

Exploring Potential Aquaculture-Immunostimulant-Peptides Derived from *Chlorella sorokiniana*

Nur Maulida Safitri^{1*}, Wiga Alif Violando², Achmad Suhermanto¹, Riza Rizkiah³, Iman Mukhaimin⁴, Taufik Hadi Ramli¹, Asthervina Widyastami Puspitasari⁵, Atiqoh Zummah⁶

¹Program Studi Budi Daya Ikan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang, Karawang, Indonesia

²Program Studi Ilmu Kelautan, UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya, Indonesia

³Program Studi Teknik Kelautan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang, Karawang, Indonesia

⁴Program Studi Teknologi Pengolahan Produk Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Karawang, Karawang, Indonesia

⁵Program Studi Teknik Budidaya Perikanan, Politeknik Kelautan dan Perikanan Sorong, Sorong, Indonesia

⁶Program Studi Biologi, UIN Sunan Ampel Surabaya, Surabaya, Indonesia

Article History

Received : July 11th, 2024

Revised : August 17th, 2024

Accepted : September 06th, 2024

*Corresponding Author:

Nur Maulida Safitri,

Program Studi Budi Daya Ikan,
Politeknik Kelautan dan
Perikanan Karawang, Karawang,
Indonesia;

Email: maulida.safitri@kkp.go.id/
nurmsafitri@gmail.com

Abstract: *Chlorella sorokiniana* is a microalgae with an outstanding nutritional profile and numerous therapeutic substances that can be used as an immunostimulant, including in aquaculture. This research aimed to investigate and characterize peptides isolated from *C. sorokiniana* protein using TCA digestion and hydrolyzed enzymatically with trypsin. Peptides were then subsequently identified using Tandem LC-MS/MS and Mascot Distiller. Results showed that the percentage of pure protein yield following TCA digestion was 54.66%, and 12 peptides with lengths ranging from 7 to 23 sequences were discovered after trypsin digestion. These peptides originated from various enzymes and chloroplast proteins, including protein synthesis elongation factor TU, photosystem I iron-sulfur center, photosystem II 43 kDa, Ycf4, ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH homolog, nitrate reductase, chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase, and ATP synthase CF1 alpha chain. These findings demonstrated that *C. sorokiniana* might serve as a source of immunostimulant peptides and proteins, particularly for aquaculture biota.

Keywords: *Chlorella sorokiniana*, Trypsin Enzymatic Hydrolysates, Immunostimulants, Peptides, TCA Digestion

Pendahuluan

Akuakultur merupakan salah satu industri penting karena dapat menyediakan sumber pangan protein tinggi untuk memenuhi permintaan global yang terus meningkat (Li et al., 2021). Pada industri ini, penggunaan imunostimulan, probiotik, maupun vitamin, mendapatkan perhatian signifikan sebagai sarana untuk meningkatkan kesehatan dan produktivitas biota budidaya. Salah satu imunostimulan yang menjanjikan adalah jenis microalga *Chlorella sorokiniana* yang merupakan alga hijau bersel tunggal (Liu & Chen, 2014; Rendon-Castrillon et al., 2021).

Chlorella sorokiniana dicirikan dengan kandungan protein yang tinggi, profil asam amino yang sesuai, serta berbagai senyawa bermanfaat lain seperti vitamin esensial, mineral, serta berbagai senyawa bioaktif seperti karotenoid, klorofil, dan polisakarida (Chou et al., 2012; Zhang et al., 2014), sehingga dapat digunakan sebagai imunostimulan maupun suplementasi tambahan pakan pada biota akuakultur (Safi et al., 2014). Penelitian yang dilakukan oleh Zhang et al (2014) menunjukkan dampak positif genus *Chlorella* dalam makanan terhadap status kekebalan berbagai spesies ikan. *Chlorella* telah terbukti dapat

meningkatkan kadar parameter imun utama, seperti imunoglobulin M, interleukin-22, dan ligan kemokin 5, di dalam jaringan ikan (Zhang et al., 2014). Temuan ini menunjukkan bahwa *Chlorella* dapat menstimulasi sistem imun adaptif dan bawaan organisme akuatik, yang berpotensi meningkatkan kemampuan mikroalga ini dalam menahan patogen maupun stressor lingkungan (Reverter et al., 2014). Pada jangka pendek, terjadi peningkatan sel natural killer dan respons inflammasi dini pada organisme patogen yang menyerang (Wu et al., 2021).

