вещества). Поради това, от биотехнологична гледна точка водораслите могат да се разглеждат като естествени биореактори за синтез на биологично активни вещества.

От направения по горе преглед може да се заключи, че изследваните видове черноморски водорасли могат да бъдат потенциални източници на важни биологично активни съединения и биогенни елементи с благоприятни ефекти за здравето. Те могат да намерят приложения при разработването на различни здравословни храни, хранителни добавки, фармацевтични и козметични продукти за превенция на развитието на редица хронични заболявания (сърдечно-съдови заболявания, атеросклероза, хиперлипидемия, различни видове рак и др.).

Морските ресурси в България до сега са подценявани и не са достатъчно използвани. Съдържанието на биологично активни вещества в черноморските макроводорасли ги прави ценни, възобновяеми и почти неизчерпаеми ресурси. Една част от тях могат да бъдат директно събирани от местообитанията им или да бъдат отглеждани изкуствено, като аквакултури с цел да се осигури необходимата суровина. Приложението на тези възобновяеми източници и продукти от тях за различни цели е много перспективно.

Големите възможности за използване на морските ресурси за различни цели се нуждаят от повече мултидисциплинарни изследвания. Необходимо е да се разгледат всички аспекти, като химически състав, биотехнологии, методи за екстракция, биологична активност, наличие на токсичност и възможности за отглеждането им като аквакултури. При преминаването от научното към практическото приложение на биологично активните вещества изолирани от морски водорасли е необходимо да бъдат определени точната активност на екстрактите/съединенията. Трябва да бъдат проведени *in vitro* и *in vivo* изследвания, които да продължат по-късно с животински модели и клинични опити с хора. Не на последно място трябва да бъдат проведени изследвания върху ефекта на методите за производство върху активността на биологично активните съединения.

Изследванията, които са представени в дисертационния труд показват, че потенциала на черноморските водорасли е голям. Те могат да се използват като хранителни добавки, козметични и фармацевтични продукти. Те са широко разпространени, достъпни и гарантирани суровини. Съдържащите се в тях биологично активни вещества са с естествен произход, а екстракцията им е сравнително рентабилен процес. Морските водорасли са лесно достъпни суровини – могат да се събират директно, както и да бъдат отглеждани като аквакултури.

ИЗВОДИ

1. Обобщени и систематизирани са голям брой изследвания за съдържанието на биологично активни вещества и биогенни елементи в различни видове водорасли от Черно море и други водни басейни през последните 10 години. Данните от литературния обзор са използвани за сравнение с получените в това изследване.
2. Разработена и приложена е аналитична процедура за определяне съдържанието на биологично активни вещества и биогенни елементи в черноморски водорасли, която включва система за контрол на качеството на анализите.
3. Изследвани са пет вида черноморски водорасли за съдържанието на биологично активни вещества (мастни киселини, фосфолипиди, стероли, витамини и каротеноиди) и биогенни елементи (Ca, Mg, K, Mn, Fe, Zn, Se и др.).
4. Определено е съдържанието на общи липиди в g/100g свежо тегло. С най-високо съдържание са зелените водорасли *Chaetomorpha linum* – 1,07 g/100g свежо тегло, а с най-ниско кафявите *Cystoseira crinita* (0,70 g/100g свежо тегло) и *Cystoseira barbata* – 0,67 g/100g свежо тегло)
5. Идентифицирани са 34 вида мастни киселини. Количествено са определени 30 вида, които са класифицирани в три групи: наситени (НМК), мононенаситени (МНМК) и полиненаситени (ПНМК). При всички видове изследвани водорасли се наблюдава следното разпределение: НМК > ПНМК > МНМК:
 - и при петте вида изследвани водорасли водорасли в групата на НМК доминира палмитиновата киселина C16:0, а сред МНМК с най-високи стойности са олеиновата C18:1 n-9 и палмитолеиновата C16:1 n-7
 - в групата на ПНМК се наблюдават различия в мастнокиселинния профил: линоловата киселина (C18:2 n-6) преобладава при зелените водорасли *Ulva rigida* и *Chaetomorpha linum*, арахидоновата (C20:4 n-6) – при червените *Gelidium crinale*, а ейкозапентаеновата (C20:5 n-3) – при кафявите водорасли *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*;
 - червените водорасли *Gelidium crinale* се открояват с най-високи количества n-3 ПНМК (12,27%);
6. Определено е съдържанието на фосфолипиди в три от изследваните видове водорасли (*Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*) То е в границите от 3,58 до 18,34% от общите липиди:
 - преобладават фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилетаноламин (ФЕА) и фосфатидилинозитол (ФИ);
 - фосфолипидите съдържат значително по-високи количества НМК;

