

UNIVERZITET U NOVOM SADU
Tehnološki fakultet

Marijana Sakač

**ANTIOKSIDANTI U ZRNU SOJE
I
NJEHOVIM PROIZVODIMA**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Novi Sad, 2000.

Putevi rađanja ideje, priprema i celovita izvedba ove doktorske disertacije vezani su za osobe koje ne mogu a da ne pomenem i da im se, što je sigurno u ovom trenutku najmanje, duboko zahvalim.

Najveću zahvalnost dugujem mentoru dr Sonji Đilas, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koja mi je po drugi put od mog početka bavljenja naučnoistraživačkim radom višestruko pomogla da prevaziđem nedoumice, probleme, shvatim nepoznato, skupim snage da istrajem kada sam posustajala i dođem do kraja izrade ove disertacije. Moja mentorka je za mene bila i stručna potpora i prijateljski mi naklonjena podrška, na čemu ću joj tokom svih godina koje slede biti uvek zahvalna.

Druga osoba koja zavređuje moju hvalu je dr Jasna Čanadanović-Brunet, docent Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, gospođa koja je izradom svoje disertacije trasirala istraživanja u oblasti kiseonikovih slobodnih radikala kod nas i time u velikoj meri opredelila postavku i tok ove doktorske disertacije. Od srca joj se zahvaljujem za sve stručne savete i drugarsku pomoć pri izvedbi eksperimentalnog dela ove teze.

Dr Stojanu Saviću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, dugujem zahvalnost na svim pruženim savetima, posebno onim vezanim za oblast termičke obrade zrna soje, kojom se već godinama, između ostalog, bavi.

Izrada eksperimentalnog dela teze bila je u startu veliki problem zbog nemogućnosti obezbeđivanja dela hemikalija. Gospodin koga u životu nisam do danas srela i koga ko zna da li ću i sresti, ali koji mi uvek izmami osmeh pri pomisli na njegovo razumevanje, plemenitost, dobrotu i podršku je dr Nenad Kostić, profesor na Iowa State University, USA. Sve što mi je nedostajalo dobila sam na poklon od dr Kostića i biću njegov doživotni dužnik.

Zahvalnost na HPLC hromatografskom određivanju sadržaja izoflavona soje dugujem Anamariji Mandić, diplomiranom inženjeru tehnologije Zavoda za tehnologiju mesa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koja je, zajedno sa Aleksandrom Pavlović, diplomiranim hemičarom, provodila sate u laboratoriji, radeći na iznalaženju optimalnih uslova metode za njihovo određivanje.

Dr Verica Jurić, vanredni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i mr Željko Čupić iz Naučnog instituta za reprodukciju u Temerinu su moje dobre i plemenite kolege, od kojih sam, takođe, dobila pomoć u izradi eksperimentalnog dela teze.

U delu tehničke izvedbe ove publikacije pomogao mi je moj kolega mr Ivan Šefer, asistent na predmetu Koloidna hemija Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, koji je pokazao volju i strpljenje da ovom radu zarad naših prijateljskih odnosa pridodeli lepši izgled.

Izradom crteža strpljivo se pozabavio Branislav Bastaja, tehnički saradnik Odeljenja za organsku hemiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, kome se zahvaljujem na smirenosti sa kojom je prilazio svakoj novoj ispravci ili dopuni.

Moje kolege sa Zavoda za tehnologiju stočne hrane Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu zaslužuju da im se zahvalim, jer su kao ljudi dobre volje i puni razumevanja, često bivali u situaciji da mi pomognu, čineći to bezrezervno i drugarski.



SADRŽAJ

1.0.0. UVOD	1
2.0.0. OPŠTI DEO	2
2.1.0. Štetno delovanje kiseonika	2
2.2.0. Kiseonikovi slobodni radikali	4
2.2.1. Atmosferski (tripletni) kiseonik	4
2.2.2. Aktivni oblici kiseonika	5
2.2.3. Redukovani oblici kiseonika	6
2.2.3.1. <i>Superoksid-anjon-radikali</i>	7
2.2.3.2. <i>Hidroksi-radikali</i>	10
2.3.0. Oksidacija lipida	14
2.3.1. Hemijske i fizičko-hemijske metode ispitivanja oksidacije lipida	23
2.4.0. Antioksidanti	27
2.4.1. Polifenoli kao antioksidanti	35
2.5.0. Soja i punomasna hraniva od soje	40
2.5.1. Izoflavoni soje	44
3.0.0. MATERIJAL I METODE	50
3.1.0. Određivanje kvaliteta zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje	50
3.2.0. Priprema ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje	51
3.2.1. Priprema ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje namenjenih ispitivanjima u model sistemima I i II	51
3.2.2. Priprema ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje namenjenih ispitivanjima u prirodnim sistemima I i II	51
3.3.0. Model sistemi	52
3.3.1. Ispitivanje termičke oksidativne degradacije metil-linoleata (model sistem I)	52
3.3.2. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije metil-linoleata (model sistem II)	52
3.4.0. Prirodni sistemi	53
3.4.1. Ispitivanje termičke oksidativne degradacije sojinog ulja (prirodni sistem I)	53
3.4.2. Ispitivanje katalitičke oksidativne degradacije sojinog ulja (prirodni sistem II)	53
3.5.0. Detekcija kiseonikovih slobodnih radikala u model i prirodnim sistemima	53
3.6.0. Određivanje sadržaja antioksidativnih materija u zrnu soje, punomasnim hranivima od zrna soje i ispitivanim ekstraktima	54
3.6.1. Određivanje sadržaja α -tokoferola	54
3.6.2. Određivanje sadržaja β -karotina i ukupnih ksantofila	55
3.6.3. Određivanje sadržaja genisteina i daidžeina	55
3.6.4. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola	56
3.6.5. Određivanje sadržaja fitinske kiseline	56
3.7.0. Selektivno kvalitativno određivanje izoenzima lipoksigenaza (LOX-1, LOX-2 i LOX-3) u zrnu soje, punomasnim hranivima od zrna soje i heksanskim ekstraktima	57

4.0.0. REZULTATI I DISKUSIJA	59
4.1.0. Kvalitet zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje	59
4.2.0. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u model sistemima I i II	61
4.2.1. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u model sistemu I	62
4.2.2. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje na stvaranje i transformaciju peroksi-radikala u model sistemu I	63
4.2.3. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u model sistemu II	69
4.2.4. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje na stvaranje i transformaciju peroksi-radikala u model sistemu II	71
4.3.0. Analiza antioksidativnog delovanja heksanskih i etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje u model sistemima I i II	76
4.3.1. Analiza antioksidativnog delovanja heksanskih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje u model sistemima I i II	76
4.3.2. Analiza antioksidativnog delovanja etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje u model sistemima I i II	82
4.4.0. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnim sistemima I i II	105
4.4.1. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu I	107
4.4.2. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje na stvaranje i transformaciju peroksi-radikala u prirodnom sistemu I	107
4.4.3. Elektron spin rezonantna spektralna analiza kiseonikovih slobodnih radikala u prirodnom sistemu II	111
4.4.4. Elektron spin rezonantna spektralna analiza uticaja ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje na stvaranje i transformaciju peroksi-radikala u prirodnom sistemu II	112
4.5.0. Analiza antioksidativnog delovanja etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje u prirodnim sistemima I i II	115
5.0.0. ZAKLJUČAK	117
6.0.0. LITERATURA	121
7.0.0. BIOGRAFIJA	140

1.0.0. UVOD

Preduslov brige o zdravlju ljudi i životinja, jedne od dominantnih, pogotovo danas, podrazumeva poznavanje i nova naučna otkrića u hemiji hrane. Interes naučnih istraživača, proizvođača i potrošača prehrambene industrije i industrije stočne hrane orijentisan je u okviru širokog delokrugu aktivnosti i na izučavanje jedne od nepoželjnih reakcija u hemiji hrane – oksidacije lipida.

Proces oksidacije lipida iniciran je u prisustvu molekulskog ili redukovanih oblika kiseonika, a odigrava se po slobodnoradikalском mehanizmu. Kiseonikovi slobodni radikali, kao izuzetno reaktivne oksidativne vrste, detektovane su tokom oksidativne destrukcije polinezasićenih masnih kiselina hrane.

Oksidativne promene lipida hrane, vezane za pojavu sekundarnih proizvoda oksidacije lipida (aldehida, ketona, alkohola, nižih masnih kiselina i drugih jedinjenja), a praćene razvijanjem nesvojstvene boje i neadekvatnog mirisa i ukusa hrane – pojavom užegnuća, rezultiraju nutritivno neispravnim i senzorno neprihvatljivim proizvodom. Reakcija oksidacije lipida odigrava se tokom procesa nabavke sirovina, proizvodnje, distribucije i skladištenja gotovih proizvoda i utiče na njihov kvalitet i održivost.

Inhibiranje oksidacije lipida prehrambenih proizvoda i proizvoda namenjenih ishrani životinja, pogotovo onih sa visokim sadržajima masti ili ulja, vezano je za upotrebu širokog spektra sintetičkih ili prirodnih antioksidanata. Iako su sintetički antioksidanti visokopotencijalni, stabilni i popularni sa ekonomskog aspekta, primat u korišćenju u mnogim zemljama širom sveta poslednjih decenija pripada prirodnim antioksidantima.

Prirodni antioksidativni potencijal soje je jedno od polja istraživanja vezano za supresiju oksidacije lipida soje, pogotovo kada je reč o punomasnim proizvodima od zrna soje namenjenim ishrani ljudi ili životinja. Poznavanje vrsta i količina antioksidativnih materija soje, kao i uticaja procesa prerade na njihove sadržaje, preduslovi su za postizanje visokog nivoa kvaliteta punomasnih proizvoda od zrna soje.

U skladu sa savremenim trendom upotrebe prirodnih antioksidanata ili antioksidativno delotvornih ekstrakata, efikasnih u supresiji oksidacije lipida, cilj ovoga rada je da se ispituju:

- uticaj uparenih ekstrakata (heksanski, etanolni, etil-acetatni) zrna soje i kod nas najčešće korišćenih punomasnih hraniva za ishranu životinja, ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotemički tretiranog zrna soje (HTZS), na termičku i katalitičku oksidaciju metil-linoleata primenom najsavremenije spektroskopske metode, elektron spin rezonantne (ESR) spektroskopije;
- sadržaj nekih antioksidativnih materija (α -tokoferol, β -karotin, ksantofili, izoflavoni soje, fitati) u zrnu soje i ispitivanim punomasnim hranivima, kao i ispitivanim ekstraktima;
- uticaj različitih termičkih tretmana, odnosno procesa prerade na antioksidativni potencijal zrna soje poređenjem antioksidativnih efekata, odnosno sadržaja ispitivanih antioksidanata pojedinih ekstrakata u zrnu soje i ispitivanim hranivima;
- uticaj primene različitih ekstragenasa na antioksidativne efekte ekstrakata neliposolubilnih antioksidanata ispitivanih hraniva tokom termičke i katalitičke oksidacije komercijalnog sojinog ulja primenom ESR.

2.0.0. OPŠTI DEO

2.1.0. ŠTETNO DELOVANJE KISEONIKA

Priča o kiseoniku, ma koliko bila priča o njegovoj jedinstvenosti, u suštini nalikuje na sve one priče o jedinstvu suprotnosti.

Početak priče datira od pre oko dva biliona godina, kada su se sa pojavom kiseonika u atmosferi Zemlje počeli, pored već postojećih anaerobnih organizama, razvijati i aerobi. Koncentracija kiseonika u vazduhu postepeno se povećavala i zavisila od porasta broja fotosintetskih organizama. Paralelno razvoju aerobnih organizama i porastu sadržaja kiseonika u vazduhu odumirao je primitivan oblik života na Zemlji.

Fotosintetska aktivnost biljaka je obezbedila da današnja atmosfera Zemlje sadrži oko 21% kiseonika. On je dominantan elemenat zemljine kore (53.8%). Prisutan je rastvoren u morima, jezerima i rekama, u količini koja zavisi od sadržaja i parcijalnog pritiska kiseonika u atmosferi, temperature vode, njene svežine i drugih faktora. S obzirom da je rastvoran u vodi, prisutan je u svim organizmima. Od izuzetnog je značaja za razmatranja novijeg datuma da je kiseonik sedam do osam puta rastvorljiviji u organskim rastvaračima nego u vodi.

Neopozivi dokaz o jedinstvenosti kiseonika je činjenica da je on neophodan za život svih aerobnih organizama, jer je njegovo postojanje preduslov za biološku oksidaciju kao izvor energije za preživljavanje i aktivnosti aeroba. Međutim, u osamnaestom veku počinju da se stiču osnove za tvrdnju o dvojnosti prirode kiseonika.

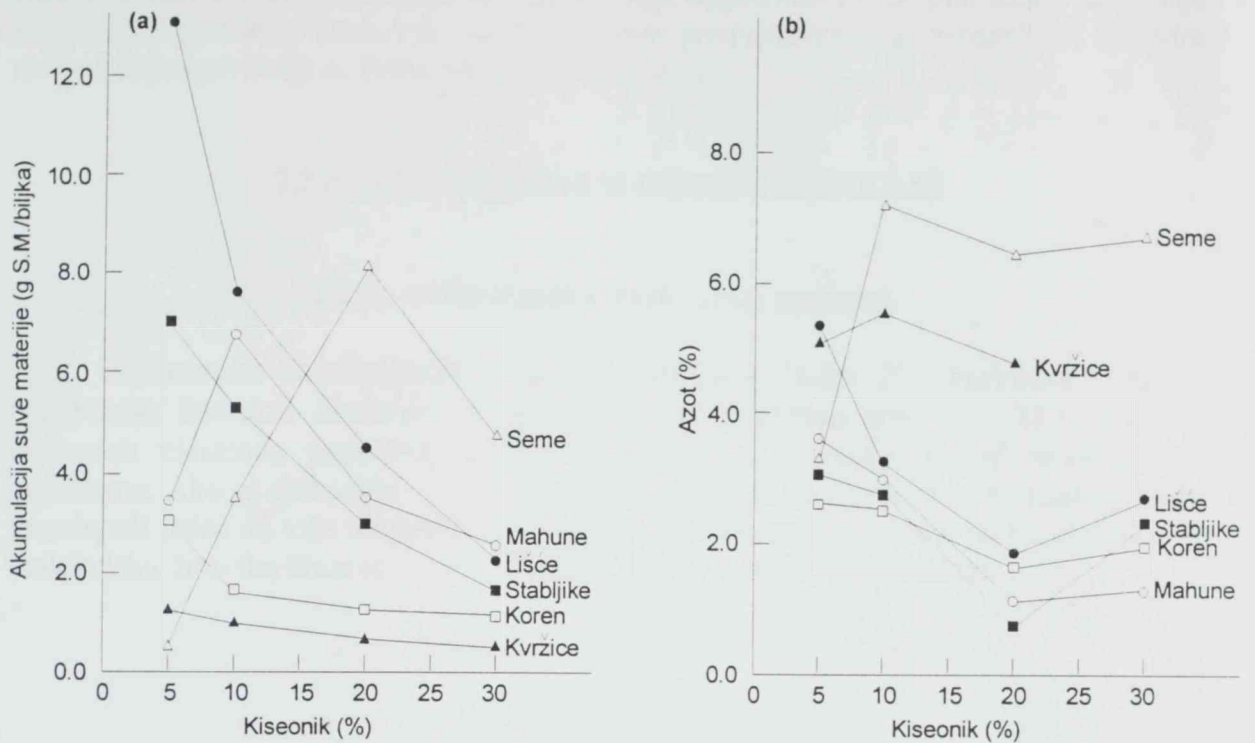
Naučnik Jožef Pristli je tvrdio da prisustvo kiseonika, ma koliko on bio blagotvoran, "ubrzava" život organizama, vodeći gubljenju snage i rezultirajući smrću. Luj Paster je, takođe, opazio da kiseonik sprečava rast nekih aerobnih mikroorganizama.

Saznavanja o prirodi kiseonika intenzivno napreduju tek u XX veku, odnosno poslednjih tri do četiri decenije.

Štetnost i pogubnost kiseonika za anaerobe je posledica oksidacije osnovnih ćelijskih komponenti, odnosno NAD(P)H, tiola, Fe-S proteina, pteridina i drugih jedinjenja. Oksidacija, odnosno inaktiviranje aktivnih centara enzima anaeroba je, takođe, razlog nemogućnosti anaeroba da opstanu u atmosferi kiseonika (Matkovics i sar., 1988). Iako su anaerobi tokom evolucije sa porastom koncentracije kiseonika u atmosferi bili prinuđeni da razvijaju elemente zaštite, koji primarno onemogućavaju prodiranje kiseonika u ćeliju, oni nisu razvili odbrambeni sistem neophodan u zaštiti od štetnog delovanja kiseonika.

Kiseonik je, prisutan u koncentracijama višim od njegovog sadržaja u vazduhu, toksičan za aerobne bakterije, biljke, životinje i ljude. Postoje dokazi da i kiseonik iz vazduha (21%) pokazuje blago štetno dejstvo, koje dolazi do izražaja dugotrajnim izlaganjem (Halliwell, 1985). Tako su, na primer, Quebedeaux i saradnici (1975) ustanovili da akumulacija suve materije i azota kod soje gajene u komorama sa različitim sadržajem kiseonika zavisi od njegovog sadržaja (slika 1).

Kiseonik prisutan u koncentracijama iznad normalne štetno deluje na sve biljne kulture, jer inhibira razvoj hloroplasta, snižava klijavost semena i rast korena, oštećuje membrane i izaziva nabiranje i opadanje listova (Balentine, 1982).



Slika 1. Akumulacija suve materije i azota u različitim delovima soje gajene u komorama sa različitim sadržajem kiseonika

Izlaganje životinja i ljudi dejstvu povišenog pritiska kiseonika ($p > 1\text{atm}$) ili dejstvu čistog kiseonika ($p = 1\text{atm}$) vodi toksifikaciji centralnog nervnog sistema praćenoj konvulzijama (Gilbert, 1981). Fotte (1976) beleži da povišene koncentracije kiseonika izazivaju poremećaj u radu žlezda sa unutrašnjim lučenjem kod životinja i ljudi, dok Mayer i saradnici (1992) navode oštećenja pluća i ishemiju.

Krvarenje, poznato kao retrolentalna fibroplazija, postalo je početkom četrdesetih godina ovoga veka široko rasprostranjeno oboljenje kod nedonoščadi, da bi se 1957. godine uzrok ovog oboljenja doveo u vezu sa visokom koncentracijom kiseonika u inkubatorima za prevremeno rođene bebe (Halliwell, 1994).

Štetno dejstvo kiseonika na aerobne organizme varira u zavisnosti od vrste organizma, dobi, fiziološkog stanja, uslova okoline i ishrane (Halliwell i Gutteridge, 1989).

Toksičnost kiseonika je svojevremeno objašnjavana njegovom sposobnošću da inhibira enzime aeroba. Dokazano je da su konvulzije životinja indukovane kiseonikom u korelaciji sa sniženjem koncentracije neurotransmitera GABA (γ -aminobuterne kiseline), do koje je došlo usled inhibicije enzima glutamat-dekarboksilaze (glutamat \rightarrow GABA + CO_2) kiseonikom (Halliwell i Gutteridge, 1989).

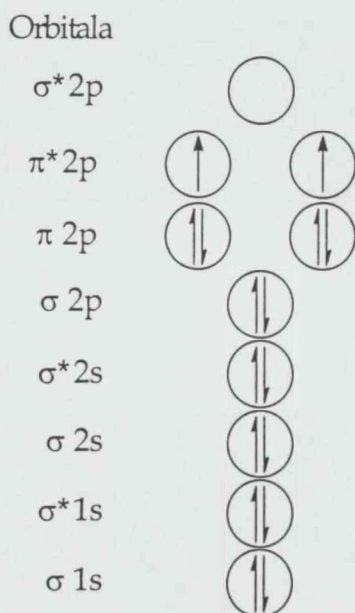
Ilustrovanje direktnog toksičnog efekta kiseonika na aerobe veoma je slikovito u biljnom svetu. Poznato je da biljke u Kalvinovom ciklusu sintetišu šećere iz ugljen-dioksida i vode. Biosintetski put Kalvinovog ciklusa započinje aktivnošću ribuloza-difosfat-karboksilaze, enzima koji omogućava vezivanje ugljen-dioksida i ribuloza-1,5-difosfata. U slučajevima povišene koncentracije ili pritiska kiseonika dolazi do kompetitivne inhibicije ovog enzima, praćene usporenim rastom biljke (Asada, 1977).

Međutim, direktni uticaj kiseonika kod aeroba, s obzirom na sporost inaktivacije enzima i veoma mali broj ugroženih "meta", nije odgovoran za ukupno štetno delovanje kiseonika. Gerschman i saradnici su 1954. godine pretpostavili da su kiseonikovi slobodni radikali najodgovorniji za štetno delovanje kiseonika.

2.2.0. KISEONIKOVI SLOBODNI RADIKALI

2.2.1. ATMOSFERSKI (TRIPLETNI) KISEONIK

Elektronska konfiguracija molekula kiseonika (slika 2) objašnjava njegovu reaktivnost. Molekul kiseonika u osnovnom, najstabilnijem stanju ($^3\Sigma^-O_2$) ima dva nesparena elektrona paralelnih spinova u paralelnim razvezujućim π^* molekulskim orbitalama. Ako se slobodnim radikalom smatra bilo koja čestica koja nezavisno egzistira posedujući jedan ili više nesparenih elektrona, pri čemu svaki zauzima jednu atomsku ili molekulsku orbitalu, onda se molekul kiseonika može smatrati biradikalom.



Slika 2. Elektronska konfiguracija molekula kiseonika u osnovnom (tripletnom) stanju

Kiseonik u osnovnom (tripletnom) stanju mogao bi da oksiduje drugi atom ili molekul akceptirajući dva elektrona, koja bi morala da budu antiparalelnih spinova, kako bi mogla da popune prazan prostor u razvezujućim π^* molekulskim orbitalama kiseonika. Međutim, ovakav zahtev je neostvarljiv, s obzirom da drugi atom ili molekul raspolaže parom elektrona koji, po Paulijevom principu zabrane ili isključenja, ima suprotne spinove. Restrikcija ovakvog elektronskog transfera objašnjava sporu reaktivnost kiseonika sa neradikalima, odnosno njegovu slabu oksidativnu sposobnost (Fotte, 1982). Prevažilaženje spinske restrikcije u direktnim reakcijama kiseonika sa neradikalima je moguće, s obzirom na činjenicu da prelazni metali (izuzev cinka), zahvaljujući njihovim višestrukim valencionim stanjima, mogu da katalizuju oksido-redukzione reakcije. Ova sposobnost prelaznih metala objašnjava njihovo često prisustvo u aktivnim centrima mnogih enzima.

Jednoelektronskom redukcijom tripletnog kiseonika, potpomognutom katalitičkom aktivnošću nekog prelaznog metala, najčešće gvožđa ili bakra, dobija se superoksid-anjon-radikal ($O_2^{\bullet -}$), a dvoelektronskom peroksidni jon (O_2^{2-}).

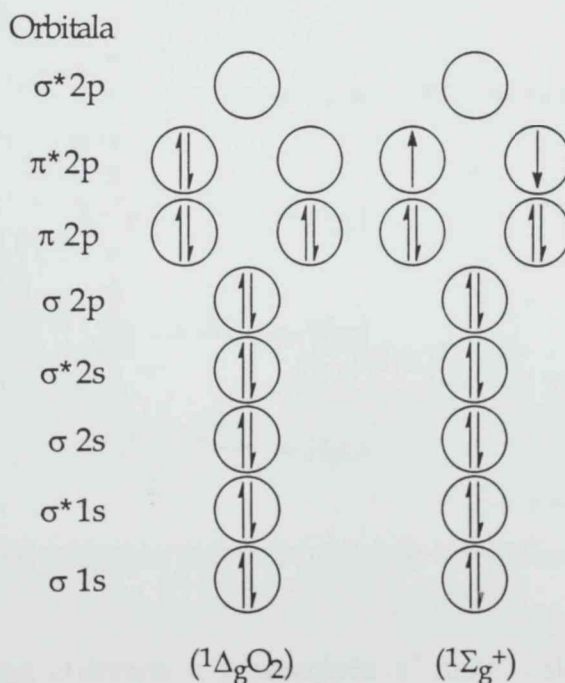
Tripletni kiseonik ($^3\Sigma^-O_2$) može da reaguje sa elementima i jonima dajući okside, dok sa organskim jedinjenjima ne reaguje. Međutim, on izrazito lako reaguje sa slobodnim radikalima molekula, nastalim aktivnošću drugih radikalskih vrsta, radijacijom, dejstvom UV zračenja, zagrevanjem i drugim načinima, pri čemu nastaju peroksi-radikali (Simić i Taylor, 1987).

Ekscitacijom ili redukcijom atmosferskog (tripletnog) kiseonika nastaju izrazito reaktivni molekuli ili kiseonikovi slobodni radikali.

2.2.2. AKTIVNI OBLICI KISEONIKA

Dovođenjem energije atmosferskom kiseoniku ($^3\Sigma^-O_2$) on prelazi u reaktivnije oblike – singletne oblike kiseonika. Njihova povišena reaktivnost u odnosu na atmosferski kiseonik omogućena je ukidanjem spinske restrikcije karakteristične za kiseonik u osnovnom stanju (Wasserman i Murray, 1979).

Postoje dva oblika singletnog kiseonika – $^1\Delta_gO_2$ i $^1\Sigma_gO_2$ (slika 3). $^1\Delta_gO_2$ oblik je na energetski višem nivou od tripletnog kiseonika ($^3\Sigma^-O_2$) za 93.8 kJ, a oblik $^1\Sigma_gO_2$ za 157.0 kJ. Po definiciji slobodnog radikala $^1\Delta_gO_2$ nije radikal, jer ne poseduje nesparene elektrone. $^1\Sigma_gO_2$ je radikal sa visokim sadržajem energije, koja ga čini nestabilnim, pa on brzo i spontano prelazi u energetski stabilniji $^1\Delta_gO_2$, dominantni oblik singletnog kiseonika u biosistemima.



Slika 3. Elektronske konfiguracije singletnih oblika kiseonika

Singletni kiseonik u biosistemima (ali i u laboratorijskim uslovima) nastaje fotohemijским reakcijama (Duran, 1982). Fotosenzitivni molekuli, ozračeni svetlošću određene talasne dužine, prelaze u ekscitirano stanje u kome borave veoma kratko (10^{-6} -

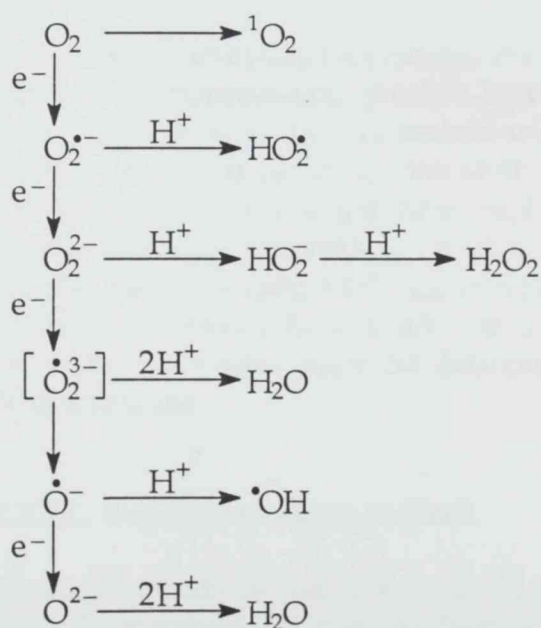
10^{-8} s). Energija ekscitacije se, potom, transferuje na kiseonik, koji iz osnovnog prelazi u singletni oblik, dok se fotosenzitivni molekul vraća u svoje osnovno stanje (Knox i Dodge, 1985). Fotosenzitivni molekuli prisutni *in vivo* su riboflavin, flavin mononukleotid (FMN), flavin adenin dinukleotid (FAD), hlorofil a i b, bilirubin, retinal i drugi, dok se u laboratorijske i druge svrhe (npr. kurativne) koriste boje metilen plavo, bengalsko crveno, psoralen i druga jedinjenja (Pathak i Joshi, 1984; Kwon i Foote, 1988).

Kanofsky i Sima (1991) navode da singletni kiseonik može da nastane i reakcijom ozona sa nekim biomolekulima.

Singletni kiseonik može da reaguje sa drugim molekulima, najčešće dajući endoperokside, hidroperokside ili karbonilna jedinjenja ili da transferuje svoju energiju, uz povratak u osnovno stanje, na neki molekul, koji se pobuđuje. Ovaj transfer je poznat kao "kvenčing" (quenching).

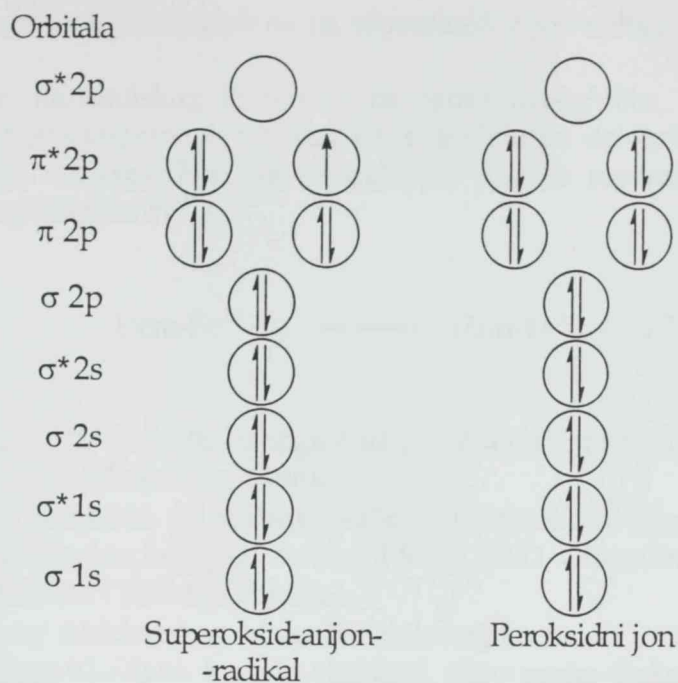
2.2.3. REDUKOVANI OBLICI KISEONIKA

Elektronska konfiguracija molekula kiseonika u osnovnom stanju, odnosno nepopunjenost njegovih razvezujućih π^* molekulskih orbitala, ukazuje da se molekul kiseonika može postepeno redukovati. Proizvodi postepene redukcije molekula kiseonika u osnovnom stanju prikazani su na slici 4.



Slika 4. Proizvodi postepene redukcije molekula kiseonika u osnovnom stanju

Primanjem jednog elektrona u razvezujuću π^* molekulsku orbitalu kiseonika u osnovnom stanju nastaje superoksid-anjon-radikal ($\text{O}_2^{\bullet -}$). Dvoelektronskom redukcijom kiseonika u osnovnom stanju nastaje peroksidni jon (O_2^{2-}), koji u prisustvu H^+ daje vodonik-peroksid, najčešći proizvod dvoelektronske redukcije kiseonika u biološkim sistemima. Peroksidni jon nema nesparene elektrone i nije radikal. Elektronske konfiguracije superoksid-anjon-radikala i peroksidnog jona prikazane su na slici 5.



Slika 5. Elektronske konfiguracije superoksid-anjon-radikala i peroksidnog jona

Postepenom redukcijom molekula kiseonika u osnovnom stanju veza O=O slabi, jer dovođenje dodatnih elektrona zahteva popunjavanje prostora razvezujućih molekulskih orbitala kiseonikovog molekula. Kiseonikovi atomi u superoksid-anjon-radikalu vazani su jednom i po kovalentnom vezom, a kod peroksidnog jona samo jednom kovalentnom vezom. Dalja redukcija zahteva popunjavanje prostora σ^* razvezujuće molekulske orbitale. Proizvod troelektronske redukcije molekula kiseonika je nestabilni hipotetički proizvod O_2^{*3-} , koji se razgrađuje dajući O^{2-} , odnosno vodu, i $O^{\bullet-}$, odnosno hidroksi-radikal ($\bullet OH$). Proizvod četvoroelektronske redukcije molekula kiseonika su dve O^{2-} čestice, koje akceptirajući H^+ , prelaze u vodu, uobičajeni proizvod četvoroelektronske redukcije molekula kiseonika u biološkim sistemima.

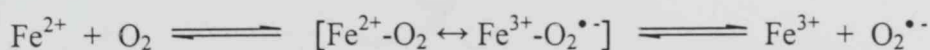
2.2.3.1. Superoksid-anjon-radikali

Nastajanje superoksid-anjon-radikala *in vivo* je moguće na nekoliko načina, a od ključnog je značaja kao preduslov "superoksidne teorije toksičnosti kiseonika", jer se preko superoksid-anjon-radikala, odnosno iz njega stvorenog vodonik-peroksida, Fentonovom ili Haber-Weissovom reakcijom, stvara izuzetno reaktivna i toksična vrsta – hidroksi-radikali.

Superoksid-anjon-radikali nastaju:

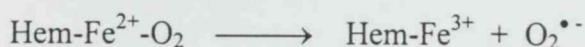
- Redukcijom molekula kiseonika nekim od jona prelaznih metala (Fe, Cu, Mn, Ni, Cr) sa izuzetkom cinka.

Fe^{2+} reaguje sa O_2 na sledeći način:



- Razgradnjom oksihemoglobina na superoksid-anjon-radikal i biološki inaktivan methemoglobin.

Vezivanjem molekuskog kiseonika za deoksihemoglobin, koji sadrži Fe^{2+} u prstenu hema, nastaje oksihemoglobin kod koga je elektron delokalizovan između jona gvožđa i kiseonika. Razlaganjem oksihemoglobina nastaju superoksid-anjon-radikali i neaktivni methemoglobin (sa Fe^{3+}):



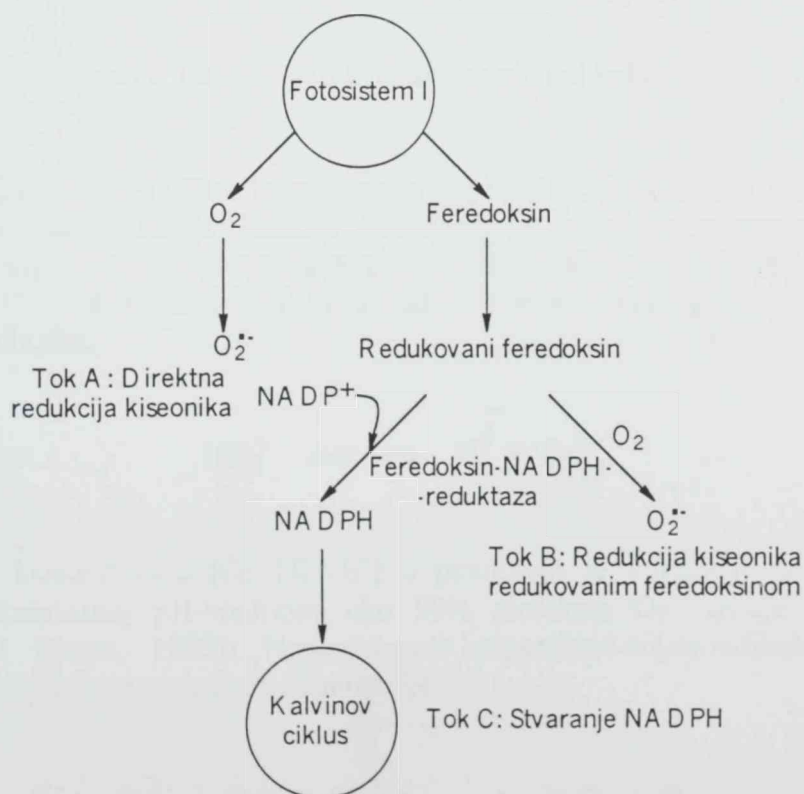
Ustanovljeno je da oko 3% hemoglobina prisutnih u humanim eritrocitima podleže ovoj oksidaciji (Thillet i Michelson, 1986).

- Prenosom elektrona sa biološki važnih molekula na kiseonik (gliceraldehid, redukovani oblik riboflavina i njegovi derivati FMN i FAD, adrenalin, tetrahidropteridini, flavoproteini, flavoenzimi i tiolna jedinjenja).

- Redukcijom molekuskog kiseonika delovanjem nekih enzima ("nespecifična" peroksidaza, celobioza-oksidaža, ksantin-oksidaža, nitropropan-dioksigenaza, indolamin-dioksigenaza, triptofan-dioksigenaza, galaktoza-oksidaža, aldehid-oksidaža) (Fridovich, 1986).

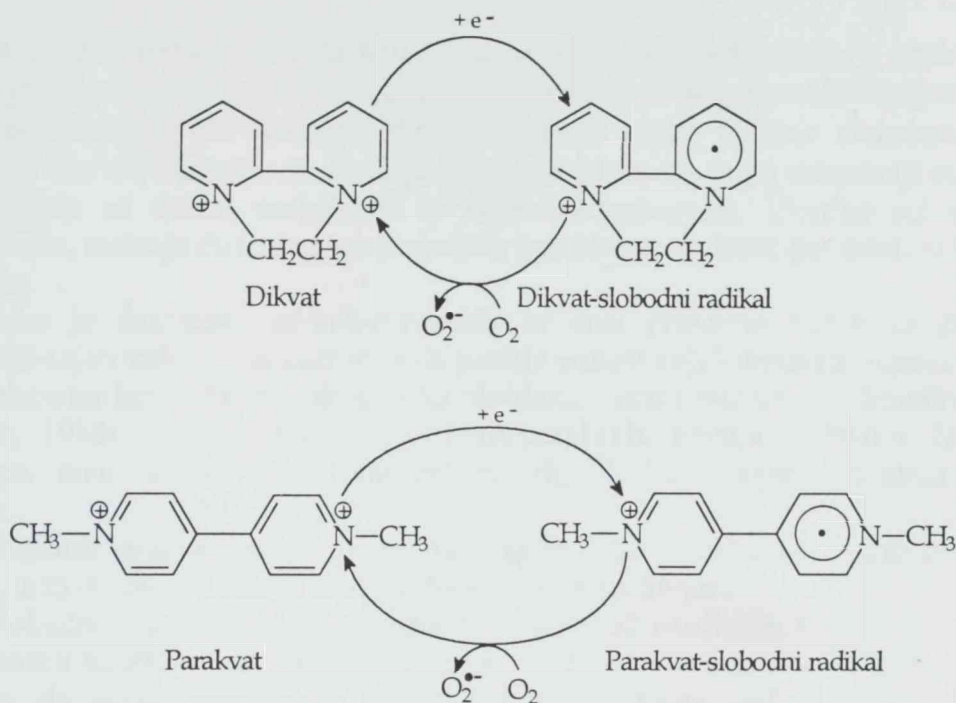
- "Propuštanjem" elektrona nastalih u fotosistemu I na kiseonik (A) ili njegovom redukcijom sa feredoksinom (B) (slika 6; Halliwell i Gutteridge, 1989).

- Aktivnošću citohrom-oksidaža kompleksa u elektronskom transferu u mitohondrijama (Cheeseman i Slater, 1993).



Slika 6. Tok elektrona iz fotosistema I i nastajanje superoksid-anjon-radikala

- "Propuštanjem" elektrona od strane NADPH-citohrom-P-450-reduktaze na kiseonik u endoplazmatičnom retikulumu ćelija jetre (Wislocki i sar., 1980).
- Delovanjem bipiridil herbicida (Rabinowitch i sar., 1987; Štajner i Popović, 1994) (slika 7).
- Pod uticajem vodenog stresa (Gamble i Burke, 1984; Quartacci i Navarizzo, 1992).



Slika 7. Nastajanje dikvat- i parakvat-slobodnih radikala

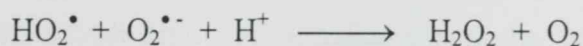
Superoxid-anjon-radikal je stabilan u organskim rastvaračima (ukoliko u njima nema tragova vode), ali je izrazito nestabilan u vodenim rastvorima. Jedna od karakteristika superoksid-anjon-radikala u vodenim rastvorima je da reaguje kao baza, akceptirajući H⁺ i egzistirajući u ravnoteži sa svojom konjugovanom kiselinom – perhidroksi-radikalom:



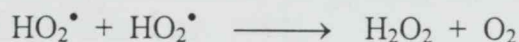
Odnos koncentracija [O₂•⁻]/[HO₂•] u pozitivnoj je korelaciji sa pH-vrednošću sredine. Pri fiziološkoj pH-vrednosti oko 99% molekula O₂•⁻ ostaje neprotonovano (Cheeseman i Slater, 1993). Nepostojanost superoksid-anjon-radikala u vodenim rastvorima objašnjava se reakcijom dizmutacije:



Konstanta brzine ove reakcije, k₁, iznosi 0.3 mol⁻¹dm³s⁻¹, ali za reakciju



konstanta brzine reakcije je $k_2 = 8 \times 10^7 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$, odnosno za reakciju



konstanta brzine reakcije je $k_2 = 8 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$.

Reakcija dizmutacije je favorizovana na nižim pH-vrednostima, s obzirom da se brže odigrava pri višim koncentracijama protonovanog oblika superoksid-anjon-radikala, HO_2^\bullet . Pri fiziološkoj pH-vrednosti zbirna konstanta brzine reakcije dizmutacije iznosi $5 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$. Reakcija dizmutacije je kompetitivna ma kojoj interakciji superoksid-anjon-radikala sa nekim molekulom u vodenim rastvorima. Ukoliko su interakcije minimizirane, reakcija dizmutacije omogućava generisanje vodonik-peroksida u biološkim sistemima.

Iako je nastanak vodonik-peroksida *in vivo* primarno vezan za produkciju superoksid-anjon-radikala, dokazano je da postoje enzimi koji katalizuju njegovo stvaranje – glikolat-oksidaza, D-aminokiselinska-oksidaza, urat-oksidaza i ksantin-oksidaza (Granger, 1988). Izvesne količine vodonik-peroksida nastaju i tokom fotosinteze, fagocitoze, iluminacijom nekih plavozelenih algi ili izlučivanjem od strane mnogih bakterija.

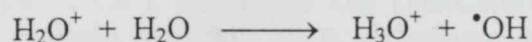
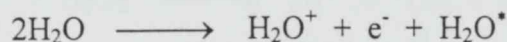
Superoksid-anjon-radikal može da reaguje i kao redukciono i kao oksidaciono sredstvo, u zavisnosti od uslova sredine ili eksperimentalnih uslova.

Toksičnost superoksid-anjon-radikala i perhidroksi-radikala, s obzirom na njihovu nestabilnost u vodenim rastvorima, nije znatna, mada ne i zanemariva. Tako je, na primer, dokazano da protonovani oblik superoksid-anjon-radikala (HO_2^\bullet) može da inicira oksidaciju masnih kiselina (Aikens i Dix, 1991), kao i da sporo reaguje sa glutationom uz nastajanje serije slobodnoradikaliskih vrsta (GS^\bullet , GSO_2^\bullet , GSO^\bullet) i singletnog oblika kiseonika (Wefers i Sies, 1983).

2.2.3.2. Hidroksi-radikali

Nastajanje hidroksi-radikala, $^\bullet\text{OH}$, jedne od najreaktivnijih radikaliskih vrsta, moguće je na više načina.

- Voda, kao dominantna komponenta svake ćelije, omogućava da se izlaganjem ćelije dejstvu jonizujućeg zračenja (X-zraci ili γ -zraci) stvaraju hidroksi-radikali. Mehanizam njihovog nastanka je sledeći:



gde je:

e^- - elektron,

$\text{H}_2\text{O}^\bullet$ - ekscitirani molekul vode.

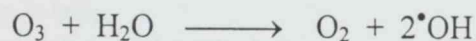
Hidroksi-radikali nastali dejstvom jonizujućeg zračenja na ćeliju štetno deluju na DNK i ćelijske membrane (Scholes, 1983; Imlay i Linn, 1988).

Jonizujuće zračenje dovodi do stvaranja hidroksi-radikala po gore navedenom mehanizmu i u prehrambenim proizvodima, jer je voda veoma često jedan od njihovih dominantnih konstituenata (Voisine i sar., 1991).

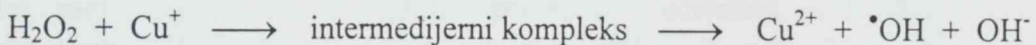
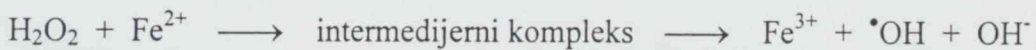
- Homolitičko raskidanje O-O veze u molekulu vodonik-peroksida izazvano dejstvom toplote, UV ili jonizujućeg zračenja, kao i dejstvom polutanata, vodi, takođe, stvaranju hidroksi-radikala (Morgan i sar., 1988; Bowler i sar., 1992).

- Ultrazvučno tretiranje vodenih rastvora, litotripsija (tehnika ekstrakorporalnog razbijanja kamena u bubregu) i liofilizacija su postupci pri kojima je utvrđeno nastajanje hidroksi-radikala (Halliwell, 1994).

- Reakcijom ozona i vode, favorizovanoj u alkalnoj sredini, nastaju hidroksi-radikali (Hoigne i Bader, 1975):



- Nastajanje vodonik-peroksida u mnogim ćelijama aeroba predstavlja preduslov za stvaranje hidroksi-radikala *in vivo*. Vodonik-peroksid, nastao primarno iz superoksid-anjon-radikala, reaguje sa jonima prelaznih metala (najčešće Fe^{2+} i Cu^+) dajući hidroksi-radikale – Fentonova reakcija:

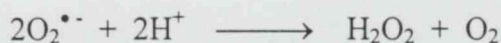


Smatra se da u toku Fentonove reakcije nastaje međuproizvod – feril, FeOH^{3+} ili FeO^{2+} (Burkitt, 1993).

- Vodonik-peroksid može da reaguje i sa superoksid-anjon-radikalima dajući hidroksi-radikale – Haber-Weissova reakcija:



Ovu reakciju katalizuje prisustvo Fe^{3+} , te je, uzimajući to u obzir, mehanizam Haber-Weissove reakcije:



Tokom Haber-Weissove reakcije formira se prelazni kompleks, perferil, $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^{\cdot-} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$.

Prelazni metali (Fe^{2+} i Cu^+), neophodni kao katalizatori u reakcijama stvaranja kiseonikovih slobodnih radikala, prisutni su u slobodnom stanju u veoma malim koncentracijama *in vivo* (< 5 μmol).

Gvožđe se u organizmu nalazi u sastavu hemoglobina (2/3 od ukupno prisutnog), mioglobina, nekih enzima i transportnih proteina transferina i laktoferina ili, pak, skladišteno u feritinu i hemosiderinu (Crichton i Charloteaux-Waters, 1987).

Gvožđe vezano u proteinima, ali i ono iz laktoferina, transferina i feritina, ne može da posluži kao katalizator za Fentonovu reakciju pri normalnom statusu organizma (Aruoma i Halliwell, 1987). Međutim, ako se na bilo koji način, u uslovima narušene ravnoteže u organizmu, pojavi slobodno gvožđe, oslobođeno iz proteina, ono će biti katalizator reakcija nastajanja hidroksi-radikala, i to najčešće na lokaciji koja je bliska mestu njegovog oslobađanja iz proteina (Cheeseman i Slater, 1993). Tako će se, na primer, iz transferina oslobađati gvožđe pri acidifikaciji sredine i u prisustvu molekula pogodnih za građenje helata (ATP, ADP i dr.), dok će se iz feritina u prisustvu redukcionih sredstava (askorbinska kiselina i superoksid-anjon-radikali) oslobađati Fe^{2+} (Halliwell i Gutteridge, 1986; Gutteridge i Halliwell, 1987).

Vezivanje gvožđa u hem i proteine koji sadrže gvožđe odigrava se u mitohondrijama, u kojima, najverovatnije, postoje "bazeni" za "neproteinski-vezano-gvožđe". Smatra se da su takvi "bazeni" mesta na kojima se oslobađa gvožđe koje potom, vezano u helate sa nižemolekulskim jedinjenjima, postaje pogodno za reakcije stvaranja kiseonikovih slobodnih radikala *in vivo*.

Halliwell i Gutteridge (1984) su dokazali da kompleksi gvožđa sa nižemolekulskim jedinjenjima reaguju sa vodonik-peroksidom *in vitro*, pri čemu nastaju hidoksi-radikali.

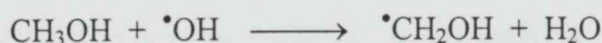
Bakar, takođe katalizator u Fentonovoj reakciji, u organizmu egzistira vezan za aminokiseline (histidin) i peptide (albumin i druge) ili skladišten u ceruloplazminu. "Ceruloplazmin-vezani bakar" ne može da katalizuje radikalske reakcije, ali bakar vezan za albumin ili histidin reaguje sa vodonik-peroksidom katalizujući ih (Halliwell i Gutteridge, 1990).

Hidroksi-radikal je jedna od najreaktivnijih hemijskih vrsta, koja reaguje sa mnogim molekulima u biološkim ili prirodnim sistemima – lipidima, šećerima, aminokiselinama, nukleotidima, organskim kiselinama i drugim prirodnim jedinjenjima (Halliwell i Gutteridge, 1984). Iako je broj molekulskih vrsta koje hidroksi-radikali mogu da napadnu i oštete velik, do danas se najviše pažnje poklanjalo izučavanju napada ovih radikala na lipide, čime se inicira oksidacija lipida (Halliwell i Chirico, 1993), kao i proteine (Stadtman i Oliver, 1991; Davies i sar., 1993) i DNK (Kasai i Nishimura, 1991; Halliwell i Aruoma, 1993).

Pregled konstanti brzine hemijskih reakcija hidroksi-radikala i širokog spektra organskih jedinjenja ukazuje na njegovu izrazitu reaktivnost (tabela 1; Halliwell i Gutteridge, 1989).

Načini reagovanja hidroksi-radikala sa gore navedenim molekulima mogu se klasifikovati u tri osnovna tipa reakcija (Willson, 1978):

- izdvajanje vodonika, na primer, reakcija hidroksi-radikala sa alkoholima:



- adicija, na primer, na aromatični prsten purinskih i pirimidinskih baza DNK:

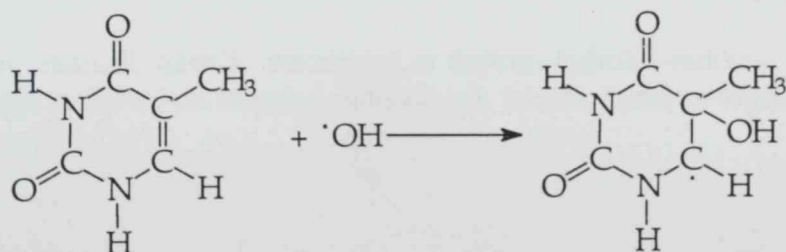
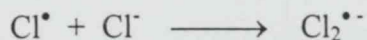


Tabela 1. Konstante brzine reakcija hidroksi-radikala i nekih organskih jedinjenja u vodenom rastvoru

Jedinjenje	pH	Konstanta brzine reakcije (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)	Jedinjenje	pH	Konstanta brzine reakcije (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)
Karbonatni jon	10.7	2.0x10 ⁸	Glicil-glicin	2.0	7.8x10 ⁷
Bikarbonatni jon	6.5	1.0x10 ⁷	Glicil-tirozin	2.0	5.6x10 ⁹
Fe(II)-jon	2.1	2.5x10 ⁸	Guanin	-	1.0x10 ¹⁰
H ₂ O ₂	7.0	4.5x10 ⁷	Hemoglobin	-	3.6x10 ¹⁰
Adenin	7.4	3.0x10 ⁹	Histidin	6.5	3.0x10 ⁹
Adenozin	7.7	2.5x10 ⁹	Hidroksiprolin	2.0	2.1x10 ⁸
AMP	5.4	1.8x10 ⁹	Laktatni jon	9.0	4.8x10 ⁹
Arginin	7.0	2.1x10 ⁹	Lecitin	-	5.0x10 ⁸
Askorbinska kis.	1.0	7.2x10 ⁹	Manitol	7.0	2.7x10 ⁹
Benzen	7.0	3.2x10 ⁹	Metanol	7.0	4.7x10 ⁸
Benzoeva kis.	3.0	4.3x10 ⁹	Metionin	7.0	5.1x10 ⁹
Butan-1-ol	7.0	2.2x10 ⁹	Nikotinska kis.	-	6.3x10 ⁸
Katalaza	-	2.6x10 ¹¹	Fenol	7.0	4.2x10 ⁹
Limunska kis.	1.0	3.0x10 ⁷	Fenilalanin	6.0	3.5x10 ⁹
Cistein	1.0	7.9x10 ⁹	Propan-1-ol	7.0	1.5x10 ⁹
Cistin	2.0	3.2x10 ⁹	Piridoksal-fosfat	-	1.6x10 ⁹
Citidin	2.0	2.0x10 ⁹	Ribonukleaza	-	1.9x10 ¹⁰
Citozin	7.0	2.9x10 ⁹	Riboza	7.0	1.2x10 ⁹
Deoksiguanilna kis.	7.0	4.1x10 ⁹	Serum albumin	-	2.3x10 ¹⁰
Deoksiriboza	7.4	3.1x10 ⁹	Tiourea	7.0	4.7x10 ⁹
Etanol	7.0	7.2x10 ⁸	Timin	7.0	3.1x10 ⁹
Glukoza	7.0	1.0x10 ⁹	Triptofan	6.0	8.5x10 ⁹
Glutaminska kis.	2.0	7.9x10 ⁷	Uracil	7.0	3.1x10 ⁹
Glutation	1.0	8.8x10 ⁹	Urea	9.0	<7.0x10 ⁵

- prenos elektrona u reakcijama sa organskim i neorganskim jedinjenjima, na primer, sa hloridnim jonom:



Slobodni radikali nastali reakcijama u kojima hidroksi-radikali uzimaju učešća najčešće su manje reaktivni od hidroksi-radikala, ali, takođe, štetni za organizme.

2.3.0. OKSIDACIJA LIPIDA

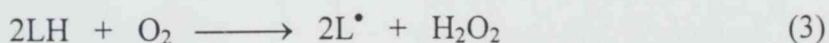
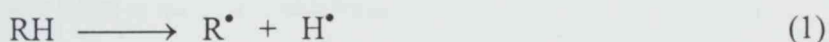
Kiseonikovi slobodni radikali reaguju sa širokim spektrom biomolekula, izazivajući na njima promene, odnosno oštećenja. Reagujući sa lipidima, oni izazivaju oksidativnu destrukciju nezasićenih, odnosno polinezasićenih masnih kiselina, poznatu kao proces oksidacije lipida (Cheeseman, 1993). Ovom procesu podležu kako lipidi u biosistemima, tako i lipidi kao konstituenti hrane. Osetljivost lipida na delovanje kiseonikovih slobodnih radikala posledica je niskih energija alilnih C-H veza nezasićenih masnih kiselina, odnosno bis-alilnih C-H veza polinezasićenih masnih kiselina.

Oksidacija lipida na ćelijskom nivou vodi direktnom oštećenju strukture ćelijskih membrana, uz indirektna oštećenja ostalih ćelijskih komponenti, prouzrokovana reaktivnošću sekundarnih proizvoda ove reakcije, aldehida (Cheeseman i Slater, 1993). Oštećenja ćelijskih membrana podrazumevaju oslabljenost membranske funkcije, promenu fluiditeta, inaktivaciju za membranu vezanih receptora i enzima, kao i porast nespecifične propustljivosti membrana za jone kao što je, na primer, Ca^{2+} (Burton i Ingold, 1989). Oksidacija lipida je odgovorna za oštećenja mnogih tkiva i razvijanje nekih bolesti. Tako je, na primer, akumulacija "pigmenata starenja" u tkivima dokaz da postoje oštećenja izazvana oksidacijom lipida (Halliwell i Gutteridge, 1989), dok široko izučavana patogeneza ateroskleroze ukazuje na značajno učešće oksidacije lipida u razvijanju ove bolesti (Esterbauer i sar., 1992).

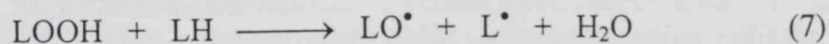
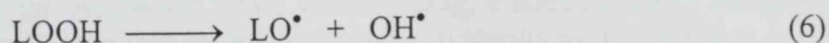
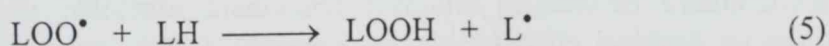
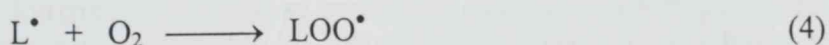
Oksidacija lipida je jedna od najviše izučavanih reakcija u hemiji hrane. Oksidativne promene lipida hrane, koje su praćene razvijanjem nesvojtvene boje i neadekvatnog mirisa i ukusa hrane – pojavom užegnuća, rezultiraju nutritivno neispravnim i senzorno neprihvatljivim proizvodom. Lipidi hrane podležu oksidaciji tokom nabavke sirovina, proizvodnje, distribucije i skladištenja proizvoda (Namiki, 1990).

Oksidacija lipida je lančana reakcija (Yanishlieva i Marinova, 1998):

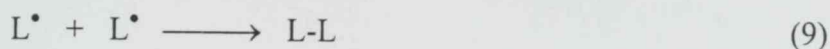
I Faza: Inicijacija



II Faza: Propagacija



III Faza: Terminacija

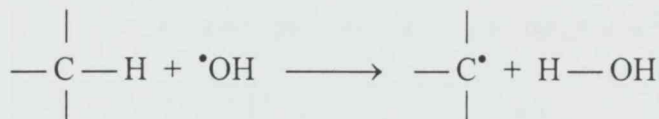


Prva faza oksidacije lipida naziva se **inicijacija**. Tokom ove faze dolazi do eliminacije vodonikovog atoma iz metilenske grupe molekula nezasićene masne kiseline od strane inicijatora, oksidujućeg radikala (R^{\bullet}) (reakcija 2). Jačina C-H veze u metilenskoj grupi polinezasićene masne kiseline uslovljava mesto napada radikala-inicijatora. S obzirom da je C-H veza u bis-alilnom položaju polinezasićene masne kiseline najslabija (314 kJ/mol), najverovatnije je da će upravo ona podleći eliminaciji vodonikovog atoma, mada ni druge metilenske grupe ne moraju biti izuzete (Simić i Taylor, 1987). Ukoliko se oksidacija lipida odigrava samo u prisustvu kiseonika naziva se autooksidacija (reakcija 3).

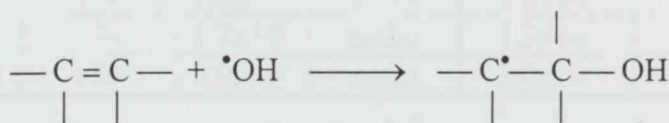
Hidroksi-radikali su jedan od najmoćnijih inicijatora oksidacije lipida (Halliwell i Chirico, 1993).

Oksidacija lipida se može inicirati hidroksi-radikalima mehanizmom:

- eliminacije H-atoma iz C-H veze



- adicije na dvostruku vezu

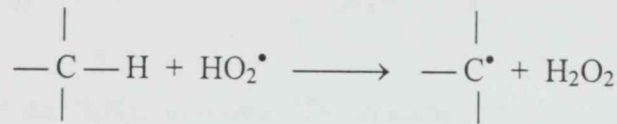


Hidroksi-radikali nastali Fentonovom reakcijom mogu inicirati oksidaciju lipida (Halliwell i Gutteridge, 1990; Halliwell i Chirico, 1993).

Homolitička fisija vode, izazvana jonizujućim zračenjem, rezultira, takođe, stvaranjem hidroksi-radikala, koji iniciraju oksidaciju lipida (Von Sonntag, 1987; Stark, 1991). Jonizujuće zračenje se poslednjih godina koristi za postizanje povećane održivosti prehrambenih proizvoda, ali se, paralelno postignutoj održivosti, u tretiranoj hrani registruju oštećenja membrana izazvana prisustvom kiseonikovih slobodnih radikala (Voisine i sar., 1991). Grüner i saradnici (1992) ispitivali su uticaj doze γ -zračenja (1-5 kGy) na oksidaciju lipida punomasnog, obezmašćenog i lecitiniranog sojinog brašna i ustanovili da je stepen oksidacije lipida u pozitivnoj korelaciji sa dozom zračenja.

Superoksid-anjon-radikali su veoma slabo reaktivni kao inicijatori oksidacije lipida (Halliwell, 1994). Protonovani oblik superoksid-anjon-radikala, perhidroksi-radikal

(HO₂[•]), može da inicira oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (Bielski i sar., 1983; Aikens i Dix, 1991):



Međutim, pri fiziološkoj pH-vrednosti sredine koncentracija perhidroksi-radikala je veoma niska, tako da nema direktnih dokaza o iniciranju oksidacije lipida perhidroksi-radikalima *in vivo*. Verovatnije je da perhidroksi-radikali, stupajući u reakciju sa već stvorenim hidro-peroksidima (LOOH) i dekomponujući ih, stimulišu oksidaciju lipida (Aikens i Dix, 1991):



Reaktivnost nekih kiseonikovih slobodnih radikala u fazi iniciranja oksidacije lipida može se sagledati iz podataka prikazanih u tabeli 2 (Simić i sar., 1992).

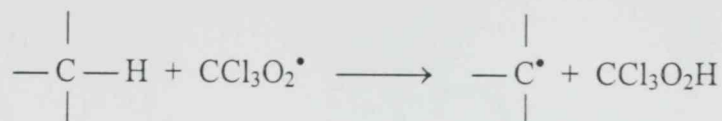
Tabela 2. Konstante brzine reakcije masnih kiselina i kiseonikovih slobodnih radikala na sobnoj temperaturi

Masna kiselina	Konstanta brzine reakcije (mol ⁻¹ dm ³ s ⁻¹)				
	LOO [•]	•O ₂ H	O ₂ ^{•-}	LO [•]	•OH
Stearinska kiselina	10 ⁻³ -10 ⁻⁴	niska	niska	2.3x10 ⁶	10 ⁹
Oleinska kiselina	0.1-1	niska	niska	3.3x10 ⁶	10 ⁹
Linolna kiselina	60	1.2x10 ³	niska	8.8x10 ⁶	9.0x10 ⁹
Linolenska kiselina	120	1.7x10 ³	niska	1.3x10 ⁷	7.3x10 ⁹
Arahidonska kiselina	180	3.0x10 ³	niska	2.0x10 ⁷	10 ¹⁰

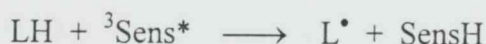
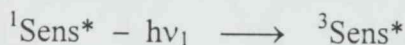
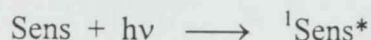
Istraživanja uticaja nekih halogenovanih ugljovodonika, kao, na primer, ugljentetra-hlorida, na oksidaciju lipida, potvrdila su da oni mogu da iniciraju proces oksidativne degradacije ćelijskih membrana jetre *in vivo* (Recknagel i sar., 1989). Mehanizam iniciranja oksidacije lipida u jetri podrazumeva metabolisanje CCl₄ citohrom P-450 sistemom do trihlormetil-radikala (CCl₃[•]), koji reaguje sa kiseonikom stvarajući peroksi-radikal:



Nastali trihlormetil-peroksi-radikal (CCl₃O₂[•]) može da eliminiše H-atom iz C-H veze nezasićene masne kiseline i tako inicira oksidaciju lipida:



Fotooksidacija lipida (LH), odnosno UV zračenje, inicira stvaranje slobodnih radikala (Hamilton i sar., 1997):



gde je:

Sens - fotosenzitivni molekul,

${}^1\text{Sens}^*$ - singletni oblik Sens,

${}^3\text{Sens}^*$ - tripletni oblik Sens.

Relativne konstante brzine oksidacije nekih masnih kiselina u reakcijama autooksidacije i fotooksidacije prikazane su u tabeli 3 (Gunstone, 1984).