Meskipun adanya protein pada *Chlorella* dapat digunakan sebagai imunostimulan, namun peptida sebagai turunan protein *Chlorella* juga berpotensi untuk memberikan efek peningkatan sel imun dan metabolisme yang lebih cepat (Bishop & Zubeck, 2012). Peptida merupakan rantai pendek asam amino yang dapat menunjukkan berbagai aktivitas biologis, termasuk modulasi respons imun yang cepat (Senevirathne & Kim, 2012). Untuk memanfaatkan potensi peptida turunan *Chlorella* sebagai imunostimulan, digunakan salah satunya menggunakan metode pelarutan trikloroasetat (TCA) yang melibatkan hidrolisis enzimatis protein, diikuti dengan proses pemurnian untuk mengisolasi fraksi peptida yang diinginkan (Orusmurzaeva et al., 2022; Wang & Zhang, 2012).

Bahan dan Metode

Ekstraksi *Chlorella*

Bubuk *C. sorokiniana* diambil sebanyak 5 mg dan dimasukkan ke dalam tube eppendorf 1.5 mL untuk dilarutkan ke dalam 1% larutan sodium dodecyl sulfate (SDS) dan disonikasi selama 3 menit. Protein yang telah terekstraksi selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dan dihilangkan pelarutnya.

Presipitasi TCA

Protein *C. sorokiniana* selanjutnya dilarutkan kembali dengan larutan asam trikloroasetat (TCA) 20% dan disimpan selama 12 jam pada suhu 4°C. TCA selanjutnya dihilangkan dengan mencuci presipitasi protein dengan aseton dan etanol (1:9) dan proses beku kering (*freeze dried*) pada suhu -20°C. Setelah benar-benar kering, protein dipecah menjadi

peptida menggunakan enzim tripsin pada suhu 37°C (1/20; enzim/sampel) selama 16 jam dan disimpan pada pH 8.5. Reaksi dihentikan dengan pemanasan campuran pada suhu 100°C selama 10 menit dan dilakukan fraksinasi berat molekul < 3 kDa.

Identifikasi Peptida

Peptida potensial diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS (LCQ Deca XP Max) dan informasi sekuens ditentukan menggunakan analisis tandem-mass-spektrometer. Sekuens selanjutnya diidentifikasi menggunakan database NCBI dengan kode *Chlorella sorokiniana* menggunakan aplikasi Mascot Distiller v2.3.2.0 (Matrix Science, London, UK).

Hasil dan Pembahasan

Persentase Protein

Protein dan Peptide berperan penting sebagai nutrisi utama untuk menjaga kesehatan dan proses metabolisme biota akuakultur. Penelitian terkini terkait potensi biomolekul genus *Chlorella*, terutama *C. sorokiniana*, yaitu difokuskan pada karakteristik hidrolisat protein, peptida, eksplorasi senyawa bioaktif, yang digunakan untuk pencegahan penyakit, regulasi sistem imun, dan peningkatan pertumbuhan (Gao et al., 2021).

Protein dan turunannya berupa peptida merupakan biomolekul esensial yang mengatur jalur metabolik kunci dan berperan penting sebagai pembangun struktur biologis biota akuakultur (Mohanty et al., 2014). Senyawa-senyawa yang terkandung didalamnya tidak hanya berperan dalam adanya kandungan nutrisi yang tinggi sebagai sumber pangan namun juga sebagai zat bioaktif yang secara langsung dapat meningkatkan kesehatan biota (Taylor et al., 2006).

Proses hidrolisis protein, baik melalui cara enzimatis maupun kimia, dapat melepaskan berbagai peptida bioaktif dari molekul protein induk (Gouic et al., 2018). Proses ini, dikenal sebagai presipitasi asam trikloroasetat (TCA), yaitu suatu metode untuk mengidentifikasi dan karakterisasi peptida bioaktif potensial didalam matriks protein kompleks (Mohanty et al., 2014). Pencernaan TCA secara efektif dapat memecah struktur kompleks protein dan menghasilkan potongan peptida yang lebih pendek sehingga

