

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Sanja B. Đurović

**UTICAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA  
EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ I  
BIOLOŠKA SVOJSTVA POLIFENOLA I  
PROTEINA IZ SEMENA ŽUTE SOJE  
RAZLIČITOG POREKLA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACUTLY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Sanja B. Đurović

**THE INFLUENCE OF DIFFERENT  
EXTRACTION PROCEDURES ON THE  
CONTENT AND BIOLOGICAL  
PROPERTIES OF POLYPHENOLS AND  
PROTEINS IN YELLOW SOYBEAN  
SEEDS OF DIFFERENT ORIGIN**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2019.

**MENTORI:**

---

**Dr Zorica Knežević-Jugović**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

**Dr Bogdan Nikolić**, viši naučni saradnik  
Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu

**ČLANOVI KOMISIJE:**

---

**Dr Dušan Mijin**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

---

**Dr Dejan Bezbradica**, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

**DATUM ODBRANE:** \_\_\_\_\_

*Ova doktorska disertacija urađena je u okviru istraživanja predloženih u projektima tehnološkog razvoja ( TR31018) „Razrada integrisanog upravljanja i primene savremenih principa suzbijanja štetnih organizama u zaštiti bilja“ i (TR 31037) „Integralni sistemi gajenja ratarskih useva: očuvanje biodiverziteta i plodnosti zemljišta“, pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2019. godine.*

*Ekperimentalni deo rada ove doktorske disertacije izveden je u Odseku za fitofarmaciju Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, a deo eksperimenata urađen je na Katedri za Biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju i Katedri za Organsku hemiju Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu.*

## **Zahvalnica**

*Koristim ovu priliku da se zahvalim svima koji su dali doprinos izradi moje doktorske disertacije.*

*Na prvom mestu veliku zahvalnost dugujem svojim mentorima prof. dr Zorici Knežević-Jugović i dr Bogdanu Nikoliću.*

*Prof. dr Zorici Knežević-Jugović hvala na poverenju koje mi je ukazala, stručnoj pomoći i strpljenju tokom izrade ove disertacije. Svojim ogromnim znanjem i iskustvom, dragocenim savetima i sugestijama usmeravala me je u svim fazama rada.*

*Dr Bogdanu Nikoliću želim da izrazim zahvalnost na nesebičnom angažovanju u svim fazama rada, na stručnom usmeravanju, stalnoj pomoći i toploj podršci, kao i na višegodišnjoj saradnji. Podrška i saveti tokom koncipiranja, realizacije oglada i pisanja rada za mene su bili od neprocenjive vrednosti.*

*Prof. Dr Dušanu Mijinu se iskreno zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu i mnogobrojnim stručnim i dragocenim savetima i sugestijama prilikom pisanja teze.*

*Iskreno se zahvaljujem prof. dr Dejanu Bezbradici na pruženoj pomoći, mnogim rešenim nedoumicama i na saradnji koja traje još od izrade diplomskog rada.*

*Želim da se zahvalim dr Nataši Šekuljici, dr Jeleni Jovanović i dr Andrei Stefanović na pomoći u toku eksperimentalnog rada.*

*Dr Neveni Luković hvala na pomoći u toku eksperimentalnog rada, a pre svega na svakodnevnoj podršci i prijateljstvu.*

*Svim kolegama sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu, koji su na bilo koji način doprineli izradi ove disertacije, se takođe zahvaljujem, a posebnu zahvalnost dugujem kolegama iz Odseka za fitofarmaciju i zaštitu životne sredine na svakodnevnoj podršci, motivisanju i dugogodišnjoj saradnji.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj porodici, mami Mirjani, sestri Tatjani, suprugu Marku, ćerki Nađi i sinu Vuku na strpljenju, podršci i ljubavi koju mi pružaju i njima posvećujem ovaj rad.*

*Autor*

## **Uticaj različitih postupaka ekstrakcije na sadržaj i biološka svojstva polifenola i proteina iz semena žute soje različitog porekla**

### **Rezime**

Predmet naučnog istraživanja doktorske disertacije je razvoj i optimizacija postupka ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja, polifenolnih kiselina i proteina iz semena žute soje primenom tehnologije ultrazvuka visoke frekvencije i mikrotalasnog zračenja.

Značaj soje proizilazi iz izuzetno povoljnog hemijskog sastava njenog zrna. Iako je primarna uloga soje kod nas, a naročito u svetu vezana za proizvodnju ulja, soja je veoma bogata polifenolnim jedinjenjima koja predstavljaju jednu od najvećih, najrasprostranjenijih i najznačajnijih grupa sekundarnih prirodnih metabolita biljaka. Fenolna jedinjenja su poznata kao antioksidansi, i kao takvi imaju sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, grupe jedinjenja sa veoma štetnim dejstvom po sve žive organizme. Slobodni radikali su veoma reaktivni i imaju sposobnost oksidacije biomolekula, što dovodi do povratnih i nepovratnih oštećenja ćelija i patoloških promena na tkivima. Prisustvo antioksidanasa u hrani i suplementima pomaže organizmu da smanji oksidativni stres. Antioksidansi različitim mehanizmima delovanja sprečavaju stvaranje slobodnih radikala, blokiraju razgradnju peroksida i hidroperoksida (kao produkata dejstva primarnih slobodnih radikala) ili vrše vezivanje metala (kao inicijatora stvaranja slobodnih radikala) u helatne komplekse. Polifenolnim jedinjenjima se, pored antioksidativnog, pripisuje antiinflamatorno, antibakterijsko, antifungalno i antitumorsko dejstvo, tako da imaju veliki značaj, kako u ishrani, tako i u medicini, ulazeći u sastav nekih lekova.

Rezultati mnogobrojnih istraživanja ukazuju na to da sadržaj polifenola treba posmatrati kao važno i specifično nutritivno i tehnološko svojstvo sojinog zrna i kao potencijalno merilo antioksidativne aktivnosti. Seme soje sadrži visoke koncentracije fenolnih kiselina i flavonoida, među njima najviše izoflavona. Fenolne kiseline, lignin i izoflavoni detektovani u soji imaju višestrukou korist za zdravlje ljudi, životinja i biljaka. Izoflavoni i fenoli soje imaju ulogu antioksidanasa u borbi protiv srčanih oboljenja i nekih vrsta kancera koji su u vezi sa nivoom hormona, kao što su rak dojke, prostate, debelog creva.

U prvom delu istraživanja izvršen je izbor optimalnog ekstrakcionog sredstva za što potpunije izolovanje polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje, kao i optimizacija HPLC metode za detekciju polifenolnih kiselina variranjem sastava mobilne faze i gradijenta eluiranja. Soja, kao i srodne mahunarke ima visok sadržaj vezanih polifenolnih jedinjenja (koja su kovalentnim vezama povezana sa drugim komponentama ćelijskog zida: celuloza, hemiceluloza i lignin), tako da nije dovoljna samo ekstrakcija rastvaračima za njihovo efikasno izdvajanje, već je neophodna prethodna hidroliza u cilju raskidanja veza između polifenolnih jedinjenja i drugih komponenti ćelijskog zida. U tu svrhu, u narednom koraku istraživanja pristupilo se optimizaciji metode hidrolize ispitivanih uzoraka bazom, kiselinom, kao i pretretmana ekstrakata ultrazvukom visoke frekvencije i mikrotalasnim zračenjem neposredno pre postupka hidrolize.

Primena ultrazvuka visoke frekvencije je veoma zastupljena u prehrambenoj industriji, koristi se i u procesima sterilizacije, ekstrakcije, sušenja i emulzifikacije prehrambenih proizvoda. Osnovni parametri koji utiču na efikasnost ekstrakcije ultrazvukom su jačina ultrazvučnih talasa, dužina ultrazvučnog tretmana i uslovi sredine u kojoj se izvodi reakcija (temperatura, pritisak, pH vrednost rastvora). U ovoj disertaciji, optimizacija parametara izvršena je variranjem jačine ultrazvuka i vremena sonikacije.

Mikrotalasno zračenje uzoraka omogućava zagrevanje smeše rastvarača direktnom interakcijom sa slobodnim molekulima prisutnim u sistemu, što dovodi do ubranog razaranja biljnog tkiva i oslobađanja ćelijskih komponenti u rastvarač. Ovaj postupak obično povećava prinos bioaktivnih jedinjenja i smanjuje troškove ekstrakcije zbog skraćivanja vremena tretmana i smanjene količine rastvarača. Dodatna prednost tehnike je ta što kombinuje visoku temperaturu i pritisak za optimalno oslobađanje bioaktivnih supstanci uz istovremeno razaranje ćelijskog zida. U cilju optimizacije mikrotalasnog pretretmana uzoraka izvršeno je variranje snage mikrotalasa, temperature i vremena trajanja pretretmana.

Dobijeni rezultati ukazuju na pozitivan efekat ultrazvuka visoke frekvencije i mikrotalasa na stepen ekstrakcije polifenolnih jedinjenja i na povećanje antioksidativne aktivnosti tako dobijenih ekstrakata.

Druga bitna komponenta sojinog zrna su proteini, čiji sadržaj se kreće, u zavisnosti od genotipa, uslova gajenja i drugih faktora od 36 do 40% u sirovom zrnu. Proteini soje

sadrže sve esencijalne aminokiseline u dovoljnoj količini, tako da prerađevine od soje predstavljaju kvalitetnu hranu za ljude i domaće životinje. Sojini proteini se koriste u ishrani kao nutritivni dodaci koji zamenjuju proteine poreklom iz životinjskih proizvoda kao što su mleko, meso i jaja. Glavna prednost proteina soje u poređenju sa proteinima iz drugih biljnih izvora je uravnotežen sastav aminokiselina. Takođe, proteini soje pomažu u borbi protiv infekcija, jer jačaju imunološki sistem i neophodni su za održavanje funkcija organizma, kao što su varenje, metabolizam i cirkulacija. Aminokiseline iz soje, takođe učestvuju u proizvodnji insulina u organizmu, što je značajno za dijabetičare. Proteini soje u raznim oblicima poseduju korisna funkcionalna i tehnološka svojstva: rastvorljivost, stabilnost koloida, formiranje gela, emulgujuća svojstva, penjenje i sposobnost adhezije/kohezije, koje ih čine veoma korisnim u prehrambenoj industriji. U mnogim slučajevima, primena sojinih proteina je ograničena zbog nekompatibilnosti između njihove rastvorljivosti i drugih funkcionalnih i tehnoloških svojstava. Da bi se dostigla željena tehnološka svojstva, proteini se podvrgavaju raznim fizičkim, hemijskim i enzimskim modifikacijama. Primenjeni postupci uzrokuju fizičke i hemijske promene, a time i različite funkcionalne i tehnološke karakteristike proteinskih proizvoda od soje. Iz tog razloga se sve više teži razvoju novih tehnoloških postupaka izolovanja proteina koji će zadovoljiti dva osnovna kriterijuma: visok prinos i očuvanje tehnološko-funkcionalnih svojstava koje poseduju proteini soje.

U narednoj fazi istraživanja ispitivan je uticaj pretretmana ultrazvukom visoke frekvencije i mikrotalasnim zračenjem na efikasnost ekstrakcije proteina iz semena soje i na njihova funkcionalna i tehnološka svojstva: rastvorljivost, emulgujući kapacitet i stabilnost emulzije.

Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju na pozitivan efekat pretretmana ultrazvukom visoke frekvencije i mikrotalasnim zračenjem, kako na ekstrakciju proteina iz obezmašćenog brašna soje, tako i na funkcionalna i tehnološka svojstva dobijenih izolata.

Poslednji deo istraživanja bio je posvećen analizi semena soje, dobijenih od biljaka soje tretiranih različitim folijarnim đubrivima na bazi biljnih ekstrakata tokom procesa gajenja useva soje. Ispitivan je sadržaj ukupnih fenola, pojedinačnih polifenolnih kiselina, antioksidativna aktivnost, kao i sadržaj ulja i nativnih proteina u brašnu soje



prema ranije optimizovanim metodama. Pošto se đubriva na bazi biljnih ekstrakata koriste i u organskoj proizvodnji, to je veoma značajan doprinos njihovog korišćenja i u očuvanju životne sredine. S druge strane, moguće je na osnovu analiziranih parametara tehnološkog kvaliteta sojinog zrna dati predlog ciljane biofortifikacije soje folijarnom fertilizacijom u zavisnosti od njene dalje namene. Ciljanom biofortifikacijom određenim đubrivima može se uticati na promenu sadržaja i akumuliranje različitih grupa bioaktivnih jedinjenja u semenu soje i tako dobijati sirov proizvod sa povećanom koncentracijom polifenolnih kiselina i uvećanom antioksidativnom aktivnošću (pre svega zbog primene u ljudskoj ishrani) ili povećanom koncentracijom proteina (zbog upotrebe kao stočne hrane) ili kao polazna sirovina za dobijanje različitih proteinskih formi soje, potrebnih za dalju industrijsku preradu.

Rezultati dobijeni tokom izrade ove disertacije utvrđuju postojanje sinergijskog efekta pretretmana ultrazvukom visoke frekvencije i mikrotalasnim zračenjem i naknadne bazne i kiselinske hidrolize na efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje i na povećanje antioksidativne vrednosti ekstrakata. Pozitivan uticaj pretretmana ultrazvukom i mikrotalasima pojavljuje se i prilikom ekstrakcije proteina iz obezmašćenog sojinog brašna i utiče na poboljšanje funkcionalnih svojstava proteinskih izolata. Ostvareni rezultati mogu poslužiti kao osnova za uvođenje novih tehnoloških postupaka za obradu prirodnih proteina sa svrhom poboljšanja njihovih funkcionalnih, nutritivnih i organoleptičkih svojstava u cilju razvoja novih prehrambenih proizvoda. Rezultati imaju i praktičan značaj jer mogu poslužiti kao osnova za proizvodnju soje poboljšanih nutritivnih karakteristika i kontrolisanu proizvodnju soje bogatije različitim klasama bioaktivnih jedinjenja u zavisnosti od njene dalje prerade.

**Ključne reči:** polifenolne kiseline, antioksidativna aktivnost, proteini soje, ultrazvučni pretretman, pretretman mikrotalasima, bazna i kiselinska hidroliza, tehnološko-funkcionalna svojstva.

**Naučna oblast:** Hemija i hemijska tehnologija

**Uža naučna oblast:** Hemijska tehnologija

**UDK broj:**

## **The influence of different extraction procedures on the content and biological properties of polyphenols and proteins in yellow soybean seeds of different origin**

### **Summary**

The scope of this academic doctoral research is the development and optimization of the process of extraction of bioactive compounds, polyphenolic acids and proteins from yellow soybean seed using high-intensity ultrasound technology and microwave technology.

The importance of soybean is derived from the extremely favorable chemical composition of its grain. Although the primary role of soybean in our country, and especially in the world is related to the production of oil, it is very rich in phenolic compounds, which are one of the largest, most widespread and most important groups of secondary natural plant metabolites. Phenolic compounds are known as antioxidants, and as such have the ability to neutralize free radicals, a group of compounds with a very harmful effect on all living organisms. Free radicals are highly reactive and have the ability to oxidize biomolecules, which leads to reversible and irreversible damage of the cells and pathological changes in the tissues. The presence of antioxidants in food and supplements helps the body to reduce oxidative stress. Antioxidants with various mechanisms prevent the formation of free radicals, block the degradation of peroxides and hydroperoxides (as products of the action of primary free radicals) or make metal binding (as the initiator of free radicals production) into chelate complexes. In addition to antioxidant properties, anti-inflammatory, antibacterial, antifungal and antitumor effects are also attributed to polyphenolic compounds, so they also have significant importance both in nutrition and in medicine, as components of some drugs.

Results of numerous studies indicate that polyphenol content should be considered as an important and specific nutritional and technological feature of soybeans and as a potential measure of antioxidant activity. Soybean seed contains high concentrations of phenolic acids and flavonoids, among them the most isoflavones. Phenolic acids, lignin and isoflavones detected in soybean have multiple benefits for human, animal and plant health. Isoflavones and soybean phenols act as antioxidants against heart disease and some types of cancer related to the level of hormones, such as breast, prostate and colon cancer.

In the first part of this research, an optimal extraction solvent was selected for more complete isolation of polyphenolic acids from defatted soybean flour, as well as the optimization of the HPLC method for the detection of polyphenolic acids by varying the composition of the mobile phase and the elution gradient. Soybean, as well as related legumes, have high content of bound polyphenol compounds (which are covalently bound to other cell wall components: cellulose, hemicellulose and lignin). Because of that, solvent extraction is not sufficient for their effective release, but previous hydrolysis is necessary in order to break bounds between polyphenol compounds and other cell wall components. For this purpose, in the next step of the research, optimization of alkaline and acid hydrolysis of the samples, as well as the pretreatment of extracts by high-intensity ultrasound and microwave radiation prior to the hydrolysis were initiated.

The use of high-intensity ultrasound is very common in the food industry, it is used in the processes of sterilization, extraction, drying and emulsification of food products. Key parameters that influence the efficiency of ultrasound extraction are the intensity of ultrasonic waves, sonication time and environment conditions (temperature, pressure, pH value of the solution). In this research, the optimization was performed by varying ultrasound intensity and sonication time.

Microwave radiation of samples allows the solvent mixture to be heated by direct interaction with free molecules present in the system, which results in accelerated destruction of plant tissue and release of cell components into the solvent. This process usually increases the yield of bioactive compounds and reduces extraction costs due to shortening of treatment time and reduced use of solvents. An additional advantage of this technique is that it combines high temperature and pressure for the optimum release of bioactive substances while simultaneously destroying a cell wall. In order to optimize microwave pretreatment of samples, variation in microwave power, temperature and radiation time was performed.

Obtained results indicate the positive effect of high-intensity ultrasound and microwave radiation on the degree of extraction of polyphenolic compounds and an increase of antioxidant activity of extracts.

Another important component of soybean grains are proteins, the content of which varies from 36 to 40% in the raw grain, depending on genotype, growth conditions and

other factors. Soy proteins contain all essential amino acids in sufficient quantity so that processed soybeans provide quality food for people and domestic animals. Soybean proteins are used as nutritional supplements that replace proteins originating from animal products such as milk, meat and eggs. The main advantage of soybean protein in comparison with proteins from other plant sources is a balanced amino acid composition. Also, soybean proteins help fight infection, because they strengthen the immune system and are necessary for maintaining the functions of the organism, such as digestion, metabolism and circulation. Soybean amino acids also participate in the production of insulin in the body, which is significant for diabetics. Soybean proteins in various forms have useful functional and technological properties: solubility, colloid stability, gel formation, emulsifying properties, foaming and adhesion/cohesion ability, making them very useful in the food industry. In many cases, the use of soy protein is limited due to the incompatibility between their solubility and other functional and technological properties. In order to achieve the desired technological properties, proteins are subjected to various physical, chemical and enzymatic modifications. Applied procedures cause physical and chemical changes, and thus different functional and technological characteristics of soybean protein products. For this reason, there is an increasing tendency to develop new technological procedures for protein isolation that will satisfy two basic criteria: high yield and preservation of technological and functional properties that possess soybean proteins.

In the next phase of the study, the influence of high-intensity ultrasound and microwave radiation on the extraction efficiency of soybean protein was investigated. Also, functional and technological properties such as solubility, emulsifying capacity and stability of emulsion were analyzed.

Obtained results indicate a positive effect of high-intensity ultrasound and microwave radiation, both on the extraction of proteins from defatted soybean flour, as well as on functional and technological properties of the isolates.

The final part of the research was dedicated to the analysis of soybean seeds obtained from soybean plants treated with various foliar fertilizers based on plant extracts during the vegetation stage. Total phenolic content, individual polyphenolic acids, antioxidant activity, as well as the content of oil and raw proteins in soybean grain was examined, according to previously optimized methods. Since fertilizers based on plant extracts are

used in organic production, the contribution of their use in environmental protection is very significant. On the other hand, on the basis of analyzed parameters of technological quality of soybean seeds, it is possible to propose targeted biofortification of soybean by foliar fertilization, depending on its further use. Targeted biofortification of certain fertilizers can affect the change in the content and accumulation of different groups of bioactive compounds in soybean seeds, thus obtaining a raw product with increased concentration of polyphenolic acids and increased antioxidant activity (primarily because of human nutrition), or increased protein concentration (due to use as fodder), or as a feedstock for obtaining the various protein soybean formulations needed for further industrial processing.

Results obtained in this research determine the existence of a synergistic effect of high-intensity ultrasound and microwave radiation and subsequent alkaline and acid hydrolysis on the efficiency of extraction of polyphenolic acids from defatted soybean flour and on the increase in the antioxidant activity of the extracts. The positive effect of high-intensity ultrasound and microwave pretreatment also occurs during protein extraction from defatted soybean flour and influences the improvement of the functional properties of protein isolates. Achieved results can contribute to the implementation of new technological processes for the processing of natural proteins in order to improve their functional, nutritional and organoleptic properties in order to develop new food products. Results also have practical significance as they can serve as the basis for the production of soybeans of improved nutritive characteristics and controlled production of soybeans rich in different classes of bioactive compounds, depending on its further processing.

**Key words:** polyphenolic acid, antioxidant activity, proteins, ultrasound pretreatment, microwave pretreatment, alkaline and acid hydrolysis, technological-functional properties.

**Scientific field:** Chemistry and Chemical Technology

**Scientific subfield:** Chemical Technology

**UDK number:**

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DEO</b>	<b>5</b>
<b>2.1. HEMIJSKI SASTAV SEMENA SOJE</b>	<b>6</b>
<b>2.2. POLIFENOLI, OSNOVNE KARAKTERISTIKE</b>	<b>7</b>
2.2.1. Flavonoidi	9
2.2.2. Antocijani	11
2.2.3. Taninske materije	11
2.2.4. Halkoni i kumarini	11
2.2.5. Lignani	12
2.2.6. Stilbeni	12
2.2.7. Fenolne kiseline	13
2.2.7.1. Hidroksibenzojeve kiseline	13
2.2.7.2. Hidroksicimetne kiseline	14
2.2.8. Sinteza polifenola u biljkama	17
2.2.9. Uloga fenolnih jedinjenja u biljkama	20
2.2.10. Fenoli kao antioksidansi	20
2.2.11. Slobodni radikali i oksidativni stres	22
2.2.12. Najzastupljeniji polifenoli u semenu soje	23
<b>2.3. PROTEINI - OSNOVNE KARAKTERISTIKE</b>	<b>27</b>
2.3.1. Najzastupljeniji proteini u semenu soje	33
2.3.2. Strukturna svojstva proteina soje	33
2.3.3. Forme proteinskih frakcija proteina soje	34
2.3.4. Funkcionalna svojstva proteina soje	35
<b>2.4. EFEKAT SOJE NA ZDRAVLJE LJUDI</b>	<b>37</b>
<b>2.5. METODE IZOLOVANJA POLIFENOLA I PROTEINA</b>	<b>38</b>
2.5.1. Ekstrakcija polifenola	38
2.5.2. Hidroliza	39
2.5.3. Ekstrakcija proteina	41
2.5.4. Primena novih tehnika u cilju poboljšanja ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala	41
<b>2.6. METODE DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE POLIFENOLA I PROTEINA</b>	<b>46</b>
2.6.1. Ukupni fenoli	46
2.6.2. Antioksidativna aktivnost	47
2.6.3. Hromatografske tehnike za kvantifikaciju polifenola	48
2.6.4. Metode kvantifikacije proteina	51
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEO</b>	<b>52</b>
<b>3.1. MATERIJALI</b>	<b>53</b>
3.1.1. Biljni materijal	53
3.1.1.1. Primenjena folijarna đubriva	53
3.1.2. Hemikalije	54
3.1.3. Aparatura	56

<b>3.2. METODE</b>	<b>57</b>
3.2.1. Obezmašćivanje sojinog brašna	57
3.2.2. Određivanje sadržaja ulja	58
3.2.3. Određivanje sadržaja vlage	58
3.2.4. Izbor adekvatnog rastvarača za ekstrakciju polifenola	58
3.2.5. Potreba za dvostepenom ekstrakcijom	59
3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	59
<b>3.3. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA DETEKCIJU POLIFENOLNIH KISELINA</b>	<b>60</b>
<b>3.4. OPTIMIZACIJA POSTUPKA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA IZ OBEZMAŠĆENOG BRAŠNA SOJE SORTE LAURA</b>	<b>61</b>
3.4.1. Metoda 1: Direktna bazna hidroliza	61
3.4.2. Metoda 2: Direktna kiselinska hidroliza	62
3.4.3. Metoda 3: Ekstrakcija slobodnih polifenolnih kiselina praćena baznom i kiselinskom hidrolizom	62
<b>3.5. PRETRETMAN ULTRAZVUČNOM SONDOM U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLA</b>	<b>63</b>
3.5.1. Metoda 4: Ekstrakcija ultrazvučnom sondom praćena baznom i kiselinskom hidrolizom	64
<b>3.6. PRETRETMAN MIKROTALASIMA U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA</b>	<b>64</b>
3.6.1. Variranje temperature u različitim vremenskim intervalima	65
3.6.2. Variranje snage mikrotalasa	65
3.6.3. Metoda 5: Ekstrakcija mikrotalasila praćen baznom i kiselinskom hidrolizom	65
<b>3.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA DOBIJENIH EKSTRAKATA</b>	<b>66</b>
3.7.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom	66
3.7.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom	68
3.7.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti Brigs-Raušerovom (Briggs-Rauscher) oscilatornom metodom	69
<b>3.8. METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA</b>	<b>70</b>
3.8.1. Kjeldalova metoda za određivanje sadržaja proteina	70
3.8.2. Postupak ekstrakcije proteina iz brašna soje	73
3.8.3. Lorijeva metoda za određivanje sadržaja rastvornih proteina	73
<b>3.9. UTICAJ PRETRETMANA ULTRAZVUKOM NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA</b>	<b>75</b>
3.9.1. Variranje jačine ultrazvuka	76
3.9.2. Variranje vremena sonikacije	76
<b>3.10. UTICAJ PRETRETMANA MIKROTALASIMA NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA</b>	<b>77</b>
3.10.1. Variranje temperature	77
3.10.2. Variranje snage mikrotalasa	77

<b>3.11. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA PROTEINA RAZLIČITO PRETRETIRANIH UZORAKA</b>	<b>77</b>
3.11.1. Određivanje rastvorljivosti	78
3.11.2. Određivanje emulgujućih svojstava	78
<b>3.12. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH REZULTATA</b>	<b>79</b>
<b>4. REZULTATI I DISKUSIJA</b>	<b>81</b>
<b>4.1. IZBOR ADEKVATNOG EKSTRAKCIONOG SREDSTVA I ISPITIVANJE POTREBE ZA DVOSTEPENOM EKSTRAKCIJOM</b>	<b>82</b>
<b>4.2. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA DETEKCIJU POLIFENOLNIH KISELINA</b>	<b>85</b>
4.2.1. Mobilna faza 1	85
4.2.2. Mobilna faza 2	87
4.2.3. Mobilna faza 3	88
<b>4.3. OPTIMIZACIJA POSTUPKA EKSTRAKCIJE</b>	<b>91</b>
<b>4.4. PRETRETMAN ULTRAZVUČNOM SONDOM U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLA</b>	<b>93</b>
<b>4.5. EKSTRAKCIJA ULTRAZVUČNOM SONDOM PRAĆENA BAZNOM I KISELINSKOM HIDROLIZOM</b>	<b>94</b>
<b>4.6. PRETRETMAN MIKROTALASIMA U CILJU POVEĆANJA EFICASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA</b>	<b>95</b>
4.6.1. Variranje temperature u različitim vremenskim intervalima	95
4.6.2. Variranje snage mikrotalasa	97
<b>4.7. EKSTRAKCIJA MIKROTALASIMA PRAĆENA BAZNOM I KISELINSKOM HIDROLIZOM</b>	<b>98</b>
<b>4.8. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI RAZLIČITO PRETRETIRANIH UZORAKA OBEZMAŠĆENOG SOJINOG BRAŠNA</b>	<b>101</b>
<b>4.9. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA U SOJINOM BRAŠNU</b>	<b>105</b>
<b>4.10. UTICAJ PRETRETMANA ULTRAZVUKOM NA EFICASNOST EKSTRAKCIJE I TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA</b>	<b>108</b>
4.10.1. Variranje jačine (amplitude) ultrazvučne sonde	108
4.10.1.1. Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na rastvorljivost proteina	109
4.10.1.2. Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na emulgujuća svojstva	111
4.10.2. Variranje vremena sonikacije pri konstantnoj amplitudi	112
4.10.2.1. Uticaj vremena sonikacije na rastvorljivost proteina	113
4.10.2.2. Uticaj vremena sonikacije na emulgujuća svojstva	114
<b>4.11. UTICAJ PRETRETMANA MIKROTALASIMA NA EFICASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA</b>	<b>116</b>
4.11.1. Uticaj temperature na efikasnost ekstrakcije proteina	116
4.11.1.1. Uticaj temperature na rastvorljivost proteina	117



4.11.1.2. Uticaj temperature na emulgujuća svojstva proteina _____	119
<b>4.11.2. Uticaj snage mikrotalasa na efikasnost ekstrakcije proteina _____</b>	<b>119</b>
4.11.2.1. Uticaj snage mikrotalasa na rastvorljivost proteina _____	120
4.11.2.2. Uticaj snage mikrotalasa na emulgujuća svojstva proteina _____	121
<b>4.12. PROMENA SADRŽAJA RAZLIČITIH BIOAKTIVNIH JEDINJENJA U SEMENU ŽUTE SOJE (cv. LAURA) USLED TRETMANA FOLIJARNIM ĐUBRIVIMA NA BAZI BILJNIH EKSTRAKATA _____</b>	<b>122</b>
4.12.1. Kvantifikacija slobodnih, esterifikovanih i vezanih polifenolnih kiselina _____	123
4.12.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti pripremljenih ekstrakata _____	128
4.12.3. Promena sadržaja nativnih proteina i ulja _____	132
<b>5. ZAKLJUČAK _____</b>	<b>133</b>
<b>6. LITERATURA _____</b>	<b>137</b>
<b>7. PRILOZI _____</b>	<b>158</b>

## 1. UVOD

Soja (*Glycine max* (L) Merrill) je jednogodišnja biljka iz porodice Leguminosae sa mahunama u kojima se nalazi 2 do 5 zrna, žute, žuto-zelene ili smeđe boje. Oblik, veličina i boja semena zavise od sorte i načina uzgoja.

Tačan podatak o poreklu kulturnih formi soje nije poznat, ali iz publikacije u publikaciju se prenosi da soja svoje originalno poreklo „vuče“ iz istočne Azije i to iz severnih i centralnih provincija Kine [1]. Opisana je još u rukopisima kineskog cara Šen-Nunga (Sheng-Nung) 2838. g. pr.n.e., a kasniji izveštaji govore da je soja bila jedna od najvažnijih kulturnih leguminoza i jedna od pet „Wu Ku“ ili pet svetih zrna (pirinač, soja, pšenica, ječam i proso). Iako se u Kini i Mandžuriji, osim za ishranu, koristila i za lekove, širenje soje po svetu je bilo veoma sporo. 1712. godina je važna, jer tada počinje ekstrakcija ulja od soje i to je početak razvoja svetske trgovine sojom. Iako je u Evropu prenesena još 1692, u bivši SSSR 1878, a u SAD 1804. značajnije gajenje soje počinje od 1933. godine i to prvo kao krmna kultura, a poslednjih 80 godina, razvojem industrije, i kao sirovina za ljudsku ishranu.