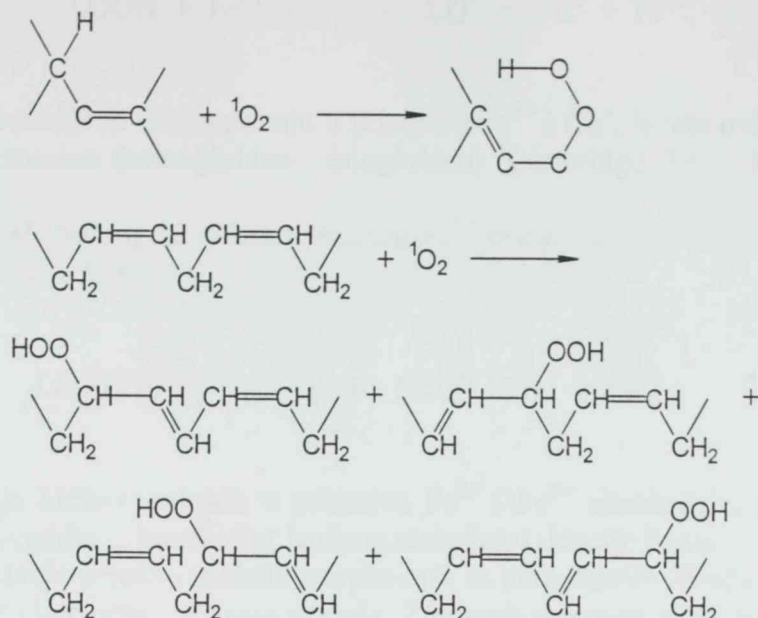
Tabela 3. Relativne konstante brzine oksidacije nekih masnih kiselina u reakcijama autooksidacije i fotooksidacije

Masna kiselina	Konstanta brzine reakcije ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$)	
	Autooksidacija	Fotooksidacija
Oleinska kiselina	1	30×10^3
Linolna kiselina	27	40×10^3
Linolenska kiselina	77	70×10^3

Druga faza oksidacije lipida, **propagacija**, podrazumeva reakciju alkil-radikala (L^\bullet), nastalih eliminacijom H-atoma iz bočnog lanca nezasićene masne kiseline lipida, sa nesparenim elektronom na C-atomu, sa kiseonikom, pri čemu nastaju peroksi-radikali (LOO^\bullet) (reakcija 4).

Peroksi-radikali omogućavaju odigravanje lančane reakcije oksidacije lipida oduzimanjem H-atoma iz susednih bočnih lanaca nezasićenih masnih kiselina. Na takav način se peroksi-radikali stabilizuju, gradeći hidro-peroksidi (LOOH), dok iz polazne supstance nastaju novi alkil-radikali (reakcija 5).

Hidro-peroksidi mogu da nastanu i reakcijom 1,2- ili 1,4-adicije singletnog oblika kiseonika na dvostuke $\text{C}=\text{C}$ veze polinezasićenih masnih kiselina (slika 8; Namiki, 1990).



Slika 8. Reakcije adicije singletnih oblika kiseonika na dvostruke C=C veze polinezasićenih masnih kiselina

Konstante brzine reakcije masnih kiselina sa singletnim oblicima kiseonika prikazane su u tabeli 4 (Simić i sar., 1992).

Tabela 4. Konstante brzine reakcije masnih kiselina sa singletnim oblicima kiseonika

Masna kiselina	Konstanta brzine reakcije ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$)
Oleinska kiselina	0.74×10^5
Linolna kiselina	1.3×10^5
Linolenska kiselina	1.9×10^5
Arahidonska kiselina	2.4×10^5

Ako se ima u vidu da stvaranje hidro-peroksida adicijom singletnog kiseonika na nezasićene masne kiseline ne inicira lančanu reakciju, a da, uz to, generisanje singletnih oblika kiseonika zahteva fotoekscitaciju nekih biomolekula, nije realno očekivati da ovakav način generisanja hidro-peroksida bude od značaja u biosistemima (Wasserman i Murray, 1979). Međutim, hrana koja sadrži gvožđe vezano za hem ili hlorofile, a izložena je svetlosti, može da podlegne u većoj meri oksidaciji lipida nastajanjem hidro-peroksida na opisani način.

Hidro-peroksidi, kao primarni proizvodi oksidacije lipida, podležu daljim reakcijama, pri čemu neke od njih vode stvaranju novih slobodnoradikalnih vrsta, dok druge rezultiraju nastajanjem niza sekundarnih proizvoda oksidacije lipida.

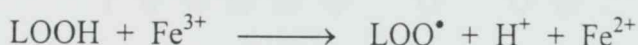
Nastajanje alkoksi-radikala (LO^\bullet) tokom propagacije oksidacije lipida odigrava se reakcijama 6, 7 i 8.

Prisustvo jona teških metala stimuliše razgradnju hidro-peroksida, odnosno oni deluju prooksidativno (Gutteridge, 1988; Halliwell i Gutteridge, 1990). Reakcija hidro-peroksida i Fe^{2+} vodi stvaranju alkoksi-radikala:



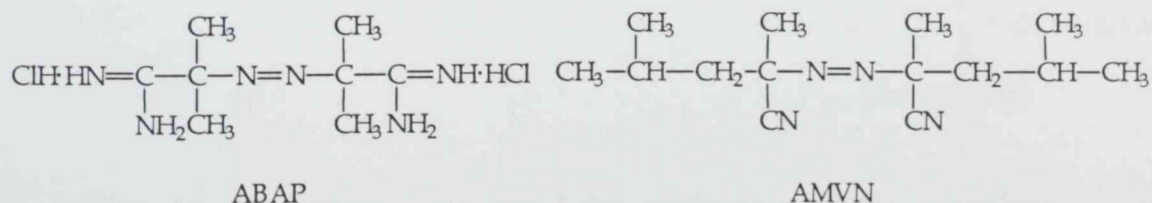
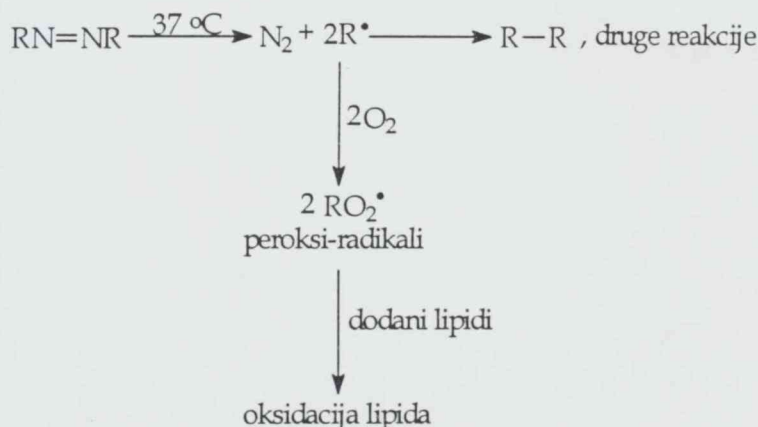
Hidro-peroksidi se dekomponuju u prisustvu Fe^{2+} i Cu^+ , helata ovih metala, hema, kao i nekih Fe-proteina (hemoglobina i mioglobina) (Gutteridge, 1988; Kim i Sevanian, 1991).

Prisustvo slobodnog ili helatno vezanog Fe^{3+} deluje, takođe, prooksidativno u fazi propagacije oksidacije lipida:



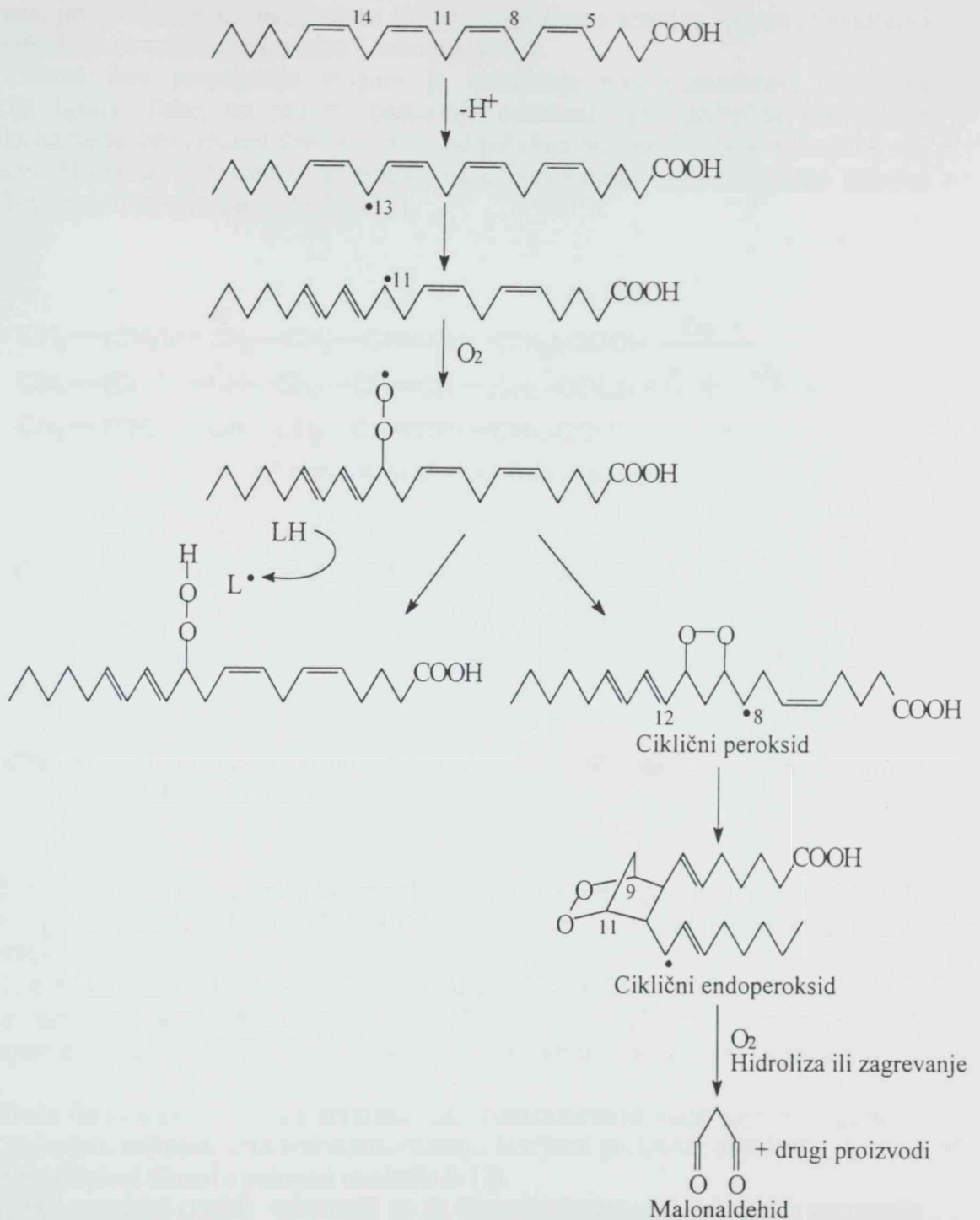
Razgradnja hidro-peroksida u prisustvu Fe^{2+} i Fe^{3+} obezbeđuje, preko dobijenih alkoksi- i peroksi-radikala, kontinuitet lančane reakcije oksidacije lipida.

Za generisanje peroksi-radikala neophodnih za stimulisanje oksidacije lipida mogu se koristiti i azo-inicijatori. Azo-jedinjenja 2,2'-azobis(2-amidinopropan)-dihidrohlorid (ABAP) i liposolubilni 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) termalnom dekompozicijom na temperaturi 37°C formiraju alkil-radikale, koji reaguju sa kiseonikom stvarajući peroksi-radikale azo-inicijatora (Yamauchi i sar., 1993). Mehanizam ove reakcije prikazan je na slici 9.



Slika 9. Razgradnja ABAP i AMVN i stvaranje peroksi-radikala azo-inicijatora

Paralelno građenju hidro-peroksida, pri višim temperaturama, pogotovo u slučaju arahidonske kiseline, intramolekulskom adicijom peroksi-radikala na susednu dvostruku $\text{C}=\text{C}$ vezu, nastaju ciklični peroksidi (Porter, 1990). Mehanizam nastajanja hidro-peroksida i cikličnih peroksida tokom oksidacije arahidonske kiseline prikazan je na slici 10.

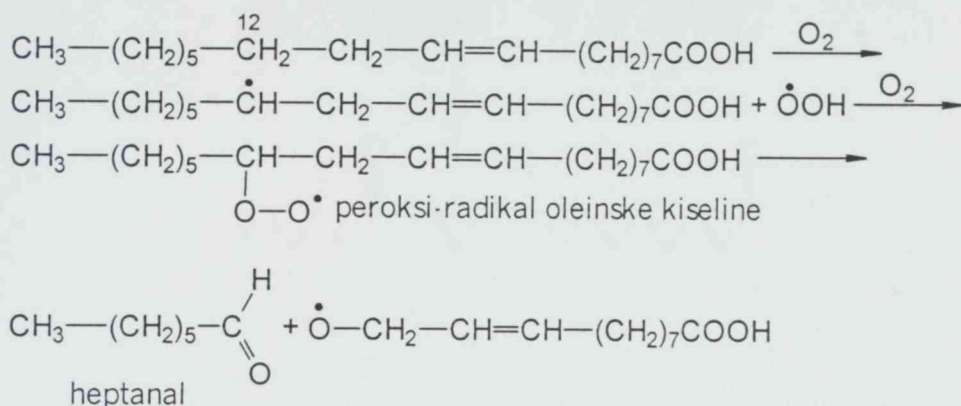


Slika 10. Mehanizam nastajanja hidro-peroksida i cikličnih peroksida tokom oksidacije arahidonske kiseline

Razgradnjom cikličnih peroksida, odnosno hidroperoksi-epidioksida i biciklo-endoperoksida, nastaje malonaldehid, sekundarni proizvod oksidacije lipida. Generisanje malonaldehida tokom oksidacije lipida predstavlja osnovu često primenjivanog TBA testa, kojim se određuje stepen oksidacije lipida u biološkim i prirodnim sistemima (Guillén-Sans i Guzmán-Chozas, 1998). Malonaldehid je odgovoran za oštećenja proteina ćelijskih

membrana, jer omogućava, interakcijom sa amino-grupama proteina, intramolekulska i intermolekulska umrežavanje proteina (Aubourg, 1993).

Tokom faze propagacije moguće je formiranje niza sekundarnih proizvoda oksidacije lipida. Tako, na primer, nastajanje određene vrste aldehida delovanjem kiseonika na nezasićenu masnu kiselinu zavisi od položaja metilenske grupe iz koje se vrši eliminacija H-atoma. Delovanjem kiseonika na C₁₂-metilensku grupu oleinske kiseline nastaje heptanal i slobodni radikal (slika 11).



Slika 11. Nastajanje heptanala delovanjem kiseonika na C₁₂-metilensku grupu oleinske kiseline

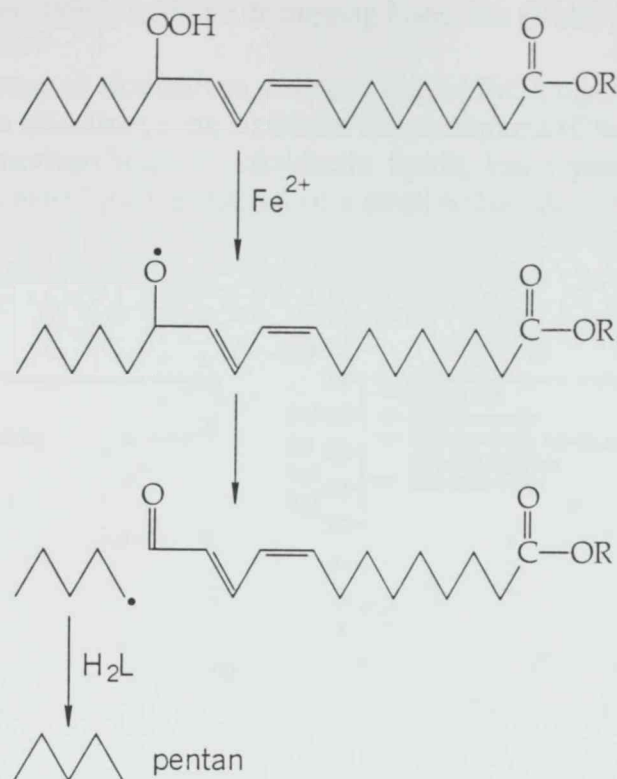
Razgradnjom hidro-peroksida nastaju mnogi aldehidi, posebno klasa hidroksi-alkenala, čiji je predstavnik citotoksični 4-hidroksi-2-*trans*-nonenal (Esterbauer i sar., 1988; 1991).

Tokom oksidacije linolne kiseline, pored drugih sporednih proizvoda, moguće je stvaranje pentana (Simić i Taylor, 1987). Mehanizam reakcije nastanka pentana razgradnjom hidro-peroksida linolne kiseline na C₁₃-atomu u prisustvu Fe²⁺ prikazan je na slici 12.

Treća faza oksidacije lipida, **terminacija**, podrazumeva reakcije koje se odigravaju između slobodnih radikala. Tim reakcijama nastaju tercijarni proizvodi oksidacije lipida – stabilni i nereaktivni dimeri i polimeri (reakcije 9-12).

Kim i saradnici (1996) ustanovili su da dimerne strukture oksidacionih proizvoda nastalih u završnoj, terminacionoj, fazi termičke oksidacije metil-linoleata karakteriše peroksidna veza ukoliko je oksidacija vršena na nižim temperaturama (60-90 °C), dok se pri višim temperaturama (120-150 °C) stvaraju dimeri sa etarskom ili C-C vezom.

Oksidacija lipida hrane je jedan od najvećih problema tokom proizvodnje, skladištenja i distribucije prehrambenih proizvoda. Podložnost lipida hrane oksidativnim promenama primarno zavisi od sastava lipida, odnosno hemijske strukture masnih kiselina (stepena nezasićenosti) i njihovog sadržaja. Viši sadržaji polinezasićenih masnih kiselina u hrani utiču na njenu podložnost oksidaciji lipida, uz brže i intenzivnije razvijanje sekundarnih, potencijalno toksičnih proizvoda oksidacije (Frankel, 1991).



Slika 12. Mehanizam nastanka pentana oksidacijom hidro-peroksida linolne kiseline

Komercijalna biljna ulja su različito podložna oksidaciji lipida, upravo zbog njihove različitosti u sastavu masnih kiselina (tabela 5; Chu i Kung, 1998).

Tabela 5. Sadržaj masnih kiselina i indeks stabilnosti nekih biljnih ulja

Vrsta ulja	Sastav masnih kiselina (%)					Indeks stabilnosti ulja (h)
	C _{16:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{18:3}	
Sojino ulje	10.4	3.5	21.5	51.5	7.8	2.22
Suncokretovo ulje	4.7	3.6	64.5	24.8	0.3	6.66
Suncokretovo ulje*	6.2	3.5	20.7	67.9	0.2	2.17
Kukuruzno ulje	10.7	1.6	24.5	61.3	1.1	3.24
Šafranovo ulje*	4.8	2.0	77.4	13.8	0.5	8.92
Repičino ulje	4.7	2.0	60.0	21.7	9.1	3.71
Maslinovo ulje	12.9	2.0	71.2	10.7	0.9	10.97

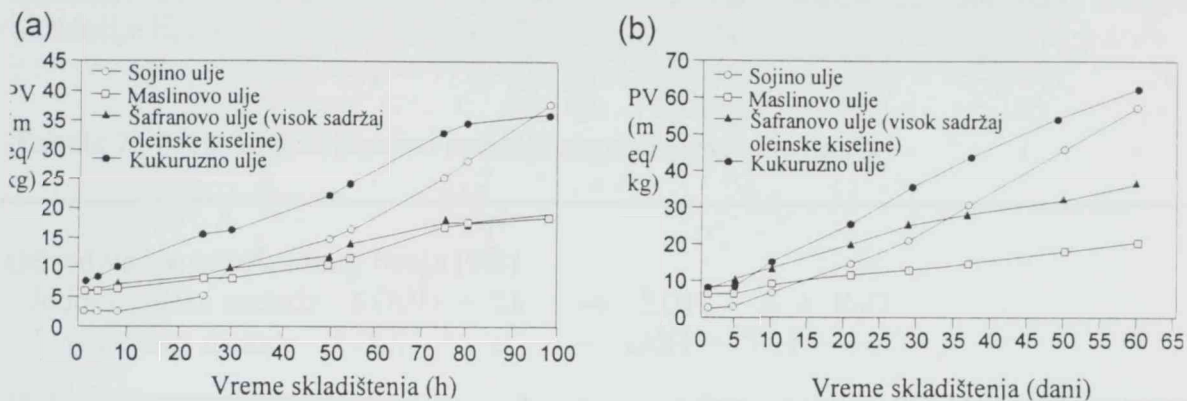
* ulje sa visokim sadržajem oleinske kiseline

Promene biljnih ulja izazvane oksidacijom lipida zavise, pored njihove hemijske strukture, od prirode procesa proizvodnje, temperature na kojoj se ulja čuvaju ili koriste, načina njihovog korišćenja (spravljanja hrane), prisustva antioksidanata, sadržaja jona

prelaznih metala (Aruoma, 1996), količine dostupnog kiseonika (Dahl, 1994), kao i drugih faktora.

Na slici 13 prikazane su oksidativne promene nekih biljnih ulja, praćene merenjem peroksidnog broja, tokom skladištenja na različitim temperaturama (Chu i Kung, 1998).

Faktori koji promotivno utiču na oksidaciju lipida, kao i paralelne sugestije za adekvatnu supresiju oksidacije lipida, prikazani su u tabeli 6 (Namiki, 1990).



Slika 13. Promene peroksidnog broja biljnih ulja tokom skladištenja

a) na 60 °C

b) na sobnoj temperaturi (25 °C)

Tabela 6. Faktori koji utiču na oksidaciju

Promotori	Supresori
Nezasićene masne kiseline	Redukcija u zasićene masne kiseline
Kiseonik, aktivni oblici kiseonika	Promena dostupnog gasa, uklanjanje kiseonika Vakumiranje
Teški metali i njihovi kompleksi	Uklanjanje metalnih jona Kompleksiranje metala
Svetlo i boje	Uklanjanje boja Zaštita od svetla
Radijacija	Primena hvatača (skevindžera) radikala
Peroksi-radikali	Antioksidanti
Zagrevanje	Hlađenje

2.3.1. HEMIJSKE I FIZIČKO-HEMIJSKE METODE ISPITIVANJA OKSIDACIJE LIPIDA

Ispitivanje procesa oksidacije lipida podrazumeva primenu neke hemijske ili fizičko-hemijske metode kojom se određuje relevantni parametar, odnosno pokazatelj kvaliteta – sadržaj nezasićenih masnih kiselina, količina nekog primarnog ili sekundarnog proizvoda oksidacije lipida, utrošak kiseonika i drugi (Halliwell i Chirico, 1993; Berset i Cuvelier, 1996). Analitičke metode koje se najčešće koriste za ispitivanje stepena oksidacije lipida prikazane su u tabeli 7 (Namiki, 1990).

Tabela 7. Metode za detekciju i merenje stepena oksidacije lipida

<p>Određivanje peroksidnog broja (PB) Jodometrijska metoda: $\text{LOOH} + 2\text{KJ} \rightarrow \text{LOH} + \text{J}_2 + \text{K}_2\text{O}$ Tiocijanatna metoda: $\text{LOOH} + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{LOH} + \cdot\text{OH} + \text{Fe}^{3+}$</p>
<p>Merenje proizvoda razgradnje Određivanje karbonilnog broja: spektrofotometrijski sa 2,4-dinitrofenilhidrazin derivatima Određivanje anizidinskog broja: spektrofotometrijski sa 4-metoksianilinom Određivanje TBA vrednosti: spektrofotometrijski sa tiobarbiturnom kiselinom Gasna hromatografija (GC) Gasnohromatografsko-masena spektrometrija (GC/MS)</p>
<p>Merenje utroška kiseonika Elektrometrijsko određivanje rastvorenog kiseonika Gravimetrijsko određivanje Varburgova metoda</p>
<p>Fizičko-hemijske metode UV apsorpcija IR spektrometrija ESR spektrometrija Fluorometrija Hemiluminiscentna metoda</p>

Određivanje količine nastalih hidro-peroksida lipida, izražene kao peroksidni broj (PB), jodometrijskom (A.O.C.S., 1987) ili tiocijanatnom metodom (A.O.C.S., 1987), često se koristi u istraživanjima oksidativne stabilnosti masti i ulja. Jodometrijska metoda je retko primenjiva na biološke sisteme, mada se može aplicirati na ekstrakte biološkog materijala ukoliko oni ne sadrže oksidaciona sredstva (npr. H_2O_2). Klasična jodometrijska titracija je osavremenjena u modifikovanoj spektrofotometrijskoj verziji metode za određivanje sadržaja hidro-peroksida lipida (Løvaas, 1992).

Test tiobarbiturne kiseline (TBA test) je jedna od najstarijih i najčešće korišćenih metoda za merenje oksidacije lipida u prehrambenim proizvodima i biološkim sistemima.

Malonaldehid, sekundarni proizvod oksidacije lipida nastao iz njegovih prekursora – hidroperoksi-epidioksida i biciklo-endoperoksida, reaguje pri definisanim uslovima testa (zagrevanje i niska pH-vrednost) sa tiobarbiturnom kiselinom, pri čemu nastaje proizvod ružičaste boje. Kvantifikacija nastalog proizvoda vrši se spektrofotometrijski na 532 nm. Primenjivost metode je ograničena širokim skupom jedinjenja koja, takođe, reaguju sa TBA, gradeći adukte koji apsorbuju na 532 nm. Jedinjenja koja interferiraju sa malonaldehidom (TBARS – TBA reaktivne supstance) su aldehidi, ketoni, ketosteroidi, estri, ugljeni hidrati, aminokiseline, piridini, pirimidini i druga (Guillén-Sans i Guzmán-Chozas, 1998). Alternativni pristup, koji omogućava visok nivo specifičnosti, odnosno pruža realan uvid u sadržaj prekursora malonaldehida, je izolovanje TBA-MDA adukta iz reakcione smeše HPLC metodom pre merenja apsorbcije (Yoden i Iio, 1989). Praćenje formiranja malonaldehida moguće je gasnrohromatografsko-maseno spektrometrijskom analizom (GC-MS) (Frankel i Neff, 1983).

Citotoksični 4-hidroksi-2,3-*trans*-nonenal, nastao razgradnjom hidro-peroksida lipida, reakcijom sa 2,4-dinitro-fenilhidrazinom daje 2,4-dinitro-fenilhidrazone, koji se određuju GC-MS ili HPLC analizom (Esterbauer i sar., 1991; Nardini i sar., 1992).

Gasna hromatografija se koristi za detektovanje isparljivih sekundarnih proizvoda oksidacije lipida, ugljovodonika etana i pentana, visokoosetljivih indikatora oksidativnih promena u toksikološkim studijama, kao i za određivanje heksanala, generisanog oksidacijom lipida u biološkim sistemima (Frankel i sar., 1989).

Elektrometrijsko određivanje utroška rastvorenog kiseonika u ispitivanim sistemima, apsorbovanog od strane alkil-radikala (L^*) ili utrošenog tokom razgradnje hidro-peroksida, služi najčešće za praćenje oksidacije masti i ulja (Dahl, 1994).

Oksidacija lipida u inicijalnoj fazi praćena je stvaranjem konjugovanih dienskih struktura estara nezasićenih masnih kiselina, koji apsorbuju UV iradijaciju u oblasti 230-235 nm. Spektrofotometrijskim merenjem apsorbcije konjugovanih diena na 234 nm potvrđuje se njihovo nastajanje, koje se često upotpunjuje prikazom promenjenog sastava masnih kiselina (GC/MS analiza) (Dahl, 1994; Berg i sar., 1995).

Stvaranje fluorescentnih proizvoda tokom oksidacije lipida može da posluži kao osnova za merenje stepena oksidacije lipida. Malonaldehid reaguje sa amino-grupama aminokiselinskih bočnih lanaca proteina, slobodnih aminokiselina, fosfatidil-etanol-amina ili nekih drugih jedinjenja, gradeći u kiseloj sredini fluorescentne amino-imino-propenske Šifove baze. U neutralnoj sredini malonaldehid i amino-jedinjenja stvaraju fluorescentne dihidro-piridine. Fluorescencija koja prati oksidaciju lipida u njenoj završnoj fazi ne izostaje čak ni u odsustvu amino-jedinjenja, jer polimerizacijom malonaldehida nastaju fluorescentni polimeri (Porta, 1991).

Termičkom razgradnjom hidro-peroksida lipida stvaraju se ekscitirana tripletna karbonilna jedinjenja, koja imaju apsorpcioni maksimum na 440-480 nm. Njihovo formiranje je osnova termoluminiscentnih određivanja sadržaja hidro-peroksida biljnih ulja (Miyazawa i sar., 1994).

Hemiluminiscentna metoda meri luminiscenciju nastalu ekscitacijom molekula nekog jedinjenja, stvorenog tokom oksidacije lipida, aktivnim kiseonikom u prisustvu luminiscentnog reagensa (luminol). Miyazawa i saradnici (1988) registrovali su promenu luminiscencije animalnih tkiva u funkciji različitih sadržaja metil-linoleata i hidro-peroksida metil-linoleata u obrocima laboratorijskih miševa.

Poslednjih godina za praćenje oksidacije lipida veoma često se koristi Rancimat metoda, koja omogućava merenje porasta konduktiviteta sa porastom koncentracije slobodnih masnih kiselina kraćeg niza, koje se formiraju tokom favorizovane oksidacije masti i ulja, pri povišenoj temperaturi i pojačanoj aeraciji (Richheimer i sar., 1996).

Elektron spin rezonancija (ESR) je jedina instrumentalna metoda kojom se detektuju slobodni radikali nastali tokom oksidacije lipida. Primena ove metode omogućava detekciju slobodnih radikala prisutnih i u koncentracijama nižim od 10^{-10} mol/dm³, pod uslovom da se radikali zadrže u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da budu detektovani. Ukoliko tokom neke reakcije nastaju izuzetno nestabilni, odnosno reaktivni slobodni radikali, za njihovo analiziranje je moguće primeniti (Borg, 1976):

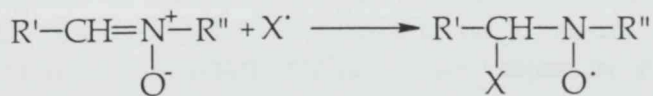
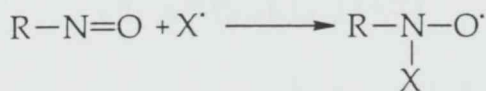
- naglo hlađenje (5-10 ms) lako isparljivog rastvora niske tačke smrzavanja, koji sadrži nestabile slobodne radikale, do veoma niskih temperatura (od -130 °C do -140 °C);
- regenerativni postupak koji stvara dinamičko stacionarno stanje u kome koncentracija slobodnih radikala može da se održava na istom nivou tokom odgovarajućeg vremenskog perioda – tehnika konstantnog protoka (continuous-flow technique);
- tehniku zaustavljenog protoka (stopped-flow technique) za slobodne radikale čije vreme poluživota iznosi 0.1 s ili duže;
- "fleš" (flash) fotolizu ili pulsnu radiolizu, posebno za kinetička ispitivanja izrazito nestabilnih slobodnih radikala, kao, na primer, hidroksi- i superoksid-anjon-radikala (Halliwell i Gutteridge, 1989);
- "spin-trapping" (spin trapping) tehniku.

S obzirom da tokom oksidacije lipida nastaju izuzetno nestabilni, odnosno reaktivni slobodni radikali (Simić i Taylor, 1987), za njihovo analiziranje se veoma često primenjuje "spin-trapping" tehnika ("hvatanje radikala"). Dodavanjem određenih organskih jedinjenja, tzv. "spin-trapova" (spin trap), u sistem sa prisutnim reaktivnim radikalima, međusobnom reakcijom nastaju relativno stabilni radikali, koji se detektuju ESR spektroskopijom (Mitsuya i sar., 1990; Nelson i sar., 1994; Milić i sar., 1998; Yamaguchi i sar., 1999).

Reakcijom nitrozo-jedinjenja (R-NO) ili nitrona $R-\text{CH}=\text{N}-R''$ sa reaktivnim

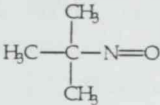
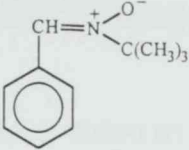
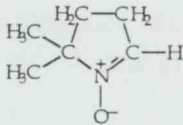
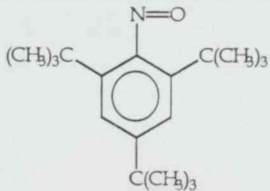
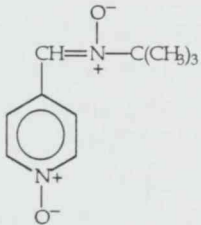


radikalima (X[•]) dobijaju se nitroksid-radikali sa relativno dugim vremenom života. Na primer:



U tabeli 8 prikazani su najčešće korišćeni "spin-trapovi" za reaktivne, odnosno nestabilne slobodne radikale.

Tabela 8. "Spin-trapovi"

Naziv	Skraćenica	Struktura
<i>tert</i> -Nitrozobutan	TNB	
<i>N-tert</i> -Butil- α -fenilnitron	PBN	
5,5-Dimetilpirolin-N-oksid	DMPO	
2,4,6-Tri- <i>tert</i> -butil-nitrozobenzen	BNB	
α -(4-Piridil-1-oksid)- <i>N-tert</i> -butilnitron	4-POBN	

2.4.0. ANTIOKSIDANTI

Stvaranje kiseonikovih slobodnih radikala u biološkim sistemima i njihovo učešće kako u procesu oksidacije lipida tako i u drugim za ćeliju nepoželjnim procesima, koji rezultiraju oštećenjima vitalnih struktura, praćeno je delovanjem enzimskog i neenzimskog sistema zaštite u organizmu.

Enzimski sistem zaštite podrazumeva aktivnost niza enzima, od kojih su najznačajniji superoksid-dizmutaza (SOD), katalaza i glutation-peroksidaza. Superoksid-dizmutaza katalizuje reakciju dizmutacije, odnosno prevođenja superoksid-anjon-radikala u vodonik-peroksid, a katalaza i glutation-peroksidaza, enzimi koji funkcionišu u sinergizmu sa SOD, katalizuju prevođenje nastalog vodonik-peroksida u H₂O i O₂.

U funkciji zaštite od delovanja kiseonikovih slobodnih radikala na ćelijskom nivou aktivni su i bioantioksidanti – glutation (supstrat za delovanje enzima glutation-peroksidaze), mokraćna kiselina, ubihinon (redukovani oblik koenzima-Q), NADPH i drugi.

Sa stanovišta proizvodnje hrane oksidacija lipida predstavlja jedan od najznačajnijih problema za sve proizvođače prehrambenih proizvoda. Jedan od mogućih načina smanjenja ili eliminacije oksidativnih promena lipida hrane je upotreba antioksidanata.

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji podleže oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), značajno inhibiraju ili potpuno sprečavaju oksidaciju supstrata. Porter (1993) smatra da je antioksidant "ma koje jedinjenje kisele prirode (uključujući polifenole), koje dodato hrani može da bude donor elektrona ili H-atoma peroksi- ili alkoksi-radikalima, s ciljem da dovede do terminacije lančane reakcije oksidacije lipida ili regeneracije fenolnog jedinjenja, ili koje može da efikasno kompleksira prooksidativne prelazne metale".

Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da (Aruoma, 1996):

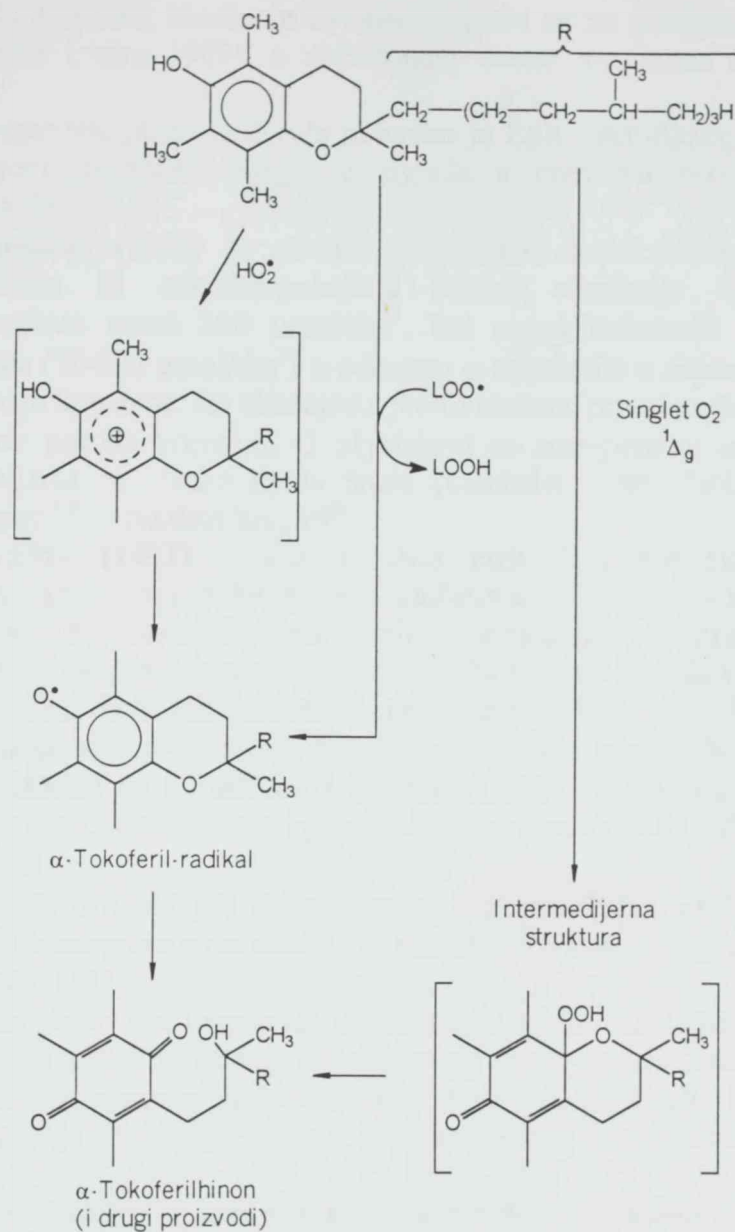
- deluju kao hvatači, tj. "skevindžeri" (scavenger) slobodnih radikala, odnosno donori elektrona ili H-atoma;
- kompleksiraju jone metala kako bi ih onemogućili da katalizuju reakcije stvaranja inicijatora oksidacije lipida (npr. $\cdot\text{OH}$) ili reakcije razgradnje hidroperoksida lipida;
- razgrađuju hidro-perokside lipida koji su nastali u fazi propagacije, transformišući ih u neradikalske vrste (npr. alkohole);
- eliminišu dejstvo singletnih oblika kiseonika;
- inhibiraju neke enzime;
- pokazuju sinergetske efekte;
- redukuju neka jedinjenja.

Potreba da se oksidacija lipida hrane, pre svega masti i ulja, potpuno ili delimično spreči i tako poveća njihova održivost, dovela je tokom poslednjih decenija do intenzivne upotrebe sintetičkih antioksidanata u prehrambenoj industriji (Hudson, 1990; Löliger, 1991). Najčešće korišćeni sintetički antioksidanti su: *terc*-butil-4-hidroksianizol (BHA), *terc*-butil-4-hidroksitoluol (BHT), *terc*-butil-hidrohinon (TBHQ), propil-galat (PG), butil-galat (BG), oktil-galat (OG), dodecil-galat (DG), etoksikvin (6-etoksi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetil-hinolin) i drugi (Papap, 1993). Sintetički antioksidanti su veoma efikasni, stabilni i prihvatljivi sa ekonomskog aspekta. Međutim, njihova upotreba, pogotovo u razvijenim zemljama Evrope, SAD i Japanu, postaje sve manja, jer postoje dokazi o njihovoj toksičnosti (Stich, 1991; Omura, 1992).

Najnoviji trend u prehrambenoj industriji je dodavanje prirodnih antioksidanata u hranu podložnu oksidaciji, odnosno zamena sintetičkih antioksidanata prirodnim (Frankel, 1995). Najvažniji prirodni antioksidanti, poznati od ranije, su α -, β -, γ - i δ -tokoferoli, karotinoidi, vitamini (A, B₂) i askorbinska kiselina.

α -Tokoferol, glavni konstituent liposolubilnog vitamina E, je jedan od najznačajnijih "skevindžera" slobodnih radikala u ćelijskim membranama i lipoproteinima, ali je i jedan od najmoćnijih komercijalno korišćenih antioksidanata (Burton, 1990).

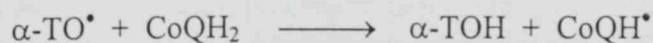
Dominantno antioksidativno delovanje α -tokoferola ostvaruje se inhibiranjem oksidacije lipida eliminacijom peroksi-radikala ($\text{LOO}\cdot$) iz lančane reakcije. α -Tokoferol je, takođe, sposoban da reaguje sa singletnim oblikom kiseonika i protonovanim oblikom superoksid-anjon-radikala ($\text{HO}_2\cdot$), čime doprinosi, ali u manjoj meri, supresiji oksidacije lipida. Reakcije α -tokoferola sa peroksi-radikalima, singletnim oblikom kiseonika i perhidroksi-radikalima suština su složenog mehanizma antioksidativnog delovanja α -tokoferola (slika 14).



Slika 14. Mehanizam antioksidativnog delovanja α -tokoferola

α -Tokoferil-radikal ($\alpha\text{-TO}^\bullet$), iako nije u potpunosti nereaktivan (Mukai i sar., 1993), pokazuje daleko manju efikasnost u eliminaciji H-atoma iz metilenskih grupa nezasićenih masnih kiselina od peroksi-radikala, što usporava lančanu reakciju (Burton, 1990). Snižena reaktivnost α -tokoferil-radikala je posledica njegove stabilizacije delokalizacijom elektrona na aromatičnom prstenu.

Recikliranje α -tokoferola ($\alpha\text{-TOH}$) vrši se redukcijom α -tokoferil-radikala ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) askorbinskom kiselinom ili ubihinonom (CoQH_2):



Redukcija askorbinskom kiselinom *in vivo* odigrava se na površini membrana i lipoproteina (Esterbauer i sar., 1989), a ubihinom unutar membrana i lipoproteina (Ernster i sar., 1992).

Mehanizam regeneracije α -tokoferola potvrđen je ESR identifikacijom tokoferil-radikala i snižavanjem intenziteta njegovog signala u prisustvu askorbil-palmitata (Roginsky i Stegmann, 1993).

Thomas i saradnici (1992) su utvrdili sinergistički antioksidativni efekat α -tokoferola i askorbata ili askorbil-palmitata tokom oksidacije lipozoma pri koncentracijama askorbata iznad $200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Isti autori ustanovili su da niske koncentracije askorbata ($50\text{-}200 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) u odsustvu α -tokoferola u sistemu koji sadrži Fe^{3+} stimulišu oksidaciju lipozoma, što ukazuje na prooksidativnu prirodu askorbata.

Antioksidativna priroda koenzima-Q objašnjava se sinergizmom α -tokoferola i koenzima-Q u reakcijama oksidacije lipida hrane (Lambelet i sar., 1992), kao i na ćelijskom nivou (Ernster i Forsmarkandree, 1993).

Yoshida i saradnici (1993) su ispitivali uticaj različitih koncentracija ($50\text{-}1000 \text{ mg}/\text{kg}$) tokoferola na oksidativnu stabilnost etil-linoleata i nekih biljnih ulja tretiranih mikrotalasima. Na osnovu određenih optimalnih koncentracija pojedinih tokoferola potrebnih pri definisanim eksperimentalnim uslovima za povećanje oksidativne stabilnosti sistema, autori su zaključili da je antioksidativni potencijal tokoferola sledeći: α -tokoferol $>$ β -tokoferol \sim γ -tokoferol $>$ δ -tokoferol. Identičnu efikasnost tokoferola u reakciji sa peroksi-radikalima zabeležili su i Hamilton i saradnici (1997), navodeći da je relativni odnos konstanti brzine reakcije tokoferola i peroksi-radikala sledeći: $3.61 : 2.55 : 2.45 : 1$ za α -, β -, γ - i δ -tokoferol.

α -Tokoferol može ostvariti jači antioksidativni efekat u slučaju oksidacije ribljeg ulja katalizovane Fe^{2+} i hemoproteinima ukoliko se primenjuje u kombinaciji sa ekstraktom ruzmarina (Fang i Wada, 1993).

Antioksidativno dejstvo α -tokoferola u poređenju sa antioksidativnim dejstvom sintetičkih antioksidanata zavisi od prirode sistema u koji se oni dodaju, načina iniciranja oksidacije lipida, izbora primarnog ili sekundarnog proizvoda oksidacije koji se prati, izbora metode za praćenje oksidacije lipida i drugih faktora (Yanishlieva i Marinova, 1998).

Ispitujući komparativno dejstvo α -tokoferola i nekih sintetičkih antioksidanata (BHA, BHT, TBHQ i propil-galat), dodatih u svinjsku mast i sojino ulje, Dougherty (1993) je ustanovio da je TBHQ izuzetno efikasan antioksidant u svinjskoj masti, α -tokoferol u sojinom ulju, dok su BHA i BHT praktično neefikasni u sojinom ulju. Isti autor je, takođe, ustanovio da postoji sinergizam između α -tokoferola i primarnog (TBHQ), kao i sekundarnih (askorbat, askorbil-palmitat) antioksidanata.

Iako je mnogim eksperimentima potvrđeno da je α -tokoferol izuzetno moćan antioksidant, postoje dokazi da bi on u izvesnoj meri mogao da deluju i prooksidativno. α -Tokoferil-radikal može da eliminiše H-atom iz hidro-peroksida metil-linoleata u rastvoru benzola, ali je konstanta brzine ove reakcije $k = 5 \times 10^{-1} \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$, dok je konstanta brzine reakcije α -tokoferola sa peroksi-radikalima metil-linoleata $k = 3.2 \times 10^6 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{s}^{-1}$ (Mukai i sar., 1993a). Međutim, konstanta brzine reakcije α -tokoferil-radikala i hidro-peroksida metil-linoleata je oko šest puta viša u slučaju visokih koncentracija α -tokoferola, što ukazuje na prooksidativno dejstvo α -tokoferola prisutnog u visokim sadržajima u hrani i uljima.

Jung i Min (1992) su dokazali, praćenjem peroksidnog broja i merenjem utrošenog kiseonika, da oksidovani oblici α -, γ - i δ -tokoferola prooksidativno deluju na sojino ulje, s

tim što oksidovani oblici α -tokoferola deluju najjače kao prooksidanti, a oksidovani γ - i δ -tokoferoli imaju slično, ali slabije dejstvo.

Askorbinska kiselina kao antioksidant u biološkim i prirodnim sistemima:

- deluje kao hvatač superoksid-anjon-radikala ($O_2^{\bullet-}$) i perhidroksi-radikala (HO_2^{\bullet}) (zbirna $k = 2.7 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ na $\text{pH} = 7.4$);
- deluje kao hvatač peroksi-radikala (LOO^{\bullet});
- deluje kao hvatač hidroksi-radikala ($^{\bullet}OH$) ($k > 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$);
- deluje kao hvatač tiil-, sulfenil- i nitroksid-radikala;
- sprečava oštećenja izazvana porastom koncentracije radikala nastalih napadom $^{\bullet}OH$ na mokraćnu kiselinu;
- redukuje kancerogene nitrozamine do inaktivnih proizvoda;
- deluje kao hvatač hipohlorne kiseline;
- inhibira oksidaciju lipida iniciranu smešom hemoglobin ili mioglobin/ H_2O_2 i sprečava razgradnju hema, odnosno oslobađanje Fe^{2+} ;
- deluje kao hvatač i "kvenčer" singletnih oblika kiseonika u vodenim rastvorima;
- regeneriše α -tokoferil-radikal na površinama membrana i lipoproteina;
- štiti lipide plazme od oksidacije izazvane aktiviranim neutrofilima;
- može da zaštiti od radikalskih vrsta prisutnih u dimu cigarete.

Antioksidativna priroda askorbinske kiseline, generalno gledano, proizilazi iz njene sposobnosti da deluje kao veoma dobar "skevindžer" mnogih radikalskih vrsta i da reciklira α -tokoferol (Bendich i sar., 1986; Halliwell, 1994).

U prisustvu jona prelaznih metala (gvožđa i bakra) askorbat deluje prooksidativno, odnosno kao redukciono sredstvo, omogućavajući generisanje superoksid-anjon-radikala, vodonik-peroksida i hidroksi-radikala (Fukuzawa i sar., 1993; Yin i sar., 1993). Pri normalnom statusu ćelije, sve dok su sadržaji metalnih jona veoma niski, antioksidativna priroda askorbata dominira (Bendich i sar., 1986). Međutim, koncentracije jona prelaznih metala tokom nekih patoloških stanja postaju više, što favorizuje prooksidativnu prirodu askorbata (Halliwell i Gutteridge, 1990; Hunt i sar., 1992).

Poslednjih nekoliko godina naučna istraživanja na polju otkrivanja novih prirodnih antioksidanata, kao i ustanovljavanja mehanizama njihovog delovanja, orijentisana su na karotinoide (Krinsky, 1994; Palozza i Krinsky, 1994; Bast i sar., 1998).

Karotinoidi mogu da reaguju sa singletnim oblicima kiseonika "kvenčing" mehanizmom, inhibirajući, ali u relativno maloj meri, oksidaciju lipida (Palozza i Krinsky, 1992). Značajniji oblik antioksidativnog delovanja karotinoida podrazumeva redukciju sadržaja peroksi-radikala tokom oksidacije lipida u rastvorima, lipozomima, membranama mikrozoma i *in vivo* sistemima (Tsuchihashi i sar., 1995; Woodall i sar., 1997; Yamauchi i sar., 1998).

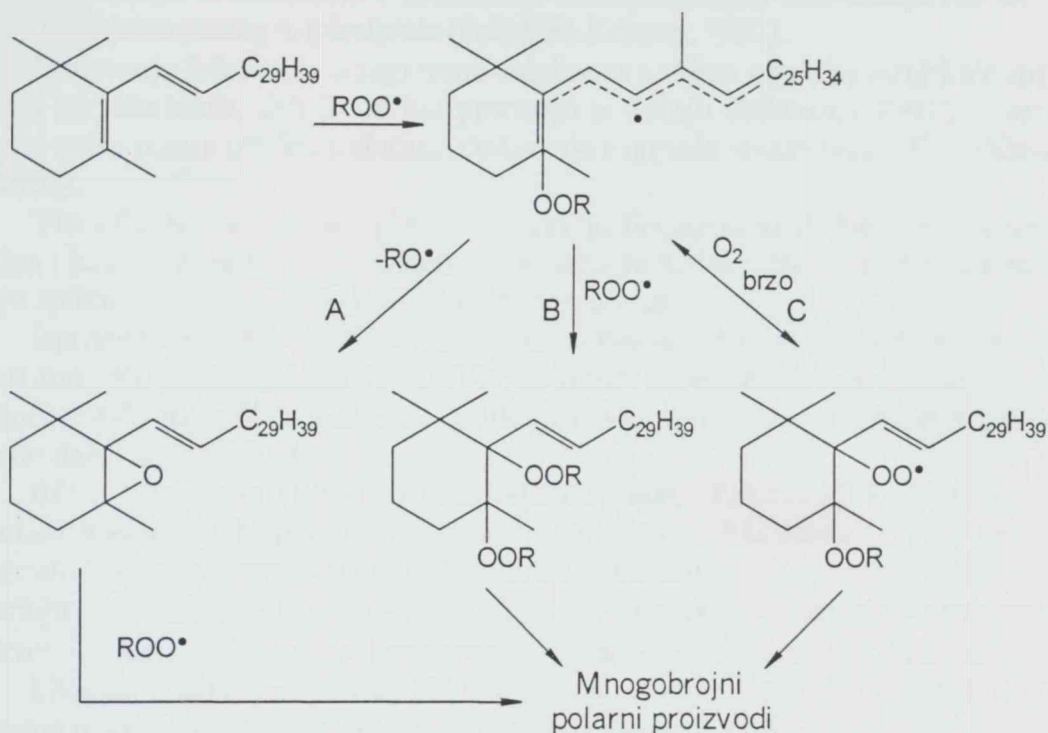
β -Karotin, jedan od najrasprostranjenijih karotina u biljnom svetu, deluje kao hvatač tiil-, nitroksid- i sulfenil-radikala, sposobnih da iniciraju oksidaciju lipida, pri čemu nastaju β -karotin-katjon-radikali i radikal-adukti (nastali interakcijom β -karotina i radikala) (Everett i sar., 1996).

Barton i Ingold su 1984. godine pretpostavili da β -karotin reaguje sa peroksi-radikalima lipida, gradeći peroksi-karotinoide adukte, koji su detektovani masenom spektrometrijom tek 1996. godine (Liebler i McClure, 1996).

Najnovija istraživanja kinetike i proizvoda reakcije β -karotina sa alkil-peroksi-radikalima pokazala su da β -karotin u prisustvu alkil-peroksi-radikala deluje kao antioksidant na dva paralelna načina:

- formirajući adukt sa alkil-peroksi-radikalom i
- transferujući H-atom na alkil-peroksi-radikal (Liebler i McClure, 1996; Woodall i sar., 1997; Mortensen i Skibsted, 1998).

Stvaranje adukta sa alkil-peroksi-radikalom podrazumeva adiciju peroksi-radikala na polienski niz, a favorizovano je stabilizacijom nastalog C-radikala delokalizacijom nesparenog elektrona duž celog polienskog niza. Dalje transformacije nastalog adukta zavise od parcijalnog pritiska kiseonika i utiču na ispoljavanje antioksidativnog ili prooksidativnog karaktera β -karotina (slika 15).



Slika 15. Mogući reakcioni putevi pri interakciji β -karotina i alkil-peroksi-radikala

Reakcion put A, odnosno put autooksidacije β -karotina, vodi nastanku epoksida i oslobađanju alkoksi-radikala, dok antioksidativni put B vodi stvaranju *bis*-peroksi adukta. Reverznom adicijom kiseonika na adukt β -karotina i alkil-peroksi-radikala, pri čemu je reakciona ravnoteža u funkciji parcijalnog pritiska kiseonika, nastaje peroksi-radikal, koji, dalje, može da oksiduje drugi molekul β -karotina (reakcioni put C). Pri niskim parcijalnim pritiscima kiseonika nastali adukt podleže promenama reakcionog puta B, uz ispoljavanje antioksidativnog karaktera β -karotina (Kennedy i Liebler, 1992).

Transfer H-atoma sa β -karotina na alkil-peroksi-radikal je termodinamički moguć, jer energija disocijacije najlabijnije C-H veze u molekulu β -karotina iznosi 309 kJ/mol, dok je energija disocijacije veze ROO-H 370-380 kJ/mol (Luo i Holmes, 1994). Međutim, transfer elektrona sa β -karotina na peroksi-radikal, pri kome bi nastajao β -karotin-katjon radikal, manje je verovatan, zbog niskog redoks potencijala peroksi-radikala, 0.68 V (Lind i sar., 1990). Favorizovan položaj za transfer H-atoma je C₄-atom cikloheksenskog prstena β -karotina, koji obezbeđuje da nakon transfera H-atoma nastane relativno stabilan C-radikal, čiji je nespareni elektron delokalizovan duž celog polienskog niza (Woodall i sar., 1997). Prisustvo nekog supstituenta (npr. keto-grupe) na C₄-atomu karotinoida

onemogućava da se njegov antioksidativni efekat ostvari mehanizmom transfera H-atoma na peroksi-radikal, pa se, u slučaju takvih karotinoida, antioksidativno dejstvo svodi samo na građenje adukata sa peroksi-radikalom.

β -Karotin nije efikasan hvatač peroksi-radikala u poređenju sa α -tokoferolom, jer je konstanta brzine reakcije β -karotina sa alkil-peroksi-radikalima manja od $10^6 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$, dok je konstanta brzine reakcije za α -tokoferol reda veličine 10^6 - $10^7 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ (Mortensen i Skibsted, 1998). Ova činjenica upućuje na malu antioksidativnu ulogu β -karotina u sistemima sa α -tokoferolom, pogotovo ako se ima u vidu da je α -tokoferol često prisutan u daleko višim koncentracijama od β -karotina u većini prirodnih lipidnih sistema. Ipak, kombinacija α -tokoferola i β -karotina obezbeđuje jače antioksidativno dejstvo u odnosu na dejstvo samog α -tokoferola (Palozza i Krinsky, 1992).

Dodavanje β -karotina u zagrevano maslinovo i sojino ulje nije rezultiralo zaštitnim efektom na tokoferole, dok je on bio primećen u slučaju dodavanja TBHQ i sezamola, odnosno nešto manje izražen u slučaju dodavanja eugenola, kvercetina i BHA (Kajimoto i sar., 1992).

Yin i Cheng (1997) su ispitivali oksidaciju lipozoma uz dodatke α -tokoferola, β -karotina i kombinacije oba antioksidanta, pri čemu su antioksidativni efekti bili najbolji u slučaju apliciranja kombinacije ispitivanih antioksidanata.

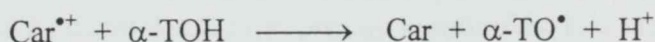
Ispitujući antioksidativni potencijal karotinoida u model sistemima u kojima su peroksi-radikali bili generisani iz AMVN ili AIBN (α, α' -azoizobutironitril), Woodall i saradnici (1997) su došli do zaključka da likopen, β -karotin, lutein i zeaksantin deluju kao izuzetno dobri antioksidanti.

Böhm i saradnici (1997) su ustanovili da postoje karotinoidi koji su u stanju da recikliraju tokoferole. Najnovija istraživanja Mortensena i Skibsteda (1997b) ukazuju da sinergizam između karotinoida i tokoferola podrazumeva sledeću antioksidativnu hijerarhiju: α -tokoferol > likopen \sim β -tokoferol \sim γ -tokoferol > β -karotin > zeaksantin \sim δ -tokoferol > lutein > ehinenon \gg kantaksantin \sim β -apo-8'-karotenal > astaksantin.

Likopen (Lik) će, na primer, biti u stanju da redukuje δ -tokoferil-radikal ($\delta\text{-TO}^\bullet$) uz nastajanje likopenil-katjon-radikala ($\text{Lik}^{*\bullet}$) i δ -tokoferola ($\delta\text{-TOH}$):



α -Tokoferol ($\alpha\text{-TOH}$) će reciklirati ma koji karotinoil-katjon-radikal ($\text{Car}^{*\bullet}$) uz nastajanje α -tokoferil-radikala ($\alpha\text{-TO}^\bullet$) i karotinoida (Car):

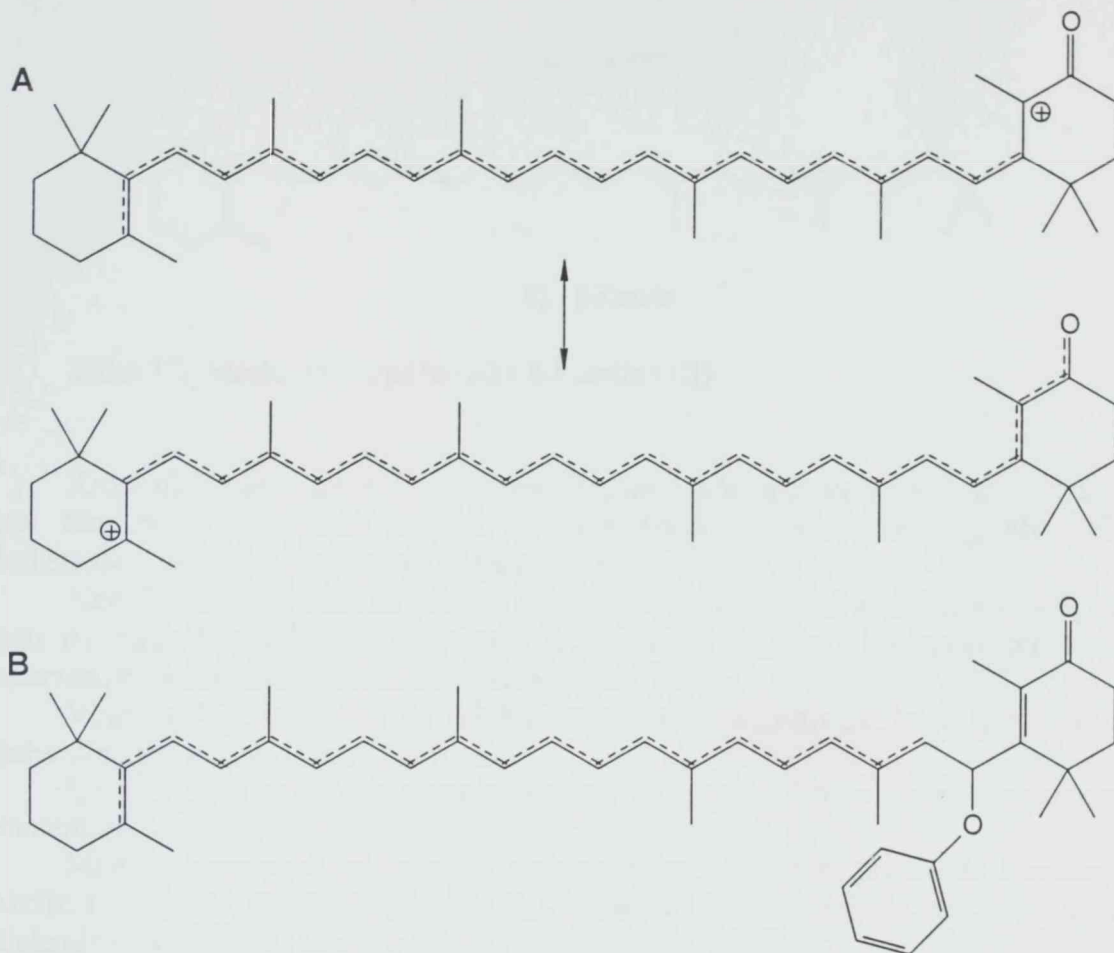


Primarno antioksidativno delovanje karotinoida vezano je za sinergizam ove klase fotosintetičkih pigmenata i jedne od najvećih klasa prirodnih antioksidanata, polifenola (Mortensen i Skibsted, 1997a). Antioksidativno delovanje polifenola zasniva se prvenstveno na sposobnosti aroksi-radikala da deluju kao hvatači peroksi- i alkoksi-radikala lipida. Karotinoidi mogu da regenerišu, odnosno redukuju aroksi-radikale.

Mortensen i Skibsted (1997a) su ispitivali kinetiku reakcije različitih karotinoida sa fenoksi-radikalima na 20°C i ustanovili da postoji signifikantna razlika u sposobnosti različitih karotinoida da deluju kao hvatači fenoksi-radikala. Antioksidativni potencijal ispitivanih karotinoida je sledeći: likopen > β -karotin > zeaksantin > ehinenon \gg kantaksantin \sim β -apo-8'-karotenal \gg astaksantin.

Intermedijeri koji nastaju u opisanim reakcijama su adukti karotinoida i fenoksi-radikala i karotinoil-katjon-radikali (Mortensen i Skibsted, 1996). Relativna stabilnost ovih

intermedijera objašnjava se delokalizacijom elektrona duž niza konjugovanih veza u molekulima intermedijera. Strukture katjon-radikala ehinenona (A) i adukta nastalog reakcijom fenoksi-radikala i ehinenona (B) prikazane su na slici 16.

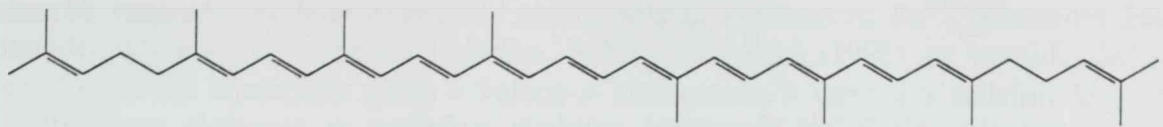


Slika 16. Strukture katjon-radikala ehinenona (A) i adukta nastalog reakcijom fenoksi-radikala i ehinenona (B)

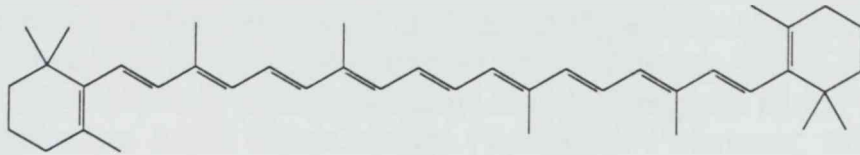
Struktura karotinoida, odnosno dužina niza konjugovanih veza i prisustvo i priroda supstituenta, direktno utiče na antioksidativnu prirodu karotinoida. Karotin likopen je bitno reaktivniji od β -karotina, jer poseduje 11 konjugovanih dvostrukih veza koje su planarne, dok β -karotin poseduje isti broj konjugovanih dvostrukih veza, od kojih su dve u cikloheksenskim prstenima, koji nisu planarni sa preostalim delom molekula. Iz ovih karotina generisaće se karotininil-katjon-radikali, od kojih će stabilniji biti onaj nastao iz likopena, jer je stabilizacija ovog katjon-radikala delokalizacijom elektrona bolja. Strukture likopena i β -karotina prikazane su na slici 17.