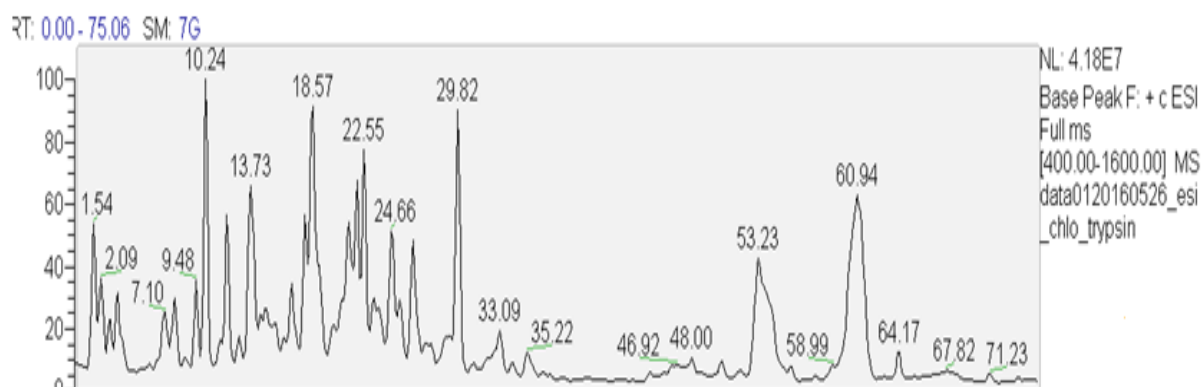
dapat memberikan bioaktivitas yang lebih cepat (Gao et al., 2021).

Pada penelitian ini, dilakukan serangkaian tahapan untuk mengekstraksi protein dari *C. sorokiniana*, yang dimulai dengan pemurnian melalui proses presipitasi hingga pemotongan peptida menggunakan enzim. Proses presipitasi menggunakan asam trikloroasetat untuk memperoleh larutan protein murni setelah proses pemisahan dari senyawa non protein. Berdasarkan hasil penelitian, sampel awal yang berjumlah 5 mg, didapatkan hasil akhir setelah proses presipitasi TCA sebanyak 2.73 ± 2.3 mg protein murni. Hasil ini menunjukkan bahwa presipitasi yang dilakukan cukup efisien dengan persentase *yield* sebesar 54.66%, yang menunjukkan bahwa lebih dari separuh protein yang terkandung dalam sampel ekstrak kasar *C. sorokiniana* telah berhasil diisolasi. Tejano et al., (2019) menyatakan bahwa *C. sorokiniana* memiliki kandungan protein $65.08 \pm 0.88\%$ dari 4.4% biomassa awal kering.

Identifikasi Peptida

Bioaktif peptida merupakan molekul protein berantai pendek (3-20 residu asam amino) yang dapat diaktivasi melalui proses hidrolisis secara enzimatik maupun selama pencernaan gastrointestinal. Pada umumnya, bioaktif peptida yang paling sesuai untuk formulasi imunostimulan adalah berukuran kurang dari 3 kDa (Aluko, 2012).

Berbagai biota akuakultur telah diteliti kandungan protein kasar dan komposisi asam aminonya, yang menunjukkan variasi yang signifikan. Spesies akuakultur yang hidup di perairan dingin cenderung kaya akan asam amino lisin dan asam aspartat, sedangkan biota laut cenderung memiliki leucine yang lebih tinggi. Ikan asli berukuran kecil kaya akan histidin, sedangkan kerapu dan manyung terkarakterisasi dengan proporsi glisin dan asam glutamat yang lebih tinggi. Perbedaan profil asam amino ini berhubungan dengan kebutuhan metabolik yang unik serta adaptasi lingkungan dari setiap spesies (Mohanty et al., 2014).



Gambar 1. Hasil identifikasi LC-MS/MS pada hidrolisat enzimatik *C. sorokiniana*

Sementara itu, mikroalga secara spesifik kaya akan asam glutamat (Taylor et al., 2006). Organisme fotosintetik sel tunggal ini merupakan bagian penting dari rantai makanan akuatik, cenderung memiliki kadar asam glutamat bermuatan negatif yang lebih tinggi dibandingkan dengan asam amino lain dalam proporsi komposisi proteinnya (Caporgno & Mathys, 2018). Kelimpahan asam glutamat dalam mikroalga diduga disebabkan oleh perannya yang krusial dalam berbagai proses metabolisme, seperti produksi energi dan asimilasi nitrogen, yang sangat penting untuk kelangsungan hidup dan pertumbuhan mikroalga

ini dalam jejaring makanan ekosistem perairan (Rizwan et al., 2018).

Salah satu metode identifikasi bioaktif peptida adalah menggunakan instrumen kromatografi LC-MS/MS. Tandem Mass-Spektrometer (MS/MS) merupakan instrumen krusial yang digunakan pada studi proteomik. MS dapat digunakan untuk menganalisis campuran protein kompleks serta karakterisasi peptida. Pada MS/MS, peptida diionisasi dari MS pertama dan selanjutnya difragmentasi dan diukur rasio massa terhadap muatan (*m/z*) dari ion yang terdeteksi (Lu dan Chen, 2023) th.