Koliko je važna uloga soje govori i činjenica da se od manje važne kulture u poslednjih nekoliko decenija „popela“ do kulture broj jedan u svetu po proizvodnji ulja. Vrednost soje poznata je i našim poljoprivrednim stručnjacima, koji već pedeset godina nastoje proširiti njenu proizvodnju nazivajući je kulturom budućnosti [2].



**Slika 1.1.** Soja: zrele mahune soje pred berbu (levo); semena soje različite boje zrna (desno)

Značaj soje proizilazi iz izuzetno povoljnog hemijskog sastava zrna. Sadržaj proteina u sirovom zrnu kreće se od 36 do 40%, a sadržaj ulja od 15 do 23%, što čini soju ne samo izuzetno korisnom, već i veoma ekonomičnom biljnom vrstom. U našoj zemlji soja se prvenstveno koristi u industriji stočne hrane, gde se postupkom prerade dobija sojina sačma, kvalitetno, visokoproteinsko stočno hranivo. U ishrani ljudi soja se kod nas još uvek ne koristi dovoljno, uglavnom zbog toga što je prilikom uvođenja u proizvodnju i ishranu reklamirana kao zamena za meso, što je potpuno pogrešno. U svetu, naročito u zemljama Azije soja se u ljudskoj ishrani koristi u različitim oblicima, kao sojine klice, sojino mleko i ulje, tofu i fermentisani proizvodi, kao što su miso i sufu.

Zrno soje ima visoku nutritivnu vrednost i svoje važno mesto u pravilnoj ishrani. Sadrži visoke koncentracije fenolnih jedinjenja [3], fenolnih kiselina i flavonoida, među njima najviše izoflavona. Najznačajniji izoflavoni u soji su daidzein, genistein i glicitein, a najzastupljenije fenolne kiseline identifikovane u sojinom brašnu su ferulna, siringinska, *o*-kumarna, *p*-kumarna i vanilinska [4-7]. Njihov sastav i sadržaj varira u zavisnosti od različitih faktora kao što su sorta, godina berbe, geografski i uslovi životne sredine, zrelost semena, boje omotača zrna itd [7-10]. Fenolna jedinjenja su poznata kao antioksidansi, i kao takvi imaju sposobnost neutralisanja slobodnih radikala, grupe jedinjenja sa veoma štetnim dejstvom po sve žive organizme. Prisustvo antioksidanasa u hrani i suplementima pomaže organizmu da smanji oksidativni stres. Prvi korak u primeni biljnih polifenola kao suplemenata u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji jeste njihova ekstrakcija iz biljnog materijala. Ekstrakcija polifenolnih jedinjenja iz soje i srodnih mahunarki u velikoj meri otežana je prisustvom velike količine proteina u zrnu, ali i time što mahunarke imaju samo 15-20% fenolnih jedinjenja u slobodnom, rastvorljivom obliku, a ostatak je vezan etarskim ili estarskim vezama sa ćelijskim komponentama [11-13]. Iz tog razloga, često joj prethodi postupak hidrolize, koji ima za cilj raskidanje kovalentnih veza i razaranje ćelijskih zidova, ali sve je češća i primena novih tehnoloških postupaka za preradu biljnog materijala, kao ekološke alternative („eco-friendly“) za dobijanje i prečišćavanje bioaktivnih jedinjenja. Neki od njih su daleko infracrveno zračenje, impulsno električno polje, ekstrakcija subkritičnom vodom, ekstrakcija superkritičnim fluidima, ekstrakcija ultrazvukom visoke frekvencije, ekstrakcija mikrotalasima. Svi oni imaju za cilj povećanje efikasnosti ekstrakcije koje se ogleda u skraćivanju vremena ekstrakcije, smanjenoj upotrebi organskih rastvarača,

čime sa pozitivno utiče na očuvanje životne sredine i dobijaju se čistiji proizvodi koji se mogu dalje koristiti u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji.

Pored polifenolnih jedinjenja, soja je, pre svega veoma važan izvor proteina koji imaju niz prednosti u odnosu na proteine životinjskog porekla. Najpre, proteini soje su bogati esencijalnim aminokiselinama, kojih nema u belančevinama životinjskog porekla. Zatim, soja sadrži vitamine B kompleksa,  $\beta$ -karoten, bogata je mineralima, najviše kalcijumom, gvožđem i kalijumom. Zbog toga se u razvijenim zemljama povećava upotreba proteinskih proizvoda od soje u ljudskoj hrani, kako direktno kod individualnih proizvođača, tako i indirektno putem upotrebe industrijskih proizvoda. U mnogim slučajevima, primena sojinih proteina je limitirana zbog nekompatibilnosti između njihove rastvorljivosti i drugih funkcionalnih svojstava. Da bi se dostigle željene vrednosti funkcionalnih svojstava (npr. sposobnost geliranja, emulgovanja, penjenja i dr.), proteini se podvrgavaju raznim fizičkim, hemijskim i enzimskim modifikacijama. Primenjeni postupci uzrokuju fizičke i hemijske promene, a time i različite funkcionalne karakteristike proteinskih proizvoda od soje. Iz tog razloga se sve više teži razvoju novih tehnoloških postupaka izolovanja proteina koji će zadovoljiti dva osnovna kriterijuma: visok prinos i očuvanje tehnološko-funkcionalnih svojstava koje poseduju proteini soje.

Primena ultrazvuka visoke frekvencije je veoma zastupljena u prehrambenoj industriji, koristi se i u procesima sterilizacije, ekstrakcije, sušenja i emulzifikacije prehrambenih proizvoda. Osnovni parametri koji utiču na efikasnost ekstrakcije ultrazvukom su jačina ultrazvučnih talasa, dužina ultrazvučnog tretmana i uslovi sredine u kojoj se izvodi reakcija (temperatura, pritisak, pH vrednost rastvora). Mikrotalasno zračenje uzoraka omogućava zagrevanje smeše rastvarača direktnom interakcijom sa slobodnim molekulima prisutnim u sistemu, što dovodi do ubrzanog razaranja biljnog tkiva i oslobađanja ćelijskih komponenti u rastvarač. Ovaj postupak obično povećava prinos bioaktivnih jedinjenja i smanjuje troškove ekstrakcije zbog skraćivanja vremena tretmana i smanjene količine rastvarača. Dodatna prednost tehnike je ta što kombinuje visoku temperaturu i pritisak za optimalno oslobađanje bioaktivnih supstanci uz istovremeno razaranja ćelijskog zida. Iako imaju niz prednosti, kako pri ekstrakciji polifenolnih jedinjenja, tako i pri ekstrakciji proteina iz biljnog materijala, oba tehnološka postupka imaju i svoja ograničenja. Suviše intenzivan tretman ultrazvukom i mikrotalasima,

može dovesti do preteranog zagrevanja smeše i degradacije polifenolnih jedinjenja, kao i do intermolekulskih interakcija nakon razvijanja molekula proteina, do njihovog agregiranja, povećanja čestica i promene fizičkih i reoloških svojstava. Zbog toga, izuzetno je važno uspostavljanje korelacije između intenziteta i parametara ultrazvučnog tretmana (amplituda, frekvencija, vreme tretmana) ili mikrotalasnog tretmana (snaga mikrotalasa, temperatura smeše, vreme tretmana) i bioloških svojstava dobijenih izolata, što je i bio cilj ovog istraživanja.

## **2. TEORIJSKI DEO**

## 2.1. HEMIJSKI SASTAV SEMENA SOJE

Iako se soja svrstava u uljane kulture, ona je pre svega proteinska biljka. Glavna karakteristika sojinog zrna i ono što soju izdvaja od ostalih mahunarki je visok sadržaj punovrednih proteina, čak do 42%. Jedan kilogram sojinog brašna, po sadržaju proteina ekvivalentan je 2,3 kg mesa ili 12 l mleka. Seme soje sadrži i 19,5% ulja [14], 33% ugljenih hidrata [15] i esencijalnih elemenata (Ca, P, K, Fe, S, Mn, Na, Mo, Cu, B, I, Co, Zn) [16,17]. Od zasićenih masnih kiselina seme soje u najvećoj meri sadrži palmitinsku kiselinu (C16:0 od 10 do 12%) i stearinsku kiselinu (C18:0 od 2,2 do 7,2%), a od nezasićenih masnih kiselina, oleinsku kiselinu (C18:1 24%), linolnu kiselinu (C18:2 54%) i linolensku kiselinu (C18:3 8,0%). Soja ne sadrži holesterol i svega nekoliko relativno teže svarljivih masnih kiselina (zasićene) koje se nalaze u svim životinjskim namirnicama, čime soja daleko nadmašuje masnoće životinjskog porekla [15]. Od ugljenih hidrata sadrži polisaharid dekstrin koji ima veliku ulogu u ishrani dijabetičara, jer ne dozvoljava da se naglo poveća sadržaj glukoze u krvi. Ona je odličan izvor lecitina, kao i vitamina tiamina (72,8% preporučenog dnevnog unosa), riboflavina (72,5% preporučenog dnevnog unosa) i folne kiseline (93,8% preporučenog dnevnog unosa), dobar je izvor vitamina B6 (29% preporučenog dnevnog unosa), pantotenske kiseline (15,9% preporučenog dnevnog unosa) i niacina (10,8% preporučenog dnevnog unosa). Sadrži i vitamine C, D, E i K, ali u manjim količinama. Ovi prirodni antioksidansi sprečavaju oksidaciju LDL holesterola. Sojin lecitin je prirodna materija izvrsnih osobina, ali manje poznata širem krugu ljudi. Njegovi glavni sastojci su holin i inozitol u obliku fosfatidilholina. Fosfatidilholin igra ključnu ulogu u izgradnji strukture bioloških membrana i često se veže za vitamine. Inozitol se u manjoj ili većoj količini nalazi u namirnicama biljnog porekla, a soja ga sadrži u izobilju. Ljudski mozak deponuje veće količine inozitola. Holin i inozitol se po funkciji smatraju katalizatorima i razgrađivačima masti. Lecitin daje kosi zdravu boju i smanjuje opadanje, može sprečiti nastanak ekcema, pojačava moć koncentracije i pamćenja i deluje umirujuće na nervni sistem. Soja je bogata i magnezijumom, koji igra važnu ulogu u funkcionisanju kostiju, srca i arterija. Od minerala tu su još kalcijum, fosfor, gvožđe i drugi.

Značajno je napomenuti i da seme soje sadrži polifenole, koji su jedna od najvećih, najrasprostranjenijih i biološki (fiziološki i medicinski) najznačajnijih grupa sekundarnih prirodnih metabolita biljaka.

## 2.2. POLIFENOLI, OSNOVNE KARAKTERISTIKE

Polifenoli predstavljaju grupu hemijskih jedinjenja heterogene strukture od jednostavnih organskih molekula do visoko polimerizovanih jedinjenja. Karakteriše ih prisustvo barem jednog aromatičnog prstena (C6) za koje je vezano više hidroksilnih (-OH) grupa. S obzirom na veliku raznovrsnost biljnih fenola, njihova klasifikacija je veoma kompleksna. Može se vršiti na više različitih načina:

1. prema dužini ugljenikovog lanca, osnovna podela data je u Tabeli 2.1 [18];
2. prema rasprostranjenosti u prirodi;
3. u zavisnosti od toga da li se u biljkama nalaze u slobodnoj formi ili vezani u kompleksna jedinjenja koja ulaze u sastav ćelijskog zida.

Prema rasprostranjenosti u prirodi dele se na tri grupe:

- usko rasprostranjeni, kao što su prosti fenoli, pirokatehol, hidrohionon, resorcinol, vanillin,
- široko rasprostranjeni- flavonoidi i njihovi derivati, kumarini i fenolne kiseline, kao što su benzoeva i cimetna kiselina i njihovi derivati,
- polimeri-tanini i lignin.

Na osnovu rastvorljivosti i oblika u kome se nalaze u biljnom tkivu dele se na rastvorne (prosti fenoli, flavonoidi i tanini male i srednje molarne mase) i nerastvorne (kondenzovani tanini, fenolne kiseline) [19].



Tabela 2.1. Podela fenolnih jedinjenja prema broju C atoma u lancu [18]

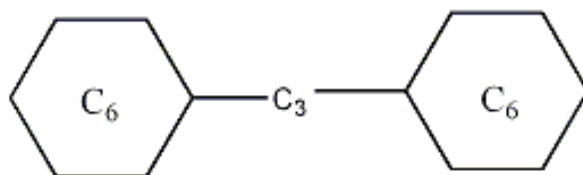
Osnovni skelet	Klasa	Primer
C6	Jednostavni fenoli Benzohinoni	Katehol, hidrohinon, rezorcinol
C6-C1	Fenolne kiseline	<i>p</i> -Hidroksibenzoeva, salicilna kiselina
C6-C2	Fenilsirćetne kiseline	<i>p</i> -Hidroksifenilsirćetna kiselina
C6-C3	Fenilpropeni	Eugenol, mirsticin
	Kumarini	Umbeliferon, eskuletin, skopolin
	Hromoni	Eugenin
C6-C4	Naftohinoni	Juglon
C6-C1-C6	Ksantoni	Mangostin, mangiferin
C6-C2-C6	Stilbeni	Resveratrol
	Antrahinoni	Emodin, hrizofanol, rein
C6-C3-C6	Flavonoidi	Sinensetin, nobiletin,
	Flavoni	izosinensitin, tangeretin, diosmin
	Flavonoli	Kvercetin, kempferol
	Flavonol glikozidi	Rutin
	Flavanoli	Dihidroksikvercetin i dihidroksikempferol glikozidi
	Flavanoni	Hesperidin, naringenin
	Flavanon glikozidi	Neohesperidin, narirutin, naringin, eriocitrin
	Antocijanini	Glikozidi pelargonidina, peonidina, delfinidina, petunidina, cijanidina
	Flavanoli (katehini)	(+)-Katehin, (-)-epikatehin, (+)-galokatehin, (-)-epigalokatehin
Halkoni	Floridžin, arbutin, halkonaringenin	
(C6-C3) <sub>2</sub>	Lignini	Pinorezinol
(C6-C3-C6) <sub>2</sub>	Biflavonoidi	Agatisflavon

### 2.2.1. Flavonoidi

U zavisnosti od stepena oksidacije centralnog piranovog prstena kao i od pozicije sekundarnog aromatičnog prstena flavonoidi su podeljeni u više klasa i potklasa:

1. fenilhromoni (pravi flavonoidi),
  - flavoni, flavonoli (monomerni i dimerni)
  - flavanoni i dihidroflavonoli
  - izoflavoni i izoflavononi
2. fenilhromani (gradivne jedinice tanina),
  - flavani
  - flavan-3-oli i flavan-3,4-dioli
3. halkoni i dihidrohalkoni,
4. auron i antocijani.

Strukturna raznolikost flavonoida rezultat je brojnih modifikacija osnovne skeletne strukture, koje su uslovljene reakcijama hidrogenizacije, hidroksilacije, O-metilacije hidroksilnih grupa, dimerizacije, vezivanja neorganskog sulfata i glikozilacije hidroksilnih grupa ili flavonoidnog jezgra. Osnovnu strukturu flavonoida čini difenilpropan (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (Slika 2.1). Ugljenikov skelet flavonoida sadrži dva benzenova prstena (A i B) međusobno povezana tročlanim ugljeničnim nizom, koji sa atomom kiseonika formira heterociklični prsten.



**Slika 2.1.** Osnovna struktura flavonoida

U zavisnosti od tipa strukture flavonoidi se dele u šest podgrupa:

1. flavonoli,
2. flavoni,
3. izoflavoni,
4. flavanoni,

5. antocijanidini i
6. flavanoli (katehini i proantocijanidini).

Flavonoidi se takođe pojavljuju kao sulfo- i metil- derivati, konjugovani sa monosaharidima i disaharidima, formiraju komplekse sa oligosaharidima, lipidima, aminima, karboksilnim kiselinama i organskim kiselinama. Predstavljaju najveću grupu polifenolnih jedinjenja. Do danas je izolovano preko 8000 jedinjenja iz ove grupe [19].

Flavonoidi ispoljavaju veliki broj biološki značajnih aktivnosti kao što je antioksidativna aktivnost. Antioksidansi imaju zadatak da smanje oksidativna oštećenja izazvana slobodnim radikalima i reaktivnim kiseoničnim vrstama u uslovima „oksidativnog stresa”, kako kod ljudi, tako i životinja koje konzumiraju antioksidativne flavonoide iz hrane. Ova jedinjenja čine najveću grupu biljnih polifenola, nalaze se u značajnim količinama u korenju, lišću, semenima, pokožici voća i cvetu viših biljaka, a prilikom prerade voća i povrća prelaze u sok u kom su dobro rastvorljivi. Pokazuju širok spektar antioksidativnih svojstava *in vitro*. Sposobni su da vezuju metalne jone gradeći helate i da prekinu reakcije stvaranja slobodnih radikala. U poslednjih nekoliko godina flavonoidi i druga fenolna jedinjenja biljnog porekla imaju važno mesto, posebno u oblasti farmacije i medicine, zbog njihovog potencijala da spreče veliki broj hroničnih i degenerativnih bolesti, uključujući maligna oboljenja i kardiovaskularne bolesti. Različite studije, *in vitro* i *in vivo* pokazale su da flavonoidi poseduju antioksidativne, antimutagene, antivirusne, antimikrobne, antiinflamatorne, antikancerogene i imuno-modulatorske efekte. Ipak, delotvornost flavonoida opada supstitucijom hidroksilnih grupa šećerima, pa su glikozidi slabiji antioksidansi od odgovarajućih aglikona [6].

Kvercetin je najaktivniji od većine bioflavonoida, a smatra se pretečom i predstavnikom svih bioflavonoida zbog toga što je njegova hemijska struktura osnovni "skelet" većine drugih bioflavonoida, uključujući rutin, hesperidin i dr. Biološko dejstvo (farmaceutsko i sl.) brojnih biljaka i njihovih proizvoda zavisi od sadržaja gore pomenutih polifenola. Brojne studije su pokazale da je kvercetin dobar antiinflamatorni agens, jer učestvuje u blokiranju nekoliko inflamatornih procesa. Blokira sintezu, a samim tim i oslobađanje histamina i drugih medijatora upale. Veoma je jak antioksidans, pa štiti LDL-holesterol

od oksidacije i smanjuje opasnost od njegovog nakupljanja na unutrašnjim zidovima arterija. Sprečava zgrušavanje krvi i stvaranje krvnih ugrušaka [20,21].

### 2.2.2. Antocijani

Antocijani su biljni pigmenti crvene do plave boje. Među svim biljnim pigmentima oni su najranije privukli pažnju mnogih istraživača. Naziv antocijani dolazi od grčke reči „antos“ - cvet i „kyaneos“ - plav. Nalaze se u cvetnim laticama i u drugim delovima viših biljaka. Antocijani pripadaju flavonoidima. U prirodi se ne pojavljuju u obliku aglikona (antocijanidina), već kao glikozidi i to najčešće kao 3-glikozidi. Šest aglikona su najrasprostranjeniji u prirodi, a to su: cijanidin, delfinidin, petunidin, pelargonidin, peonidin i malvidin (nazivi potiču iz biljaka iz kojih su prvi put ekstrahovani). Najzastupljeniji je cijanidin. Antocijanidini imaju u osnovi 2-fenilbenzopirilijum ili flavilijum-jon i variraju jedino po broju OH i OCH<sub>3</sub> grupa. Derivati su benzopirilijum-hlorida.

### 2.2.3. Taninske materije

Tanini ili štavne materije su fenolna jedinjenja biljnog porekla koja imaju opor ukus. Sa solima gvožđa obrazuju rastvore crne, plave i zelene boje. Mogu da ispunjavaju čitavu vakuolu biljne ćelije koja tada dobija naziv taninska vakuola. Nalaze se u stablima i listovima nekih biljaka, a sadrže ih i zeleni plodovi, koji zbog toga imaju opor ukus. Sazrevanjem plodova količina tanina u njima se smanjuje. Osim u medicini, našli su primenu i u industriji kože za štavljenje. Antioksidativna aktivnost tanina zavisi od stepena polimerizacije ovih supstanci. Kod kondenzovanih tanina velike molarne mase, ova aktivnost može biti od petnaest do trideset puta veća u odnosu na proste fenole.

### 2.2.4. Halkoni i kumarini

Halkoni su intermedijari u biosintezi flavonoida. Iz ove grupe jedinjenja, u hrani se najčešće nalaze floretin i njegov glikozid florizin (floretin 2'-glukoza), kao i halkonaringenin i arbutin. Floretin i florizin su prisutni u jabukama, halkonaringenin je karakterističan za paradajz, arbutin za krušku. Međutim, arbutin se takođe nalazi i u jagodama, pšenici i njenim proizvodima (brašno, testenine i sl.), u tragovima ga ima i u

čaju, kafi, crnom vinu i brokoliju. U nekim biljnim vrstama, glavni pigmenti žutog cveća su halkoni [22].

Kumarini predstavljaju derivate cimetine kiseline, nastaju ciklizacijom bočnog lanca *o*-kumarne kiseline [23]. U prirodi se najčešće pojavljuju u obliku glikozida, kao što umbeliferon, eskuletin i skopoletin, i uglavnom se nalaze u maslinovom ulju, zobi i začinima. Halkoni i kumarini takođe poseduju antioksidativnu aktivnost [24].

### 2.2.5. Lignani

Lignani se formiraju od dve fenilpropanoidne jedinice. Najbogatiji izvor lignana je laneno seme, koje sadrži sekoizolaricirezinol (do 3,7 g/kg suve mase) i male količine matairezina. Žitarice, voće i neke vrste povrća takođe sadrže tragove istih lignana, ali koncentracije u lanenom semenu su i 1000 puta veće nego kod ostalih namirnica [25]. Lignani se u crevnoj mikroflori metabolišu do enterodiola i enterolaktona. Male količine sekoizolaricirezinola i matairezina koje se unesu putem ishrane se ne poklapaju sa koncentracijom metabolita enterodiola i enterolaktona u plazmi i urinu. Dakle, nesumnjivo postoje lignani biljnog porekla koji su prekursori enterodiola i enterolaktona, a koji još uvek nisu identifikovani [26]. Tompson (Thompson) i sar. (1991) su koristili tehniku *in vitro* simulirajući uslove fermentacije u ljudskoj crevnoj flori da bi kvantifikovali prekursore enterodiola i enterolaktona. Potvrđeno je da je laneno seme najbogatiji izvor, manje količine su identifikovane u algama, mahunarkama (sočivo i soja), žitaricama (tritikale i pšenica), povrću (luk, špargla, šargarepa), i voću (kruške, šljive) [27]. Daljom polimerizacijom lignana nastaju lignini. Pored celuloze i hemiceluloze glavni su sastojci lignoceluloznog materijala (oko 30%).

### 2.2.6. Stilbeni

Stilbeni se nalaze u obliku dva izomera E-stilben (*trans*-izomer) i Z-stilben (*cis*-izomer). Njihovi derivati stilbenoidi pripadaju grupi prirodnih fenola i nalaze se u veoma malim količinama u nekim biljkama. Jedan od njih, resveratrol, biljke proizvode kao odbrambeni mehanizam na dejstvo patogenih gljiva i bakterija. Manje količine resveratrola su nađene u opni grožđa, borovnica, malina i duda, kao i u vinu. Zbog malih količina koje se ishranom unose, postoji veoma malo dokaza o eventualnom zaštitnom efektu resveratrola u ljudskom organizmu, iako je njegovo protektivno

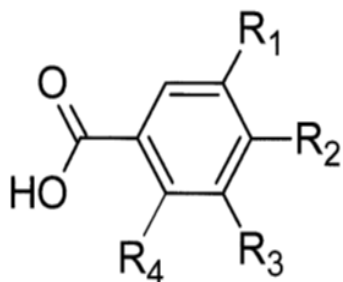
delovanje kod srčanih oboljenja i neoplazmi predmet ispitivanja mnogih studija [28-30].

### 2.2.7. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su velika grupa fenolnih jedinjenja, koja se nalaze u hrani biljnog porekla. Dele se na derivate cimetine i hidroksibenzoeve kiseline.

#### 2.2.7.1. Hidroksibenzoeve kiseline

Hidroksibenzoeve kiseline opšte strukture C<sub>6</sub> - C<sub>1</sub> izvedene su direktno iz benzoeeve kiseline (Slika 2.2). Varijacije u strukturi pojedinih hidroksibenzoevih kiselina proizilaze iz hidroksilacije i metilovanja aromatičnog prstena [31]. Najzastupljeniji hidroksi derivati benzoeeve kiseline su: *p*-hidroksibenzoeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Protokatehinska kiselina je prisutna u biljkama različitih familija, a galna kiselina je komponenta mnogih taninskih materija (galotanini). Za aromatično jezgro mogu da se vežu i metoksi-grupe, što je slučaj kod vanilinske kiseline. Molekuli galne kiseline mogu da grade novu C-C vezu, pri čemu nastaje heksahidroksidifenska kiselina iz koje eliminacijom nastaje elaginska kiselina. Hidroksi derivati benzoeeve i cimetine kiseline su prisutni u hrani biljnog porekla (voće, povrće, žitarice). Nalaze se u svim delovima biljaka (koren, stabljika, lišće, seme). U različitim delovima biljaka nalaze se različite koncentracije fenolnih kiselina. Osim toga, u različitim stadijumima razvoja biljaka prisutne su različite fenolne kiseline. Uslovi rasta, kao što je temperatura, utiču na sadržaj fenolnih kiselina.



*p*-Hidroksibenzoeva kiselina (  $R_1, R_3, R_4 = H$ ;  $R_2 = OH$  )

Galna kiselina (  $R_1, R_2, R_3 = OH$ ;  $R_4 = H$  )

Vanilinska kiselina (  $R_1 = OCH_3$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_3, R_4 = H$  )

Salicilna kiselina (  $R_1, R_2, R_3 = H$ ;  $R_4 = OH$  )

Gentistinska kiselina (  $R_1, R_3 = OH$ ;  $R_2, R_4 = H$  )

Protokatehinska kiselina (  $R_1, R_2 = OH$ ;  $R_3, R_4 = H$  )

Siringinska kiselina (  $R_1, R_3 = OCH_3$ ;  $R_2 = OH$ ;  $R_4 = H$  )

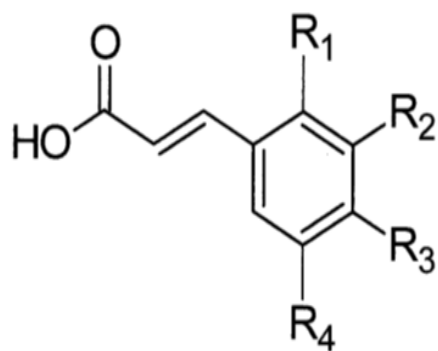
**Slika 2.2.** Opšte formule i nazivi najzastupljenijih hidroksibenzoevih kiselina

Manji deo fenolnih kiselina se nalazi u slobodnom obliku dok je većina vezana estarskom, etarskom ili acetatnom vezom sa strukturnim komponentama biljaka (celulozom, proteinima i ligninom), ili sa manjim organskim molekulima (glukoza, hininska, maleinska i vinska kiselina) i drugim prirodnim proizvodima (terpeni). Hidroksibenzoeva kiselina u slobodnoj i esterifikovanoj formi dokazana je samo u nekim višim biljkama.

#### 2.2.7.2. Hidroksicimetne kiseline

Hidroksicimetne kiseline, imaju C6-C3 strukturu i više su zastupljene u odnosu na hidroksibenzove kiseline. Najzastupljeniji hidroksi derivati cimetne kiseline su *p*-kumarna, kafena, ferulna i sinapinska kiselina (Slika 2.3). Pojavljuju se u različitim konjugovanim oblicima, slobodne forme su obično artefakti hemijske ili enzimske hidrolize tkiva tokom ekstrakcije. Konjugovani oblici su estri hidroksi kiselina kao što su hininska, šikiminska i vinska kiselina, kao i njihovi šećerni derivati [6,31,32]. Kafena i hininska kiselina formiraju hlorogenu kiselinu, koja se nalazi u mnogim vrstama voća, a u većoj koncentraciji u kafi (jedna šoljica sadrži 70-350 mg hlorogene kiseline). Cimetna kiselina je pronađena u svim delovima voća, a najveći sadržaj je utvrđen u spoljašnjem omotaču zrelog ploda. Kafena kiselina je izolovana iz kafe. U slobodnom i esterifikovanom obliku je najviše zastupljena fenolna kiselina i čini od 75 do 100%

ukupnog sadržaja derivata cimetne kiseline u voću. Najvažniji izvor ferulne kiseline su zrna žitarica u kojima je dominantna fenolna kiselina.