Uvođenje hidroksi-grupa u karotinoidnu strukturu rezultira sniženjem antioksidativne moći hidroksi-karotinoida. Mono-keto-karotinoidi (npr. ehinenon) su veoma slabi antioksidanti, dok dve keto-grupe ili aldehidna-grupa u molekulu karotinoida dovodi do potpunog izostanka antioksidativne moći (Woodall i sar., 1997).

Slabiju sposobnost ksantofila (derivati karotina sa hidroksi-, keto-, epoksi-, karboksi- i metoksi-grupama) da deluju kao hvatači slobodnih radikala u poređenju sa karotinima zabeležili su Miller i saradnici (1996).



A) Likopen



B) β -Karotin

Slika 17. Strukture likopena (A) i β -karotina (B)

Ksantofili iz kore tajvanske pomorandže, iako dokazano slabiji kao antioksidanti u grupi karotinoida, pozitivno deluju na oksidativnu stabilnost sojinog ulja tokom skladištenja u prisustvu svetlosti (Yen i Chen, 1995).

Neki karotinoidi, kao, na primer, β -karotin i β -kriptoksantin, dejstvom oksigenaza mogu da budu konvertovani u vitamin A (retinol), koji, kao i njegovi metabolički prekursori, poseduje antioksidativa svojstva (Bates, 1995).

Vitamin A je sposoban da inhibira neenzimsku oksidaciju lipida u cerebralnim mitohondrijama pacova (Das, 1989).

Halter (1989) navodi da vitamin A može da posluži kao jedna od mogućnosti u hemoterapiji.

Mnogi biomolekuli, uključujući aminokiseline i proteine, proizvode Maillardove reakcije, fosfolipide, riboflavin (vitamin B₂), hlorofile i druga jedinjenja, pokazuju, takođe, antioksidativni karakter (Maestro-Durán i Borja-Padilla, 1993).

Pored istraživanja zastupljenosti i načina delovanja navedenih prirodnih antioksidanata, poslednjih decenija intenzivno se ispituju antioksidativni efekti sirovih ili prečišćenih biljnih ekstrakata dobijenih iz veoma različitih izvora – ljuski kakaoa, ovs, čaja, maslina, belog luka, đumbira, ljuske crvenog luka, grožđa, jabuka, likorike, muskatnog oraha, korijandera, origana, timijana, žalfije, ruzmarina i mnogih drugih biljaka (Aruoma, 1996). Nakon izolovanja aktivnih komponenti biljnih ekstrakata za većinu je dokazano da su polifenolne prirode.

2.4.1. POLIFENOLI KAO ANTIOKSIDANTI

Polifenoli su već niz godina poznati kao antioksidativna jedinjenja, ali je njihovo izučavanje sa stanovišta supresije oksidacije lipidnih konstituenata hrane, kao i humane zaštite u medicini, i danas veoma aktuelno, posebno u svetlu težnji za zamenom sintetičkih antioksidanata prirodnim.

Mnogi derivati fenolnih kiselina su efikasniji hvatači slobodnih radikala od vitamina E i C, pri čemu redukciona sposobnost hidroksi-derivata benzoeve i cimetine kiseline zavisi od broja i položaja OH-grupa na aromatičnom prstenu (Miller i Rice-Evans, 1997).

Ispitujući sposobnost fenolnih jedinjenja da deluju kao hvatači alkoksi-radikala, nastalih razgradnjom hidro-peroksida metil-linoleata u prisustvu Fe^{2+} , primenom ESR metode, odnosno "spin-traping" tehnike, Milić i saradnici (1998) su utvrdili sledeću antioksidativnu hijerarhiju: galna > kafena > hlorogenska > vanilna > salicilna kiselina. Ustanovljena aktivnost je posledica strukture ispitivanih jedinjenja, odnosno broja i položaja OH-grupa.

Kafena kiselina je najbolji hvatač hidroksi-radikala u odnosu na ostala fenolna jedinjenja prisutna u maslinovom ulju (Chimi i sar., 1991), a deluje i kao hvatač peroksi-radikala nastalih u metil-linoleatu indukcijom sa azo-inicijatorom AMVN (Terao i sar., 1993). Produženje inicijalnog perioda oksidacije suncokretovog ulja na 25 °C i 100 °C postiže se korišćenjem 0.05% kafene kiseline (Yanishlieva i Marinova, 1996). Luiza i saradnici (1998) su utvrdili da 5-kafeil-kvininska kiselina deluje kao primarni antioksidant i helator metalnih jona pri oksidaciji sojinog ulja.

Hlorogenska kiselina, dominantno fenolno jedinjenje suncokretovog semena, prisutno i u drugim biljnim kulturama (kafa, pasulj, paradajz, duvan, čaj, jabuke i dr.), pokazala se kao bolji hvatač 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil-radikala (DPPH) od *dl*- α -tokoferola i askorbinske kiseline. Hlorogenska kiselina inhibira nastajanje konjugovanih diena linolne kiseline tokom oksidacije indukovane superoksid-anjon-radikalima (Ohnishi i sar., 1994).

Visoka rezistentnost susamovog ulja na oksidaciju u poređenju sa ostalim biljnim uljima objašnjava se prisustvom polifenolnih jedinjenja, sezamola i sezamolina (Shahidi i sar., 1997). Sezaminol, aktivna komponenta susamovog ulja, je visokopotencijalan antioksidant zbog velike termostabilnosti i dokazane efikasnosti u supresiji degradacije tokoferola u prirodnim sistemima, kao što je kukuruzno ulje (Ramarathnam i sar., 1995). Baba i saradnici (1998) su ustanovili da sezamol reducira termičku razgradnju fosfatidil-holin-hidro-peroksida, dok α -tokoferol, BHT i askorbinska kiselina nisu pokazali nikakve efekte u ispitivanom sistemu.

Najviše eksploatisane začinske biljke sa stanovišta antioksidativnog potencijala su ruzmarin i žalfija. Aktivne komponente izolovane iz heksanskog, acetonskog i metanolnog ekstrakta ruzmarina su karnosol, rozmanol, karnosolna kiselina, rozmaridifenol i ursolinska kiselina (Chen i sar., 1992). Richheimer i saradnici (1996) su utvrdili da je karnosolna kiselina bolji antioksidant u poređenju sa drugim aktivnim komponentama lišća ruzmarina, BHT i BHA pri oksidaciji sojinog ulja na 60 °C praćenoj Rancimat testom.

Etanolni ekstrakt žalfije sadrži antioksidant rozmanol-9-etil-etar, koji se pokazao moćnijim od BHT i BHA (Đarmati i sar., 1991). Polifenolni antioksidanti ekstrakata ruzmarina i žalfije deluju u sinergizmu sa α -tokoferolom na stabilizaciju suncokretovog ulja (Pokorný i sar., 1997).

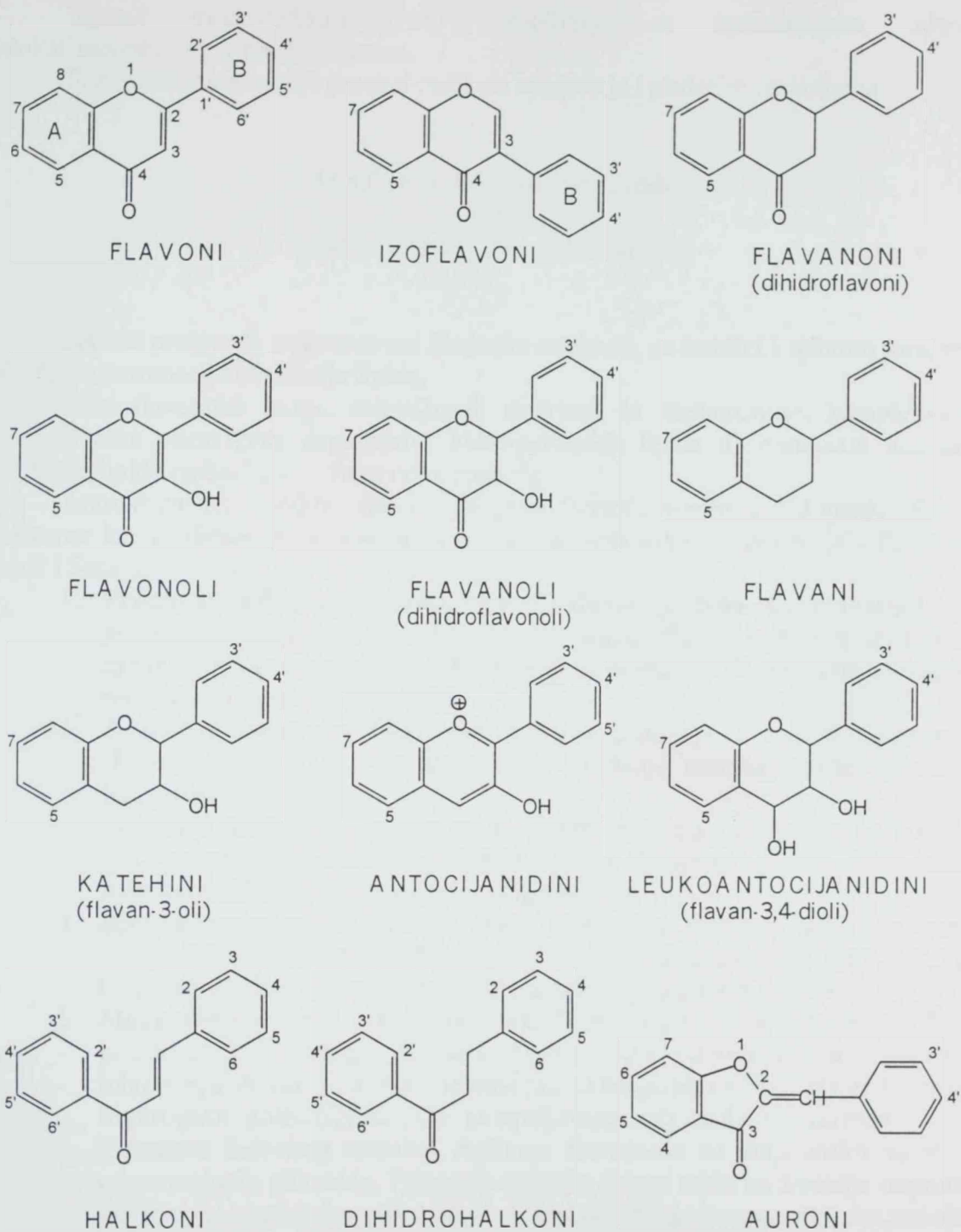
Ekstrakti timijana, žalfije, kleke i origana (10% etanol) uticali su na produženje indukcionog perioda oksidacije repičinog ulja, pri čemu je najbolje delovao ekstrakt žalfije (Takácsová i sar., 1995).

Economou i saradnici (1991) ispitali su antioksidativnu aktivnost metanolnih ekstrakata origana, jasenka, timijana, majorana, sperminta, lavande i bosiljka. Ekstrakti navedenog začinskog bilja, korišćeni u koncentracijama 0.01-0.2%, produžavali su indukcionu period oksidacije svinjske masti.

Džindžerol, antioksidativna komponenta đumbira, uspešno je inhibirao termičku oksidaciju sojinog ulja, pokazavši se jednako uspešnim kao BHT (Beak i Woo, 1993).

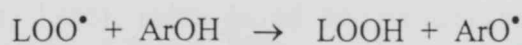
Flavonoidi, koji pokazuju širok spektar bioloških dejstava, uključujući antibakterijsko, antivirusno, antiinflamatorno, anti alergijsko i vazodilatatorno dejstvo, poznati su i kao antioksidanti (Cook i Samman, 1996).

Strukture osnovnih klasa flavonoida prikazane su na slici 18.



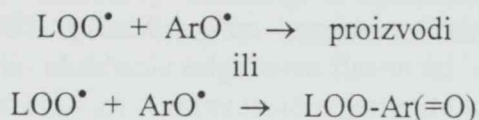
Slika 18. Strukture osnovnih klasa flavonoida

Flavonoidi inhibiraju *in vitro* oksidaciju lipida u inicijalnoj fazi delujući kao "skevindžeri" superoksid-anjon- i hidroksi-radikala, dok u fazi propagacije deluju kao donori H-atoma peroksi-radikalima (Roginsky i sar., 1996):



Nastali aroksi-radikali (ArO^\bullet) stabilizuju se rezonancijom, odnosno delokalizacijom nesporenog elektrona.

Sniženje koncentracije peroksi-radikala moguće je i sledećim reakcijama:



Nastali proizvodi, pogotovo oni hinonske strukture, su stabilni i njihovo formiranje uslovljava terminaciju oksidacije lipida.

Neki flavonoidi mogu, zahvaljujući strukturi, da mehanizmom kompleksiranja metalnih jona onemoguće degradaciju hidro-peroksida lipida ili nastajanje inicijatora oksidacije lipida mehanizmom Fentonove reakcije.

Antioksidativni karakter flavonoida je u funkciji strukture jedinjenja. Sledeće strukturne karakteristike su od značaja u proceni antioksidativnog potencijala flavonoida (Cook i Samman, 1996):

1. **Prisustvo hidroksilne grupe na C₃-atomu prstena C.** Flavonoidi koji poseduju OH-grupu na C₃-atomu, kao, na primer, fisetin, kvercetin, miricetin ili morin, bolji su antioksidanti od onih koji ne poseduju OH-grupu na navedenom položaju (apigenin, naringenin).
2. **Prisustvo dvostruke C=C veze između položaja 2 i 3 u prstenu C.** Hidrogenovanje ove veze dovodi do opadanja antioksidativne efikasnosti flavonoida.
3. **Prisustvo karbonilne grupe na C₄-atomu prstena C.** Katehin ne poseduje C=O-grupu na navedenom položaju i stoga slabije deluje kao "skevindžer" hidroksi-radikala od kvercetina, koji je poseduje.
4. **Broj hidroksi-grupa.** Porast broja OH-grupa direktno utiče na porast antioksidativne efikasnosti. Miricetin (OH-grupe na položajima 3,5,7,3',4',5') je bolji antioksidant od kempferola (OH-grupe na položajima 3,5,7,4').
5. **Međusobni položaj hidroksi-grupa.** Hidroksi-grupe na položajima 5 i 7 prstena A, 3' i 4' prstena B, kao i OH-grupa na C₃-atomu prstena C doprinose inhibiranju oksidacije lipida. Flavonolima je neophodna OH-grupa na C₂-atomu ili pirogaloil grupa (C_{3'}, C_{4'}, C_{5'}) za ispoljavanje antioksidativne prirode.
6. **Prisustvo šećernog ostatka.** Aglikoni flavonoida su bolji antioksidanti od odgovarajućih glikozida. Prisustvo ostataka šećera utiče na sniženje doprinosa OH-grupa, susednih glikozidno vezanim OH-grupama, antioksidativnom karakteru flavonoida usled sternih smetnji.
7. **Prisustvo metoksi-grupa.** Antioksidativni efekat flavonoida sa metoksi-grupama je niži od efekta odgovarajućeg flavonoida sa hidroksi-grupama zbog sternih smetnji.
8. **Prisustvo karbonilne grupe na C₄-atomu prstena C i hidroksi-grupa na C₃- i C₅-atomima.** Flavonoidi koji poseduju navedene grupe mogu da inhibiraju oksidaciju lipida kompleksiranjem metalnih jona, pri čemu ne gube sposobnost da deluju i kao hvatači slobodnih radikala.

Kvercetin, čiji se antioksidativni karakter u funkciji molekulske strukture ispitivao još 1966. godine (Letan, 1966), jedan je od najviše izučavanih flavonoida. Sadržaj kvercetina je najviši u crnom i belom luku, praziluku, jabukama, brokoliju, sojinim

izdancima i grejpfrotu (Mizuno i sar., 1992). Kvercetin i miricetin su veoma efikasni kao hvatači hidroksi- i superoksid-anjon-radikala (Husain i sar., 1987; Robak i Gryglewski, 1988).

Ljuske kikirikija su poslužile za dobijanje metanolnog ekstrakta, koji je ispoljio antioksidativno dejstvo pri termičkoj oksidaciji u model sistemu metil-linoleat/etanol (99:1%) (Duh i sar., 1992). Identifikacijom komponenti ekstrakta je dokazano da je najvećim delom za inhibiciju oksidacije odgovoran flavonoid luteolin, koji je efikasan kao donor H-atoma i kao hvatač hidroksi- i superoksid-anjon-radikala (Yen i Duh, 1994).

Izoflavonoid 2"-O-glukozil-viteksin, izolovan iz lišća mladog ječma, inhibirao je formiranje malonaldehida u istoj meri kao i α -tokoferol u model-sistemima etil-estara linolne, linolenske i arahidonske kiseline pri oksidaciji Fentonovim reagensima (Nishiyama i sar., 1993). Isti model sistemi poslužili su Miyakeu i Shibamotu (1997) za praćenje antioksidativnog delovanja naringina, galangina i rutina, pri čemu se rutin pokazao najboljim antioksidantom u svim ispitivanim sistemima.

Nieto i saradnici (1993) ispitivali su uticaj nekih flavonoida na stabilnost ribljeg ulja i zaključili da su kao antioksidanti najefikasniji katehin, morin i kvercetin, čak efikasniji od BHA, BHT i α -tokoferola. Isti autori su konstatovali da postoji jak sinergizam između kvercetina i α -tokoferola.

Ekstrakt lišća biljke ginko sadrži kvercetin, kamferol i izoramnetin, flavonoide koji obezbeđuju antioksidativni karakter ovog ekstrakta (Shi i Niki, 1998).

Inhibiranje *in vitro* oksidacije humanih LDL (low density lipoprotein) u prisustvu nekih antocijana, praćenjem formiranja konjugovanih diena i heksanala, dovelo je do zaključka da delfinidin, cijanidin, malvidin, malvin i pelargonidin deluju kao antioksidanti, odnosno kao donori H-atoma i jedinjenja sposobna da kompleksiraju metalne jone (Satue-Gracia i sar., 1997). Antocijani mogu i posredno da inhibiraju oksidaciju lipida, sprečavajući oksidaciju askorbinske kiseline izazvane prisustvom metalnih jona (Sarma i sar., 1997).

Tanini, biljni polifenoli velikih molekulskih masa, 15-20 puta efikasnije deluju kao hvatači peroksi-radikala nego polifenoli malih molekulskih masa ili trolox (hidrosolubilni analog vitamina E), što ukazuje na veliki značaj ovih jedinjenja kao prirodnih antioksidanata (Hagerman i sar., 1998).

Termička oksidacija repičinog ulja, praćena utroškom kiseonika i promenama sadržaja linolne i linolenske kiseline, inhibira se upotrebom etanolnog ekstrakta zelenog ili žutog čaja (Chen i sar., 1996). Polifenoli zelenog čaja sposobni da supresiraju oksidaciju linolne kiseline identifikovani su kao: (-)-epikatehin, (-)-epigalokatehin, (-)-epikatehin-galat, (-)-epigalokatehin-galat i galna kiselina (Jia i sar., 1998). Isti autori navode da polifenoli zelenog čaja deluju u sinergizmu sa α -tokoferolom.

Frankel i saradnici (1993) su saopštili da polifenolne komponente izolovane iz crnog vina (uključujući flavonoide i neflavonoidne polifenole) inhibiraju bakrom katalizovanu oksidaciju LDL *in vitro*.

Poslednjih godina postoje indicije da neki polifenoli, generalno smatrani antioksidantima i antikancerogenima, mogu, pri odgovarajućim uslovima, da stimulišu oštećenja nelipidnih komponenti, kao, na primer, DNK, proteina i ugljenih hidrata, u *in vitro* ispitivanjima (Aruoma, 1996; Decker, 1997). Dvojna priroda morina i naringenina, koji su delovali kao prooksidanti i izazvali oštećenja strukture DNK (Sahu i Gray, 1997), upućuje na neophodnost detaljnih utvrđivanja uslova pri kojima se ispoljava antioksidativni karakter nekog polifenola (Decker, 1997).

2.5.0. SOJA I PUNOMASNA HRANIVA OD SOJE

Soja (*Glycine max*) je biljka izuzetnog proteinsko-energetskog potencijala, što je čini jednim od najvažnijih izvora hrane za ljude i životinje.

Američka istraživanja pokazuju da se soja u ishrani ljudi američkog podneblja najčešće koristi u obliku proteinskih proizvoda od soje – brašna, griza, izolata, koncentrata i teksturiranih proizvoda, koji se dodaju kao komponente u razne vrste hrane (Berk, 1992). Nefermentisani (sojini izdanci, sojino mleko, tofu, tostovano sojino brašno) i fermentisani (miso, nato, soja sos, tempeh) proizvodi od soje poslednjih godina postaju sve češći izbor u ishrani stanovništva SAD i Evrope, mada su još uvek najzastupljeniji u ishrani stanovništva Azije (Wilson i sar., 1992).

Soja se u ishrani životinja koristi u obliku proteinskih i proteinsko-energetskih komponenti koje se upotrebljavaju u proizvodnji kompletnih krmnih smeša. Najčešće korišćeni proizvodi od soje namenjeni ishrani životinja su sojina sačma i punomasna hraniva od soje.

Proizvodnja punomasnih hraniva od zrna soje je od 1960. godine u porastu, a proizvedena hraniva se primarno koriste u kompozicijama hrane koja, pored proteina, iziskuje energiju, kao, na primer, hrani za brojlere ili niže kategorije životinja (prasad, telad) (Hanson, 1996). Upotrebom punomasnih hraniva od zrna soje u proizvodnji kompletnih krmnih smeša izbegava se jedan od velikih problema u proizvodnji smeša kod kojih postoji zahtev za energijom – problem zamašćivanja smeša.

Korišćenje zrna soje u ishrani životinja podrazumeva neophodnost njegove termičke obrade, s obzirom da soja, pored visokog sadržaja kvalitetnih proteina i ulja (tabele 9 i 10; Perkins, 1995), kao i zavidnog mineralno-vitaminskog profila, sadrži inhibitorne materije. Neke od njih su inhibitori proteolitičkih enzima (tripsin i himotripsin inhibitori) (Böhm i Täufel, 1993), hemaglutinini (lektini) (Van der Poel, 1990), fitati (Zhou i Erdman, 1995), saponini (Tsukamoto i sar., 1995), antivitamini A, E i B₁₂ (Liener, 1981), alergenski faktori (glicinin i β -konglicinin) (Hanson, 1996) i drugi.

Inhibitorne materije (antinutritivni) negativno utiču na apetit, apsorpciju hrane i metabolizam životinja (Liener i Kakade, 1980). Rackis i saradnici (1986) navode da visoki sadržaji tripsin inhibitora sirove soje inhibiraju proteolitičku aktivnost pankreatičnog enzima tripsina.

Termičko tretiranje soje se koristi za poboljšanje nutritivnih, higijenskih, fizičko-hemijskih i drugih karakteristika soje, odnosno njime se inaktiviraju termolabilni antinutritivni, povećava hranljiva vrednost nutritivenata, poboljšavaju senzorna svojstva zrna (reducira neprijatni "sirovi" ukus soje) i obezbeđuje mikrobiološka ispravnost proizvoda (Jansen, 1991; Verheul, 1997).

Najčešće korišćeni termički tretmani za obrađivanje zrna soje su ekstrudiranje, mikronizacija, tostiranje, hidrotermička obrada, prženje, tretman mikrotalasima, dielektrično toplotno tretiranje i drugi (Thompson, 1987; Petres i sar., 1990; Rand i sar., 1996; Sakač i sar., 1996).

Ekstruzija je savremen i složen tehnološki postupak, koji se, kao metod prerade soje i različitih sirovina u proizvode namenjene ljudskoj i stočnoj hrani, koristi od šezdesetih godina ovoga veka. Ekstrudiranje podrazumeva HT/ST princip ekstruzionog kuvanja (high temperature/short time), odnosno proces u kome je materijal izložen delovanju visokih temperatura (do 200 °C) kratko vreme (1-2 minuta). Postupak može biti suv (sadržaj vlage do 30%) ili vlažan (sadržaj vlage do 80%), a rezultira prevođenjem polaznog materijala kompleksnim delovanjem niza faktora (vlaga, pritisak, toplota, trenje) u finalni ekstrudat.

Tabela 9. Osnovni hemijski sastav i profil aminokiselina zrna soje

Pokazatelj	
Osnovni hemijski sastav	Sadržaj (%)
Vlaga	11.0
Sirovi proteini	37.9
Sirova mast	17.8
Sirova celuloza	4.7
Mineralne materije	4.5
BEM	24.1
Aminokiselinski sastav	% u proteinima
Alanin	4.0
Arginin	7.0
Asparaginska kiselina	11.3
Cistin	1.6
Glutaminska kiselina	17.2
Glicin	4.0
Histidin	2.7
Izoleucin	4.9
Leucin	8.0
Lizin	6.4
Metionin	1.4
Fenilalanin	5.3
Prolin	4.7
Serin	5.0
Treonin	4.2
Triptofan	1.2
Tirozin	3.9
Valin	5.3

Tabela 10. Sastav sojinog ulja

Pokazatelj	Sadržaj
Trigliceridi	95-97%
Fosfatidi	1.5-2.5%
Nesaponifikovane materije	1.6%
Biljni steroli	0.33%
Tokoferoli	0.15-0.22%
Ugljovodonici	0.014%
Slobodne masne kiseline	0.3-0.7%
Gvožđe	1-3 ppm
Bakar	0.03-0.05 ppm

Hidrotermički postupak obrade zrna soje svodi se na delovanje zasićene vodene pare pod pritiskom na polaznu masu soje. Željeno razaranje strukture sferozoma postiže se naglom, ali kontrolisanom ekspanzijom mase iz reaktora u ekspanzioni sud, pri čemu, s obzirom da se vrši blaga tehnička priprema i vlaženje zrna, ne dolazi do destrukcije zrna.

Sušтина adekvatne primene bilo kog od termičkih tretmana je postizanje kompromisa između reduciranja nivoa antinutritivenata (pre svega tripsin inhibitora) i očuvanja nutritivno vrednih komponenti soje. Optimizacija termičkog tretmana podrazumeva postizanje ravnoteže između biohemijskih karakteristika sirovine, vrste procesa, primenjenih parametara procesa (temperatura, pritisak, vreme) i zahteva životinje (Vohra i Kratzer, 1991).

Ekstruzijom (145 °C, 16 s) i hidrotermičkim tretmanom zrna soje (100 °C, 15 min) nivo tripsin inhibitora se reducira za 97-98% (Van der Poel, 1990; 1997). Kontrolisanje adekvatnosti primenjenih parametara režima, kao i kvaliteta finalnog proizvoda, vrši se određivanjem aktivnosti ureaze, čiji je nivo u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem tripsin inhibitora (Monari, 1994).

Termičko tretiranje do određenog nivoa povećava svarljivost proteina soje, ali, generalno gledano, negativno utiče na kvalitet proteina, odnosno sadržaj i iskoristljivost pojedinih esencijalnih aminokiselina, pogotovo lizina (Anderson i sar., 1992; Herkelman i sar., 1993). Pri termičkom tretiranju soje dolazi i do odigravanja neželjene reakcije između aminokiselinskih ostataka lizina i ugljenih hidrata – Maillardove reakcije (Eichner i Wolf, 1983).

Uticaj termičkog tretiranja na ulje soje je dvojak. Tako, na primer, pri ekstruziji, usled velikog trenja i visokog pritiska, dolazi do razaranja ćelijskih zidova i oslobađanja ulja iz sferozoma, čime se povećava njegova svarljivost na 90%. Svarljivost ulja pržene punomasne soje iznosi samo 73% (Smoje i sar., 1996). Paralelno navedenom, dolazi do inaktivacije lipoksigenaza, što rezultira delimičnom supresijom oksidacije lipida (Paula i sar., 1995).

Punomasna hraniva od zrna soje sadrže oko 20% ulja. Sastav masnih kiselina sojinog ulja (tabela 11; Perkins, 1995) ukazuje da su ovi proizvodi ograničeno stabilni, odnosno veoma osetljivi na oksidaciju lipida. Tako, na primer, fino mleveni punomasni proizvodi od termički tretiranog zrna soje čija je vlaga iznad 11%, pogotovo iznad 15%, već nakon 24 h podležu oksidaciji lipida, praćenju porastom sadržaja konjugovanih diena i heksanala (Kim i sar., 1991).

Tabela 11. Sastav masnih kiselina sojinog ulja

Masna kiselina	Sadržaj (%)
C _{12:0} – Laurinska kiselina	-
C _{14:0} – Miristinska kiselina	< 0.5
C _{16:0} – Palmitinska kiselina	7-12
C _{18:0} – Stearinska kiselina	2-5.5
C _{20:0} – Arahinska kiselina	1.0
C _{22:0} – Behenska kiselina	0.5
C _{16:1} – Palmitooleinska kiselina	< 0.5
C _{18:1} – Oleinska kiselina	20-50
C _{18:2} – Linolna kiselina	35-60
C _{18:3} – Linolenska kiselina	2-13
C _{20:4} – Arahidonska kiselina	1.0

Božovićeva i saradnici (1992) su ustanovili da prilikom procesa ekstruzije dolazi do promena u sadržaju masnih kiselina ulja soje, mada je mogućnost da do oksidativnih promena tokom procesa dođe minimalna, s obzirom na odsustvo atmosferskog kiseonika u zatvorenom sistemu ekstrudera. Sadržaj masnih kiselina ulja sirove i ekstrudirane soje prikazan je u tabeli 12 (Božović i sar., 1992).

Tabela 12. Sadržaj masnih kiselina ulja sirove i ekstrudirane soje

Uzorak	C _{16:0} (%)	C _{18:0} (%)	C _{18:1} (%)	C _{18:2} (%)	C _{18:3} (%)
Sirova soja	10.591	3.663	23.294	54.345	8.106
Ekstrudirana soja	11.969	3.848	21.592	54.073	7.618

Stabilnost punomasnog ekstrudiranog sojinog griza zavisi od kvaliteta polazne sirovine i temperature ekstrudiranja (Estelecki, 1990), kao i od uslova skladištenja i načina rukovanja proizvodom. Relativno izražena osetljivost ekstrudiranih proizvoda na proces oksidacije lipida uslovljena je niskim sadržajem vlage, povećanom dodirnom površinom i povišenim sadržajem gvožđa (Camire i Dougherty, 1998).

Jedan od faktora koji doprinosi stabilnosti punomasnih proizvoda od zrna soje je sadržaj antioksidativnih materije soje – vitamina E (α -tokoferola), vitamina A, karotinoida i polifenola soje.

Sadržaj α -, γ - i δ -tokoferola u sojinom ulju prikazan je u tabeli 13 (Perkins, 1995).

Tabela 13. Sadržaj α -, γ - i δ -tokoferola u sojinom ulju

Tokoferoli	Sadržaj (mg/100 g)
α -tokoferol	9-12
γ -tokoferol	74-102
δ -tokoferol	24-30
Ukupni	113-145

Vitamin E, najvažniji liposolubilni antioksidant soje, obezbeđuje oksidativnu stabilnost sojinog ulja (Chow i Drapper, 1974). Porast sadržaja nezasićenih masnih kiselina sojinog ulja praćen je porastom sadržaja α -tokoferola s ciljem očuvanja stabilnosti ulja (Shmulovich, 1994).

Prema navodima Albersa (1997), proces ekstrudiranja snižava sadržaj vitamina E i A za 20% u odnosu na sadržaj ovih vitamina u sirovoj soji, pri čemu vreme tretiranja značajnije utiče na sadržaj vitamina od primenjene temperature.

Smoje i saradnici (1996) navode da se pri ekstrudiranju gubi 20-40% vitamina C, zbog relativno visokog sadržaja gvožđa u zrnu soje, koje doprinosi ovim gubicima.

Metanolni ekstrakti mejua i doenjanga (proizvodi dobijeni fermentacijom soje) frakcionisani su i testirani kao antioksidanti tokom oksidacije linolne kiseline (Kim i sar., 1994). Jedna frakcija je sadržala fenolne kiseline – kafenu (70% od ukupnih fenolnih kiselina), hlorogensku, ferulnu, vanilnu i *p*-kumarinsku kiselinu, dok je druga sadržala izoflavone soje. Obe frakcije su pokazale podjednak antioksidativni efekat u ispitivanom sistemu.

Pratt (1980) navodi da se u antioksidativne materije soje ubrajaju i fenolne kiseline, pre svega kafena, hlorogenska i ferulna kiselina, ali da su dominantni antioksidanti soje izoflavoni.

Antioksidativna svojstva pokazuju i fosfolipidi soje, odnosno lecitin, koji, ukoliko se dodaje u biljna ulja, deluje u sinergizmu sa tokoferolima (Reblova i sar., 1991). Fosfatidil-etanol-amin izolovan iz soje ostvaruje sinergistički efekat sa tokoferolom zahvaljujući primarnim amino-grupama ovog jedinjenja, koje služe kao donori H-atoma tokoferil-radikalima (Totani, 1997).

Esaki i saradnici (1996) su nedavno otkrili novu antioksidativnu materiju u tempehu, identifikujući je kao 3-hidroksi-antranilnu kiselinu. Ona je karakteristična samo za proizvode dobijene fermentacijom soje.

Biohemijska i epidemiološka ispitivanja, kao i ogledi sa životinjama, ukazuju na ulogu soje, odnosno nekih njenih komponenti, u prevenciji hroničnih bolesti, kao, na primer, raka, osteoporoze i kardiovaskularnih bolesti (Messina i sar., 1994; Adlercreutz, 1995; Barrett, 1996). Efekti koje soja ispoljava vezani su za niz fitojedinjenja soje – saponine, fitate, tokoferole, ali posebno izoflavone (Pratt i Birac, 1979; Setchell i sar., 1987; Coward i sar., 1993; Franke i sar., 1994).

2.5.1. IZOFLAVONI SOJE

Izoflavoni su karakteristični sekundarni metaboliti leguminoza, koji dominiraju u podfamiliji *Papilionoideae* (Williams i Harborne, 1988).

Izoflavoni nastaju iz flavonona aril-migracijom po do danas nedovoljno poznatom mehanizmu (Hakamatsuka i Sankawa, 1993).

Smatra se da izoflavoni soje funkcionišu kao podstrekači gena za isključavanje korena soje bakterijske flore zemljišta (Spaink, 1995) ili kao prekursori pterokarpanskih fitoaleksina – gliceolina I-III (Ebel i Grisebach, 1988).

Najvažniji izoflavoni soje, daidžin i genistin i njihovi aglikoni, daidžein i genistein, izolovani su i identifikovani iz sojinog brašna 1941. godine (Walter, 1941). Treći izoflavon soje, glicitein (6-metoksi-daidžein), kao i njegov 7-O- β -glukozid, glicitin, otkriveni su znatno kasnije (Naim i sar., 1973).

Glicitein je identifikovan u nekim vrstama soje (Naim i sar., 1973; Eldridge, 1982), ali ne svim (Wang i Murphy, 1994b).

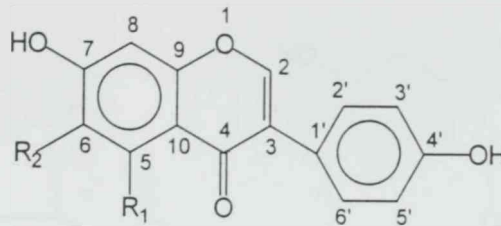
Dalja istraživanja raznolikosti struktura sojinih izoflavona dovela su do otkrića 6"-O-acetil-daidžina (Ohta i sar., 1979) i 6"-O-acetil-genistina (Kudou i sar., 1991b), izolovanih iz zrna soje. Farmakalidis i Murphy (1985) su iste glikozide izolovali i iz obezmašćenih tostovanih sojinih ljuspica.

Malonil-glikozidi, 6"-O-malonil-daidžin, 6"-O-malonil-genistin i 6"-O-malonil-glicitin, otkriveni su u zrnu soje i za njih je potvrđeno da su termolabilna jedinjenja (Kudou i sar., 1991a; Park i sar., 1992).

Najnovija istraživanja koja su izveli Wang i Murphy (1994a; 1994b; 1996) pokazala su da zrno soje u najvećoj meri sadrži 6"-O-malonil-genistin (25-42% od ukupnih izoflavona), genistin, 6"-O-malonil-daidžin i daidžin. Isti autori navode da ova četiri izoflavona čine 83-93% od ukupnih izoflavona sojinog zrna.

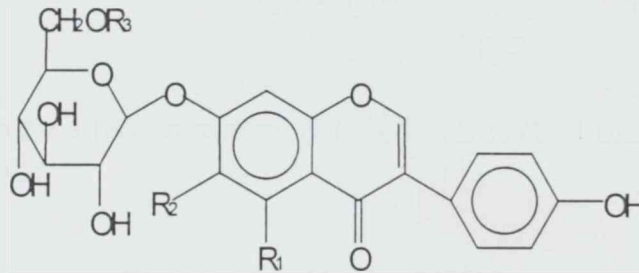
Strukture izoflavona zrna soje prikazane su na slici 19.

AGLIKONI



- Daidžein ($R_1=H$; $R_2=H$)
 Genistein ($R_1=OH$; $R_2=H$)
 Glicitein ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$)

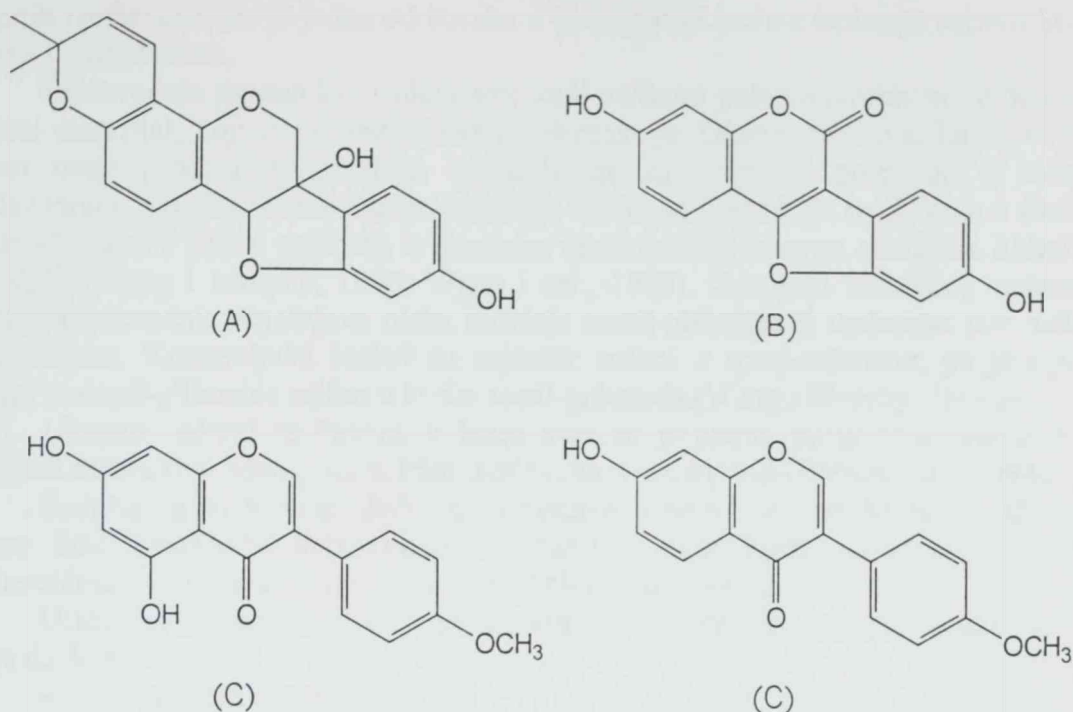
GLIKOZIDI



- Daidžin ($R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$)
 Genistin ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$)
 Glicitin ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=H$)
 6''-O-Acetilaidžin ($R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=COCH_3$)
 6''-O-Acetilgenistin ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=COCH_3$)
 6''-O-Acetilglicitin ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=COCH_3$)
 6''-O-Malonilaidžin ($R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=COCH_2COOH$)
 6''-O-Malonilgenistin ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=COCH_2COOH$)
 6''-O-Malonilglicitin ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=COCH_2COOH$)

Slika 19. Strukture izoflavona zrna soje

Gliceolin I, pterokarpanski izoflavonoid (slika 20A) i njegovi izomeri identifikovani su u zrnu soje nakon mikrobiološke infekcije i tokom narastanja stresnih faktora (Paxton, 1995). Kumestrol (slika 20B) je još jedan od izoflavonskih derivata prisutnih u soji (Lookhart i sar., 1978), ali njegovo prisustvo nije potvrđeno u svim ispitivanjima sadržaja izoflavona soje (Coward i sar., 1993; Barnes i sar., 1994a; Franke i sar., 1994). Izoflavoni koji su veoma retko prisutni u zrnu soje ili proizvodima od soje su biohanin A (slika 20C) i formononetin (slika 20D) (Pettersson i Kiessling, 1984; Wang i sar., 1990; Franke i sar., 1998).



Slika 20. Gliceolin I (A), kumestrol (B), biohanin A (C) i formononetin (D) iz zrna soje

Najviše koncentracije izoflavona su u hipokotiledonu sojinog zrna. One su oko četiri puta više od onih u kotiledonu (Kudou i sar., 1991a), dok u ljuski soje izoflavona skoro i nema (Eldridge i Kwolek, 1983).

Sadržaj izoflavona u sojinom zrnu varira od 1000-4000 mg/kg (Eldridge i Kwolek, 1983; Coward i sar., 1993; Franke i sar., 1994; Wang i Murphy, 1994a; Choi i sar., 1996; Wang i Liu, 1998) i zavisi od niza faktora, kao što su genetski, uslovi sredine i vreme žetve (Barnes i sar., 1994a; Wang i Murphy, 1994a; Tsukamoto i sar., 1995). Klimatski uslovi, pogotovo temperaturni nivoi i količine padavina, značajnije utiču na sadržaj izoflavona u soji od kvaliteta zemljišta, odnosno lokacije (Wang i Murphy, 1994a; Yi i sar., 1997).

Sirova soja uzgajana u Japanu sadrži 4.6 mg/kg genisteina i 200.6 mg/kg genistina (Fukutake i sar., 1996), dok su sadržaji ovih izoflavona u soji gajenoj u SAD daleko viši – ona sadrži 15-45 mg/kg genisteina i 330-888 mg/kg genistina (Wang i Murphy, 1994a).

Proces prerade soje ne mora bitno da utiče na sadržaj izoflavona (Coward i sar., 1993; Franke i sar., 1994; Wang i Murphy, 1994b). Tako, na primer, proces proizvodnje sojinog brašna, koji podrazumeva obezmaščivanje oljuštenih sojinih ljuspica i mlevenje do granulacije koja omogućava da 97% brašna prođe kroz otvore sita od 100 mesha, skoro da uopšte ne utiče na promenu sadržaja izoflavona (Wang i Murphy, 1994b).

Dominantni izoflavoni u zrnu soje su 6"-O-malonil-glikozidi, dok su u hrani koja je tretirana zagrevanjem bez dodatka vode ili pare ili je intenzivno kuvana prisutni 6"-O-acetil-glikozidi u visokim koncentracijama, nastali dekarboksilacijom termolabilnih malonil-glikozida (Kudou i sar., 1991a; Coward i sar., 1993; Wang i Murphy, 1996).

U granuliranoj hrani od soje i teksturiranim proizvodima upravo dominiraju 6"-O-acetil-genistin i 6"-O-acetil-daidžin, verovatno nastali usled termičkog tretmana tokom procesa ekstruzije (Wang i Murphy, 1994b). Pržena soja poseduje sličan profil izoflavona, kao posledicu intenzivnog termičkog tretmana sirove soje.

Proces proizvodnje proteinskih koncentrata soje vodi bitnom sniženju sadržaja ukupnih izoflavona, jer je jedan od koraka u proizvodnji izolata ispiranje sojinih ljuspica vodom ili alkoholom.

Proizvodnja proteinskih izolata soje vodi velikom gubitku izoflavona u odnosu na polazni materijal, koji je posledica alkalne ekstrakcije. Obezmaščivanje, kao prvi korak tokom ovog procesa proizvodnje, ne utiče na zastupljenost pojedinih u ukupnim izoflavonima. Alkalna ekstrakcija prouzrokuje bitan pad u sadržaju izoflavona u finalnom proizvodu, kao i porast aglikona u ukupnim izoflavonima izazvan alkalnom hidrolizom glikozida (Wang i Murphy, 1996; Wang i sar., 1998). Odsustvo termičkog tretmana u procesu proizvodnje objašnjava niske sadržaje acetil-glikozida u izolatima soje sušenim smrzanjem. Komercijalni izolati su najčešće sušeni u sprej-sušarama, pa je i njihov sadržaj malonil-glikozida snižen u korist acetil-glikozida (Wang i Murphy, 1994b).

Ukupan sadržaj izoflavona u hrani koja se priprema intenzivnim kuvanjem ili prženjem menja se u odnosu na sadržaj izoflavona u sirovoj soji (Barnes i sar., 1994a).

Sadržaj aglikona u ukupnim izoflavonima u hrani od soje kreće se od 1-12%, izuzev kod proizvoda dobijenih fermentacijom, kod kojih aglikoni u ukupnim izoflavonima dominiraju (Wang i Murphy, 1994b; Fukutake i sar., 1996).

Uticaj izoflavona na zdravlje konzumenata hrane na bazi soje podrazumeva da oni mogu da deluju kao:

- estrogeni ili antiestrogeni;
- kooperatori u supresiji osteoporoze;
- elementi u prevenciji faktora rizika srčanih oboljenja;
- elementi u reduciranju rizika od kancera.

Estrogena funkcija izoflavona objašnjava se njihovom sposobnošću da se vežu za estrogene receptore, verovatno zbog strukturne sličnosti steroidnim estrogenima (Böhm i Franke, 1996). Ispoljavanje fitoestrogene prirode ovih jedinjenja javlja se u postmenstrualnom periodu, kada su oni u stanju da reduciraju simptome menopauze, kao, na primer, valunge (Murkies i sar., 1995). Suprotne, antiestrogene karakteristike, beleže se kod žena pred menopauzom, kod kojih se izoflavoni konkurentno vežu za estrogene receptore (Cassidy i sar., 1994). Dodatni mehanizam koji objašnjava antiestrogenu prirodu izoflavona odnosi se na regulaciju vezivanja seksualnih hormona za globulin (Mousavi i Adlercreutz, 1993), kao i regulaciju nivoa enzima neophodnih za biosintezu estrogena – aromataze (Adlercreutz i sar., 1993) i hormon-specifičnih oksidoreduktaza (Mäkelä i sar., 1995).

Izoflavoni soje deluju kao fitoestrogeni, povećavajući čvrstinu kostiju ovarijaktomisanih pacova hranjenih obrocima na bazi soje, pa su potencijalno korisni u prevenciji ili lečenju osteoporoze (Arjmandi i sar., 1996).

Prisustvo izoflavona u obrocima na bazi soje snižava LDL-holesterol (Anthony, 1996), supresira oksidaciju LDL (Puurunen i sar., 1994; Tikkanen i sar., 1998) i smanjuje agregaciju trombocita (Kanazawa i sar., 1995), odnosno snižava faktore rizika srčanih oboljenja. Hodgson i saradnici (1996) i Yokota i saradnici (1996) navode da genistein i daidžein snižavaju rizik od kardiovaskularnih oboljenja.

Tokom poslednjih godina sprovedena su mnogobrojna epidemiološka ispitivanja (Adlercreutz i sar., 1992; 1995), ogledi sa životinjama (Barnes i sar., 1990; Sharma i sar., 1992; Wei i sar., 1993; Hendrich i sar., 1994), kao i *in vitro* ispitivanja (Adlercreutz i sar., 1992; Wei i sar., 1993), na osnovu kojih se mogao izvesti generalni zaključak – soja je bitan element u prevenciji kancerogenih oboljenja.

Ispitivanjem zastupljenosti kancerogenih oboljenja u Aziji i SAD došlo se do zaključka da populacija Azije daleko slabije podleže ovim oboljenjima (Coward i sar., 1993). Rezultat ovih ispitivanja dovodi se u vezu sa načinom ishrane stanovništva Azije,

koja se temelji na proizvodima od soje daleko više nego ishrana Amerikanaca. Genistein i daidžein se smatraju odgovornim za sniženje rizika od kancera (Barnes i sar., 1994b; Messina i sar., 1994;).

Barrett (1996) je dokazao da napredovanje kancera dojke, prostate, debelog creva, rektuma, želuca, jetre i kože može značajno da se suzbije konzumiranjem hrane na bazi soje ili dodavanjem daidžeina i genisteina u obroke.

Epidemiološki podaci nekoliko studija ukazuju da je snižavanje incidence nekih tumora, posebno dojke i prostate, vezano za konzumiranje hrane od soje (Choi i sar., 1996).

Wei i saradnici (1995) navode da je prisustvo tostovanog sojinog brašna u obrocima glodara razlog smanjenju tumora mlečnih žlezda, izazvanim reduciranjem delovanja ornitin-dekarboksilaze i favorizovanjem aktivnosti glutation-transferaze, katalaze i protein-kinaze C, angažovanih u prevenciji kancera. Autori smatraju da je genistein odgovoran za utvrđena dejstva.

Mehanizmi koji objašnjavaju antikancerogeno delovanje soje objedinjuju antioksidativno delovanje izoflavona – "skevindžer" efekat (Wei i sar., 1993; 1995), efekat diferencijacije (Constantinou i Huberman, 1995), antiestrogenu aktivnost (Cassidy i sar., 1994) ili inhibiciju protein-tirozin-kinaze, topoizomerase i angiogeneze (Fotsis i sar., 1995).

Najnovija istraživanja Kima i saradnika (1996) i Fukutakea i saradnika (1996) upućuju na mogućnost korišćenja genisteina u hemoterapiji zbog njegove sposobnosti da inhibira neke enzime. Akiyama i saradnici (1987) identifikovali su genistein kao važno antikancerogeno jedinjenje, koje može da inhibira protein-tirozin-kinazu *in vitro*. Protein-histidin-kinaza iz ekstrakta ćelija kvasca inhibira se, takođe, genisteinom (Huang i sar., 1992).

Peterson i Barnes (1991) su ustanovili da genistein može da inhibira rast ćelija kancera dojke, dok daidžein i biohanin A deluju slabije. Genistein deluje antiproliferativno na rast ćelija kancera želuca (Matsukawa i sar., 1993).

Poslednja saopštenja Miyazawe i saradnika (1999) svedoče o potvrđenoj antimutagenoj aktivnosti genisteina i daidžeina u Ames i *umu* testovima.

Jha i saradnici (1985) ukazuju na antioksidativnu aktivnost izoflavona soje, posebno genisteina, pri mikrozomalnoj oksidaciji lipida u sistemu $Fe^{2+}/ADP/NADP$, dok su Kusonoki i saradnici (1992) došli do saznanja da stvaranje superoksid-anjon-radikala u neutrofilima može biti inhibirano genisteinom.

Antioksidativni karakter izoflavona soje čini ih važnim sa stanovišta medicine i ishrane, odnosno očuvanja kvaliteta hrane (Messina i Barnes, 1991). Doprinos ispravnosti hrane, odnosno njena adekvatna mikrobiološka slika, vezana je, takođe, za antifungalnu prirodu izoflavona soje (Weidenbörner i sar., 1990; Yi i sar., 1997).

Naim i saradnici (1976) navode da izoflavoni soje inhibiraju aktivnost lipoksigenaza i preventivno deluju na oksidativnu hemolizu eritrocita ovaca *in vitro*, pri čemu stepen inhibicije zavisi od hemijske strukture izoflavona.

Praćenjem brzine beljenja β -karotina u sistemu lipid-voda ustanovljeno je da zrno soje, obezmašćeno sojino brašno, proteinski koncentрати i izolati soje pokazuju antioksidativno dejstvo (Pratt i Birac, 1979).

Fleury i saradnici (1992) ispitali su uticaj malonil-izoflavona na oksidativnu stabilnost sistema β -karotin/linolna kiselina tokom UV indukovane oksidacije i pri temperaturi skladištenja 37 °C. Navedeni autori su ustanovili da malonil-izoflavoni deluju antioksidativno, čak bolje od BHA i BHT, ali ne i pri visokim temperaturama (100 °C), jer se razgradnjom inaktiviraju.

Berghofer i saradnici (1998) navode da su antioksidativne materije zrna soje, pored tokoferola, izoflavoni, koji su u najvećoj meri prisutni kao malonil-glikozidi. Ovi autori su ispitivali produženje indukcionog perioda oksidacije svinjske masti i suncokretovog ulja, izazvano dodavanjem sirove soje, oljuštene parom tretirane soje i tempeha, na 60 °C Schaalovim testom. Utvrdili su da proizvodi od soje dobijeni fermentacijom (tempeh) pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost, što upućuje na zaključak da su aglikoni soje, genistein i daidžein, najjači antioksidanti.

Iz tempeha je još 1964. godine izolovan, pored uobičajenih izoflavona, 6,7,4'-trihidroksi-izoflavon (György i sar., 1964), karakterističan samo za proizvode dobijene fermentacijom soje (Murakami i sar., 1984; Ikeda i sar., 1995). Murata (1988) ukazuje da ovaj izoflavon karakteriše izuzetan antioksidativni potencijal.

Ulje ekstrahovano iz tempeha pokazuje antioksidativnu aktivnost ukoliko se dodaje raznim biljnim uljima (Packett i sar., 1971).

Esaki i saradnici (1994) su pratili termički indukovanu oksidaciju lipida (40 °C) u natu, tempehu i misu, kao i pripadajućim parom tretiranim količinama soje pre fermentacije. Autori su ustanovili da proces fermentacije ne utiče bitno na sadržaj α -, β -, γ - i δ -tokoferola, te da su za više antioksidativne efekte u finalnim proizvodima odgovorni aglikoni izoflavona, odnosno genistein i daidžein.

Ulje tempeha je manje podložno oksidativnim promjenama od sojinog ulja zbog viših sadržaja aglikona i mogućeg prisustva proizvoda Maillardove reakcije u tom ulju (Murakami i sar., 1984).

Sirova, obezmaščena, pržena i obezmaščena i pržena soja su poslužile Kimu i saradnicima (1995) kao polazni materijal za ekstrakciju na hladno (30 °C) i refluks-ekstrakciju (85 °C) primenom različitih rastvarača (voda, etanol, metanol, aceton, hloroform, benzen, etil-acetat, etar, dihlormetan, heksan). Autori su ekstrakte aplicirali na sojino ulje podvrgnuto oksidaciji na 105 °C tokom 10 h, da bi, potom, antioksidativni karakter ekstrakata ocenjivali praćenjem TBA-vrednosti. Metanolni ekstrakti pržene i obezmaščene i pržene soje dobijeni refluks-metodom pokazali su najjači antioksidativni efekat.

Santiago i saradnici (1992) su ustanovili, primenom ESR spektrometrije i "spin-trapning" tehnike, da miso poseduje komponente koje deluju kao hvatači DPPH-, hidroksi-, superoksid-anjon- i alkil-radikala. TBA-testom je, takođe, dokazano da miso deluje kao inhibitor oksidacije lipida. Pretpostavlja se da vitamin E, izoflavoni i saponini iz misa mogu da deluju kao "skevindžeri" ispitivanih slobodnih radikala.

Oksidacija linolne kiseline, indukovana peroksi-radikalima nastalim u prisustvu 2,2'-azobis(2-aminopropan) hidrohlorida (AAPH) ili UV zračenjem, inhibirana je u prisustvu genisteina. Ovaj izoflavon nije uticao na formiranje konjugovanih diena, ali se pokazao uspešnim u reduciranju sadržaja vodonik-peroksida (Record i sar., 1995).

3.0.0. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalni deo ovoga rada urađen je u laboratorijama Zavoda za tehnologiju stočne hrane, Odeljenja za organsku hemiju i Zavoda za tehnologiju mesa Tehnološkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i laboratoriji Instituta za stočarstvo Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu.

Svi reagensi i hemikalije upotrebljeni u eksperimentalnom radu bili su analitičke čistoće. Metil-linoleat, *N-terc*-butil- α -fenilnitron (PBN), genistein, daidžein, tripsin (EC 3.4.21.4, tip III), *N* α -benzoil-DL-arginin-*p*-nitroanilid, aluminijum-oksidi (stepen aktivnosti I, tip WN-3, neutralan), natrijum-fitat (tip V) i standardi aminokiselina proizvedeni su u Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. β -Karotin je dobijen od firme Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley, NJ, linolenska kiselina je proizvod firme Fluka AG, 2,2-tiodietilen-glikol proizvod firme Carlo Erba, S.p.A., Milano, a kaprilna kiselina poklon firme Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA.

Ninhidrin, titan(III)-hlorid, etilen-glikol-monometiletar, kao i DL- α -tokoferol proizvedeni su u firmi Merck, Darmstadt, Germany.

Rastvarači za HPLC analize (metanol, acetonitril, glacijalna sirćetna kiselina) su bili HPLC stepena čistoće, Merck, Darmstadt, Germany.

Ostale hemikalije su proizvodi firme Merck, Darmstadt, Germany.

Za pripremu prirodnih sistema I i II korišćeno je komercijano sojino ulje nabavljeno u lokalnom marketu.

Ekstrudirani sojin griz (SOPROEX-PESG/SH) dobijen je od Deoničkog društva za preradu soje "Sojaprotein" iz Bečeja.

Hidrotermički tretirano zrno soje dobijeno je od PIK "Agrobanat", RJ "Sojara" iz Plandišta.

Sirova soja dobijena je od oba proizvođača punomasnih hraniva od zrna soje.

3.1.0. ODREĐIVANJE KVALITETA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE

Osnovni hemijski sastav (vlaga, sirovi proteini, sirova mast, sirova celuloza, mineralne materije) zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje određen je po metodama A.O.A.C. (1984).

Aminokiselinski sastav ispitivanih uzoraka određen je na aminoanalizatoru Biotronic LC 5001. Uzorci su hidrolizovani 6 mol/dm³ hlorovodoničnom kiselinom tokom 23 h na temperaturi 110 °C. Cistin i metionin su prethodno oksidovani permravljom kiselinom (15 h na 2 °C) (Moore, 1963).

Sadržaj tripsin inhibitora u zrnu soje i punomasnim hranivima od zrna soje određen je po metodi Hamerstanda i saradnika (1981).

Aktivnost ureaze u ispitivanim uzorcima određena je po metodi propisanoj Internacionalnim standardom ISO 5506 (1988).

Indeks rastvorljivosti azota (Nitrogen Solubility Index – NSI) određen je po metodi A.O.C.S. (1973).

3.2.0. PRIPREMA EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE

3.2.1. PRIPREMA EKSTRAKATA ZRNA SOJE, EKSTRUDIRANOG SOJINOG GRIZA I HIDROTERMIČKI TRETIRANOG ZRNA SOJE NAMENJENIH ISPITIVANJIMA U MODEL SISTEMIMA I I II

U 50 g samlevenog sirovog zrna soje dodato je 250 cm³ n-heksana. Ekstrakcija je vršena uz intenzivno mešanje na sobnoj temperaturi tokom 5 h. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter-papir (Whatman No 41), a postupak je nakon toga ponavljan još dva puta sa po 250 cm³ n-heksana. Sjedinjeni heksanski filtrati (3x250 cm³) upareni su na rotacionom vakuum uparivaču. Prinos heksanskog ekstrakta zrna soje iznosio je 15.76%.

Obezmašćenom sirovom zrnju soje (ostatak nakon ekstrakcije n-heksanom) dodato je 250 cm³ 96% etanola. Ekstrakcija je vršena uz intenzivno mešanje na sobnoj temperaturi tokom 5 h. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter-papir (Whatman No 41), a postupak je ponavljan još dva puta sa po 250 cm³ 96% etanola. Sjedinjeni etanolni filtrati upareni su na rotacionom vakuum uparivaču. Prinos etanolnog ekstrakta zrna soje iznosio je 4.89%.

Ostatku sirovog zrna soje nakon ekstrakcije etanolom dodato je 250 cm³ etil-acetata. Ekstrakcija je vršena trostepeno na isti način kao i u prethodnim slučajevima. Sjedinjeni etil-acetatni filtrati su upareni na rotacionom vakuum uparivaču. Prinos etil-acetatnog ekstrakta sirove soje iznosio je 0.19%.

Identični postupci ekstrakcije (iste vrste i količine ekstragenasa, sukcesivna ekstrakcija, sobna temperatura, 3x5 h) primenjeni su i u slučaju ekstrudiranog sojinog griza (50 g) i hidrotermički tretiranog zrna soje (50 g).

Prinosi ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza iznosili su:

- heksanski ekstrakt: 20.23%;
- etanolni ekstrakt: 4.21%;
- etil-acetatni ekstrakt: 0.14%.

Prinosi ekstrakata hidrotermički tretiranog zrna soje iznosili su:

- heksanski ekstrakt: 18.98%;
- etanolni ekstrakt: 5.03%;
- etil-acetatni ekstrakt: 0.27%.

3.2.2. PRIPREMA EKSTRAKATA EKSTRUDIRANOG SOJINOG GRIZA I HIDROTERMIČKI TRETIRANOG ZRNA SOJE NAMENJENIH ISPITIVANJIMA U PRIRODNIH SISTEMIMA I I II

Obezmaščivanje punomasnih hraniva od zrna soje. U 10 g hraniva (ekstrudiranog sojinog griza ili hidrotermički tretiranog zrna soje) dodato je 30 cm³ n-heksana. Ekstrakcija je vršena uz intenzivno mešanje na sobnoj temperaturi tokom 5 h. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter-papir (Whatman No 41), a postupak je nakon toga ponavljan još dva puta sa po 30 cm³ n-heksana. Sjedinjeni heksanski filtrati (3x30 cm³) upareni su na rotacionom vakuum uparivaču.

Ekstrakcija izoflavona. Iz obezmašćenih hraniva ekstrahovani su izoflavoni primenom tri različita rastvarača na sledeći način:

I Etil-acetatni ekstrakt: U 2 g obezmašćenog hraniva dodato je 2.0 cm^3 0.1 mol/dm^3 HCl i 10.0 cm^3 etil-acetata. Uzorak je ekstrahovan 2 h na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje.

II Etanolni ekstrakt: U 2 g obezmašćenog hraniva dodato je 2.0 cm^3 0.1 mol/dm^3 HCl i 10.0 cm^3 etanola. Uzorak je ekstrahovan 2 h na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje.

III Acetonitrilni ekstrakt: U 2 g obezmašćenog hraniva dodato je 2.0 cm^3 0.1 mol/dm^3 HCl i 10.0 cm^3 acetonitrila. Uzorak je ekstrahovan 2 h na sobnoj temperaturi uz intenzivno mešanje.

Prinosi ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza iznosili su:

- etil-acetatni ekstrakt: 1.77%;
- etanolni ekstrakt: 4.75%;
- acetonitrilni ekstrakt: 1.22%.

Prinosi ekstrakata hidrotermički tretiranog zrna soje iznosili su:

- etil-acetatni ekstrakt: 1.76%;
- etanolni ekstrakt: 4.57%;
- acetonitrilni ekstrakt: 1.21%.

3.3.0. MODEL SISTEMI

3.3.1. ISPITIVANJE TERMIČKE OKSIDATIVNE DEGRADACIJE METIL-LINOLEATA (MODEL SISTEM I)

Model sistem I dobijen je rastvaranjem 0.0213 g (0.12 mmol) PBN u 1.6 cm^3 (5 mmol) metil-linoleata. Reakciona smeša zagrevana je na temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

Nastajanje kiseonikovih slobodnih radikala ispitano je ESR analizom nakon reakcionog perioda od 24 h.

Da bi se ispitao uticaj ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na termičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata, dodavani su heksanski, etanolni i etil-acetatni ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat, u model sistem I pre zagrevanja na temperaturi od $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Promene intenziteta ESR signala praćene su nakon reakcionog perioda od 24 h.

3.3.2. ISPITIVANJE KATALITIČKE OKSIDATIVNE DEGRADACIJE METIL-LINOLEATA (MODEL SISTEM II)

Model sistem II dobijen je mešanjem 1.6 cm^3 (5 mmol) metil-linoleata, 0.0213 g (0.12 mmol) PBN i 0.0044 g (0.158 mmol) gvožđe(II)-sulfata.