Tabel 1. Identifikasi peptida potensial dari *C. sorokiniana* menggunakan kombinasi presipitasi TCA dan hidrolisis tripsin

No	Nama Protein	Sekuens Peptida	M/Z	Mr	Skor
1.	Protein synthesis elongation factor TU (chloroplast)	KYDDIDSAPEEK	705.7419	1408.6358	76
2.	Photosystem I iron-sulfur center (chloroplast)	VVLGSETTR	513.5886	1024.5189	42
3.	Photosystem I iron-sulfur center (chloroplast)	CESACPTDFLSVR	713.4929	1424.9712	20
4.	Photosystem II 43 kDa protein (chloroplast)	LGANVASAQGPTG LGK	721.4177	1440.8209	38
5.	ATP synthase CF1 alpha chain (chloroplast)	ELIIGDR	408.6222	815.2298	36
6.	Ycf4 (chloroplast)	FLQVSLEGI	503.1352	1004.2559	31
7.	Photosystem II D2 protein (chloroplast)	NILLNEGIR	521.5266	1041.0387	31
8.	Unnamed protein product (chloroplast)	LSSFVASKSAEK	447.0614	1338.1624	24
9.	Nitrate reductase	VCDLLQLCGMKS MAEGALHVCFR	2362.4163	2522.8180	21
10.	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH homolog (chloroplast)	LSLKNLNGR	506.8833	1011.7520	19
11.	Unnamed protein product (chloroplast)	QALMISAICK	552.8085	1103.6024	18
12.	Chloroplastic glucose-6-phosphate dehydrogenase	AALSIVVVGASGD LAKK	799.3719	1596.7293	18

Teknik LC-MS/MS dapat digunakan untuk identifikasi dan karakterisasi struktur dan sifat fungsional dari berbagai peptida bioaktif, sehingga dapat berpotensi untuk digunakan sebagai imunostimulan biota akuakultur (Ryu & Kim, 2013; Kim & Kang, 2011). Berdasarkan hasil penelitian, selama 75 menit masa pemrosesan sampel hasil hidrolisat, ditemukan sejumlah puncak (*peak*) pada waktu retensi (RT) yang berbeda. Terdapat dua puncak (*area*) yang memiliki kuantitas/jumlah total senyawa yang terdeteksi relatif tinggi dalam sampel hidrolisat *C. sorokiniana*, yaitu pada RT 53.23 dan 60.94. Selain itu, ditemukan sejumlah puncak yang menunjukkan intensitas sinyal yang tinggi, seperti pada RT 1.54, 10.24, 11.78, 13.73, 18.57, 22.55, 24.66, serta 29.82. selain itu, ditemukan dua puncak yang memiliki intensitas sinyal deteksi cenderung rendah, seperti pada RT 2.09, 7.10, 9.48, 33.09, 35.22, 46.92, 48.00, 58.99, 64.17, 67.82, dan 71.23. Untuk mengidentifikasi peptida yang terdeteksi, analisis dilanjutkan dengan menggunakan aplikasi Mascot Distiller.

Hasil proteolisis spesifik pada masing-masing puncak yang terdeteksi pada LC-MS/MS selanjutnya diukur rasio m/z berdasarkan database protein yang tersedia dari NCBI

menggunakan database *in silico* (Lu & Chen, 2003). Meskipun ditemukan beberapa puncak yang menunjukkan keberadaan peptida spesifik di dalam sampel, tidak semua peptida dapat teridentifikasi. Hal ini disebabkan karena tingkat sensitivitas sampel terhadap instrumen. Beberapa peak yang tidak simetris menunjukkan ketidakstabilan peptida di dalam sampel (Aebersold & Mann, 2003; Domon & Aebersold, 2006).

Kloroplas merupakan rumah bagi beragam protein yang berkontribusi pada berbagai proses metabolisme penting pada tumbuhan (Lu et al., 2020). Hal ini tidak hanya mencakup kompleks protei fotosintesis, namun juga enzim yang terlibat dalam asimilasi nutrisi, redoks, homeostatis, dan fungsi penting lainnya (Balafrej et al., 2020). Berdasarkan hasil penelitian, ditemukan 12 sekuens peptida (Tabel 1) dari hidrolisat enzimatik *C. sorokiniana*, dimana 83% protein yang ditemukan merupakan protein regulator kloroplas. Protein-protein ini berimplikasi penting untuk meningkatkan efisiensi fotosintesis, toleransi stres, dan sifat lain yang relevan sebagai potensinya sebagai imunostimulan (Fu et al., 2022).