- наблюдават се съществени различия в профила на ПНМК при фосфолипидите: при зелените водорасли преобладават ейкозатриеновата (C20:3 n-3, ETE) и α -линоленовата (C18:3 n-3, ALA), а при червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata* – ейкозатриеновата киселина (C20:3 n-3, ETE);
7. Определено е съдържанието на стероли в три от изследваните видове водорасли (*Ulva rigida*, *Gelidium crinale* и *Cystoseira barbata*) То е в границите от 0,54 до 1,61% от общите липиди, като съдържанието на свободни стероли значително надвишава това на естерифицирани стероли:
- при свободните стероли преобладават холестерол и β -ситостерол, а при естерифицираните стероли – β -ситостерол, холестерол и фукостерол;
 - при мастнокиселинния профил на стероловите естери се наблюдават следните модели на разпределение на групите мастни киселини: за *Cystoseira barbata* – НМК > ПНМК > МНМК, за *Gelidium crinale* и *Ulva rigida* – НМК > МНМК > ПНМК;
 - при зелените водорасли *Ulva rigida* в групата на ПНМК преобладават ейкозапентаеновата (C20:5 n-3), а α -линоленовата (C18:3 n-3) – при червените *Gelidium crinale* и кафявите *Cystoseira barbata*;
8. Определено е съдържанието на мастноразтворими витамини и каротеноиди в петте вида черноморски водорасли:
- съдържанието на α -токоферол е в границите от 5,50 до 59,24 mg/100g dw, като то е най-високо при кафявите водорасли *Cystoseira crinita*, а най-ниско – при зелените *Ulva rigida*;
 - съдържанието на астаксантин е от 0,17 до 6,68 mg/100g dw, като то е най-високо при кафявите водорасли *Cystoseira crinita*, а най-ниско – при зелените *Chaetomorpha linum*;
 - съдържанието на β -каротен е от 0,18 до 28,01 mg/100g dw, като то е най-високо при кафявите водорасли *Cystoseira barbata*, а най-ниско – при зелените *Chaetomorpha linum*;
9. Определено е съдържанието на биогенни и токсични елементи в петте изследвани вида черноморски водорасли:
- количеството на Ca е най-високо при кафявите *Cystoseira barbata* (21,40 mg/g dw), на Mg – при зелените *Ulva rigida* (7,85 mg/g dw), а на K – при кафявите *Cystoseira crinita*, съдържанието на Se (0,16 mg/100g dw) и Zn (3,80 mg/100g dw) е най-високо при червените *Gelidium crinale*;
 - при всички изследвани видове водорасли, с изключение на *Ulva rigida* количеството на K е по-високо от това на Na;

- съдържанието на токсични елементи в изследваните видове не надвишава установените максимално допустими концентрации, приети като норми от редица организации.

Единствено съдържанието на арсен е малко по-високо от тези норми;

10. Изчислени са стойностите за съотношението n-6/n-3. Те са в границите от 0,57 до 8,01. Тези стойности са в рамките на препоръчаните от СЗО граници (под 10:1).
11. Определени са стойностите за АИ и ТИ. Всички изследвани видове показват стойности < 2,5, което е показател за добрите антиатерогенни и антитромбогенни свойства на липидите на изследваните видове черноморски водорасли;
12. Направена е оценка на потенциала на изследваните видове черноморски водорасли като суровини за производството на хранителни, фармацевтични и козметични продукти. Заключение е, че те са един много добър ресурс.