Katalitička oksidativna degradacija metil-linoleata praćena je nastajanjem kiseonikovih slobodnih radikala nakon reakcionog perioda od 24 h.

Da bi se ispitao uticaj ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na katalitičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata, dodavani su heksanski, etanolni i etil-acetatni ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat, u model sistem II. Promene intenziteta ESR signala praćene su nakon reakcionog perioda od 24 h.

3.4.0. PRIRODNI SISTEMI

3.4.1. ISPITIVANJE TERMIČKE OKSIDATIVNE DEGRADACIJE SOJINOG ULJA (PRIRODNI SISTEM I)

Prirodni sistem I dobijen je rastvaranjem 0.0213 g (0.12 mmol) PBN u 2.0 cm³ (1.65 g) sojinog ulja. Reakciona smeša zagrevana je na temperaturi od 60 °C.

Nastajanje kiseonikovih slobodnih radikala ispitano je ESR analizom nakon reakcionog perioda od 24 h.

Da bi se ispitao uticaj ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na termičku oksidativnu degradaciju sojinog ulja, dodavani su etil-acetatni, etanolni i acetonitrilni ekstrakti ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na sojino ulje, u prirodni sistem I pre zagrevanja na temperaturi od 60 °C. Promene intenziteta ESR signala praćene su nakon reakcionog perioda od 24 h.

3.4.2. ISPITIVANJE KATALITIČKE OKSIDATIVNE DEGRADACIJE SOJINOG ULJA (PRIRODNI SISTEM II)

Prirodni sistem II dobijen je mešanjem 2.0 cm³ (1.65 g) sojinog ulja, 1.0 cm³ destilovane vode, 0.0213 g (0.12 mmol) PBN i 0.0013 g (0.005 mmol) gvožđe(II)-sulfata.

Katalitička oksidativna degradacija sojinog ulja praćena je nastajanjem kiseonikovih slobodnih radikala nakon reakcionog perioda od 24 h.

Da bi se ispitao uticaj ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na katalitičku oksidativnu degradaciju sojinog ulja, dodavani su etil-acetatni, etanolni i acetonitrilni ekstrakti ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na sojino ulje, u prirodni sistem II. Promene intenziteta ESR signala praćene su nakon reakcionog perioda od 24 h.

3.5.0. DETEKCIJA KISEONIKOVIH SLOBODNIH RADIKALA U MODEL I PRIRODNIH SISTEMIMA

Elektron spin rezonantna određivanja kiseonikovih slobodnih radikala u ispitivanim model (I i II) i prirodnim (I i II) sistemima izvršena su "spin-trapping" tehnikom na ESR spektrometru Bruker 300E pri sledećim radnim karakteristikama:

- frekvencija modulacije	100.000 KHz
- amplituda modulacije	0.204 G
- vremenska konstanta	327.68 ms
- vremenski opseg merenja	1310.72 ms
- centar polja	3440.00 G
- ukupan opseg merenja	100.00 G
- frekvencija mikrotalasnog područja	9.64 GHz
- snaga mikrotalasnog područja	20 mW
- temperatura merenja	23 °C

Za detekciju kiseonikovih slobodnih radikala tokom termičke i katalitičke oksidacije metil-linoleata i sojinog ulja primenjena je jačina struje (receiver gain) od $1.00e+03$.

Uzorci reakcionih smeša prilikom snimanja su se nalazili u standardnoj Bruker ER-160FC kvarcnoj kivetu za vodene rastvore.

3.6.0. ODREĐIVANJE SADRŽAJA ANTIOKSIDATIVNIH MATERIJA U ZRNU SOJE, PUNOMASNIM HRANIVIMA OD ZRNA SOJE I ISPITIVANIM EKSTRAKTIMA

3.6.1. ODREĐIVANJE SADRŽAJA α -TOKOFEROLA

Određivanje sadržaja α -tokoferola (vitamina E) u zrnu soje, punomasnim hranivima od zrna soje i njihovim heksanskim ekstraktima vršeno je po metodi BASF, prezentiranoj u "Estimation of Vitamins and Carotenoids in Premixes and Feeds" pod brojem MAE/EC 1/1990.

Saponifikacija i ekstrakcija α -tokoferola:

Odmerenih oko 10 g uzorka preneto je u tikvicu sa okruglim dnom od 250 cm^3 i pomešano sa 40 cm^3 metanola, 10 cm^3 50% rastvora natrijum-hidroksida, 2 cm^3 10% rastvora natrijum-askorbata, nekoliko kapi n-heksana i 10 mg *terc*-butil-4-hidroksitoluola (BHT). Tikvica je vezana za refluks hladnjak pod strujom azota, postavljena u vodeno kupatilo i sadržaj saponifikovan 20 minuta na temperaturi od $90 \text{ }^\circ\text{C}$ u atmosferi azota. Ohlađeni sadržaj je ekstrahovan četiri puta sa po 100 cm^3 petrol-etra ($40\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$). Ekstrakti su ispirani zasićenim rastvorom natrijum-hlorida i destilovanom vodom do neutralne reakcije. Sjedinjeni ekstrakti su upareni na rotacionom vakuum-uparivaču do suva ($50 \text{ }^\circ\text{C}$). Suvi ostatak je rastvoren u metanolu (HPLC stepena čistoće) i kvantitativno prenet u odmerni sud od 10 cm^3 , pa dopunjen navedenim rastvaračem do marke. Alikvot metanolnog ekstrakta prenet je u vijalu korišćenjem filter-pipeta.

Kvantifikacija α -tokoferola HPLC metodom:

Određivanje sadržaja α -tokoferola izvršeno je na HPLC aparatu Hewlett-Packard 1090 pri sledećim radnim karakteristikama:

- detektor: DAD (Diode Array Detector)
- kolona: ODS HYPERSIL ($5 \mu\text{m}$)
- mobilna faza: metanol
- injekcioni volumen: $25 \mu\text{l}$
- protok: 0.80 ml/min
- vreme: 7 min
- temperatura kolone: ambijentalna ($25 \text{ }^\circ\text{C}$)

DL- α -tokoferol je korišćen kao standard. Absorbancija je merena na 286 nm .

3.6.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA β -KAROTINA I UKUPNIH KSANTOFILA

Određivanje sadržaja β -karotina i ukupnih ksantofila u zrnju soje, punomasnim hranivima od zrna soje i njihovim heksanskim ekstraktima vršeno je po A.O.A.C. metodi, broj 43.018 (1984), predviđenoj za određivanje sadržaja β -karotina i ukupnih ksantofila u stočnoj hrani.

3.6.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA GENISTEINA I DAIDŽEINA

Određivanje sadržaja nekih izoflavona, odnosno genisteina i daidžeina u zrnju soje, punomasnim hranivima od zrna soje i njihovim etanolnim ekstraktima vršeno je po metodi Wanga i Murphy (1994b) uz neke aparativne i proceduralne razlike.

Ekstrakcija izoflavona iz zrna soje i punomasnih hraniva:

Oko 2-2.5 g samlevenog uzorka (odmerenog sa 0.0001 g tačnosti) je prethodno obezmašćeno n-heksanom ili dietiletom, osušeno na vazduhu i, potom, kvantitativno preneto u Erlenmajer bocu od 125 cm³ sa brušenim zapašaćem. Uzorku je dodato 10 cm³ acetonitrila i 2 cm³ 0.1 mol/dm³ HCl i mešano je magnetnom mešalicom 2 h na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter-papir (Whatman No 41) i uparen na rotacionom vakuum-uparivaču do suva na temperaturi nižoj od 30 °C. Suvi ostatak je rastvoren u 80% metanolu (HPLC stepena čistoće) u vodi korišćenjem ultrazvučnog kupatila i kvantitativno prenet u odmerni sud od 10 cm³, pa dopunjen navedenim rastvaračem do marke.

Etanolni ekstrakti zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva (10-20 mg, sa tačnošću od 0.0001 g) su direktno rastvoreni u 80% metanolu (HPLC stepena čistoće) u vodi korišćenjem ultrazvučnog kupatila i kvantitativno preneti u odmerne sudove od 10 cm³, pa dopunjeni navedenim rastvaračem do marke.

Detekcija i kvantifikacija genisteina i daidžeina HPLC metodom:

Detekcija i kvantifikacija izoflavona genisteina i daidžeina izvršena je na HPLC aparatu Hewlett-Packard 1090 pri sledećim radnim karakteristikama:

- detektor: DAD (Diode Array Detector)
talasna dužina 254/4 nm ref. 550/100 nm
- kolona: HYPERSIL-MOS (200 x 2.1 mm i.d.)
- mobilna faza: Rastvor A: 0.1% rastvor glacijalne sirćetne kiseline u vodi
Rastvor B: 0.1% rastvor glacijalne sirćetne kiseline u acetonitrilu
Linearni gradijent: početak – 85% rastvora A i 15% rastvora B
Udeo rastvora B tokom 50 minuta analize raste od 15% do 35%, da bi poslednjih 10 minuta analize ostao konstantan – 35%.
- injekcioni volumen: 10 μ l
- protok: 0.150 ml/min
- vreme: 60 min
- temperatura kolone: ambijentalna (25 °C)

3.6.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA

Određivanje sadržaja ukupnih polifenola u zrnju soje, punomasnim hranivima od zrna soje i njihovim etanolnim ekstraktima vršeno je po A.O.A.C. metodi (1984). Kalibraciona kriva je konstruisana na osnovu absorbancija serije standardnih rastvora genisteina.

3.6.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA FITINSKE KISELINE

Sadržaj fitinske kiseline u zrnju soje, punomasnim hranivima od zrna soje i njihovim etanolnim ekstraktima određen je po metodi Hauga i Lantzscha (1983), izvorno namenjenoj brzom određivanju fitata u žitaricama i proizvodima od žitarica.

Uzorci zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje su prethodno obezmaščivani n-heksanom.

Priprema rastvora:

- (1) *Osnovni rastvor.* Natrijumova so fitinske kiseline koristi se bez dodatnih prečišćavanja. Sadržaj fitinske kiseline potrebno je odrediti za svaku isporuku navedenog standarda primenom neke direktne metode. Osnovni rastvor treba da sadrži 0.15 g natrijum-fitata u 100 cm³ destilovane vode. Ovaj rastvor je stabilan u odsustvu fitaza.
- (2) *Serijski standardni rastvori.* Standardni rastvori se pripremaju razblaživanjem osnovnog rastvora hlorovodoničnom kiselinom u koncentracionom opsegu 3-30 µg/cm³ fitinskog fosfora. Finalna koncentracija HCl u seriji osnovnih rastvora treba da iznosi 0.2 mol/dm³.
- (3) *Rastvor Fe(III).* Rastvori se 0.2 g gvožđe(III)-amonijum-sulfata×12H₂O u 100 cm³ 2 mol/dm³ HCl i dopuni destilovanom vodom do 1000 cm³.
- (4) *Rastvor 2,2'-bipiridina.* Rastvori se 10 g 2,2'-bipiridina u 10 cm³ tioglikolne kiseline i dopuni destilovanom vodom do 1000 cm³.

Ovi rastvori su stabilni nekoliko meseci na sobnoj temperaturi.

Postupak:

Odmereno je 0.2 g obezmašćenog uzorka zrna soje ili punomasnog hraniva od zrna soje i ekstrahovano sa 100 cm³ 0.2 mol/dm³ HCl tokom 3 h na sobnoj temperaturi pri 60 obrtaja/min. Bistar ekstrakt je dobijen filtriranjem kroz kvalitativni filter-papir (Whatman No 41).

Etanolni ekstrakti (0.2 g) su direktno rastvoreni u 100 cm³ 0.2 mol/dm³ HCl.

Otpipetiranih 0.5 cm³ ekstrakta je preneto u staklenu epruvetu sa brušenim zapušačem u koju je dodat 1 cm³ rastvora 3. Zatvorena epruveta je držana na vodenom kupatilu 30 minuta, a potom hlađena u ledenom kupatilu 15 minuta i ostavljena van njega da postigne sobnu temperaturu.

Dalji tok analize pratio je varijantu B originalne metode Hauga i Lantzscha (1983), koja ne zahteva centrifugiranje rastvora sa talogom feri-fitata. Naime, u epruvetu je nakon postizanja sobne temperature dodato 2 cm³ rastvora 4 i sadržaj je promešan. Apsorbancija je merena nakon tačno definisanog vremena (1 minut) na 519 nm.

Opisani postupak je primenjen i na seriju standardnih rastvora natrijum-fitata, kako bi se konstruisala kalibraciona kriva.

3.7.0. SELEKTIVNO KVALITATIVNO ODREĐIVANJE IZOENZIMA LIPOKSIGENAZA (LOX-1, LOX-2 I LOX-3) U ZRNU SOJE, PUNOMASNIM HRANIVIMA OD ZRNA SOJE I HEKSANSKIM EKSTRAKTIMA

Selektivno kvalitativno određivanje izoenzima lipoksigenaza (LOX-1, LOX-2 i LOX-3) u zrnu soje, punomasnim hranivima od zrna soje i heksanskim ekstraktima izvršeno je u skladu sa vizuelnom varijantom metode Sude i saradnika (1995), uz modifikaciju metode koja se odnosila na supstrat.

Priprema supstrata:

Za razliku od originalne metode, koja propisuje natrijum-linoleatni supstrat, korišćen je natrijum-linolenatni supstrat.

Natrijum-linolenatni supstrat (10 mmol) dobijen je homogenizovanjem 0.0696 g linolenske kiseline sa 4 cm³ destilovane vode. U homogenat je dodato 0.55 cm³ 0.5 mol/dm³ natrijum-hidroksida i rastvor je kvantitativno prenet u odmerni sud od 25 cm³ sa destilovanom vodom, pa dopunjen do marke.

Priprema 50%-no zasićenog rastvora β-karotina u acetonu:

Oko 0.0100 g β-karotina rastvoreno je u 10 cm³ acetona. Nakon intenzivnog mešanja i centrifugiranja narandžasto obojeni supernatant razblažen je identičnom zapreminom acetona i ostavljen da stoji na temperaturi od 4 °C u tamnoj boci. Ovaj rastvor je nepostojan i priprema se uvek svež.

Test I (dokaz prisustva LOX-1)

- (1) 0.0025 g uzorka odmereno je u epruvetu;
- (2) 0.5 cm³ destilovane vode je dodato, smeša je lagano promešana i ostavljena da stoji 3-10 minuta;
- (3) bojeni supstrat pripremljen je mešanjem 25 cm³ 200 mmol natrijum-boratomnog pufera (pH 9.0), 5 cm³ 100 μmol metilen plavog, 5 cm³ 10 mmol natrijum-linolenatnog supstrata i 5 cm³ destilovane vode u odmernom sudu od 100 cm³ (za 20 uzoraka);
- (4) 2 cm³ bojenog supstrata (3) dodato je u epruvetu sa uzorkom;
- (5) boja je proverena nakon 3 minuta.

Obezbojavanjem bojenog supstrata testa I dokazano je prisustvo LOX-1 u ispitivanom uzorku.

Test II (dokaz prisustva LOX-2)

Test je podrazumevao istu proceduru kao i test I, izuzev sledećih modifikacija:

- (1) 0.0050 g uzorka odmereno je u epruvetu;
- (2) –
- (3) 0.15425 g ditiotrietola odmereno je u odmerni sud od 100 cm³, dodato je 25 cm³ 200 mmol natrijum-fosfatnog pufera (pH 6.0), 5 cm³ 100 μmol metilen plavog, 5 cm³ acetona i 5 cm³ 10 mmol natrijum-linolenatnog supstrata (bojeni supstrat za 20 uzoraka);
- (4) –
- (5) boja je proverena nakon 5 minuta.

Obezbojavanjem bojenog supstrata testa II dokazano je prisustvo LOX-2 u ispitivanom uzorku.

Test III (dokaz prisustva LOX-3)

Test je podrazumevao istu proceduru kao i test I, izuzev sledećih modifikacija:

- (1) –
- (2) 0.5 cm³ ekstrakta uzorka soje koja je sadržala samo izoenzim LOX-2, pripreman centrifugiranjem 0.0010 g/cm³ homogenata varijeteta soje koja je sadržala samo LOX-2 u destilovanoj vodi, korišćeno je umesto destilovane vode;
- (3) 25 cm³ 200 mmol natrijum-fosfatnog pufera (pH 6.6), 5 cm³ 10 mmol natrijum-linolenatnog supstrata i 5 cm³ destilovane vode pomešano je u odmernom sudu od 100 cm³, pa je, potom, dodato 5 cm³ 50%-no zasićenog rastvora β-karotina u acetonu. Smeša je snažno promućkana (bojeni supstrat za 20 uzoraka);
- (4) –
- (5) –.

Obezbojavanjem bojenog supstrata testa III dokazano je prisustvo LOX-3 u ispitivanom uzorku.

Radi objašnjenja intenziteta obezbojavanja korišćeni su sledeći simboli:

- ++ relativno slabo obezbojavanje – slabije izraženo prisustvo lipoksigenaza;
- +++ izraženo obezbojavanje – izraženo prisustvo lipoksigenaza;
- ++++ trenutno obezbojavanje – jako izraženo prisustvo lipoksigenaza.

4.0.0. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1.0. KVALITET ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE

Kvalitet hraniva proizvedenih termičkim tretiranjem zrna soje – ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje – može se sagledati iz rezultata ispitivanja osnovnog hemijskog sastava i aminokiselinskog profila zrna soje (sirove soje) i proizvedenih hraniva (tabela 14).

Tabela 14. Pokazatelji kvaliteta zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje

Pokazatelj kvaliteta	Zrno soje		Ekstrudirani sojin griz		Hidrotermički tretirano zrno soje	
	% u uzorku	% u SM*	% u uzorku	% u SM*	% u uzorku	% u SM*
Osnovni hemijski sastav						
Vlaga	10.06	-	4.67	-	10.66	-
Sirovi proteini	37.48	41.67	39.40	41.33	36.92	41.32
Sirova mast	19.27	21.26	20.26	21.25	19.28	21.58
Sirova celuloza	4.39	4.88	4.08	4.28	4.55	5.09
Mineralne materije	4.63	5.15	4.81	5.05	4.68	5.24
Aminokiselinski sastav (% u proteinima)						
Asparaginska kiselina	12.00		10.35		10.83	
Treonin	4.59		3.63		4.06	
Serin	5.02		5.00		4.82	
Glutaminska kiselina	14.73		13.84		14.25	
Prolin	4.87		3.59		3.95	
Glicin	4.10		3.99		4.09	
Alanin	3.99		3.86		3.85	
Cistin	1.54		1.26		1.27	
Valin	5.14		3.76		3.82	
Metionin	1.27		0.84		0.66	
Izoleucin	4.27		4.26		3.98	
Leucin	7.20		7.13		7.05	
Tirozin	4.49		4.21		4.17	
Fenilalanin	5.18		4.95		4.60	
Histidin	3.49		3.44		3.01	
Lizin	6.10		5.03		5.25	
Arginin	7.90		7.89		7.15	

* SM – suva materija

Rezultati prezentirani u tabeli 14 ukazuju da su proizvedena punomasna hraniva od zrna soje kvalitativno ujednačena, bez obzira što su proizvedena primenom različitih termičkih tretmana. Sadržaji nutritivno najvažnijih pokazatelja kvaliteta ovih hraniva, sirovih proteina i sirove masti, veoma su slični, uz relativno sličnu destrukciju pojedinih

aminokiselina do koje je došlo tokom termičkih tretmana. Za razliku od zrna soje, kod koje je udeo aminokiselina u ukupnim proteinima 95.88%, pri proizvodnji navedenih hraniva prouzrokovani su gubici u sadržaju aminokiselina, pa je sadržaj aminokiselina u ukupnim proteinima kod ekstrudiranog sojinog griza 87.04%, odnosno kod hidrotermički tretiranog zrna soje 86.81%. Sniženje sadržaja pojedinih aminokiselina pri proizvodnji ovih hraniva slično je već ustanovljenim nivoima sniženja za pojedine aminokiseline pri termičkom tretiranju soje (Anderson i Hafermann, 1992; Van der Poel, 1997). Sadržaj limitirajuće aminokiseline, lizina, u oba hraniva nešto je niži od literaturnih podataka za sadržaj lizina nekih proizvoda termički obrađenog zrna soje, koji se kreće od 5.5-6.5% u proteinima (Gundel i Mátrai, 1996; Zuilichem i sar., 1996). Ovo sniženje je posledica nižeg sadržaja lizina u zrnu soje (6.10%) od koje su hraniva proizvedena i primene agresivnijih tretmana pri proizvodnji ispitivanih hraniva. Registrovani gubici lizina prouzrokovani termičkim tretmanom zrna soje mogu se objasniti lipid-protein interakcijom (Lederer, 1996) i odigravanjem Maillardove reakcije između NH₂-grupe bočnog lanca lizina i npr. glukoze ili nekog drugog redukujućeg šećera prisutnog u soji (Alaiz i sar., 1997).

Uvid u adekvatnost primenjenih termičkih tretmana, ekstruzije i hidrotermičkog tretmana, pri obrađivanju zrna soje, koja se očituje kroz sadržaje nekih pokazatelja kvaliteta merodavnih u proceni uspešnosti reduciranja antinutritienata, stiče se razmatranjem podataka iz tabele 15.

Tabela 15. Pokazatelji kvaliteta merodavni u proceni adekvatnosti primenjenih termičkih tretmana

Pokazatelj kvaliteta	Zrno soje	Ekstrudirani sojin griz	Hidrotermički tretirano zrno soje
Tripsin inhibitor (mg/g)	61.66	3.27	3.91
Aktivnost ureaze (mg N/g·min na 30 °C)	10.95	0.26	0.28
NSI (%)	65.82	25.64	23.79

Dominantni antinutritient zrna soje, termolabilni tripsin inhibitor, markantno je termički inaktiviran procesom ekstruzije (94.70%), odnosno nešto slabije hidrotermičkim procesom (93.66%). Van der Poel (1990) navodi da tretman parom (100 °C, > 15 min) reducira sadržaj tripsin inhibitora zrna soje za 65-97%, a ekstrudiranje (145 °C, 16 s) za 78-98%. Gundel i Mátrai (1996) dozvoljavaju i niže nivoe do kojih se reducira sadržaj tripsin inhibitora (97-99% za ekstruziju, odnosno 88-94% za hidrotermiku). Rezultati prikazani u tabeli 15 u saglasnosti su i sa podacima Armoura i saradnika (1998), koji su ustanovili da hidrotermički tretman (100 °C, 10 min) skoro u potpunosti eliminiše dejstvo tripsin i himotripsin inhibitora i lektina.

S obzirom da se ranije publikovani podaci generalno slažu u konstataciji da je prihvatljiv sadržaj tripsin inhibitora nakon ma kog termičkog tretmana 5 mg/g ili niži (Monari, 1994; Murray, 1996; Zuilichem i sar., 1996; Sakač i sar., 1998), može se smatrati da su primenjeni režimi obrade bili adekvatni i rezultirali dobijanjem finalnih proizvoda optimalnog kvaliteta. Ovakvom zaključku idu u prilog i određeni nivoi aktivnosti ureaze (tabela 15), koji su u potpunoj saglasnosti sa podacima iz tabele 16 (Monari, 1994), uzetim za orijentaciju pri pronalaženju optimalnih radnih parametara pri termičkoj obradi zrna soje.

Tabela 16. Nivoi aktivnosti ureaze postignuti pri različitim termičkim tretmanima zrna soje (Monari, 1994)

Proizvod termički tretirane soje	Aktivnost ureaze (mg N/g·min na 30 °C)
Pretretiran	< 0.05
Optimalno tretiran	0.1-0.3
Slabije tretiran	0.3-0.5
Nedovoljno tretiran (sirov)	> 0.5

Indeks rastvorljivosti azota (NSI), kao još jedan od pokazatelja kvaliteta koji se koristi u optimizaciji termičkog tretmana i kontroli kvaliteta, iznosi 65-75% u zrnju soje (Božović i sar., 1992; Monari, 1994; Sakač i sar., 1996), ali je kod termički tretiranih proizvoda bitno niži. Mada su literaturni navodi za optimalne vrednosti NSI termički tretirane soje različiti, orijentir bi mogli biti navodi Holmesa (1988), kojima se kod nas u oceni tretmana i proizvoda najčešće i pribegava – nivo NSI od 12.5% smatra se rezultatom primene preagresivnog tretmana, a nivo NSI od 25.1% rezultatom optimalnog tretmana. Poređenjem ovih vrednosti sa vrednostima NSI ekstrudiranog sojinog griza (25.64%) i hidrotermički tretiranog zrna soje (23.79%) (tabela 15) može se zaključiti da su primenjeni termički tretmani bili optimalni i rezultirali dobijanjem hraniva sličnog kvaliteta.

Ujednačenost kvaliteta ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, koja je ustanovljena upoređivanjem pokazatelja kvaliteta prezentiranih u tabelama 14 i 15, osnova je za dalja ispitivanja antioksidativnog delovanja ekstrakata zrna soje i proizvedenih hraniva, odnosno vrsta i količina antioksidativnih materija prisutnih u ispitivanim ekstraktima.

4.2.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVIIH SLOBODNIH RADIKALA U MODEL SISTEMIMA I I II

Oksidativne promene lipida hrane praćene su razvijanjem nesvojstvene boje i neprijatnog mirisa i ukusa, odnosno pojavom užegnuća, koja hranu čini nutritivno neispravnom i senzorno neprihvatljivom (Hamilton i sar., 1997).

Termička i katalitička oksidativna degradacija lipida su složeni procesi tokom kojih nastaju kiseonikovi slobodni radikali.

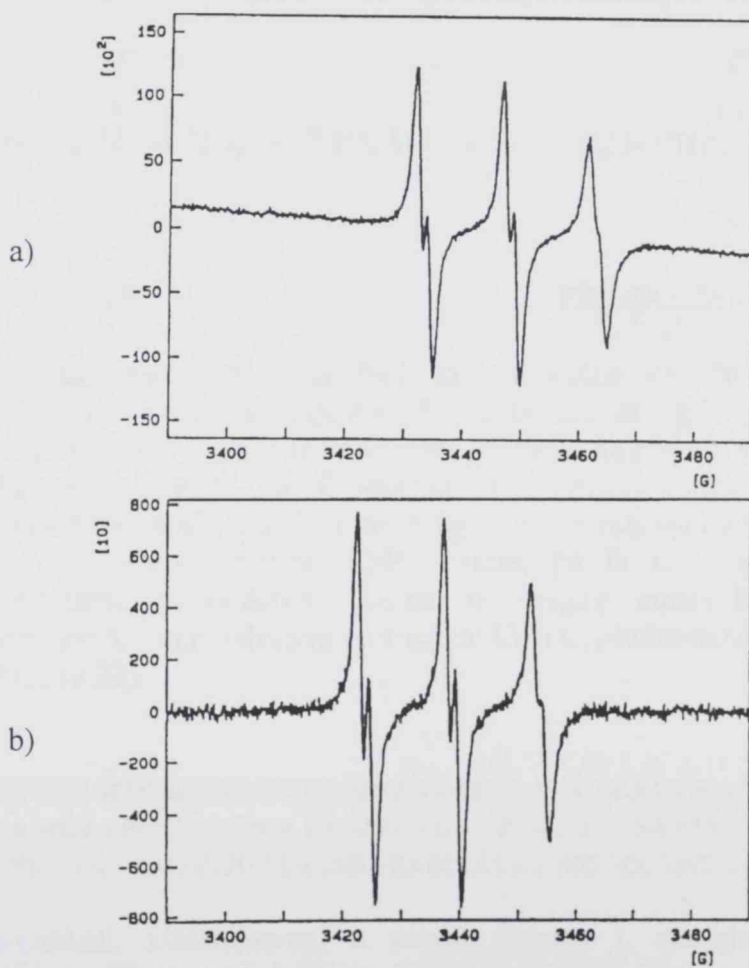
Prilikom proizvodnje punomasnih hraniva od zrna soje, odnosno tokom termičke obrade sirove soje, dolazi do termičke oksidativne degradacije ulja sojinog zrna. Eventualni neadekvatni uslovi skladištenja proizvedenih hraniva, koji podrazumevaju visoke temperature, mogu, takođe, da rezultiraju termičkom oksidativnom degradacijom lipida hraniva i prouzrokuju pad njihove stabilnosti.

Relativno visok sadržaj gvožđa u sojinom zrnju i proizvedenim hranivima, koji iznosi 103 mg/kg za sojino zrno, odnosno 129 mg/kg za oba hraniva (Sakač, 1999), objašnjava podložnost punomasnih hraniva od zrna soje katalitičkoj oksidativnoj degradaciji lipida. Sojino ulje je poznato po izuzetno visokom sadržaju gvožđa, najvišem od svih biljnih ulja – maksimalno 0.76 mg/kg (Garrido i sar., 1994). Sadržaj bakra u sojinom ulju, oko 0.041 mg/kg, iako znatno niži od sadržaja gvožđa, može, takođe, da bude odgovoran za odigravanje katalitičke oksidacije sojinog ulja (Chu i Kung, 1998).

Poznavanje sastava masnih kiselina sojinog ulja, koga karakteriše visok nivo linolne kiseline – 35-60% (tabela 11; Perkins, 1995), uz već navedena saznanja o izraženoj podložnosti punomasnih hraniva od zrna soje oksidaciji lipida (Kim i sar., 1991), opredelila su odluku o izboru model sistema za ESR spektralnu analizu kiseonikovih slobodnih radikala nastalih tokom termičke i katalitičke oksidacije lipida soje.

4.2.1. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVII SLOBODNIH RADIKALA U MODEL SISTEMU I

Na slici 21 prikazani su ESR spektri slobodnih radikala nastalih u model sistemu I termičkom oksidacijom 1.6 cm^3 (5 mmol) metil-linoleata u prisustvu 0.0213 g (0.12 mmol) PBN na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 24 h.

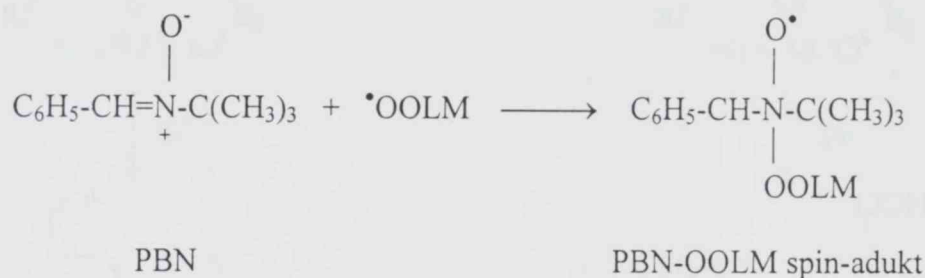


Slika 21. ESR spektar slobodnih radikala nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I detektovan

- a) pri paralelnom snimanju ESR spektara slobodnih radikala nastalih u model sistemu I u prisustvu pojedinačnih ekstrakata zrna soje (slepa proba I)
- b) pri paralelnom snimanju ESR spektara slobodnih radikala nastalih u model sistemu I u prisustvu pojedinačnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje (slepa proba II)

Na oba ESR spektra, prikazana na slici 21, uočava se šest linija približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesporenog elektrona i jednog ^{14}N -atoma ($I=1$) i jednog ^1H -atoma ($I=1/2$). Konstante hiperfinog cepanja linija spektara $a_{\text{N}} = 14.75 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.80 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOLM) u reakcionim smešama model sistema I i u potpunosti su saglasnosti sa vrednostima konstanti hiperfinog cepanja linija ESR spektra za PBN-OOLM spin-adukte koje je ustanovila Čanadanović-Brunet (1997).

Termička dekompozicija metil-linoleata je lančana reakcija, koja se odigrava po slobodnoradikalском mehanizmu. Tokom termičke oksidacije metil-linoleata nastaju alkil-peroksi- i alkoksi-radikali (Simić i Taylor, 1987). Iako je u odgovarajućim vremenskim periodima tokom termičke oksidacije metil-linoleata moguća detekcija različitih kiseonikovih slobodnih radikala (Čanadanović-Brunet, 1997), nakon reakcionog perioda od 24 h ESR spektrometrijom su detektovani i na osnovu vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija spektra identifikovani samo peroksi-radikali metil-linoleata, odnosno stabilni PBN-peroksi-radikal spin-adukti (PBN-OOLM) nastali reakcijom PBN i MLOO-radikala:

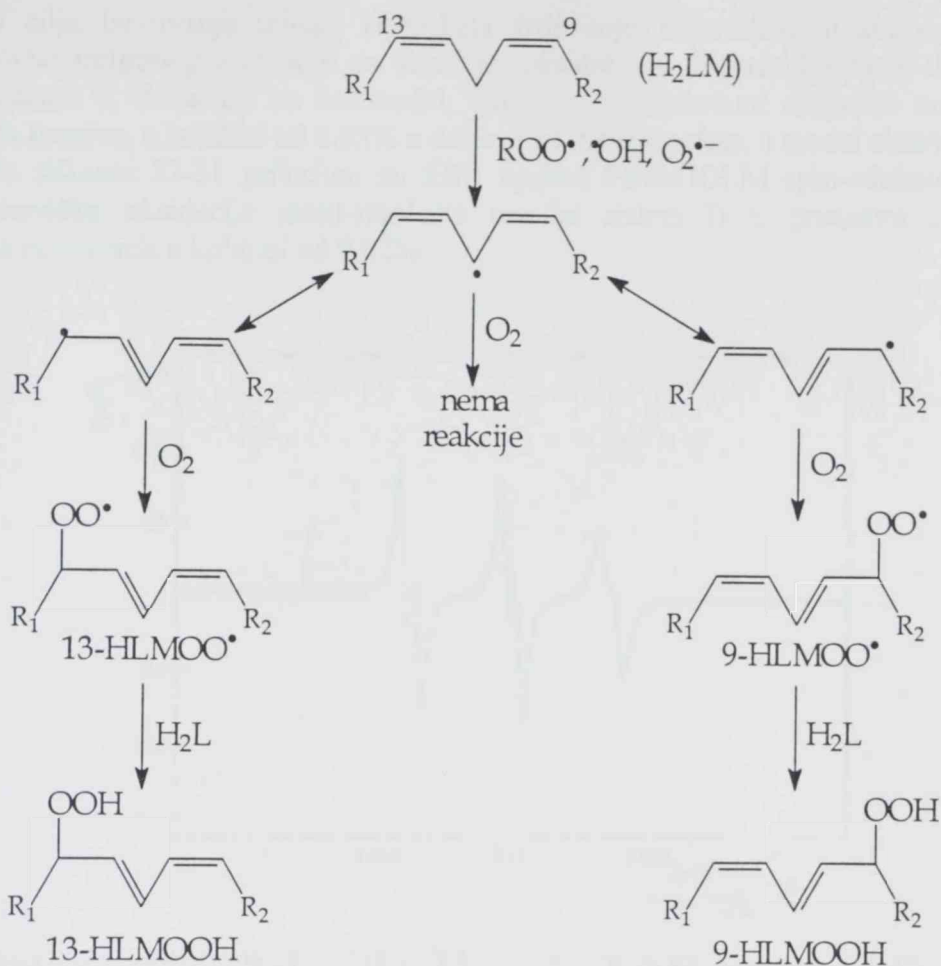


Alkil-radikali nastaju u inicijalnoj fazi termičke oksidacije metil-linoleata homolitičkim raskidanjem najreaktivnije *bis*-alilne C-H veze (energija veze 313.5 kJ/mol) i stabilizuju se rezonancijom. *Bis*-alil-radikali metil-linoleata ne reaguju sa kiseonikom zbog smanjene elektronske gustine na C_{11} -atomu. Rezonantne forme alkil-radikala sa nesporenim elektronom na C_9 - i C_{13} -atomu reaguju sa kiseonikom stvarajući C_9 - i C_{13} -peroksi-radikale, koji daju identične ESR spektre, pa ih nije moguće razlikovati. Sekundarno izdvajanje vodonikovog atoma iz drugog molekula lipida rezultira propagacijom lančane reakcije, odnosno stvaranjem C_9 - i C_{13} -hidro-peroksida lipida (Simić i Taylor, 1987) (slika 22).

4.2.2. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU PEROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMU I

Peroksi-radikali, identifikovani u model sistemu I, spadaju u najreaktivnije kiseonikove radikale (Cheeseman i Slater, 1993; Halliwell i Chirico, 1993). Nastajanje peroksi-, kao i drugih radikalskih vrsta, odgovorno je za neželjene promene na mastima i uljima tokom procesa proizvodnje, distribucije i skladištenja (Yanishlieva i Marinova, 1998). Inhibiranje nastanka peroksi-radikala ili snižavanje njihove koncentracije, pogotovo primenom nekog prirodnog antioksidanta, jedan je od imperativa za dobijanje kvalitetnijih proizvoda osetljivih na oksidaciju lipida.

Supresija oksidacije lipida kod punomasnih hraniva od zrna soje vezana je, između ostalog, za antioksidativni potencijal same soje (Böhm i Franke, 1996), ali i mogućnost da se on pojača dodavanjem po mogućstvu prirodnih antioksidativnih materija u proizvedena hraniva ili u sirovinu pre proizvodnje. Uslov da se neko jedinjenje upotrebi u



Slika 22. Oksidacija metil-linoleata (H_2LM)

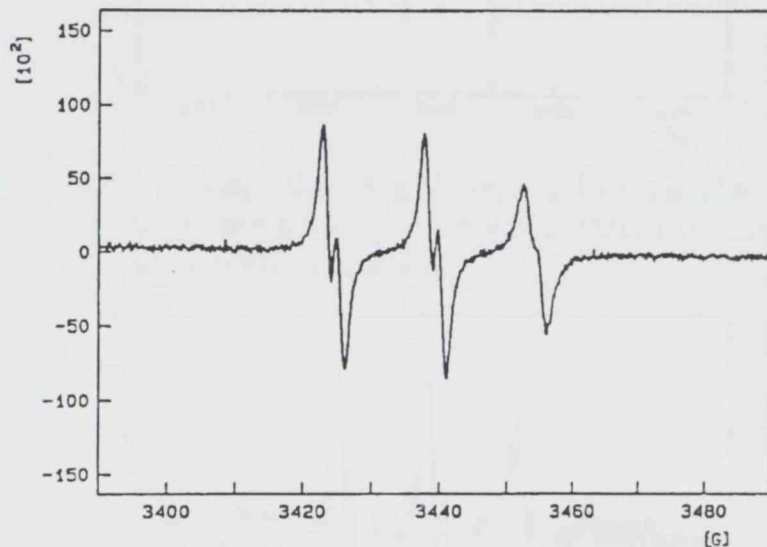
antioksidativne svrhe je da ne utiče na nutritivne karakteristike hrane, da je efikasno pri niskim koncentracijama (do 0.1%), kompatibilno sa supstratom i bez nepoželjnih, npr. toksikoloških, dejstava. Kompatibilnost korišćenog antioksidanta sa supstratom svakako je najveća ako se supstratu dodaje materija koju on već poseduje.

Soja i proizvodi od soje sadrže niz jedinjenja za koja je dokazano da deluju kao antioksidanti. Ranija istraživanja antioksidativnih materija soje bila su orijentisana na najvažniji liposolubilni vitamin soje, vitamin E (Chow i Drapper, 1974), da bi se, kasnijih godina usmerila, pored lecitina (Reblova i sar., 1991), fosfatidil-etanol-amina (Totani, 1997), holesterola (Wiseman, 1993), saponina (Nishida i sar., 1993) i drugih jedinjenja, na polifenole soje. Izuzetno su brojni literaturni navodi koji upućuju na širok spektar dejstava izoflavona soje, od kojih su mnoga primarno izučavana sa medicinskog stanovišta, ali posredno podrazumevaju njihov antioksidativni karakter (Arjmandi i sar., 1996; Hodgson i sar., 1996; Barnes, 1998; Miyazawa i sar., 1999).

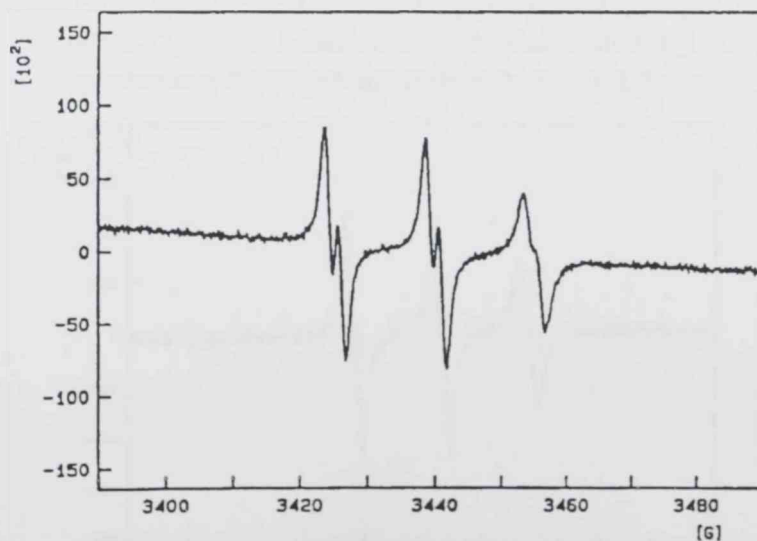
Ideja da se ispituju neke antioksidativne materije zrna soje i hraniva proizvedenih termičkim tretiranjem soje, kako bi se spoznale mogućnosti supresije oksidacije lipida u proizvodima ove vrste, i eventualno iskoristile mogućnosti aplikacije ekstrakata zrna soje i proizvedenih hraniva na sličan supstrat (npr. sojino ulje), opredelila je dalji tok istraživanja na ispitivanje uticaja ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje na stvaranje i transformaciju kiseonikovih slobodnih radikala nastalih u model sistemu I.

U cilju ispitivanja uticaja ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na termičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata u model sistemu I, dodavani su heksanski, etanolni i etil-acetatni ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat, u model sistem I.

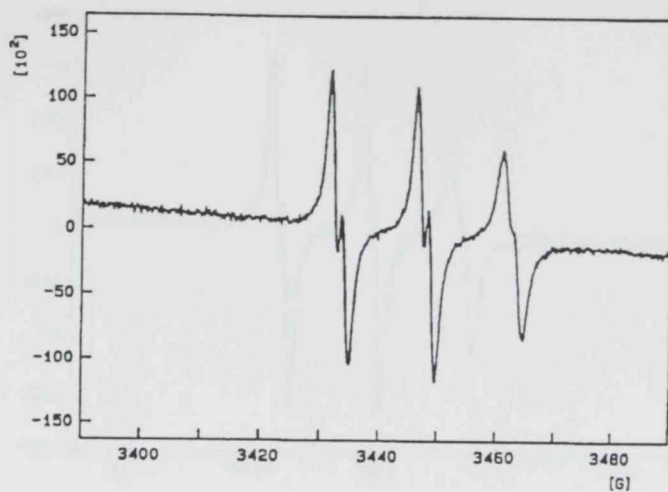
Na slikama 23-31 prikazani su ESR spektri PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata (model sistem I) u prisustvu ispitivanih ekstrakata dodavanih u količini od 0.02%.



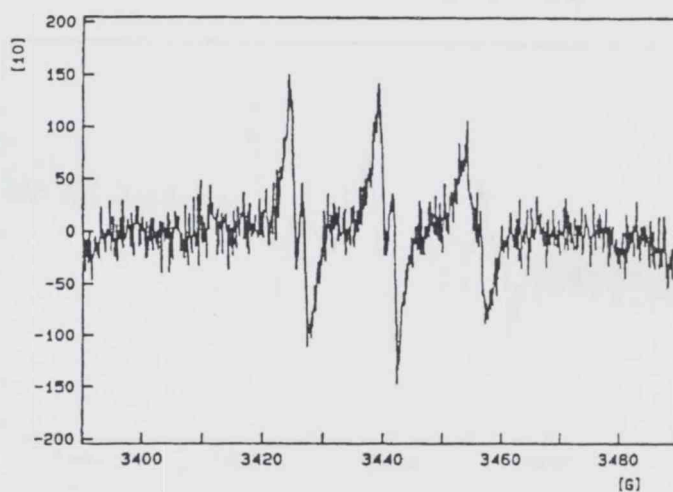
Slika 23. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta zrna soje



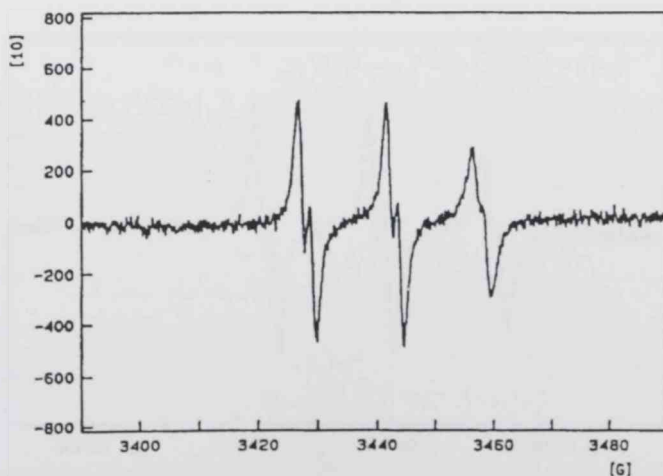
Slika 24. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta zrna soje



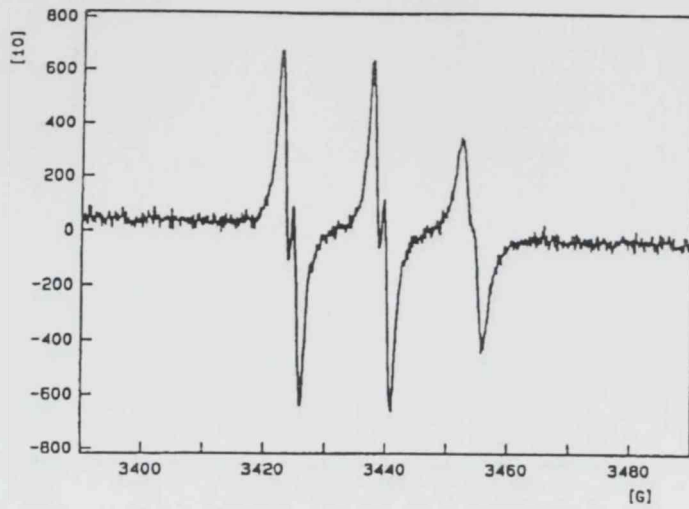
Slika 25. ESR spektar PBN-OOLM spin-adiukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta zrna soje



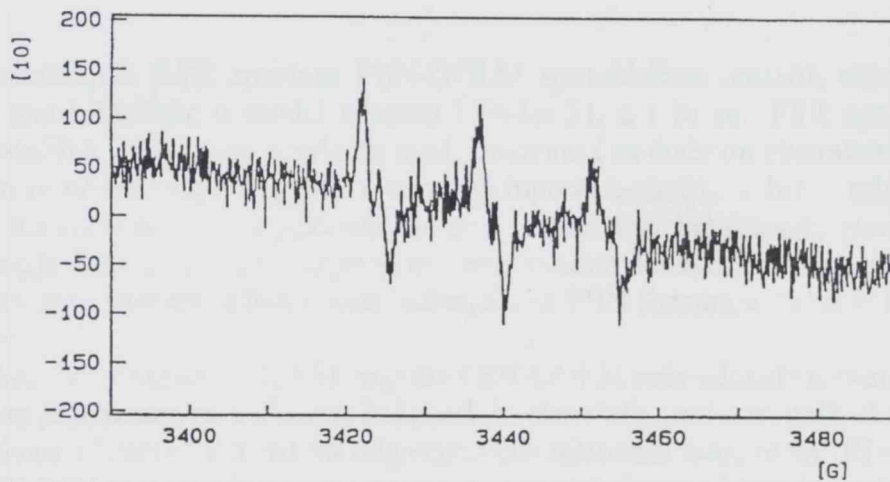
Slika 26. ESR spektar PBN-OOLM spin-adiukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



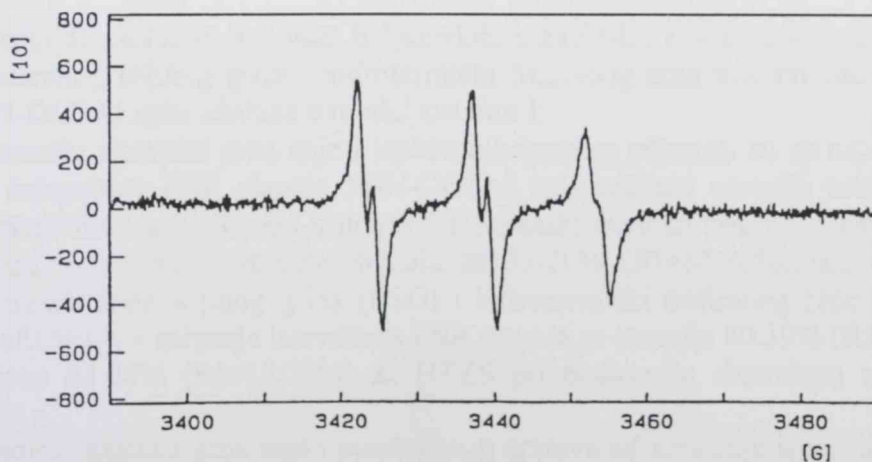
Slika 27. ESR spektar PBN-OOLM spin-adiukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



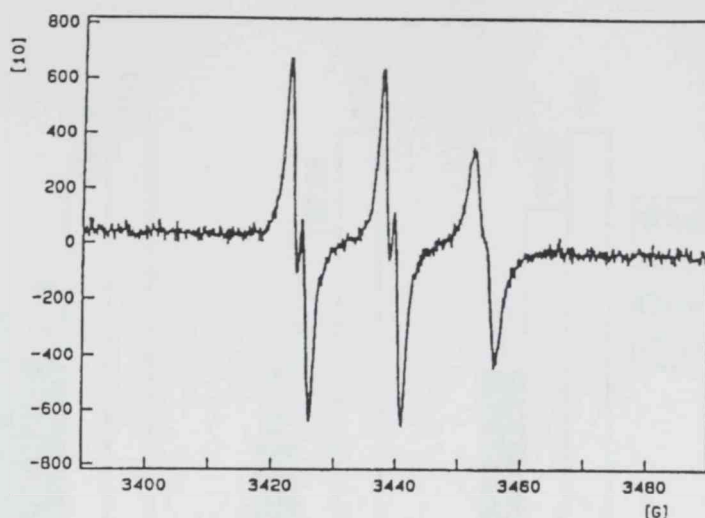
Slika 28. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 29. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 30. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 31. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

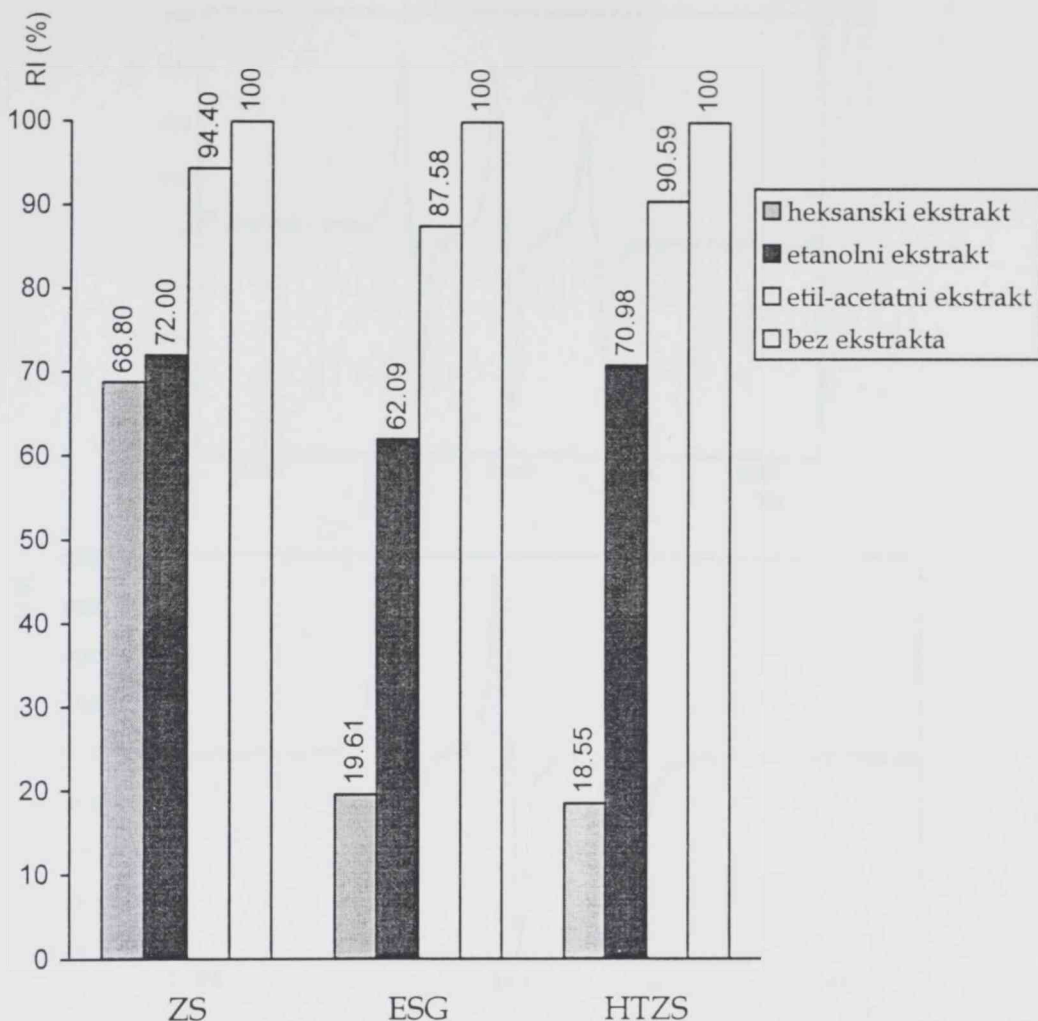
Upoređenjem ESR spektara PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I (slika 21, a i b) sa ESR spektrima spin-adukata nastalih u reakcionim smešama model sistema I sa dodatim ekstraktima (slike 23-31), uočava se očuvan izgled spektara, odnosno hiperfina struktura, broj i relativan odnos intenziteta njihovih linija. To pokazuje da se i u prisustvu heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje u model sistemu I stvaraju peroksi-radikali, koji reakcijom sa PBN formiraju stabilne PBN-OOLM spin-adukate.

Relativni intenziteti (RI) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u svim ispitivanim sistemima sa pojedinačnim dodacima heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva niži su od odgovarajućih relativnih intenziteta (RI=100%) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata detektovanih u model sistemu I bez dodatka ekstrakata (slika 21, a ili b). Ustanovljena sniženja intenziteta ESR signala peroksi-radikala, odnosno PBN-OOLM spin-adukata, ukazuju da ispitivani ekstrakti sadrže antioksidativne materije koje inhibitorno deluju na termičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata u model sistemu I.

Na slici 32 prikazan je efekat heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na sniženje RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemu I.

Heksanski ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva pokazali su se najefikasnijim u snižavanju intenziteta ESR signala PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I. Heksanski ekstrakt zrna soje dodat u količini od 0.02% snizio je intenzitet ESR signala za 31.20% (RI=68.80%), ali su heksanski ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotermički tretiranog zrna soje (HTZS) bili daleko efikasniji – sniženja intenziteta ESR signala su iznosila 80.39% (RI=19.61%) za ESG, odnosno 81.45% (RI=18.55%) za HTZS pri dodavanju ekstrakata u količini od 0.02%.

Etanolni ekstrakti zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje ispoljili su približno sličan efekat sniženja RI ESR signala u model sistemu I, koji je iznosio 28.00% (RI=72.00%) za zrno soje, 37.91% (RI=62.09%) za ESG, odnosno 29.02% (RI=70.98%) za HTZS pri dodavanju ekstrakata u količini 0.02%.

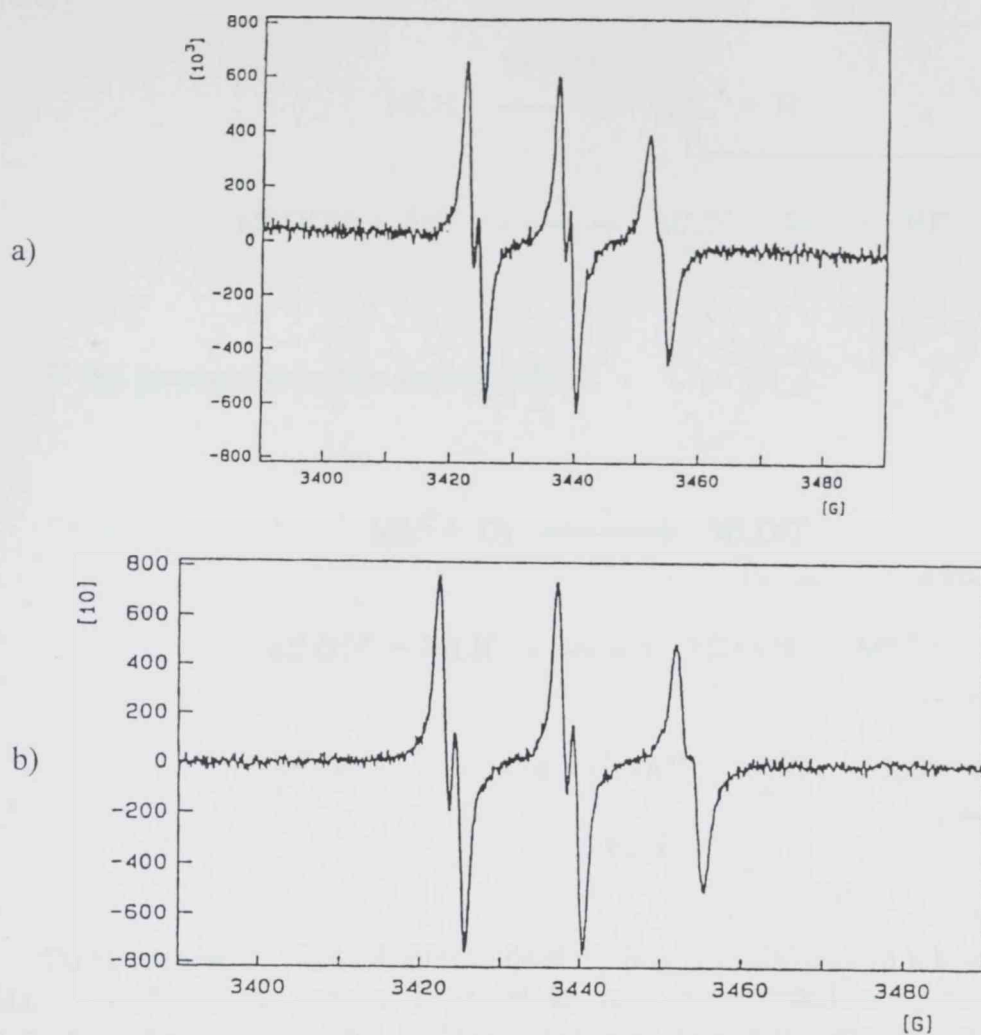


Slika 32. Uticaj heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje (ZS), ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotérmički tretiranog zrna soje (HTZS) na intenzitet ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemu I

Dodavanje etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva u količini od 0.02% nije izazvalo značajnija sniženja intenziteta ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemu I. Stepén inhibicije, meren sniženjem RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata, za etil-acetatni ekstrakt zrna soje iznosi svega 5.60% (RI=94.40%), za etil-acetatni ekstrakt ESG-a 12.42% (RI=87.58%), odnosno za etil-acetatni ekstrakt HTZS-a 9.41% (RI=90.59%).

4.2.3. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVIIH SLOBODNIH RADIKALA U MODEL SISTEMU II

Na slici 33 prikazani su ESR spektri slobodnih radikala dobijenih u model sistemu II rastvaranjem 0.0213 g (0.12 mmol) PBN u 1.6 cm³ (5 mmol) metil-linoleata. Oksidacija je indukovana dodavanjem 0.0044 g (0.158 mmol) gvožđe(II)-sulfata, a detekcija radikala je vršena nakon reakcionog perioda od 24 h.

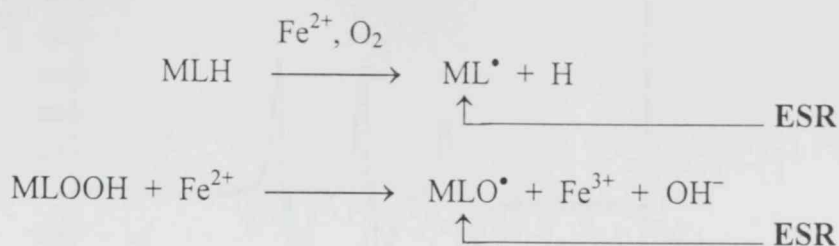


Slika 33. ESR spektar slobodnih radikala nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II detektovan

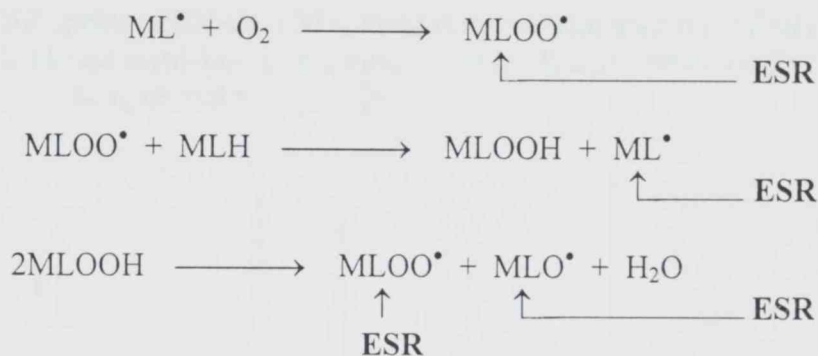
- a) pri paralelnom snimanju ESR spektara slobodnih radikala nastalih u model sistemu II u prisustvu pojedinačnih ekstrakata zrna soje (slepa proba I)
- b) pri paralelnom snimanju ESR spektara slobodnih radikala nastalih u model sistemu II u prisustvu pojedinačnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje (slepa proba II)

Na oba ESR spektra prikazana na slici 33 uočava se šest linija približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesporenog elektrona i jednog ^{14}N -atoma ($I=1$) i jednog ^1H -atoma ($I=1/2$). Konstante hiperfinog cepanja linija spektara $a_{\text{N}} = 14.75 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.80 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOLM) u reakcionim smešama model sistema II.

Katalitička oksidativna degradacija metil-linoleata (MLH) u prisustvu Fe(II)-jona je složena lančana reakcija u kojoj nastaje smeša kiseonikovih slobodnih radikala. U fazi inicijacije, uz prisustvo Fe(II)-jona i molekuskog kiseonika, tok oksidacije lipida je sledeći:



U fazi propagacije nastaju sledeći radikali:

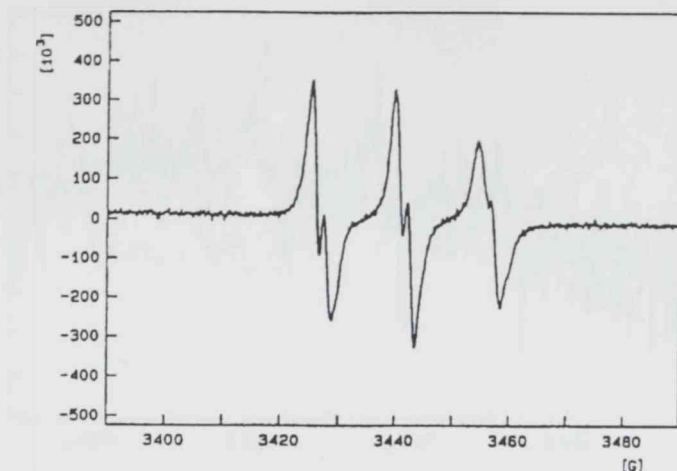


Da bi se sprečilo zbirno detektovanje slobodnih radikala nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata izabrano je vreme detekcije nakon reakcionog perioda od 24 h, kada su na osnovu izgleda ESR spektara i vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija spektara identifikovani samo peroksi-radikali metil-linoleata, odnosno PBN-peroksi-radikal spin-adukti (PBN-OOLM).