Sekuens KYDDIDSAPEEK (KK12)

merupakan potongan asam amino yang ditemukan berasal dari protein synthesis elongation factor TU (chloroplast), dengan M/Z 705.7419 dan skor kesesuaian (*identity*) 76. Protein ini merupakan protein esensial untuk translasi protein dalam kloroplas (Pilon et al., 2006). Faktor ini membantu memastikan bahwa materi genetik kloroplas diekspresikan dengan baik yang memungkinkan untuk menjalankan fungsi metabolisme esensialnya (Sjuts et al., 2017). Protein ini sangat melimpah dalam sel bakteri, dengan sekitar 10 salinan per ribosom, dan berfungsi untuk mengirimkan aminoasil-tRNA ke ribosom yang diprogram oleh RNA pembawa. Selain perannya dalam sintesis protein, kompleks yang terbentuk antara elongation factor TU dan aminoasil-tRNA juga berfungsi untuk melindungi aminoasil-tRNA dari deasilasi (Kavaliauskas et al., 2012). Fungsi perlindungan ini sangat penting, karena membantu menjaga stabilitas dan integritas molekul tRNA selama proses penerjemahan (Sjuts et al., 2017). Protein ini telah menunjukkan potensi yang signifikan sebagai target obat karena fungsinya yang penting di dalam sintesis protein, sehingga merupakan kandidat yang menarik dalam pengembangan obat antibakteri. Adanya gangguan aktivitas pada protein penting ini dapat mengganggu sintesis protein dalam sel target yang menyebabkan kematian sel atau penghambatan pertumbuhan sel patogen (Czworkowski & Moore, 1996; Ho et al., 2012), sehingga dapat dijadikan alternatif imunostimulan terbaru.

Sekuens VVLGSETTR dan CESACPTDFLSVR yang teridentifikasi berasal dari protein Photosystem I iron-sulfur center (chloroplast), dengan M/Z 513.5886 dan 713.4929 dan skor identitas 42 dan 20. Gugus besi-sulfur dalam protein ini berperan penting dalam transpor elektron fotosintesis kloroplas serta dalam proses metabolisme lainnya, seperti asimilasi nitrogen dan sulfur (Przybyla-Toscano et al., 2018).

Sekuens LGANVASAQGPTGLGK yang teridentifikasi dari hidrolisat tripsin *C. sorokiniana* berasal dari protein Photosystem II 43 kDa protein (chloroplast), dengan M/Z 721.4177 dan Mr 1440.8209. Di dalam sistem fotosintesis, protein ini merupakan komponen penting dalam mesin fotosintesis yang bertanggungjawab pada reaksi pemisahan air

oleh cahaya sehingga menghasilkan gradien proton yang digunakan untuk memberi daya pada sintesis ATP (Finazzi et al., 2009). Protein ini juga membantu dalam proses reduksi NAD(P)H berbagai proses biosintesis dan antioksidan dalam organel (Kruger & Schaeuwen, 2003).

Sekuens ELIIGDR berasal dari protein ATP synthase CF1 alpha chain (chloroplast), yang berperan penting dalam menghasilkan ATP pada sel dalam proses fotosintesis. Protein ini sangat penting terutama dalam proses konversi energi cahaya menjadi energi kimia secara efisien dalam proses selular *Chlorella* (Caffarri et al., 2014). Sekuens peptida ini memiliki M/Z 408.6222 dan skor identitas 36.

Sekuens FLQVSLEGI berasal dari protein Ycf4 (chloroplast), dengan Mr 1004.2559 dan M/Z 503.1352. Protein Ycf4 merupakan salah satu protein yang terlibat dalam proses perakitan Fotosistem I (Andersen et al., 2003). Selain protein ini, ditemukan sekuens peptida yang didapatkan dari protein fotosistem yang terlibat dalam proses fotosintesis, yaitu NILLNEGIR yang berasal dari protein Photosystem II D2 protein (chloroplast) dengan M/Z 521.5266 dan Mr 1041.0387. Protein ini merupakan komponen utama dari pusat reaksi kompleks fotosintesis, bersamaan dengan Fotosistem I. (Pilon et al., 2006; Timko, 2006).

Sekuens LSSFVASKSAEK dan sekuens QALMISAIKK berasal dari produk protein kloroplas yang belum teridentifikasi (unnamed protein product). Masing-masing sekuens memiliki M/Z 447.0614 dan 552.8085.