*o*-Kumarna kiselina ( $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3=R_4=H$ )

*m*-Kumarna kiselina ( $R_2=OH$ ;  $R_1=R_3=R_4=H$ )

*p*-Kumarna kiselina ( $R_3=OH$ ;  $R_1=R_2=R_4=H$ )

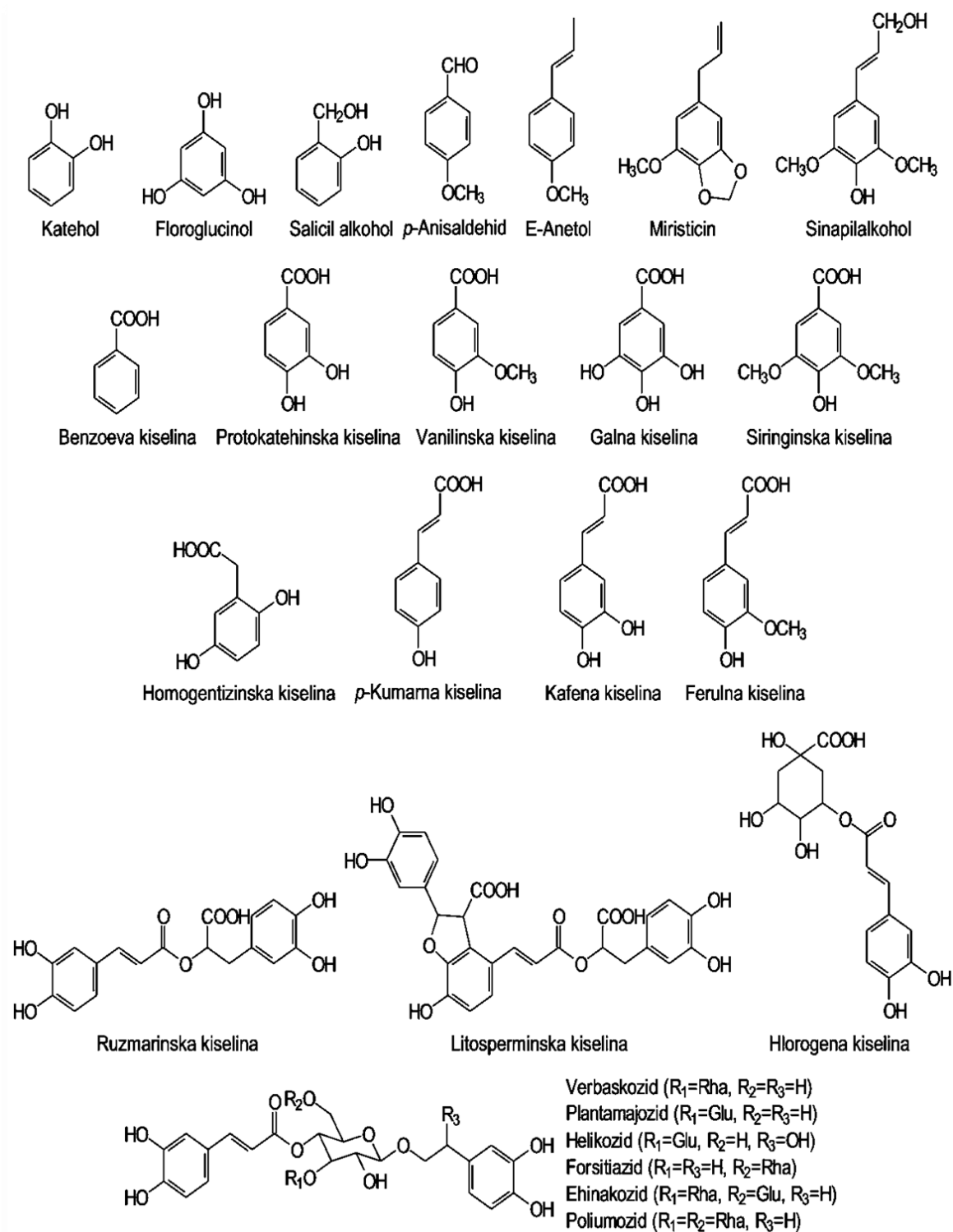
Kafena kiselina ( $R_2,R_3=OH$ ;  $R_1, R_4=H$ )

Ferulna kiselina ( $R_2=OCH_3$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_1,R_4=H$ )

Sinapinska kiselina ( $R_2,R_4=OCH_3$ ;  $R_3=OH$ ;  $R_1=H$ )

**Slika 2.3.** Opšte formule i nazivi najzastupljenijih hidroksicimetnih kiselina

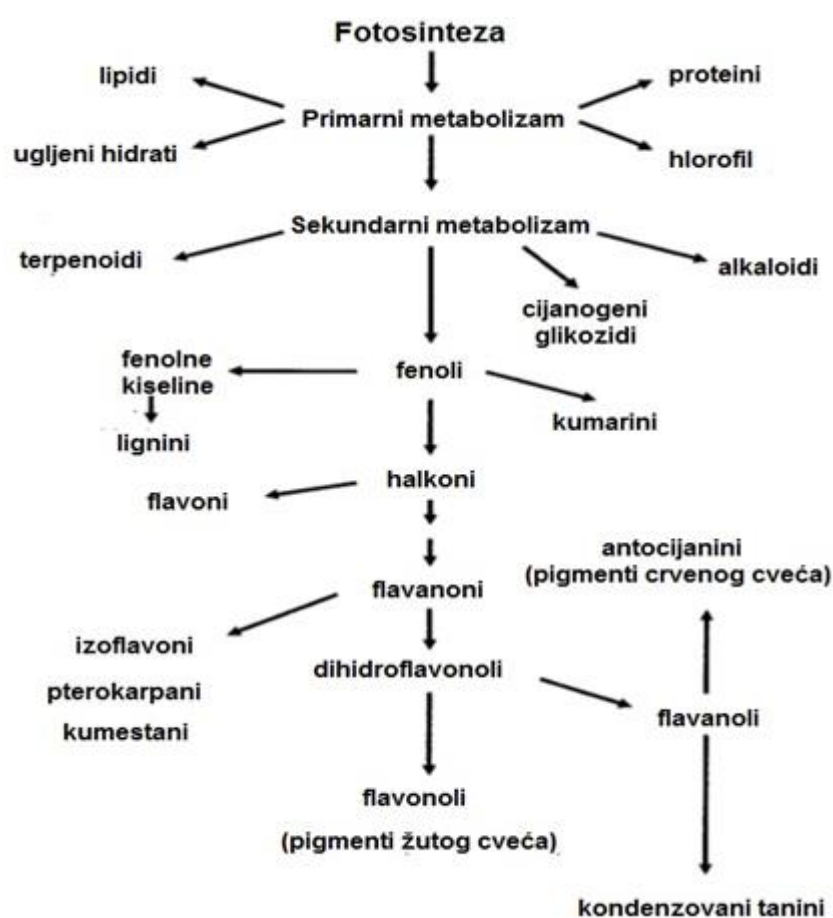




Slika 2.4. Hemijska struktura nekih najznačajnijih predstavnika polifenolnih jedinjenja

### 2.2.8. Sinteza polifenola u biljkama

Metabolizam biljaka podjeljen je na primarni i sekundarni. Supstance koje su zajedničke za živa bića i od suštinskog značaja za očuvanje ćelija (lipidi, belančevine, ugljeni hidrati i nukleinske kiseline) produkti su primarnog metabolizma. S druge strane, supstance koje nastaju kao proizvodi nekoliko biosintetičkih puteva i ograničene su na određene grupe organizama, produkti su sekundarnog metabolizma. Slika 2.5 predstavlja međusobnu povezanost primarnog i sekundarnog metabolizma u biljkama.



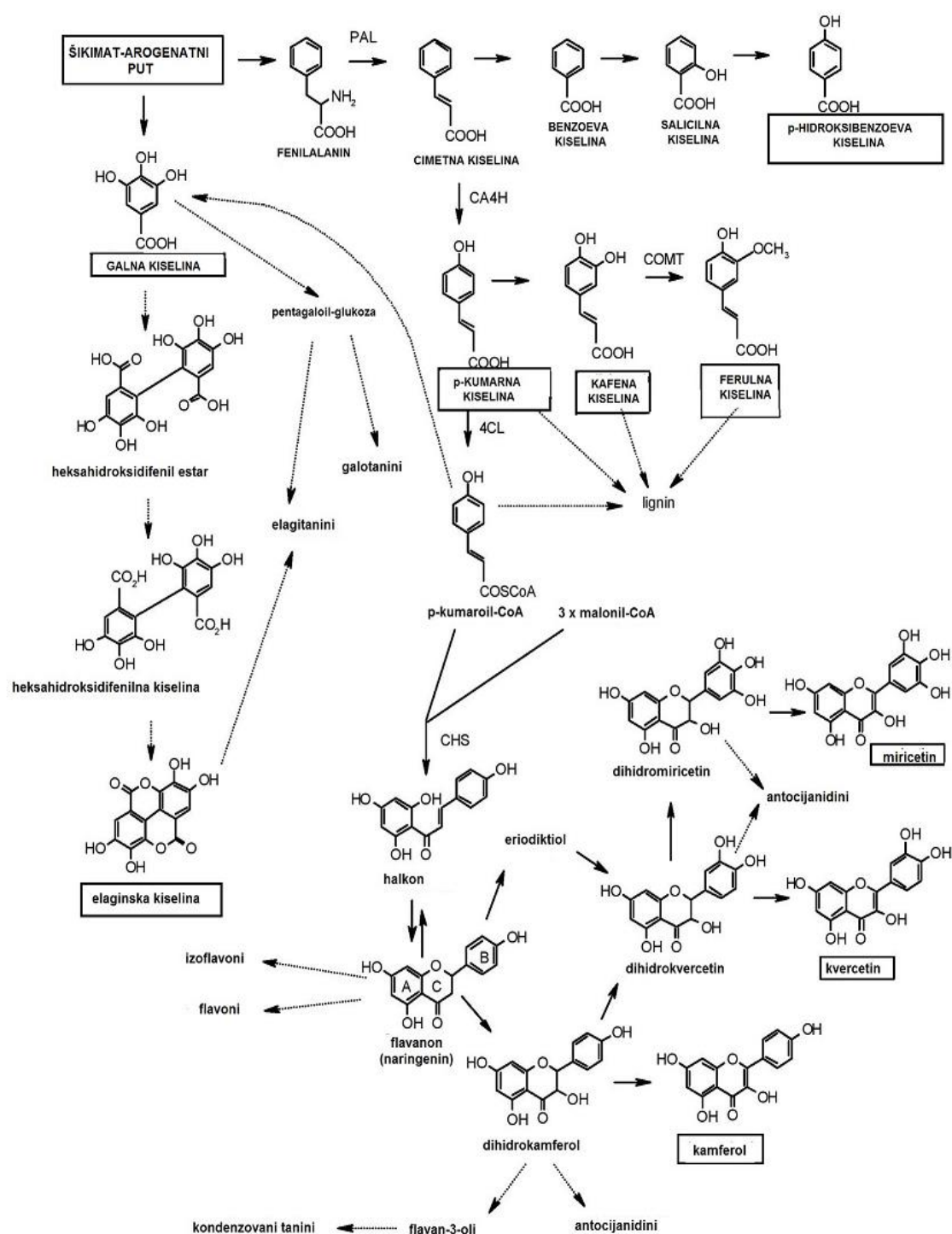
**Slika 2.5.** Šematski prikaz međusobne povezanosti primarnog i sekundarnog metabolizma u biljkama [19]

Biljni fenoli su neki od proizvoda sekundarnog metabolizma biljaka. Putevi biosinteze fenola u biljkama su dobro poznati [31,33-36]. Fenolna jedinjenja nastaju kroz dva

metabolička puta: put šikiminske kiseline (šikimatni ili fenilpropanoidni put) u kojem se uglavnom formiraju fenilpropanoidi i put sirćetne kiseline, u kojem su glavni proizvodi jednostavni fenoli. Većina biljnih fenola se sintetiše kroz fenilpropanoidni put. Kombinacija oba puta dovodi do formiranja flavonoida, najzastupljenije grupe fenolnih jedinjenja u prirodi.

Biosinteza i akumulacija sekundarnih jedinjenja može biti endogeno kontrolisan proces tokom razvojne diferencijacije [31,36] ili se može regulisati egzogenim faktorima kao što su svetlost, temperatura i oštećenje biljnog tkiva [35,37]. Aminokiselina fenilalanin, koja nastaje u biljkama preko šikimatnog puta je uobičajeni prekursor za većinu fenolnih jedinjenja viših biljaka (Slika 2.6). Slično, hidroksicimetne kiseline, a naročito njihovi koenzim A estri, su uobičajeni strukturni elementi fenolnih jedinjenja, kao što su cimetni estri i amidi, lignin, flavonoidi i kondenzovani tanini [31,36].

Fenilalanin-hidroksicimetni put je definisan kao „opšti fenilpropanoidni metabolizam“. Enzimi katalizatori pojedinačnih koraka u opštem fenilpropanoidnom metabolizmu su fenilalaninska amonijak-lijaza (PAL), *trans*-cinamat-4-monooksigenaza (CA4H) i hidrokicimetna: koenzim A ligaza (4CL). Ova tri koraka su neophodna za biosintezu fenolnih jedinjenja. Sve veći broj dokaza ukazuje na to da fenilpropanoidne i flavonoidne puteve katalizuje nekoliko multienzimskih kompleksa [35,38].



**Slika 2.6.** Biosinteza hidroksicimetnih kiselina, hidroksibenzoevih kiselina i flavonoida [33-37,39,40]. Pune linije (strelice) predstavljaju dobro okarakterisane reakcije katalizovane pojedinačnim enzimima. Isprekidane linije predstavljaju transformacije koje zahtevaju više enzima, koji su manje specifični, ili se razlikuju među biljnim vrstama. Enzimi: *trans*-cinamat-4-monooksigenaza (CA4H), halkan – sintaza (CHS), hidroksicimetna: koenzim A ligaza (4CL), fenilalaninska amonijak-liaza (PAL).

### 2.2.9. Uloga fenolnih jedinjenja u biljkama

Fenoli predstavljaju integralni deo strukture ćelijskih zidova, uglavnom u obliku polimernih materijala kao što su lignini, čineći mehaničku podršku i barijeru za mikroorganizme [36,41]. Učestvuju u raznim biohemijskim procesima vezanim za fotosintezu, štite biljke od bakterija, gljiva i virusa kao i od mehaničkih oštećenja. Imaju takođe i značajnu funkciju u uklanjanju kiseoničkih radikala. Značajna je funkcija fenolnih flavonoida, posebno antocijanina, flavona i flavonola kao pigmentata. Boje plodove, listove i latice cvetova raznim nijansama crvene, plave i ljubičaste boje [34]. Ovo je važno za privlačenje insekata i ptica u cilju oprašivanja biljaka i disperzije semena. Važna funkcija fenolnih jedinjenja je njihov doprinos u odbrambenim mehanizmima biljaka [35,37,42]. Uslovi oksidativnog stresa, kao što je intenzivno UV zračenje, oštećenje biljnog tkiva ili infekcija indukuju biosintezu fenolnih jedinjenja. Fenoli u odbrambenom mehanizmu mogu da deluju na dva načina, direktnim toksičnim delovanjem na parazite (npr. iz prekursora lignina nastaju slobodni radikali), ili brzim nagomilavanjem fizičkih barijera kao što je lignin, kao deo ćelijskog zida biljaka [36,37]. Fenoli takođe imaju sposobnost indukovanja akumulacije „fitoaleksina“-jedinjenja male molarne mase koja nastaju kao rezultat mikrobiološkog napada na biljku i koji posreduju u daljim odbrambenim reakcijama biljke na prisustvo parazita.

### 2.2.10. Fenoli kao antioksidansi

Antioksidansi su supstance, sintetičkog ili prirodnog porekla, koje smanjuju ili potpuno sprečavaju oksidaciju lako oksidujućeg supstrata, kao što su lipidi, ugljeni hidrati, proteini i DNK [43]. Sintetički antioksidansi su dugi niz godina imali veoma široku primenu, pre svega u prehrambenoj, ali i kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji. Neki od najčešće korišćenih sintetičkih antioksidanasa su:

BHA (na engl. *Butylated hydroxyanisole* i BHT (na engl. *Butylated hydroxytoluene*) – primenjuju se u prehrambenoj industriji za stabilizaciju masti životinjskog porekla, ali su manje efikasni za primenu u biljnim uljima, izuzetno su isparljivi i nisu pogodni za primenu u procesima koji iziskuju povišenu temperaturu, kao što su kuvanje i prženje;

TBHQ (na engl. *tert-Butylhydroquinone*) – najčešće se dodaje uljima za prženje, jer je otporniji na visoke temperature u odnosu na BHA i BHT;

Propil galat – ima veoma široku upotrebu, iako je osjetljiv na visoke temperature, koristi se kao pojačivač arome i dodatak biljnim uljima i stočnoj hrani.

U poslednjih nekoliko decenija nizom naučnih studija dokazan je štetan uticaj sintetičkih antioksidanata i negativne dugoročne posledice po zdravlje ljudi i životinja, što je dovelo do potpune zabrane ili ograničenja njihove upotrebe u mnogim zemljama, pre svega u prehrambenoj industriji. Zbog toga se sve više pribegava upotrebi prirodnim antioksidansima. Prirodni antioksidansi se nalaze u mnogim namirnicama, pre svega voću i povrću, ali male količine antioksidanasa proizvodi i ljudski organizam, pa se, prema mestu nastajanja, dele na egzogene i endogene. Neki od prirodnih antioksidanasa su lutein, selen, likopen, vitamini A, C i E, alfa-tokoferol, beta-karoten, ali i polifenolna jedinjenja.

Polifenolna jedinjenja pripadaju grupi neenzimskih antioksidanasa i svoju antioksidativnu aktivnost ispoljavaju na nekoliko načina [44]:

predajom H-atoma, čime se direktno vezuju („hvatanje“: trapping i/ ili „gašenje“: quenching) slobodne kiseonične ili azotne radikalske vrste;

heliranjem prooksidativnih metalnih jona ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ );

aktiviranjem antioksidativnih enzima;

inhibicijom prooksidativnih enzima (lipoksigenaza, NAD(P)H oksidaza, ksantin-oksidaza, enzimi citohroma P-450).

Antioksidativna aktivnost polifenolnih jedinjenja usko je povezana sa njihovom strukturom, pa tako najizraženiju antioksidativnu aktivnost ispoljavaju tanini ili polimerni polifenoli, dok se mnogi mali fenolni molekuli ponašaju kao pro-oksidansi.

Od različitih grupa polifenolnih jedinjenja, polifenolne kiseline takođe ispoljavaju antioksidativnu aktivnost i ona u velikoj meri zavisi od supstituenata i njihove pozicije na aromatičnom prstenu, kao i od strukture bočnog niza. Hidroksilne i metoksi grupe na fenolnom prstenu povećavaju antioksidativnu aktivnost, pa su hidroksi derivati cimene kiseline jači antioksidansi od hidroksi derivata benzojeve kiseline. Od hidroksibenzojevih kiselina, najveću antioksidativnu aktivnost ispoljava galna kiselina. Takođe,

monohidroksilne kiseline su slabiji antioksidansi od odgovarajućih dihidroksilnih kiselina.

Antioksidativna aktivnost fenolnih kiselina je značajna za stabilnost hrane, kao i u odbrambenim mehanizmima bioloških sistema. U poslednje vreme veliku pažnju privlače flavonoidi jer predstavljaju dobre "hvatače" slobodnih radikala, zbog toga što su veoma reaktivni kao donori vodonika ili elektrona, pa imaju značajnu ulogu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji. Imaju sposobnost vezivanja metalnih jona gradeći helate, čime dolazi do prekidanja reakcije stvaranja slobodnih radikala [19].

### 2.2.11. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali su nestabilni atomi, joni ili molekuli koje telo proizvodi kao reakciju na različite vrste stresa. Karakteriše ih jedan ili više nesparenih, slobodnih elektrona, koji ih čine veoma reaktivnim. Nespareni elektron uglavnom se nalazi na kiseoniku ili azotu, pa tako razlikujemo slobodne radikale kiseonika (ROS) (na engl. *reactive oxygen species*), azota (RNS) (na engl. *reactive nitrogen species*), ali može se nalaziti i na atomima drugih elemenata [45]. Slobodni radikali nastaju enzimskim reakcijama, hemijskim procesima, termolizom, redoks reakcijama i elektromagnetnim zračenjem. Zbog težnje da spare nespareni elektron, slobodni radikali „krađu“ elektron od drugih molekula, čime molekul koji je ostao bez elektrona i sam postaje slobodni radikal i dolazi do niza lančanih reakcija koje za posledicu imaju oštećenje vitalnih ćelijskih makromolekula: proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, što može biti uzrok čitavog niza poremećaja u metabolizmu i izazvati disfunkciju i smrt ćelija. Za pravilnu fiziološku funkciju neophodna je ravnoteža između slobodnih radikala i antioksidanasa. Ukoliko slobodni radikali nadvladaju sposobnost tela da ih reguliše, dolazi do nastanka tzv. oksidativnog stresa [46]. Poremećaji koji su posledica oksidativnog stresa su: arteroskleroza, kancer, kardiovaskularna oboljenja, astma, artritis, gastritis, dermatitis, dijabetes, bolesti jetre, bolesti bubrega, zapaljenski procesi, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest itd. U cilju sprečavanja lančanih reakcija slobodnih radikala u organizmu primenjuju se različiti antioksidativni mehanizmi odbrane uključujući enzime, proteine, antioksidanse, te flavonoide u svojstvu hvatača (trapping) ili gasioca (quenching) slobodnih radikala [44].



### 2.2.12. Najzastupljeniji polifenoli u semenu soje

Seme soje sadrži visoke koncentracije fenolnih jedinjenja, fenolnih kiselina i flavonoida, među njima najviše izoflavona [3]. Izoflavonoidi soje predstavljaju polifenolna jedinjenja koja se u zrnju soje nalaze u obliku heterozida (glikozidi, acetilglikozidi i malonilglikozidi), vezani za šećernu komponentu. U digestivnom traktu izoflavonoidi se hidrolizuju i oslobađaju aglikone – izoflavone koji ispoljavaju fiziološko delovanje. Najznačajniji izoflavoni u soji su daidzein, genistein i glicitein. Njihov sadržaj znatno varira u zavisnosti od različitih faktora kao što su sorta, godina berbe, geografski i uslovi životne sredine, zrelost semena, itd. [7-10]. Li (Lee) i sar. (2003) su izvršili ekstrakciju sojinih proteina i ispitali uticaj godine, lokacije, i genotipa soje na sadržaj izoflavona. Autori su zaključili da su uticaji životne sredine i genotipa najvažniji na variranje sadržaja izoflavona u soji [47]. U drugoj studiji, Vej (Wei) i sar. (2004) su ispitali razlike u sadržaju izoflavona u soji domaće proizvodnje i uvezenoj genetski modifikovanoj soji. Oni su izvestili da je sadržaj izoflavona uvezeno genetski modifikovane soje sličan sadržaju u tradicionalno gajenoj tajvanskoj soji [48]. Tai (Taie) i sar. (2008) su izvestili da različiti tretmani organskog đubrenja značajno utiču na sadržaj fenola i antioksidativnu aktivnost soje [49]. Slično tome, Amarović (Amarovicz) i sar. (2009) su razmotrili uticaj uslova skladištenja na sadržaj fenola. Autori su otkrili da su varijacije u sadržaju polifenola zanemarljive u odnosu na razlike u sadržaju između različitih biljnih vrsta [50]. Distribucija izoflavona varira u velikoj meri i u različitim delovima semena soje, najveći sadržaj je u klici, u odnosu na kotiledon i omotač zrna. S druge strane, dominantni izoflavoni se takođe razlikuju u tri dela semena [51]. Sirovo zrno soje sadrži u proseku oko 1500 mg/kg ukupnih izoflavonoida, od čega najviše genisteina i daidzeina, koji su veoma stabilni pod uobičajenim uslovima čuvanja. Termičkim tretmanom ili u prisustvu enzima glikozidaze ovaj sadržaj se povećava. Tokom fermentacije dešava se mnogo biohemijskih promena, što dovodi do izmenjenog odnosa nutritivnih i antinutritivnih komponenata u biljkama, koje utiču na svojstva proizvoda, kao što su biološka aktivnost i svarljivost [52,53]. Fermentisani i termički obrađeni sojini proizvodi sadrže uglavnom slobodne aglikone, (koji ispoljavaju fiziološko delovanje) (npr. tofu sir 250-450 mg/kg).



Procenjen unos izoflavonoida soje u zapadnoj ishrani iznosi nekoliko miligrama, dok kod vegetarijanaca i u Aziji može ići i do 30-40 mg dnevno [54,55].

Druga bitna grupa fenolnih jedinjenja prisutnih u semenu soje su fenolne kiseline. Glavne fenolne kiseline identifikovane u sojinom brašnu su ferulna, siringinska, *o*-kumarna, *p*-kumarna i vanilinska [4-7]. Prema literaturnim podacima njihov sastav i sadržaj, kao i sadržaj izoflavona varira najviše u zavisnosti od boje omotača zrna (crna, žuta, zelena i smeđa soja). Prema podacima Čo (Cho) i sar. (2013), najveći prosečan sadržaj izoflavona ima zelena soja (3079,42 µg/g), a zatim žuta (2393,41 µg/g) i crna soja (2373,97 µg/g), dok smeđa soja ima najniži sadržaj (1821,82 µg/g). Antocijanini su prisutni samo u crnoj soji, sa prosečnim sadržajem primarnih antocijana: cijanidin-3-O-glikozida, delphinidin-3-O-glikozida i petunidin-3-O-glikozida, 11,046; 1,971 i 0,557 mg/g, respektivno [56]. Ovi podaci su u skladu istraživanjem Žilić i sar. (2013), koji su utvrdili da je najveći sadržaj fenola, flavonoida i antocijanina prisutan u crnoj soji, kako u zrnu, tako i u oljuštenom omotaču. Ispitivane su 4 sorte žute soje (Galeb, Nena, Bosa i Lidija) i 2 sorte crne soje (Black Tokio i Cornaja) uzgajane u Institutu za kukuruz, Zemun polje. U Tabeli 2.2 je dat prikaz sadržaja ukupnih fenola, flavonoida i antocijanina za pojedine sorte. Od hidroksicimetnih kiselina, samo ferulna i *p*-kumarna su detektovane i u oljuštenom zrnu i u opni i žute i crne soje i to u mnogo većim koncentracijama u oljuštenom zrnu nego u samoj opni, sa sledećim opadajućim redosledom: oljušteno zrno žute soje > oljušteno zrno crne soje > opna žute soje > opna crne soje. Dva derivata benzojeve kiseline, galna i protokatehinska su detektovane samo u opni crne soje [57].

**Tabela. 2.2.** Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijanina u oljuštenom zrnju i opni žute i crne soje [57]

	<b>Fenoli (mg GAE/kg)</b>	<b>Flavonoidi (mg CE/kg)</b>	<b>Antocijanini (mg CGE/kg)</b>
<b>Oljušteno zrno</b>			
Galeb	2596,79 ± 52,72 <sup>b</sup>	598,73 ± 37,58 <sup>b</sup>	n.d.
Bosa	1238,47 ± 39,78 <sup>d</sup>	392,37 ± 38,37 <sup>bc</sup>	n.d.
Nena	2032,35 ± 25,629 <sup>c</sup>	356,85 ± 27,84 <sup>bc</sup>	n.d.
Lidija	1925,12 ± 62,22 <sup>c</sup>	207,40 ± 10,2 <sup>c</sup>	n.d.
Black Tokio	1049,21 ± 39,51 <sup>e</sup>	208,07 ± 12,36 <sup>c</sup>	n.d.
Cornaja	900,12 ± 40,70 <sup>ef</sup>	245,52 ± 15,81 <sup>c</sup>	n.d.
<b>opna</b>			
Galeb	645,11 ± 16,32 <sup>gh</sup>	86,94 ± 3,65 <sup>ef</sup>	n.d.
Bosa	825,79 ± 14,97 <sup>fg</sup>	48,91 ± 1,22 <sup>f</sup>	n.d.
Nena	536,66 ± 15,51 <sup>hi</sup>	53,84 ± 2,36 <sup>f</sup>	n.d.
Lidija	344,50 ± 20,42 <sup>i</sup>	67,76 ± 3,00 <sup>f</sup>	n.d.
Black Tokio	29934,31 ± 196,25 <sup>a</sup>	4569,97 ± 214,63 <sup>a</sup>	16475,48 ± 95,41 <sup>a</sup>
Cornaja	29779,51 ± 191,69 <sup>a</sup>	4575,50 ± 259,28 <sup>a</sup>	11434,54 ± 86,82 <sup>b</sup>
<b>Srednja vrednost u oljuštenom zrnju (žuta soja)</b>			
	1948,18 ± 557,37 <sup>B</sup>	388,84 ± 161,26 <sup>B</sup>	n.d.
<b>Srednja vrednost u oljuštenom zrnju (crna soja)</b>			
	974,66 ± 105,42 <sup>C</sup>	226,79 ± 26,48 <sup>B</sup>	n.d.
<b>Srednja vrednost u opni zrna (žuta soja)</b>			
	588,02 ± 201,44 <sup>D</sup>	64,36 ± 17,04 <sup>C</sup>	n.d.
<b>Srednja vrednost u opni zrna (crna soja)</b>			
	29856,91 ± 109,46 <sup>A</sup>	4572,74 ± 2910,12 <sup>A</sup>	13955,01 ± 3564,48 <sup>A</sup>

Srednja vrednost genotipova sa istim malim slovom u superskriptu u istoj koloni se ne razlikuje značajno ( $p > 0,05$ ); Srednja vrednost frakcija zrna sa istim velikim slovom u superskriptu u istoj koloni se ne razlikuje značajno ( $p > 0,05$ ); n.d-nije detektovan, GAE-ekvivalent galne kiseline, CE-katehin ekvivalent, CGE-cijanidin 3 - glikozid ekvivalent

U istraživanjima Mega i Lorenc (Lorenz) (1974) navodi se da se sadržaj fenolnih kiselina u prethodno obezmašćenom semenu soje kreće oko 256  $\mu\text{g/g}$ , dok je u istraživanju Dabrovski (Dabrowski) i sar. (2004) nađeno da se sadržaj *p*-hidroksibenzoeve (139  $\mu\text{g/g}$ ), *p*-kumarne (90  $\mu\text{g/g}$ ), i *t*-kafene kiseline (60  $\mu\text{g/g}$ ) menja u zavisnosti od sorte soje [4,58]. Obezmašćivanje je korak koji prethodi ekstrakciji polifenola iz biljnog materijala bogatog lipidima, (kao npr. soja) u cilju njihove efikasnije kvantifikacije. Prema istraživanjima Kim i sar. (2004) sadržaj polifenola u semenu soje znatno varira u toku skladištenja. Ispitan je sadržaj ukupnih fenola i pojedinačnih fenolnih jedinjenja u semenu devet sorti soje u periodu skladištenja od četiri godine. Rezultati su pokazali sa sadržaj ukupnih fenola varira od 0,36% do 0,42%, dok sa najveći sadržaj (od 0,42%) postiže u toku druge i treće godine skladištenja. Moguće je da do ovog povećanja sadržaja polifenola u semenu soje tokom njegovog skladištenja dolazi zbog smanjenja sadržaja vode u zrnu, što je prirodan proces. Sadržaj pojedinačnih fenolnih jedinjenja (ispitano je jedanaest polifenola) varira od 730  $\mu\text{g/g}$  do 1812,8  $\mu\text{g/g}$ , a najveća koncentracija je detektovana posle dve godine skladištenja. Ukupni sadržaj 11 fenolnih jedinjenja (sedam polifenolnih kiselina i 4 izoflavona) se kreće od 20,96% do 47,73% od ukupnih fenola i kao i u prethodnim istraživanjima najveće koncentracije fenola poseduje crna soja, a najveći sadržaj pojedinačnih polifenolnih frakcija je u zelenoj soji [59].

Ovo je u skladu sa istraživanjima Avila (Ávila) i sar. (2012), gde su simulirani uslovi ubranog starenja na tri genotipa soje. Rezultati su pokazali da se sadržaj ukupnih fenola povećava dok ne dostigne maksimum 622,23  $\text{mg/cm}^3$ , 678,52  $\text{mg/cm}^3$  i 593,66  $\text{mg/cm}^3$ , odnosno u periodima 24,67; 28,38 i 39,18 časova ubranog starenja semena (izlaganje zrna povišenim temperaturama, čime se smanjuje sadržaj vode u semenu) i počev od tog trenutka, došlo je do opadanja njihovog sadržaja u semenu soje. Sadržaj ukupnih flavonoida ispitivanih sorti raste počevši od nultog vremena starenja do maksimalno 73,14  $\mu\text{g/cm}^3$ , 85,20  $\mu\text{g/cm}^3$  i 85,23  $\mu\text{g/cm}^3$  u periodima 39,50; 40,00 i 17,33 časova, što predstavlja ponašanje slično prethodnom [60].

Osim hranljivih komponenti, zrelo zrno soje sadrži i antinutritivne komponente različite biološke aktivnosti. Glavni nosioci inhibitorne aktivnosti sirovog zrna soje su inhibitori proteaza, pre svega: Kunitz tripsin inhibitor [61] i Bovman-Birkov tripsin inhibitor [62]. To su supstance koje inhibiraju delovanje proteolitičkih enzima - tripsina, himotripsina,

karboksipeptidaza, sprečavaju razgradnju proteina u gastrointestinalnom traktu, a samim tim i njihovu resorpciju.

Njihovo prisustvo sprečava neposredno korišćenje sirove soje u ishrani ljudi i domaćih životinja i zahteva termičku obradu kako bi oni bili potpuno inaktivirani [63]. Umanjenje ili eliminisanje inhibitora tripsina u zrnju soje dovodi do poboljšanja nutritivnog kvaliteta zrna. Drugi važan antinutrijent prisutan u sojinom zrnju je fitin. Monogastrične životinje ne mogu da ga svare, a on umanjuje vezivanje i usvajanje fosfora i mikroelemenata (npr. Fe, Cu, Zn i sl.) u intestinalnom traktu ovih životinja, što dovodi, s jedne strane do smanjenog usvajanja ovih mineralnih elemenata [17,64], a s druge strane do zagađenja podzemnih voda fosforom iz životinjskih fekalija [65].