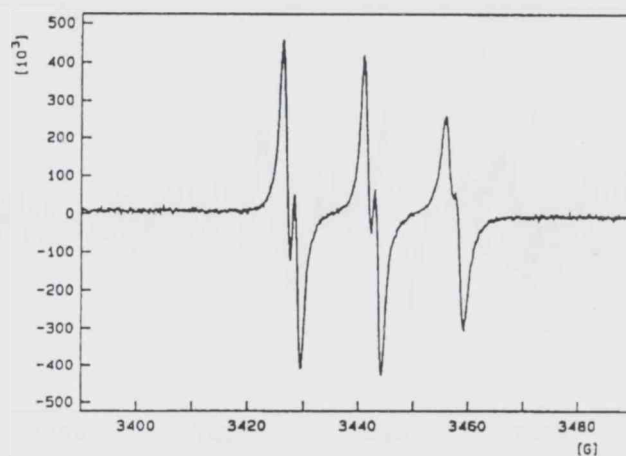
4.2.4. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU PEROKSI-RADIKALA U MODEL SISTEMU II

Radi ispitivanja uticaja ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na katalitičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata u model sistemu II, dodavani su heksanski, etanolni i etil-acetatni ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva, u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat, u model sistem II.

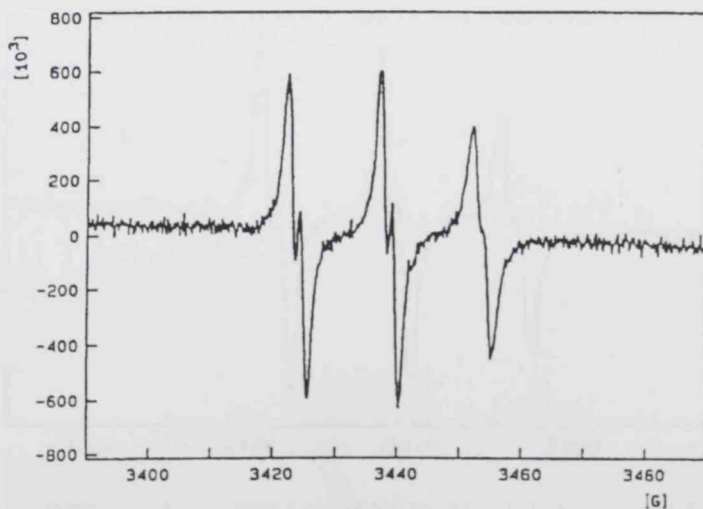
Na slikama 34-42 prikazani su ESR spektri PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata (model sistem II) u prisustvu ispitivanih ekstrakata dodvanih u količini od 0.02%.



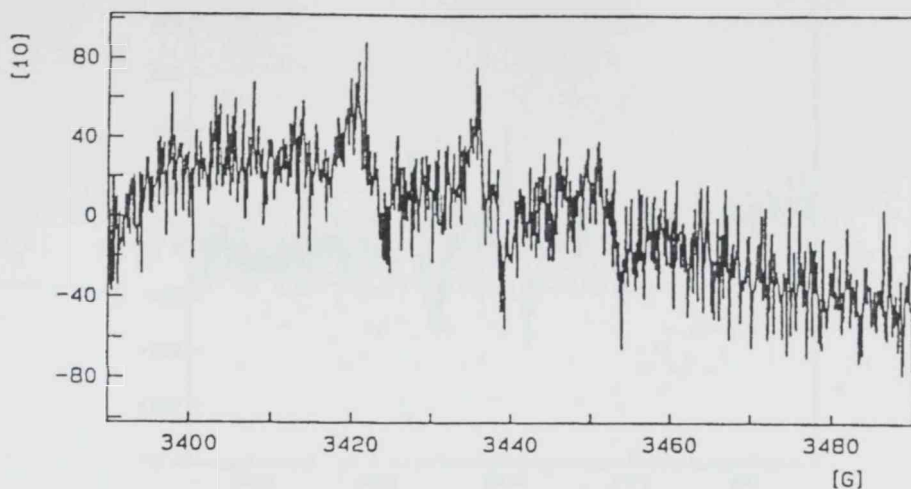
Slika 34. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta zrna soje



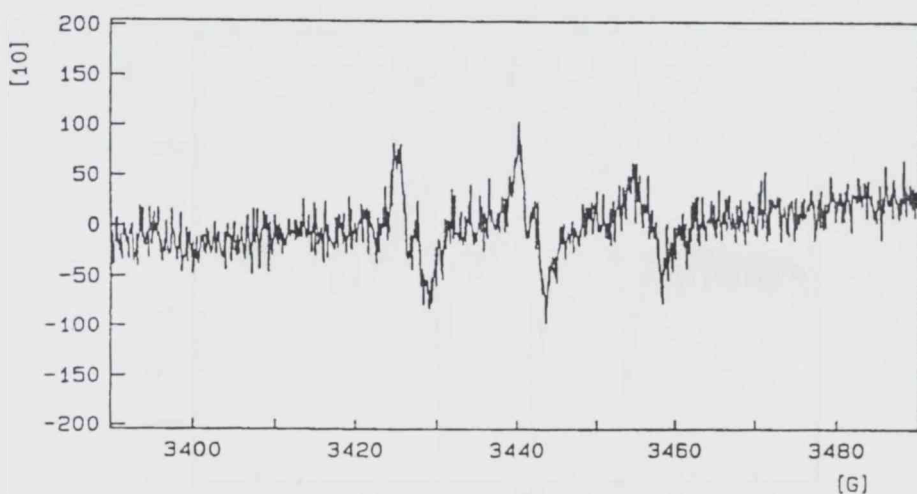
Slika 35. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta zrna soje



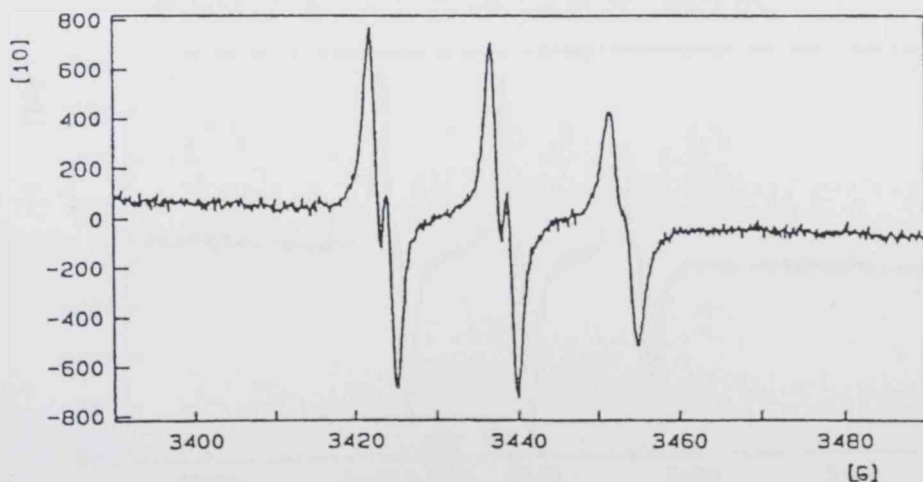
Slika 36. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta zrna soje



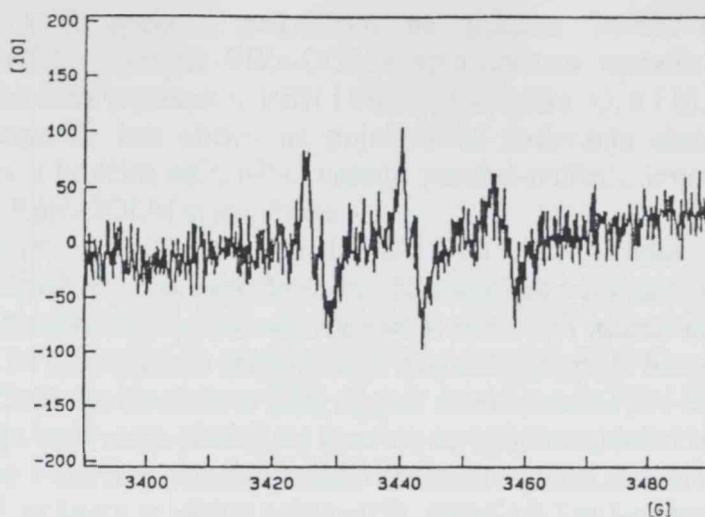
Slika 37. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



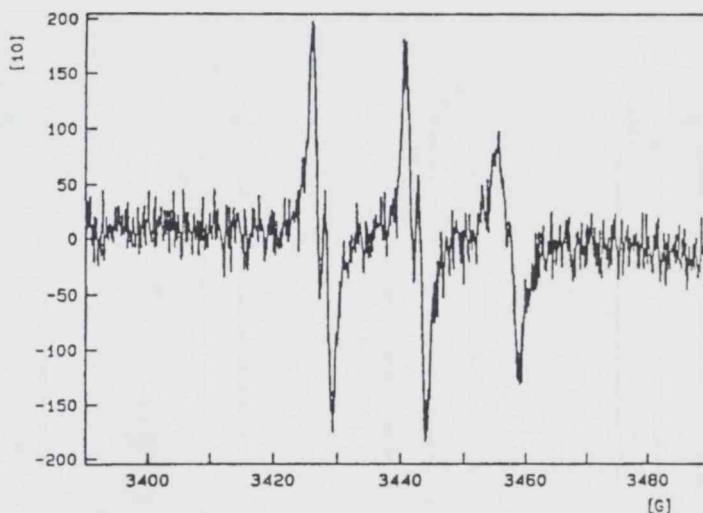
Slika 38. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 39. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 40. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% heksanskog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 41. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

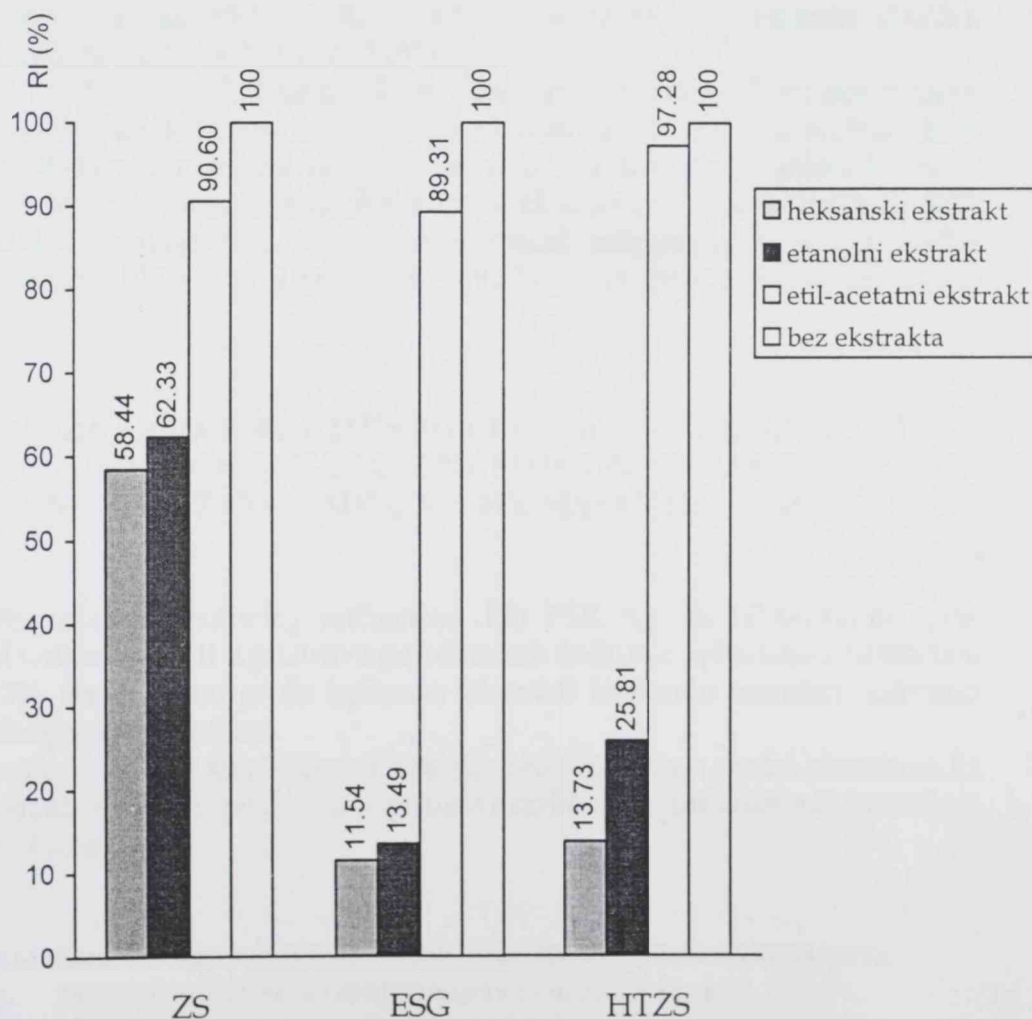


Slika 42. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

Analizom ESR spektara prikazanih na slikama 34-42, odnosno njihovim upoređenjem sa ESR spektrima PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u prisustvu PBN i Fe(II)-jona (slika 33, a i b), može se zaključiti da u model sistemu II, bez obzira na pojedinačna dodavanja ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva u količini od 0.02%, nastaju peroksi-radikali, koji reakcijom sa PBN formiraju stabilne PBN-OOLM spin-adukte.

Relativni intenziteti (RI) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u svim ispitivanim sistemima sa pojedinačnim dodacima heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva niži su od odgovarajućih relativnih intenziteta (RI=100%) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata detektovanih u model sistemu II bez dodataka ekstrakata (slika 33, a ili b). Snižjenja intenziteta ESR signala detektovanih PBN-OOLM spin-adukata u slučaju dodavanja ispitivanih ekstrakata upućuju na njihovu antioksidativnu prirodu, koja je ustanovljena i pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu I.

Na slici 43 prikazan je efekat heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na sniženje RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemu II.



Slika 43. Uticaj heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje (ZS), ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotermički tretiranog zrna soje (HTZS) na intenzitet ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemu II

Heksanski ekstrakti zrna soje i ispitivanih hraniva dodavani u model sistem II ostvarili su, kao i u slučaju model sistema I, odnosno termičke oksidacije metil-linoleata, najjače antioksidativno dejstvo od svih ispitivanih ekstrakata. Heksanski ekstrakt zrna soje dodat u količini od 0.02% snizio je intenzitet ESR signala za 41.56% (RI=58.44%), dok su heksanski ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje bili delotvorniji, kao i pri inhibiciji termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I. Heksanski ekstrakt ESG-a snizio je intenzitet ESR signala PBN-OOLM spin-adukata za 88.46% (RI=11.54%), dok je isti ekstrakt HTZS-a ostvario stepen sniženja intenziteta signala od 86.27% (RI=13.73%).

Etanolni ekstrakt zrna soje dodat u model sistem II u količini od 0.02% ispoljio je nešto izraženiji antioksidativni efekat u odnosu na onaj ispoljen u model sistemu I (28.00%, RI=72.00%), snižavajući RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata za 37.67% (RI=62.33%). Međutim, etanolni ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, dodavani u pojedinačnim količinama od 0.02% u model sistem II, pokazali su se bitno efikasnijim u supresiji katalitičke oksidacije metil-linoleata u odnosu na efikasnost koju su ispoljile iste količine istih ekstrakata tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I. Etanolni ekstrakt ESG-a snizio je RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata za čak 86.51% (RI=13.49%), dok je etanolni ekstrakt HTZS-a ostvario stepen sniženja od 74.19% (RI=25.81%).

Inhibicija katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II uz pojedinačne dodatke etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva bila je slična inhibiciji koju su ovi ekstrakti, dodavani u model sistem I, ostvarili pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata, odnosno bezmalo zanemarljiva. Etil-acetatni ekstrakt zrna soje snizio je RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata detektovan u model sistemu II za svega 9.40% (RI=90.60%), ekstrakt ESG-a za 10.69% (RI=89.31%), odnosno HTZS-a za 2.72% (RI=97.28%).

4.3.0. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA HEKSANSKIH I ETANOLNIH EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE U MODEL SISTEMIMA I I II

Praćenjem sniženja relativnog intenziteta (RI) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemima I i II u prisustvu pojedinačnih dodataka ispitivanih ekstrakata u količini od 0.02% ustanovljeno je da ispitivani ekstrakti inhibiraju termičku, odnosno katalitičku oksidaciju metil-linoleata.

Supresiranje termičke i katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II u prisustvu dodatih ekstrakata posledica je prisustva različitih antioksidativnih materija u ispitivanim ekstraktima.

4.3.1. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA HEKSANSKIH EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE U MODEL SISTEMIMA I I II

Sniženja RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u model sistemima I i II, prouzrokovana pojedinačnim dodacima heksanskih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva u količini od 0.02%, mogu se objasniti prisustvom liposolubilnih antioksidativnih materija u ispitivanim heksanskim ekstraktima, s obzirom da su Nishiba i

Suda (1998) nedavno ustanovili da su liposolubilni antioksidanti soje odgovorni za sniženja RI ESR signala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH) u sistemu u koji je dodat supernatant vodene suspenzije sojinog brašna.

Najvažniji liposolubilni antioksidant je α -tokoferol, koji deluje kao hvatač peroksi-radikala, čija je konstanta brzine reakcije sa većinom alkil-peroksi-radikala reda veličine 10^6 - 10^7 mol⁻¹dm³s⁻¹ (Neta i sar., 1990). S obzirom da navodi Hamiltona i saradnika (1997) upućuju na činjenicu da stabilnost biljnih ulja, pa i sojinog, primarno zavisi od sadržaja tokoferola, pristupilo se određivanju sadržaja α -tokoferola kako u zrnu soje i ispitivanim hranivima, tako i u heksanskim ekstraktima. Navodeći da α -tokoferol deluje kao važan antioksidant u ulju soje, ali u sinergizmu sa drugim liposolubilnim antioksidantima, Quinteiro i Vianni (1995) i Nishiba i Suda (1998) su uputili na ideju da se u navedenom materijalu odrede i sadržaji β -karotina i ukupnih ksantofila.

Iako se u soji i proizvodima od soje, pored tokoferola, nalaze izoflavoni, za koje je ustanovljeno da su relativno efikasni antioksidanti (Berghofer i sar., 1998), njihovo određivanje u heksanskim ekstraktima nije sprovedeno, jer obezmaščivanje mlevene soje heksanom ne ekstrahuje izoflavone, odnosno oni nisu prisutni u sojinom ulju (Eldridge i Kwolek, 1983; Coward i sar., 1993; Wang i Murphy, 1994b; 1996).

Sadržaj nekih liposolubilnih antioksidativnih materija u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i heksanskim ekstraktima, za koje se pretpostavilo da su primarno odgovorni za supresiju oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II, prikazan je u tabeli 17.

Tabela 17. Sadržaj nekih liposolubilnih antioksidativnih materija u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i heksanskim ekstraktima

Uzorak	α -Tokoferol		β -Karotin		Ukupni ksantofili	
	mg/kg u uzorku	mg/kg u SM	mg/kg u uzorku	mg/kg u SM	mg/kg u uzorku	mg/kg u SM
Zrno soje	32.99	36.68	0.91	1.01	9.28	10.32
ESG	10.38	10.89	0.78	0.82	6.34	6.65
HTZS	15.21	17.02	0.88	0.98	7.66	8.57
Heksanski ekstrakt zrna soje	40.11		2.52		29.93	
Heksanski ekstrakt ESG	37.77		3.41		25.04	
Heksanski ekstrakt HTZS	37.50		3.55		28.85	

SM – suva materija

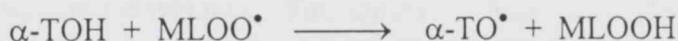
Sadržaj najvažnijeg liposolubilnog antioksidanta u zrnu soje, α -tokoferola (tabela 17), u saglasnosti je sa navodom Nishibe i Sude (1998), po kome sadržaj α -tokoferola u zrnu soje iznosi 30.54-37.20 mg/kg. Primenjeni termički tretmani, ekstrudiranje i hidrotermička obrada, rezultirali su značajno nižim sadržajem α -tokoferola u proizvedenim hranivima u odnosu na zrno soje (tabela 17). Ustanovljeni gubici α -tokoferola (oko 65% za ESG, odnosno 50% za HTZS), kao posledice termičke obrade, viši su od ranije ustanovljenih 20% sniženja sadržaja α -tokoferola do koga dolazi tokom ekstruzije (Albers i sar., 1997), što upućuje na agresivnost primenjenih režima sa stanovišta sadržaja α -tokoferola. Sadržaji β -karotina i ukupnih ksantofila u ispitivanim hranivima niži su,

takođe, od sadržaja navedenih pokazatelja kvaliteta u zrnu soje, ali stepeni sniženja njihovih sadržaja nisu reda veličine gubitaka α -tokoferola.

Sadržaj α -tokoferola u heksanskom ekstraktu zrna soje (40.11 mg/kg) odgovara sadržaju α -tokoferola u sirovom sojinom ulju – 42-55 mg/kg (King i sar., 1998), dok je sadržaj α -tokoferola u heksanskim ekstraktima punomasnih hraniva nešto niži (tabela 17). Razlike u sadržajima preostalih ispitivanih liposolubilnih antioksidanata u heksanskim ekstraktima zrna soje i ispitivanih hraniva su, takođe, veoma male. S obzirom da kod zrna soje struktura ćelijskih zidova nije narušena, odnosno da sojino ulje nije oslobođeno iz sferozoma, stepeni ekstrakcije ispitivanih liposolubilnih antioksidanata iznose svega oko 25% za α -tokoferol, 50% za β -karotin i 60% za ukupne ksantofile. Pri proizvodnji ekstrudiranog sojinog griza dolazi do potpunog oslobađanja ulja iz sferozoma (Smoje i sar., 1997), što objašnjava bolju ekstrakciju liposolubilnih antioksidanata heksanom iz ESG-a (oko 75% za α -tokoferol, 90% za β -karotin i 80% za ukupne ksantofile). Hidrotermičko obrađivanje zrna soje dovodi do manjih gubitaka u sadržajima liposolubilnih antioksidanata u odnosu na proces ekstruzije (tabela 17), ali su stepeni ekstrakcije određenih antioksidanata heksanom iz HTZS-a niži (oko 50% za α -tokoferol, 80% za β -karotin i 70% za ukupne ksantofile), verovatno kao posledica slabijeg narušavanja ćelijske strukture zrna soje hidrotermičkim procesom. Ustanovljene razlike u stepenima ekstrakcije α -tokoferola iz zrna soje i ispitivanih hraniva korišćenjem heksana kao ekstragensa u saglasnosti su sa navodom Chua i Lina (1993), po kome sadržaj α -tokoferola u sojinom ulju nakon ekstrakcije zavisi, pored ostalog, od fizičkih karakteristika soje, odnosno ćelijske strukture, granulacije i drugih faktora.

U model sistemima I i II sa pojedinačnim dodacima heksanskih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva, koji sadrže α -tokoferol, β -karotin i ksantofile, u kojima dominira lutein (Perkins, 1995), snižavanje koncentracije peroksi-radikala odigrava se:

- eliminacijom peroksi-radikala iz lančane reakcije oksidacije metil-linoleata u prisustvu α -tokoferola uz nastajanje α -tokoferil-radikala (α -TO $^{\bullet}$):



- adicijom peroksi-radikala na β -karotin uz nastajanje adukta, β -karotin-radikala (MLOO β Car $^{\bullet}$):



- transferom H-atoma sa β -karotina na peroksi-radikal;
- adicijom peroksi-radikala na lutein uz nastajanje adukta, lutein-radikala (MLOOLut $^{\bullet}$):



- transferom H-atoma sa luteina na peroksi-radikal.

Antioksidativni karakter ispitivanih heksanskih ekstrakata dodavanih u model sisteme I i II najverovatnije ne podrazumeva paralelno delovanje α -tokoferola i karotinoida, jer je reaktivnost α -tokoferola prema peroksi-radikalima oko 30 puta veća od reaktivnosti β -karotina prema istoj radikalskoj vrsti (Tsuchihashi i sar., 1995), dok je

antioksidativni karakter luteina još slabiji (Mortensen i Skibsted, 1997b; Woodall i sar., 1997). Naime, u homogenom sistemu, kakvi su model sistemi I i II sa dodatkom heksanskih ekstrakata, s obzirom na nemogućnost β -karotina i luteina da recikliraju α -tokoferol (Mortensen i Skibsted, 1997b; Valgimigli i sar., 1997), postignuti antioksidativni efekti ispitivanih heksanskih ekstrakata predstavljaju sumu pojedinačnih efekata liposolubilnih antioksidanata prisutnih u ekstraktima. α -Tokoferol, izrazito reaktivan prema peroksi-radikalima, troši se prvi, da bi po njegovom utrošku reagovali kao antioksidanti β -karotin i, konačno, lutein (Tsuchihashi i sar., 1995). Najverovatnije da kumulativni antioksidativni karakter kombinacije α -tokoferola, β -karotina i luteina, manifestovan u homogenim sistemima, prerasta u sinergističku spregu u složenijim, prirodnim sistemima, npr. membranama (Palozza i Krinsky, 1992).

Sadržaji α -tokoferola, β -karotina i ukupnih ksantofila u model sistemima I i II u slučaju svih ispitivanih heksanskih ekstrakata su veoma niski – reda veličine 0.007-0.008 mg/kg za α -tokoferol, 0.0005-0.0007 mg/kg za β -karotin, odnosno 0.005-0.006 mg/kg za ukupne ksantofile. Međutim, iako niski, ovi sadržaji su ostvarili značajne stepene sniženja relativnog intenziteta (RI) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata, pogotovo u slučaju apliciranja heksanskih ekstrakata punomasnih hraniva na model sisteme I i II (slike 32 i 43). Delotvornost ispitivanih liposolubilnih antioksidanata i pri ovako niskim koncentracijama u skladu je sa navodom Warnera i Frankela (1987), po kome β -karotin u sojinom ulju izloženom dejstvu svetlosti na 25 °C deluje antioksidativno samo pri koncentracijama nižim od 0.002%. Sličan zaključak nalazi se i u radu Bratkowske i Zwierzykowskog (1988), koji ističu da karotinoidi u koncentracionom opsegu 0.5×10^{-4} – 20×10^{-4} % inhibiraju autooksidaciju repičinog ulja na 90 °C.

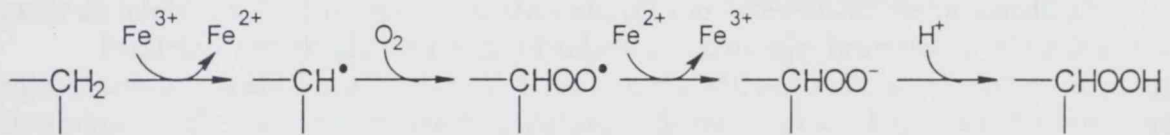
Antioksidativni efekti postignuti dodavanjem heksanskih ekstrakata u model sistem I (slika 32) nešto su niži od efekata koje su ostvarili isti ekstrakti u model sistemu II (slika 43), ali su ustanovljene razlike u nivoima inhibicije relativno male, što ukazuje da ispitivani ekstrakti ispoljavaju slično antioksidativno dejstvo kako pri termičkoj, tako i pri katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata. Ovo saznanje upućuje na činjenicu da pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu I (60 °C, 24 h) ne dolazi do bitnije degradacije ispitivanih liposolubilnih antioksidanata. Yanishlieva i Marinova (1998) beleže da efektivnost (mogućnost blokiranja lančane radicalske reakcije interakcijom sa peroksi-radikalima, pri čemu se produžava indukcionim period) i antioksidativna moć (sposobnost da antioksidant učestvuje i u paralelnim, po oksidaciju "nepoželjnim" reakcijama) α -tokoferola rastu sa porastom temperature pri termičkoj oksidaciji triacilglicerola. Relativnu stabilnost α -tokoferola u termički tretiranom sojinom ulju utvrdili su i Kajimoto i saradnici (1991), ispitujući termičku degradaciju α -tokoferola u različitim biljnim uljima, tretiranim na 180 °C, otkrivši da je stepen degradacije α -tokoferola u obrnutoj srazmeri sa udelom oleinske kiseline u biljnim uljima. Međutim, istovremeno delovanje povišene temperature i pritiska vodi sniženju koncentracije liposolubilnih antioksidanata (Artz i sar., 1992), na što ukazuju i sniženja sadržaja α -tokoferola i ispitivanih karotinoida u punomasnim hranivima u odnosu na zrno soje, registrovana nakon ostvarenih termičkih tretmana (tabela 17). Sličnost u antioksidativnim efektima heksanskih ekstrakata postignutim u model sistemima I i II ukazuje, takođe, da heksanski ekstrakti ne sadrže antioksidante koji bi mehanizmom kompleksiranja Fe(II)-jona (ili nekog drugog metalnog jona) inhibirali katalitičku oksidaciju metil-linoleata.

Heksanski ekstrakti ispitivanih hraniva dodavani u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat u model sistem I pokazali su se efikasnijim u snižavanju RI ESR signala PBN-OOLM spin adukata u odnosu na heksanski ekstrakt zrna soje (stepeni inhibicije – 31.20% zrno soje; 80.39% ESG; 86.27% HTZS – slika 32). Slični odnosi efikasnosti

heksanskih ekstrakata pri snižavanju RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata registrovani su i u model sistemu II (stepeni inhibicije – 41.56% zrno soje; 88.46% ESG; 81.45% HTZS – slika 43). Sadržaj ispitivanih antioksidativnih materija u heksanskim ekstraktima zrna soje i ispitivanih hraniva (tabela 17) ne pruža mogućnost da se objasne razlike u antioksidativnim efektima ispitivanih heksanskih ekstrakata, ostvarenim njihovim dodavanjem u model sisteme I i II.

U pronalazenju objašnjenja za slabiji antioksidativni efekat heksanskog ekstrakta zrna soje u odnosu na heksanske ekstrakte ispitivanih hraniva, kako pri termičkoj tako i pri katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata, pošlo se od pretpostavke da bi dokaz prisustva lipoksigenaza u heksanskom ekstraktu zrna soje poslužio kao osnova za traženo objašnjenje. Naime, mnoge biljke, uključujući i soju, sadrže lipoksigenaze, enzime koji su delimično odgovorni za funkcionisanje odbrambenog mehanizma "kontrolisane oksidacije", kojim fizički ugrožena biljka pokušava da se suprotstavi delovanju mikroorganizama, tj. gljivica i bakterija (Halliwell i Gutteridge, 1989). Aktiviranje odbrambenog mehanizma započinje hidrolizom glicerida, glikolipida i fosfolipida delovanjem lipaza, pri čemu se oslobađaju slobodne masne kiseline, koje direktnom oksidacijom sa kiseonikom, katalizovanom lipoksigenazama, daju C₉- i C₁₃-hidroperokside masnih kiselina (Hamilton i sar., 1997).

Soja sadrži tri izoenzima lipoksigenaza (LOX) – LOX-1, LOX-2 i LOX-3, od kojih svaki sadrži jedan Fe(III)-jon po molekulu enzima (Axelrod i sar., 1981). Supstrat za izoenzime lipoksigenaza mora da sadrži *cis,cis*-1,4-pentadienidnu sekvencu u strukturi, kakvu poseduju linolna i linolenska kiselina (King i sar., 1998). Katalitičko delovanje lipoksigenaza odigrava se po sledećem mehanizmu (Gunstone, 1984):



Primenom metode za selektivno kvalitativno određivanje izoenzima lipoksigenaza u zrnu soje (Suda i sar., 1995) na sojino zrno, punomasna hraniva i heksanske ekstrakte dobijeni su podaci prezentirani u tabeli 18.

Tabela 18. Prisustvo izoenzima lipoksigenaza (LOX-1, LOX-2 i LOX-3) u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i heksanskim ekstraktima

Uzorak	LOX-1	LOX-2	LOX-3
Zrno soje	+++	+++	++++
ESG	-	-	-
HTZS	-	-	-
Heksanski ekstrakt zrna soje	++	++	++
Heksanski ekstrakt ESG	-	-	-
Heksanski ekstrakt HTZS	-	-	-

++ - slabije izraženo prisustvo
 +++ - izraženo prisustvo
 ++++ - jako izraženo prisustvo

Prisustvo svih izoenzima lipoksigenaza soje (LOX-1, LOX-2 i LOX-3) zabeleženo je samo u zrnu soje i pripadajućem heksanskom ekstraktu (tabela 18). Interesantno je napomenuti da korišćeno zrno soje domaćeg podneblja sadrži sva tri izoenzima lipoksigenaza, pri čemu je aktivnost LOX-3 najizraženija.

Termički tretmani, primenjivani pri proizvodnji ispitivanih hraniva, prouzrokovali su inaktivaciju enzima lipoksigenaza (tabela 18). Camire i Dougherty (1998) ističu da se lipaze i drugi enzimi koji učestvuju u oksidaciji lipida biljnog materijala tokom ekstruzije denaturišu. Paula i saradnici (1995) su ustanovili da se LOX-1 iz soje potpuno inaktivira termičkim tretanjem na 100 °C tokom 7 minuta, dok navodi Ludikhuzyea i saradnika (1998) upućuju na još blaže uslove termičke inaktivacije lipoksigenaza soje – temperaturu od 60-70 °C pri atmosferskom pritisku. Imajući u vidu navedene literaturne podatke može se zaključiti da je tokom proizvodnje punomasnih hraniva od zrna soje došlo do potpune denaturacije lipoksigenaza, s obzirom da tokom ekstruzije temperatura ekstrudata dostiže oko 130 °C u trajanju od 30 sekundi, a da se prilikom hidrotermičkog tretmana zrna soje ostvaruje temperaturni raspon od 75-115 °C u trajanju od 7-8 minuta.

Iniciranje delovanja lipoksigenaza zrna soje vezano je za proces mlevenja, koji je prethodio sukcesivnoj ekstrakciji zrna soje različitim rastvaračima. Izraženu lipoksigenaznu aktivnost u supernatantu vodene suspenzije sojinog brašna, dobijenog mlevenjem sirovog zrna soje, zabeležili su Nishiba i Suda (1998).

Dodavanje heksanskog ekstrakta zrna soje u količini od 0.02% u model sisteme I i II prouzrokovalo je supresiju oksidacije metil-linoleata usled prisutnih liposolubilnih antioksidanata, ali i istovremenu enzimsku oksidaciju metil-linoleata zbog prisutnih lipoksigenaza soje. Generisanje peroksi-radikala delovanjem LOX-2 i LOX-3 iz soje na linolensku kiselinu zabeležili su Matsui i saradnici (1994), ustanovivši da retinska kiselina može da inhibira delovanje lipoksigenaza, delujući kao "skevindžer" peroksi-radikala.

Paralelno antioksidativno i prooksidativno delovanje heksanskog ekstrakta zrna soje objašnjava slabije snižavanje RI ESR signala PBN-OOLM spin adukata u model sistemima I i II, u kojima se, dakle, u slučaju dodavanja heksanskog ekstrakta zrna soje, deo prisutnih antioksidanata angažuje na snižavanje koncentracije enzimski generisanih peroksi-radikala. Nishiba i Suda (1998) su nedavno ustanovili da je supresivna aktivnost liposolubilnih antioksidanata homogenata sojinog zrna tokom enzimske oksidacije lipida soje praćena padom koncentracija ispitivanih antioksidanata, posebno α -tokoferola.

Pretpostavka da α -tokoferol, prisutan u heksanskom ekstraktu zrna soje, inhibira delovanje lipoksigenaza u saglasnosti je sa već zabeleženim antioksidativnim efektom troloxa na aktivnost LOX-1 iz soje (Maccarrone i sar., 1995). β -Karotin je, takođe, sposoban da inhibira aktivnost lipoksigenaza iz heksanskog ekstrakta zrna soje, s obzirom da je nedavno registrovano da ispoljava antioksidativno dejstvo pri oksidaciji linolne kiseline lipoksigenazama iz krompira (Aziz i sar., 1999).

Heksanski ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje ne sadrže lipoksigenaze soje (tabela 18), jer ih nema ni u punomasnim hranivima, pa su, stoga, antioksidativni efekti postignuti dodavanjem ovih ekstrakata u model sisteme I i II značajno viši u poređenju sa efektima heksanskog ekstrakta zrna soje.

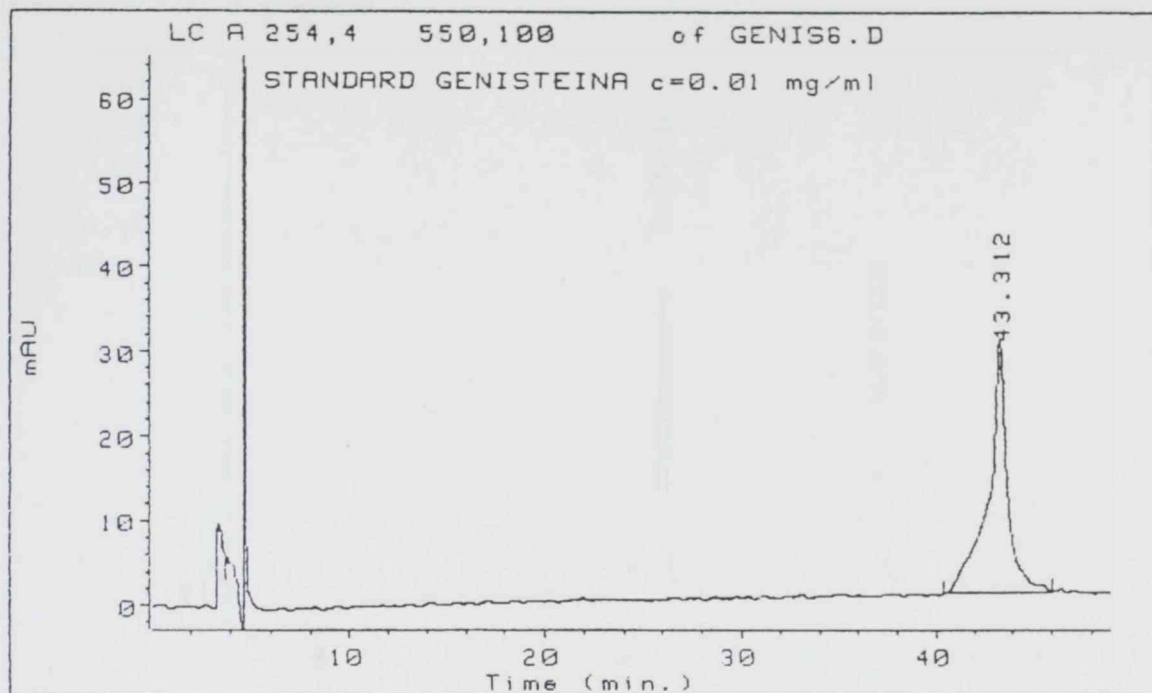
Poređenjem sadržaja ispitivanih liposolubilnih antioksidanata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje (tabela 17) dolazi se do zaključka da su različiti termički tretmani zrna soje, ekstruzija i hidrotermička obrada, slično uticali na sadržaj liposolubilnih antioksidanata zrna soje.

4.3.2. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA ETANOLNIH EKSTRAKATA ZRNA SOJE I PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE U MODEL SISTEMIMA I I II

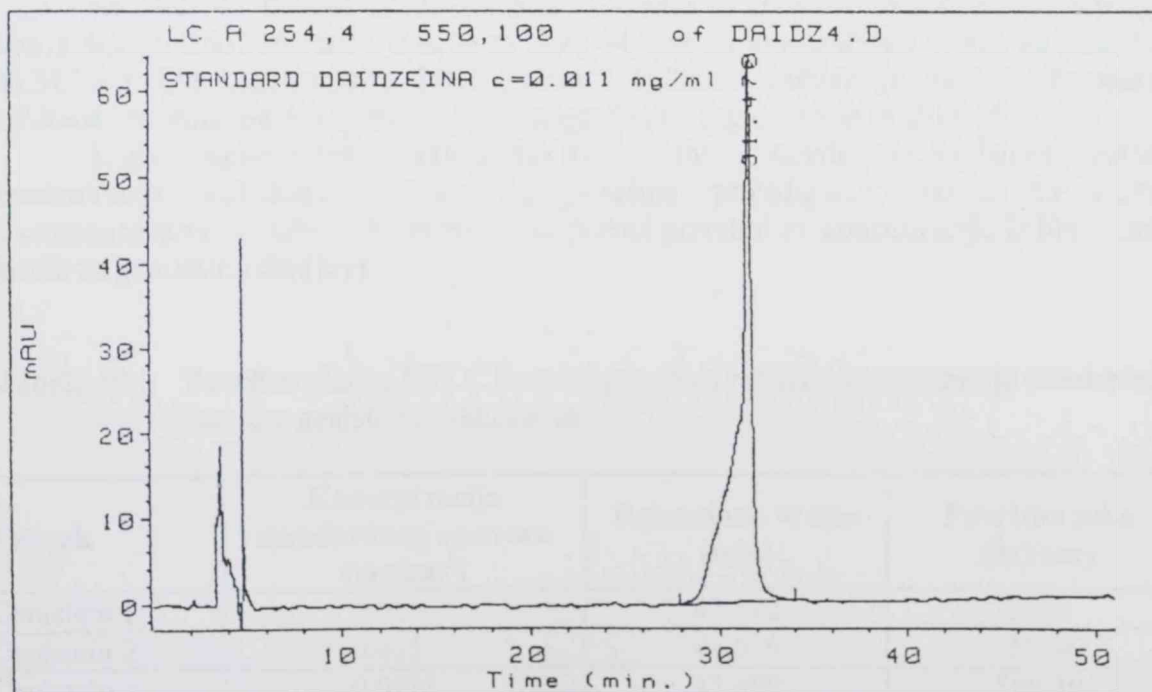
Dodavanje etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje u količini od 0.02% u model sisteme I i II dovelo je do supresije termičke, odnosno katalitičke oksidacije metil-linoleata. Snižena RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata izazvana dodavanjem etanolnih ekstrakata u model sisteme I i II ukazuju da oni sadrže neke antioksidativne materije. Antioksidativnu prirodu sirovog etanolnog ekstrakta natoa, proizvoda fermentacije soje izazvane delovanjem *Bacillus natto*, dodavanog u model sisteme različitih nezasićenih masnih kiselina, ustanovili su i Hattori i saradnici (1995), navodeći da ekstrakt sadrži materije koje, "hvatajući" peroksi-radikale, inhibiraju fazu propagacije oksidacije lipida. Lentsova i saradnici (1993) su, takođe, utvrdili da dodavanje etanolnog ekstrakta grubo mlevenog sojinog brašna u količini od 0.25% u mast rezultira manjim sniženjima koncentracije linolne, linolenske i oleinske kiseline u ispitivanim uzorcima masti tokom oksidacije u odnosu na uzorke masti bez dodatka ekstrakta.

Obrazloženje za utvrđene antioksidativne efekte ispitivanih etanolnih ekstrakata traženo je u mnogobrojnim literaturnim navodima, koji upućuju na antioksidativni karakter fenolnih jedinjenja soje, pre svega polifenola – izoflavona. Pratt je još 1980. godine naveo da su dominantni polifenolni antioksidanti soje izoflavoni, da bi serija naučnih istraživanja novijeg datuma ovo potvrdila (Fleury i sar., 1992; Esaki i sar., 1994; Kim i sar., 1994; Ikeda i sar., 1995; Lee i Cheigh, 1997a; 1997b; Berghofer i sar., 1998). Identifikacija izoflavona zabeležena je u različitim ekstraktima soje i njenih proizvoda – metanolnim (Coward i sar., 1993; Kim i sar., 1994; Fukutake i sar., 1996; Bae i sar., 1997; Lee i Cheigh, 1997a), etanolnim (Pettersen i Kiessling, 1984; Wang i sar., 1990; Kim i sar., 1995), acetonitrilnim (Murphy, 1982; Wang i sar., 1990; Coward i sar., 1993; Wang i Murphy, 1994b; 1996), etil-acetatnim (Liggins i sar., 1998; Miyazawa i sar., 1999) i vodenim (Kim i sar., 1995; Tamura i sar., 1999). Navedeni literaturni navodi ukazali su na mogućnost da se antioksidativna priroda etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje pripíše nekim izoflavonima soje, pre svega genisteinu i daidžeinu. Pripisivanje dominantne uloge ovim izoflavonskim aglikonima soje u antioksidativnom delovanju polifenolne frakcije ispitivanih etanolnih ekstrakata bazirano je na činjenici da alkoholni ekstrakti fermentisanih proizvoda od soje, koji sadrže uglavnom aglikone genistein i daidžein, ispoljavaju znatno jače antioksidativne efekte u poređenju sa efektima alkoholnih ekstrakata nefermentisanih proizvoda od soje (Murakami i sar., 1984; Esaki i sar., 1994). Razmatranja zavisnosti antioksidativnog karaktera i hemijske strukture niza izoflavona soje, koja će biti predočena kasnije, idu, takođe, u prilog ovom opredeljenju.

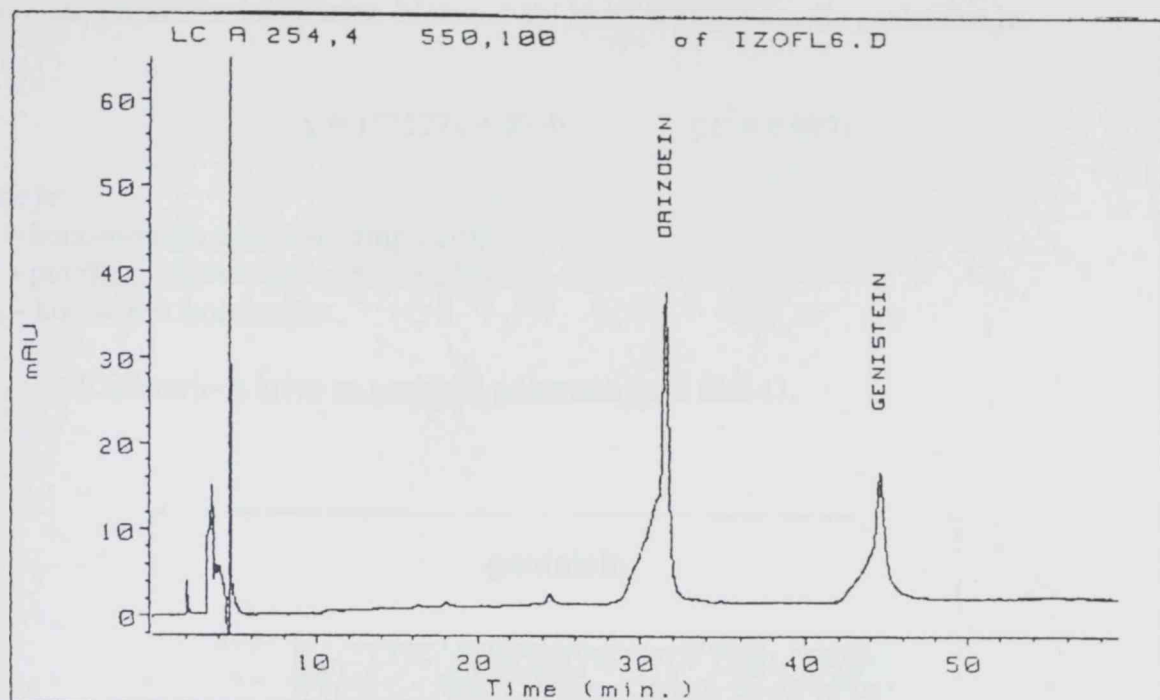
Kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi genisteina i daidžeina u zrnju soje, punomasnim hranivima od zrna soje i etanolnim ekstraktima primenom HPLC metode prethodilo je hromatografisanje serije standardnih rastvora genisteina i daidžeina. HPLC hromatogrami standardnih rastvora genisteina, daidžeina i smeše oba standarda (1:1) prikazani su na slikama 44-46.



Slika 44. HPLC hromatogram standardnog rastvora genisteina



Slika 45. HPLC hromatogram standardnog rastvora daidžeina



Slika 46. HPLC hromatogram standardnog rastvora smeše genisteina i daidžeina (1:1)

Na slici 45 uočava se da retenciono vreme za daidžein iznosi 31.470 min (za koncentraciju 0.011 mg/cm^3), dok se sa slike 44 vidi da je retenciono vreme za genistein 43.312 min (za koncentraciju 0.010 mg/cm^3). Odlično razdvajanje ovih izoflavonskih aglikona pri primenjenim uslovima hromatografisanja sagledava se sa slike 46.

Konstruisanje kalibracionih krivih podrazumeva određivanje zavisnosti između koncentracija standardnih rastvora i površina pripadajućih pikova na HPLC hromatogramima. U tabeli 19 prikazani su podaci potrebni za konstruisanje kalibracionih krivih za genistein i daidžein.

Tabela 19. Površine pikova HPLC hromatograma za različite koncentracije standardnih rastvora genisteina i daidžeina

Uzorak	Koncentracija standardnog rastvora (mg/cm^3)	Retenciono vreme (min)	Površina pika (mVsec)
Genistein 1	0.01	43.312	2062
Genistein 2	0.005	43.079	1039
Genistein 3	0.0025	42.499	589.39
Daidžein 1	0.011	31.470	3333
Daidžein 2	0.0055	31.069	1694
Daidžein 3	0.00275	31.030	851.24

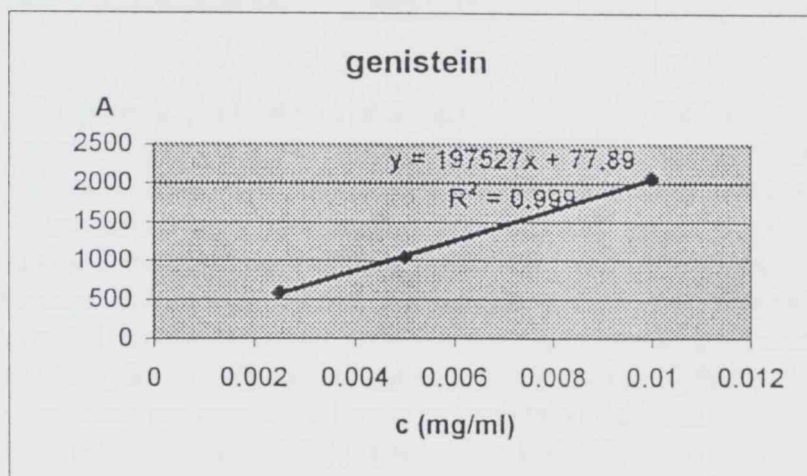
Regresionom analizom podataka iz tabele 19 ustanovljena je matematička zavisnost između detektovanih površina na HPLC hromatogramima i koncentracija standardnih rastvora genisteina i daidžeina. Matematički izraz za koncentraciju genisteina je:

$$y = 197527x + 77.89 \quad (R^2 = 0.999)$$

gde je:

- x – koncentracija genisteina (mg/cm^3),
- y – površina odgovarajućeg pika (mVsec),
- R – koeficijent korelacije.

Kalibraciona kriva za genistein prikazana je na slici 47.



Slika 47. Kalibraciona kriva za genistein

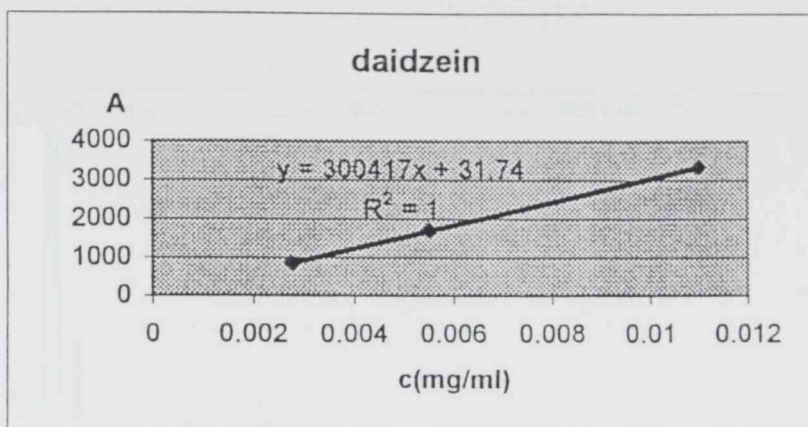
Matematički izraz za koncentraciju daidžeina je:

$$y = 300417x + 31.74 \quad (R^2 = 1.000)$$

gde je:

- x – koncentracija daidžeina (mg/cm^3),
- y – površina odgovarajućeg pika (mVsec),
- R – koeficijent korelacije.

Kalibraciona kriva za daidžein prikazana je na slici 48.



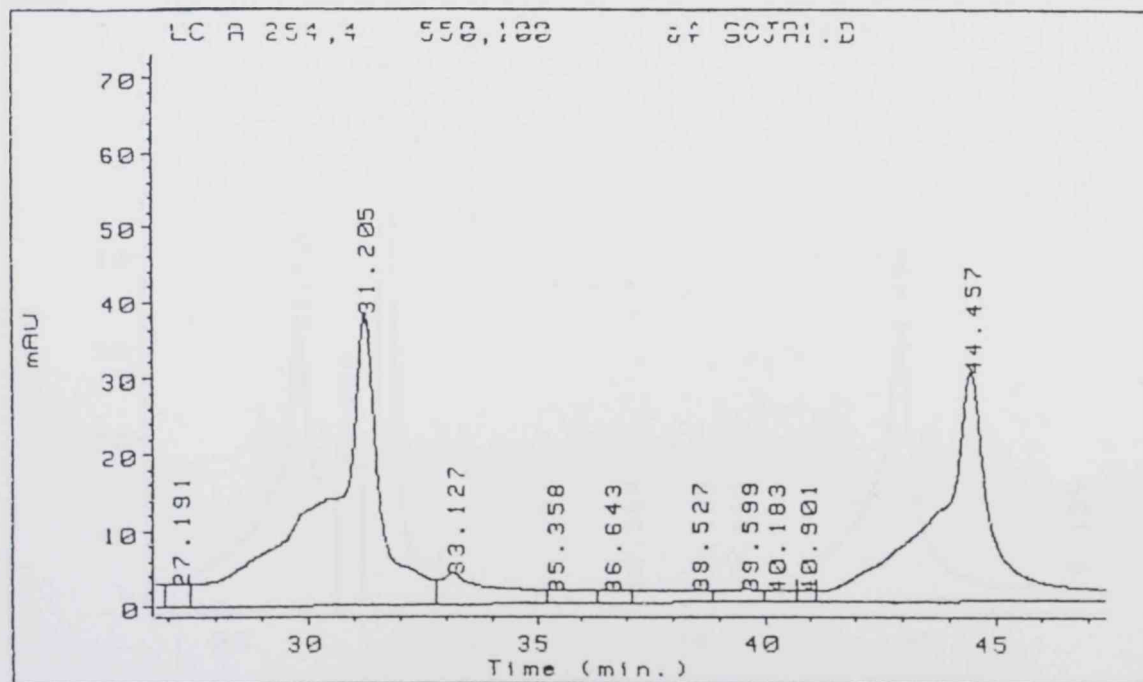
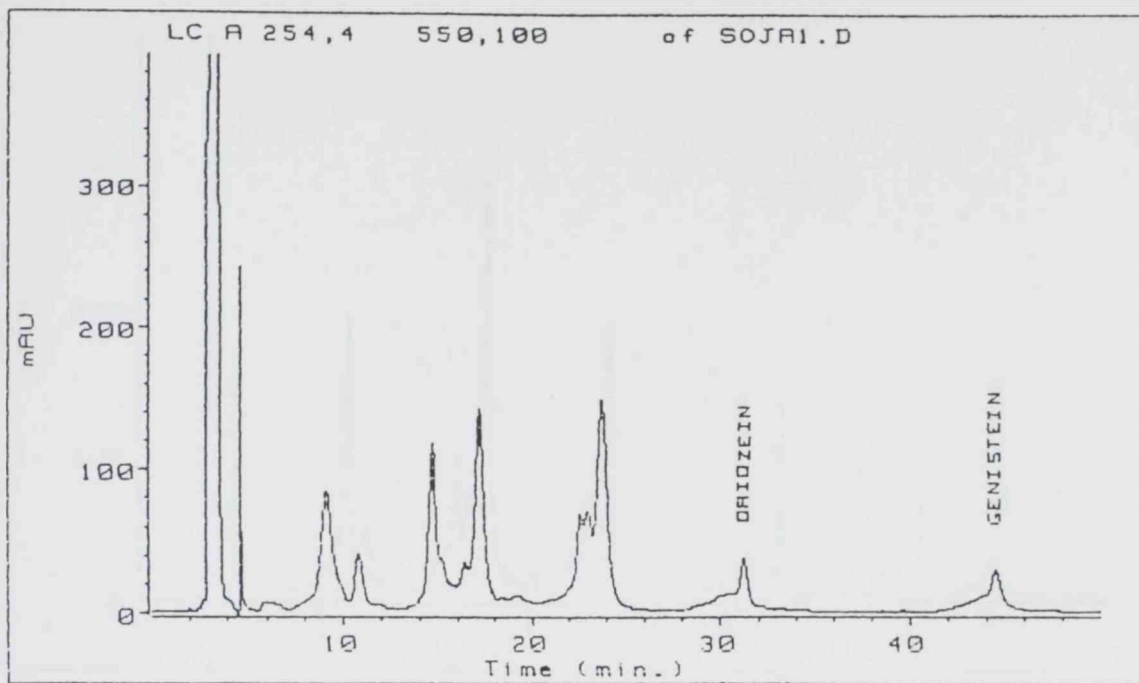
Slika 48. Kalibraciona kriva za daidžein

Detekcija pikova genisteina i daidžeina na HPLC hromatogramima zrna soje, ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje i etanolnih ekstrakata vršena je na osnovu retencionih vremena i izgleda UV spektara standardnih rastvora genisteina i daidžeina.

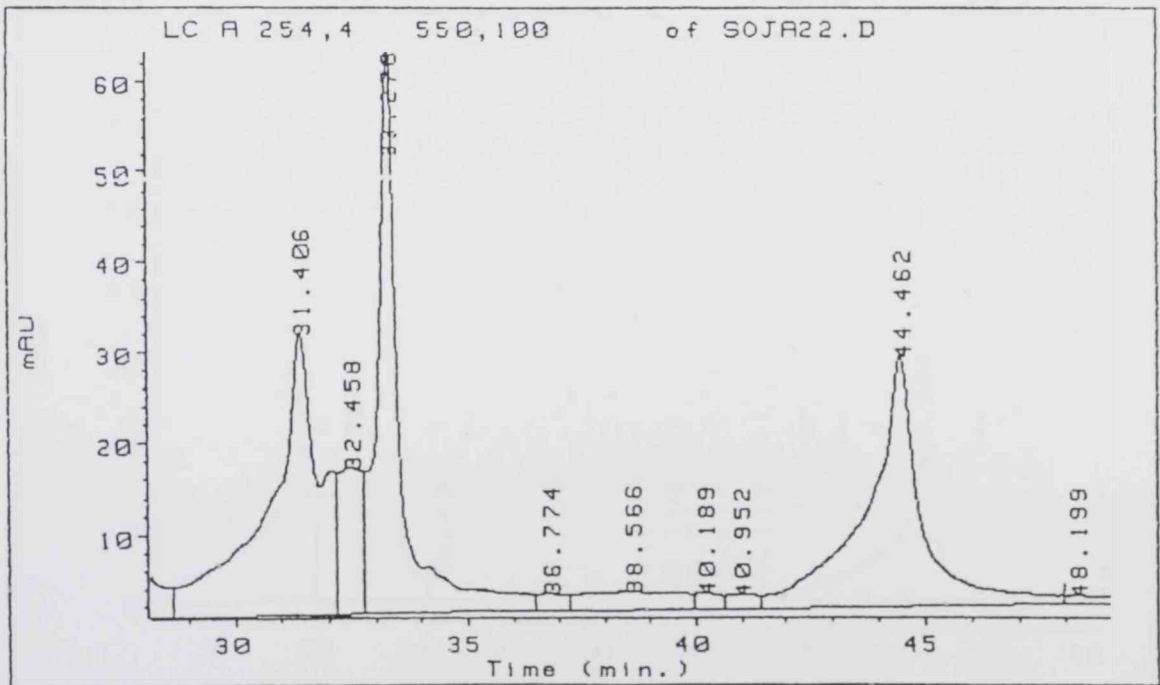
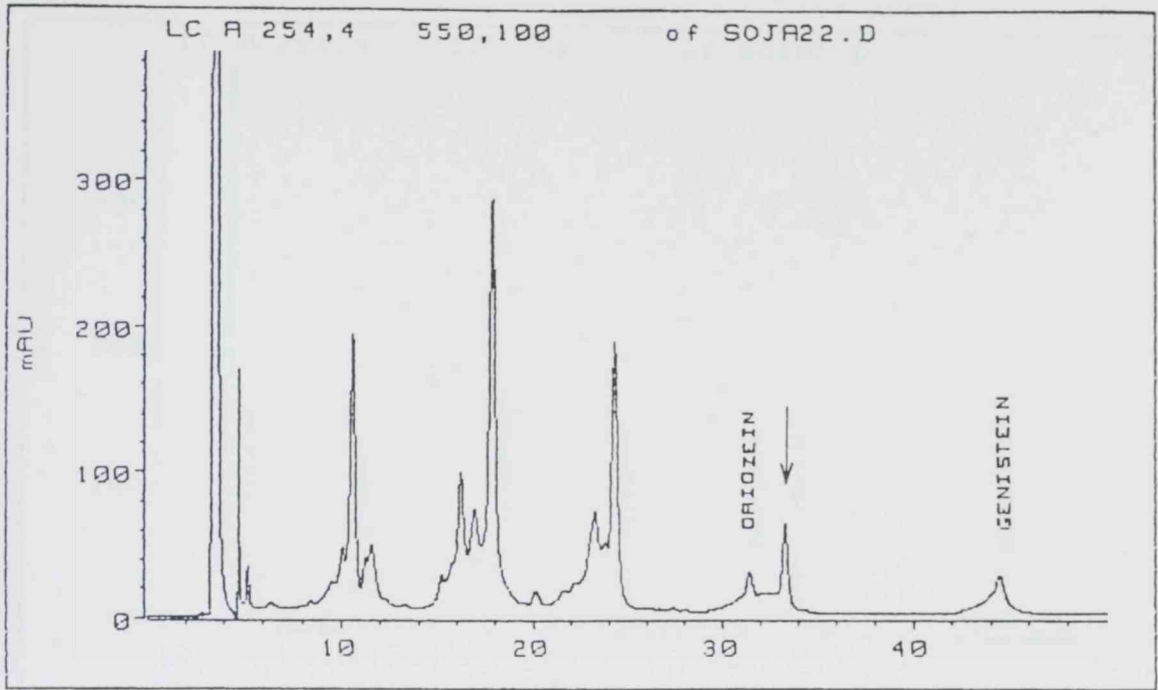
HPLC hromatogrami zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza, hidrotermički tretiranog zrna soje i etanolnih ekstrakata prikazani su na slikama 49-54.

Određivanje sadržaja genisteina i daidžeina u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i etanolnim ekstraktima vršeno je na osnovu integracije površina pikova ovih izo flavona na hromatogramima prikazanim na slikama 49-54, odnosno primenom matematičkih izraza za genistein i daidžein.