Berbeda dengan sekuens lainnya, peptida VCDLLQLCGMKSMAGALHVCFR berasal dari golongan enzim nitrat reductase dengan M/Z 2362.4163 dan Mr. 2522.8180. Enzim ini merupakan komponen utama dalam asimilasi nitrogen pada *Chlorella* yang membantu sintesis asam amino maupun biomolekul lain yang mengandung nitrogen yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan *Chlorella* (Saha & Singh, 2018). Manipulasi ekspresi atau aktivitas enzim ini dapat berpotensi untuk meningkatkan produksi biomassa dan kandungan protein dalam *Chlorella*, sehingga bisa meningkatkan efisiensi nutrisi (Naik et al., 2018) pada biota akuakultur.

Peptida LSLKNLNGR memiliki M/Z 506.8833 dan Mr. 1011.7520 berasal dari protein ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH

homolog (chloroplast). Enzim ini banyak ditemukan pada bagian kloroplas dan berperan penting dalam pengendalian kualitas protein fotosintesis (Bashir et al., 2016) dengan mendegradasi protein yang rusak secara selektif sehingga membantu menjaga integritas fungsional fotosintesis dan memastikan konversi cahaya menjadi energi yang optimal (Kato & Sakamoto, 2018). Homolog FtsH merupakan kandidat target yang menarik untuk aplikasi bioteknologi terutama dalam peningkatan produktivitas *Chlorella* dan toleransinya terhadap tekanan dan stres (Niazian et al., 2021).

Sekuens peptida terakhir yang teridentifikasi berdasarkan aplikasi Mascot Distiller adalah sekuens AALSIVVVGASGDLA KK berasal dari enzim chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase, dengan M/Z 799.3719 dan Mr. 1596.7293. Sesuai dengan namanya, enzim ini terlibat dalam jalur pentosa fosfat oksidatif di dalam kloroplas. Jalur ini berperan penting dalam menyediakan daya reduksi dalam bentuk NADPH, yang diperlukan dalam berbagai proses biosintesis, termasuk sintesis asam lemak dan regenerasi askorbat serta antioksidan penting (Riganti et al., 2012). Aktivitas enzim ini berperan penting dalam fotosintesis dan metabolisme tanaman (Corpas & Barroso, 2014). Penelitian Kruger & Schaewen (2003) menunjukkan bahwa ekspresi berlebihan enzim ini dapat meningkatkan pertumbuhan dan toleransi tanaman terhadap stres abiotik dengan meningkatkan ketersediaan NADPH dan antioksidan tanaman, sehingga berpotensi untuk digunakan menjadi imunostimulan pada biota akuakultur.

Kesimpulan

Secara keseluruhan, hasil yang diperoleh dari penelitian ini menunjukkan bahwa proses presipitasi protein *C. sorokiniana* dengan TCA mampu mengekstraksi protein *C. sorokiniana* secara efisien, dengan perolehan hasil akhir sebanyak 54.66% dari sampel awal. Selain itu, analisis hidrolisat secara enzimatis menggunakan tripsin menunjukkan adanya 12 sekuens peptida yang teridentifikasi dan berasal dari berbagai enzim dan protein kloroplas, seperti: protein synthesis elongation factor TU, photosystem I iron-sulfur center, photosystem II 43 kDa, nitrat reduktase, dan ATP synthase CF1 alpha chain.

Penemuan ini menunjukkan bahwa protein *C. sorokiniana* dapat menjadi sumber peptida potensial yang dimanfaatkan sebagai imunostimulan, terutama pada biota akuakultur.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diberikan kepada Professor Philip Hsu, laboratorium Analytical Chemistry Departement Biological Science and Technology NPUST, yang telah memberikan fasilitas laboratorium maupun pendanaan pada penelitian ini.

Referensi

- Aebersold R. & Mann M. (2003). Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature*. 422(6928), 198-207.
- Aluko RE. (2012). Bioactive Peptides (Chapter 3). In *Functional Foods and Nutraceuticals*. New York: Springer. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3480-1>
- Andersen G., Nissen P. & Nyborg J. (2003, August 1). Elongation factors in protein biosynthesis. Elsevier BV, 28(8), 434-441. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(03)00162-2)
- Balafrej H., Bogusz D., Triqui Z E A., Guédira A., Bendaou N., Smouni A. & Fahr, M. (2020). Zinc Hyperaccumulation in Plants: A Review. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 9(5): 562-562. <https://doi.org/10.3390/plants9050562>
- Bashir K., Rasheed S., Kobayashi T., Seki M. & Nishizawa N.K. (2016). Regulating Subcellular Metal Homeostasis: The Key to Crop Improvement. *Frontiers Media*. 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01192>
- Bishop W.M. & Zubeck H.M. (2012). Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition and Food Sciences*. 02(05). <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000147>
- Caffarri S., Tibiletti T., Jennings R C. & Santabarbara S. (2014). A Comparison Between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and