S druge strane, sojino zrno sadrži proteine sa sulfhidrilnim grupama koje igraju veoma važnu ulogu kao antioksidansi. Osim njihove uloge u hvatanju slobodnih radikala i prevenciji stresa [66], antioksidansi mogu smanjiti inhibitore tripsina, poput Kunitz-tripsin inhibitora (specifičnog za soju) [67]. Malenčić i sar. (2007) ističu da fenoli najviše doprinose antioksidativnoj aktivnosti zrna soje. Genotipovi sa niskim sadržajem fenola takođe imaju i nizak nivo antioksidativne aktivnosti. Rezultati ukazuju na to da sadržaj fenola treba posmatrati kao važno i specifično nutritivno i tehnološko svojstvo sojinog zrna i kao potencijalno merilo antioksidativne aktivnosti [68,17].

### 2.3. PROTEINI - OSNOVNE KARAKTERISTIKE

Proteini (grč. *proteos*-prvi, primarni, najvažniji) su veliki organski biomakromolekuli od 100 do približno 1000 aminokiselinskih ostataka, što odgovara relativnoj molarnoj masi ( $M_r$ ) od 10 do 200 kDa. Nastaju povezivanjem ostataka aminokiselina peptidnom vezom (-CO-NH-) u obično duge polipeptidne lance. Ove molekule je prvi opisao nemački hemičar Johanes Milder (Gerardus Johannes Mulder) [69], a naziv „protein“ predložio je njegov saradnik Berzelijus (Jöns Jacob Berzelius). Prvi protein koji je izdvojen je insulin (Frederik Sanger).

Proteini su gradivni elementi svakog živog organizma. Oni učestvuju u svim ćelijskim i međućelijskim procesima. Funkcija i svojstva proteina direktno zavise od redosleda aminokiselina u polipeptidnom lancu. Uloga im je:

gradivna (primarna funkcija)

kontraktilna (miogen)  
katalitička (enzimi)  
regulatorna (hormoni)  
transportna (hemoglobin)  
imunološka (antitela) i  
energetska (17,2 kJ/g) [70].

S obzirom na kompleksnost proteina, možemo razlikovati četiri nivoa njihove uređenosti, nastalih specifičnim vezivanjem lanaca aminokiselina, a koji određuju strukturu proteina. To su primarna, sekundarna, tercijarna i kvaternerna struktura.

**Primarna** struktura predstavlja prvi stepen u specifičnoj trodimenzionalnoj strukturi proteina. Definiše vrstu i redosled (*sekvencu*) aminokiselina, udeo pojedinih aminokiselina i raspored disulfidnih mostova u polipeptidnom lancu [71]. Raspored amino kiselina varira od proteina do proteina. Direktna informacija o rasporedu je sadržana u genima, a raspored disulfidnih mostova i 3D struktura zavisi i od drugih faktora. I najmanja promena u primarnoj strukturi može značajno uticati na ukupnu strukturu i funkcionisanje proteina [71].

**Sekundarna** struktura predstavlja način uvijanja (nabiranja) polipeptidnog lanca u prostoru, pri čemu se ne uzimaju u obzir interakcije između ostataka aminokiselina u bočnim lancima. Veze koje stabilizuju sekundarnu strukturu su: disulfidni mostovi, interakcije između polarnih grupa, vodonične veze, hidrofobne interakcije, Vander-Vaslove veze i druge. Sekundarna struktura podrazumeva lokalnu 3D strukturu, zasnovanu na pravilno raspoređenim vodoničnim vezama. Umotavanje polipeptidnog lanca se realizuje u tri tipa sekundarnih struktura i to:

**$\alpha$ -heliks** - uključuje strukturu u prostoru samo jednog polipeptidnog lanca pri čemu se on savija u spiralu;

**$\beta$ -plisirana struktura (nabrana  $\beta$ -konformacija)** - se obrazuje kada se dva ili više polipeptidnih lanaca ili segmenata jednog istog lanca povežu uzduž jedan sa drugim vodoničnim vezama u jednu plisiranu strukturu i

**$\beta$ -zavojnica** - pojavljuje se u globularnim proteinima, gde je oko polovina polipeptidnog niza uvijena u obliku  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -nabrane strukture, dok se preostali deo većinom nalazi u obliku  $\beta$ -zavojnice.

**Tercijarna** (trodimenzionalna struktura) predstavlja viši oblik organizacije proteina u prostoru u kojoj se nabiraju segmenti heliksa, plisirane strukture i  $\beta$ -zavojnice peptidnog lanca u trodimenzionalnu strukturu nativnog proteina ili proteinske subjedinice stvarajući globule ili fibrile. Promena tercijarne strukture uslovljava promenu bioloških (npr. enzimsko ili hormonsko dejstvo) i fizičkih osobina proteina. Proteini se klasifikuju na osnovu tercijarne strukture na *globularne*, koji mogu biti loptasti ili elipsoidni, i *fibrilarne* koji mogu biti jednostruki, dvostruki ili višestruki [72].

*Fibrilarni (fibrilni) proteini* su jako izduženi i pretežno se pojavljuju u obliku sekundarne strukture. Oni grade vlakna, od kojih su neka ugrađena u matrice od organskog ili neorganskog materijala, što dodatno doprinosi čvrstoći bioloških struktura u kojima se ovi molekuli nalaze. Fibrilarni proteini, imaju strukturnu i zaštitnu ulogu, a predstavljaju ključne komponente u biološkim strukturama. Nerastvorni su i ne mogu se dobiti u kristalnom stanju, što znatno otežava njihovo izolovanje i ispitivanje. *Globularni (sferoidni) proteini* se sastoje iz peptidnih lanaca koji su izuvijani i namotani na kompaktan način. Molekuli su manje ili više sfernog oblika, slično elipsoidu ili lopti. Globularni proteini su enzimi i drugi brojni biološki aktivni proteini. Kod globularnih proteina hidrofobne grupe su orijentisane unutar globule, a polarne su na površini molekula što omogućava rastvorljivost ovih proteina u vodi.

**Kvaternerna** struktura je finalni oblik strukture proteina nastala interakcijom različitih polipeptidnih lanaca. Kvarternu strukturu proteina srećemo, na primer, kod hemoglobina. Na Slici 2.7. dat je primer (a) primarne, (b) sekundarne, (c) tercijarne i (d) kvaternerne strukture protiena.

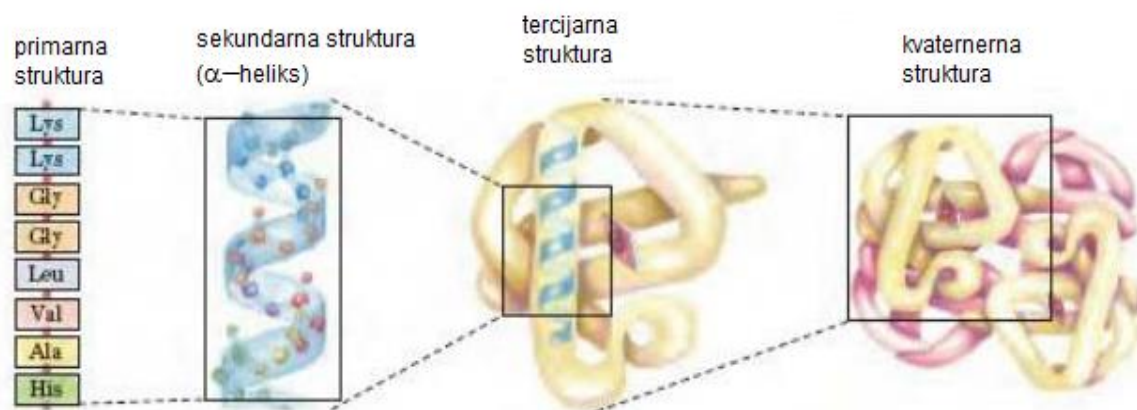
Proteini biljaka su važan izvor esencijalnih aminokiselina i osnovna hrana ljudi i životinja. U ishrani ljudi biljni proteini su zastupljeni sa 80%, proteini životinja sa 15%, a riba sa 5%. Do danas je iz biljaka izolovan veliki broj proteina, te postoji potreba za njihovom klasifikacijom. Zbog nepoznavanja primarne strukture većine proteina, nije se mogla uvesti hemijska klasifikacija, te je pokušano da se biljni proteini klasifikuju prema:

složenosti,

subcelularnoj lokaciji,

funkciji,

elektroforetskoj pokretljivosti i dr.



Slika 2.7. Nivoi strukture proteina [73]

Nijedna od navedenih klasifikacija nije kompletna i one se međusobno mogu dopunjavati. U praksi se najčešće koristi klasifikacija proteina prema složenosti, na osnovu koje se proteini mogu podeliti u dve grupe i to:

proste (nekonjugovane) proteine i  
složene (konjugovane) proteine.

Pod prostim (nekonjugovanim) proteinima smatraju se oni koji hidrolizom daju samo aminokiseline i dele se na *globularne* i *fibrilarne* proteine.

Još je Osborn (Osborne) 1924. godine globularne proteine biljaka klasifikovao na osnovu njihove rastvorljivosti [74] i ova podela na četiri grupe je još i danas u upotrebi (Tabela 2.3).

Tabela 2.3. Podela globularnih proteina na osnovu rastvorljivosti [74]

Naziv proteina	Rastvorljivost	Izvor
<b>Albumini</b>	Rastvorni su u destilovanoj vodi pri neutralnim ili slabo kiselim pH, zagrevanjem lako koagulišu.	Najzastupljeniji su u zrnju žitarica i leguminoza: <i>leukozin</i> - pšenica, ječam, raž; <i>legumelin</i> - soja, grašak, sočivo.
<b>Globulini</b>	Nerastvorni su u vodi, a rastvorni u razblaženim rastvorima soli, zagrevanjem teško koagulišu	Veoma su rasprostranjeni u semenu biljkama: <i>legumin</i> - grašak, sočivo; <i>fazeolin</i> - pasulj; <i>konglutin</i> - lupina; <i>glicinin</i> - soja; <i>edestin</i> - konoplja; <i>amandin</i> - badem, breskva, kajsija; <i>vicilin</i> – grašak; <i>avenalin</i> - ovas.
<b>Glutelini</b>	Nerastvorni u vodi, rastvorima soli i EtOH, a rastvorni u jakim kiselinama i bazama	To su rezervni proteini semena, najzastupljeniji su: <i>orizenin</i> – pirinač; <i>glutenin</i> – pšenica, kukuruz.
<b>Prolamini</b>	Rastvorni su u 70% etanolu, ali ne i u apsolutnom etanolu	To su rezervni proteini semena, zastupljeni su u zrnastim kulturama: <i>zein</i> – kukuruz; <i>gliadin</i> - pšenica, raž; <i>hordenin</i> – ječam.

Složeni (konjugovani) proteini ili proteidi sadrže pored proteinskog i neproteinski deo koji se naziva prostetičnom grupom. Ona je obično vezana za proteinski deo molekula kovalentnim, heteropolarnim ili koordinativnim hemijskim vezama. Prostetična grupa može biti neki ugljeni hidrat, lipid, nukleinska kiselina, metal, pigment, fosfatni ostatak



i dr. Prema prirodi prostetične grupe složeni proteini (konjugovani proteini ili proteidi) se mogu podeliti u nekoliko grupa i to:

**Nukleoproteini** - su složeni proteini jedra, hromozoma, ribozoma i mitohondrija. Oni kao neproteinsku komponentu sadrže nukleinske kiseline.

**Lipoproteini** - sadrže lipid kao neproteinsku komponentu koji je veoma čvrsto vezan za ostatak proteina tako da se ova dva dela molekula veoma teško razdvajaju elektroforezom, ultracentrifugovanjem i taloženjem solima teških metala. Lipidna komponenta je najčešće *lecitin*, *kefalin* ili *holesterol*. Najvećim delom se nalaze u ćelijskoj membrani, mitohondrijama i drugim ćelijskim strukturama.

**Glikoproteini** - sadrže ugljene hidrate, od kojih najčešće oligosaharide kao prostetičnu grupu. Oni mogu biti sastojci ćelijskih membrana, enzimi (kao npr. peroksidaza), lektini (fitohemaglutin koji izaziva aglutinaciju eritrocita), hormoni, otrovni proteini (ricin iz semena ricinusa), komponente sluzi i dr. Mnogi glikoproteini transportuju supstance kroz membrane.

**Metaloproteini** - su konjugovani proteini sa metalima. U metaloproteinima metali su funkcionalni sastojci ovih molekula i obično nosioci njihovih katalitičkih i regulatornih funkcija. Značajniji metaloproteini koji sadrže gvožđe su citohromi, respiratorni pigmenti, enzimi (npr. katalaza i dr) itd. Cink je prisutan u karboanhidrazama, a neki glikolitički enzimi i proteaze sadrže magnezijum.

Pored napred navedenih klasifikacija proteini se mogu klasifikovati i po osnovu njihove *biološke funkcije* na više grupa koje obuhvataju:

enzime,

rezervne proteine (proteini semena),

metaboličke proteine (proteini citoplazme),

membranske proteine itd.

### 2.3.1. Najzastupljeniji proteini u semenu soje

U semenu soje, kao što je već rečeno, zastupljenost proteina je od 32 do 40%, u zavisnosti od sorte, uslova gajenja itd. Proteini soje sadrže sve esencijalne aminokiseline u dovoljnoj količini tako da prerađevine od soje predstavljaju kvalitetnu hranu. Sojini proteini se koriste u ishrani kao nutritivni dodaci koji zamenjuju proteine poreklom iz životinjskih proizvoda kao što su mleko, meso i jaja. Glavna prednost proteina soje u poređenju sa proteinima iz drugih biljnih izvora je dobar balans u sastavu aminokiselina. Iz tog razloga se sve više teži razvoju novih tehnoloških postupaka izolovanja proteina koji će zadovoljiti dva osnovna kriterijuma: visok prinos i očuvanje tehnološko-funkcionalnih svojstava koje poseduju proteini soje.

### 2.3.2. Strukturna svojstva proteina soje

Približno 90% proteina u soji, uglavnom globulini, su u obliku dehidriranih skladišnih proteina. Preostali proteini sastavljeni su od intracelularnih enzima (lipoksigenaze, ureaze, amilaze), hemaglutinina, protein inhibitora i membranskih lipoproteina. Brojne studije pokazuju da su proteini soje prilično heterogeni. Glavne komponente su klasifikovane prema njihovim sedimentacionim karakteristikama koje zavise od uslova, pufera, pH, ali i drugih faktora. Shodno tome, sojini proteini se mogu podeliti u četiri glavne frakcije koje su poznate kao 2S, 7S, 11S i 15S, a čiji je udeo u zrnu prikazan u Tabeli 2.4. Koliki je sadržaj proteina u ovakvim frakcijama direktno zavisi od načina uzgoja soje i vremenskih prilika [75].

**Tabela 2.4.** Približna (aproksimativna) distribucija glavnih komponenata sojinih proteina [75]

Frakcija	Udeo, %	Glavne komponente
2S	8	Tripsin inhibitor, citohrom
7S	35	Lipoksigenaze, amilaze, globulini
11S	52	globulini
15S	5	polimeri

Komponente male molarne mase, tj. **2S** (8000-20000 Da) su sastavljene od tripsina inhibitora, citohroma i drugih globulina. Inhibitori tripsina smanjuju biološku aktivnost tripsina uključenog u razgradnju proteina tokom digestije. Kao takvi, imaju antinutritivni efekat i moraju se termički inaktivirati u cilju poboljšanja svarljivosti. U zavisnosti od dalje namene, ovaj proces može negativno uticati na funkcionalna svojstva proteina.

Skladišni proteini, **7S** (konglicinin) i **11S** (glicinin), su glavne komponente proteina soje. Udeo ovih proteina u ukupnim proteinima soje je preko 80%. Glavni nedostatak skladišnih proteina semena soje je nizak sadržaj aminokiselina sa sumporom, metionina i cisteina koje predstavljaju važne nutritivne komponente proteinskog obroka [76]. Glicinin, osnovni protein soje, je glavni predstavnik 11S frakcije i sadrži znatno više metionina i cisteina u odnosu na  $\beta$ -konglicin. Glicinin (360 kDa) je protein sa kompaktnom kvaternom strukturom koja je stabilizovana preko disulfidnih, elektrostatičkih i hidrofobnih interakcija. Sastoji se od šest subjedinića, od kojih se svaka sastoji od kiselog i baznog polipeptida koji su međusobno spojeni disulfidnim mostovima preko ostatka cisteina. Te subjediniće se pakuju tako da formiraju šuplje, spljoštene cilindre.  $\beta$ -Konglicin je glavni protein 7S frakcije sa molarnom masom od 150-180 kDa. Sastoji se od tri subjediniće  $\alpha'$ ,  $\alpha$  i  $\beta$  čijom interakcijom mogu da nastanu sedam izomera. Originalni konglicin je glikoprotein koji sadrži ugljene hidrate [77]. Za frakciju **15S** se pretpostavlja da predstavlja dimer glicina.

### 2.3.3. Forme proteinskih frakcija proteina soje

Danas se koriste proteini soje u različitim oblicima kako zbog svojih nutritivnih karakteristika, tako i zbog svojih funkcionalnih efekata. Oljuštena i obezmašćena soja se prerađuje u četiri vrste visoko proteinskih komercijalnih proizvoda: sojino brašno, koncentrat proteina, izolati proteina i teksturisani proteini soje.

Sojino brašno predstavlja najmanje rafinisane forme proteina koje variraju u sadržaju masti, veličini čestica, teksturi i stepenima termičkog tretmana. Minimalni sadržaj proteina se kreće od 40 do 54%. Oko polovina ugljenih hidrata sojinog brašna su oligosaharidi (stahioza, rafinoza), a druga polovina su polisaharidi koji su nerastvorni u vodi ili alkoholu. Ima široku primenu u pekarskoj industriji [78].

Koncentrati proteina soje su rafinisaniji od sojinog brašna i sadrže 70% ili više proteina. Koncentrati proteina se pripremaju iz obezmašćenih pahuljica ili sojinog brašna uklanjanjem oligosaharida, dela pepela i još nekih komponenti. Zahvaljujući višem sadržaju proteina u odnosu na sojino brašno, sojini koncentrati se mogu koristiti tamo gde je potrebno dodati više proteina ili postići veću funkcionalnost. Pored toga što se postiže veći sadržaj proteina nego sa sojinim brašnom, primenom sojinih koncentrata se smanjuje u velikoj meri sadržaj šećera koji izazivaju flatus (nadutost) i postiže blaži profil ukusa. Zbog smanjenja sadržaja šećera, učestanost pojave Mailardove reakcije u koncentratima soje je umanjena, te je boja ovih sojinih proizvoda svetlija. To omogućava bolju formulaciju i primenu u sistemima sa ribom i pilećim mesom.

Izolati proteina predstavljaju najprerađeniju formu proteina sa sadržajem od preko 90% proteina. Oni se pripremaju uklanjanjem polisaharida nerastvornih u vodi kao i oligosaharida.

Teksturisani proteini soje se dobijaju ili upredanjem u vlakno i kombinacijom vlakna u slojeve da bi se dobila željena tekstura ili termoplastičnim procesom istiskivanja vode. Teksturizacija predstavlja razvoj fizičke strukture koja će prilikom konzumacije odavati osećaj kao da se jede meso [79]. Ovi proizvodi, poznati kao teksturni biljni proteini, mogu simulirati strukture vlakna mesa. Karakteriše ih strukturni integritet koji se zadržava i prilikom hidratacije, kuvanja, sterilisanja i sličnih postupaka. Imaju visoku moć apsorbovanja vode, masti i mesnih sokova, stabilizuju sistem, sprečavaju izdvajanje masti i deluju antioksidativno. Druga mogućnost su hidrolizovani sojini proteini. Stepent hidrolize u velikoj meri određuje funkcionalnost krajnjih proizvoda prerade sojinog brašna. Nizak stepent hidrolize rezultira krajnje funkcionalnim penušavim agensima, a visok stepent hidrolize rezultira hidrolizovanim biljnim proteinima (HBP) koji se koriste u supama i sosevima kao pojačivači ukusa [77].

### 2.3.4. Funkcionalna svojstva proteina soje

Proteini soje u svojim raznim oblicima poseduju funkcionalna svojstva kao što su: rastvorljivost, stabilnost koloida, formiranje gela, emulgujuća svojstva, penjenje i adhezija/kohezija, koje ih čine veoma korisnim u prehrambenoj industriji (Tabela 2.5) Koje od navedenih svojstava će biti dominantno u velikoj meri zavisi od fizičko-

hemijskih i strukturnih svojstava proteina, a to su: oblik i veličina, aminokiselinska sekvenca, udeo hidrofobnih/hidrofilnih delova, tercijarna i kvaternerna struktura [80].

**Tabela 2.5.** Funkcionalna svojstva proteina soje i njihova primena u prehrambenoj industriji [80]

<b>Funkcionalna svojstva</b>	<b>Forma soje</b>	<b>Primena u prehrambenoj industriji</b>
Emulgujuća svojstva	Sve forme	Torte, supe, kobasice i hleb
Apsorpcija masti	Sve forme	Viršle, kobasice, pljeskavice
Stabilizacija	Sve forme	Zaleđeni dezerti, kobasice, supe i viršle
Apsorpcija vode	Brašna i koncentрати	Poslastice, hlebovi, torte i testenina
Tekstura		
Viskoznost	Sve forme	Supe, sosevi i čili.
Formiranje gela	Izolati	Imitacija mlevenog mesa.
Formiranje vlakana	Izolati	Imitacija mesa
Formiranje testa	Sve forme	Peciva
Formiranje filma	Izolati	Viršle i kobasice
Kohezija	Brašna i koncentрати	Peciva, fermentisani proizvodi na bazi soje, testenina
Adhezija	Koncentрати i izolati	Rolati, paštete i kobasice
Elastičnost	Izolati	Peciva i fermentisani proizvodi na bazi soje
Kontrola boje:		
Izbeljivanje	Brašna	Hleb
Tamnjenje	Brašna	Hleb palačinke i vafli
Aeracija	Izolati	Šlag, poslastice

U mnogim slučajevima, primena sojinih proteina je limitirana zbog nekompatibilnosti između njihove rastvorljivosti i drugih funkcionalnih svojstava. Da bi se dostigle željene vrednosti proteini se podvrgavaju raznim fizičkim, hemijskim i enzimskim

modifikacijama. Primjenjeni postupci uzrokuju fizičke i hemijske promene, a time i različite funkcionalne karakteristike proteinskih proizvoda od soje.

#### **2.4. EFEKAT SOJE NA ZDRAVLJE LJUDI**

Fenolne kiseline, lignin i izoflavoni detektovani u soji imaju višestruku korist za zdravlje ljudi i biljaka. Sojini izoflavoni mogu da pomognu u smanjenju rizika od osteoporoze. Nekoliko istraživanja sugeriraju da izoflavon genistein inhibira lomljenje kostiju i ima efekat sličan efektu estrogena na održavanje koštanog tkiva. Soja indirektno poboljšava zdravlje kostiju. Ishrana bogata životinjskim proteinima utiče na veće izlučivanje kalcijuma iz organizma. Ako umesto proteina životinjskog porekla konzumiramo soju (i njene proteine) sprečava se gubitak kalcijuma iz kostiju. Soja je jedan od najbogatijih izvora supstanci pod imenom fitoestrogeni. Fitoestrogeni se spajaju sa receptorima estrogena i tako podražavaju efekte pravog estrogena, stoga soja smanjuje simptome koji nastaju kod žena u menopauzi [81]. Soja smanjuje rizik od srčanih bolesti: u zemljama u kojima se soja redovno koristi u ishrani, niži je nivo oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti. Istraživači smatraju da soja pomaže u prevenciji srčanih bolesti tako što smanjuje ukupnu količinu holesterola, sprečavajući pojavu zakrečenja krvnih sudova. I ovi pozitivni efekti se pripisuju sojinim izoflavonima. Genistein takođe može da utiče na povećanje fleksibilnosti krvnih sudova. Izoflavoni i fenoli soje imaju ulogu antioksidanasa u borbi protiv srčanih oboljenja i nekih vrsta kancera koji su u vezi sa nivoom hormona, kao što su rak dojke, prostate, debelog creva [81]. Vlakna iz soje vezuju toksine koji utiču na razvoj raka debelog creva. Studija Sagara i sar. (2004) iznosi nalaz da prehrana koja obuhvata soju značajno utiče na smanjenje pritiska i ukupnog holesterola, povećava nivo HDL-a („dobrog holesterola“), te sekvstrira holesterol nakupljen u arterijama i omogućava njegovo izlučivanje iz tela. Vlakna prisutna u znatnoj količini u soji vezuju masti i holesterol iz hrane tako da se on manje apsorbuje u organizmu. Soja smanjuje slepljivanje krvnih pločica, a pretpostavlja se da je razlog tome što je dobar izvor omega-3 masnih kiselina, koje sprečavaju zakrečavanje krvnih sudova i druge patogene procese u vezi sa tim. Takođe, povoljno utiče na nivo šećera u krvi, dobar je izvor proteina i dijetetskih

vlakana obolelima od dijabetesa koji imaju problema s konzumiranjem životinjskih proteina. Soja takođe snižava udeo triglicerida, koji je povišen kod dijabetičara [82].

Proteini su osnovne gradivne materije odgovorne za rast i razvoj mišića, kostiju, ligamenata i tkiva. Takođe, pomažu u borbi protiv infekcija, jer jačaju imunološki sistem i neophodni su za održavanje funkcija organizma kao što su varenje, metabolizam i cirkulacija. Našem telu su potrebni ovi makronutrijenti za proizvodnju enzima, hormona i drugih telesnih hemijskih jedinjenja. Aminokiseline iz soje, takođe učestvuju u proizvodnji insulina u organizmu, što je značajno za dijabetičare. Nedostatak proteina može izazvati gubitak mišićne mase, srčanu slabost, slab imunološki sistem pa čak i smrt u ekstremnim slučajevima [83].

## **2.5. METODE IZOLOVANJA POLIFENOLA I PROTEINA**

Ekstrakcija bioaktivnih jedinjenja iz biljnih materijala je prvi korak u upotrebi fitohemikalija kao dodataka u proizvodnji dijetetskih suplemenata, sastojaka hrane, farmaceutskih i kozmetičkih proizvoda. Korak koji prethodi ekstrakciji je usitnjavanje, mlevenje i homogenizacija biljnog materijala da bi se povećala dodirna površina i omogućio bolji kontakt rastvarača za ekstrakciju sa uzorkom [84]. Opšte je poznato da prinos ekstrakcije zavisi od vrste rastvarača različitih polariteta, vremena ekstrakcije i temperature, odnosa uzorak-rastvarač kao i hemijskog sastava i fizičkih karakteristika uzoraka.

### **2.5.1. Ekstrakcija polifenola**

Fenoli se mogu izdvojiti iz svežeg, zamrznutog ili sušenog biljnog materijala. Sušenje uzorka vrši se zamrzavanjem ili sušenjem u struji vazduha. Generalno, sušenje zamrzavanjem dovodi do manjih gubitaka fenolnih jedinjenja u uzorcima biljaka u odnosu na sušenje na vazduhu. Rastvorljivost fenola je determinisana hemijskim sastavom biljnog materijala, kao i polarnošću korišćenog rastvarača. Biljni materijal može sadržati niz fenolnih jedinjenja koja variraju od jednostavnih (npr. fenolne kiseline, antocijani) do visoko polimerizovanih supstanci (npr. tanini) u različitim količinama. Fenoli su najčešće vezani sa drugim biljnim komponentama kao što su

ugljeni hidrati i proteini. Zbog svega navedenog ne postoji univerzalni postupak ekstrakcije pogodan za ekstrakciju svih biljnih fenola. Ekstrakcijom se, u zavisnosti od rastvarača, izoluju i neke nefenolne supstance poput šećera, organskih kiselina i masti. Kao rezultat toga, potrebni su dodatni koraci kako bi se ove neželjene supstance uklonile iz samog ekstrakta. Najčešće korišćeni rastvarači za ekstrakciju fenola iz biljnih materijala su metanol, etanol, aceton, etil-acetat i njihove kombinacije sa različitim udelom vode. Izbor pravog rastvarača (polarnost, pH vrednost, sposobnost za stvaranje vodoničnih veza, itd.) utiče na količinu i brzinu ekstrakcije polifenola, zavisno od tipa biljnog materijala. Konkretno, metanol je efikasniji za ekstrakciju fenola niže molarne mase, dok se molekuli velike molarne mase bolje ekstrahuju u vodenom acetonu [85]. Izbor rastvarača se vrši i u zavisnosti od svrhe ekstrakcije, tj. dalje upotrebe ekstrahovanih polifenola, pa se često koristi i etanol jer je bezbedan za ljudsku ishranu.

### 2.5.2. Hidroliza

Nerastvorni fenoli su kovalentnim vezama povezani sa strukturnim jedinicama ćelijskog zida kao što su celuloza, hemiceluloza, lignin, pektin i fibrilarni strukturni proteini [13]. Postoje različiti putevi apsorpcije vezanih fenolnih jedinjenja tokom varenja u gastrointestinalnom traktu u koje su uključeni mikroorganizmi, enzimi, pa čak i transporteri glukoze. Takođe postoji nekoliko prehrambenih procesa koji pojačavaju oslobađanje vezanih polifenola. Oni obuhvataju fermentaciju (enzimska, mikrobiološka itd.) kao i termomehaničke procese, kao što su ekstruziono kuvanje i alkalna hidroliza. Fermentacija povećava sadržaj slobodnih fenola i antioksidativnu aktivnost biljnog uzorka.

U voću i povrću sa većim sadržajem vode, u proseku oko 24% od ukupnih fenolnih jedinjenja nalazi se u vezanom obliku (jabuke-6,5%; banane-33,5%; narandže-24,3%; šargarepa-37,6%; crvena paprika-9,8%) [11,86]. S druge strane, u žitaricama i leguminozama sa niskim sadržajem vode procenat vezanih fenola je znatno veći (kukuruz-85%; pšenica-75%; pirinač-62%), što je razumljivo s obzirom da semena sazrevaju gubitkom vode [11,12].



S obzirom na gore navedeno, priprema uzorka može uključivati baznu, kiselinsku ili enzimsku hidrolizu da bi se oslobodili vezani fenoli i omogućila njihova ekstrakcija, a potom i kvantifikacija iz biljnog materijala.

Bazna i kiselinska hidroliza je najčešći način oslobađanja fenolnih jedinjenja [87]. Glavne promjenljive ovih hemijskih hidroliza su koncentracija kiseline/ baze, vreme hidrolize i temperatura. Tretman kiselinom raskida glikozidne veze makromolekula i oslobađa jednostavne šećere, ali generalno ostavlja estarske veze u tako produkovanim šećerima netaknute [88]. S druge strane, kiselinska hidroliza na povišenim temperaturama rezultira gubitkom nekih fenola [89,90].