ПРИНОСИ

1. Направено е комплексно изследване на пет от най-разпространените видове черноморски водорасли (*Ulva rigida*, *Chaetomorpha linum*, *Gelidium crinale*, *Cystoseira barbata* и *Cystoseira crinita*) във връзка с използването им като суровина за производството на хранителни, фармацевтични и козметични продукти.
2. За първи път е определен детайлният мастнокиселинен профил на общите липиди, индивидуалните фосфолипиди (фосфатидилхолин, фосфатидилетаноламин и фосфатидилинозитол) и стероловите естери на изследваните видове черноморски водорасли. Идентифицирани са 34 мастни киселини, като 30 от тях са количествено определени.
3. За първи път е направен анализ за съдържанието на витамини и каротеноиди (α -токоферол, β -каротен и астаксантин) в петте вида черноморски водорасли.
4. Направената оценка на потенциала на черноморските водорасли като суровини за производството на хранителни, фармацевтични и козметични продукти, показва, че те са един много добър източник на редица биологично активни вещества и биоγενни елементи.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Ivanova, V.**, Stancheva, M., Merdzhanova, A. (2012) Fatty acids composition of macroalgae from Bulgarian Black Sea coast, *Ovidius University Annals of Chemistry*, **23(1)**, 35-40
2. **Ivanova, V.**, Stancheva, M., Petrova, D. (2013) Fatty acids composition of Black Sea coast *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*, *Bulgarian Journal of Agricultural Sciences*, **19(1)**, 42-47
3. **Panayotova, V.**, Stancheva, M. (2013) Fat soluble vitamins and fatty acids composition of Black Sea *Cystoseira barbata*, *International Conference on Integration and Innovation in Science and Education*, 355-360, DOI: 10.12955/cbup.2013.58
4. **Panayotova, V.**, Stancheva, M., Dobрева, D. (2013) Alpha-tocopherol and ergocalciferol contents of some macroalgae from Bulgarian Black Sea coast, *Ovidius University Annals of Chemistry*, **24(1)**, 13-16
5. **Panayotova, V.**, Stancheva, M. (2013) Mineral composition of marine macroalgae from the Bulgarian Black Sea coast, *Scripta Scientifica Medica*, **45(6)**, 48-51

СПИСЪК НА УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

1. **Ivanova, V.** "Fatty acid composition and fat-soluble vitamins in Black Sea algae", WORKSHOP "Safety and nutrition value of Black sea foods", Medical University – Varna, June 11-13, 2012, "St. Konstantin and Helena" Varna, Bulgaria
2. **Ivanova, V.**, Stancheva, M., Petrova, D. Fatty acids composition of Black Sea coast *Ulva rigida* and *Cystoseira crinita*, 80 Years Institute of Fish Resources, International Conference "Evolution of the Black Sea Ecosystem", October 5-6, 2012, "St. Konstantin and Helena" Varna, Bulgaria
3. **Panayotova, V.**, Stancheva, M. Fat soluble vitamins and fatty acids composition of Black Sea *Cystoseira barbata*, Central Bohemia University, International Conference on Integration and Innovation in Science and Education, April 7-14, 2013, Prague, Czech Republic
4. **Panayotova, V.**, Stancheva, M. Fat soluble vitamins and fatty acids composition of Black Sea *Ulva rigida* and *Gelidium crinale*, 1st International U.O.C.-B.EN.A. Conference "The Sustainability of Pharmaceutical, Medical and Ecological Education and Research – SPHAMEER 2013", Ovidius University of Constanta, June 20-23, 2013, Constanta, Romania
5. **Panayotova, V.**, Stancheva, M. Comparative study of the chemical composition of Black Sea *Chaetomorpha linum* and *Cystoseira crinita*, International Conference "Marine Research Horizon 2020" Institute of Oceanology – Bulgarian Academy of Sciences, September 17-20, 2013, Golden Sands, Bulgaria
6. Stancheva, M., **Panayotova, V.**, Vutov, S. Fatty Acid Profile, Fat Soluble Vitamins and Some Pigments in Black Sea Macroalgae, Aquaculture conference: To the Next 40 Years of Sustainable Global Aquaculture, November 3-7, 2013, Las Palmas, Gran Canaria
7. Stancheva, M., **Panayotova, V.**, Dobрева, D., Merdzhanova, A. Lipid composition of the Black Sea macroalgae *Gelidium crinale*, 14th International Nutrition & Diagnostics Conference, September 2-5, 2014, Prague, Czech Republic