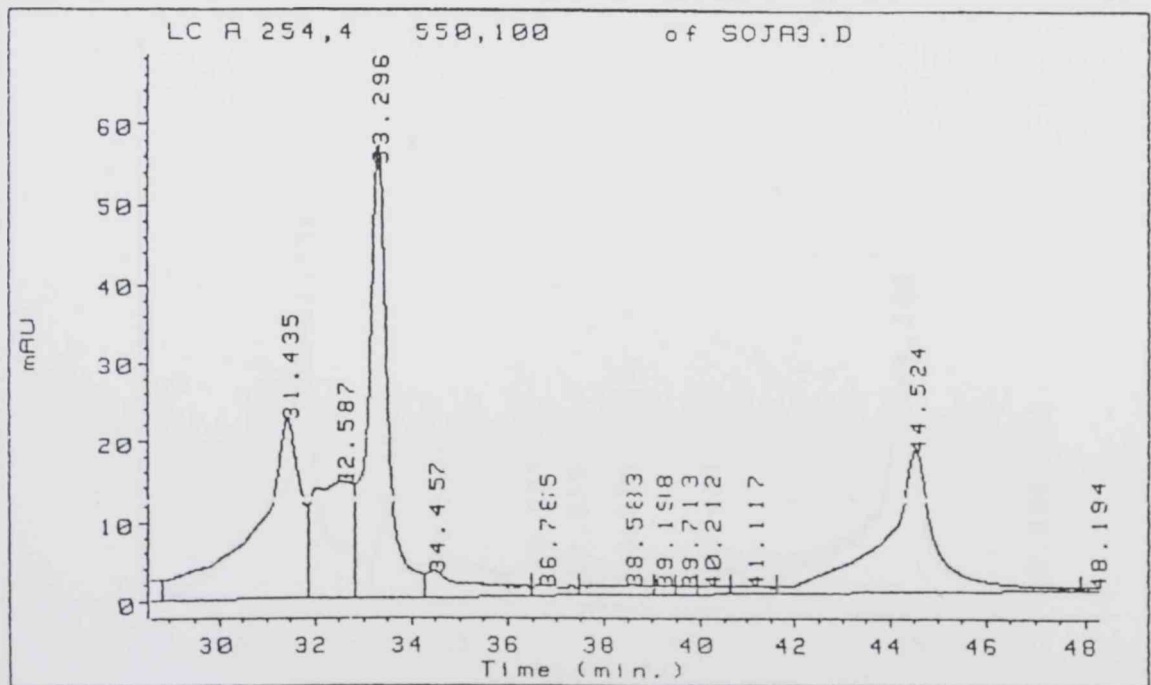
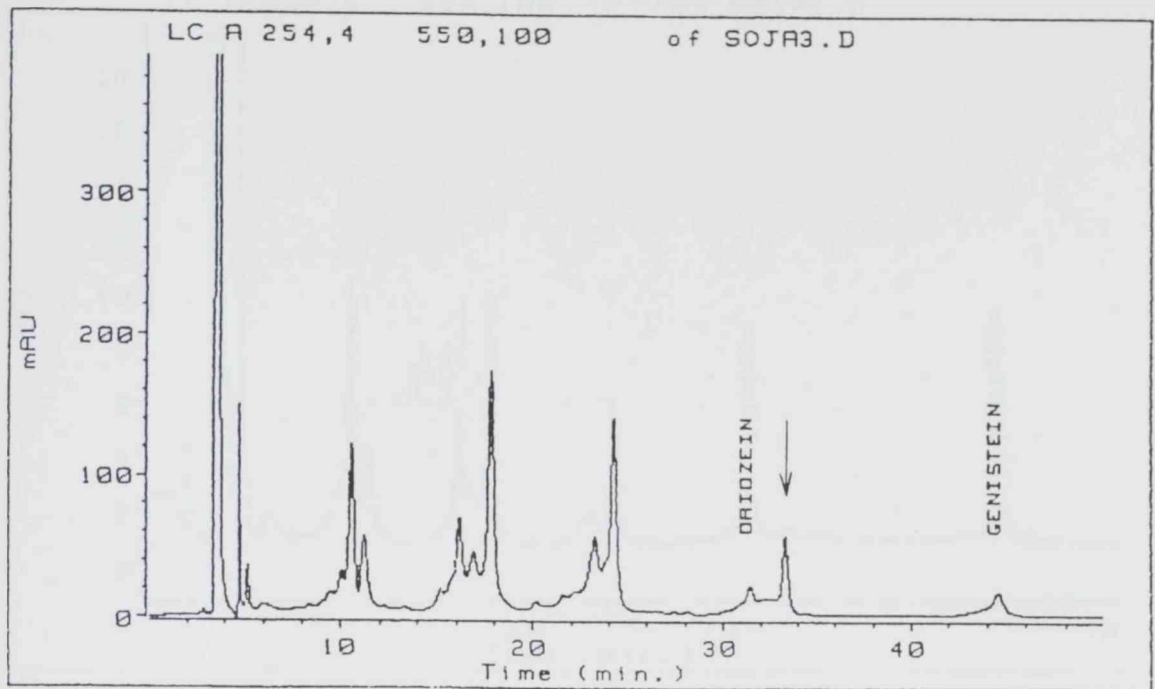
Rezultati određivanja sadržaja genisteina i daidžeina u navedenom materijalu prikazani su u tabelama 20 i 21.



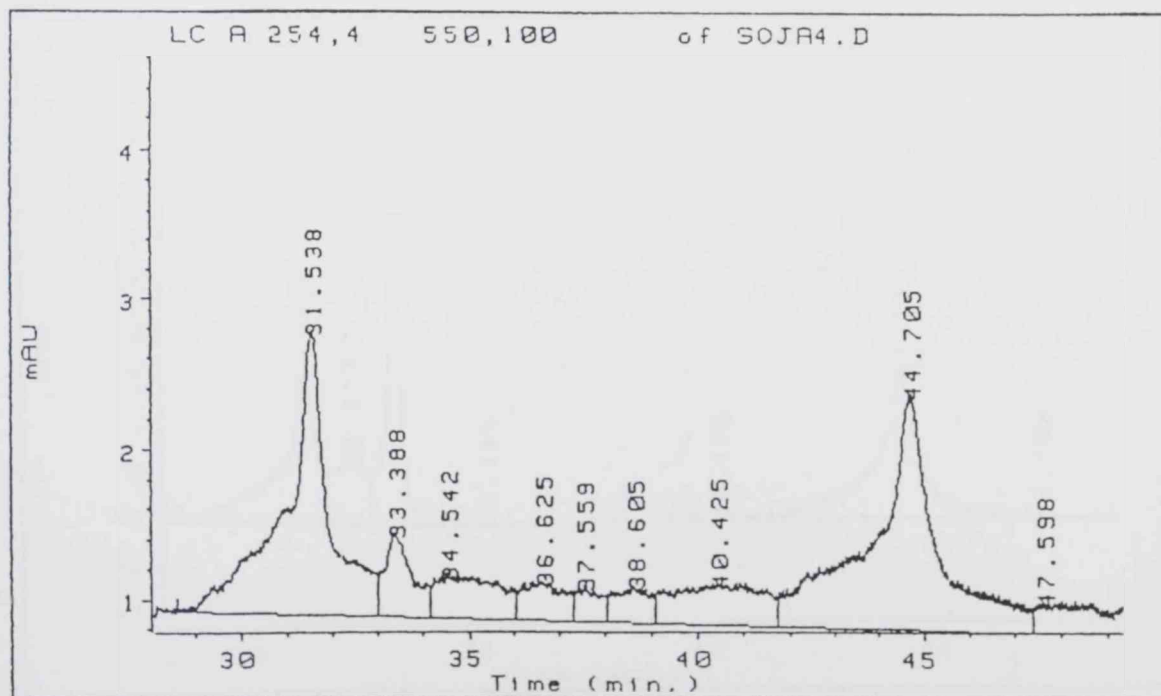
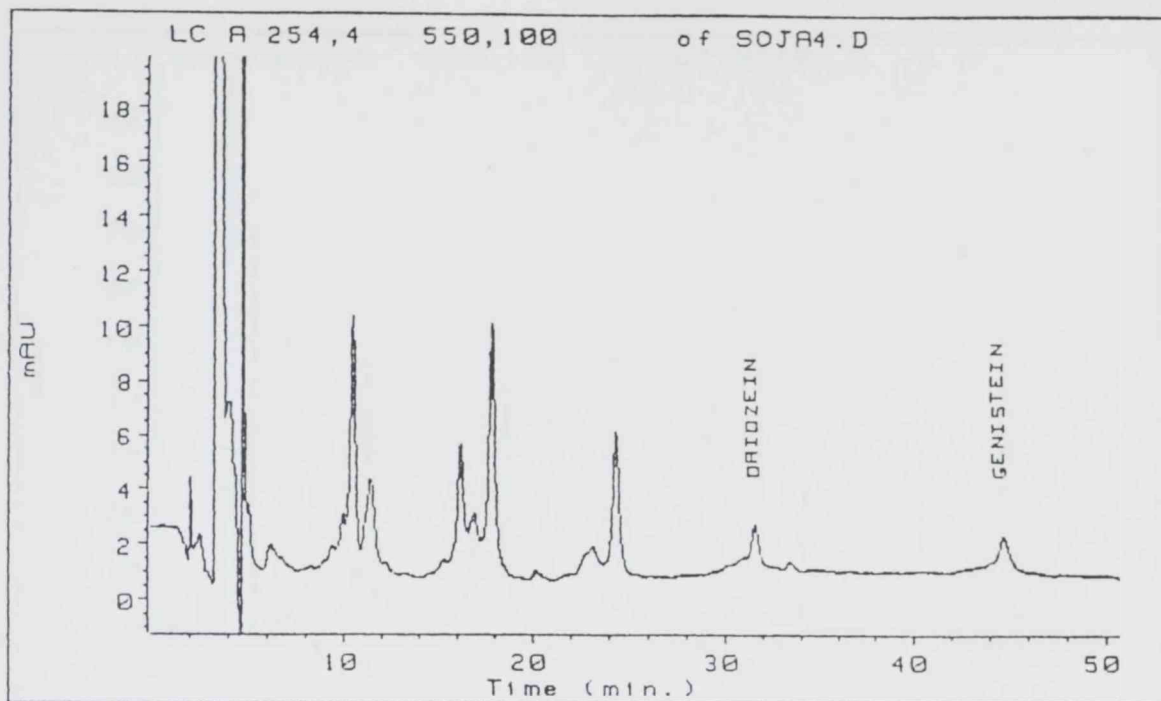
Slika 49. HPLC hromatogram zrna soje



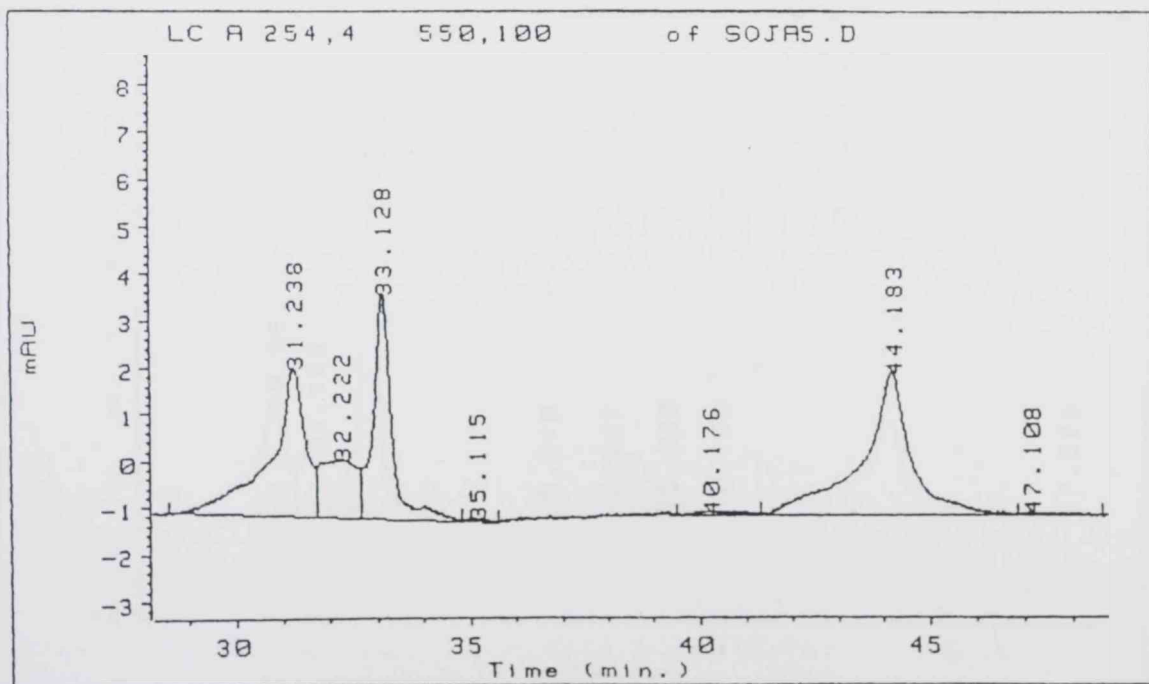
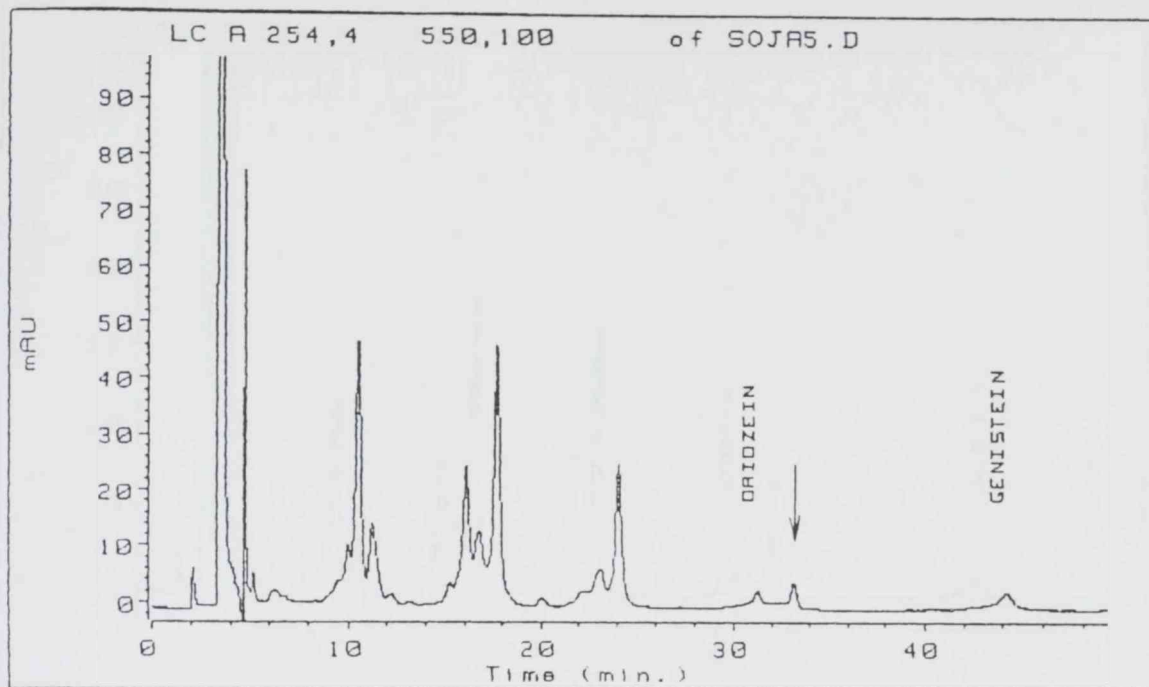
Slika 50. HPLC hromatogram ekstrudiranog sojinog griza



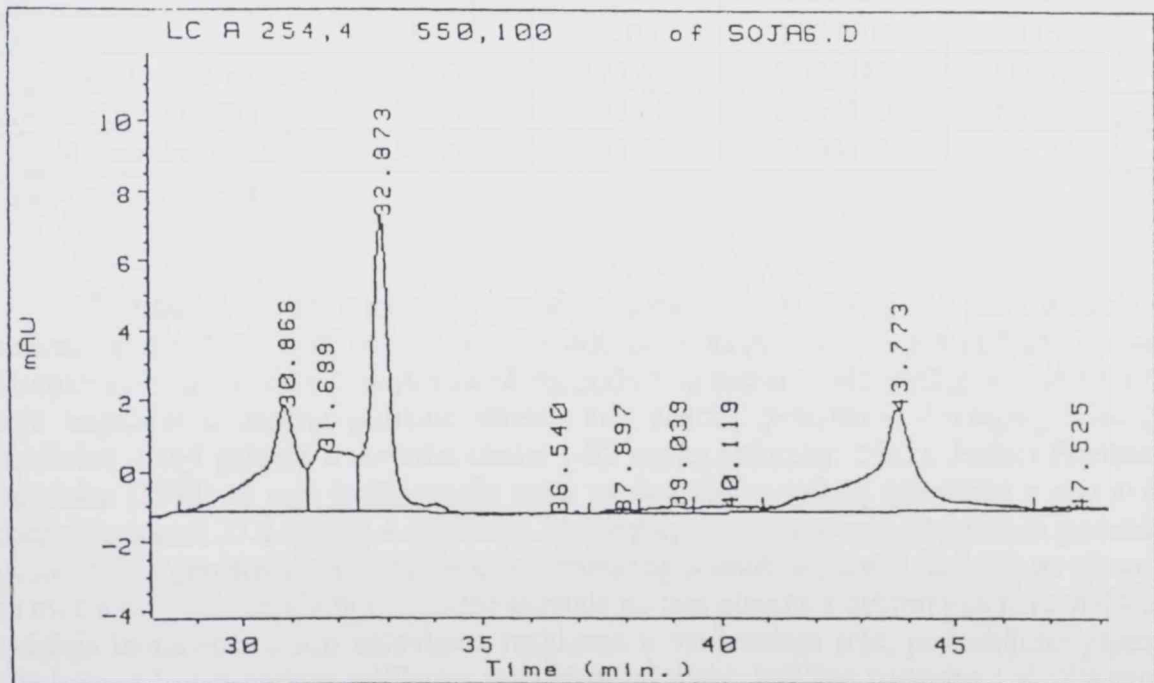
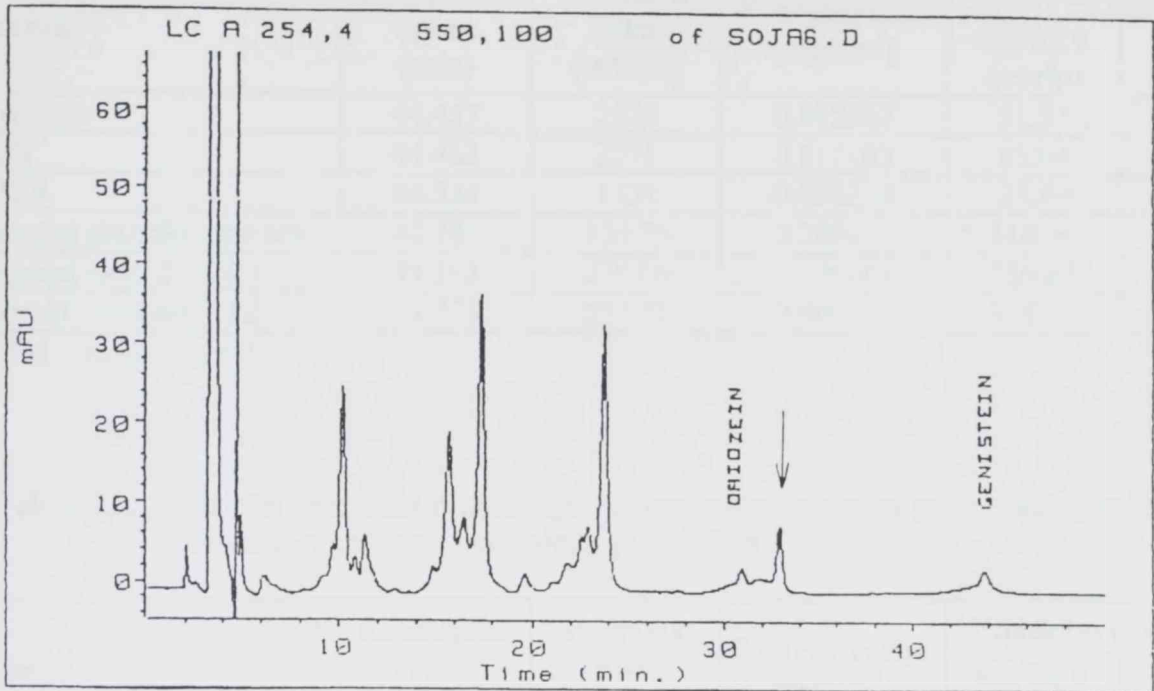
Slika 51. HPLC hromatogram hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 52. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta zrna soje



Slika 53. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 54. HPLC hromatogram etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

Tabela 20. Sadržaj genisteina u zrnju soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnju soje i etanolnim ekstraktima

Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika (mVsec)	Koncentracija (mg/cm ³)	Sadržaj genisteina	
				mg/kg u uzorku	mg/kg u SM*
Zrno soje	44.457	2579	0.012662	51.51	57.27
ESG	44.462	2271	0.011103	45.01	47.21
HTZS	44.524	1331	0.006344	25.99	29.09
Etanolni ekstrakt zrna soje	44.705	159.76	0.000414	414.00	
Etanolni ekstrakt ESG	44.163	229.66	0.000768	389.85	
Etanolni ekstrakt HTZS	44.773	227.71	0.000758	385.77	

*SM – suva materija

Tabela 21. Sadržaj daidžeina u zrnju soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnju soje i etanolnim ekstraktima

Uzorak	Retenciono vreme (min)	Površina pika (mVsec)	Koncentracija (mg/cm ³)	Sadržaj daidžeina	
				mg/kg u uzorku	mg/kg u SM*
Zrno soje	31.205	3135	0.01033	42.02	46.72
ESG	31.406	2381	0.00782	31.70	33.25
HTZS	31.435	1505	0.004904	20.09	22.49
Etanolni ekstrakt zrna soje	31.538	125.63	0.000313	313.00	
Etanolni ekstrakt ESG	31.238	172.81	0.000470	238.58	
Etanolni ekstrakt HTZS	30.866	155.77	0.000413	209.64	

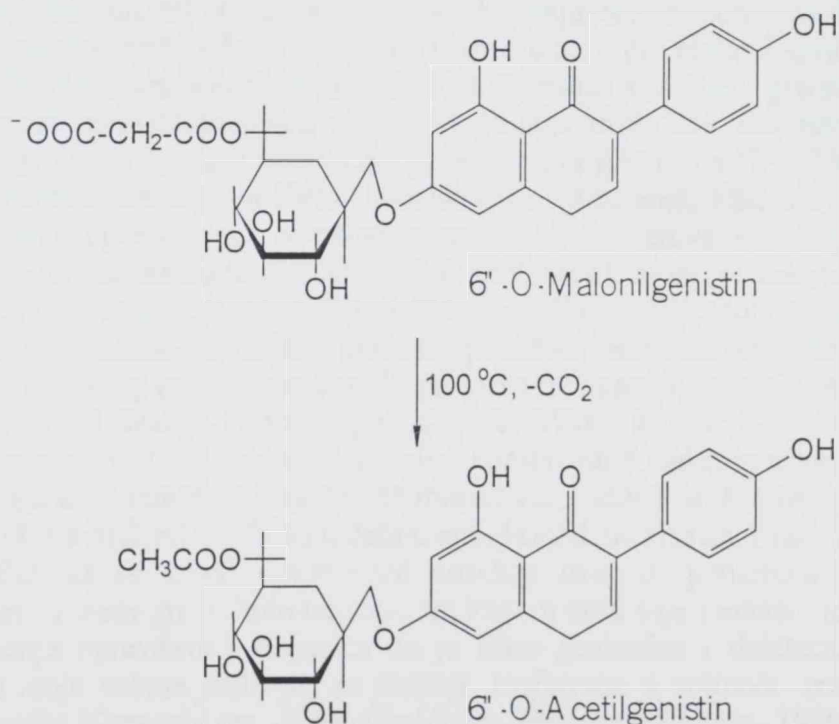
*SM – suva materija

Literaturni navodi o sadržaju genisteina i daidžeina u sirovoj soji (ali i u širokom spektru proizvoda od soje) veoma se razlikuju. Tako, na primer, Murphy (1982) i Wang i Murphy (1994a) navode da soja američkog podneblja sadrži 15-45 mg/kg genisteina, dok soju uzgajanu u Japanu odlikuje daleko niži sadržaj genisteina, 4.6 mg/kg. Sadržaj daidžeina u soji gajenoj u Americi iznosi 1-22 mg/kg (Murphy, 1982). Podaci Frankea i saradnika (1998) za soju iz Singapura nešto su drugačiji – sadržaj genisteina u soji ovog podneblja iznosi 27.8 mg/kg, a daidžeina 51.9 mg/kg. Poređenje ovih literaturnih podataka sa sadržajem genisteina i daidžeina u soji domaćeg podneblja (tabele 20 i 21) ne ukazuje na mogućnost povlačenja neke striktno paralele po tom pitanju, s obzirom da je raznolikost sadržaja izoflavona u soji uslovljena razlikama u varijetetima soje, podnebljima gajenja ove kulture i vremenskim prilikama (temperaturni nivoi, količine padavina i sl.) (Wang i Murphy, 1994a; Yi i sar., 1997).

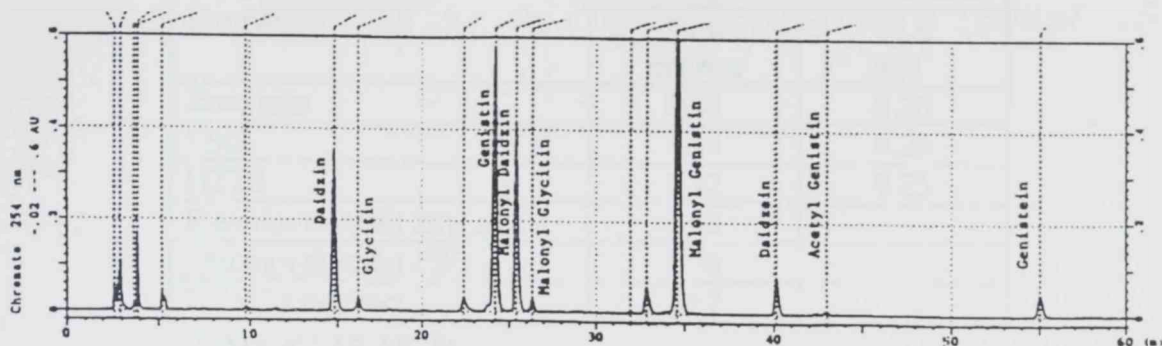
Ekstrudiranje i hidrotermička obrada zrna soje rezultiraju sniženjem koncentracije genisteina i daidžeina u proizvedenim punomasnim hranivima, s tim da je stepen redukcije ovih izoflavona viši pri proizvodnji HTZS-a (oko 29% za genistein, odnosno 52% za daidžein) u odnosu na proizvodnju ESG-a (oko 17% za genistein, odnosno 29% za daidžein). Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa podacima Mahungua i saradnika (1999),

koji su ustanovili da proces ekstruzije izaziva kvalitativne i kvantitativne promene izoflavona soje. Isti autori navode da redukcija sadržaja aglikona u ekstrudiranoj hrani od soje može biti rezultat destrukcije izoflavona izazvane toplotom ili posledica razlika u ekstraktibilnosti ovih jedinjenja iz različitih matriksa. Moguće je, takođe, da se viši sadržaj genisteina i daidžeina u netretiranom zrnu soje objasni hidrolizom izoflavonskih glikozida β -glukozidazama, koje se aktiviraju tokom ekstrakcije (Matsamura i sar., 1993). Njihovo dejstvo je isključeno pri ekstrakciji izoflavona iz termički tretiranih proizvoda od soje, jer se tokom tretmana ovi enzimi inaktiviraju (Mahungu i sar., 1999).

Termičke tretmane, i pored manjih sniženja sadržaja aglikona izoflavona soje, generalno ne prati značajan pad sadržaja ukupnih izoflavona nego promena izoflavonskog profila glikozida (Wang i sar., 1990; Wang i Lui, 1999). Naime, termički tretmani zrna soje primarno rezultiraju sniženjem sadržaja termolabilnih 6''-O-malonil-glikozida, odnosno paralelnim porastom sadržaja dekarboksilacijom nastalih 6''-O-acetil-glikozida (Farmakalidis i Murphy, 1985; Wang i Murphy, 1994b; 1996). Tako, na primer, 6''-O-malonil-genistin, dominantni esterifikovani glikozid zrna soje (25-42% od ukupnih izoflavona) (Wang i Murphy, 1994a; 1994b; 1996; 1999), podleže dekarboksilaciji tokom termičkih tretmana (100 °C) dajući 6''-O-acetil-genistin (Barnes i sar., 1998):



Mada nije bilo mogućnosti da se izvrši identifikacija većine pikova na HPLC hromatogramima zrna soje, ESG-a i HTZS-a (slike 49-51), pretpostavljeno je da uzajamni položaj pikova na HPLC hromatogramu sirove soje (slika 55), dat u radu Wang i Murphyjeve (1994b), može da posluži kao orijentir, pogotovo što je način pripreme uzoraka i hromatografisanja koji je izveden bio zasnovan na postupku koji navode ovi autori.



Slika 55. Hromatogram sirove soje (Wang i Murphy, 1994b)

Na navedenom HPLC hromatogramu uočavaju se, između ostalih, pik acetil-genistina, smešten između pikova daidžeina i genisteina, i pik malonil-genistina, levo od pika daidžeina. Navedeni autori su ustanovili da površina pika acetil-genistina na HPLC hromatogramima termički tretiranih proizvoda od soje raste, dok istovremeno površina pika malonil-genistina opada u odnosu na površine istih pikova na HPLC hromatogramu sirove soje. Poređenjem izgleda HPLC hromatograma zrna soje, ESG-a i HTZS-a (slike 49-51), odnosno upoređenjem površina pikova koji najverovatnije pripadaju acetil-genistinu na ovim hromatogramima (označeni strelicama), može se zaključiti da tokom termičkih tretmana zrna soje, ekstruzije i hidrotérmičke obrade, dolazi do već poznate dekarboksilacije malonil-glikozida, praćene porastom koncentracije acetil-glikozida. Promenu izoflavonskog profila, bez bitnijih promena u ukupnom sadržaju izoflavona soje, zabeležili su, pored Wang i Murphyjeve (1994b; 1996), Kudou i saradnici (1991a) i Coward i saradnici (1993). Literaturni navodi o konstantnosti sadržaja ukupnih izoflavona soje, bez obzira na primenjene termičke tretmane, kao i saznanja da i drugi izoflavonski derivati, na primer malonil-izoflavoni, deluju antioksidativno (Fleury i sar., 1992), ukazali su na potrebu da se izvrši određivanje sadržaja ukupnih polifenola u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotérmički tretiranom zrnu soje i etanolnim ekstraktima. Ova određivanja opravdava i činjenica da je udeo genisteina i daidžeina u ukupnim izoflavonima soje veoma mali, jer se sadržaj izoflavona u sojinom zrnu kreće od 1000-4000 mg/kg (Coward i sar., 1993; Choi i sar., 1996; Franke i sar., 1996; Wang i Lui, 1998; Muellner i Sontag, 1999).

Sadržaj ukupnih polifenola u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotérmički tretiranom zrnu soje i etanolnim ekstraktima prikazan je u tabeli 22.

Sadržaj ukupnih polifenola u zrnu soje i ispitivanim punomasnim hranivima (tabela 22), kao što je iz literature već poznato, praktično je, bez obzira na primenjene termičke tretmane, isti. Ukoliko se pretpostavi da ukupne polifenole soje čine fenolne kiseline i izoflavoni, s tim što sadržaj fenolnih kiselina u zrnu soje iznosi oko 230 mg/kg (Shahidi i Nacz, 1992), moglo bi se zaključiti da soja domaćeg podneblja sadrži oko 2000 mg/kg izoflavona i da taj sadržaj ostaje nepromenjen i u punomasnim hranivima od zrna soje.

Tabela 22. Sadržaj ukupnih polifenola u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i etanolnim ekstraktima

Uzorak	Sadržaj ukupnih polifenola	
	% u uzorku	% u SM*
Zrno soje	0.23	0.26
ESG	0.24	0.25
HTZS	0.22	0.25
Etanolni ekstrakt zrna soje	1.88	
Etanolni ekstrakt ESG	1.96	
Etanolni ekstrakt HTZS	1.97	

*SM – suva materija

Sadržaji genisteina u etanolnim ekstraktima zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje, bez obzira na ustanovljene razlike u polaznom materijalu, veoma su slični (tabela 20). Stepene ekstrakcije genisteina iz zrna soje i ekstrudiranog sojinog griza su skoro identični (oko 39% za zrno soje, odnosno 37% za ESG), mada je, iz nepoznatih razloga, stepen ekstrakcije genisteina iz hidrotermički tretiranog zrna soje znatno viši (oko 75%). Sadržaji daidžeina u ispitivanim etanolnim ekstraktima više se razlikuju od bezmalo ujednačenih sadržaja genisteina u istim ekstraktima (tabela 21). Stepene ekstrakcije daidžeina iz zrna soje i ekstrudiranog sojinog griza ponovo su skoro identični (oko 36% za zrno soje, odnosno 32% za ESG), dok je stepen ekstrakcije daidžeina iz hidrotermički tretiranog zrna soje, poput onog za genistein, ponovo najviši (oko 52%).

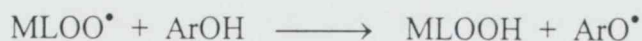
Poređenjem izgleda HPLC hromatograma etanolnih ekstrakata zrna soje, ESG-a i HTZS-a (slike 52-54), odnosno upoređenjem površina pikova koji najverovatnije pripadaju acetil-genistinu na ovim hromatogramima (označeni strelicama), može se zaključiti da etanolne ekstrakte punomasnih hraniva od zrna soje odlikuju više koncentracije acetil-genistina u odnosu na etanolni ekstrakt zrna soje. Ovakvo zapažanje bilo je i očekivano, jer je isti trend konstatovan razmatranjem izgleda HPLC hromatograma zrna soje i ispitivanih hraniva (slike 49-51). On je, kao što je već napomenuto, uslovljen dekarboksilacijom malonil-glikozida, odnosno njihovim prevođenjem u acetil-glikozide, što bi, sa stanovišta procene antioksidativnog delovanja etanolnih ekstrakata hraniva, moglo da ukaže na eventualni blaži porast njihove antioksidativne efikasnosti. Ovakav porast mogao bi da se objasni smanjenjem sternih smetnji pri interakciji acetil-glikozida sa peroksi-radikalima u odnosu na interakciju malonil-glikozida sa istom radikalskom vrstom, kao posledicom smanjene voluminoznosti šećernog ostatka acetil-glikozida soje. Razlike u antioksidativnim efektima koje su pojedinačni dodaci etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva ostvarili u model sistemu I (stepeni inhibicije – 28.00% zrno soje; 37.91% ESG; 29.02% HTZS – slika 32) potvrđuju ovu mogućnost, mada je verovatnije da su one prouzrokovane nešto višim sadržajem ukupnih polifenola u etanolnim ekstraktima punomasnih hraniva u odnosu na ekstrakt zrna soje (tabela 22).

Inhibiranje termičke i katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II sa pojedinačnim dodacima etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva, s obzirom na njihov relativno visok sadržaj izoflavona, moglo bi da se odigrava:

- snižavanjam koncentracije peroksi-radikala predavanjem H-atoma, uz nastajanje manje reaktivnih *cis,trans*-hidro-peroksida;

- snižavanjam koncentracije peroksi-radikala predavanjem H-atoma, uz nastajanje manje reaktivnih *cis,trans*-hidro-peroksida;
- snižavanjam koncentracije peroksi-radikala interakcijom sa nastalim aroksi-radikalima – "skevindžer" efekat;
- inhibiranjem stvaranja peroksi-radikala mehanizmom kompleksiranja metalnih jona.

U nepolarnom sistemu, kakvi su model sistemi I i II, polifenoli primarno deluju kao donori H-atoma peroksi-radikalima metil-linoleata (Jovanović i sar., 1996; Roginsky i sar., 1996):

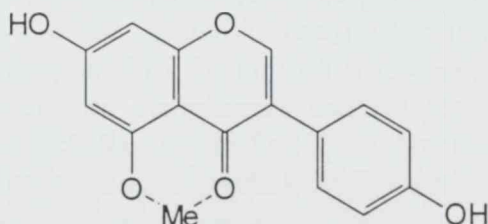


Interakcijom peroksi-radikala i polifenola (u ovom slučaju nekog izoflavona soje) favorizuje se nastanak *cis,trans*-hidro-peroksida, koji, za razliku od *trans,trans*-hidro-peroksida, sternim rasporedom supstituenata sprečavaju gusto pakovanje molekula, odnosno nastanak micelarne strukture, čime se smanjuje njihova podložnost daljim lančanim reakcijama u fazi propagacije (Weenen i Porter, 1982). Nastali aroksi-radikali (ArO^\bullet) stabilizuju se rezonancijom, odnosno delokalizacijom nesparenog elektrona.

Aroksi-radikali mogu da stupe u interakciju sa peroksi-radikalima metil-linoleata, tzv. "skevindžer" efektom, snižavajući njihovu koncentraciju u model sistemima I i II, odnosno uslovljavajući terminaciju oksidacije metil-linoleata:



Supresija katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u koji su pojedinačno dodavani etanolni ekstrakti zrna soje i punomasnih hraniva teoretski je moguća i inhibiranjem nastanka peroksi-radikala kompleksiranjem Fe(II)-jona nekim izoflavonskim molekulima, npr. genisteinom (slika 56):



Slika 56. Kompleks genistein-metalni jon

Antioksidativni karakter izoflavona soje, kao, uostalom, i svih polifenola, zavisi od njihove strukture i koncentracije (Cook i Samman, 1996), njihovih redoks potencijala, polarnosti rastvarača i pH vrednosti ispitivanog sistema (Jovanović i sar., 1996) i drugih faktora. Razmatranjem hemijske strukture izoflavona soje ne može se steći utisak da ova jedinjenja odlikuje izrazit antioksidativni karakter, mada su, na primer, antioksidativni efekti postignuti dodavanjem etanolnih ekstrakata punomasnih hraniva u model sistem II, dakle u slučaju katalitičke oksidacije metil-linoleata, veliki (stepeni inhibicije – 86.51% za ESG, odnosno 74.19% za HTZS – slika 43). Kako ovo objasniti?

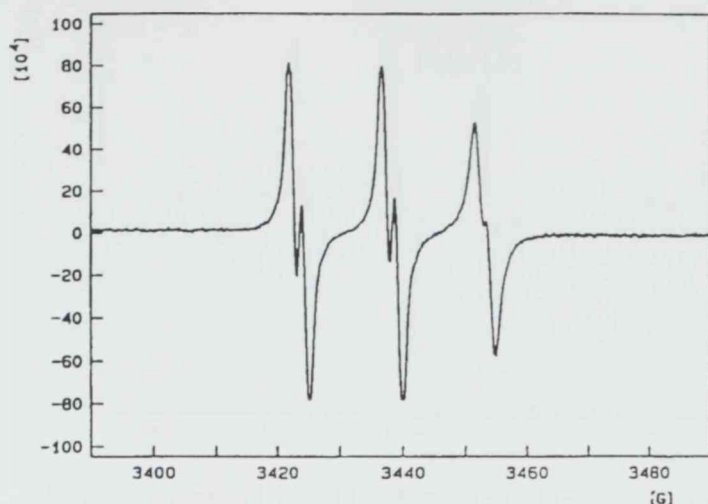
esterifikovanih oblika glikozida u ukupnim izoflavonima soje veoma visok – 97-98% (Wang i Murphy, 1994b; 1996; 1999), pri čemu je 6"-O-malonil-genistin najzastupljeniji (Wang i Murphy, 1994a; 1996). Glikolizacija hidroksilne grupe u položaju C₇, odnosno esterifikacija hidroksilne grupe u položaju C₆, doprinose opadanju antioksidativnog karaktera ma kog od izoflavonskih glikozida soje (Hopia i Heinonen, 1999), jer sterne smetnje rezultiraju manjom mogućnošću interakcije sa peroksi-radikalima. Isti autori navode da prisustvo šećernih ostataka utiče i na promenu rastvorljivosti izoflavona soje, koja i inače nije povoljna u model sistemima I i II, s obzirom da su komponente etanolnih ekstrakata relativno polarne prirode.

Potvrda da je gore navedena dominantna uloga u antioksidativnom delovanju polifenolne frakcije ispitivanih etanolnih ekstrakata vezana za sadržaje genisteina i daidžeina pronalazi se u radovima Esakia i saradnika (1994) i Berghofera i saradnika (1998), koji su ustanovili da ekstrakti fermentisanih proizvoda od soje, karakteristični po visokom sadržaju aglikona, ispoljavaju jače antioksidativno dejstvo od ekstrakata nefermentisanih proizvoda.

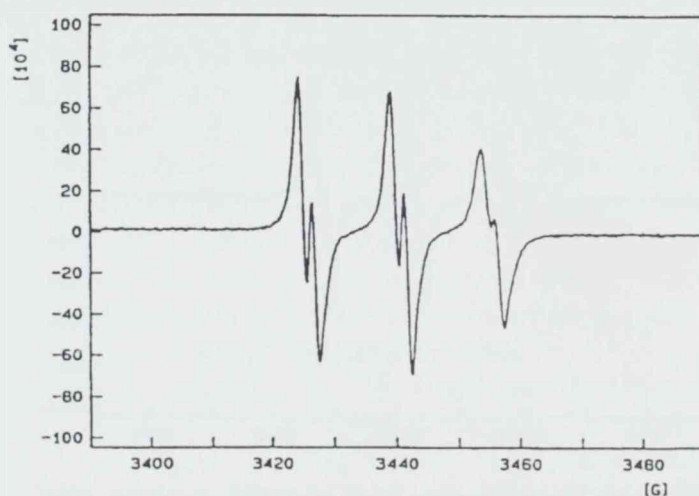
Strukture izoflavonskih aglikona soje ukazuju na mogućnost da antioksidativni efekti ovih jedinjenja budu jači u poređenju sa efektima po sadržaju dominantnih malonil- i acetil-glikozida, mada ne i izraziti, jer osnovnih strukturnih elemenata koji doprinose jačini antioksidativnog dejstva nekog flavonoida kod ovih aglikona nema. Tu se, pre svega, misli na odsustvo većeg broja hidroksilnih grupa, pogotovo na o-dihidroksilnu sekvencu prstena B flavonoida (Čanadanović-Brunet, 1997). Svrstavanje genisteina u kategoriju antioksidanata srednje jačine delovanja već je zabeleženo u literaturi. Naime, Record i saradnici (1995) su, ispitujući inhibiciju oksidacije linolne kiseline indukovane peroksi-radikalima u prisustvu genisteina, ustanovili da ovaj izoflavon deluje antioksidativno, snižavajući koncentraciju peroksi-radikala generisanih iz AAPH. "Skevindžer" efekat misoa (fermentisani proizvod soje), registrovan primenom ESR spektrometrije u cilju praćenja intenziteta ESR signala nekih kiseonikovih slobodnih radikala, pripisan je genisteinu i daidžeinu (Santiago i sar., 1992). Međutim, podatak Recorda i saradnika (1995) o potpunoj nesposobnosti genisteina da kompleksira Fe(III)-jone ukazuje na ograničenje antioksidativnog karaktera ovog jedinjenja. Ovakav podatak je neočekivan, s obzirom na hemijsku strukturu genisteina, koja bi mogla da omogućiti kompleksiranje nekog metalnog jona (slika 56), možda ne onoliko izrazito kao flavonoidne strukture koje poseduju hidroksi-grupe u položajima C₃ i C₅, ali ipak u izvesnoj meri. Kontradiktornost po pitanju sposobnosti genisteina da kompleksira metalne jone postaje veća kada se razmotre rezultati istraživanja Mitchella i saradnika (1998). Ovi autori su, između ostalog, ispitivali mogućnost redukcije sadržaja Fe(III)-jona u prisustvu niza flavonoida i ustanovili da genistein poseduje najveći antioksidativni kapacitet od svih ispitivanih izoflavona (< 0.2 Fe(III)-jona po molekulu genisteina). Oni su, takođe, utvrdili da helatni kapacitet genisteina, mada registrovan, nije ni približno izrazit kao kapacitet troloxa, kempferola ili kvercetina, što je logična posledica strukture ovog jedinjenja.

S obzirom da je bilo izuzetno važno da se sazna da li genistein i daidžein inhibiraju stvaranje peroksi-radikala mehanizmom kompleksiranja metalnih jona, kako bi se objasnile velike razlike u inhibitornim efektima ostvarenim dodavanjem istih etanolnih ekstrakata u model sisteme I i II (posebno kada su u pitanju ekstrakti hraniva) (slike 32 i 43), izvršena je ESR spektralna analiza slobodnih radikala nastalih u model sistemima I i II u koje su pojedinačno dodati čisti preparati genisteina i daidžeina u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat.

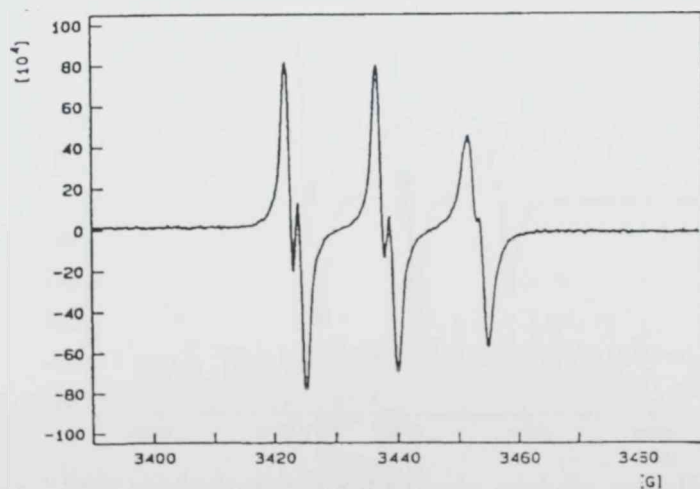
Uticaj genisteina i daidžeina na termičku i katalitičku oksidaciju metil-linoleata u model sistemima I i II može se sagledati sa ESR spektara prikazanih na slikama 57-62.



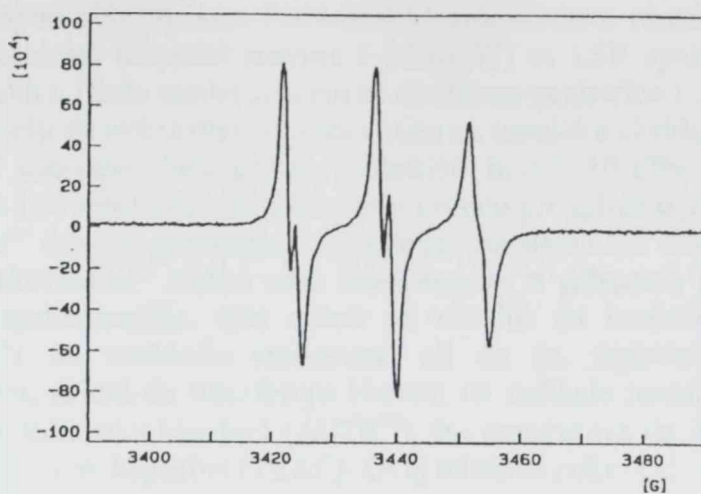
Slika 57. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I (slepa proba)



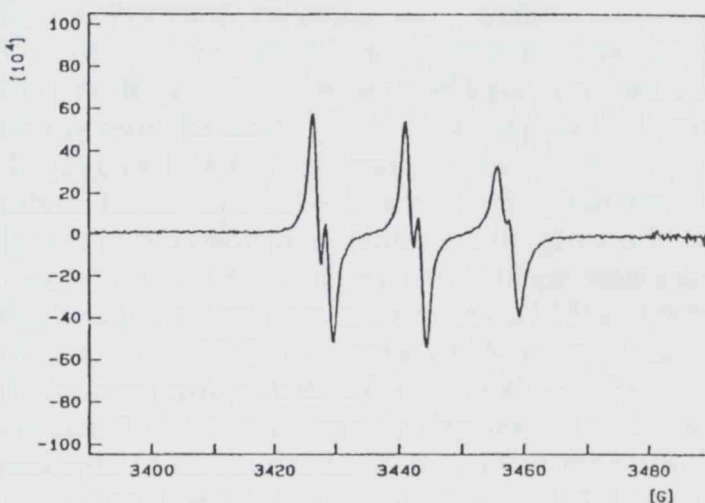
Slika 58. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% genisteina



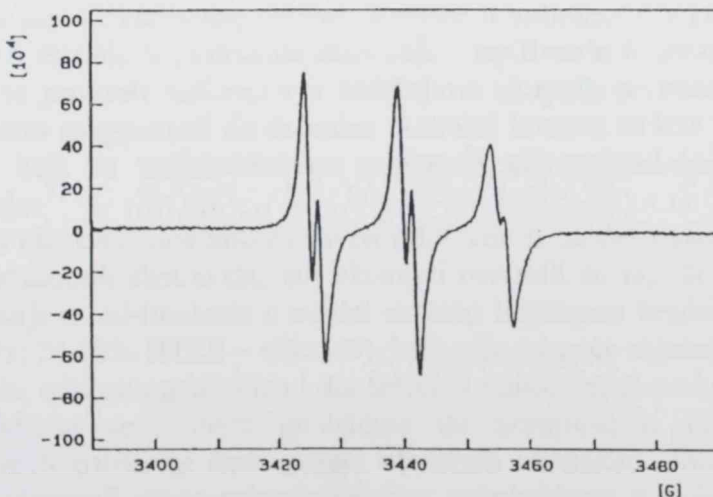
Slika 59. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I u prisustvu 0.02% daidžeina



Slika 60. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II (slepa proba)



Slika 61. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% genisteina



Slika 62. ESR spektar PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II u prisustvu 0.02% daidžeina

Upoređivanjem ESR spektra PBN-OOLM spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu I (slika 57) sa ESR spektrima PBN-OOLM spin-adukata nastalih u istom model sistemu sa dodacima genisteina i daidžeina (slike 58 i 59) može se zaključiti da ovi izoflavoni slabo utiču na termičku oksidaciju metil-linoleata. Step en inhibicije izazvane dodavanjem genisteina iznosi 10.12% (RI=89.88%), dok daidžein praktično i ne ispoljava antioksidativnu prirodu pri apliciranju na model sistem I. Slabo "skevindžer" dejstvo genisteina i daidžeina zabeležili su i Mitchell i saradnici (1998), prateći "skevindžer" efekte niza fitoestrogena u prisustvu galvinoksil-radikala primenom ESR spektrometrije. Ovi autori su utvrdili da izoflavoni "hvataju" 0.02 galvinoksil-radikala po molekulu izoflavona, ali da su, suprotno slabo izraženom "skevindžer" efektu, skloni da transferuju H-atom na radikale nastale iz 2,2'-azobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS^{•+}), što omogućava da im se odredi Trolox ekvivalent antioksidativni kapacitet (TEAC). Ovaj relativni pokazatelj za izoflavone iznosi 1.5-2.

Dodavanje genisteina u količini od 0.02% u model sistem II rezultira sniženjem RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata za 23.07% (RI=76.93%) (slika 61), dok je efekat postignut dodavanjem 0.02% daidžeina veoma slab – sniženje RI ESR signala iznosi svega 6.65% (RI=93.35%) (slika 62). Rezultati koje su ostvarili dodaci genisteina i daidžeina u model sistemu II u poređenju sa ostvarenim efektima u model sistemu I nesumljivo ukazuju na sposobnost ovih izoflavona da u izvesnoj, ali ne suviše izraženoj, meri kompleksiranjem Fe(II)-jona inhibiraju stvaranje peroksi-radikala, što je u saglasnosti sa već iznetim rezultatima istraživanja helatnih kapaciteta izoflavona Mitchella i saradnika (1998), kao i rezultatima helatne aktivnosti izoflavonskih aglikona Leeja i Cheiga (1997a).

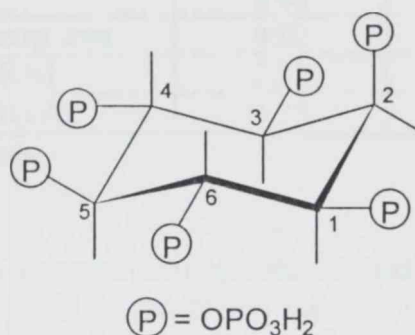
Saznanja o inhibitornim efektima koje su ostvarili genistein i daidžein pri termičkoj i katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemima I i II ne pružaju mogućnost da se u potpunosti objasne stepeni inhibicije oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II u koje su pojedinačno dodavani ispitivani etanolni ekstrakti.

Dodavanje etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva u količini od 0.02% u model sistem I rezultiralo je malim razlikama u nivoima inhibicije (stepeni inhibicije – 28.00% zrno soje; 37.91% ESG; 29.02% HTZS – slika 32), koja je u poređenju sa inhibicijom izazvanom dodavanjem čistih preparata genisteina i daidžeina u isti model sistem bitno viša. Moguće je da prilikom dodavanja etanolnih ekstrakata u model sistem I dolazi do izražaja neki oblik sinergizma između komponenti ekstrakata, koji doprinosi ispoljavanju jačeg antioksidativnog dejstva. Razlike u antioksidativnim efektima koje su pojedinačni dodaci etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih hraniva ostvarili u model sistemu I mogu se pripisati razlikama u sadržajima ukupnih polifenola ovih ekstrakata (tabela 22), odnosno mogućnosti da etanolni ekstrakti hraniva sadrže više acetil-derivata izoflavona soje, koji su antioksidativno potentniji od malonil-derivata iz etanolnih ekstrakata zrna soje.

Za razliku od postizanja sličnih nivoa inhibicije u model sistemu I pri dodavanju svih ispitivanih etanolnih ekstrakata, isti ekstrakti ostvarili su različite stepene supresije katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II (stepeni inhibicije – 37.67% zrno soje; 86.51% ESG; 74.19% HTZS – slika 43), koje nije moguće objasniti niti sa stanovišta sadržaja polifenola, odnosno genisteina i daidžeina u etanolnim ekstraktima, niti uzimajući u obzir ustanovljenu sposobnost genisteina da kompleksira Fe(II)-jone. Izuzetni antioksidativni efekti ostvareni dodavanjem etanolnih ekstrakata punomasnih hraniva u model sistem II ukazivali su na prisustvo nekog antioksidanta u ovim ekstraktima koga odlikuje veoma izražena sposobnost kompleksiranja metalnih jona (pa i Fe(II)-jona).

Soja, kao i mnoge žitarice i leguminoze, sadrži fitinsku kiselinu, mioinozitol heksafosfat (slika 63), odnosno fitin, tj. Ca/Mg so fitinske kiseline (Cheryan, 1980), kao

skladišni oblik fosfora i energije (Cosgrove, 1980). Fitinska kiselina spada u antinutritivne, jer je karakteristična izrazita sklonost ka građenju kompleksa sa mnogim metalima (cink, gvožđe, kalcijum, magnezijum, bakar i drugi), koji su izrazito stabilni u širokom rasponu pH vrednosti (Graf i sar., 1987; Szkudelski, 1997). Jedan molekul fitata može da veže do šest dvovalentnih katjona ili, pak, postoji mogućnost da dođe do intermolekulskog povezivanja dva ili više molekula fitinske kiseline uz učešće katjona (Graf i Eaton, 1990). Osobina fitinske kiseline da kompleksira prelazne metale, gradeći katalitički neaktivne helate, uslovljava njenu antioksidativnu prirodu pri katalitičkoj oksidaciji lipida (Graf i sar., 1984; Lee i Hendricks, 1997).



Slika 63. Fitinska kiselina

Mogućnost da se izraziti antioksidativni efekti etanolnih ekstrakata dodanih u model sistem II pripisu prisustvu, odnosno antioksidativnom delovanju fitinske kiseline bila je podstaknuta istraživanjima Wua i saradnika (1994), koji su utvrdili da je fitinska kiselina iz metanolnog, etanolnog i etil-acetatnog ekstrakta divljeg pirinča odgovorna za inhibiciju oksidacije svinjske masti. Navod Leeja i Hendricksa (1997), po kome fitinska kiselina inhibira oksidaciju linolne kiseline katalizovanu Fe(II)-jonima, jer gradi stabilan kompleks u kome fitinska kiselina zaposeda sva koordinaciona mesta Fe(II)-jona, upućivao je, takođe, na fitinsku kiselinu u soji kao jedinjenje odgovorno za postignute efekte u model sistemu II.

Određivanje sadržaja fitinske kiseline u znu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom znu soje i etanolnim ekstraktima rezultiralo je podacima prikazanim u tabeli 23.

Sadržaj fitinske kiseline u 15 varijeteta zrna soje iznosi 1.00-1.47% u SM (Lolas i sar., 1976), odnosno 1.4-1.6% u SM (Erdman, 1979), te je sadržaj od 1.66% u SM zrna soje (tabela 23) u skladu sa očekivanjem.

Literatura upućuje na degradaciju fitinske kiseline tokom ključanja ili delovanja pare na temperaturama od oko 100 °C (Bullock i sar., 1993), pa bi se, stoga, moglo očekivati da ekstruzija i hidrotermički tretman zrna soje reduciraju sadržaj fitinske kiseline. Međutim, deBoland i saradnici (1975) su utvrdili, proučavajući uticaj autoklaviranja na sadržaj fitata, da je stepen redukcije fitata veoma nizak pri kratkotrajnim tretmanima i u slučaju egzistiranja fitata u kompleksima sa proteinima i/ili katjonima. Marfo i saradnici (1990), takođe, navode da, iako se sadržaj fitata reducira termičkim tretmanjem, značajno sniženje sadržaja ovog antinutritivna zahteva dug tretman (2 ili više sati). Isti autori su ustanovili da dugotrajno kuvanje zrna soje rezultira gubljenjem samo 16% sadržaja fitata.

Tabela 23. Sadržaj fitinske kiseline u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu, hidrotermički tretiranom zrnu soje i etanolnim ekstraktima

Uzorak	Sadržaj fitinske kiseline	
	% u uzorku	% u SM*
Zrno soje	1.49	1.66
ESG	1.56	1.64
HTZS	1.46	1.63
Etanolni ekstrakt zrna soje	0.92	
Etanolni ekstrakt ESG	5.33	
Etanolni ekstrakt HTZS	4.35	

*SM – suva materija

S obzirom da su termički tretmani primenjivani pri proizvodnji punomasnih hraniva kratkotrajni, logično je da nisu doveli do gubitaka u sadržaju fitinske kiseline (tabela 23). Niski sadržaj vlage obrađivanog materijala (oko 10%) nije, takođe, pogodovao destrukciji fitinske kiseline, s obzirom da su visoki sadržaji vlage u termički tretiranom kukuruzu (oko 24%) u pozitivnoj korelaciji sa gubicima fitinske kiseline (Khan i sar., 1991).

Ekstrakcija zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje etanolom rezultirala je različitim sadržajima fitinske kiseline u dobijenim ekstraktima (tabela 23). Sadržaj fitinske kiseline u etanolnom ekstraktu zrna soje bitno je niži od sadržaja ovog jedinjenja u etanolnim ekstraktima hraniva, što objašnjava slabije antioksidativno dejstvo etanolnog ekstrakta zrna soje u odnosu na efekte koje postižu dodaci ekstrakata hraniva u model sistemu II (stepeni inhibicije – 37.67% zrno soje; 86.51% ESG; 74.19% HTZS – slika 43). Nizak sadržaj fitinske kiseline u etanolnom ekstraktu zrna soje najverovatnije je prouzrokovan prisustvom fitaza, enzima odgovornih za destrukciju fitata, koje su aktivirane procesom mlevenja zrna soje (Pointillart, 1993). Bullock i saradnici (1993) navode da delovanje fitaza vodi najvišem stepenu destrukcije fitinske kiseline, koja izostaje ukoliko dođe do termičke inaktivacije fitaza na temperaturi od 70-80 °C (Pointillart, 1993).

Ekstrudiranje i hidrotermički tretman inaktiviraju dejstvo fitaza (Maga, 1982), ali, kako je već zaključeno, ne utiču na destrukciju fitinske kiseline, što se odražava na značajno prisustvo ovog jedinjenja u etanolnim ekstraktima ESG-a i HTZS-a (tabela 23). Različiti sadržaji fitinske kiseline u ovim ekstraktima odgovorni su za razliku u antioksidativnim efektima koje su etanolni ekstrakti ovih hraniva ostvarili pri katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu II (slika 43), jer je stepen inhibicije oksidacije linolne kiseline katalizovane Fe(II)-jonima u prisustvu fitata upravo proporcionalan koncentraciji fitinske kiseline (Lee i Hendricks, 1997).

Odgovornost za jače supresivno dejstvo etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva u model sistemu II u odnosu na efekte postignute dodavanjem istih ekstrakata u model sistem I može se, dakle, pripisati sinergizmu između antioksidativno delotvornih izoflavona i fitinske kiseline u ispitivanim etanolnim ekstraktima. Fitinska kiselina u model sistemu II deluje kao metal-helator, koji inhibira nastanak peroksidiradikala tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata mehanizmom kompleksiranja Fe(II)-jona.

Antioksidativni potencijal etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza pokazao se višim u odnosu na potencijal etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje u oba ispitivana model sistema (slike 32 i 43), kao rezultat razlika u sadržajima ispitivanih antioksidativnih materija ovih ekstrakata (tabele 20, 21, 23). Međutim, sadržaji ispitivanih antioksidanata, mada različiti u etanolnim ekstraktima hraniva, ne pokazuju neke razlike pri poređenju samih hraniva. To dovodi do zaključka da su ekstruzija i hidrotermička obrada zrna soje slično uticali na sadržaje antioksidanata koji se ekstrahuju etanolom, ali da zbog razlika u stepenima ekstrakcije ovih materija iz ispitivanih hraniva dobijeni ekstrakti ispoljavaju različite antioksidativne efekte.

Postoji mogućnost da se jače antioksidativno dejstvo etanolnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje u odnosu na dejstvo etanolnog ekstrakta zrna soje u oba model sistema u izvesnoj meri pripíše stvaranju proizvoda Maillardove reakcije tokom proizvodnje hraniva, koji deluju antioksidativno (Camire i Dougherty, 1998). Naime, proizvodnju punomasnih hraniva od zrna soje prate gubici lizina (tabela 14), koji su posledica interakcije NH_2 -grupe lizina sa CHO-grupama nekih redukujućih šećera u soji, pri kojoj nastaju proizvodi Maillardove reakcije. Proizvodi ove reakcije mogu da nastanu i pri interakciji aminokiselina soje sa sekundarnim proizvodima oksidacije lipida soje, kao, na primer, malonaldehidom, što, s obzirom na antioksidativni karakter nastalih proizvoda, objašnjava supresiju oksidacije lipida u kompleksnim sistemima kakva su i punomasna hraniva od zrna soje (Alaiz i sar., 1995; 1996).

Antioksidativni karakter proizvoda Maillardove reakcije pripisuje se sposobnosti ovih jedinjenja da kompleksiraju Fe(II)-jone (Yoshimura i sar., 1997). Yen i Liu (1997) su došli do saznanja da upravo etanolna frakcija proizvoda Maillardove reakcije, dobijenih u model sistemu ksiloza-lizin, inhibira katalitičku oksidaciju linolne kiseline izazvane prisustvom Fe(II)-jona za čak 80% (pri koncentraciji 0.2 mg/cm^3). Ovi autori naglašavaju da se inhibicija ostvaruje kompleksiranjem 95% sadržaja Fe(II)-jona proizvodima Maillardove reakcije iz ispitivane etanolne frakcije. Bersuder i saradnici (1998) su, ispitujući uticaj vrste ekstragensa na ekstrakciju i antioksidativni potencijal proizvoda Maillardove reakcije, došli, takođe, do zaključka da je etanolna frakcija najefikasnija u supresiji oksidacije lipida u model sistemu suncokretovo ulje:voda (1:2).

Navedeni literaturni podaci ukazuju na mogućnost da etanolni ekstrakti punomasnih hraniva od zrna soje sadrže proizvode Maillardove reakcije, nastale tokom termičkih tretmana primenjenih pri proizvodnji hraniva, koji mogu da doprinesu inhibiciji katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II. Ovakva pretpostavka treba da posluži kao osnova za dalja istraživanja u ovoj oblasti.

Poređenje antioksidativnih efekata koje ostvaruju heksanski i etanolni ekstrakti dobijeni iz istog polaznog materijala u model sistemima I i II veoma je značajno za proširenje saznanja o ukupnom antioksidativnom potencijalu zrna soje i ispitivanih hraniva. Literaturni navodi o supresiranju oksidacije lipida liposolubilnim antioksidantima soje uveliko su poznati (Chow i Drapper, 1974; Yoshida i sar., 1993; Shmulovich, 1994; Frankel, 1995; Chu i Kung, 1998; King i sar., 1998), ali su podaci o inhibiciji oksidacije sojinog ulja izoflavonima ili nekim drugim antioksidativno potentnim jedinjenjima, na primer, fitatima, manje poznati.

Antioksidativno delovanje ma kog od ispitivanih etanolnih ekstrakata slabije je u poređenju sa delovanjem heksanskog ekstrakta dobijenog iz istog polaznog materijala u model sistemu I. To, dakle, znači da dominantna antioksidativna uloga pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata (ali i sojinog ulja) pripada liposolubilnim antioksidantima. Njihova uloga u supresiji termičke oksidacije metil-linoleata je utoliko upečatljivija ukoliko se uzme u obzir da su koncentracije pojedinih liposolubilnih antioksidanata nakon pojedinačnog dodavanja svih heksanskih ekstrakata u model sistemu I (ali i II) veoma

niske (reda veličine 0.007-0.008 mg/kg za α -tokoferol, 0.0005-0.0007 mg/kg za β -karotin, odnosno 0.005-0.006 mg/kg za ukupne ksantofile), dok su koncentracije izoflavona, ukupnih polifenola i fitata u istom model sistemu nakon pojedinačnih dodavanja svih etanolnih ekstrakata daleko više (reda veličine 0.1 mg/kg za genistein, 0.05-0.1 mg/kg za daidžein, 4 mg/kg za ukupne polifenole, odnosno 2-11 mg/kg za fitate).