Baznom hidrolizom se efikasnije oslobađaju fenolna jedinjenja i smanjuje njihov gubitak, nego u uslovima kiselinske hidrolize [91]. Na primer, bazna hidroliza prouzrokuje gubitak od 4,8 % ferulne kiseline u kukuruznom zrnu u odnosu na 78% gubitka nakon kiselinske hidrolize [89], tako da se ista često koristi za ekstrakciju polifenola i srodnih jedinjenja iz zrna žitarica [88,90,91]. Bazna hidroliza raskida estarske veze kojima su fenolne kiseline vezane za polisaharide ćelijskog zida i predstavlja efikasan način da se oslobode fenolna jedinjenja iz tih polisaharida. Obično se bazna hidroliza izvodi na sobnoj temperaturi [92] u trajanju od 15 min, pa preko noći (do 16 h), uz korišćenje različitih koncentracija NaOH različitih molariteta (1-4 M) [87,93]. U velikom broju radova proučavan je uticaj dodavanja askorbata (AA) i etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA) u cilju sprečavanja oksidativnih gubitaka fenolnih kiselina tokom bazne hidrolize [94-96]. Dodavanje 10 mM rastvora EDTA i 1% rastvora AA u potpunosti sprečava degradaciju fenolnih kiselina podložnih oksidaciji. Kiselinska hidroliza se obično izvodi uz dodatak koncentrovane hlorovodonične kiseline, sa ili bez 10 mM rastvora EDTA i 1% rastvora AA, na povišenoj temperaturi (85°C) u trajanju od 30 minuta [96].

Enzimaska hidroliza predstavlja mnogo specifičniji i efikasniji način da se oslobode vezana fenolna jedinjenja. Enzimi koji hidrolizuju ugljene hidrate, kao što su pektinaze, celulaze, amilaze, hemicelulaze i glukanaze se uspešno koriste za oslobađanje polifenola. Ovi enzimi igraju ulogu u razaranju matriksa ćelijskog zida biljaka i stoga olakšavaju ekstrakciju polifenola [87,97, 98].

### 2.5.3. Ekstrakcija proteina

Biljni materijal sadrži širok opseg proteina različitih svojstava, koja zahtevaju specifične uslove ekstrakcije i prečišćavanja. Biljne ćelije, za razliku od životinjskih imaju čvrsti ćelijski zid od celuloze, koji dodatno može biti ojačan lignifikacijom. Pored toga, često imaju veliku vakuolu koja sadrži sekundarne biljne proizvode (posebno fenole i polifenole), organske kiseline i proteinaze. Ove vakuole se cepaju prilikom mlevenja biljnog materijala i oslobođeni sadržaj može modifikovati, inaktivirati, precipitirati ili degradirati proteine. Shodno tome, potrebne su specifične tehnike za razaranje ćelijskih zidova i istovremenu zaštitu proteina od oslobođenih štetnih komponenti. Izbor ekstrakcionih sredstava zavisi od prirode proteina koje želimo da ekstrahujemo. Kao i kod polifenola, ekstrakcijom se, u zavisnosti od rastvarača izoluju i neke druge supstance poput šećera, organskih kiselina i masti, pa su potrebni prethodni koraci obezmašćivanja biljnog materijala i dodatni koraci prečišćavanja dobijenih izolata.

Tradicionalno, proteinski izolati soje dobijaju se iz obezmašćenih pahuljica ili sojinog brašna, ekstrakcijom razblaženim alakalnim rastvorom (pH 8-9), uz naknadno centrifugiranje radi odvajanja nerastvornih materija, čime se dobijaju proteini soje, oligosaharidi i minerali. Zatim se vrši zakišeljavanje disperzije do pH vrednosti 4,5 korišćenjem sumporne, fosforne ili hlorovodonične kiseline i naknadno ispiranje radi uklanjanja neproteinskih rastvornih supstanci, neutralizacija i na kraju sušenje u sprej sušnici [99].

Generalno, voda se koristi za ekstrakciju proteina rastvornih u vodi, 5% rastvor natrijum-hlorida za ekstrakciju globulina; 70% etanol za ekstrakciju prolamina, dok se 1% rastvorom natrijum-hidroksida efikasno ekstrahuju glutelini.

### 2.5.4. Primena novih tehnika u cilju poboljšanja ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala

U poslednjih nekoliko decenija, istraživanja u oblasti ekstrakcionih tehnologija su se uglavnom fokusirala na efikasne i inovativne tehnike za preradu biljnog materijala, kao ekološke alternative za dobijanje i prečišćavanje bioaktivnih jedinjenja. Neke od

inovativnih tehnika su ekstrakcija superkritičnim fluidima, primena impulsnih električnih polja, daleko-infracrveno zračenje, ekstrakcija subkritičnom vodom, primena mikrotalasa, ultrazvuka visoke snage i druge.

Daleko-infracrveno zračenje (FIR) (na engl. *Far Infrared Radiation*) - može efikasno osloboditi vezane fenole iz biljnog matriksa [100] i aktivirati prirodne antioksidanse male molarne mase [101]. FIR zraci su elektromagnetni talasi duži od 4  $\mu\text{m}$ , ali kraći od mikrotalasa ( $\lambda > 0,1 \text{ cm}$ ) koji prenose toplotu u centar materijala i sposobni su da razbiju kovalentne veze fenolnih jedinjenja (poput flavonoida i tanina) sa matriksom [101].

Ekstarkcija pomoću impulsnog električnog polja (PEF) (na engl. *Pulsed Electric Field technology*) se zasniva na primeni visokog napona impulsnog električnog polja (PEF) čime se povećava poroznost biljnih ćelija, a time i njihova dostupnost dejstvu rastvarača [102].

Ekstrakcija superkritičnim fluidima (SFE) (na engl. *Solid Phase Extraction*) je postupak u kom se kao rastvarač koristi fluid koji se nalazi u superkritičnom stanju, to jest, na temperaturi iznad svoje kritične temperature i pritisku iznad svog kritičnog pritiska. Kao ekstrakciono sredstvo najčešće se koristi ekološki ugljen-dioksid zbog relativno niskog kritičnog pritiska (73,8 bar), niske kritične temperature (31,06 °C), poželjnih svojstava i niske cene. Modifikacijom različitih procesnih parametara, kao što su protok ugljen-dioksida, pritisak i temperatura ekstrakcije, kontroliše se proces ekstrakcije i kvalitet dobijenog ekstrakta. Ovaj energetski efikasan proces pripada tzv. „čistoj tehnologiji“, jer nema sekundarnih proizvoda štetnih za životnu sredinu i kao takav zauzima značajno mesto u prehrambenoj industriji [103-106].

Ekstrakcija subkritičnom vodom sprovodi se na temperaturi između 100 (tačka ključanja) i 374°C (kritična tačka) i pritiscima dovoljno visokim da se održi tečno stanje vode [107]. Sa modifikacijom svojstava vode na povišenoj temperaturi (smanjena permitivnost, viskozitet i površinski napon, kao i povećan difuzioni karakter vode), kapacitet fluida za rastvaranje analita se povećava.

Ekstrakcija mikrotalasila (na engl. *Microwave Assisted Extraction*) se zasniva na primeni mikrotalasnog zračenja koje predstavlja nejonizujuće zračenje frekvencije između 300 MHz i 300 GHz, pozicionirano između radio talasa i IR-zraka u elektromagnetnom spektru. Zasniva se na direktnom dejstvu talasa na materijale koji

imaju sposobnost da konvertuju deo elektromagnetne energije u toplotu. Mikrotalasi se sastoje od dva oscilujuća, međusobno upravna polja, električnog i magnetnog, koje je i odgovorno za zagrevanje. Sam proces zagrevanja mikrotalasima se može objasniti pomoću dva fenomena, jonske kondukcije i rotacije dipola. Jonska kondukcija nastaje pod uticajem električnog polja kao posledica elektroforetske migracije jona. Otpor rastvora usled migracije jona stvara trenje koje dovodi do zagrevanja rastvora. Rotacija dipola podrazumeva orijentisanje molekula, pod uticajem mikrotalasa, kako bi uskladili kretanje sa pravcem električnog polja. Dolazi do vibracije molekula i generisanja toplote uzrokovane trenjem. Ova dva mehanizma se obično pojavljuju istovremeno [108]. Zagrevanje smeše rastvarača direktnom interakcijom sa slobodnim molekulima prisutnim u sistemu dovodi do ubrzanog razaranja biljnog tkiva i oslobađanja komponenti u rastvarač [109].

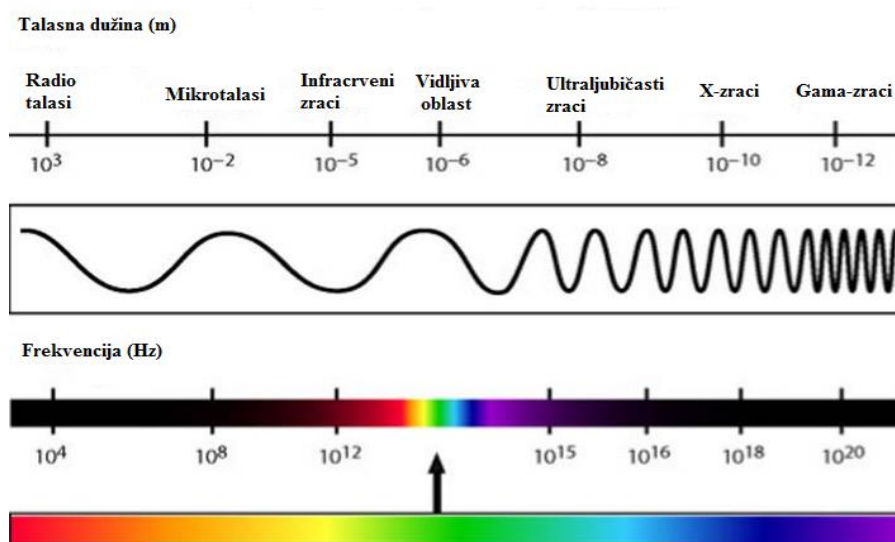
Brojni literaturni podaci pokazuju da se primenom mikrotalasa skraćuje vreme reakcije i povećava prinos i čistoća dobijenih produkata [110,111]. Dodatna prednost tehnike je ta što kombinuje visoku temperaturu i pritisak za optimalno oslobađanje bioaktivnih supstanci uz istovremeno razaranje ćelijskog zida [112]. Danas postoje dva komercijalno dostupna sistema za ekstrakciju mikrotalasima, otvoren i zatvoren sistem (na engl. *open-vessel, closed-vessel system*). U otvorenom sistemu ekstrakcija se vrši pri atmosferskom pritisku, dok se u zatvorenom sistemu ekstrakcija odigrava pri kontrolisanom pritisku i temperaturi.



**Slika 2.8.** Mikrotaladni reaktor korišćen za pretretman obezmašćenog sojinog brašna

U otvorenom sistemu, koji se uglavnom koristi za ekstrakciju, ekstrakcioni sud sa uzorkom i rastvaračem se izlaže direktnom dejstvu mikrotalasa (generisani magnetronom), pri kontrolisanim uslovima temperature i na atmosferskom pritisku. Temperatura u sistemu je kontrolisana mikrotalasnom snagom koja određuje količinu energije koja se prenosi na uzorak i koja se dalje konvertuje u toplotu. Snaga koja se u ovom sistemu postiže, kreće se od 0 do 300 W, a brzina zagrevanja je 2–6 °C/s. Praćenje postignute temperature se vrši preko temperaturnog senzora (infracrveni senzor ili sonda na bazi optičkih vlakana).

Ekstrakcija ultrazvukom niske frekvencije i jake snage (na engl. *Ultrasound Assisted Extraction*) je takođe u fokusu savremenih istraživanja. Ultrazvučni talas predstavlja mehanički talas frekvence iznad 20 kHz koje ljudsko uho ne može da čuje (Slika 2.9) i klasifikuje se u dve kategorije: ultrazvuk niske jačine (visoka frekvencija-slaba snaga) i ultrazvuk visoke jačine (niska frekvencija-jaka snaga). Snaga ultrazvuka niske jačine je relativno mala ( $1 \text{ W cm}^{-2}$ ), sa opsegom frekvencije od 5-10 MHz i on se najčešće primenjuje u medicini kao i u dijagnostičkoj analizi prehrambenih proizvoda, dok je nešto jača snaga karakteristična za ultrazvuk visoke jačine ( $10\text{-}1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) kao i frekvencija od 20-100 kHz, pa kao takav on ima letalan efekat na mikroorganizme i primenjuje se kao tretman prilikom čuvanja hrane [113].



Slika 2.9. Spektar elektromagnetnog zračenja (preuzeta uz obradu, od Donia (Donya) i sar. (2014)) [114]

Dejstvom ultrazvuka visokog intenziteta, u tečnom medijumu dolazi do naizmenične smene ciklusa visokog pritiska (kompresija-sabijanje) i niskog pritiska (razuđenost-širenje). Tokom ciklusa niskog pritiska nastaju mali vakuumski mehurići ili praznine u tečnom medijumu. Kada mehurići postignu veličinu pri kojoj više ne mogu da apsorbuju energiju, oni snažno implodiraju tokom ciklusa visokog pritiska, uzrokujući rast temperature, pritiska i pojavu hidrodinamičkih smicajnih sila na vrhu sonde. Ovaj fenomen naziva se kavitacija. Istraživanja su pokazala da je frekvencija ultrazvuka obrnuto proporcionalna veličini mehura, što znači da ultrazvuk visoke jačine stvara veće kavitacione mehure izazivajući povećanje temperature i pritiska u kavitacionoj zoni [115]. Veoma jake sile smicanja koje nastaju vrše mehaničko oštećenje ćelijskog zida i poboljšavaju oslobađanje unutarćelijskog materijala.

Osnovni parametri koji utiču na efikasnost ekstrakcije ultrazvukom su jačina ultrazvučnih talasa, dužina ultrazvučnog tretmana i uslovi sredine u kojoj se izvodi reakcija (temperatura, pritisak, pH vrednost i jonska jačina rastvora). Ultrazvučni tretman prehrambenih proizvoda dovodi do promenama fizičko-hemijskih karakteristika mnogobrojnih izvora proteina, koristi se i u procesima sterilizacije, ekstrakcije, sušenja i emulzifikacije prehrambenih proizvoda [116]. Prednosti korišćenja ultrazvučnog tretmana u prehrambenoj industriji su: bolji kvalitet hrane, visoka efektivnost, kao i ušteda na poljima troškova proizvodnje i energije. Danas postoje dva osnovna tipa ultrazvučnih uređaja koja su našla primenu u laboratorijama, ultrazvučno kupatilo i ultrazvučna sonda (Slika 2.10). Ultrazvučno kupatilo (dizajnirano za čišćenje stakla i degasiranje) je vrlo jeftin ultrazvučni uređaj prisutan u svakoj analitičkoj laboratoriji, a koristi se i u medicini i stomatologiji. Glavno ograničenje je slabljenje jačine ultrazvuka vremenom i neuniforman prenos ultrazvuka. Ovo može uticati na reproduktivnost rezultata. Ultrazvučne sonde su mnogo pogodnije za upotrebu u analitičkim laboratorijama, ali su i mnogo skuplje. Osnovne prednosti sonde su mogućnost programiranja ciklusa snage i vremena i uvek rade na fiksnoj frekvenciji (obično 20 kHz ili 40 kHz) [117].

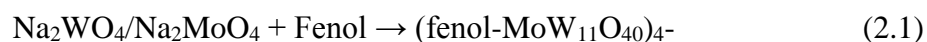


**Slika 2.10.** Ultrazvučni homogenizator Sonoplus, frekvence 20 kHz, ultrazvučna sonda tip VS70T (levo); Ultrazvučni pretretman pripremljenih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna (desno)

## 2.6. METODE DETEKCIJE I KVANTIFIKACIJE POLIFENOLA I PROTEINA

### 2.6.1. Ukupni fenoli

Metoda za određivanje sadržaja ukupnih fenola se zasniva na reakciji između Folin-Čokalteovog (na engl. *Folin Ciocalteu*) (FC) reagensa i fenolnih jedinjenja koja ulaze u sastav ispitivanog uzorka. FC reagens predstavlja smešu fosfomolibdenske i fosfovolframove kiseline. Redukcijom određenim hemijskim agensima (flavonoidi, fenolne kiseline) molibden (+VI) i volfram (+VI) prelaze u niža oksidaciona stanja (+V) gradeći takozvano molibdenensko plavo. Niže su prikazane jednačine hemijskih reakcija fenolnih jedinjenja i FC reagensa [118]:



Plavo obojen kompleks ima maksimum apsorpcije na talasnoj dužini od 763 nm. Ukupan sadržaj fenola se obično izražava preko ekvivalenata galne kiseline (mg EGK/g biljnog materijala).



FC reagens je modifikacija Folin-Denisovog (na engl. *Folin-Denis*) (FD) koji je korišćen u ranom 19-om veku za determinaciju tirozina u proteinima. FD reagens se dobija mešanjem natrijum-volframata i fosfomolibdenske kiseline u fosfornoj kiselini. Problem kod primene ovog reagensa je stvaranje belog taloga koji ometa direktno kolorimetrijsko određivanje fenola. Modifikacija FC reagensa se sastoji u dodavanju litijum-sulfata i broma, čime se sprečava nastajanje taloga i postiže veća osetljivost i reproduktivnost metode. Iako se FC reagens godinama unazad koristi za određivanje sadržaja fenola u poljoprivrednim, farmaceutskim i prehrambenim proizvodima, novije studije ukazuju na neselektivnost FC reagensa [119]. Prisustvo askorbinske kiseline ili druge lako oksidujuće supstance, koje ne pripadaju grupi fenolnih jedinjenja, može takođe dovesti do formiranja plave boje sa FC reagensom, dajući lažnu sliku o sadržaju ukupnih fenola [6,120]. Folinovi reagensi mogu biti neprikladni za biljne ekstrakte sa visokim sadržajem drugih lako oksidujućih supstanci kao što su šećeri i askorbinska kiselina [121,122]. Uprkos ovim ograničenjima, FC metoda je veoma jednostavna i najčešće korišćena metoda za procenu ukupnog sadržaja fenola u voću i povrću. U prilog korišćenju FC reagensa za kvantifikaciju polifenola u brašnu zrna soje ide i činjenica da zno soje, kao rezervne materije sadrži pre svega proteine i skrob, pa onda ulja, a u vrlo malom obimu jednostavne disaharide i monosaharide (uključujući i askorbinsku kiselinu), što je navedeno u uvodnom delu.

### 2.6.2. Antioksidativna aktivnost

Za određivanje antioksidativne aktivnosti ispitivanih jedinjenja često se koriste spektrofotometrijske metode. One se zasnivaju na spektrofotometrijskom praćenju promene koncentracije nekog od reaktanata ili produkata reakcije antioksidanasa sa slobodnim radikalima. Jedna od najčešće korišćenih je 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil (DPPH) test [123,124]. Pored ove metode primenjuje se FRAP metoda (na engl. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay*) [125-128] i ORAC (na engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) metoda [129-131].



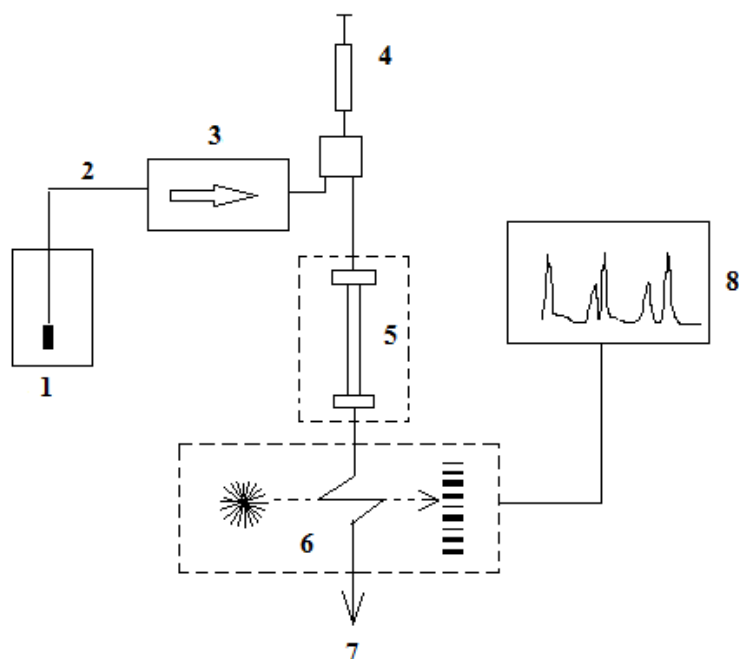
### 2.6.3. Hromatografske tehnike za kvantifikaciju polifenola

Najčešće korišćene tehnike za kvantifikaciju oslobođenih fenolnih jedinjenja iz biljnog materijala su tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) i gasna hromatografija kuplovana sa različitim detektorima (diodni (DAD), plameno-jonizujući (FID) i maseni spektrometar (MS) [6].

**HPLC (tečna hromatografija visokih performansi)**, trenutno predstavlja najpopularniju i pouzdanu tehniku za analizu fenolnih jedinjenja. Različite kolone i mobilne faze su dostupne za analizu fenola, uključujući antocijane, proantocijanidine, tanine, flavonole, flavan-3-ole, flavanone, flavone i fenolne kiseline u različitim biljnim ekstraktima i uzorcima hrane [132-142]. HPLC tehnike nude jedinstvenu priliku za istovremenu analizu svih komponenti od interesa, zajedno sa njihovim derivatima ili proizvodima razgradnje [143,144].

Uvođenje reverzno faznih (RP) kolona znatno poboljšava HPLC razdvajanje različitih klasa fenolnih jedinjenja [145,146] i skoro isključivo se koriste RP C18 kolone. HPLC na reverznim fazama (RP-HPLC) koristi nepolarnu stacionarnu fazu i polarnu mobilnu fazu. Najčešća stacionarna faza je silikatna, tretirana sa  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$ , gde je R alkilna grupa ravnog lanca kao  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$  ili  $\text{C}_8\text{H}_{17}$ . Vreme zadržavanja je duže za manje polarne supstance. Vreme zadržavanja se povećava dodatkom polarnih rastvarača u mobilnu fazu, a smanjuje se dodatkom hidrofobnih rastvarača. Razlike u dužini kolone, prečniku pora, veličini čestica, kao i u mobilnoj fazi koja se primenjuje utiču na rezoluciju pikova, njihovu simetričnost i retenciono vreme [147]. Temperatura kolone može uticati na razdvajanje fenola i preporučuje se konstantna vrednost temperature kako bi se postigla reproduktivnost. Na Slici 2.11. prikazana je šema jednog tečnog hromatografa. Najčešće korišćene mobilne faze obuhvataju kombinaciju metanola, izopropil-alkohola, vode, acetonitrila, mravlje kiseline i kalijum-fosfatnog pufera [145,148, 149]. pH i jonska jačina mobilne faze utiču na zadržavanje fenola u koloni zavisno od protonovanja, disocijacije ili parcijalne disocijacije [150]. Promena pH koji povećava jonizaciju uzorka može smanjiti retenciono vreme određene komponente. Tako, male količine sirćetne, mravlje, fosforne ili trifluorosirćetne kiseline (0,1%) u sistemu

rastvarača sprečavaju jonizaciju fenolnih i karboksilnih grupa i samim tim poboljšavaju rezoluciju i reproduktivnost hromatografske analize.



**Slika 2.11.** Šema tečnog hromatografa sa standardnim delovima

(1) Rezervoar eluenta, (2) linija za transfer mobilne faze sa fritom, (3) pumpa, (4) sistem za injektiranje, (5) kolona, (6) detektor (npr. IR, UV), (7) otpad, (8) sistem za obradu podataka.

Fenolna jedinjenja apsorbuju u UV oblasti i najčešće korišćen detektor za HPLC je UV ili UV-vis detektor promenljive talasne dužine [151,152]. Nijedna talasna dužina nije idealna za praćenje svih klasa fenola, pošto pokazuju maksimum apsorpcije na različitim talasnim dužinama [153]. Derivati benzoeve kiseline pokazuju maksimum apsorpcije na 246-262 nm, osim galne kiseline i siringinske kiseline koje imaju maksimum apsorpcije na 271 i 275 nm [154]. Hidroksicimetne kiseline apsorbuju u dva UV regiona, jedan maksimum je u opsegu od 225-235 nm, a drugi u opsegu 290-330 nm [155]. Na 320 nm, derivati cimetne kiseline mogu da se detektuju bez ikakvog uticaja derivata benzoeve kiseline, koji pokazuju veću apsorpciju na 254 nm. Najbolja alternativa za istovremeno određivanje obe klase jedinjenja je detekcija na 280 nm [156]. Apsorpcioni

opseg od 350-370 nm se koristi za kvantifikaciju flavonol-aglikona, a 280 nm za kvantifikaciju flavan-3-ola i flavonol-glikozida [152].

**Masena spektrometrija** je jedna od najviše korišćenih analitičkih tehnika u fitohemijskim istraživanjima, posebno kada su u pitanju kompleksni biološki uzorci. Glavna prednost masene spektroskopije u odnosu na ostale tehnike je visoka osetljivost (koja se ogleda u mikrogramskim količinama uzorka) i analiza kompleksne smeše prirodnih jedinjenja. Povezivanje kapilarne elektroforeze i hromatografskih metoda sa širokim spektrom masenih detektora povećava osetljivost i selektivnost masene detekcije [157].

Prvi korak tokom analize molekula masenom spektrometrijom je jonizacija. Jonizator je uređaj koji pod dejstvom spoljašnje energije prevodi molekule u jone. Ispitivani molekul daje fragment najveće molarne mase, koji odgovara „molekulskom jonu“ i može poticati od M-H, ili M+H jonizacije. Prilikom jonizacije može doći do fragmentacije molekula na manje fragmente. Tako nastali fragmenti daju informacije o strukturi i fragmentacionom mehanizmu ispitivanih molekula. Mase nastalih fragmenata se mogu porediti sa masama fragmenta standardnog jedinjenja nastalim pod istim uslovima ili literaturnim vrednostima za to jedinjenje. Sledeći korak pri analizi molekula masenom spektroskopijom je razdvajanje nastalih jona ili fragmenata u analizatoru na osnovu odnosa mase/naelektrisanja ( $m/z$ ). Na kraju, razdvojeni fragmenti dalje odlaze na detektor [158].

Postoje različite tehnike jonizacije od kojih je elektrosprej jonizacija (na engl. *Electro Spray Ionization*, ESI) jedna od najviše korišćenih tehnika. Kod ove tehnike jonizacije ispitivani molekul se nalazi u obliku vodenog rastvora. Ova tehnika je našla primenu pre svega u analizi makro- i mikro- molekula [157].

Razvoj novih ambijentalnih jonizatora kao što su hemijska jonizacija pri atmosferskom pritisku (na engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI), brzo bombardovanje atoma (*Fast Atom Bom-Bardment*, FAB), direktna analiza u realnom vremenu (*Direct Analysis in Real Time*, DART), desorpcija elektrosprej jonizacija (*Desorption Electrospray Ionization*, DESI) omogućavaju veoma brzu analizu uzorka pri ambijentalnim uslovima. Glavna prednost ovih jonizatora je brzina, laka priprema uzorka (u većini slučajeva bez pripreme), kao i mogućnost kuplovanja sa tankoslojnom hromatografijom [159,160].

#### 2.6.4. Metode kvantifikacije proteina

Postoji veoma veliki broj metoda za kvantifikaciju proteina u biljnom materijalu, od nespecifičnih, koje se koriste za kvantifikaciju ukupnih proteina, do visoko specifičnih koje mogu da detektuju koncentraciju svakog pojedinačnog proteina u biljnom materijalu. Od specifičnih metoda najzastupljenije metode su:

tečna hromatografija visokog pritiska (HPLC)-detekcija proteina i peptida

tečna hromatografija-masena spektrometrija (LC/MS)-može da detektuje proteine u vrlo niskim koncentracijama ( $\text{ng/cm}^3$  do  $\text{pg/cm}^3$ ) u krvi i telesnim tečnostima

enzimski imuno test (ELISA)-može detektovati proteine u koncentraciji do  $\text{pg/cm}^3$

Neke od najčešće korišćenih nespecifičnih metoda su

Bradfordova (Bradford) metoda-limit detekcije je oko  $1\text{mg/cm}^3$

Lorijeva (Lowry) metoda-opseg detekcije je od  $0.01\text{--}1.0\text{ mg/cm}^3$

Kjeldalova (Kjeldahl) metoda-određuje sadržaj azota, pa se računskim putem dobija količina proteina, pre svega u hrani, zahteva prethodnu oksidaciju uzoraka

### ***3. EKSPERIMENTALNI DEO***

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Biljni materijal

Eksperimenti su sprovedeni u Zemun Polju, na parcelema „Instituta za kukuruz“, veličina elementarne parcele iznosila je 5×5 m, sa 3 ponavljanja po oglednom tretmanu. Korišćena je sorta žute soje (*Glycine max.* Merr.) Laura, koja u svom sastavu ne sadrži Kunitz-tripsin intibitor. Sorta Laura tretirana je sa pet različitih folijarnih đubriva („Vegard“, „Eko-Fus“, „Calbit-C“, „Cropmax“ i „Zircon“). Sva đubriva su prirodnog porekla (uglavnom ekstrakti biljaka i algi) i komercijalno se koriste u biljnoj proizvodnji. Svi uzorci semena soje su nakon završene žetve ručno očišćeni od zaostalih mahuna i nečistoća, samleveni u laboratorijskom mlinu i propušteni kroz laboratorijsko sito prečnika otvora 500 μm. Nakon toga uzorci su zamrznuti na -20 °C i čuvani u zamrzivaču do analize. Za razvijanje i optimizaciju metoda ekstrakcije i kvantifikacije polifenolnih kiselina i proteina korišćen je kontrolni uzorak soje, nad kojim nije izvršeno tretiranje đubrivima.

##### 3.1.1.1. *Primenjena folijarna đubriva*

Folijarna đubriva omogućavaju biljkama da preko lista u stresnim situacijama, ili na siromašnim zemljištima usvoje potrebne količine hranljivih materija koje nisu dostupne korenu preko zemljišta. Isključivo se koriste kao dopunska, komplementarna đubriva i kao ađuvanti u dobrom programu ishrane biljaka preko zemljišta i u održavanju poboljšane zdravstvene kondicije u stresnim uslovima. U ovom radu su korišćena sledeća folijarna đubriva primenjena u preporučenim koncentracijama (preračunato sa preporučene doze đubriva po jediničnoj površini (1 ha) na količinu đubriva potrebnu za prihranu biljaka soje na gorepomenute tri elementarne ( $\approx 75 \text{ m}^2$ ) parcele):

„Vegard“ (24 cm<sup>3</sup> đubriva/4 dm<sup>3</sup> vode u rastvoru za primenu): ekstrakt više kineskih lekovitih biljaka, koji sadrži 1-2% organskog ugljenika, 2-5% organskog azota, 5% huminskih kiselina, 10% fulvo kiselina, 1% K<sub>2</sub>O; 1-2% aminokiselina u osnovnom preparatu đubriva.

„Eko-Fus“ (22,5 cm<sup>3</sup> đubriva/4 dm<sup>3</sup> vode u rastvoru za primenu): ekstrakt alge fucus (*Fucus vesiculosus*) koji sadrži 1,8% ukupnog azota; 1% vodorastvornog fosfora (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>); 2% vodorastvornog kalijuma (K<sub>2</sub>O); 0,5% magnezijuma (Mg); 1,8% gvožđa (Fe) u osnovnom preparatu đubriva.

„Calbit-C“ (20 cm<sup>3</sup> đubriva/8 dm<sup>3</sup> vode u rastvoru za primenu): biljni ekstrakt (strugotina), koji sadrži 15% vodorastvorljivog kalcijuma (CaO) u formu Ca-lignosulfonata u osnovnom preparatu đubriva.

„Cropmax“ (20 cm<sup>3</sup> đubriva/4 dm<sup>3</sup> vode u rastvoru za primenu): biljni ekstrakt (melasa šećerne trske i drugih biljaka), koji sadrži 1,7% ukupnog azota; 2% ukupnih aminokiselina; 2% organskog ugljenika u osnovnom preparatu đubriva.