- Functioning. Bentham Science Publishers. *Current Protein & Peptide Sciences*. 15(4): 296-331. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140327102218>
- Caporgno M.P. & Mathys A. (2018). Trends in Microalgae Incorporation Into Innovative Food Products With Potential Health Benefits. *Nutrition and Food Science Technology*. 5. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00058>
- Chou N., Cheng C., Wu H., Lai C., Lin L., Pan I. & Ko C. (2012). Chlorella sorokiniana-Induced Activation and Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells through NF- κ B and PI3K/MAPK Pathways. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/735396/>
- Corpas F.J. & Barroso J.B. (2014). NADPH-generating dehydrogenases: their role in the mechanism of protection against nitro-oxidative stress induced by adverse environmental conditions. *Frontiers*. 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00055>
- Czworkowski J. & Moore P.B. (1996). The Elongation Phase of Protein Synthesis. Academic Press. 293-332. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60366-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60366-9)
- Domon B. & Aebersold R. (2006). Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 312(5771): 212-217. DOI: [10.1126/science.1124619](https://doi.org/10.1126/science.1124619)
- Finazzi G., Drapier D. & Rappaport F. (2009). The CF0F1 ATP Synthase Complex of Photosynthesis. In *The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition)*. Academic Press. 639-670. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-370873-1.00026-5>
- Fu Y., Li X., Fan B., Zhu C. & Chen Z. (2022). Chloroplasts Protein Quality Control and Turnover: A Multitude of Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*. 23(14): 7760-7760. <https://doi.org/10.3390/ijms23147760>
- Gao R., Yu Q., Shen Y., Chu Q., Chen G., Fen S., Yang M., Yuan, L., McClements D.J. & Sun Q. (2021). Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends in Food Science & Technology*. 110: 687-699. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
- Gouic A.V.L., Harnedy P.A. & FitzGerald. (2018). Bioactive Peptides from Fish Protein By-Products. In *Bioactive Molecules in Food*. SpringerNature. ISBN : 978-3-319-54528-8. Pp: 1-35.
- Ho J.C.S., Rydström A., Trulsson M., Bålfors J., Storm P., Puthia M., Nadeem A. & Svanborg C. (2012). HAMLET: functional properties and therapeutic potential. *Future Medicine*. 8(10): 1301-1313. <https://doi.org/10.2217/fon.12.122>
- Kato Y. & Sakamoto W. (2018). FtsH Protease in the Thylakoid Membrane: Physiological Functions and the Regulation of Protease Activity. *Front in Plant Sciences*. 20:9:855. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00855>
- Kavaliauskas D., Nissen P. & Knudsen C.R. (2012). The Busiest of All Ribosomal Assistants: Elongation Factor Tu. *American Chemical Society*. 51(13): 2642-2651. <https://doi.org/10.1021/bi300077s>
- Kim S. & Kang K. (2011). Medicinal Effects of Peptides from Marine Microalgae. *Advances in Food and Nutrition Research*. 64: 313-323. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-387669-0.00025-9>
- Kruger N.J. & Schaeven A.V. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Current Opinion in Plant Biology*. 6(3): 236-246. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(03)00039-6)
- Li Y., Aiello G., Fassi EMA., Boschin G., Bartolomei M., Bollati C., Roda G., Arnoldi A., Grazioso G. & Boschin G. (2021). Investigation of Chlorella pyrenoidosa Protein as a Source of Novel Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) and Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) Inhibitory Peptides. *Nutrients*. 13(5): 1624-1624. <https://doi.org/10.3390/nu13051624>