Antioksidativna efikasnost etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje dolazi do izražaja pri inhibiranju katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II. Dodavanje ovih ekstrakata u model sistem II rezultira stepenima inhibicije koji su slični onima koje ostvaruju i dodaci heksanskih ekstrakata istog materijala u navedenom model sistemu, uz napomenu da se koncentracije aktivnih komponenti ekstrakata, kao što je gore napomenuto, razlikuju.

Na osnovu ovih paralela moglo bi se zaključiti da su liposolubilni antioksidanti soje primarno odgovorni za supresiju bilo kog vida oksidacije sojinog ulja, pa samim tim i ključni za održivost proizvedenih punomasnih hraniva od zrna soje. Međutim, s obzirom da sojino ulje karakteriše izuzetno visok sadržaj grožđa, bitno viši od sadržaja istog u drugim vrstama biljnih ulja (Garrido i sar., 1994), antioksidativni karakter izoflavona i fitata soje je potencijal koga ne treba zanemariti.

U kompleksnom sistemu, kao što su ispitivana punomasna hraniva od zrna soje, navedene antioksidativne materije najverovatnije deluju sinergistički. Liposolubilni antioksidanti inhibiraju lančanu reakciju oksidacije lipida, snižavajući koncentraciju peroksi-radikala, ali i u sinergizmu sa izoflavonima (Mitchell i sar., 1998), s obzirom da redukuju aroksi-radikale nastale iz izoflavona (Mortensen i Skibsted, 1997a). Izoflavoni soje deluju, takođe, inhibitorno na lančanu reakciju oksidacije lipida, mada je, kao što je prezentirano, za njih karakteristična i metal-helatorna aktivnost – kompleksiranje metalnih jona pri katalitičkoj oksidaciji lipida. U punomasnim hranivima od zrna soje, koja odlikuje visok sadržaj fitinske kiseline, može se očekivati da ovo jedinjenje deluje kao najjači metal-helator, daleko višeg kapaciteta vezivanja metalnih jona od izoflavona.

Sadržaji antioksidativnih materija različitih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje i supresivni efekti postignuti korišćenjem ovih ekstrakata pri termičkoj i katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata treba da posluže kao osnova u budućim pokušajima apliciranja ekstrakata prirodnih antioksidanata na kompatibilne materijale. Priroda materijala, kao i način njegove obrade, rukovanja i skladištenja mogu da opredele izbor ekstrakta, odnosno vrste ekstragensa za njegovo dobijanje.

4.4.0. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVIH SLOBODNIH RADIKALA U PRIRODNIM SISTEMIMA I I II

Činjenica da su etanolni ekstrakti zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, dodavani u količini od 0.02% u model sisteme I i II, ispoljili antioksidativne efekte pri termičkoj (model sistem I), odnosno katalitičkoj (model sistem II) oksidaciji metil-linoleata usmerila je dalji tok istraživanja na pokušaj da se ustanovi vrsta ekstragensa koji će najboljom ekstrakcijom antioksidativnih materija matriksa obezbediti najjače antioksidativno delovanje u prirodnim sistemima I i II.

Literaturni podaci koji se odnose za izbor vrste ekstragensa za što bolju ekstrakciju izoflavona soje veoma su različiti. Neki istraživači daju primat metanolu (Coward i sar., 1993; Kim i sar., 1994; Fukutake i sar., 1996; Bae i sar., 1997; Lee i Cheigh, 1997a), neki

se opredeljuju za etanol (Pettersson i Kiessling, 1984; Wang i sar., 1990; Kim i sar., 1995), neki za etil-acetat (Liggins i sar., 1998; Miyazawa i sar., 1999), dok je, čini se, u novije vreme najčešće u upotrebi acetonitril (Murphy, 1982; Wang i sar., 1990; Coward i sar., 1993; Wang i Murphy, 1994a; 1994b; 1996; Murphy i sar., 1999). S obzirom da je za efikasnu ekstrakciju relativno polarnih izoflavona soje poželjan polarniji rastvarač, često se u organske rastvarače dodaje voda (Coward i sar., 1993) ili razblažena hlorovodonična kiselina (Wang i sar., 1990). Wang i Murphy (1994a) navode da je kombinacija acetonitrila sa $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ (83:17) izuzetno povoljna za ekstrakciju izoflavona soje, jer povećava ekstrakcionu efikasnost, a, istovremeno, snižava količine interferirajućih koekstranata.

Za ekstrakciju fitata najčešće se koriste razblaženi rastvori kiselina – 2.4% hlorovodonična kiselina (Latta i Eskin, 1980), kombinacija 1.2% hlorovodonična kiselina i 10% natrijum-sulfat (deBoland i sar., 1975; Thompson i Erdman, 1982) ili 3% trihlorsirćetna kiselina (Wheeler i Feerel, 1971).

Sa ciljem da se ispita uticaj različitih ekstragenasa na antioksidativni potencijal ekstrakata koji sadrže neliposolubilne antioksidante, odabrana su za komparaciju tri ekstragensa – etanol- $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ (83:17), etil-acetat- $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ (83:17) i acetonitril- $0.1 \text{ mol/dm}^3 \text{ HCl}$ (83:17), koji se čine podesnim za istovremenu ekstrakciju izoflavona i fitata.

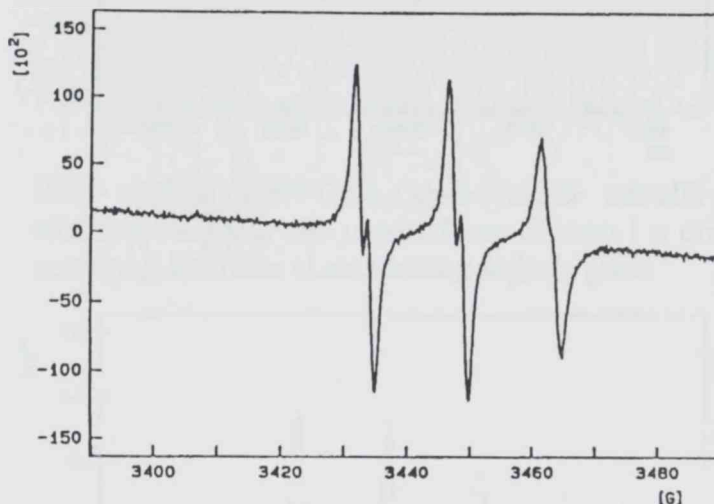
Izbor etil-acetata je posebno bio značajan, jer je ustanovljeno da su sniženja RI ESR signala PBN-OOLM spin adukata u model sistemima I i II, prouzrokovana pojedinačnim dodavanjem 0.02% etil-acetatnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva, zanemarljiva (slike 32 i 43). Međutim, rezultati koje su ostvarili dodaci etil-acetatnih ekstrakata u model sistemima I i II nisu merodavni u proceni mogućnosti da se upotrebom etil-acetata dobije ekstrakt izraženog antioksidativnog dejstva, jer su ispitivani etil-acetatni ekstrakti zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje dobijeni sukcesivnom ekstrakcijom polaznog materijala, odnosno nakon već izvršene ekstrakcije heksanom i etanolom. Slabi antioksidativni efekti koje su etil-acetatni ekstrakti ostvarili u model sistemima I i II ukazuju da je ekstrakcija neliposolubilnih antioksidanata etanolom bila bezmalo potpuna, odnosno da je sadržaj zaostalih antioksidanata dospelih u etil-acetatne ekstrakte veoma mali.

Ispitujući antioksidativno dejstvo etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje pri termičkoj i katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata ustanovljeno je da dodavanje etanolnog (kao i heksanskog) ekstrakta zrna soje rezultira slabijom supresijom oksidacije metil-linoleata u poređenju sa odgovarajućim ekstraktima punomasnih hraniva. Ovo saznanje dovelo je do odluke da se ispita uticaj primene izabranih ekstragenasa na antioksidativni potencijal ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje bez komparacije sa zrnom soje.

Registrowanje peroksi-radikala, odnosno PBN-OOL spin-adukata, tokom termičke i katalitičke oksidacije suncokretovog ulja (Čanadanović-Brunet, 1997), koje je kao prirodni sistem u izvesnoj meri slično sojinom ulju (Chu & Kung, 1998), dalo je ideju da se etil-acetatni, etanolni i acetonitrilni ekstrakti dodaju u komercijalno sojino ulje, kao pokušaj da se do danas komercijalno neeksploatisani antioksidanti soje apliciraju na prirodni sistem zajedničkog porekla radi utvrđivanja njihove antioksidativne efikasnosti.

4.4.1. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVIH SLOBODNIH RADIKALA U PRIRODNOM SISTEMU I

Na slici 64 prikazan je ESR spektar slobodnih radikala nastalih u prirodnom sistemu I termičkom oksidacijom 2.0 cm^3 (1.65 g) komercijalnog sojinog ulja u prisustvu 0.0213 g (0.12 mmol) PBN na $60 \text{ }^\circ\text{C}$ tokom 24 h .



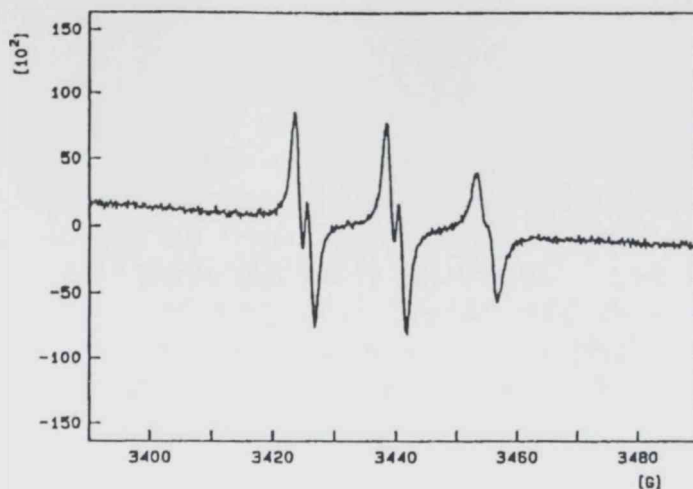
Slika 64. ESR spektar slobodnih radikala nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I (slepa proba)

Na ESR spektru prikazanom na slici 64 uočava se šest linija približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesparenog elektrona i jednog ^{14}N -atoma ($I=1$) i jednog ^1H -atoma ($I=1/2$). Konstante hiperfinog cepanja linija spektra $a_{\text{N}} = 14.75 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.80 \text{ G}$ ukazuju na prisustvo PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOL) u reakcionoj smeši.

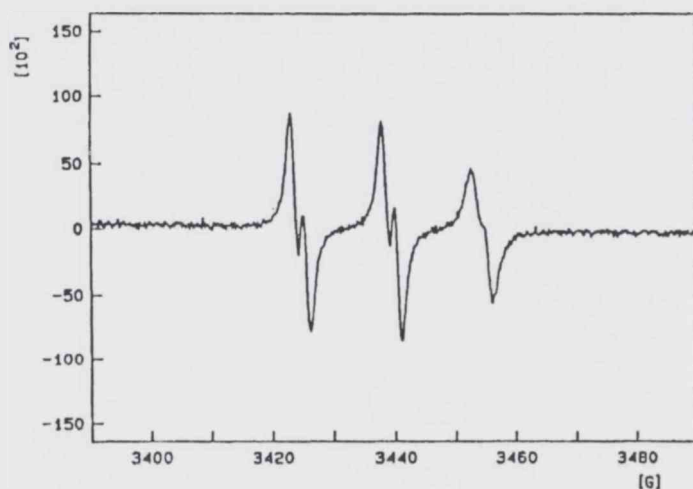
4.4.2. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU PEROKSI-RADIKALA U PRIRODNOM SISTEMU I

Ispitivanje antioksidativnog delovanja etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, na termičku oksidativnu degradaciju sojinog ulja vršeno je dodavanjem ovih ekstrakata u količini od 0.02% u prirodni sistem I, te snimanjem ESR spektara spin-adukata nastalih tokom reakcionog perioda od 24 h (slike 65-70).

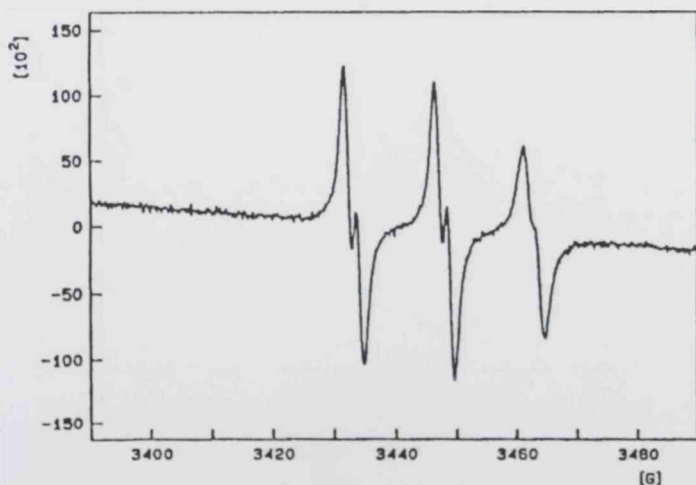
Na slikama 65-70 prikazani su ESR spektri PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidativne degradacije sojinog ulja (prirodni sistem I) u prisustvu ispitivanih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje dodavanih u količini od 0.02% .



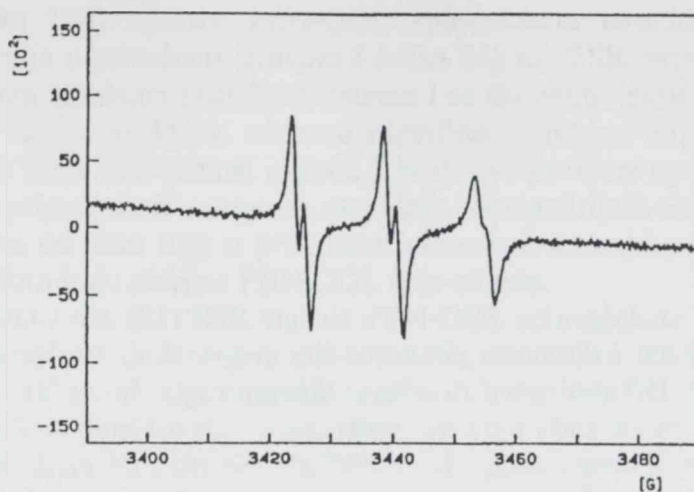
Slika 65. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



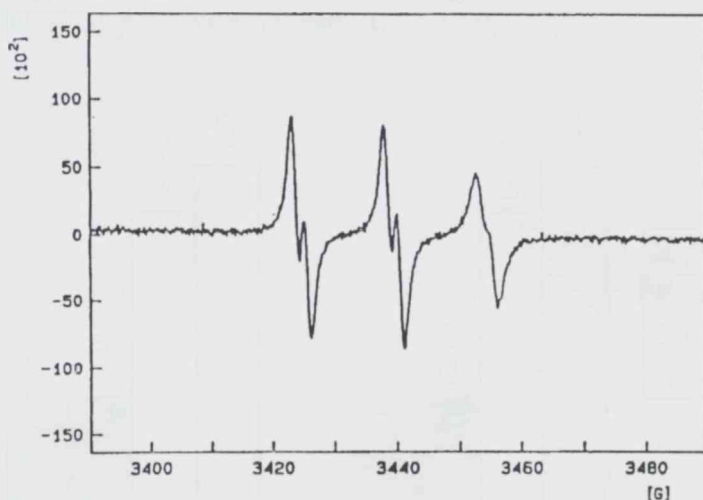
Slika 66. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



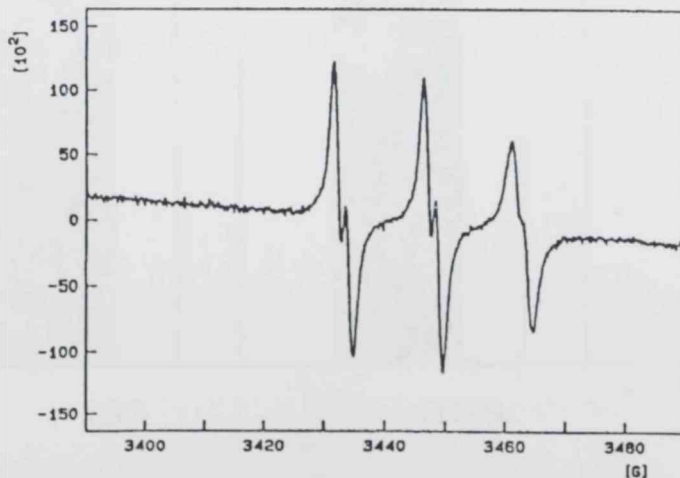
Slika 67. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% acetonitrilnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 68. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 69. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

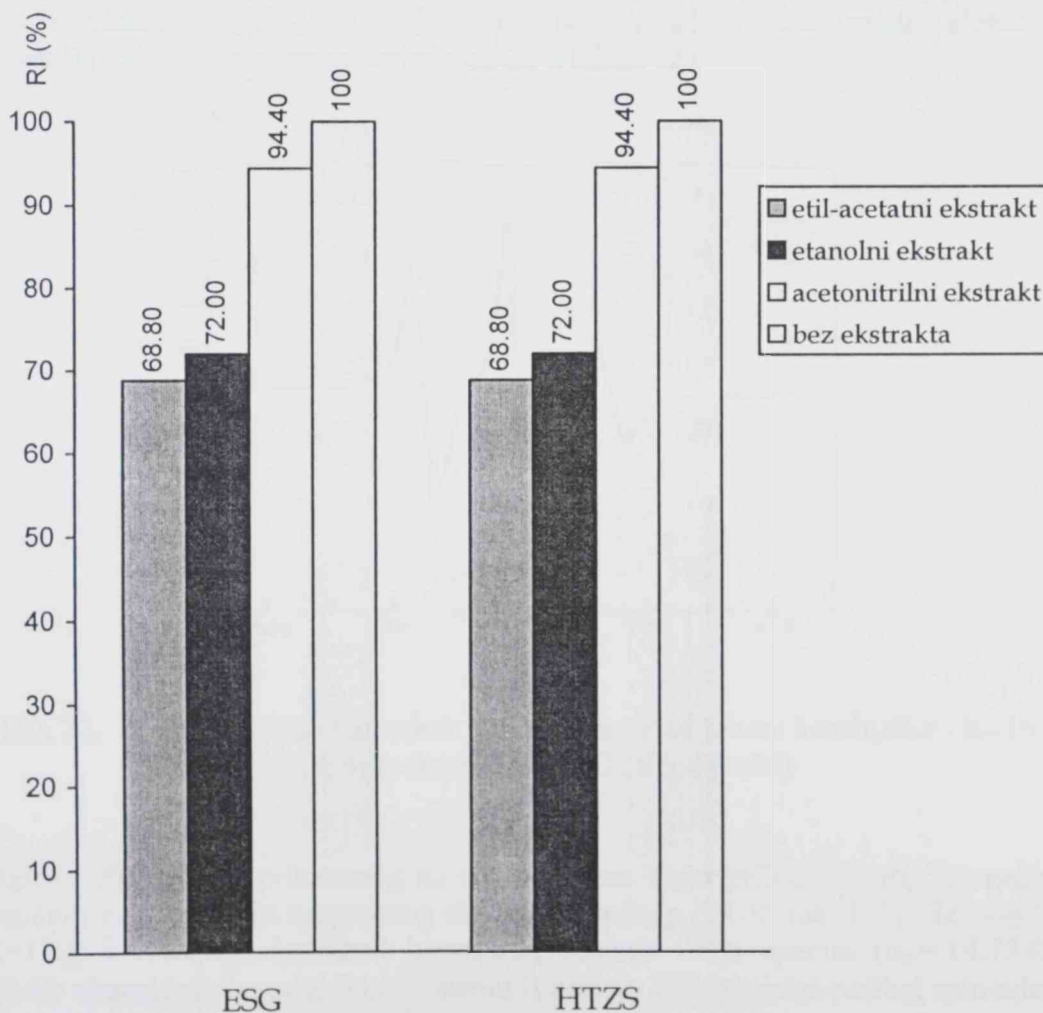


Slika 70. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I u prisustvu 0.02% acetonitrilnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

Upoređenjem ESR spektra PBN-OOL spin-adiukata nastalih tokom termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I (slika 64) sa ESR spektrima spin-adiukata nastalih u reakcionim smešama prirodnog sistema I sa dodacima ekstrakata (slike 65-70), uočava se očuvan izgled spektara, odnosno hiperfina struktura, broj i relativan odnos intenziteta njihovih linija. Istovetnost izgleda i hiperfine strukture upoređivanih spektara potvrđuje da se i u prisustvu etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje u prirodnom sistemu I stvaraju peroksi-radikali, koji reakcijom sa PBN formiraju stabilne PBN-OOL spin-adiukate.

Relativni intenziteti (RI) ESR signala PBN-OOL spin-adiukata u svim ispitivanim sistemima sa pojedinačnim dodavanjem etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ispitivanih hraniva niži su od odgovarajućih relativnih intenziteta (RI=100%) ESR signala PBN-OOL spin-adiukata detektovanih u prirodnom sistemu I bez dodataka ekstrakata (slika 64). Ustanovljena sniženja RI ESR signala PBN-OOL spin-adiukata u reakcionim smešama prirodnog sistema I sa pojedinačnim dodacima ispitivanih ekstrakata ukazuju na antioksidativnu prirodu komponenti ekstrakata.

Na slici 71 prikazan je efekat etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na sniženje RI ESR signala PBN-OOL spin-adiukata u prirodnom sistemu I.



Slika 71. Uticaj etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotermički tretiranog zrna soje (HTZS) na intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adiukata u prirodnom sistemu I

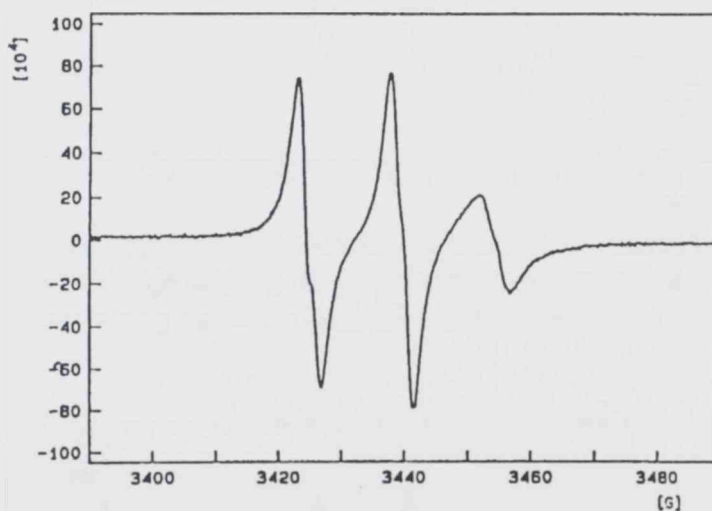
Etil-acetatni ekstrakti ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje dodati u količini od 0.02% u prirodni sistem I ispoljili su identične efekte sniženja RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom termičke oksidativne degradacije sojinog ulja, koji su iznosili 31.20% (RI=68.80%).

Stepeni inhibicije termičke oksidacije sojinog ulja, mereni sniženjem RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata nastalih u prirodnom sistemu I, uz dodatak 0.02% etanolnih ekstrakata ispitivanih hraniva, iznosili su istovetnih 28.00% (RI=72.00%) za navedene ekstrakte oba hraniva.

Acetonitrilni ekstrakti punomasnih hraniva od zrna soje, dodati u prirodni sistem I u količini od 0.02%, nisu značajnije snizili intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adukata (stepeni inhibicije – 5.60% za ekstrakte oba hraniva; RI=94.40%).

4.4.3. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA KISEONIKOVIIH SLOBODNIH RADIKALA U PRIRODNOM SISTEMU II

Katalitička oksidativna degradacija komercijalnog sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu Fe(II)-jona registrovana je snimanjem ESR spektra slobodnih radikala nastalih tokom reakcionog perioda od 24 h (slika 72).



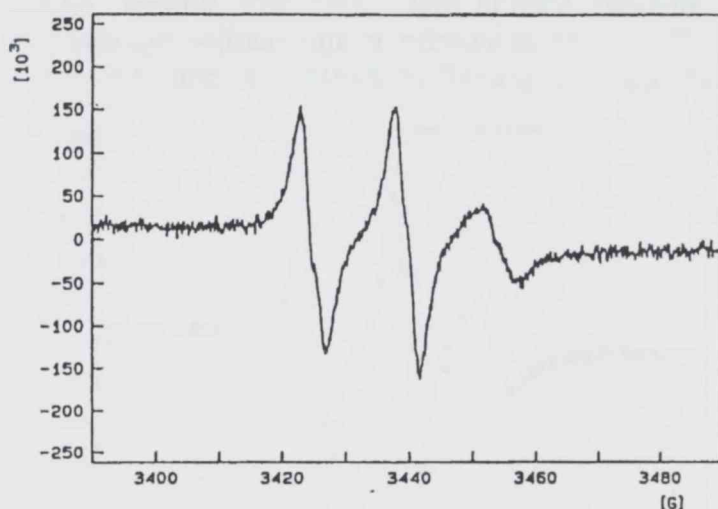
Slika 72. ESR spektar slobodnih radikala nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II (slepa proba)

Izgled ESR spektra prikazanog na slici 72 (šest linija približno istog intenziteta, karakterističnih za interakciju nesparenog elektrona i jednog ^{14}N -atoma ($I=1$) i jednog ^1H -atoma ($I=1/2$)) i vrednosti konstanti hiperfinog cepanja linija spektra ($a_{\text{N}} = 14.75 \text{ G}$ i $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.80 \text{ G}$) ukazuju da i u prirodnom sistemu II nastaju PBN-peroksi-radikal spin-adukti (PBN-OOL).

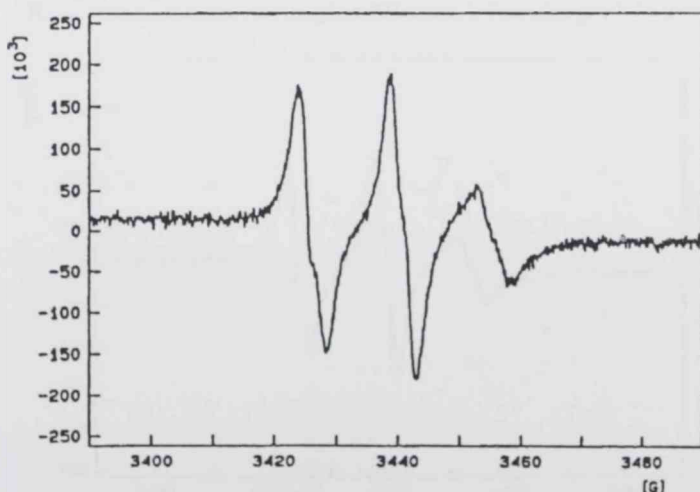
4.4.4. ELEKTRON SPIN REZONANTNA SPEKTRALNA ANALIZA UTICAJA EKSTRAKATA PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE NA STVARANJE I TRANSFORMACIJU PEROKSI-RADIKALA U PRIRODNOM SISTEMU II

Ispitivanje antioksidativnog delovanja etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, na katalitičku oksidativnu degradaciju sojinog ulja vršeno je dodavanjem ovih ekstrakata u količini od 0.02% u prirodni sistem II, te snimanjem ESR spektara spin-adukata nastalih tokom reakcionog perioda od 24 h (slike 73-78).

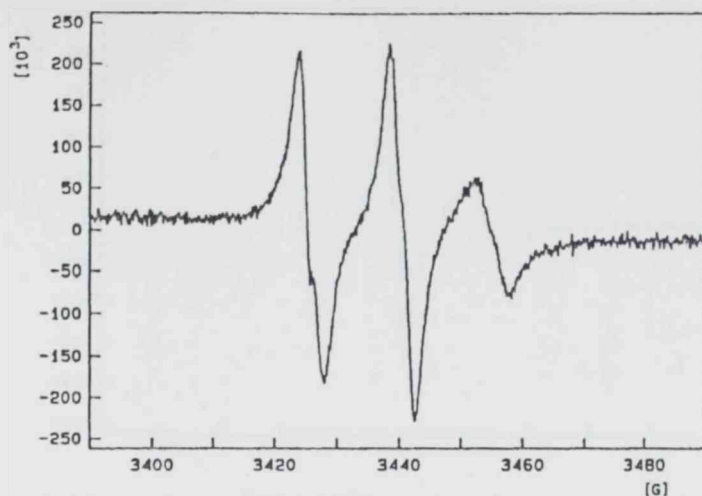
Na slikama 73-78 prikazani su ESR spektri PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidativne degradacije sojinog ulja (prirodni sistem II) u prisustvu ispitivanih ekstrakata punomasnih hraniva od zrna soje dodavanih u količini od 0.02%.



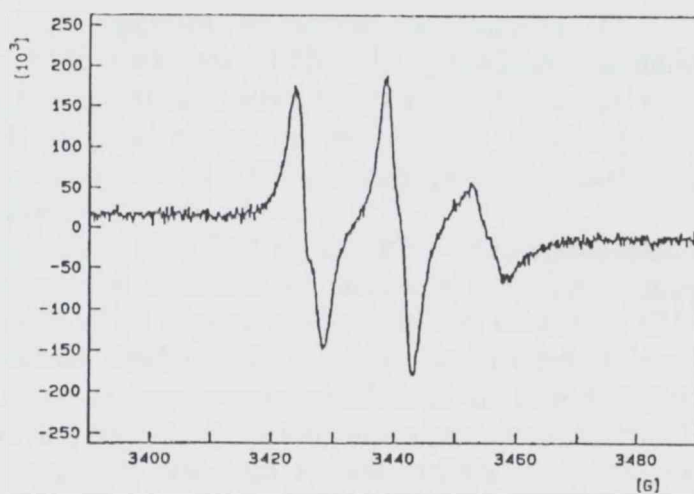
Slika 73. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



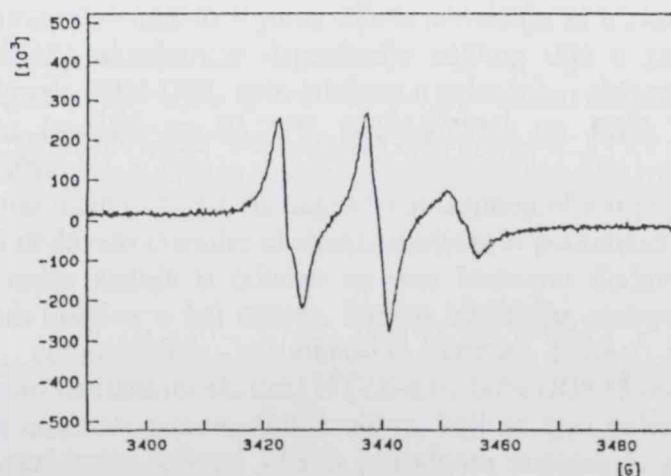
Slika 74. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



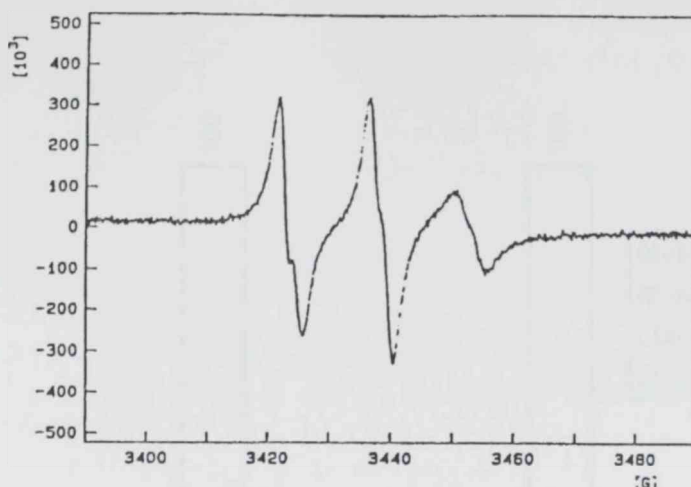
Slika 75. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% acetonitrilnog ekstrakta ekstrudiranog sojinog griza



Slika 76. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% etil-acetatnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 77. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% etanolnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje



Slika 78. ESR spektar PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u prisustvu 0.02% acetonitrilnog ekstrakta hidrotermički tretiranog zrna soje

Analizom ESR spektara prikazanih na slikama 73-78, odnosno njihovim upoređivanjem sa ESR spektrom PBN-OOL spin-adukata nastalih tokom katalitičke oksidacije sojinog ulja u prisustvu PBN i Fe(II)-jona (slika 72), može se zaključiti da u prirodnom sistemu II, bez obzira na pojedinačna dodavanja ekstrakata ispitivanih punomasnih hraniva u količini od 0.02%, nastaju peroksi-radikali, koji reakcijom sa PBN formiraju stabilne PBN-OOL spin-adukte.

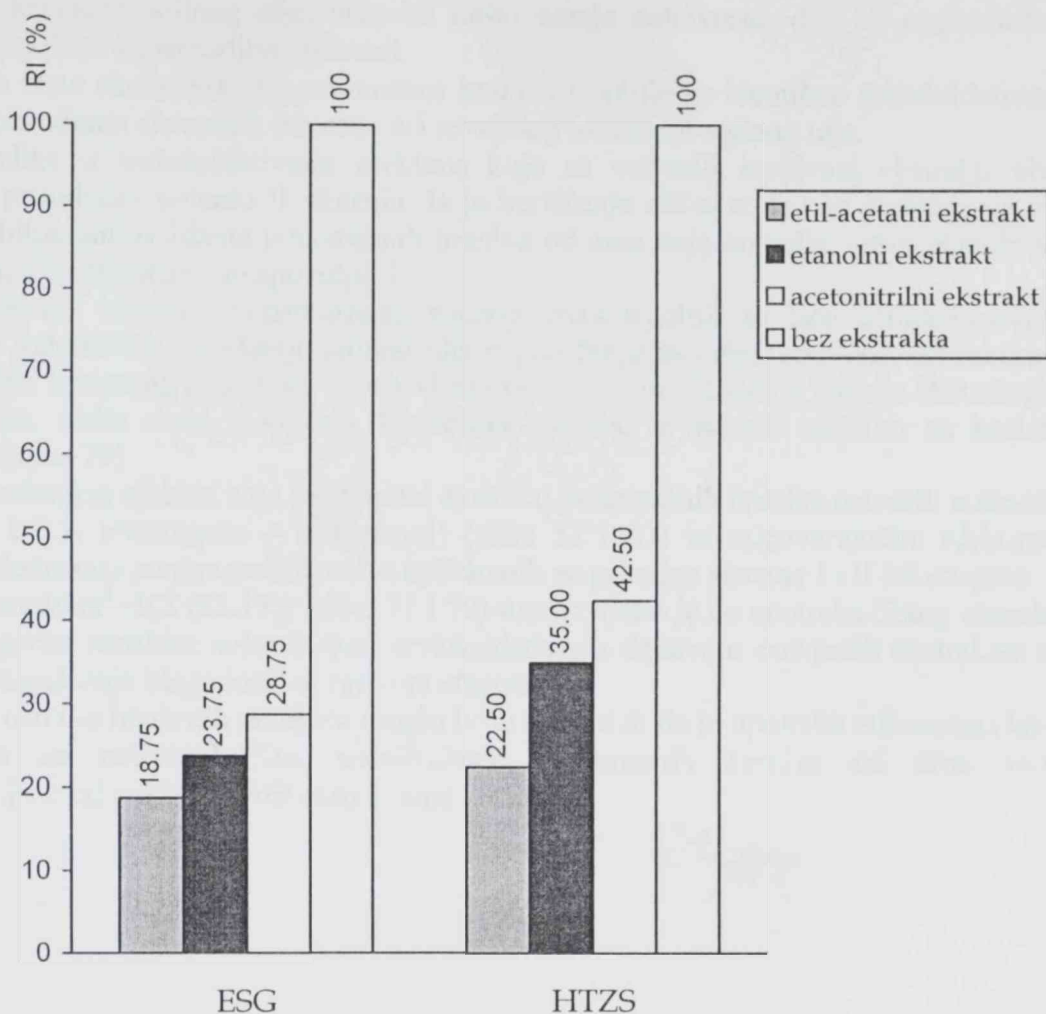
Relativni intenziteti (RI) ESR signala PBN-OOL spin-adukata u svim ispitivanim sistemima sa pojedinačnim dodacima etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ispitivanih hraniva niži su od odgovarajućih relativnih intenziteta (RI=100%) ESR signala PBN-OOL spin-adukata detektovanih u prirodnom sistemu II bez dodataka ekstrakata (slika 72), što ukazuje na ispoljavanje antioksidativne prirode ispitivanih ekstrakata pri katalitičkoj oksidativnoj degradaciji sojinog ulja u prirodnom sistemu II.

Uticaj etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na sniženje RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu II prikazan je na slici 79.

Etil-acetatni ekstrakti ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje dodavani u količini od 0.02% u prirodni sistem II ispoljili su znatno jače antioksidativno dejstvo pri katalitičkoj oksidativnoj degradaciji sojinog ulja u poređenju sa efektima koje su ostvarili pri inhibiranju termičke oksidativne degradacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I. Sniženja RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu II uz dodatke etil-acetatnih ekstrakata iznosila su 81.25% (RI=18.75%) za ESG, odnosno 77.50% (RI=22.50%) za HTZS.

Inhibicija katalitičke oksidativne degradacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II u koji su pojedinačno dodavani etanolni ekstrakti ispitivanih punomasnih hraniva u količini od 0.02% bila je nešto slabija u odnosu na onu izazvanu dodavanjem etil-acetatnih ekstrakata ispitivanih hraniva u isti sistem. Stepent inhibicije, meren sniženjem RI ESR signala PBN-OOL spin-adukata, za etanolni ekstrakt ESG-a iznosio je 76.25% (RI=23.75%), odnosno za etanolni ekstrakt HTZS-a 65.00% (RI=35.00%).

Acetonitrilni ekstrakti punomasnih hraniva, koji se nisu pokazali delotvornim pri supresiji termičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu I, ispoljili su relativno značajno antioksidativno dejstvo u prirodnom sistemu II, snižavajući intenzitet ESR signala za 71.25% (RI=28.75%) u slučaju ESG-a, odnosno za 57.50% (RI=42.50%) u slučaju HTZS-a.



Slika 79. Uticaj etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza (ESG) i hidrotermički tretiranog zrna soje (HTZS) na intenzitet ESR signala PBN-OOL spin-adukata u prirodnom sistemu II

4.5.0. ANALIZA ANTIOKSIDATIVNOG DELOVANJA ETIL-ACETATNIH, ETANOLNIH I ACETONITRILNIH EKSTRAKATA PUNOMASNIH HRANIVA OD ZRNA SOJE U PRIRODNIH SISTEMIMA I I II

Dodavanje etil-acetatnih, etanolnih i acetonitrilnih ekstrakata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje u količini od 0.02% u prirodne sisteme I i II prouzrokovalo je inhibiciju termičke, odnosno katalitičke oksidacije komercijalnog sojinog ulja.

Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su izraženije antioksidativno dejstvo pri katalitičkoj oksidaciji sojinog ulja (slike 71 i 79), što je identično već ustanovljenom antioksidativnom ponašanju etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva u model sistemima I i II (slike 32 i 43).

Etil-acetatni ekstrakti punomasnih hraniva bili su najdelotvorniji u supresiji termičke oksidacije sojinog ulja, etanolni nešto manje delotvorni, dok su acetonitrilni ekstrakti praktično zanemarljivo delovali.

Iste vrste ekstrakata oba punomasna hraniva ispoljile su identično antioksidativno dejstvo u prirodnom sistemu I, odnosno pri termičkoj oksidaciji sojinog ulja.

Razlike u antioksidativnim efektima koje su ostvarili ispitivani ekstrakti oba hraniva u prirodnom sistemu II ukazuju da je korišćenje etil-acetata kao ekstragensa za neliposolubilne antioksidante punomasnih hraniva od zrna soje najbolje, izbor etanola je nešto lošiji, a acetonitrila najnepovoljniji.

Ispitivani ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza ispoljili su jače antioksidativno dejstvo pri katalitičkoj oksidaciji sojinog ulja u poređenju sa odgovarajućim ekstraktima hidrotermički tretiranog zrna soje. Ustanovljene razlike su minimalne u slučaju ekstrakcije etil-acetatom, nešto veće u slučaju korišćenja etanola, a najveće ukoliko se koristi acetonitril (slika 79).

Poređenjem efekata koje su etanolni ekstrakti punomasnih hraniva ostvarili u model sistemima I i II (ekstragens – čist etanol) (slike 32 i 43) sa odgovarajućim efektima etanolnih ekstrakata punomasnih hraniva apliciranih na prirodne sisteme I i II (ekstragens – etanol-0.1 mol/dm³ HCl (83:17)) (slike 71 i 79) ustanovljeno je da upotreba čistog etanola kao ekstragensa rezultira nešto boljim antioksidativnim dejstvom dobijenih ekstrakata u odnosu na korišćenje blago kiselog rastvora etanola.

Na osnovu izloženih rezultata moglo bi se zaključiti da je upotreba etil-acetata kao ekstragensa za neliposolubilne antioksidante punomasnih hraniva od zrna soje najpovoljnija, mada ni korišćenje etanola nije loš izbor.

5.0.0. ZAKLJUČAK

Hraniva proizvedena termičkim tretiranjem zrna soje, ekstrudirani sojin griz i hidrotermički tretirano zrno soje, bila su ujednačenog i zadovoljavajućeg kvaliteta, što je smatrano osnovom za dalja ispitivanja antioksidativnog delovanja ekstrakata zrna soje i proizvedenih hraniva, odnosno vrsta i količina antioksidativnih materija prisutnih u ispitivanim hranivima.

Sukcesivnom ekstrakcijom zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva od zrna soje n-heksanom, etanolom i etil-acetatom dobijeni su ekstrakti, koji su korišćeni za ispitivanje uticaja na termičku, odnosno katalitičku oksidaciju metil-linoleata primenom elektron spin rezonantne spektroskopije (ESR) u kombinaciji sa "spin-traping" (spin trapping) tehnikom.

Termičkom oksidativnom degradacijom metil-linoleata (model sistem I) nastali su peroksi-radikali, koji su stabilizovani u prisustvu "spin-trapa" (spin trap) *N-terc*-butil- α -fenilnitrona (PBN). Konstante hiperfinog cepanja linija ESR spektara PBN-peroksi-radikal spin-adukata (PBN-OOLM) iznose $a_N = 14.75$ G i $a_H^\beta = 2.80$ G.

Ispitivanje uticaja heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na termičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata vršeno je praćenjem uticaja ispitivanih ekstrakata, pojedinačno dodavanih u model sistem I u količini od 0.02%, na relativni intenzitet (RI) ESR signala PBN-OOLM spin-adukata.

Na osnovu rezultata ispitivanja ustanovljeno je da svi ispitivani ekstrakti zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva inhibiraju termičku oksidaciju metil-linoleata. Heksanski ekstrakti ispoljili su najjaču antioksidativnu aktivnost u model sistemu I, etanolni slabiju, a etil-acetatni zanemarljivu. Heksanski i etanolni ekstrakti punomasnih hraniva bili su antioksidativno delotvorniji u poređenju sa istim vrstama ekstrakata zrna soje.

Katalitička oksidativna degradacija metil-linoleata u prisustvu Fe(II)-jona (model sistem II) rezultura, takođe, nastankom peroksi-radikala, odnosno u prisustvu PBN formiranih PBN-OOLM spin-adukata. Konstante hiperfinog cepanja linija ESR spektara PBN-OOLM spin-adukata iznose $a_N = 14.75$ G i $a_H^\beta = 2.80$ G.

Uticaj heksanskih, etanolnih i etil-acetatnih ekstrakata zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje na stvaranje i stabilnost peroksi-radikala nastalih tokom katalitičke oksidativne degradacije metil-linoleata ispitan je praćenjem uticaja ispitivanih ekstrakata, pojedinačno dodavanih u model sistem II u količini od 0.02%, na RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata.

Ustanovljeno je da svi ispitivani ekstrakti zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva inhibiraju katalitičku oksidaciju metil-linoleata. Stepene inhibicije izazavane dodavanjem heksanskih i etanolnih ekstrakata u model sistem II su veoma slični, dok etil-acetatni ekstrakti ne ispoljavaju značajno dejstvo. Dodavanje heksanskih i etanolnih ekstrakata punomasnih hraniva u model sistem II rezultiralo je jačim antioksidativnim efektima u poređenju sa onim koje su ostvarile iste vrsta ekstrakata zrna soje.

Supresiranje termičke i katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II u prisustvu heksanskih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva pripisano je antioksidativnom delovanju liposolubilnih antioksidanata – α -tokoferola, β -karotina i ukupnih ksantofila.

Određen je sadržaj α -tokoferola, β -karotina i ukupnih ksantofila u zrnu soje, ekstrudiranom sojinom grizu (ESG), hidrotermički tretiranom zrnu soje (HTZS) i heksanskim ekstraktima.

Sadržaj α -tokoferola u ispitivanom materijalu iznosi: 32.99 mg/kg, tj. 36.68 mg/kg u SM zrna soje, 10.38 mg/kg, tj. 10.89 mg/kg u SM ESG-a, 15.21 mg/kg, tj. 17.02 mg/kg u

SM HTZS-a, 40.11 mg/kg u heksanskom ekstraktu zrna soje, 37.77 mg/kg u heksanskom ekstraktu ESG-a i 37.50 mg/kg u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Sadržaj β -karotina u ispitivanom materijalu iznosi: 0.91 mg/kg, tj. 1.01 mg/kg u SM zrna soje, 0.78 mg/kg, tj. 0.82 mg/kg u SM ESG-a, 0.88 mg/kg, tj. 0.98 mg/kg u SM HTZS-a, 2.52 mg/kg u heksanskom ekstraktu zrna soje, 3.41 mg/kg u heksanskom ekstraktu ESG-a i 3.55 mg/kg u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Sadržaj ukupnih ksantofila u ispitivanom materijalu iznosi: 9.28 mg/kg, tj. 10.32 mg/kg u SM zrna soje, 6.34 mg/kg, tj. 6.65 mg/kg u SM ESG-a, 7.66 mg/kg, tj. 8.57 mg/kg u SM HTZS-a, 29.93 mg/kg u heksanskom ekstraktu zrna soje, 25.04 mg/kg u heksanskom ekstraktu ESG-a i 28.85 mg/kg u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Ekstruzija i hidrotermička obrada zrna soje prouzrokovali su sniženje koncentracije ispitivanih liposolubilnih antioksidanata.

Ekstrakcija liposolubilnih antioksidanata upotrebom n-heksana bila je najbolja iz ekstrudiranog sojinog griza, nešto slabija iz hidrotermički tretiranog zrna soje, odnosno najslabija iz zrna soje, a rezultirala je relativno sličnim sadržajem ispitivanih antioksidativnih materija u dobijenim ekstraktima.

Liposolubilni antioksidanti heksanskih ekstrakata najverovatnije inhibiraju lančanu reakciju termičke, odnosno katalitičke oksidacije metil-linoleata, snižavajući koncentraciju peroksi-radikala.

Antioksidativni efekti postignuti dodavanjem heksanskih ekstrakata u model sistem I nešto su niži od efekata ostvarenih dodavanjem istih ekstrakata u model sistem II, ali su razlike u inhibitornim efektima male. Iz toga se može zaključiti da pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu I uz dodatke ispitivanih heksanskih ekstrakata ne dolazi do bitnije degradacije liposolubilnih antioksidanata i da, takođe, ovi antioksidanti ne deluju kao metal-helatori pri katalitičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu II.

Heksanski ekstrakti ispitivanih punomasnih hraniva, dodavani u količini od 0.02% u odnosu na metil-linoleat u model sisteme I i II, pokazali su se efikasnijim u snižavanju RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata u odnosu na heksanski ekstrakt zrna soje, za koga je ustanovljeno da, poput zrna soje, sadrži lipoksigenaze. Paralelno antioksidativno i prooksidativno delovanje heksanskog ekstrakta zrna soje objašnjava slabije antioksidativne efekte postignute dodavanjem ovog ekstrakta u model sisteme I i II, u kojima se deo antioksidanata heksanskog ekstrakta zrna soje angažuje na snižavanje koncentracije enzimski generisanih peroksi-radikala.

Heksanski ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje nisu sadržali lipoksigenaze, jer su one inaktivirane tokom termičkih tretmana primenjivanih u proizvodnji hraniva.

Upoređivanjem sadržaja ispitivanih liposolubilnih antioksidanata punomasnih hraniva od zrna soje dolazi se do zaključka da su različiti termički tretmani zrna soje, ekstruzija i hidrotermička obrada, slično uticali na sadržaj liposolubilnih antioksidanata zrna soje.

Inhibiranje termičke i katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemima I i II u prisustvu etanolnih ekstrakata zrna soje i ispitivanih punomasnih hraniva pripisano je antioksidativnom delovanju neliposolubilnih antioksidanata – izoflavona soje i fitinske kiseline.

Primenom HPLC metode određen je sadržaj antioksidativno najpotentnijih izoflavona soje – genisteina i daidžeina u zrnu soje, punomasnim hranivima od zrna soje i etanolnim ekstraktima. U navedenom materijalu određen je i sadržaj ukupnih polifenola i fitinske kiseline.

Sadržaj genisteina u ispitivanom materijalu iznosi: 51.51 mg/kg, tj. 57.27 mg/kg u SM zrna soje, 45.01 mg/kg, tj. 47.21 mg/kg u SM ESG-a, 25.99 mg/kg, tj. 29.09 mg/kg u

SM HTZS-a, 414.00 mg/kg u heksanskom ekstraktu zrna soje, 389.85 mg/kg u heksanskom ekstraktu ESG-a i 385.77 mg/kg u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Sadržaj daidžeina u ispitivanom materijalu iznosi: 42.02 mg/kg, tj. 46.72 mg/kg u SM zrna soje, 31.70 mg/kg, tj. 33.25 mg/kg u SM ESG-a, 20.09 mg/kg, tj. 22.49 mg/kg u SM HTZS-a, 313.00 mg/kg u heksanskom ekstraktu zrna soje, 238.58 mg/kg u heksanskom ekstraktu ESG-a i 209.64 mg/kg u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Sadržaj ukupnih polifenola u ispitivanom materijalu iznosi: 0.23%, tj. 0.26% u SM zrna soje, 0.24%, tj. 0.25% u SM ESG-a, 0.22%, tj. 0.25% u SM HTZS-a, 1.88% u heksanskom ekstraktu zrna soje, 1.96% u heksanskom ekstraktu ESG-a i 1.97% u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Sadržaj fitinske kiseline u ispitivanom materijalu iznosi: 1.49%, tj. 1.66% u SM zrna soje, 1.56%, tj. 1.64% u SM ESG-a, 1.46%, tj. 1.63% u SM HTZS-a, 0.92% u heksanskom ekstraktu zrna soje, 5.33% u heksanskom ekstraktu ESG-a i 4.35% u heksanskom ekstraktu HTZS-a.

Ekstruzija i hidrotermička obrada zrna soje prouzrokovali su sniženje koncentracije ispitivanih izoflavona, genisteina i daidžeina, koje nije bilo praćeno padom sadržaja ukupnih polifenola i fitinske kiseline u proizvedenim hranivima.

Ekstrakcija ispitivanih izoflavona upotrebom etanola bila je najbolja iz hidrotermički tretiranog zrna soje, dok su nešto slabiji, međusobno ujednačeni, stepeni ekstrakcije ostvareni iz zrna soje i ekstrudiranog sojinog griza. Rezultat ekstrakcije etanolom je relativno sličan sadržaj genisteina i ukupnih polifenola u dobijenim ekstraktima, dok su sadržaji daidžeina i fitinske kiseline u etanolnim ekstraktima različiti. Najniži sadržaj fitinske kiseline registrovan je u etanolnom ekstraktu zrna soje, dok su sadržaji ovog jedinjenja u etanolnim ekstraktima hraniva daleko viši.

S obzirom da je razlika u inhibitornim efektima ostvarenim dodavanjem ma kog etanolnog ekstrakta u model sisteme I i II velika, ispitivan je uticaj čistih preparata genisteina i daidžeina na termičku i katalitičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata. Navedeno ispitivanje je vršeno praćenjem uticaja genisteina i daidžeina, pojedinačno dodvanih u model sisteme I i II u količini od 0.02%, na RI ESR signala PBN-OOLM spin-adukata.

Ustanovljeno je da genistein slabo utiče na termičku oksidativnu degradaciju metil-linoleata u model sistemu I (stepen inhibicije – 10.12%), dok daidžein praktično ne ispoljava antioksidativno dejstvo u navedenom slučaju.

Dodavanje genisteina u model sistem II rezultira inhibicijom katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II (stepen inhibicije – 23.07%), dok dodatak daidžeina ostvaruje zanemarljiv efekat (stepen inhibicije – 6.65%).

Dobijeni rezultati ukazuju da genistein u model sistemu I inhibira lančanu reakciju oksidacije metil-linoleata snižavajući koncentraciju peroksi-radikala, dok u model sistemu II deluje dvojako, i kao inhibitor lančane reakcije oksidacije metil-linoleata i kao metal-helator. Delovanje genisteina kao metal-helatora u model sistemu II podrazumeva da on kompleksiranjem Fe(II)-jona inhibira stvaranje peroksi-radikala, što je u saglasnosti sa hemijskom strukturom ovog izoflavona.

Antioksidativni efekti postignuti dodavanjem etanolnih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje u model sistem I (stepeni inhibicije – 28.00% zrno soje; 37.91% ESG; 29.02% HTZS) objašnjavaju se zbirnim, moguće i sinergističkim, delovanjem izoflavona soje.

Dodaci ispitivanih etanolnih ekstrakata u model sistemu II ostvaruju različite stepene supresije katalitičke oksidacije metil-linoleata (stepeni inhibicije – 37.67% zrno soje; 86.51% ESG; 74.19% HTZS), za koje je odgovoran različit sadržaj fitinske kiseline u ispitivanim ekstraktima. Fitinska kiselina u model sistemu II deluje kao metal-helator, koji

inhibira nastanak peroksi-radikala tokom katalitičke oksidacije metil-linoleata mehanizmom kompleksiranja Fe(II)-jona.

Upoređivanjem sadržaja ispitivanih neliposolubilnih antioksidanata u punomasnim hranivima od zrna soje dolazi se do zaključka da su različiti termički tretmani zrna soje, ekstruzija i hidrotermička obrada, slično uticali na sadržaj neliposolubilnih antioksidanata zrna soje.

Poređenje antioksidativnih efekata koje su etanolni i heksanski ekstrakti dobijeni iz istog polaznog materijala ostvarili u model sistemu I sa velikom verovatnoćom ukazuje na dominantnu antioksidativnu ulogu liposolubilnih antioksidanata soje pri termičkoj oksidaciji ulja zrna soje i punomasnih hraniva.

Antioksidativna efikasnost neliposolubilnih antioksidanata ispitivanih etanolnih ekstrakata, mada registrovana i pri termičkoj oksidaciji metil-linoleata u model sistemu I, dolazi posebno do izražaja pri inhibiciji katalitičke oksidacije metil-linoleata u model sistemu II, sugerirajući da ovi antioksidanti, s obzirom na visok sadržaj gvožđa u ulju zrna soje ili punomasnih hraniva, mogu da daju značajan doprines u supresiji katalitičke oksidacije sojinog ulja.

Termičkom oksidativnom degradacijom komercijalnog sojinog ulja (prirodni sistem I), odnosno katalitičkom oksidativnom degradacijom komercijalnog sojinog ulja (prirodni sistem II) nastali su peroksi-radikali, koji su stabilizovani u prisustvu "spin-trapa" PBN-a. Konstante hiperfinog cepanja linija ESR spektara PBN-OOL spin-adukata iznose $a_N = 14.75 \text{ G}$ i $a_H^{\beta} = 2.80 \text{ G}$.

Ispitivanje uticaja vrste ekstragensa na antioksidativne efekte ekstrakata neliposolubilnih antioksidanata ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje podrazumevalo je pojedinačno dodavanje etil-acetatnih (etil-acetat-0.1 mol/dm³ HCl (83:17)), etanolnih (etanol-0.1 mol/dm³ HCl (83:17)) i acetonitrilnih (acetonitril-0.1 mol/dm³ HCl (83:17)) ekstrakata ovih hraniva u količini od 0.02% u prirodne sisteme I i II, te praćenje sniženja RI ESR signala PNB-OOL spin-adukata izazvanog antioksidativnim delovanjem komponenti ekstrakata.

Svi ispitivani ekstrakti neliposolubilnih antioksidanata punomasnih hraniva od zrna soje ispoljili su izraženije antioksidativno dejstvo pri katalitičkoj oksidaciji sojinog ulja.

Etil-acetatni ekstrakti punomasnih hraniva bili su najdelotvorniji u supresiji termičke oksidacije sojinog ulja, etanolni nešto manje delotvorni, dok su acetonitrilni ekstrakti praktično zanemarljivo delovali.

Iste vrste ekstrakata oba punomasna hraniva ispoljile su identično antioksidativno dejstvo u prirodnom sistemu I, odnosno pri termičkoj oksidaciji sojinog ulja.

Inhibicija katalitičke oksidacije sojinog ulja u prirodnom sistemu II najuspešnija je u slučaju dodavanja etil-acetatnih ekstrakata ispitivanih hraniva, slabija uz dodatke etanolnih ekstrakata hraniva, odnosno najslabija uz dodatke acetonitrilnih ekstrakata hraniva.

Ispitivani ekstrakti ekstrudiranog sojinog griza ispoljili su jače antioksidativno dejstvo pri katalitičkoj oksidaciji sojinog ulja u poređenju sa odgovarajućim ekstraktima hidrotermički tretiranog zrna soje.

Na osnovu rezultata ispitivanja uticaja vrste ekstragensa na antioksidativne efekte ekstrakata neliposolubilnih antioksidanata punomasnih hraniva od zrna soje može se zaključiti da je korišćenje etil-acetata najpovoljnije, mada ni upotreba etanola nije loš izbor.

6.0.0. LITERATURA

1. Adlercreutz, H.: Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection, *Environ. Health Perspect.*, 103, 103-112, 1995.
2. Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Mäkelä, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P.J., Kellis, J., Vickery, L.E.: Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 44, 147-153, 1993.
3. Adlercreutz, H., Mousavi, Y., Clark, J., Höckerstedt, K., Hämäläinen, E., Wähälä, K., Mäkelä, T., Hase, T.: Dietary phytoestrogens and cancer: *in vitro* and *in vivo* studies, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 41, 331-337, 1992.
4. Aikens, J., Dix, T.A.: Peroxy radical (HOO) initiated lipid peroxidation. The role of fatty acid hydroperoxides, *J. Biol. Chem.*, 266, 1591-1598, 1991.
5. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Tanabe, S.-I., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami, Y.: Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases, *J. Biol. Chem.*, 262, 5592-5595, 1987.
6. Alaiz, M., Hidalgo, F.J., Zamora, R.: Comparative antioxidant activity of Maillard- and oxidized lipid-damaged bovin serum albumin, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 8, 3250-3254, 1997.
7. Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J.: Natural antioxidants produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 72, 12, 1571-1575, 1995.
8. Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J.: Antioxidative stability of pyrrole, imidazole, dihydropyridine and pyridinium salt derivatives produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 3, 686-691, 1996.
9. Albers, N.: Uticaj proizvodnog procesa i sastava smeša na stabilnost vitamina, *VII Savetovanje tehnologija stočne hrane* "Unapređenje tehnologije proizvodnje stočne hrane", Zbornik radova, 95-104, Tara, 1997.
10. American Oil Chemists' Society (A.O.C.S.): *Official and Tentative Methods*, Ba 11-65, *Nitrogen Solubility Index (NSI)*, Champaign, Illinois, 1987.
11. American Oil Chemists' Society (A.O.C.S.): *Official and Tentative Methods*, Cd 2-38, *Thiocyanogen Value*, Champaign, Illinois, 1987.
12. American Oil Chemists' Society (A.O.C.S.): *Official and Tentative Methods*, Cd 8-53, *Peroxide Value*, Champaign, Illinois, 1987.
13. Anderson, A., Hafermann, J.C., Zhang, J., Parsons, C.M.: Effect of heating on the nutritional quality of conventional and Kunitz trypsin-free soybeans, *Poultry Sci.*, 71, 1700-1709, 1992.
14. Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Hughes, C.L.jr., Morgan, T.M., Burkes, G.L.: Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal Rhesus Monkeys, *J. Nutr.*, 126, 43-50, 1996.
15. Arjmandi, B.H., Alekel, L., Hollis, B.W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., Kukreja, S.C.: Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis, *J. Nutr.*, 126, 161-167, 1996.
16. Armour, J.C., Perera, R.L.C., Buchan, W.C., Grant, G.: Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat-treatment, *J. Sci. Food Agr.*, 78, 2, 225-231, 1998.
17. Artz, W.E., Rao, S.K., Sauer, R.M.: Lipid oxidation in extruded products during storage affected by extrusion temperature and selected antioxidants, Kokini, I.E., Ho, C.-T., Karwe, M.V. (eds.), *Food Extrusion Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 449-461, 1992.

18. Aruoma, O.I.: Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 73, 12, 1617-1625, 1996.
19. Aruoma, O.I., Halliwell, B.: Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation?, *Biochem. J.*, 241, 273, 1987.
20. Asada, K.: *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen*, Hayaishi, O., Asada, K. (eds.), Japan Scientific Society Press, Tokyo, p. 45, 1977.
21. Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.): *Official Methods of Analysis*, 14th ed., Washington, DC, 1984.
22. Aubourg, S.P.: Interaction of malondialdehyde with biological molecules – new trends about reactivity and significance, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 28, 4, 323-335, 1993.
23. Axelrod, B., Cheesborough, T.M., Laasko, S.: Lipoxygenase from soybean, *Methods Enzymol.*, 71, 441-451, 1981.
24. Aziz, S., Zecai Wu, Robinson, D.S.: Potato lipoxygenase catalysed co-oxidation of β -carotene, *Food Chem.*, 64, 1, 227-230, 1999.
25. Baba, N., Takahashi, I., Daido, H., Alam, M.K., Nakajima, S., Kaneko, T.: Effect of antioxidants in preventing the thermal decomposition of phosphatidylcholine hydroperoxide, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 1, 157-159, 1998.
26. Bae, E.-A., Kwon, T.-W., Moon, G.-S.: Isoflavone contents and antioxidative effects of soybeans, soybean curd and their by-products, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 3, 371-375, 1997.
27. Balentine, J.D.: *Pathology of Oxygen Toxicity*, Academic Press, New York, 1987.
28. Barrett, J.: Phytoestrogens – friends or foes?, *Environ. Health Perspect.*, 104, 478-482, 1996.
29. Barnes, S.: Evolution of the health benefits of soy isoflavones, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217, 3, 386-392, 1998.
30. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D.R., Carlson, J.: Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer, Pariza, M.W., Felton, J.S., Aeschbacher, H.-U., Sato, S. (eds.), *Mutagens and Carcinogens in the Diet*, Wiley-Liss, New York, pp. 239-253, 1990.
31. Barnes, S., Kirk, M., Coward, L.: Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 2466-2474, 1994a.
32. Barnes, S., Peterson, T.G., Grubbs, C., Setchell, K.D.R.: *Diet and Cancer: Markers, Prevention and Treatment*, Plenum Press, New York, pp. 135-147, 1994b.
33. BASF: *Estimation of Vitamins and Carotenoids in Premixes and Feeds*, MAE/EC 1, 1990.
34. Bast, A., Haenen, G.R.M.M., Van den Berg, R., Van den Berg, H.: Antioxidant effects of carotenoids, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 68, 399-403, 1998.
35. Bates, C.J.: Vitamin A, *Lancet*, 345, 31-35, 1995.
36. Beak, S.-E., Woo, S.-K.: Antioxidant activity of crude gingerol. I Thermal stability of gingerol from ginger and effect of its concentration on the oxidation of soybean oil, *J. Korean Soc. Food Sci.*, 9, 1, 33-36, 1993.
37. Bendich, A., Machlin, L.J., Scandurra, O., Burton, G.W., Wayner, D.D.M.: The antioxidant role of vitamin C, *Advan. Free Radical Biol. Med.*, 2, 419-444, 1986.
38. Berghofer, E., Grzeskowiak, B., Mundigler, N., Sentall, W.B., Walcak, J.: Antioxidative properties of faba bean-, soybean- and oat tempeh, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 49, 45-54, 1998.