„Zircon“ (1,2 cm<sup>3</sup> đubriva/ 4 dm<sup>3</sup> vode u rastvoru za primenu): ekstrakt lekovite biljke ehinaceje (*Echinacea pallida*), koji sadrži 0,1 g/dm<sup>3</sup> aktivnih supstanci - polifenolnih kiselina (3,4-dihidroksicimetna (kafena) kiselina; hlorogena kiselina; cihorična kiselina) u osnovnom preparatu đubriva.

### 3.1.2. Hemikalije

*trans*-cimetna kiselina 97% (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);

*p*-kumarna kiselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, St.Louis, SAD);

hlorogena kiselina 99,5% (Chromadex, SAD);

kafena kiselina ≥ 98% (Sigma Aldrich, St.Louis, SAD);

ferulna kiselina 99% (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);

galna kiselina 97,5% (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);

Folin-Denisov reagens (na engl. *Folin-Denis*) (Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD);

Folin-Čokalteov reagens (na engl. *Folin-Ciocalteu*) (Reagecon, Irska);

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);

TROLOX (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina), 97% (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);

TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-*s*-triazin, ≥99% (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);

L(+)-askorbinska kiselina, 99% (Acros Organics, New Jersey, SAD);

etilendiamintetrasirćetna kiselina (EDTA), (Acros organics, New Jersey, SAD);

mravlja kiselina 98% (Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka);

hlorovodonična kiselina p.a., min 35% (Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka);  
petrol-etar p.a. čistoće (Alkaloid-Skopje, Republika Makedonija);  
etil-acetat,  $\geq 99,5\%$  (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);  
dietil-etar p.a. čistoće (Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka);  
voda HPLC čistoće (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);  
aceton  $\geq 99,7\%$  (Betahem, Republika Srbija);  
*n*-heksan  $\geq 99\%$  (Promochem, Nemačka);  
acetonitril  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);  
etanol  $\geq 99,8\%$  (Carlo Erba, Italija);  
metanol, HPLC čistoće  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich St.Louis, SAD);  
natrijum-hidroksid granule (NaOH) p.a. čistoće (Betahem, Republika Srbija);  
gvožđe-sulfat heptahidrat ( $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ), p.a. čistoće (Centrohem, Republika Srbija);  
BHT (2,6-di-*terc*-butil-*p*-krezol), min 98% (Centrohem, Republika Srbija);  
natrijum-hidroksid, 0,2 M astvor (Alfapanon, Republika Srbija);  
sumporna kiselina, 0,1 M rastvor (Alfapanon, Republika Srbija);  
K1 katalizator (tableta sastava 5 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  i 0,1 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) (Fisher Chemicals, Velika Britanija);  
K2 katalizator (tableta sastava 3,5 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  i 0,4 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ ) (Fisher Chemicals, Velika Britanija);  
sumporna kiselina, konc. min. 98% (Zorka Pharma, Republika Srbija);  
Taširo indikator, kombinovani indikator (metilen-plavo i metil-crveno u etanolu) (Mol, Republika Srbija);  
goveđi serumski albumin, (BSA), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);  
SDS (natrijum-dodecil-sulfat), (Sigma Aldrich, St. Louis, SAD);  
urea (Surfachem group, Leeds, Engleska);  
natrijum-karbonat, (Lach-Ner, Neratovice, Republika Češka);  
kalijum-natrijum-tartarat, (zur analyse Merck Darmstadt, Nemačka);  
bakar(II)-sulfat, (Zorka Pharma, Republika Srbija);  
glicin (Wego, Oosterhout, Holandija).



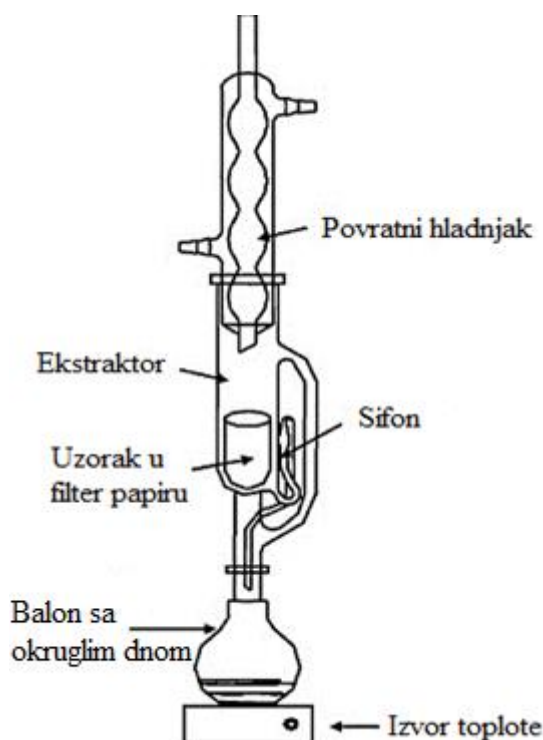
### 3.1.3. Aparatura

UV/Vis spektrofotometar UV-2100 (Shimadzu, Japan);  
UV/Vis spektrofotometar, Ultrospec 3300 pro (Amersham Bioscience, Corston, Velika Britanija);  
Rotacioni uparivač ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska);  
Laboratorijski mlin A 10 ( IKA, SAD);  
Analitička vaga AE-240 (Mettler, Švajcarska);  
Tehnička vaga ET-1111 (Tehtnica, Slovenija);  
Vodeno kupatilo (HHS-1RM Kina);  
Sušnica IP 20 (BINDER Nemačka);  
Ultrazvučno kupatilo 4P (ISKRA, Slovenija);  
Vortex MX-S (Amtast, SAD);  
Laboratorijska centrifuga Harrier 15/80 (Sanyo, Velika Britanija);  
Laboratorijska Centrifuga, Eppendorf AG, Minispin (Eppendorf, Hamburg, Nemačka);  
pH-metar, 340i (WTW, Nemačka);  
pH-metar (EUTECH Instruments, Holandija);  
Tečni hromatograf Nexera XR (Shimadzu, Japan);  
Ultrazvučni homogenizator Sonopuls HD 2200 (BANDELIN electronics, Sonoplus Ultrasonics Homogenizers, Nemačka);  
Sonotroda, VS70T (BANDELIN electronics, Nemačka);  
Mikrotalasni reaktor, Monowave 300 (Anton Paar, SAD);  
Jedinica za digestiju, K-424 (Büchi, Švajcarska);  
Jedinica za destilaciju, K-350 (Büchi, Švajcarska);  
Digitalna bireta zapremine 50 ml (Jencons digitrate, Velika Britanija);  
Sprej sušnica (B-290, BUCHI Labortechnik AG, Švajcarska);  
Homogenizator Yellowline, DI 25 basic, (Ica Works Inc., Wilmington).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Obezmašćivanje sojinog brašna

Određena količina sojinog brašna umotana u filter papir postavljena je u Sokslet (Soxhlet) aparat, prelivena petrol-etrom i uz zagrevanje balona sa okruglim dnom, vršeno je obezmašćivanje uzorka u trajanju od 4h. Količina (zapremina) rastvarača mora biti veća od one koja je potrebna da se tečnost povratno prelije putem bočnog sifona u prihvatni balon, ali ne sme da bude veća od 2/3 zapremine balona. Primer Soksletove aparature prikazan je na Slici 3.1.



**Slika 3.1.** Soksletova aparatura za obezmašćivanje sojinog brašna (preuzeto uz obradu od Vang (Wang) i sar. (2006)) [161]

Visina filter papira sa uzorkom ne sme da bude viša od prelivnog sifona da bi ceo uzorak bio potopljen u rastvarač i da bi obezmašćivanje bilo efikasnije. Kada se tečnost zagreje do ključanja dolazi do refleksa. Ovaj ciklus se u vremanskom periodu od 4 sata ponavlja nekoliko puta. Obezmašćivanje je završeno kada petrol-etar u destilacionom

balonu ima izrazito žutu boju, a u ekstraktoru, nakon kondenzacije, ostane bezbojan. Potom je obezmašćeno sojino brašno osušeno u struji vazduha (preko noći) i kao takvo korišćeno za sve dalje analize.

### 3.2.2. Određivanje sadržaja ulja

Nakon završenog obezmašćivanja soje, vrši se uparavanje petrol-etra prisutnog u balonu za destilaciju. Sadržaj ulja se određuje gravimetrijski, na osnovu razlike u masi praznog balona i balona posle završenog uparavanja.

### 3.2.3. Određivanje sadržaja vlage

Sadržaj vlage u brašnu soje određen je gravimetrijski, na osnovu razlike u masi uzorka pre i posle sušenja. Na analitičkoj vagi je odmereno 10 g brašna sa preciznošću od 0,0001 g u prethodno osušeni i izmeren vegeglas i sušenje je izvršeno u sušnici na 105°C do konstantne mase, a zatim je ponovo odmerena masa vegeglasa sa osušeni uzorkom.

### 3.2.4. Izbor adekvatnog rastvarača za ekstrakciju polifenola

Obezmašćeno brašno soje ekstrahovano je sa osam različitih ekstrakcionih smeša:

50% vodeni rastvor acetona (v/v);

80% vodeni rastvor acetona (v/v);

Smeša 70% vodenog rastvora acetona i 70% vodenog rastvora metanola u odnosu 1:1 (v/v);

80% vodeni rastvor metanola (v/v);

80% vodeni rastvor etanola (v/v);

metanol sa 10% vodenim rastvorom HCl u odnosu 85:15 (v/v);

acetone sa 10% vodenim rastvorom HCl u odnosu 85:15 (v/v);

etanol sa 10% vodenim rastvorom HCl u odnosu 85:15 (v/v);

Ekstrakcija je vršena na sledeći način: 0,5 g sojinog brašna odmereno je na analitičkoj vagi sa tačnošću od 0,0001 g i ekstrahovano sa 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše u

ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 30 minuta. Nakon isteka vremena, uzorci su centrifugirani na 10000 ob/min u trajanju od 15 minuta, supernatanti su dekantovani i korišćeni za analizu ukupnih fenola.

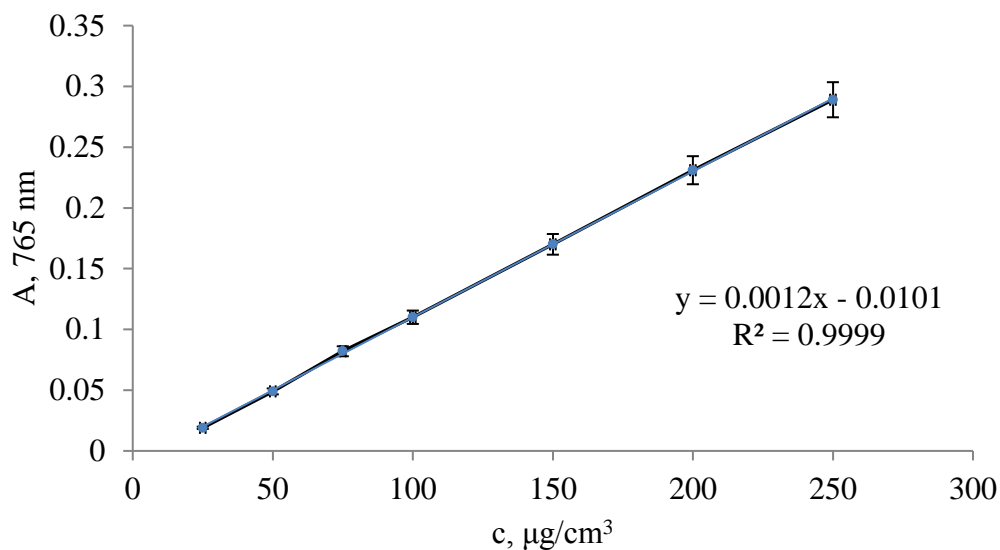
### 3.2.5. Potreba za dvostepenom ekstrakcijom

Nakon centrifugiranja uzoraka u prethodnom koraku i odvajanja supernatanta, talog je pod istim uslovima ekstrahovan sa dodatnih 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše. Izvršeno je centrifugiranje (10000 ob/min, 15 min), supernatanti su spojeni, upareni u rotacionom vakuum uparivaču do suva, rastvoreni u 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše i korišćeni za određivanje sadržaja ukupnih fenola.

### 3.2.6. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je spektrofotometrijski, koristeći FD i FC reagens i standard galne kiseline.

Postupak je istovremeno rađen i sa FD i sa FC reagensom. Odmereno je 0,05 cm<sup>3</sup> biljnog ekstrakta, 3 cm<sup>3</sup> vode, 0,25 cm<sup>3</sup> Folinovih reagenasa i 0,75 cm<sup>3</sup> 20% rastvora Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nakon mešanja i stajanja uzorka 8 minuta na sobnoj temperaturi, dodato je još 0,95 cm<sup>3</sup> vode u reakcionu sud. Razvoj boje postignut je inkubacijom smeše u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 2 sata. Koncentracija ukupnih fenola je određena očitavanjem apsorbance na 765 nm. Istovremeno je pripremljena i kalibraciona prava galne kiseline u koncentracionom opsegu od 25-250 µg/cm<sup>3</sup> (Slika 3.2). Pripremljen je osnovni standard galne kiseline u metanolu koncentracije 1 mg/cm<sup>3</sup> i adekvatnim razblaženjem napravljeni su radni rastvori koncentracija 25, 50, 75, 100, 150, 200 i 250 µg/cm<sup>3</sup>. Koncentracija ukupnih fenola je izražena kao mg ekvivalent galne kiseline/g suve materije. Oba Folinova reagensa su razblažena vodom u odnosu 1:1.



**Slika 3.2.** Kalibraciona prava galne kiseline u opsegu koncentracija 25-250 µg/cm<sup>3</sup>

Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je najadekvatnija ekstrakciona smeša i Folinov tip reagensa i korišćeni su u daljem toku eksperimenta.

### 3.3. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA DETEKCIJU POLIFENOLNIH KISELINA

Sadržaj pojedinačnih polifenolnih kiselina u semenu soje određen je metodom reverzno fazne tečne hromatografije visokog pritiska. Optimizacija uslova kvantifikacije polifenolnih kiselina izvršena je na tečnom hromatografu Shimadzu Nexera XR.

Analize su izvršene na koloni Zorbax SB C18 4,6×250 mm, prečnika pora 5 µm.

Ispitivane su tri različite mobilne faze:

A: 0,1% rastvor HCOOH; B: metanol [96,162,163];

A: 0,1% rastvor HCOOH; B: acetonitril [164];

A: 2% rastvor CH<sub>3</sub>COOH; B: metanol:acetonitril 1:1 [95];

i tri različita režima (linearna gradijenta):

1. Na 0 min. 95% A; na 25 min. 70% A; na 35 min. 60% A; na 40 min. 52% A; na 50 min. 30% A; na 55 min. 0% A; na 65 min. 95% A, na 75 min. 95% A [95];

2. Na 0 min. 95% A; na 40 min. 70% A; na 55 min. 70% A; na 65 min. 0% A; na 70 min. 0% A; na 75 min 95% A [162], uz male modifikacije zbog dužine kolone;
3. Na 0 min. 97% A; na 10 min. 92% A; na 20 min. 85% A; na 30 min. 80% A; na 40 min. 70% A; na 50 min. 60% A; na 60 min. 75% A; na 70 min. 97% A; na 75 min. 97% A, uz male modifikacije zbog dužine kolone [165].

Na osnovu literaturnih podataka, usvojen je protok mobilne faze od  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$ , a količina injektiranog uzorka je iznosila  $0,01 \text{ cm}^3$ . Injektiranje je vršeno automatski, korišćenjem autosampler-a. Kolona je termostatirana na temperaturi od  $25^\circ\text{C}$ .

Optimizacija uslova je izvršena na osnovu promene sastava mobilne faze, a preko vrednosti odgovora i najboljeg razdvajanja smeše standarda polifenolnih kiselina na talasnim dužinama od 280 nm i 325 nm. Korišćeni su standardi galne kiseline, hlorogene, *p*-kumarne, kafene, ferulne, i *trans*-cimetne kiseline. Pripremljen je rastvor koncentracije  $1 \text{ mg}/\text{cm}^3$  u metanolu i od njega su pravljena razblaženja u sve tri mobilne faze u odnosu 1:1.

Razblaženi rastvor kiselina koncentracije  $100 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$  je korišćen za optimizaciju metode, a zatim je na osnovu rezultata izabrana mobilna faza i linearni gradijent koji je korišćen u daljim analizama. Za izabranu mobilnu fazu i gradijent eluiranja pripremljeni su standardi kiselina u koncentracionom opsegu od 10 do  $150 \text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^3$  i konstruisane kalibracione prave za svaku ispitivanu polifenolnu kiselinu (Prilog 2).

Koncentracija pojedinačnih polifenolnih kiselina u uzorcima izračunata je korišćenjem softvera LabSolutions, Shimadzu i izražena u  $\mu\text{g}/\text{g}$  s.m.

### 3.4. OPTIMIZACIJA POSTUPKA EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA IZ OBEZMAŠĆENOG BRAŠNA SOJE SORTE LAURA

#### 3.4.1. Metoda 1: Direktna bazna hidroliza

Obezmašćeno sojino brašno je podvrgnuto direktnoj baznoj hidrolizi prema sledećem postupku: 0,5 g brašna pomešano je sa  $10 \text{ cm}^3$  4M rastvora NaOH (uz dodatak 2% rastvora askorbinske kiseline i  $13,4 \text{ }\mu\text{M}$  rastvora EDTA u cilju sprečavanja oksidacije

polifenolnih kiselina) [94]. Reakcioni sud je stavljen u ultrazvučno kupatilo u periodu od 4 sata. Nakon završene hidrolize, uzorak je zakišeljjen na pH 2 6M rastvorom HCl, (primećuje se i po prelazu boje iz crveno-narandžaste u svetlo žutu) i ekstrahovan sa  $2 \times 15 \text{ cm}^3$  smeše dietil-etar/etil-acetat (DE/EA) u odnosu 1:1. Nakon svakog koraka, uzorak je stavljen 45 s na vorteks, a zatim centrifugiran na 4500 ob/min 10 minuta. Gornji DE/EA slojevi su spojeni, upareni u rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi 40-45°C do suva, pa rastvoreni u  $3 \text{ cm}^3$  75% MeOH. Ekstrakt je profiltriran kroz  $45 \mu\text{m}$  PTFE filter i stavljen u vialu za HPLC (ili u zamrzivač do analize).

### 3.4.2. Metoda 2: Direktna kiselinska hidroliza

Obezmašćeno sojino brašno je podvrgnuto direktnoj kiselinskoj hidrolizi sa koncentrovanom hlorovodoničnom kiselinom (HCl) prema sledećem postupku: 0,5 g brašna pomešano je sa  $2,5 \text{ cm}^3$  HCl konc. Neposredno pre dodavanja kiseline u uzorak je dodato  $5 \text{ cm}^3$  destilovane vode i hidroliza je vršena u vodenom kupatilu na 85°C u trajanju od 30 min. Nakon toga uzorak je ohlađen pod mlazom vode i izvršena je ekstrakcija oslobođenih polifenola sa  $2 \times 15 \text{ cm}^3$  smeše dietil-etar/etil-acetat (DE/EA) u odnosu 1:1. Nakon svakog koraka, uzorak je stavljen 45 sekundi na vorteks, a zatim centrifugiran na 4500 ob/min 10 minuta. Gornji DE/EA slojevi su spojeni, upareni u rotacionom vakuum uparivaču na 40-45°C do suva, pa rastvoreni u  $3 \text{ cm}^3$  75% MeOH. Dobijeni ekstrakt je profiltriran kroz  $45 \mu\text{m}$  PTFE filter i stavljen u vialu za HPLC (ili u zamrzivač do analize).

### 3.4.3. Metoda 3: Ekstrakcija slobodnih polifenolnih kiselina praćena baznom i kiselinskom hidrolizom

Ovom metodom prvo se vrši ekstrakcija rastvornih polifenolnih kiselina, a kao ekstrakciona smeša izabrana je ona koja je dala najbolje rezultate na početku eksperimenta. Odmereno je 0,5 g uzorka i dodato  $10 \text{ cm}^3$  ekstrakcione smeše. Ekstrakcija je, kako je ranije opisano, trajala 30 minuta na sobnoj temperaturi u ultrazvučnom kupatilu. Nakon isteka vremena, odvojeno je  $2 \text{ cm}^3$  ekstrakta, propušteno kroz  $45 \mu\text{m}$  PTFE filter i stavljeno u vialu za HPLC (ili u zamrzivač do analize). Ova

frakcija predstavlja frakciju rastvornih polifenolnih kiselina. Ostatak od 8 cm<sup>3</sup> podvrgnut je baznoj hidrolizi kako je prethodno opisano (metoda 1). Ova frakcija predstavlja frakciju rastvornih esterifikovanih polifenolnih kiselina. Ostatak je, zatim podvrgnut kiselinskoj hidrolizi pod uslovima opisanim u metodi 2, uz izuzetak da nije dodavano 5 cm<sup>3</sup> vode, nego samo 2,5 cm<sup>3</sup> HCl konc. Dobijena frakcija predstavlja frakciju vezanih polifenolnih kiselina. Za sve tri frakcije određen je sadržaj ukupnih fenola, profil pojedinačnih polifenolnih kiselina i antioksidativna aktivnost ekstrakata DPPH i FRAP metodom.

Polifenolne komponente prisutne u uzorcima identifikovane su poređenjem njihovih retencionih vremena i spektara sa retencionim vremenom i spektrom standarda za svaku komponentu. Kvantitativno određivanje komponenata izvršeno je metodom spoljašnjeg standarda polifenolnih kiselina. Za smešu standarda različitih koncentracija (10-150 µg/cm<sup>3</sup>) konstruisana je kalibraciona prava, za svaki standard, na osnovu dobijenih površina u zavisnosti od masene koncentracije standarda. Iz dobijene jednačine linearne zavisnosti vršeno je izračunavanje masenih koncentracija polifenolnih kiselina prisutnih u biljnim uzorcima.

Na osnovu dobijenih rezultata izabrana je najefikasnija metoda ekstrakcije koja je korišćena u daljoj fazi analize uticaja pretretmana ultrazvučnom sondom i mikrotalasima.

### **3.5. PRETRETMAN ULTRAZVUČNOM SONDOM U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLA**

Iako je u prethodnim fazama eksperimenta korišćeno ultrazvučno kupatilo, kao jedan od dva tipa ultrazvučnih uređaja, u narednoj fazi ispitan je uticaj ultrazvučne sonde na efikasnost ekstrakcije polifenola iz obezmašćenog brašna žute soje. Pod pretpostavkom da ultrazvuk generisan sondom uronjenom direktno u ekstrakcionu smešu, poboljšava prenos mase, pospešuje parcijalno razaranje ćelijskih zidova i oslobađanje vezanih polifenolnih kiselina, izvršen je sledeći tretman: 0,5 g obezmašćenog sojinog brašna pomešano je sa 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše u specijalnoj posudi za sonikaciju od nerđajućeg čelika sa rashladnim omotačem. Ultrazvučna sonda sa 13 mm titanijumskim vrhom uronjena je direktno u reakcionu smešu i vršeno je tretiranje ultrazvučnim



talasima sa vrha sonde. Sonikacija je izvršena na frekvenciji od  $20 \pm 0,2$  kHz na dve različite jačine ultrazvuka (amplitude 15 i 30%). Za svaku amplitudu uzorci su bili sonicirani u vremenskim periodima od 30 s, 2 min, 5 min, 10 min i 15 min. Temperatura je održavana konstantnom ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) cirkulisanjem termostatisane vode kroz rashladni omotač (uobičajeni protok vode je od 5 do  $10 \text{ cm}^3/\text{min}$ ). Nakon završenog pretretmana sondom, uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta, supernatant je propušten kroz  $45\mu\text{m}$  PTFE filter i prebačen u vialu za HPLC. Na osnovu analize polifenolnih kiselina u svim ekstraktima, izvršena je procena optimalnih parametara amplitude i vremena pretretmana i oni su korišćeni u daljem toku eksperimenta.

#### **3.5.1. Metoda 4: Ekstrakcija ultrazvučnom sondom praćena baznom i kiselinskom hidrolizom**

Odmereno je novih 0,5 g obezmašćenog sojinog brašna i pomešano sa  $10 \text{ cm}^3$  ekstrakcione smeše. Ponovljen je postupak pretretmana ultrazvučnom sondom za koji su u prethodnom koraku dobijeni najbolji rezultati, nakon centrifugiranja odvojeno je  $2 \text{ cm}^3$  supernatanta, a ostatak reakcione smeše je podvrgnut baznoj i kiselinskoj hidrolizi pod uslovima opisanim u metodi 3. U supernatantu su prisutne rastvorne polifenolne kiseline, u frakciji nakon bazne kiseline esterifikovane polifenolne kiseline, a u frakciji nakon kiselinske hidrolize, vezane nerastvorne polifenolne kiseline.

#### **3.6. PRETRETMAN MIKROTALASIMA U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA**

U narednoj fazi izvršeno je ispitivanje pretretmana uzorka mikrotalasima u cilju što efikasnije ekstrakcije polifenolnih kiselina. Korišćen je mikrotalasni reaktor Anton Paar sa staklenom kivetom zapremine  $30 \text{ cm}^3$ . Kako pri mikrotalasnoj ekstrakciji mogu da se variraju ili temperatura ili snaga mikrotalasa u različitim vremenskim intervalima, prvo je vršeno variranje temperature.

### 3.6.1. Variranje temperature u različitim vremenskim intervalima

Odmereno je 0,5 g obezmašćenog sojinog brašna u kivetu za ekstrakciju i pomešano sa 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše. Ekstrakcija je vršena u periodu od 2, 5 i 10 min na četiri različite temperature, 55, 65, 75 i 85°C. Temperatura je održavana konstantnom, a snaga mikrotalasa je rasla sve do dostizanja zadate temperature. Nakon završenog postupka ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 10000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Analiza polifenolnih kiselina u dobijenim ekstraktima izvršena je HPLC metodom, kako je ranije opisano.

### 3.6.2. Variranje snage mikrotalasa

Nakon usvajanja optimalne temperature i vremena ekstrakcije, varirana je snaga mikrotalasa od 25, 50, 75 i 100 W. Temperaturni limit je podešen na 120°C da bi se izbegla degradacija bioaktivnih jedinjenja u biljnom materijalu. Nakon završenog pretretmana, uzorci su centrifugirani na 10000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Analiza polifenolnih kiselina u dobijenim ekstraktima izvršena je HPLC metodom, kako je ranije opisano.

Nakon određivanja količine polifenolnih kiselina u pojedinim ekstraktima, poređenjem rezultata pri kontrolisanoj temperaturi i kontrolisanoj snazi, izabrani su optimalni uslovi za dalje faze eksperimenta.

### 3.6.3. Metoda 5: Ekstrakcija mikrotalasima praćen baznom i kiselinskom hidrolizom

Odmereno je novih 0,5 g obezmašćenog sojinog brašna i pomešano sa 10 cm<sup>3</sup> ekstrakcione smeše. Ponovljen je postupak pretretmana mikrotalasima za koji su u prethodnom koraku dobijeni najbolji rezultati, nakon centrifugiranja odvojeno je 2 cm<sup>3</sup> supernatanta, a ostatak reakcione smeše je podvrgnut baznoj i kiselinskoj hidrolizi pod uslovima opisanim u metodi 3. U supernatantu su prisutne rastvorne polifenolne kiseline, u frakciji nakon bazne kiseline esterifikovane polifenolne kiseline, a u frakciji nakon kiselinske hidrolize, vezane nerastvorne polifenolne kiseline.

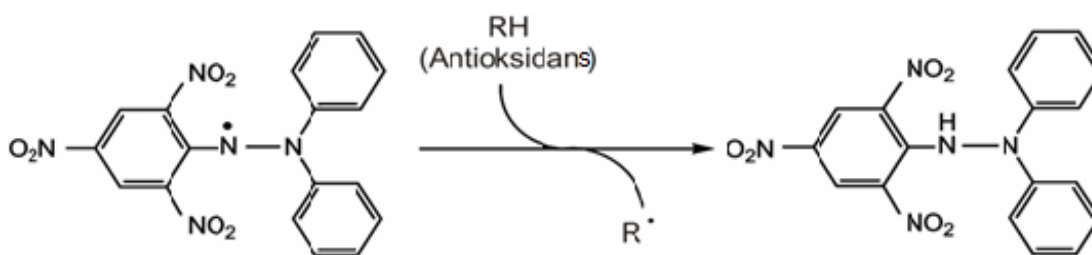
### 3.7. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNOG POTENCIJALA DOBIJENIH EKSTRAKATA

U različito pretretiranim ekstraktima koji su pokazali najveći sadržaj polifenolnih kiselina, određen je sadržaj ukupnih fenola, po ranije opisanom postupku, kao i antioksidativna aktivnost DPPH i FRAP metodom. Ovi parametri određeni su u sve tri frakcije.

#### 3.7.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom

DPPH metoda je jednostavan, brz i osjetljiv način za ispitivanje antioksidativne aktivnosti određenog jedinjenja ili biljnog ekstrakta.

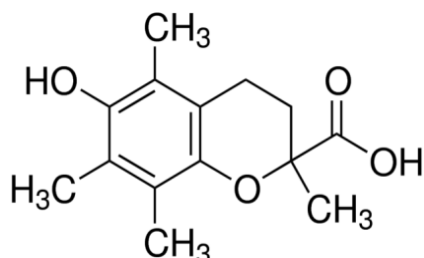
DPPH test pruža podatke o reaktivnosti potencijalnih antioksidanasa sa stabilnim, slobodnim 1,1-difenil-2-pikril-hidrazil radikalom (DPPH). Sam DPPH radikal je purpurne boje i ima maksimum apsorpcije na 517 nm. Reakcijom sa antioksidansima on vezuje vodonikov atom svojim nesparenim elektronom i na taj način prelazi u žut DPPH-H (Slika 3.3). DPPH test može da se izrazi preko procenta obezbojavanja, odnosno smanjenja apsorbancije DPPH radikala na 517 nm, čime se dolazi do podataka o antioksidativnoj sposobnosti ispitivanog molekula, tj. o njegovoj sposobnosti da radikalu DPPH preda atom vodonika i na taj način ga dezaktivira.



**Slika 3.3.** Mehanizam reakcije DPPH radikala sa antioksidansima

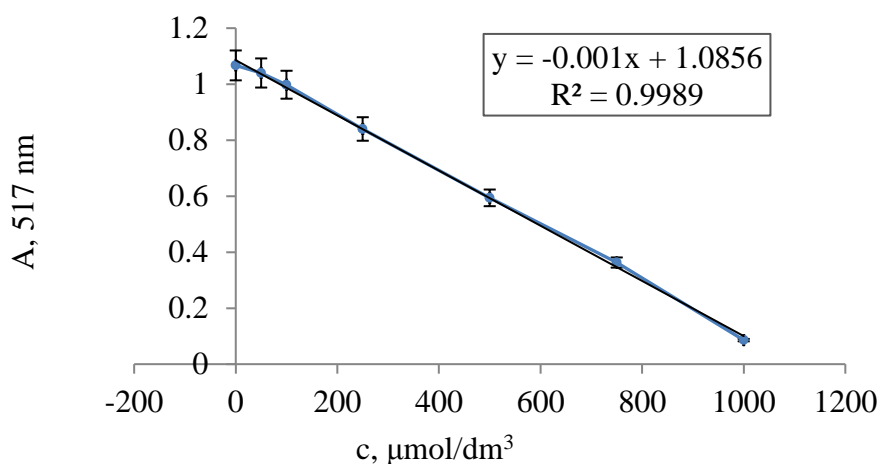
Drugi način izračavanja antioksidativne aktivnosti DPPH metodom je preko TROLOX ekvivalenta. Troloks (Slika 3.4) je komercijalni sintetički antioksidans, IUPAC naziva 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina i predstavlja u vodi

rastvoran analog vitamina E. Antioksidativna aktivnost ekstrakata se izražava kao mikromol ekvivalent TROLOX-a po gramu suve materije uzorka ( $\mu\text{M TE/g s.m.}$ ).