- Liu J. & Chen F. (2014). Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 1-35. https://doi.org/10.1007/10_2014_286
- Lu W. & Chen H. (2003). Recent advances in LC-MS and LC-MS/MS for pesticide residue analysis. *Journal of Chromatography A*. 1000(1-2): 279-299.
- Lu Y., Liu, L.N., Roston R., Soll J., & Gao H. (2020). Editorial: Structure and Function of Chloroplasts - Volume II. *Frontiers Media*. 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.620152>
- Mohanty B.P., Mahanty A., Ganguly S., Sankar T., Chakraborty K., Anandan R., Paul B., Sarma D., Mathew S., Asha K.K., Behera B.K., Aftabuddin M., Debnath D., Vijayagopal P., Nimmagadda S., Akhtar M.S., Sahi N., Mitra T., Banerjee S. & Sharma, A P. (2014). Amino Acid Compositions of 27 Food Fishes and Their Importance in Clinical Nutrition. *Hindawi Publishing Corporation*. 2014, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/269797>
- Niazian M., Sadat-Noori S.A., Tohidfar M., Mortazavian S.M.M. & Sabbatini P. (2021). Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) vs. Flavodoxin (Fld): Two Important Genes for Enhancing Plants Stress Tolerance and Productivity. *Frontiers in Plant Sciences*. 1(12). <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.650215>
- Orusmurzaeva Z., Maslova A., Tambieva Z., Sadykova E., Askhadova P., Umarova K., Merzhoeva A., Albogachieva K., Ulikhanyan K., & Povetkin S N. (2022). Investigation of the chemical composition and physicochemical properties of *Chlorella vulgaris* biomass treated with pulsed discharges technology for potential use in the food industry. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 16: 777-789. <https://doi.org/10.5219/1803>
- Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Hoewyk D.V., Ye H. & Pilon-Smits E.A.H. (2006). Biogenesis of Iron-Sulfur Cluster Proteins in Plastids. *Genetic Engineering*. 101-117. https://doi.org/10.1007/0-387-25856-6_7
- Przybyla-Toscano J., Roland M., Rellán-Álvarez R., Couturier J. & Rouhier N. (2018). Roles and maturation of iron-sulfur proteins in plastids. *Journal of Bioorganic Chemistry*. 23(4): 545-566. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1532-1>
- Rendón-Castrillón L., Ramírez-Carmona M., Ocampo-López C. & Giraldo-Aristizabal R. (2021). Evaluation of the operational conditions in the production and morphology of *Chlorella* sp. *Brazilian Journal of Biology*. 81(1), 202-209. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.228874>
- Reverter M., Tapissier-Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B. & Sasal P. (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. *Aquaculture*. 433(20): 50-61. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.05.048>
- Rizwan M., Mujtaba G., Memon S A., Lee K. & Rashid N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 92: 394-404. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.034>
- Ryu B. & Kim S. (2013). Isolation and Biological Activities of Peptides from Marine Microalgae by Fermentation. *Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications*. 441-448. <https://doi.org/10.1002/9781118375082.ch21>
- Safi C., Zebib B., Merah O., Pontalier P., & Vaca-García C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 35: 265-278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>
- Saha A.K.A. & Singh I.S.B. (2018). Concurrent Expression and Regulation of Genes Involved in Carbon and Nitrogen Metabolism in Relation with Nitrogen Use Efficiency. *International Journal of Current Microbiology and Applied*

- Sciences*. 7(07): 1894-1909.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.707.225>
- Senevirathne M. & Kim S. (2012). Development of Bioactive Peptides from Fish Proteins and Their Health Promoting Ability. *Advances Food and Nutrition Research*. 65: 235-248.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416003-3.00015-9>
- Sjuts I., Soll J. & Bölter B. (2017). Import of Soluble Proteins into Chloroplasts and Potential Regulatory Mechanisms. *Frontiers in Plant Sciences*. 8(8): 168.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00168>
- Taylor M.W., Barr N.G., Grant C.M., & Rees T.A.V. (2006). Changes in amino acid composition of *Ulva intestinalis* (Chlorophyceae) following addition of ammonium or nitrate. *Phycologia*. <https://doi.org/10.2216/05-15.1>
- Tejano L.A., Peralta J.P., Yap E.E.S., Panjaitan F.C.A. & Chang Y.W. (2019). Prediction of Bioactive Peptides from *Chlorella sorokiniana* Proteins using Proteomic Techniques in Combination with Bioinformatics Analyses. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(7): 1786. DOI: 10.3390/ijms20071786
- Timko M.P. (2006). Pigment Biosynthesis: Chlorophylls, Heme, and Carotenoids. In *Pigment Biosynthesis: Chlorophylls, Heme, and Carotenoids*. Springer Science Business Media. 377-414.
https://doi.org/10.1007/0-306-48204-5_20
- Wang, X., & Zhang, X. (2012, December 1). Optimal extraction and hydrolysis of *Chlorella pyrenoidosa* proteins. *Bioresource Technology*. 126: 307-313.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.059>
- Wu S., Liu H., Li S., Sun H., He X., Huang Y. & Long H. (2021). Transcriptome Analysis Reveals Possible Immunomodulatory Activity Mechanism of *Chlorella* sp. Exopolysaccharides on RAW264.7 Macrophages. *Marine Drugs*. <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/4/217/pdf>
- Zhang Y., Zhang A., Li X. & Lu, C. (2020). The Role of Chloroplast Gene Expression in Plant Responses to Environmental Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(17): 6082-6082.
<https://doi.org/10.3390/ijms21176082>.