39. Berk, Z.: *Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soybeans*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1992.
40. Berset, C., Cuvelier, M.E.: Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power, *Sci. Aliment.*, 16, 3, 219-245, 1996.
41. Bersuder, P., Hole, M., Smith, G.: Antioxidants from a heated histidine-glucose model system. I. Investigation of the antioxidant role of histidine and isolation of antioxidants by high-performance liquid chromatography, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 75, 2, 181-187, 1998.
42. Bielski, B.J.H., Arudi, R.L., Sutherland, M.W.: A study of reactivity of HO₂/O₂⁻ with unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.*, 258, 4759-4761, 1983.
43. Böhm, F., Edge, R., Land, E.J., McGarvey, D.J., Truscott, T.G.: Carotenoids cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical, *Nature Med.*, 1, 98-99, 1995.
44. Böhm, H., Franke, A.: Health relevance of soybeans due to their isoflavonoid content, *Proceedings of the 3. Hamburger Soja-Tagen* "Neue Aspekte bei der Verwendung von Sojaprodukten", pp. 33-39, Hamburg, 1996.
45. Böhm, H., Täufel, A.: Protein-inhibitoren hydrolitischer enzyme in nahrungspflanzen, *Teil I. Ern-Umschau.*, 40, 331-334, 1993.
46. Borg, D.C.: Applications of electron spin resonance in biology, Pryor, W.A. (ed.), *Free Radicals in Biology*, Vol. 1, Accademic Press, New York, pp. 69-147, 1976.
47. Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D.: Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 43, 83-116, 1992.
48. Božović, I., Bekrić, V., Radosavljević, M., Kuč, R.: Kvalitativne i kvantitativne promene na proteinima i ulju soje nakon primene termičkih procesa: ekstruzije i mikronizacije, *V Simpozijum tehnologije stočne hrane*, Zbornik radova, 157-163, Divčibare, 1992.
49. Bratkowska, I., Zwierzykowski, W.: Effect of carotenoids on the autoxidation of rapeseed oil with phospholipid additives, *Thuszcz Jadalne*, 26, 3-12, 1988.
50. Bullock, J.I., Duffin, P.A., Nolan, K.B.: *In vitro* hydrolysis of phytate at 95 °C and the influence of metal ion on the rate, *J. Food Sci. Agr.*, 63, 261-263, 1993.
51. Burkitt, M.J.: ESR spin trapping studies into the nature of the oxidizing species formed in the Fenton reaction: pitfalls associated with the use of 5,5-di-methyl-1-pyrroline-N-oxide in the detection of the hydroxyl radical, *Free Radical Res. Commun.*, 18, 43-57, 1993.
52. Burton, G.W., Ingold, K.U.: β-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant, *Science*, 224, 569-573, 1984.
53. Burton, G.W., Ingold, K.U.: Vitamin E as an *in vitro* and *in vivo* antioxidant, *Ann. NY Acad. Sci.*, 570, 7-22, 1989.
54. Burton, G.W., Traber, M.G.: Vitamin E: antioxidant activity biokinetics and bioavailability, *Annu. Rev. Nutr.*, 10, 357-382, 1990.
55. Camire, M.E., Dougherty, M.P.: Added phenolic compounds enhance lipid stability in extruded corn, *J. Food Sci.*, 63, 3, 516-518, 1998.
56. Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K.D.R.: Biological effect of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 60, 333-340, 1994.
57. Cheeseman, K.H.: Lipid peroxidation in biological systems, Halliwell, B., Aruoma, O.I. (eds.), *DNA and Free Radicals*, Ellis Harwood, London, 1993.
58. Cheeseman, K.H., Slater, T.F.: An introduction to free radical biochemistry, *Brit. Med. Bull.*, 49, 3, 481-493, 1993.

59. Chen, Q., Huang, S., Ho, C.-T.: Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 69, 10, 999-1002, 1992.
60. Chen, Z.Y., Chan, P.T., Ma, H.M., Fung, P.K., Wang, J.: Antioxidative effect of ethanol tea extracts on oxidation of canola oil, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 73, 3, 375-380, 1996.
61. Cheryan, M.: Phytic acid interaction in food systems, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 297-335, 1980.
62. Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M.: Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolics antioxidants, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68, 5, 307-311, 1991.
63. Choi, J.-S., Kwon, T.-W., Kim, J.-S.: Isoflavone contents in some varieties of soybean, *Foods Biotechnol.*, 5, 2, 167-169, 1996.
64. Chow, C.K., Drapper, H.H.: Oxidative stability and antioxidant activity of the tocopherols in corn and soybean oils, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 44, 396-403, 1974.
65. Chu, Y.-H., Kung, Y.-L.: A study on vegetable oil blends, *Food Chem.*, 62, 2, 191-195, 1998.
66. Constantinou, A., Huberman, E.: Genistein as an inducer of tumor cell differentiation: possible mechanisms of action, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208, 109-115, 1995.
67. Cook, N.C., Samman, S.: Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 66-76, 1996.
68. Cosgrove, D.J.: Physiology of inositol phosphates, Cosgrove, D.J., Irving, G.C.J. (eds.), *Inositol Phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amstredam, pp. 139-156, 1980.
69. Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R., Barnes, S.: Genistein, daidzein and their β -glucoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods of American and Asian diets, *J. Agr. Food Chem.*, 41, 1961-1967, 1993.
70. Crichton, R.R., Charlotheaux-Waters, M.: Iron transport and storage, *Eur. J. Biochem.*, 164, 485, 1987.
71. Čanadanović-Brunet, J.: *Kiseonikovi slobodni radikali prirodnih i model sistema*, Doktorska teza, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1997.
72. Dahl, S.: Low oxygen levels in foods. Measuring methods and influence on lipid oxidation, *SIK Rapport*, 607, 85, 1994.
73. Das, N.P.: Effects of vitamin A and its analogs on nonenzymatic lipid peroxidation in rat brain mitochondria, *J. Neurochem.*, 52, 585-588, 1989.
74. Davies, M.J., Gilbert, B.C., Haywood, R.M.: Radical-induced damage to bovine serum albumin – role of the cystine residue, *Free Radical Res. Commun.*, 18, 6, 353-367, 1993.
75. deBoland, A.R., Garner, G.B., O'Dell, B.L.: Identification and properties of 'phytate' in cereal grains and oilseed products, *J. Agr. Food Chem.*, 23, 1186-1189, 1975.
76. Decker, E.A.: Phenolics: prooxidants or antioxidants?, *Nutr. Rev.*, 55, 11, 396-398, 1997.
77. Dougherty, M.E.: Effectiveness of natural antioxidants compared to synthetic antioxidants, *Int. Food Ingred.*, 3, 27-32, 1993.
78. Duh, P.-D., Yeh, D.-B., Yen, G.-C.: Extraction and identification of an antioxidative component from peanut hulls, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 69, 8, 814-818, 1992.
79. Duran, N.: Singlet oxygen in biological processes, *Chemical and Biochemical Generation of Excited States*, Academic Press, New York, p. 345, 1982.

80. Darmati, Z., Jankov, R.M., Schwirtlich, E., Đulinac, B., Đorđević, A.: High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO₂ extraction, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68, 10, 731-734, 1991.
81. Ebel, J., Grisebach, H.: Defence strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*: a molecular analysis, *Trends Biochem. Sci.*, 13, 23-27, 1988.
82. Economou, K.D., Oreopoulou, V., Thomopoulos, C.D.: Antioxidative activity of some plant extracts of the family *Labiatae*, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 68, 2, 109-113, 1991.
83. Eichner, K., Wolf, W.: Maillard reaction products as indicator compounds for optimizing drying and storage conditions, Wallen, G.R., Feather, M.S. (eds.), *The Maillard Reactions in Foods and Nutrition*, ACS Symposium Series 215, Washington, DC, 1983.
84. Eldridge, A.C.: Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates, *J. Agr. Food Chem.*, 30, 353-355, 1982.
85. Eldridge, A.C., Kwolek, W.F.: Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition, *J. Agr. Food Chem.*, 31, 394-396, 1983.
86. Erdman, J.W.: Oilseed phytates: nutritional implications, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 56, 736-741, 1979.
87. Ernster, L., Forsmark, P., Nordenbrand, K.: The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, *Biofactors*, 3, 241-248, 1992.
88. Ernster, L., Forsmarkandree, P.: Ubiquinol – an endogenous antioxidant in aerobic organisms, *Clin. Invest.*, 71, 8 Suppl., S60-S65, 1993.
89. Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S., Osawa, T.: New antioxidant isolated from tempeh, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 696-700, 1996.
90. Esaki, H., Onozaki, H., Osawa, T.: Antioxidative activity of fermented soybean products, Huang, M.-T., Osawa, T., Ho, C.-T., Rosen, R.T. (eds.), *Food Phytochemicals for Cancer Prevention I*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 353-360, 1994.
91. Estelecki, I.: *Razrada metodologije za procenu kvaliteta punomasnog ekstrudiranog sojinog griza*, Magistarska teza, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, 1990.
92. Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H., Jurgens, G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL, *Free Radical Biol. Med.*, 13, 341-349, 1992.
93. Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H.: Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes, *Free Radical Biol. Med.*, 11, 81-128, 1991.
94. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M.: Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein, *Free Radical Res. Commun.*, 6, 67-75, 1989.
95. Esterbauer, H., Zollner, H., Schaur, R.J.: Hydroxyalkenals: cytotoxic products of lipid peroxidation, *ISI Atlas Sci.*, 1, 311-317, 1988.
96. Everett, S.A., Dennis, M.F., Patel, K.B., Maddix, S., Kundu, S.C., Willson, R.L.: Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant β -carotene, *J. Biol. Chem.*, 271, 8, 3988-3994, 1996.
97. Fang, X., Wada, S.: Enhancing the antioxidant effect of α -tocopherol with rosemary in inhibiting catalyzed oxidation caused by Fe²⁺ and hemoprotein, *Food Res. Int.*, 26, 6, 405-411, 1993.

98. Farmakalidis, E., Murphy, P.: Isolation of 6''-O-acetylgenistin and 6''-O-acetyldaidzin from toasted deffated soyflakes, *J. Agr. Food Chem.*, 33, 385-389, 1985.
99. Fleury, Y., Welti, D.H., Philipposian, G., Magnolato, D.: Soybean (malonyl) isoflavones characterization and antioxidant properties, Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C.Y. (eds.), *Phenolics Compounds in Food and Their Effects on Health*, American Chemical Society, Washington, DC, Vol. 2, pp. 98-113, 1992.
100. Foote, C.S.: Photosensitized oxidation and singlet oxigen: consequences in biological systems, Pryor, W.A. (ed.), *Free Radicals in Biology*, Vol. 2, Academic Press, New York, p. 85, 1976.
101. Foote, C.S.: *The Patology of Oxygen*, Academic Press, New York, p. 21, 1982.
102. Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Hase, T., Montesano, R., Schweigerer, L.: Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and *in vitro* angiogenesis, *J. Nutr.*, 125 suppl., 790S-797S, 1995.
103. Franke, A.A., Custer, L.J., Cerna, C.M., Narala, K.K.: Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 1905-1913, 1994.
104. Franke, A.A., Custer, L.J., Wang, W., Shi, C.-J.: HPLC analysis of isoflavonoids and other phenolics agents from foods and from human fluids, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217, 3, 263-273, 1998.
105. Frankel, E.N.: Recent advances in lipid oxidation, *J. Sci. Food Agr.*, 39, 242-246, 1991.
106. Frankel, E.N.: Natural and biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications, *Lipid Technol.*, 7, 4, 77-80, 1995.
107. Frankel, E.N., Hu, M.N., Tappel, A.L.: Rapid headspace gas chromatography of hexanal as a measure of lipid peroxidation in biological samples, *Lipids*, 24, 976-981, 1989.
108. Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E.: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *Lancet*, 341, 454-457, 1993.
109. Frankel, E.N., Neff, W.E.: Formation of malonaldehyde from lipid oxidation products, *Biochim. Biophys. Acta*, 754, 264, 1983.
110. Fridovich, I.: Superoxide dismutases, *Adv. Enzymol.*, 58, 62-97, 1986.
111. Fukutake, M., Takahashi, M., Ishida, K., Kawamura, H., Sugimura, T., Wakabayashi, K.: Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 457-461, 1996.
112. Fukuzawa, K., Seko, T., Minami, K., Terao, J.: Dynamics of iron-ascorbate-induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles, *Lipids*, 28, 6, 497-503, 1993.
113. Gamble, P.E., Burke, J.J.: Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system I. Alterations in glutathione reductase activity, *Plant Physiol.*, 76, 615-621, 1984.
114. Garrido, M.D., Frías, I., Díaz, C., Hardisson, A.: Concentrations of metals in vegetable edible oils, *Food Chem.*, 50, 237-243, 1994.
115. Gerschman, K., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dryer, P., Fenn, W.O.: Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common, *Science*, 119, 623-626, 1954.
116. Gilbert, D.L.: *Oxygen and Living Processes: An Inter-disciplinary Approach*, Springer, New York, 1981.
117. Graf, E., Eaton, J.W.: Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radical Biol. Med.*, 8, 61-69, 1990.

118. Graf, E., Empson, K.L., Eaton, J.W.: Phytic acid, a natural antioxidant, *J. Biol. Chem.*, 262, 11647-11650, 1987.
119. Graf, E., Mahoney, J.R., Bryant, R.G., Eaton, J.W.: Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordinate site, *J. Biol. Chem.*, 259, 3620-3624, 1984.
120. Granger, D.N.: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury, *Amer. J. Physiol.*, 255, 1269-1275, 1988.
121. Grüner, M., Horvatić, M., Kujundžić, D., Magdalenić, B.: Effect of gamma irradiation on lipid components of soy protein product, *Nahrung*, 36, 5, 443-450, 1992.
122. Guillén-Sans, R., Guzmán-Chozas, M.: The thiobarbituric acid (TBA) reaction in foods: a review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 38, 4, 315-330, 1998.
123. Gundel, J., Mátrai, T.: Different methods of heat treatment for soybeans in piglet nutrition, *Proceedings of the 2nd International Fullfat Soya Conference*, pp. 433-450, Budapest, 1996.
124. Gunstone, F.D.: Reaction of oxygen and unsaturated fatty acids, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 61, 2, 441-447, 1984.
125. Gutteridge, J.M.C.: Lipid peroxidation: some problems and concepts, Halliwell, B. (ed.), *Oxygen Radicals and Tissue Injury*, Allen Press, Lawrence, Kansas, pp. 9-19, 1988.
126. Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.: Radical-promoting loosely-bound iron in biological fluids and the bleomycin assay, *Life Chem. Rep.*, 4, 113, 1987.
127. György, P., Murata, K., Ikehata, H.: Antioxidants isolated from fermented soybeans (tempeh), *Nature*, 203, 870-872, 1964.
128. Hagerman, A.E., Riedl, K.M., Jones, G.A., Sovik, K.N., Ritchard, N.T., Hartzfeld, P.W., Riechel, T.L.: High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants, *J. Agr. Food Chem.*, 46, 5, 1887-1892, 1998.
129. Hakamatsuka, T., Sankawa, U.: Recent progress in studies of the biosynthesis of isoflavonoids: oxidative aryl migration during the formation of the isoflavone skeleton, *J. Plant Res.*, 3, 129-144, 1993.
130. Halliwell, B.: *Chloroplast Metabolism*, Oxford University Press, New York, p. 160, 1985.
131. Halliwell, B.: Free radicals and antioxidants: a personal view, *Nutr. Rev.*, 52, 8, 253-265, 1994.
132. Halliwell, B., Aruoma, O.I.: *DNA and Free Radicals*, Chichester, Ellis-Harwood, London, 1993.
133. Halliwell, B., Chirico, S.: Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Amer. J. Clin. Nutr.*, 57, 715S-725S, 1993.
134. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, 219, 1-14, 1984.
135. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts, *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501-514, 1986.
136. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Clarendon Press, Oxford, 1989.
137. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.*, 186, 1-85, 1990.
138. Halter, S.A.: Vitamin A: its role in the chemoprevention and chemotherapy of cancer, *Hum. Pathol.*, 20, 205-209, 1989.
139. Hamerstand, G.E., Black, L.T., Glover, J.D.: Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure, *Cereal Chem.*, 58, 42-45, 1981.

140. Hamilton, R.J., Kalu, C., Prisk, E., Padley, F.B., Pierce, H.: Chemistry of free radicals in lipids, *Food Chem.*, 60, 2, 193-199, 1997.
141. Hanson, L.J.: Expected animal response to the quality of full fat soya, *Proceedings of the 2nd International Fullfat Soya Conference*, pp. 83-89, Budapest, 1996.
142. Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H., Watanabe, K.: Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto*, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 28, 1, 135-138, 1995.
143. Haug, W., Lantzsch, H.J.: Sensitive method for the rapid determination of phytate in cereals and cereal products, *J. Sci. Food Agr.*, 34, 1423-1426, 1983.
144. Hendrich, S., Lee, K.-W., Xu, X., Wang, H.-J., Murphy, P.A.: Defining food components as new nutrients, *J. Nutr.*, 134, 1789S-1792S, 1994.
145. Herkelman, K.L., Cromwell, G.L., Cantor, A.H., Stahly, T.S., Pfeiffer, T.W.: Effects of heat treatment on the nutritional value of conventional and low trypsin inhibitor soybeans for chicks, *Poultry Sci.*, 72, 1359-1369, 1993.
146. Hodgson, J.M., Croft, K.D., Puddey, I.B., Mori, T.A., Beilin, L.J.: Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit *in vitro* lipoprotein oxidation in serum, *J. Nutr. Biochem.*, 7, 664-669, 1996.
147. Hoigne, J., Bader, H.: Ozonation of water: role of hydroxyl radicals as oxidising intermediates, *Science*, 190, 782, 1975.
148. Holmes, B.: Komercijalna proizvodnja, primjena i iskorištavanje punomasne soje, *Krmiva*, 30, 11-12, 217-226, 1988.
149. Hopia, A., Heinonen, M.: Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 76, 1, 139-144, 1999.
150. Huang, J., Nasr, M., Kim, Y., Matthews, R.: Genistein inhibits protein histidine kinase, *J. Biol. Chem.*, 267, 15511-15515, 1992.
151. Hudson, B.J.F.: *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London, 1990.
152. Hunt, J.V., Bottoms, M.A., Mitchinson, M.J.: Ascorbic acid oxidation: a potential cause of the elevated severity of atherosclerosis in diabetes mellitus?, *FEBS Lett.*, 311, 161-164, 1992.
153. Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P.: Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids, *Phytochemistry*, 26, 2489, 1987.
154. Ikeda, R., Ohta, N., Watanabe, T.: Changes of isoflavones at various stages of fermentation in defatted soybeans, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 42, 322-327, 1995.
155. Imlay, J.A., Linn, S.: DNA damage and oxygen toxicity, *Science*, 240, 1302, 1988.
156. International Standards Organization (ISO): *International Standard 5506: Soya Bean Products – Determination of Urease Activity*, ISO, Geneva, 1988.
157. Jansen, H.D.: Extrusion cooking for mixed feed processing, *Advan. Feed Technol.*, 5, 58-66, 1991.
158. Jha, H.C., von Recklinghausen, G., Zilliken, F.: Inhibition of *in vitro* microsomal lipid peroxidation by isoflavones, *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1367-1369, 1985.
159. Jia, Z.-S., Zhou, B., Yang, L., Wu, L.-M., Liu, Z.-L.: Antioxidant synergism of tea polyphenols and α -tocopherol against free radical induced peroxidation of linoleic acid in solution, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 4, 911-915, 1998.
160. Jovanović, S.V., Steenken, S., Hara, Y., Simić, M.G.: Reduction potentials of flavonoid and model phenoxyl radicals. Which ring in flavonoids is responsible for antioxidant activity?, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 2, 2497-2504, 1996.
161. Jung, M.Y., Min, D.B.: Effects of oxidized α -, γ - and δ -tocopherols on the oxidative stability of purified soybean oil, *Food Chem.*, 45, 3, 183-187, 1992.

162. Kajimoto, G., Kanomi, Y., Kawakami, H., Hamatani, M.: Effect of antioxidants on the oxidative stability of oil and of tocopherol in oil during heating, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 45, 3, 291-295, 1992.
163. Kajimoto, G., Kanomi, Y., Yoshida, H., Shibahara, A.: Influence of fatty acid composition in oil on the thermal decomposition of tocopherols, *Yokugaku*, 3, 196-201, 1991.
164. Kanazawa, T., Osanai, T., Zhang, X.-S., Nemura, T., Yiu, X.-Z., Onodera, K., Oika, Y., Ohkubo, K.: Protective effects of soy protein on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular diseases, *J. Nutr.*, 125, 639S-646S, 1995.
165. Kanofsky, J.P., Sima, P.: Singlet oxygen production from reactions of ozone with biological molecules, *J. Biol. Chem.*, 266, 9039-9042, 1991.
166. Kasai, H., Nishimura, S.: Formation of 8-hydroxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance, Sies, H. (ed.), *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London, pp. 99-116, 1991.
167. Kennedy, T.A., Liebler, D.C.: Peroxyl radical scavenging by β -carotene in lipid bilayers. Effect of oxygen partial pressure, *J. Biol. Chem.*, 267, 4658-4663, 1992.
168. Khan, N., Zaman, R., Elahi, M.: Effect of heat treatments on the phytic acid content of maize products, *J. Sci. Food Agr.*, 54, 153-156, 1991.
169. Kim, C.J., Lee, C.C., Johnson, L.A.: Factors affecting lipid oxidation in full-fat soy flour, *Korean J. Food Sci Technol.*, 23, 6, 732-738, 1991.
170. Kim, E.H., Sevanian, A.: Hematin- and peroxide-catalyzed peroxidation of phospholipid liposomes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 288, 324-330, 1991.
171. Kim, I.-H., Kim, C.-J., Kim, D.-H.: Effect of temperature on formation of polymer in oxidation of methyl linoleate, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 28, 3, 446-450, 1996.
172. Kim, J.-S., Nam, Y.-J., Kwon, T.-W.: Induction of quinone reductase by genistein, soybean isoflavone, *Foods Biotechnol.*, 5, 70, 1996.
173. Kim, J.-Y., Maeng, Y.-S., Lee, K.-Y.: Antioxidative effects of soybean extracts by using various solvents, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 27, 5, 635-639, 1995.
174. Kim, M.-H., Im, S.-S., Yoo, Y.-B., Kim, G.-E., Lee, J.-H.: Antioxidative materials in domestic meju and doenjeng. IV Separation of phenolic compounds and their antioxidative activity, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 23, 5, 792-798, 1994.
175. King, J.M., Svendsen, L.K., Fehr, W.R., Narvel, J.M., White, P.J.: Oxidative and flavor stability of oil from lipoxygenase-free soybeans, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 75, 9, 1121-1126, 1998.
176. Knox, J.P., Dodge, A.D.: Singlet oxygen and plants, *Phytochemistry*, 24, 5, 889-896, 1985.
177. Krinsky, N.I.: The biological properties of carotenoids, *Pure Appl. Chem.*, 66, 1003-1010, 1994.
178. Kudou, S., Fluery, Y., Welti, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, M.: Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), *Agr. Biol. Chem.*, 55, 2227-2233, 1991a.
179. Kudou, S., Shimoyamada, M., Imura, T., Uchida, T., Okubo, K.: A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O- β -D-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside, *Agr. Biol. Chem.*, 55, 859-560, 1991b.
180. Kusunoki, T., Higashi, H., Hosai, S., Hata, D., Sugie, K., Mayumi, M., Mikawa, H.: Tyrosine phosphorylation and its possible role in superoxide production by human neutrophils stimulated with FMLP and IgG, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 183, 789-796, 1992.

181. Kwon, B.M., Foote, C.S.: Chemistry of singlet oxygen. 50. Hydroperoxide intermediates in the photooxygenation of ascorbic acid, *J. Amer. Chem. Soc.*, 110, 6582, 1988.
182. Lambelet, P., Löliger, J., Saucy, F., Bracco, U.: Antioxidant properties of coenzyme-Q10 in food systems, *J. Agr. Food Chem.*, 40, 4, 581-584, 1992.
183. Latta, M., Eskin, M.: A simple and rapid colorimetric method for phytate determination, *J. Agr. Food Chem.*, 28, 6, 1313-1315, 1980.
184. Lederer, M.O.: Reactivity of lysine moieties toward γ -hydroxy- α,β -unsaturated epoxide: a model study on protein-lipid oxidation product interaction, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 9, 2531-2537, 1996.
185. Lee, B.J., Hendricks, D.G.: Metal-catalyzed oxidation of ascorbate, deoxyribose and linoleic acid as affected by phytic acid in a model system, *J. Food Sci.*, 62, 5, 935-938, 1997.
186. Lee, J.-S., Cheigh, H.-S.: Antioxidative characteristics of isolated crude phenolics from soybean fermented foods (doenjang), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 3, 376-382, 1997a.
187. Lee, J.-S., Cheigh, H.-S.: Composition and antioxidative characteristics of phenolic fractions isolated from soybean fermented food, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 26, 3, 383-389, 1997b.
188. Lentsova, L.V., Samburova, G.N., Chizhikova, O.G., Botova, N.A.: Influence of soy meal on sensory properties and oxidation of cooking fats during storage, *Voprosy Pitaniya*, 2, 61-62, 1993.
189. Letan, A.: Relation of structure to antioxidant activity of quercetin and some of its derivatives, *J. Food Sci.*, 31, 395, 1966.
190. Liebler, D.C., McClure, T.D.: Antioxidant reactions of β -carotene: identification of carotenoid-radical adducts, *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 8-11, 1996.
191. Liener, I.E.: Factors affecting the nutritional quality of soya products, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 58, 406-415, 1981.
192. Liener, I.E., Kakade, M.L.: *Protease Inhibitors, Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, Academic Press, New York, 1980.
193. Liggins, J., Bluck, L.J.C., Coward, W.A., Bingham, S.A.: Extraction and quantification of daidzein and genistein in food, *Anal. Biochem.*, 264, 1-7, 1998.
194. Lind, J., Shen, X., Eriksen, T.E., Merényi, G.: The one-electron reduction potential of 4-substituted phenoxyl radicals in water, *J. Amer. Chem. Soc.*, 112, 2, 479-482, 1990.
195. Lolas, G.M., Palamidis, N., Markakis, P.: The phytic acid-total phosphorus relationship in barley, oats, soybeans and wheat, *Cereal Chem.*, 53, 6, 867-871, 1976.
196. Löliger, J.: The use of antioxidants in food, Aruoma, O.I., Halliwell, B. (eds.), *Free Radicals Food Additives*, Taylor & Francis, London, pp. 121-150, 1991.
197. Lookhart, G.L., Jones, B.L., Finney, K.F.: Determination of coumestrol in soybeans by high-performance liquid and thin-layer chromatography, *Cereal Chem.*, 55, 967-972, 1978.
198. Løvaas, E.: A sensitive spectrophotometric method for lipid hydroperoxide determination, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 69, 8, 777-783, 1992.
199. Ludikhuzye, L., Indrawati, A., Broeck, I., van den Weemaes, C., Hendricks, M.: Effect of combined pressure and temperature on soybean lipoxygenase. I Influence of extrinsic and intrinsic factors on isobaric-isothermal inactivation kinetics, *J. Agr. Food Chem.*, 46, 10, 4074-4080, 1998.
200. Luo, Y.-R., Holmes, J.L.: The stabilization energies of polyenyl radicals, *Chem. Phys. Lett.*, 228, 4-5, 329-332, 1994.

201. Luzia, M.R., Trugo, L.C., da Paixão, K.C.C., Marcílio, R., de Maria, C.A.B., Quinteiro, L.M.C.: Effect of 5-caffeoylquinic acid in the presence of metal chelators on soybean oil oxidative stability, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 31, 1, 64-68, 1998.
202. Maccarrone, M., Veldink, G.A., Vliegthart, J.F.G., Agro, A.F.: Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants, *Lipids*, 30, 1, 51-54, 1995.
203. Maestro-Durán, R., Borja-Padilla, R.: Actividad antioxidante de compuestos naturales nitrogenados, *Grasas Aceites*, 44, 3, 204-207, 1993.
204. Maga, J.: Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis, *J. Agr. Food Chem.*, 30, 1, 1-9, 1982.
205. Mahungu, S.M., Diaz-Mercado, S., Li, J., Schwenk, M., Singletary, K., Faller, J.: Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture, *J. Agr. Food Chem.*, 47, 279-284, 1999.
206. Mäkelä, S., Poutanen, M., Lehtimäki, J., Kostian, M.-L., Santti, R., Vihko, R.: Estrogen-specific 17- β -hydroxysteroid oxidoreductase type I (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208, 51-59, 1995.
207. Marfo, E.K., Simpson, B.K., Idowu, J.S., Oke, O.L.: Effect of local food processing on phytate levels in cassava, cocoyam, yam, maize, sorghum, rice, cowpea and soybean, *J. Agr. Food Chem.*, 38, 7, 1580-1585, 1990.
208. Matkovic, B., Boda, H., Kalasz, H.: *Oxygen Free Radicals and the Tissue Injury*, Akademia Kiado, Budapest, p. 175, 1988.
209. Matsamura, M., Obata, O.: β -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin, *J. Food Sci.*, 54, 602-605, 1993.
210. Matsui, K., Kajiwara, T., Hatanaka, A., Waldmann, D., Schreier, P.: 5,6-Epoxidation of all-*trans*-retinoic acid with soybean lipoxygenase-2 and -3, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 58, 1, 140-145, 1994.
211. Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satome, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishimo, H., Aoike, A.: Genistein arrests cell cycle progression at G₂-M, *Cancer Res.*, 53, 1328-1331, 1993.
212. Mayer, D.C., Strada, J.C., Hanson, A., Artman, M.: Effect of hemorrhagic shock and retransfusion on catalase and superoxide dismutase activities in rabbits, *Circ. Shock*, 36, 147, 1992.
213. Messina, M., Barnes, S.: The role of soy products in reducing cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 541-546, 1991.
214. Messina, M., Persky, V., Setchell, K.D.R., Barnes, S.: Soy intake and cancer risk: a review of *in vitro* and *in vivo* data, *Nutr. Cancer*, 21, 113-131, 1994.
215. Milić, B.Lj., Đilas, S., Čanadanović-Brunet, J.M.: Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system, *Food Chem.*, 61, 4, 443-447, 1998.
216. Miller, N.J., Rice-Evans, C.A.: Cinnamates and hydroxybenzoates in the diet: antioxidant activity assessed using the ABTS^{•+} radical cation, *Brit. Food J.*, 99, 2, 57-61, 1997.
217. Miller, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A.: Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls, *FEBS Lett.*, 384, 3, 240-242, 1996.
218. Mitchell, J.H., Gardner, P.T., McPhail, D.B., Morrice, P.C., Collins, A.R., Duthie, G.G.: Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch. Biochem. Biophys.*, 360, 1, 142-148, 1998.

219. Mitsuya, K., Mizuta, Y., Kohno, M., Hiramatsu, M., Mori, A.: The application of ESR spin-trapping technique to the evaluation of SOD-like activity of biological substances, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 63, 187-191, 1990.
220. Miyake, T., Shibamoto, T.: Antioxidative activities of natural compounds found in plant, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 5, 1819-1822, 1997.
221. Miyazawa, M., Katsuhisa, S., Nakamura, S., Kosaka, H.: Antimutagenic activity of isoflavones from soybean seeds (*Glycine max* Merrill), *J. Agr. Food Chem.*, 47, 4, 1346-1349, 1999.
222. Miyazawa, T., Fujimoto, L., Kinoshita, M., Usuki, R.: Rapid estimation of peroxide content of soybean oil by measuring thermoluminescence, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 71, 3, 343-345, 1994.
223. Miyazawa, T., Fujimoto, K., Kaneda, T.: Lipid peroxidation and chemiluminescence in animal tissues, Sevanian, A. (ed.), *Lipid Peroxidation in Biological Systems*, American Oil Chemists' Society, p. 1, 1988.
224. Mizuno, M., Tsuchida, H., Kozukue, N., Mizuno, S.: Rapid quantitative analysis and distribution of free quercetin in vegetables and fruits, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 39, 1, 88-92, 1992.
225. Monari, S.: *Full-fat Soya Handbook*, American Soybean Association, Brussels, 1994.
226. Moore, S.: On the determination of cystein as cysteic acid, *J. Biol. Chem.*, 238, 235-237, 1963.
227. Morgan, T.R., Laudone, V.P., Heston, W.D., Zeitz, L., Fair, W.R.: Free radical production by high-energy shock waves – comparison with ionizing radiation, *J. Urol.*, 139, 1, 186-189, 1988.
228. Mortensen, A., Skibsted, L.H.: Kinetics of parallel electron transfer from β -carotene to phenoxyl radical and adduct formation between phenoxyl radical and β -carotene, *Free Radical Res.*, 25, 515-523, 1996.
229. Mortensen, A., Skibsted, L.H.: Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 8, 2970-2977, 1997a.
230. Mortensen, A., Skibsted, L.H.: Relative stability of carotenoid radical cations and homologue tocopheroxyl radicals. A real time kinetic study of antioxidant hierarchy, *FEBS Lett.*, 417, 261-266, 1997b.
231. Mortensen, A., Skibsted, L.H.: Reactivity of β -carotene towards peroxy radicals studied by laser flash and steady-state photolysis, *FEBS Lett.*, 426, 392-396, 1998.
232. Mousavi, Y., Adlercreutz, H.: Genistein is an effective stimulator of sex hormone-binding globulin production in hepatocarcinoma human liver cancer cells and suppresses proliferation of these cells in culture, *Steroids*, 58, 301-304, 1993.
233. Muellner, C., Sontag, G.: Determination of some phytoestrogens in soybeans and their processed products with HPLC and coulometric electrode array detection, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 3, 261-265, 1999.
234. Mukai, K., Morimoto, H., Okauchi, Y., Nagaoko, S.: Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids, *Lipids*, 28, 8, 753-756, 1993.
235. Mukai, K., Sawada, K., Kohno, Y., Terao, J.: Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol – hydrogen abstraction from lipid hydroperoxides by tocopheroxyls in solution, *Lipids*, 28, 8, 747-752, 1993.
236. Murakami, H., Asakawa, T., Terao, J., Matsushita, S.: Antioxidative stability of tempeh and liberation of isoflavones by fermentation, *Agr. Biol. Chem.*, 48, 2971-2975, 1984.
237. Murata, K.: Antioxidative stability of tempeh, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 65, 799-800, 1988.

238. Murkies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J.G.: Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flushes: effect of soy and wheat, *Maturitas*, 21, 189-195, 1995.
239. Murphy, P.A.: Phytoestrogen content of processed soybean products, *Food Technol.*, 36, 60-64, 1982.
240. Murphy, P.A., Tongtong Song, Buseman, G., Barua, K., Beecher, G.R., Trainer, D., Holden, J.: Isoflavones in retail and institutional foods, *J. Agr. Food Chem.*, 47, 7, 2697-2704, 1999.
241. Murray, J.H.: The role of the micronizer in full fat soya production with reference to young animal nutrition, *Proceedings of the 2nd International Fullfat Soya Conference*, pp. 67-77, Budapest, 1996.
242. Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., Birk, Y.: Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones, *J. Agr. Food Chem.*, 24, 1174-1177, 1976.
243. Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y., Bondi, A.: A new isoflavone from soya beans, *Phytochemistry*, 12, 169-170, 1973.
244. Namiki, M.: Antioxidants/Antimutagens in food, *Food Sci. Nutr.*, 29, 273-300, 1990.
245. Nardini, M., Scaccini, C., D'Aquino, M., Benedetti, P.C., Felice, M. di, Tomassi, G.: Lipid peroxidation in liver microsomes of rats fed soybean, olive and coconut oil, *J. Nutr. Biochem.*, 4, 1, 39-44, 1992.
246. Nelson, M.J., Cowling, R.A., Seitz, S.P.: Structural characterization of alkyl and peroxy radicals in solutions of purple lipoxygenase, *Biochemistry*, 33, 16, 4966-4973, 1994.
247. Neta, P., Huie, R.E., Ross, A.B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 19, 413-513, 1990.
248. Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F., Valenzuela, A.: Flavonoids as stabilizers of fish oil: an alternative to synthetic antioxidants, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 70, 8, 773-778, 1993.
249. Nishiba, Y., Suda, I.: Degradation of vitamin E, vitamin C and lutein in soybean homogenate: a comparison of normal soybean and lipoxygenase lacking (triple-null) soybean, *J. Agr. Food Chem.*, 46, 9, 3708-3712, 1998.
250. Nishida, K., Ohta, Y., Araki, Y., Ito, M., Nagamura, Y., Ishiguro, I.: Inhibitory effects of group A saponin and group B saponin fractions from soybean seed hypocotyls on radical-initiated lipid peroxidation in mouse liver microsomes, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 15, 3, 175-184, 1993.
251. Nishiyama, T., Hagiwara, Y., Hagiwara, H., Shibamoto, T.: Inhibition of malonaldehyde formation from lipids by an isoflavonoid isolated from young green barley leaves, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 70, 8, 811-813, 1993.
252. Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., Kido, R.: Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis, *Phytochemistry*, 36, 3, 579-538, 1994.
253. Ohta, N., Kuwata, G., Akahori, H., Watanabe, T.: Isoflavonoid constituents of soybeans and isolation of a new acetyldaidzin, *Agr. Biol. Chem.*, 43, 1415-1419, 1979.
254. Omura, K.: Chemistry on the decay of the phenoxy radical from butylated hydroxytoluene, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 69, 5, 461-465, 1992.
255. Packett, L.V., Chen, L.H., Liu, J.Y.: Antioxidant potential of tempeh as compared to tocopherol, *J. Food Sci.*, 36, 798-799, 1971.
256. Palozza, P., Krinsky, N.I.: β -Carotene and α -tocopherol are synergistic antioxidants, *Arch. Biochem. Biophys.*, 297, 184-187, 1992.

257. Palozza, P., Krinsky, N.I.: Antioxidant properties of carotenoids, Livrea, M.A., Vidali, G. (eds.), *Retinoids: From Basic Science to Clinical Applications*, Birkhäuser Verlag, Basel, 1994.
258. Papas, A.M.: Oil-soluble antioxidants in foods, *Toxicol. Ind. Health*, 9, 123-149, 1993.
259. Park, H.-H., Hakamatsuka, T., Noguchi, H., Sankawa, U., Ebizuka, Y.: Isoflavone glucosides exist as their 6''-O-malonyl esters in *Pueraria lobata* and its cell supresion cultures, *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 1978-1980, 1992.
260. Pathak, M.A., Joshi, P.C.: Production of active oxygen species ($^1\text{O}_2$ and O_2^-) by psoralens and ultraviolet radiation, *Biochim. Biophys. Acta*, 798, 115, 1984.
261. Paula, A.C.O. de, Carvalho, I.C.jr., Vieira, C.R., Bastos, A.M.M.: Kinetic studies of thermal inactivation of lipoxygenase and insolubilization of proteins in soybeans, *Ciencia Technol. Aliment.*, 15, 3, 262-267, 1995.
262. Paxton, J.: Soybean phytoalexins: elicitation nature, mode of action and role, Daniel, M., Purkayastha, R.P. (eds.), *Handbook of Phytoalexins Metabolism and Action*, Marcel Dekker, New York, pp. 69-83, 1995.
263. Perkins, E.G.: Composition of soybeans and soybean products, Erickson, D.R. (ed.), *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*, AOAC Press, Champaign, Illinois & United Soybean Board, St. Louis, Missouri, pp. 9-28, 1995.
264. Peterson, G., Barnes, S.: Genistein inhibition of the growth of human breast cancer cells: Independence from estrogen receptors and the multi-drug resistance gene, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 661-667, 1991.
265. Petres, J., Márkus, Zs., Gelencsér, É., Bogár, Zs., Gajzágó, I., Czukor, B.: Effect of dielectric heat treatment on protein nutritional values and some antinutritional factors in soya bean, *J. Sci. Food Agr.*, 53, 35-41, 1990.
266. Pettersson, H., Kiessling, K.H.: Liquid chromatographic determination of the plant estrogens coumestrol and isoflavones in animal feed, *J. Assn. Offic. Anal. Chem.*, 67, 503-506, 1984.
267. Pointillart, A.: Importance of phytates and cereal phytases in the feeding of pigs, *Proceedings of the 1st Symposium Enzymes in Animal Nutrition*, pp. 192-198, Kartause Ittingen (Switzerland), 1993.
268. Pokorný, J., Nguyen, H.T.T., Korczak, J.: Antioxidative activities of rosemary and sage extracts in sunflower oil, *Nahrung*, 41, 3, 176-177, 1997.
269. Porta, E.A.: Advances in age pigment research, *Arch. Gerontol. Geriatr.*, 12, 303-320, 1991.
270. Porter, N.A.: Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: initiation, propagation and product distribution (basic chemistry), Vigo-Pelfrey, C. (ed.), *Membrane Lipid Oxidation*, Boca Raton: CRC, pp. 239-283, 1990.
271. Porter, W.L.: Paradoxical behaviour of antioxidants in food and biological systems, *Toxicol. Ind. Health*, 9, 93-122, 1993.
272. Pratt, D.E.: Natural antioxidants of soybeans and other oil-seeds, Simić, M.G., Karel, M. (eds.), *Antioxidation in Food and Biological Systems*, Plenum Press, New York, pp. 283-293, 1980.
273. Pratt, D.E., Birac, P.M.: Source of antioxidant activity of soybeans and soy products, *J. Food Sci.*, 44, 1720-1722, 1979.
274. Puurunen, M., Manittari, M., Maninen, V., Tenkanen, L., Alfthang, G., Enholm, C., Vaarala, O., Kimmo, A., Palosuo, T.: Antibody against oxidized low-density lipoprotein predicting myocardial infarct, *Arch. Intern. Med.*, 154, 2605, 1994.
275. Quartacci, M.F., Navarizzo, F.: Water-stress and free-radical mediated changes in sunflower seedlings, *Plant Physiol.*, 139, 5, 621-625, 1992.

276. Quebedeaux, B., Havelka, U.D., Livak, K.L., Hardy, R.W.F.: Effect of altered pO₂ in aerial part of soybean on symbiotic N₂ fixation, *Plant Physiol.*, 56, 761-764, 1975.
277. Quinteiro, L.M., Vianni, R.: Characteristics and stability of soybean oils, *Ciencia Techol. Aliment.*, 15, 1, 29-36, 1995.
278. Rabinowitch, H.D., Privalle, C.T., Fridovich, I.: Effects of paraquat on the green alga *Dunaliella salina*: protection by the mimic of superoxide dismutase, desferal-Mn(IV), *Free Radical Biol. Med.*, 3, 125, 1987.
279. Rackis, J.J., Wolf, W.J., Baker, E.C.: Protease inhibitors in plant foods: content and inactivation, Friedman, M. (ed.), *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*, Plenum Publishing, New York, pp. 299-347, 1986.
280. Ramarathnam, N., Osawa, T., Ochi, H., Kawakishi, S.: The contribution of plant food antioxidants to human health, *Trends Food Sci. Technol.*, 6, 75-82, 1995.
281. Rand, N.T., Cier, D., Viola, S.: Israeli experience with full fat soybeans, *Proceedings of the 2nd International Fullfat Soya Conference*, pp. 311-323, Budapest, 1996.
282. Reblova, Z., Pokorný, J., Panek, J.: Autoxidation of stored soybean lecithin, *Nahrung*, 35, 6, 665-666, 1991.
283. Recknagel, R.O., Glende, E.A.jr., Dolak, J.A., Waller, R.L.: Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity, *Pharmacol. Ther.*, 43, 139-154, 1989.
284. Record, I.R., Dreosti, I.E., McInerney, J.K.: The antioxidant activity of genistein *in vitro*, *J. Nutr. Biochem.*, 6, 481-485, 1995.
285. Richheimer, S.L., Bernart, M.W., King, G.A., Kent, M.C., Bailey, D.: Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 73, 4, 507-514, 1996.
286. Robak, J., Gryglewski, R.J.: Flavonoids are scavengers of superoxide anion, *Biochem. Pharmacol.*, 37, 837, 1988.
287. Roginsky, V.A., Barsukova, T.K., Remorova, A.A., Bors, W.: Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 73, 6, 777-786, 1996.
288. Roginsky, V.A., Stegmann, H.B.: Kinetics of the reaction between ascorbate and free radical from vitamin E as studied by ESR steady-state method, *Chem. Phys. Lipids*, 65, 2, 103-112, 1993.
289. Sahu, S.C., Gray, G.C.: Lipid peroxidation and DNA damage induced by morin and naringenin in isolated rat liver nuclei, *Food Chem. Technol.*, 35, 5, 443-447, 1997.
290. Sakač, M.: Neobjavljeni podaci, 1999.
291. Sakač, M., Ristić, M., Đuragić, O.: Kontrola kvaliteta proizvoda od termički tretiranog zrna soje, *VIII Simpozijum tehnologije stočne hrane "Tehnologija proizvodnje stočne hrane u službi ekologije"*, Zbornik radova, 111-119, Petrovac na moru, 1998.
292. Sakač, M., Ristić, M., Lević, J.: Effects of microwave heating on the chemico-nutritive value of soybeans, *Acta Aliment.*, 25, 2, 163-169, 1996.
293. Santiago, L.A., Hiramatsu, M., Mori, A.: Japanese soybean paste miso scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 38, 297-304, 1992.
294. Sarma, A.D., Yellamraju Sreelakshmi, Rameshwar Sharma: Antioxidant ability of anthocyanins against ascorbic acid oxidation, *Phytochemistry*, 45, 4, 671-674, 1997.
295. Satue-Gracia, M.T., Heinonen, M., Frankel, E.N.: Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 9, 3362-3367, 1997.
296. Scholes, G.: Radiation effects on DNA, *Brit. J. Radiol.*, 56, 221, 1983.

297. Setchell, K.D.R., Welch, M.B., Lim, C.K.: HPLC analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection, *J. Chromatogr.*, 386, 315-323, 1987.
298. Shahidi, F., Amarowics, R., Abou-Gharbia, H.A., Shehata, A.A.Y.: Endogenous antioxidants and stability of sesame oil as affected by processing and storage, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 74, 2, 143-148, 1997.
299. Shahidi, F., Naczek, M.: An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 69, 9, 917-923, 1992.
300. Sharma, O.P., Adlercreutz, H., Strandberg, J.D., Zirkin, B.R., Coffey, D.S., Ewing, L.L.: Soy of dietary source plays a preventive role against the pathogenesis of prostatitis in rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43, 557-564, 1992.
301. Shi, H., Niki, E.: Stoichiometric and kinetic studies on *Ginkgo biloba* extract and related antioxidants, *Lipids*, 33, 4, 365-370, 1998.
302. Shmulovich, V.G.: Interrelation of contents of unsaturated fatty acids and vitamin E in food products lipids, *Appl. Biochem. Micro.*, 30, 547-551, 1994.
303. Simić, M.G., Jovanović, S.V., Niki, E.: *Mechanisms of Lipid Oxidative Processes and Their Inhibition*, American Chemical Society, Washington, DC, p. 14, 1992.
304. Simić, M.G., Taylor, K.A.: *Free Radical Mechanisms of Oxidation Reactions*, Academic Press, New York, pp. 69-114, 1987.
305. Smoje, I., Ereg, D., Sadžakov, S., Predin, S.: Novi aspekti proizvodnje i primene ekstrudiranih hraniva, *VI Savetovanje tehnologije stočne hrane "Tehnologija proizvodnje u službi kvaliteta"*, Zbornik radova, 69-81, Budva, 1996.
306. Spaink, H.P.: The molecular basis of infection and nodulation by *Rhizobia* – the ins and outs of symphatogenesis, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 33, 345-368, 1995.
307. Stadtman, E.R., Oliver, C.N.: Metal-catalyzed oxidation of proteins: physiological consequence, *J. Biol. Chem.*, 266, 2005-2008, 1991.
308. Stark, G.: The effect of ionizing radiation on lipid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 759, 38-41, 1991.
309. Stich, H.F.: The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds, *Mutat. Res.*, 259, 307-324, 1991.
310. Suda, I., Hajika, M., Nishiba, Y., Furuta, S., Igita, K.: Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isoenzymes in soybean seeds, *J. Agr. Food Sci.*, 43, 3, 742-747, 1995.
311. Szkudelski, T.: Phytic acid – its influence on organism, *J. Anim. Feed Sci.*, 6, 427-438, 1997.
312. Štajner, D., Popović, M.: Effect of herbicides on the antioxidant enzyme activities and soluble protein content in wheat seeds, *J. Serb. Chem. Soc.*, 59, 10, 775, 1994.
313. Takácsová, M., Příbela, A., Faktorová, M.: Study of the antioxidative effects of thyme, sage, juniper and oregano, *Nahrung*, 39, 3, 241-243, 1995.
314. Tamura, Y., Takenaka, Y., Takenaka, T.: Purification of water soluble antioxidant compounds from okara and its characterization, *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.*, 46, 5, 303-310, 1999.
315. Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T., Takama, K.: Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and related phenolic compounds in solution, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 7, 1204-1205, 1993.
316. Thillet, J., Michelson, A.M.: *Free Radical Res. Commun.*, 12-13, 553, 1986.
317. Thomas, C.E., McLean, L.R., Parker, R.A., Ohlweiler, D.F.: Ascorbate and phenolic antioxidants interactions in prevention of liposomal oxidation, *Lipids*, 27, 7, 543-550, 1992.

318. Thompson, D.: Review of processing systems for fullfat soy in the USA, *Fullfat soy: A Regional Conference of the American Soybean Association*, Milan, pp. 113-121, 1987.
319. Thompson, D.B., Erdman, J.W.jr.: Phytic acid determination in soybeans, *J. Food Sci.*, 47, 513-517, 1982.
320. Tikkanen, M.J., Wahala, K., Ojala, S., Vihma, V., Adlercreutz, H.: Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 95, 6, 3106-3110, 1998.
321. Totani, Y.: Antioxidative effects of phospholipids in an emulsifying system, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, 46, 1, 21-27, 1997.
322. Tsukamoto, C., Shimada, S., Igita, K., Kudou, S., Kokubun, M., Okubo, K., Kitamura, K.: Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins and composition of fatty acids at different temperatures during seed development, *J. Agr. Food Chem.*, 43, 1184-1192, 1995.
323. Valgimigli, L., Lucarini, M., Pedulli, G.F., Ingold, K.U.: Does β -carotene really protect vitamin E from oxidation?, *J. Amer. Chem. Soc.*, 119, 8095-8096, 1997.
324. Van den Berg, J.J.M., Cook, N.E., Tribble, D.L.: Reinvestigation of the antioxidant properties of conjugated linoleic acid, *Lipids*, 30, 7, 599-605, 1995.
325. Van der Poel, A.F.B.: Legume seeds: effects of processing on antinutritional factors and nutritional value for non-ruminant feeding, *Advan. Feed Technol.*, 4, 22-36, 1990.
326. Van der Poel, A.F.B.: *Expander Processing of Animal Feeds*, Feed Processing Centre, Wageningen, 1997.
327. Verheul, J.A.: Sallmonela-free production, *Cebeco Con. Engin. Inform.*, 7, 7-8, 1997.
328. Vohra, P., Kratzer, F.H.: Evaluation of soybean meal determines adequacy of heat treatment, *Feedstuffs*, 22-28, 1991.
329. Voisine, R., Vézina, L.-P., Willemot, C.: Induction of senescence-like deterioration of microsomal membranes from cauliflower by free radicals generated during gamma irradiation, *Plant Physiol.*, 97, 545-550, 1991.
330. Von Sonntag, C.: *The Chemical Basis of Radiation Biology*, Taylor & Francis, London, 1987.
331. Waidenbörner, M., Hindorf, H., Jha, H.C., Tsotsonos, P., Egge, H.: Antifungal activity of isoflavones in different reduced stages on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, *Phytochemistry*, 29, 801-803, 1990.
332. Walter, E.D.: Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans, *J. Amer. Chem. Soc.*, 63, 3273-3276, 1941.
333. Wang, C., Ma, Q., Pagadala, S., Sherrard, M.S., Krishnan, P.G.: Changes of isoflavones during processing of protein isolates, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 75, 3, 337-342, 1998.
334. Wang, C.E., Liu, X.Y.: Composition, concentration and properties of soyabean isoflavone, *Food Sci., China*, 19, 4, 39-43, 1998.
335. Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M., Carman, A.S.: A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products, *J. Agr. Food Chem.*, 38, 1, 185-190, 1990.
336. Wang, H., Murphy, P.A.: Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop year and location, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 1674-1677, 1994a.
337. Wang, H., Murphy, P.A.: Isoflavone content in commercial soybean foods, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 8, 1666-1673, 1994b.

338. Wang, H., Murphy, P.A.: Mass balance study of isoflavones during soybean processing, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 8, 2377-2383, 1996.
339. Warner, K., Frankel, E.N.: Effects of β -carotene on light stability of soybean oil, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 64, 213-218, 1987.
340. Wasserman, H.H., Murray, R.W.: *Singlet Oxygen*, Academic Press, Orlando, 1979.
341. Weenen, H., Porter, N.A.: Autoxidation of model membrane systems – co-oxidation of polyunsaturated lecithins with steroids, fatty acids and alpha-tocopherol, *J. Amer. Chem. Soc.*, 104, 19, 5216-5221, 1982.
342. Wefers, H., Sies, H.: Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen, *Eur. J. Biochem.*, 137, 29, 1983.
343. Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S., Wang, Y.: Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208, 124-130, 1995.
344. Wei, H., Wei, L., Frenkel, K., Bowen, R., Barnes, S.: Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation *in vitro* and *in vivo* by genistein, *Nutr. Cancer*, 20, 1-12, 1993.
345. Wheeler, E.L., Feerel, R.E.: A method for phytic acid determination in wheat and wheat fractions, *Cereal Chem.*, 48, 312-320, 1971.
346. Williams, C.A., Harborne, J.B.: Isoflavonoids, Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds.), *Methods of Plant Biochemistry*, Academic Press, London, pp. 421-449, 1989.
347. Willson, R.L.: Biochemical mechanisms of liver injury, Slater, T.F. (ed.), Academic Press, London, pp. 123-224, 1978.
348. Wilson, L.A., Murphy, P.A., Gallagher, P.: *Soyfood product market in Japan: U.S. export opportunities*, Food Science and Human Nutrition Department, Iowa State University, Ames, IA, 1992.
349. Wiseman, H.: Vitamin D is a membrane antioxidant – ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and temoxifen to anticancer action, *FEBS Lett.*, 326, 1-3, 285-288, 1993.
350. Wislocki, P.G., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H.: Reactions catalysed by the cytochrome P system, *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1980.
351. Woodall, A.A., Lee, S.W.-M., Weesie, R.J., Jackson, M.J., Britton, G.: Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity, *Biochim. Biophys. Acta*, 1336, 33-42, 1997.
352. Wu, K.J., Zhang, W.B., Addis, P.B., Epley, R.J., Salih, A.M., Lehrfeld, J.: Antioxidant properties on wild rice, *J. Agr. Food Chem.*, 41, 1, 34-37, 1994.
353. Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Ariga, T.: Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an $H_2O_2/NaOH/DMSO$ system, *J. Agr. Food Chem.*, 47, 7, 2544-2548, 1999.
354. Yamauchi, R., Miyake, N., Inoue, H., Kato, K.: Product formed by peroxy radical oxidation of β -carotene, *J. Agr. Food Chem.*, 41, 5, 708-713, 1993.
355. Yamauchi, R., Tsuchihashi, K., Kato, K.: Oxidation products of β -carotene during the peroxidation of methyl linoleate in the bulk phase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 62, 7, 1301-1306, 1998.
356. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M.: Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil, *Z. Lebensmittel-Untersuch Fors.*, 203, 220-223, 1996.
357. Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M.: Activity and mechanism of action of natural antioxidants in lipids, *Recent Res. Devel. Oil Chem.*, 2, 1-14, 1998.
358. Yen, G.-C., Duh, P.-D.: Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free-radical and active-oxygen species, *J. Agr. Food Chem.*, 42, 3, 629-632, 1994.

359. Yen, G.-C., Liu, M.-L.: Antioxidant effect of xylose-lysine Maillard reaction products and its fractionated products, *J. Chin. Agr. Chem. Soc.*, 35, 3, 273-287, 1997.
360. Yen, W.J., Chen, B.H.: Isolation of xanthophylls from Taiwanese orange peels and their effects on the oxidation stability of soybean oil, *Food Chem.*, 53, 4, 417-425, 1995.
361. Yi, M.-A., Kwon, T.-W., Kim, J.-S.: Changes in isoflavone contents during maturation of soybean seed, *J. Food Sci. Nutr.*, 2, 3, 255-258, 1997.
362. Yin, M.-C., Cheng, W.-S.: Oxymyoglobin and lipid oxidation in phosphatidylcholine liposomes retarded by α -tocopherol and β -carotene, *J. Food Sci.*, 62, 6, 1095-1097, 1997.
363. Yin, M.C., Faustman, C., Riesen, J.W., Williams, S.N.: α -Tocopherol and ascorbate delay oxymyoglobin and phospholipid oxidation *in vitro*, *J. Food Sci.*, 58, 6, 1273-1276, 1993.
364. Yoden, K., Iio, T.: Determination of thiobarbituric acid-reaction substances in oxidized lipids by high-performance liquid chromatography with a postcolumn reaction system, *Anal. Biochem.*, 182, 116, 1989.
365. Yokota, T., Hattori, T., Ohishi, H., Hasegawa, K., Watanabe, K.: The effect of antioxidant-containing fraction from fermented soybean food and atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits, *Food Sci. Technol.*, 29, 751-755, 1996.
366. Yoshida, H., Kajimoto, G., Emura, S.: Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 70, 10, 989-995, 1993.
367. Yoshimura, Y., Iijima, T., Waranabe, T., Nakazawa, H.: Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system, *J. Agr. Food Chem.*, 45, 10, 4106-4109, 1997.
368. Zhou, J.R., Erdmann, J.W.: Phytic acid in health and disease, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 35, 495-508, 1995.
369. Zuilichem, D.J., Van der Poel, A.F.B., Urbano-Cruz, E., Stolp, W., Wolters, I.: Thermomechanical treatment of soybeans, *Proceedings of the 2nd International Fullfat Soya Conference*, pp. 99-117, Budapest, 1996.

7.0.0. BIOGRAFIJA

Mr Marijana B. Sakač rođena je 07.03.1961. godine u Novom Sadu. Osnovnu i srednju školu završila je u Novom Sadu sa odličnim uspehom.

Studije hemije upisala je na Prirodno-matematičkom fakultetu, Institutu za hemiju, u Novom Sadu 1979. godine, gde je i diplomirala 1984. godine sa prosečnom ocenom položenih ispita 9.63. Diplomski rad "Dobivanje 3-metoksi-17-acetoksi-16,16-sekoestra-1,3,5/10/-trien-16-aminoacetata" odbranila je sa ocenom 10.

Poslediplomske studije upisala je na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, smer primenjena hemija, 1988. godine, završivši ih 1992. godine sa prosečnom ocenom 10. Magistarski rad pod nazivom "Uticaj polifenola na stabilnost slobodnih radikala Maillardovih reakcija" odbranila je 11.09.1992. godine.

Mr Marijana Sakač je zaposlena na Tehnološkom fakultetu u Novom Sadu, u Zavodu za tehnologiju stočne hrane, od 1988. godine, gde radi kao istraživač-saradnik i frukovodilac hemijske laboratorije.

Autor je 78 radova i saopštenja, kao i monografije "Tehnologija proizvodnje proteinsko-energetskih hraniva od sporednih proizvoda zaklane živine".

Član je Srpskog hemijskog društva i Jugoslovenskog društva za EPR spektroskopiju.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije:

TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:

TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:

VR

Doktorska disertacija

Autor:

AU

Mr Marijana B. Sakač

Mentor:

MN

Dr Sonja M. Đilas, redovni profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

Naslov rada:

NR

Antioksidanti u zrnu soje i njegovim proizvodima

Jezik publikacije:

JP

Srpski (latinica)

Jezik izvoda:

JI

s/en

Zemlja publikovanja:

ZP

SR Jugoslavija

Uže geografsko područje:

UG

Vojvodina

Godina:

GO

2000.

Izdavač:

IZ

Autorski reprint

Mesto i adresa:

MA

Novi Sad, Bulevar cara Lazara, 1

Fizički opis rada:

FO

Broj poglavlja: 7, Strana: 140, Lit. citata: 369, Tabela: 23, Slika: 79

Naučna oblast:

NO

Hemija

Naučna disciplina:

ND

Hemija hrane

Predmetna odrednica/

Ključne reči:

PO

zrno soje, punomasna hraniva od zrna soje, antioksidanti, oksidacija lipida, ESR spektroskopija

UDK:

Čuva se:

ČU

(633.34+664.641.2):577.15

Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara, 1

Važna napomena:

VN

Izvod/abstrakt: Ispitan je uticaj heksanskih, etanolnih i etil-acetanih ekstrakata zrna soje i punomasnih hraniva od zrna soje, ekstrudiranog sojinog griza i hidrotermički tretiranog zrna soje, na termičku i katalitičku oksidaciju metil-linoleata primenom ESR spektroskopije i "spin-traping" tehnike. Utvrđeno je da ispitivani ekstrakti inhibiraju termičku i katalitičku oksidaciju metil-linoleata različitim mehanizmima antioksidativnog delovanja. Ustanovljeni antioksidativni efekti dovedeni su u vezu sa vrstama i sadržajem liposolubilnih (α -tokoferol, β -karotin, ukupni ksantofili) i neliposolubilnih antioksidanata (izoflavoni i fitinska kiselina) soje, odnosno u vezu sa termičkim tretmanima primenjenim u proizvodnji ovih hraniva. Ispitani su i uticaji primene različitih rastvarača (etil-acetat, etanol, acetonitril) na antioksidativne efekte ekstrakata neliposolubilnih antioksidanata punomasnih hraniva od zrna soje tokom termičke i katalitičke oksidacije sojinog ulja primenom ESR.

IZ

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 04.06.1999.g.

DP

Datum odbrane:

DO

21. 7. 2000.

Članovi komisije:

(Naučni stepen/ime i prezime/zvanje/fakultet)

KO

Predsednik: Dr Stojan Savić, red. profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu

Član: Dr Sonja M. Đilas, red. profesor Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

- MENTOR

Član: Dr Jasna M. Čanadanović-Brunet, docent Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF TECHNOLOGY

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual material, printed

Contents code:

CC

PhD Thesis

Author:

AU

Marijana B. Sakač, MSc

Menthor:

MN

Prof. Sonja M. Đilas, PhD, Full Professor, Faculty of Technology, Novi Sad

Title:

TI

Antioxidants in soybean grain and soybean products

Language of text:

LT

Serbian

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication:

CP

Yugoslavia

Locality of publication:

LP

Vojvodina

Publication year:

PY

2000.

Publisher:

PU

Author's reprint

Publishing place:

PP

Novi Sad, Bulevar cara Lazara, 1

Physical description:

PD

Chapters: 7, Pages: 140, Literature: 369, Tables: 23, Pictures: 79

Scientific field:

SF

Chemistry

Scientific discipline:

SD

Food chemistry

Subject/

Key words:

SU

soybean grain, full-fat feeds of soybean grain, antioxidants, lipid peroxidation, ESR spectroscopy

UC:

(633.34+664.641.2):577.15

Holding data:

HD

Faculty of Technology (library), 21000 Novi Sad,
Bulevar cara Lazara, 1

Note:

N

Abstract:

The influence of hexane, ethanol and ethyl acetate extracts of soybean grain and full-fat feeds of soybean grain, fullfat extruded soybean grits and hydrothermal treated soybean grain on the thermal and catalytic oxidation of methyl linoleate has been studied by ESR spectroscopy and spin-trapping method. It has been found that the investigated extracts inhibit the thermal and catalytic oxidation of methyl linoleate through different mechanisms of antioxidation action. The antioxidative effects found were related to the kinds and contents of soybean liposoluble (α -tocopherol, β -carotene, total xanthophyls) and nonliposoluble antioxidants (isoflavones, phytic acid), that is, they were put in relation to thermal treatments used in production of these feeds. The effects of the application of different solvents on the antioxidative actions of the extracts of nonliposoluble antioxidants of full-fat soybean feeds during thermal and catalytic oxidation of soybean oil have been studied by ESR.

AB

Accepted by the Scientific Board on: 04.06.1999.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defend board:

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President:

Prof. Stojan Savić, PhD, Faculty of Agriculture, Novi Sad

Member:

Prof. Sonja M. Đilas, PhD, Faculty of Technology, Novi Sad - /

Member:

Assis. prof. Jasna M. Čanadanović-Brunet, PhD, Faculty of Technology, Novi Sad