**Slika 3.4.** Strukturna formula TROLOX-a

Za određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom korišćeni su isti ekstrakti kao i za određivanje ukupnih fenola i profila polifenolnih kiselina. Neposredno pre analize ekstrakti su razblaženi 10 puta. Pripremljen je 0,1 mM rastvor DPPH u metanolu (u normalnom sudu od  $100 \text{ cm}^3$  izmereno je 0,0039 g DPPH i dopunjeno do crte metanolom) i stavljen u ultrazvučno kupatilo u tamnoj boci, umotanoj u aluminijumsku foliju oko 30 minuta.  $0,2 \text{ cm}^3$  razblaženog ekstrakta pomešano je sa  $3,8 \text{ cm}^3$  0,1 mM DPPH reagensa. Razvoj boje postignut je inkubacijom smeše u mraku na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta. Antioksidativna aktivnost određena je očitavanjem apsorbance na 517 nm, u odnosu na kalibracionu pravu TROLOX-a i izražena kao  $\mu\text{mol TE/g s.m.}$  Kalibraciona prava TROLOX-a u koncentracionom opsegu od 0-1000  $\mu\text{mol/dm}^3$  (Slika 3.5) pripremljena je pravljenjem osnovnog standarda TROLOX-a u metanolu, koncentracije  $1 \text{ mmol/dm}^3$ , a zatim su adekvatnim razblaženjem napravljeni radni rastvori koncentracija 0, 50, 100, 250, 500 i  $750 \mu\text{mol/dm}^3$ .

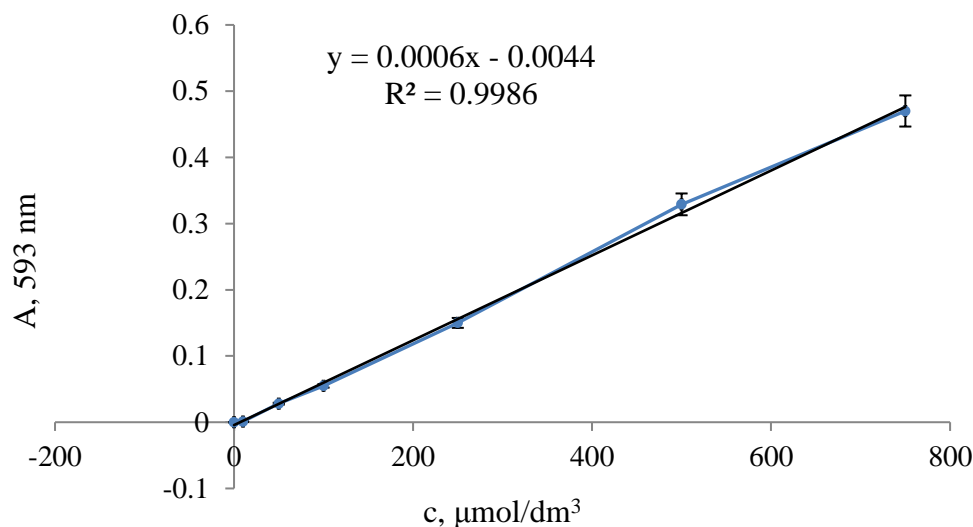


**Slika 3.5.** Kalibraciona prava TROLOX-a u opsegu koncentracija 0-1000 µmol/dm<sup>3</sup>

### 3.7.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom

FRAP metoda (na engl. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power Assay*), se zasniva na redukciji Fe<sup>3+</sup>-tripiridil-*s*-triazin kompleksa (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) do Fe<sup>2+</sup>-tripiridil-*s*-triazin kompleksa. Redukovani Fe<sup>2+</sup>-tripiridil-*s*-triazin kompleks intenzivno je plave boje, koja se određuje spektrofotometrijski na 593 nm [125,128]. FRAP reagens sadrži 2,5 cm<sup>3</sup> TPTZ reagensa (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) (10 mM rastvor TPTZ u 40 mM rastvoru HCl); 2,5 cm<sup>3</sup> 20mM rastvora FeCl<sub>3</sub>×6H<sub>2</sub>O i 25 cm<sup>3</sup> 0,3 M acetatnog pufera (pH 3,6) i priprema se neposredno pred upotrebu. Količina redukovanog Fe<sup>2+</sup>-TPTZ kompleksa izračunava se iz jednačine regresione prave, koja je konstruisana merenjem apsorpcije standardnih vodenih rastvora FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O koncentracije 0,1-1 mmol/dm<sup>3</sup> pri uslovima, koji važe za tok određivanja. Rezultati se izražavaju u µmol Fe<sup>2+</sup>/mg biljnog materijala. Za određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom su korišćeni razblaženi biljni ekstrakti (10 puta) različito pretretiranih uzoraka sojinog brašna. U epruvete je odmereno po 4,5 cm<sup>3</sup> FRAP reagensa i 0,15 cm<sup>3</sup> razblaženog ekstrakta. Nakon inkubacije od 30 minuta na 37°C, merena je apsorbanca plavo obojenih rastvora na 593 nm u odnosu na slepu probu (4,5 cm<sup>3</sup> FRAP reagensa i 0,15 cm<sup>3</sup> rastvarača). Istovremeno je konstruisana i kalibraciona prava sa FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O. Pripremljen je osnovni standard FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O u vodi koncentracije 1 mmol/dm<sup>3</sup> i adekvatnim razblaženjem napravljeni su radni rastvori koncentracija 0, 50, 100, 250, 500 i 750 µmol/dm<sup>3</sup> (Slika 3.6) koji su podvrgnuti istom postupku kao i biljni ekstrakti. Dobijene

vrednosti izražene su kao  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  jona po g suve materije uzorka. Svaka reakcija je rađena u tri ponavljanja.



**Slika 3.6.** Kalibraciona prava  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  u koncentracionom opsegu od 0 do 750  $\mu\text{mol/dm}^3$

### 3.7.3. Određivanje antioksidativne aktivnosti Brigs-Raušerovom (Briggs-Rauscher) oscilatornom metodom

Brigs-Raušerova metoda je veoma pogodna za određivanje prisustva antioksidanasa u hrani [167]. Metoda se sastoji iz dva efekta, trenutnog prestanka oscilacija nakon dodavanja antioksidansa u sistem i naknadne regeneracije oscilacija. Vreme prestanka oscilacija linearno je zavisno od koncentracije prisutnog antioksidansa. BR metoda daje “širu sliku” antioksidativne aktivnosti i može da pokaže postojanje sinergijskih efekata različitih bioaktivnih jedinjenja unutar same biljke [166]. Dinamika BR reakcije je praćena potenciometrijski [167]. Pt elektroda je korišćena kao radna elektroda, dok je Ag /AgCl korišćena kao referentna elektroda. Početne koncentracije reaktanata za BR reakciju su bile  $[\text{CH}_2(\text{COOH})_2]_0 = 0,0789 \text{ mol/dm}^3$ ,  $[\text{MnSO}_4]_0 = 0,00752 \text{ mol/dm}^3$ ,  $[\text{HClO}_4]_0 = 0,0300 \text{ mol/dm}^3$ ,  $[\text{KIO}_3]_0 = 0,0752 \text{ mol/dm}^3$  and  $[\text{H}_2\text{O}_2]_0 = 1,2690 \text{ mol/dm}^3$ . Reakciona zapremina iznosila je  $25 \text{ cm}^3$ . Alikvot od  $0,1 \text{ cm}^3$  ekstrakata pripremljenih od različito tretiranih uzoraka soje je dodat 30 s nakon dodavanja vodonik-peroksida u BR oscilatornom režimu. Eksperimentalni uslovi su prilagođeni onima u ljudskom

organizmu, temperatura je održavana na  $37 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , a BR reakcioni rastvor je podešen na pH vrednost želuca  $<2$ .

### 3.8. METODE ZA ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA

#### 3.8.1. Kjeldalova metoda za određivanje sadržaja proteina

Sadržaj proteina u hrani se najčešće određuje na osnovu ukupnog sadržaja azota. Kjeldalova metoda se gotovo univerzalno primenjuje za određivanje sadržaja azota, a zatim se sadržaj proteina dobija računskim putem množenjem ukupnog azota faktorom. Ovaj pristup zasniva se na pretpostavci da gotovo sav azot u hrani potiče iz aminokiselina koje ulaze u sastav proteina. Na osnovu ranijih istraživanja, prosečan sadržaj azota (N) u proteinima iznosi 16 procenata, što je dovelo do korišćenja faktora 6,25 ( $100/16 = 6,25$ ) za konverziju sadržaja azota u sadržaj proteina ( $N \times 6,25$ ).

Metoda se sastoji od tri koraka, digestije, destilacije i titracije. Postupak digestije obuhvata zagrevanje uzorka u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), koja razgrađuje organsku supstancu oksidacijom i oslobađa redukovani azot u obliku amonijum-sulfata. Brzina digestije zavisi od temperature na kojoj se izvodi, a temperatura je ograničena samom temperaturom ključanja kiseline (koja u slučaju sumporne kiseline iznosi  $338^\circ\text{C}$ ). Kako je temperatura potrebna za raskidanje polipeptidnih veza  $373^\circ\text{C}$ , dodavanjem soli i katalizatora može se značajno uticati na povišenje temperature ključanja kiseline i brzinu razaranja uzorka. Najpogodnija so je kalijum-sulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) zbog izuzetno dobre rastvorljivosti u sumpornoj kiselini. Od katalizatora najčešće se koriste živa, selen, bakar i titanijum. Iako je živa najefikasniji katalizator, zbog štetnog uticaja na životnu sredinu, danas je u potpunosti zamenjena bakrom, ili mešanim katalizatorima na bazi bakra i titanijuma. Najbolji način da se izbegnu varijacije prilikom dodavanja soli i katalizatora i obezbedi tačnost i ponovljivost metode jeste upotreba Kjeldalovih tableta. Danas se proizvodi nekoliko vrsta Kjeldalovih tableta sa tačno određenim odnosom soli i katalizatora. Nakon završenog postupka digestije, koji traje oko 2 sata, a primećuje se po obezbojavanju sadržaja, sledi proces destilacije koji ima za cilj prevođenje amonijačnih jona u amonijak u prisustvu jake baze ( $\text{NaOH}$ ). Na kraju aparature za destilaciju nalazi se

prihvatni sud sa razblaženom  $H_2SO_4$ . Oslobođeni amonijak se vezuje za kiselinu i ponovo prelazi u tečno stanje. Destilacija ima za cilj da razdvoji amonijak od ostatka smeše. Nakon završene destilacije sledi titracija dobijenog destilata razblaženim rastvorom NaOH uz odgovarajući indikator. Sadržaj azota izračunava se prema sledećoj jednačini:

$$N(\%) = \frac{(V_{sp} - V_{uz}) \times M(\text{NaOH}) \times 1.4}{w(g)} \quad (3.1)$$

gde je  $V_{sp}$ -utrošena zapremina NaOH za titraciju slepe probe

$V_{uz}$ - utrošena zapremina NaOH za titraciju uzorka

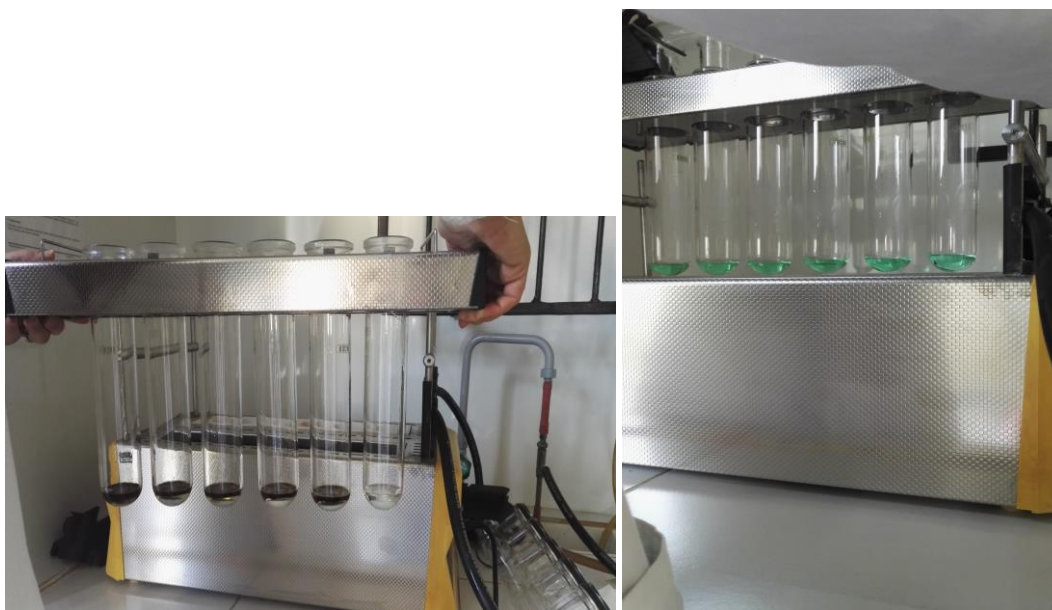
$M(\text{NaOH})$  – molaritet NaOH

$w$ -odvaga uzorka u gramima

Postupak određivanja sirovih proteina u sojinom brašnu optimizovan je variranjem odvage uzorka, količine kiseline i količine soli i katalizatora potrebnih za potpunu digestiju. Poređene su tri odvage sojinog brašna 0,2; 0,5 i 1 g, dve zapremine sumporne kiseline 10 i 20  $cm^3$  i dve vrste Kjeldalovih tableta kao kombinacije soli i katalizatora. Katalizator 1 (K1): 5 g  $K_2SO_4$  i 0,1 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$ , katalizator 2 (K2): 3,5 g  $K_2SO_4$  i 0,4 g  $CuSO_4 \times 5 H_2O$ .

U Kjeldalov balon dodato je obezmašćeno sojino brašno, Kjeldalova tableta i konc.  $H_2SO_4$ . Postupak digestije (u jedinici za digestiju Büchi, K-424) vršen je uz postepeno zagrevanje i praćenje izdvajanja belih para. Nakon izbistravanja uzorka, zagrevanje je nastavljeno još 20 minuta, tako da je ceo postupak digestije trajao oko 2 h. Na Slici 3.7 prikazani su pripremljeni uzorci u Kjeldalovim kolbama pre (a) i nakon (b) završene digestije. Uzorak je zatim ohlađen, dodato je 20  $cm^3$  destilovane vode, a neposredno pre početka destilacije i 50  $cm^3$  32% rastvora NaOH.





**Slika 3.7.** Digestivna jedinica sa uzorcima sojinog brašna pre početka procesa digestije (levo); nakon završenog postupka digestije biljnog materijala (desno)

U prihvatni sud pipetirano je 50 cm<sup>3</sup> 0,1 M rastvora H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> uz dodatak 3-4 kapi Taširo indikatora. Postupak destilacije je trajao 10 minuta (u destilacionoj jedinici Büchi, K-350) (Slika 3.8).



**Slika 3.8.** Izgled destilacione jedinice korišćene u ovom istraživanju sa pripremljenim uzorkom za destilaciju

Nakon završenog postupka destilacije dobijeni destilat titrisan je 0,2 M rastvorom NaOH do promene boje iz ružičaste u svetlo zelenu.

Uporedo je rađena i slepa proba. Dobijeni rezultati se odnose tj. izražavaju sadržaj azota, a sadržaj proteina se dobija množenjem faktorom 5,71, koji je usvojen na osnovu literaturnih podataka [168,169].

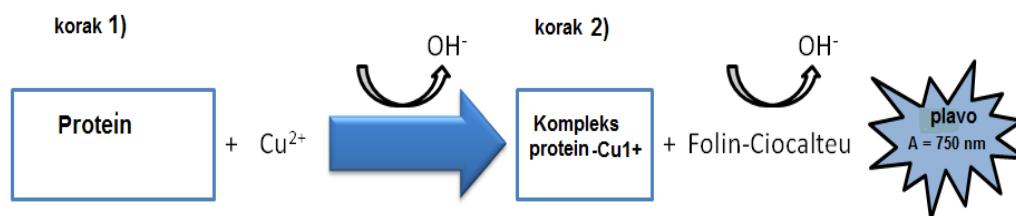
### 3.8.2. Postupak ekstrakcije proteina iz brašna soje

Postupak izolovanja proteina iz obezmašćenog sojinog brašna vršen je na sledeći način: pripremljen je 5% (w/v) vodeni rastvor obezmašćenog sojinog brašna uz podešavanje pH vrednosti na pH 9 rastvorom 1 M NaOH. Smeša je stavljena na tresilicu na sobnoj temperaturi u trajanju od 30 minuta, a zatim je centrifugirana na 5000 ob/min 10 minuta. Iz taloga je određen sadržaj nerastvornih proteina Kjeldalovom metodom, po ranije opisanom postupku.

### 3.8.3. Lorijeva metoda za određivanje sadržaja rastvornih proteina

Lorijeva metoda je jedna od najčešće korišćenih metoda kojom se utvrđuje sadržaj proteina u biološkim uzorcima. Zasnovana je na dve hemijske reakcije. Prva reakcija je redukcija bakarnih jona u alkalnoj sredini i stvaranje kompleksa bakra sa peptidnim vezama proteina (Biuretska reakcija). Druga reakcija je redukcija FC reagensa (koji sadrži fosfomolibdensku i fosfovolframovu kiselinu) bakarnim kompleksom pomoću aromatičnih bočnih ostataka, uglavnom tirozina, triptofana i cisteina, koja dovodi do razvijanja plavo obojenog rastvora sa maksimumom apsorpcije na talasnoj dužini od 650 do 750 nm [170]. Na Slici 3.9 dat je šematski prikaz ove dve reakcije. Koncentracija proteina u uzorku procenjuje se čitanjem apsorbanace krajnjeg proizvoda Folinove reakcije u odnosu na kalibracionu pravu odabranog rastvora proteina (npr. goveđeg serum albumina-BSA rastvora). Prednosti ove metode su njena osetljivost i, što je najvažnije, tačnost. Međutim, zahteva više vremena u odnosu na druge metode, a mnoga jedinjenja koja se obično koriste u puferima za pripremu proteina (kao što su deterdženti, ugljeni hidrati, glicerol, EDTA, Tris) dovode do stvaranja taloga. Ipak, efekat ovih supstanci može se smanjiti razblaženjem uzorka, ali samo ako je

koncentracija proteina u biljnom materijalu dovoljno visoka. Brojne studije pokazuju da je vreme za izvođenje ove metode moguće skratiti podizanjem temperature ili upotrebom mikrotalasa [171].



**Slika 3.9.** Šematski prikaz Lorijeve metode

Pre početka primene metode pripremljeni su sledeći reagensi:

Reagens A: 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pripremljen u 0,1M rastvoru NaOH;

Reagens B: 1%  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  pripremljen u destilovanoj vodi;

Reagens C: 2%  $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$  pripremljen u destilovanoj vodi;

Reagens D: 1  $\text{cm}^3$  reagensa B + 1  $\text{cm}^3$  Reagensa C, dopunjeno do 100  $\text{cm}^3$  reagensom A (priprema se neposredno pre dodavanja u uzorke) i

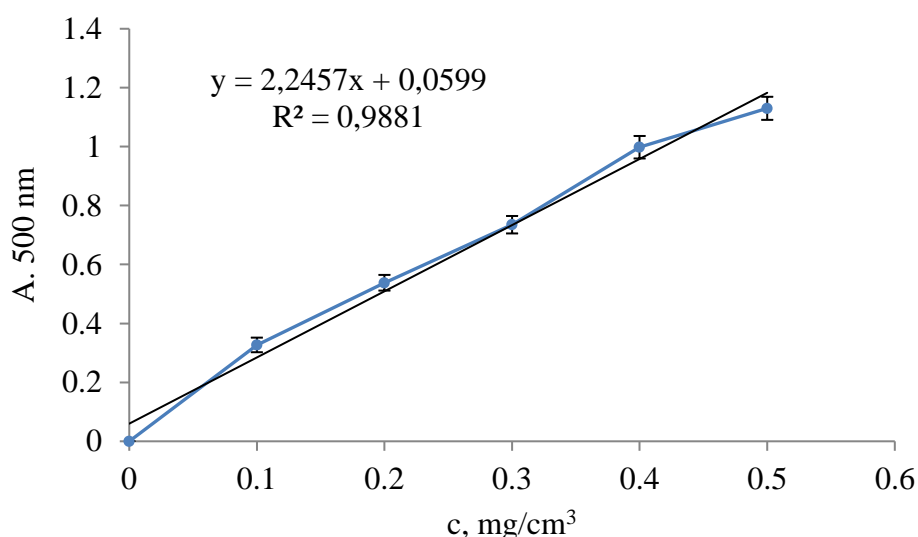
Reagens F: komercijalni FC reagens razblažen vodom u odnosu 1:2.



**Slika 3.10.** Sprej sušnica B-290 (BÜCHI, Švajcarska) korišćena u ovom istraživanju

Uzorak dobijen nakon sušenja u sprej sušnici (Slika 3.10) je rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji  $1 \text{ mg/cm}^3$ . Alikvot od  $1 \text{ cm}^3$  uzorka pomešan je sa  $2 \text{ cm}^3$  reagensa D. Tako pripremljena smeša inkubirana je na sobnoj temperaturi 10 minuta. Zatim je izvršeno dodavanje reagensa F u količini od  $0,2 \text{ cm}^3$  i smeša je u tami inkubirana 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon isteka vremena, očitana je apsorbancija na talasnoj dužini od  $500 \text{ nm}$ .

Slepa proba je pripremljena sa vodom umesto uzorka, uz dodatak svih potrebnih reagenasa. Koncentracija proteina određivana je na osnovu kalibracione prave konstruisane korišćenjem albumina kao standarda (Slika 3.11). Kalibraciona prava je pripremljena na sledeći način: goveđi serum albumin (BSA) je rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji  $1 \text{ mg/cm}^3$ . Nakon toga pripremljena su adekvatna razblaženja (0; 0,1; 0,2 ;0,3; 0,4; 0,5) tako da konačna zapremina bude  $1 \text{ cm}^3$ . Dalji postupak pripreme i razvijanja boje vršen je kao i za uzorke.



**Slika 3.11.** Kalibraciona prava goveđeg seruma albumina (BSA) u koncentracionom opsegu od 0 do  $0,5 \text{ mg/cm}^3$

### 3.9. UTICAJ PRETRETMANA ULTRAZVUKOM NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA

Iako postoje ohrabrujući rezultati u pogledu efikasnosti ekstrakcije biljnih proteina primenom ultrazvuka [172-176], velika snaga ultrazvuka sa produženjem vremena

tretmana stvara visoku temperaturu i pritisak koji mogu da promene prvobitno stanje proteina hrane [177].

U cilju povećanja efikasnosti ekstrakcije proteina iz sojinog brašna i poboljšanja funkcionalnih karakteristika proteinskih izolata vršen je pretretman ultrazvučnom sondom, slično kao i kod prethodnog postupka sa polifenolima.

### 3.9.1. Variranje jačine ultrazvuka

Pripremljen je 5% (w/v) vodeni rastvor obezmašćenog sojinog brašna u specijalnoj posudi za sonikaciju od nerđajućeg čelika sa rashladnim omotačem uz podešavanje pH vrednosti smeše na pH 9, rastvorom 1 M NaOH. Ultrazvučna sonda sa 13 mm titanijumskim vrhom uronjena je direktno u reakcionu smešu i vršeno je tretiranje ultrazvučnim talasima sa vrha sonde. Sonikacija je izvršena na frekvenciji od  $20 \pm 0,2$  kHz pri tri različite jačine ultrazvuka (amplitude 15, 20 i 30%) u trajanju od 10 minuta. Nakon završenog pretretmana uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min 10 minuta. Supernatant je osušen u sprej sušnici, a talog u sušnici na 105°C 24h. Iz supernatanta je određen sadržaj rastvornih proteina metodom po Loriju, a iz taloga sadržaj nerastvornih proteina metodom po Kjeldalu. Na osnovu dobijenih rezultata usvojena je najefikasnija amplituda za koju su u narednoj fazi eksperimenta varirana vremena sonikacije.

### 3.9.2. Variranje vremena sonikacije

Napravljene su nove odvage uzoraka sojinog brašna po prethodno opisanom postupku i smeše su sonicirane u vremenskim periodima od 30 s, 2 min, 5 min, 10 min i 15 min. Temperatura je održavana konstantnom ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) cirkulisanjem termostatisane vode kroz rashladni omotač (uobičajeni protok vode je od 5 do 10  $\text{cm}^3/\text{min}$ ). Nakon završenog pretretmana sondom, uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta, supernatant i talog su podvrgnuti sušenju i ranije opisanim analizama.

### **3.10. UTICAJ PRETRETMANA MIKROTALASIMA NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA**

#### **3.10.1. Variranje temperature**

Odmereno je 5 g obezmašćenog sojinog brašna i pomešano sa 100 cm<sup>3</sup> destilovane vode. Rastvor je podešen na pH 9, 1 M rastvorom NaOH. Ekstrakcija je vršena na tri različite temperature, 65, 75 i 85°C, u periodu od 2 minuta. Svaka pojedinačna temperatura je održavana konstantnom, a snaga mikrotalasa je rasla sve do dostizanja zadate temperature. Nakon završenog postupka ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant i talog su osušeni i analizirani po ranije opisanom postupku.

#### **3.10.2. Variranje snage mikrotalasa**

Nakon usvajanja optimalne temperature ekstrakcije, varirana je snaga mikrotalasa od 100, 180 i 300 W u periodu od 2, 5 i 10 minuta. Temperaturni limit je podešen na 120°C da bi se izbegla degradacija bioaktivnih jedinjenja u biljnom materijalu. Nakon završenog pretretmana, uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant i talog su osušeni i analizirani po ranije opisanom postupku.

### **3.11. ODREĐIVANJE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA PROTEINA RAZLIČITO PRETRETIRANIH UZORAKA**

Za određivanje funkcionalnih svojstava izolovanih proteina soje (rastvorljivost, emulgujući kapacitet i stabilnost emulzije) koriste se spektrofotometrijske metode mereći apsorbancu rastvora proteina u odnosu na kalibracionu pravu goveđeg seruma albumina.

### 3.11.1. Određivanje rastvorljivosti

Rastvorljivost je najvažnije i generalno prvo funkcionalno svojstvo koje je ispitivano u toku razvoja novih proteinskih sastojaka zbog značajnog uticaja na druga funkcionalna svojstva proteina kao što su sposobnost geliranja, emulgovanja i penjenja [178,179]. Generalno, proteini su rastvorljiviji pri nižim (kiselim) ili višim (baznim) pH vrednostima, zbog viška naelektrisanja istog znaka, kada se pojavljuju odbojne sile između molekula što doprinosi njihovoj rastvorljivosti. Proteini su obično najmanje rastvorljivi oko izoelektrične tačke (pI), gde su odbojne sile nedovoljno jake da spreče agregaciju molekula i zbog toga je stepen interakcije vode sa molekulima manji.

Sadržaj proteina određuje se spektrofotometrijski, metodom po Loriju, u odnosu na BSA serum kao standard, a rastvorljivost proteina se izražava kao procenat proteina zaostalih u supernatantu u odnosu na ukupan sadržaj proteina u uzorku nakon rastvaranja.

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: od različito pretretiranih ekstrakata, nakon sprej sušenja, pripremljen je rastvor koncentracije  $1 \text{ mg/cm}^3$  u destilovanoj vodi, a zatim je, korišćenjem 0,5 M rastvora NaOH ili 0,5 M rastvora HCl podešen pH na željenu vrednost: 3, 5, 7 i 9. Uzorci su mešani na magnetnoj mešalici 30 minuta na sobnoj temperaturi brzinom od 500 ob/min. Nakon inkubacije, odvojen je alikvot za određivanje sadržaja proteina, a ostatak reakcione smeše je centrifugiran 10 minuta na 12000 ob/min. Rastvorljivost je određena na osnovu razlike u sadržaju proteina u uzorku pre i nakon centrifugiranja i izražena u procentima. Sadržaj proteina je određen korišćenjem BSA kao standarda i metode po Loriju, na osnovu prethodno opisanog postupka.

### 3.11.2. Određivanje emulgujućih svojstava

Emulgujući kapacitet i stabilnost emulzije se takođe određuju spektrofotometrijski merenjem apsorbance proteinskih rastvora na talasnoj dužini od 500 nm u odnosu na SDS (natrijum-dodecil-sulfat) kao standard, prema metodi iz literature sa manjim modifikacijama [180]. Na osnovu izmerene apsorbance računskim putem se određuje замуćenje (turbidnost) (T) prema sledećoj formuli:

$$T = 2.303 \frac{A}{l} \quad (3.2)$$

gde je  $T$  zamućenje,  $A$  je apsorbanca na 500 nm i  $l$  je debljina kivete (m).

Indeks aktivnosti emulzije (IAE) se računa po formuli:

$$IAE = \frac{2 \times T \times r}{c \times \theta} \quad (3.3)$$

izraženo u  $m^2/g$ , gde je  $T$  zamućenje (izračunato iz prethodnog izraza),  $r$  faktor razblaženja,  $\theta$  zapremina uljane faze (ml),  $c$  masa proteina po jedinici zapremine vodene faze pre formiranja emulzije (g/ml).

Indeks stabilnosti emulzije (ISE) se računa po formuli:

$$ISE = \frac{T \Delta t}{\Delta T} \quad (3.4)$$

gde je  $T$  početno zamućenje na 0 h,  $\Delta T$  je promena zamućenja u periodu od 24 h i  $\Delta t$  je vremenski interval (24 h).

Uzorci su pripremljeni na sledeći način: odgovarajući suvi koncentrat je rastvoren do koncentracije 1% (w/v). 3  $cm^3$  pripremljenog rastvora proteina je pomešano sa 1  $cm^3$  suncokretovog ulja i homogenizovano u trajanju od 90 s na 13500 ob/min i temperaturi od 25°C. Alikvot od 0,05  $cm^3$  je razblažen 100 puta fosfatnim puferom (0,01 M fosfatni pufer, pH 7) koji sadrži 0,1% (w/v) rastvor SDS-a i merena je apsorbanca na 500 nm u uzorku u odnosu na pufer sa SDS-om.

Za određivanje stabilnosti emulzije, disperzije proteina soje su čuvane u frižideru na temperaturi 4°C tokom 24 h i analizirana je emulziona aktivnost merenjem apsorbanca na 500 nm kao što je prethodno opisano, a zatim je indeks stabilnosti emulzije (ISE) izračunat prema formuli 3.4.

### 3.12. STATISTIČKA OBRADA EKSPERIMENTALNIH REZULTATA

Postupci ekstrakcije za svaki tretman su izvedeni u duplikatu, sva merenja su izvršena u triplikatu, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Analiza varijanse (ANOVA) praćena Tukey testom korišćena je za upoređivanje efekata ultrazvučnog i mikrotalasnog pretretmana, kao i efekata različitih đubriva na sadržaj



bioaktivnih jedinjenja u semenu soje. Razlike u vrednostima su smatrane statistički značajnim ukoliko je  $p$  vrednost bila manja od 0,05 ( $p < 0,05$ ). Statistički program Minitab 16 (Minitab 16 Statistical Software) korišćen je za obradu podataka. Analiza glavnih komponenti (na engl. *Principal Component Analysis*, PCA) primenjena je za procenu uticaja folijarnih đubriva na akumulaciju polifenolnih kiselina u semenu soje, korišćenjem statističkog programa SPSS 15.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

## ***4. REZULTATI I DISKUSIJA***

Kako je soja bogata polifenolnim jedinjenjima, pre svega izoflavonima i polifenolnim kiselinama, u prvoj fazi eksperimenta izvršena je optimizacija uslova za određivanje sadržaja polifenolnih kiselina (galna, *trans*-cimetna, ferulna, hlorogena, kafena i *p*-kumarna) u samlevenom i obezmašćenom zrnu soje.

U ispitivanom uzorku žute soje sorte Laura određen je sadržaj ulja od 20,48% (w/w) i procenat vlage od 11,67% (w/w). Ove vrednosti su korišćene u preračunavanju svih određivanih parametara u cilju izražavanja njihovog sadržaja u odnosu na suhu materiju semena (brašna).

#### **4.1. IZBOR ADEKVATNOG EKSTRAKCIONOG SREDSTVA I ISPITIVANJE POTREBE ZA DVOSTEPENOM EKSTRAKCIJOM**

Izbor najefikasnijeg ekstrakcionog sredstva izvršen je na osnovu sadržaja ukupnih fenola. Obezmašćeno brašno soje ekstrahovano je sa osam različitih ekstrakcionih smeša kao što je opisano u metodi 3.2.4, dok je sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima određen korišćenjem dva tipa Folinovih reagenasa po metodi 3.2.6 i izražen u odnosu na galnu kiselinu. U Tabeli 4.1 prikazan je sadržaj ukupnih fenola u brašnu soje ekstrahovanom različitim rastvaračima.

Među tri korišćena rastvarača, 80% vodeni rasvor acetona pokazao je najveću efikasnost ekstrakcije, što se ne može pripisati njegovoj polarnoj prirodi, jer su i metanol i etanol vrlo polarni rastvarači. Kako su polifenolna jedinjenja zbog svoje fenolne prirode relativno hidrofilna, očekuje se da polarni rastvarači poput metanola ili etanola olakšavaju rastvorljivost slobodnih polifenola, uključujući aglikone, glikozide i oligomere olakšanim prodiranjem u biljne ćelije. Međutim, čini se da su efekti rastvarača na ekstrakciju pojedinačnih klasa fenolnih jedinjenja složeni i zavise od uslova i intenziteta samog postupka, vrste fenolnih jedinjenja i od prirode polaznog materijala. Prema literaturnim podacima, metanol je efikasniji za ekstrakciju fenola male molarne mase, dok se molekuli velike molarne mase bolje ekstrahuju u vodenom acetonu [85].

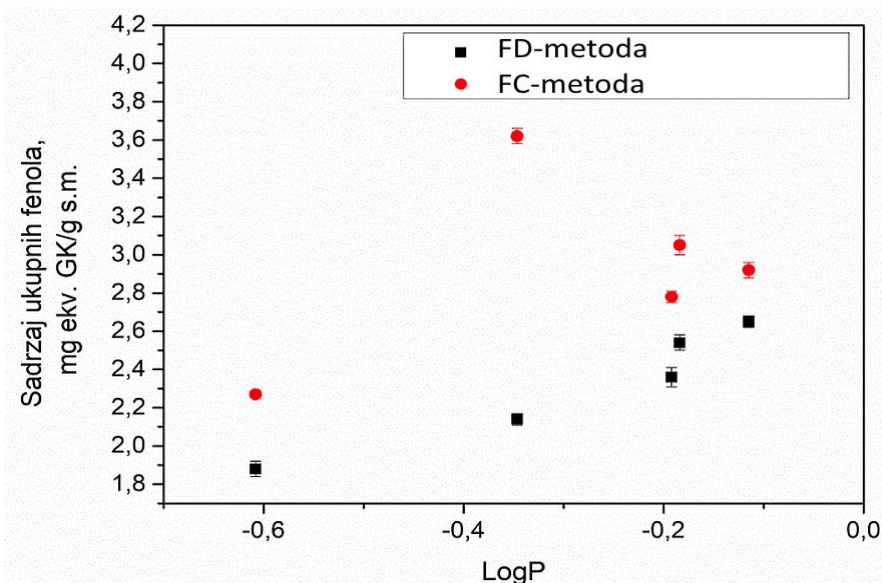
**Tabela 4.1.** Sadržaj ukupnih fenola (mg ekv. GK/g s.m.) u obezmašćenom brašnu soje ekstrahovanom različitim ekstrakcionim smešama, određen korišćenjem dva tipa Folinovih reagenasa i vrednosti logaritamskog koeficijenta raspodele jedinjenja u sistemu *n*-oktanol/voda kao mere lipofilnosti rastvarača

Ekstrakciona smeša	Log <i>P</i>	FD reagens	FC reagens
metanol i 10% HCl u odnosu 85:15 (v/v)	–	2,72 ± 0,02 <sup>A</sup>	3,65 ± 0,03 <sup>A</sup>
aceton i 10% HCl u odnosu 85:15 (v/v)	–	2,66 ± 0,03 <sup>B</sup>	3,31 ± 0,03 <sup>B</sup>
etanol i 10% HCl u odnosu 85:15 (v/v)	–	2,48 ± 0,02	3,07 ± 0,04
70% (v/v) metanol i 70% (v/v) aceton u odnosu 1:1	–0,3465	2,14 ± 0,03	3,62 ± 0,04
80% (v/v) aceton	–0,184	2,54 ± 0,04 <sup>B</sup>	3,05 ± 0,05 <sup>A</sup>
50% (v/v) aceton	–0,115	2,65 ± 0,03	2,92 ± 0,04
80% (v/v) etanol	–0,192	2,36 ± 0,05 <sup>B</sup>	2,78 ± 0,03 <sup>B</sup>
80% (v/v) metanol	–0,608	1,88 ± 0,04	2,27 ± 0,02

<sup>A</sup>Rezultati dobijeni sa ekstrakcionom smešom koja se sastoji od metanola i HCl statistički se značajno razlikuju u odnosu na rezultate sa smešom acetona sa HCl i etanola sa HCl; rezultati sa 80% rastvorom acetona statistički se značajno razlikuju od 80% rastvora etanola i 80% metanola ( $p < 0,05$ )

<sup>B</sup>Rezultati dobijeni sa ekstrakcionom smešom koja se sastoji od acetona sa HCl statistički se značajno razlikuju od rezultata sa etanolom sa HCl; ekstrakciona smeša 80% etanola statistički se značajno razlikuje od 80% metanola ( $p < 0,05$ )

Da bi se potvrdilo da li postoji korelacija između ekstrakcije fenolnih jedinjenja i polariteta rastvarača, konstruisan je grafik zavisnosti ukupnih fenola (TPC) i particionog koeficijenta (log*P*) ekstrakcionih smeša (Slika 4.1). Postoji linearna korelacija između TPC i log*P* ekstrakcionih smeša ( $R^2=0,93$ ) kada se ukupni fenoli određuju po FD metodi, što ukazuje na negativnu ulogu polariteta rastvarača na rastvorljivost polifenola. Naime, TPC se smanjio sa povećanjem polarnosti rastvarača.



**Slika 4.1.** Zavisnost sadržaja ukupnih fenola od polarnosti rastvarača izražene kao logaritam koeficijenta raspodele, logP

Slično našim rezultatima sa sojinim brašnom, Kajdzanoska i sar. (2011) su utvrdili da mešavine koje sadrže aceton daju mnogo veći prinos ukupnih fenolnih jedinjenja iz jagoda od onih koje sadrže metanol, što se uglavnom može pripisati većim količinama flavan-3-ola (proantocijanidina) i konjugovanih oblika elaginske kiseline. Takođe su otkrili da prisustvo i priroda kiseline u rastvaraču nisu značajno uticali na ekstrakciju antocijanina u acetonu [181]. Međutim, u tekućem istraživanju, zakišeljavanje metanola 10%-nim vodenim rastvorom hlorovodonične kiseline (10% HCl) značajno je poboljšalo ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Iz tog razloga ovaj sistem rastvarača odabran je za dalji rad. Takođe, od dva ispitana tipa Folinovih reagenasa, bolje rezultate daje FC reagens, što je i bilo pretpostavljeno, jer on predstavlja poboljšanu modifikaciju FD reagensa. U narednim fazama eksperimenta za određivanje sadržaja ukupnih fenola korišćen je FC reagens.

Sledeći korak je bio upoređivanje jednostepene i dvostepene ekstrakcije sojinog brašna. Odmerene su nove odvage uzoraka prema metodi 3.2.4, a nakon centrifugiranja uzoraka i odvajanja supernatanta, ponovljen je postupak ekstrakcije, a zatim i centrifugiranja pod istim uslovima. Supernatanti su spojeni, upareni do suva u rotacionam vakuum uparivaču i suvi ostatak rastvoren je u 10 ml ekstrakcione smeše iz koje je određen

sadržaj ukupnih fenola. Na osnovu dobijenih rezultata za jednostepenu ekstrakciju (3,65 mg ekv.GK/g s.m) i dvostepenu ekstrakciju (3,67 mg ekv.GK/g s.m), zaključeno je da nema potrebe za dvostepenom ekstrakcijom polifenola iz brašna soje (STD < 2%), pre svega zbog smanjene upotrebe rastvarača, što je bitno kako zbog ekonomičnosti postupka, tako i zbog zaštite životne sredine.

## 4.2. OPTIMIZACIJA HPLC METODE ZA DETEKCIJU POLIFENOLNIH KISELINA

Da bi se optimizovao postupak ekstrakcije polifenola iz obezmašćenog sojinog brašna bilo je neophodno razviti pouzdanu metodu za njihovo kvantitativno određivanje. Tečna hromatografija pod visokim pritiskom je jedna od najviše korišćenih metoda za kvantitativno određivanje ukupnih i pojedinačnih polifenolnih jedinjenja, ali nivo detekcije i efikasnost razdvajanja jako zavise od sastava mobilne faze i uslova proticanja kroz kolonu.

Optimizacija je izvršena korišćenjem mešanog standarda šest praćenih polifenolnih kiselina koncentracije 100 µg/cm<sup>3</sup> i praćenjem vremena zadržavanja i odziva kiselina na detektoru na dve talasne dužine, 280 nm za galnu i *trans*-cimetnu kiselinu i 325 nm za hlorogenu, kafenu, *p*-kumarnu i ferulnu kiselinu. Varirani su sastavi mobilne faze i gradijentski uslovi za svaku od faza, kao što je navedeno u daljem tekstu. U nastavku su prikazani hromatogrami na osnovu kojih je izabrana adekvatna mobilna faza i njen odgovarajući gradijent. Na datim hromatogramima polifenolne kiseline su obeležene na sledeći način: galna (1), hlorogena (2), kafena (3), *p*-kumarna (4), ferulna (5) i *trans*-cimetna (6).

### 4.2.1. Mobilna faza 1

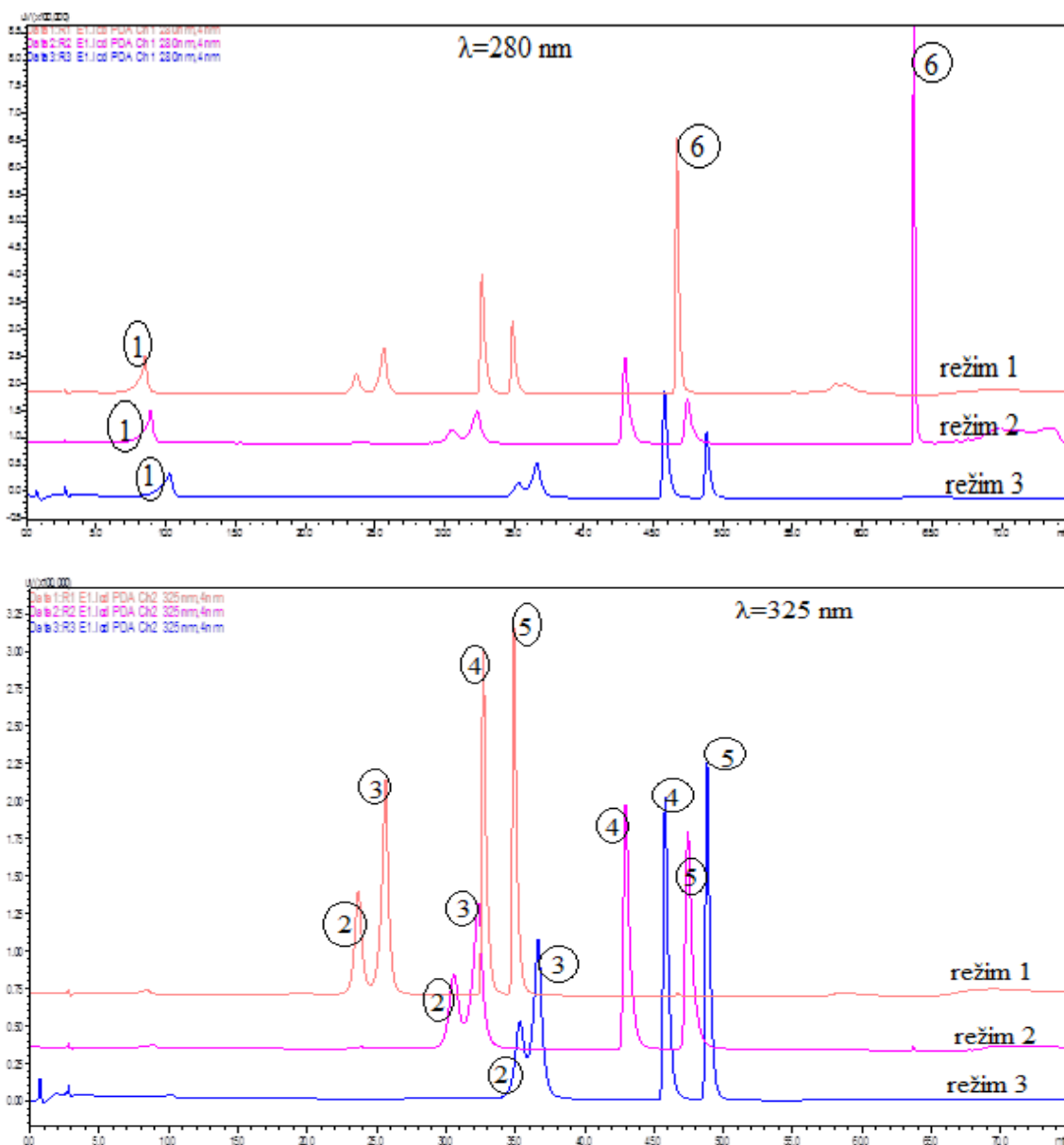
A: 0,1% rastvor mravlje kiseline

B: Metanol [96,162,163];

**Gradijent 1:** Na 0 min. 95% A; na 25 min. 70% A; na 35 min. 60% A; na 40 min. 52% A; na 50 min. 30% A; na 55 min. 0% A; na 65 min. 95% A; na 75 min. 95% A [95];

**Gradijent 2:** Na 0 min. 95%A; na 40 min. 70%A; na 55 min 70%A; na 65 min. 0%A; na 70 min. 0%A; na 75 min. 95%A, uz male modifikacije zbog dužine kolone [162];

**Gradijent 3:** Na 0 min. 97% A; na 10 min. 92% A; na 20 min. 85% A; na 30 min. 80% A; na 40 min. 70% A; na 50 min. 60% A; na 60 min. 75% A, uz male modifikacije zbog dužine kolone. [165].



**Slika 4.2.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$  praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitom gradijentu

Na Slici 4.2 prikazani su standardi šest polifenolnih kiselina u zavisnosti od gradijenta, tj. promene sastava mobilne faze u toku vremena. Sva tri gradijentna režima su usvojena na osnovu pregleda literature za analize istih ili sličnih polifenolnih kiselina, a na osnovu istog ili srodnog matriksa. Eventualne izmene su izvršene u cilju usklađivanja sa dužinom kolone korišćene u ovom istraživanju. Na talasnoj dužini 280 nm (Slika 4.2 a), praćene su dve polifenolne kiseline, galna (1) i *trans*-cimetna (6). Najslabiji rezultati dobijeni su korišćenjem režima 3, gde u zadatom vremenskom intervalu nije došlo do eluiranja *trans*-cimetne kiseline. Kako se ovaj režim pokazao kao najlošiji i na talasnoj dužini od 325 nm (Slika 4.2 b), na kojoj su praćene preostale četiri polifenolne kiseline, hlorogena (2), kafena (3), *p*-kumarna (4) i ferulna (5), pre svega zbog veoma lošeg razdvajanja hlorogene i kafene kiseline, odbačen je. Od preostala dva režima, bolje razdvajanje hlorogene i kafene kiseline i veći odziv na detektoru postignut je korišćenjem režima 1, tako da je on usvojen u ovoj fazi eksperimenta.

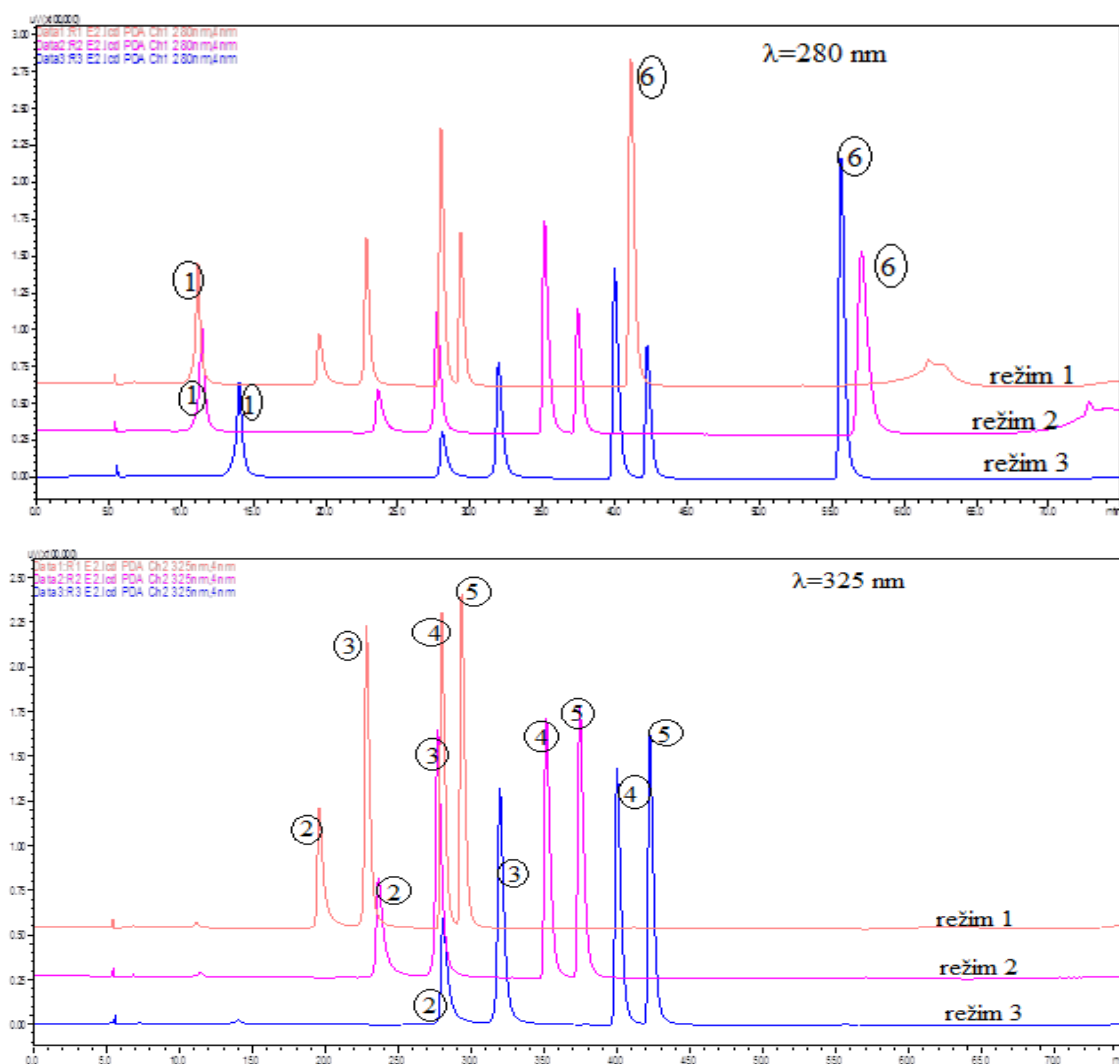
#### 4.2.2. Mobilna faza 2

A: 0,1% rastvor mravlje kiseline;

B: Acetonitril [164].

U ovom koraku promenjen je sastav mobilne faze, a korišćeni su isti gradijenti kao u prethodnom. Sva tri gradijentna režima pokazala su slične rezultate, kako za razdvajanje pikova, tako i za jačinu odziva (Slika 4.3). Nešto je slabiji odziv i pik smanjene oštrine dobijen za *trans*-cimetnu kiselinu (Slika 4.3 a), korišćenjem režima 2, pa je on prvi odbačen. Između režima 1 i 3 u ovoj fazi eksperimenta usvojen je režim 1, pre svega zbog kraćeg vremena zadržavanja (retencionog vremena) praćenih polifenolnih kiselina.





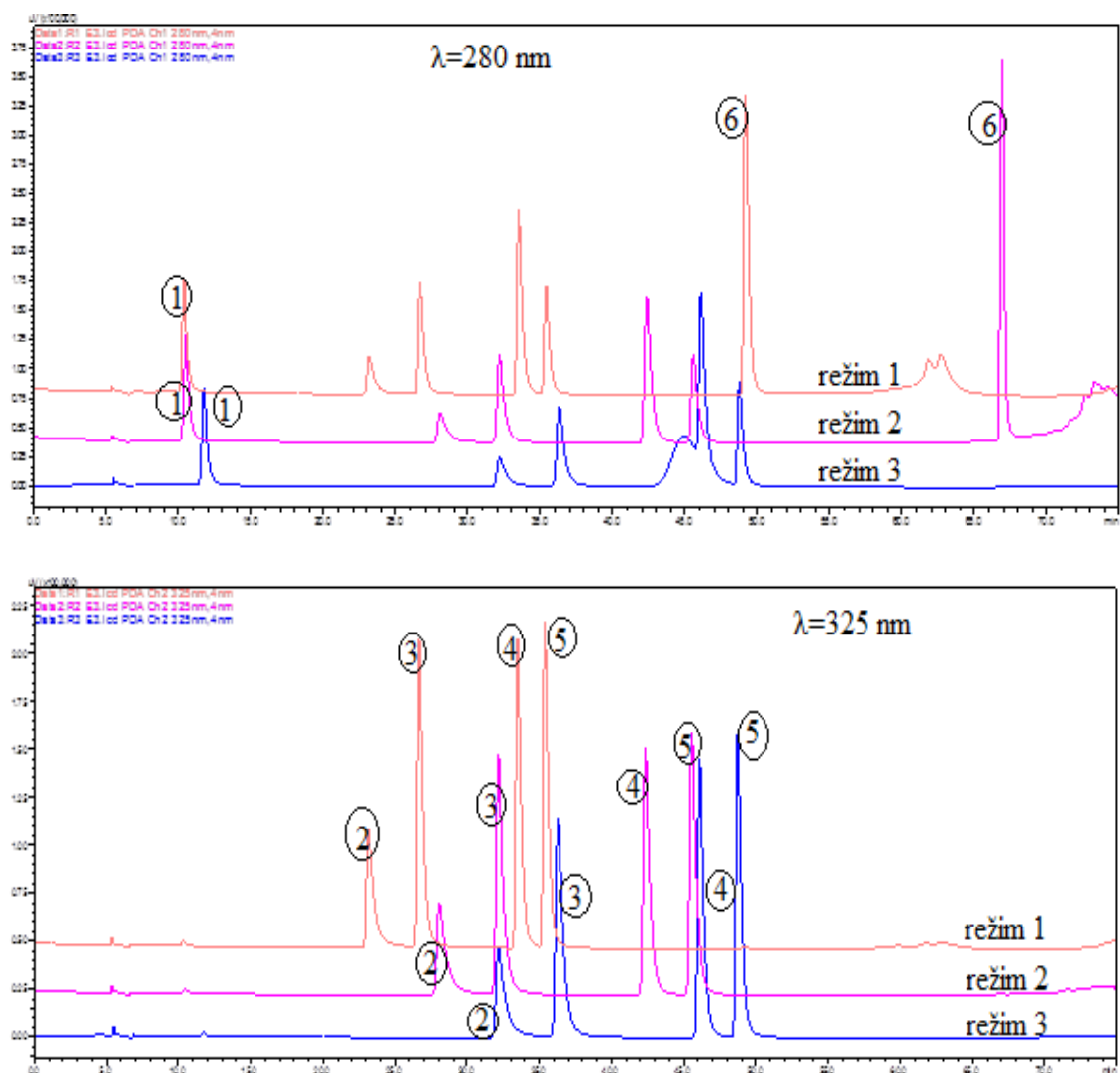
**Slika 4.3.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$  praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitim gradijentu eluiranja

#### 4.2.3. Mobilna faza 3

A: 2% rastvor sirćetne kiseline;

B: Metanol:Acetonitril, 1:1 [95].

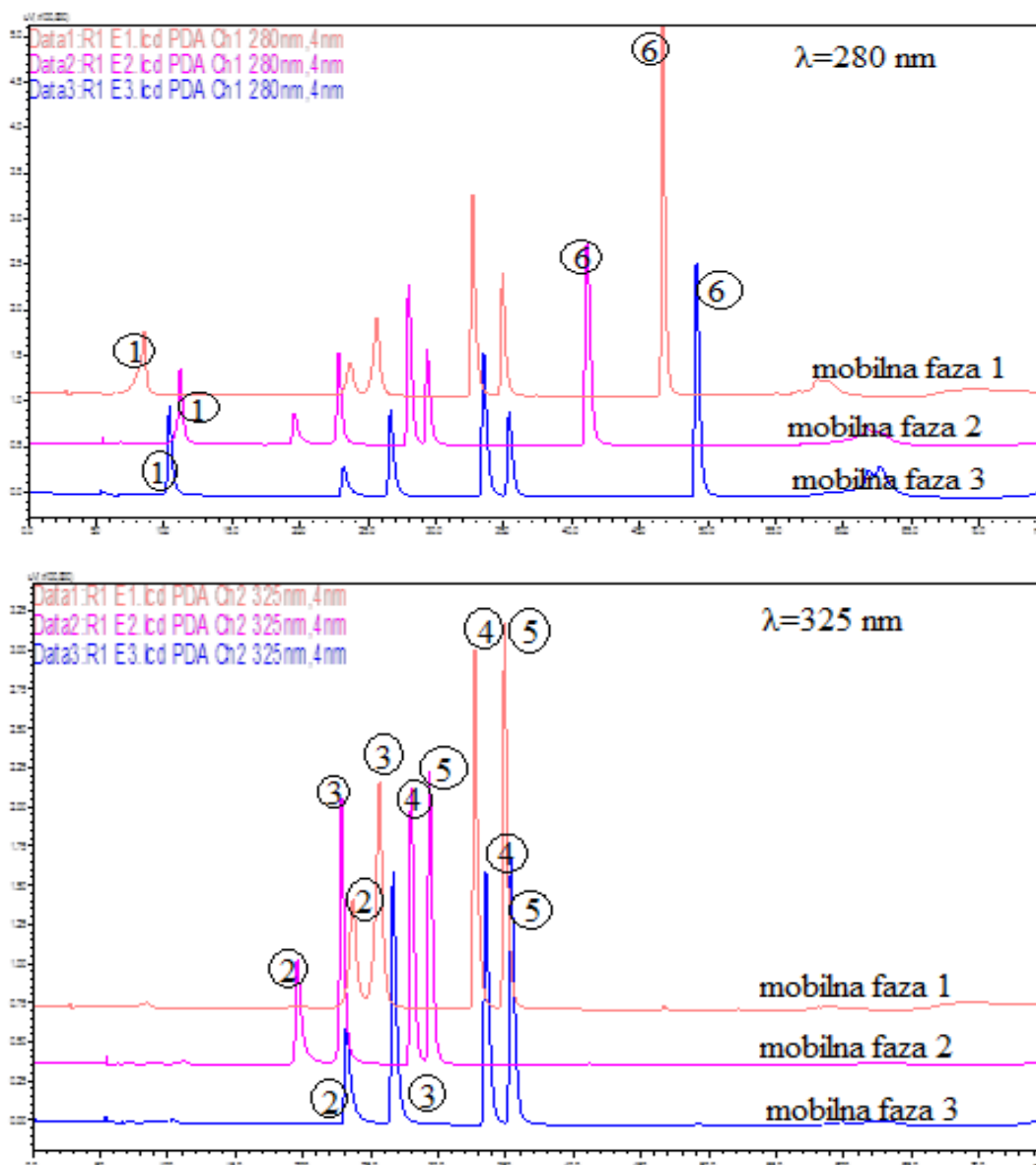
Sastav mobilne faze je ponovo promenjen, a ispitana su ista tri gradijenta kao u prethodnim koracima. Rezultati su prikazani na Slici 4.4.



**Slika 4.4.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitom gradijentu eluiranja

Slično kao pri korišćenju mobilne faze 1, *trans*-cimetna kiselina (Slika 4.4. a) ne eluira u zadatom vremenskom intervalu, pa je režim 3 odbačen. Od preostala dva režima, najviše zbog kraćeg vremena zadržavanja, izabran je gradijentni režim 1, s obzirom da je kod oba razdvajanje polifenolnih kiselina zadovoljavajuće, a odziv sličnog intenziteta. Na osnovu prethodnih analiza, za sve tri mobilne faze najadekvatniji se pokazao gradijentni režim 1: Na 0 minuta 95% A; na 25 min. 70% A; na 35 min. 60% A; na 40 min. 52% A; 50 min. 30% A; na 55 min. 0% A; na 65 min. 95% A; na 75 min 95% A [95], pa je izvršeno upoređivanje sve tri mobilne faze u ovom režimu.

Rezultati su prikazani na Slici 4.5.



**Slika 4.5.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^3$  praćenih na dve talasne dužine pri istom gradijentu eluiranja, a različitim mobilnim fazama

Poređenjem odziva kiselina (intenziteta pikova) na talasnoj dužini od 280 nm, može se zaključiti da mobilna faza 3 daje nešto jači odziv galne kiseline (Slika 4.5 a, pik 1), ali da su odzivi *trans*-cimetne kiseline značajno slabiji korišćenjem mobilnih faza 2 i 3 u odnosu na mobilnu fazu 1. Poređenjem odziva kiselina koje daju maksimum na 325 nm, sve tri mobilne faze omogućavaju dobro razdvajanje istih, ali se i ovde izdvaja mobilna

faza 1, pre svega zbog jačine odziva *p*-kumarne i ferulne kiseline (Slika 4.5 b, pikovi 3 i 4).

Kako su, prema literaturnim podacima, ove dve polifenolne kiseline najzastupljenije u semenu soje [4-7], u daljim fazama eksperimenta usvojena je mobilna faza 1: 0,1% rastvor mravlje kiseline i metanol pri gradijentnom režimu 1. Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  za izabranu mobilnu fazu i gradijent eluiranja, sa vremenom eluiranja i odzivima za pojedinačne polifenolne kiseline dati su u Prilogu 1. Za svaku kiselinu pod prethodnim uslovima gradijenta i sastava mobilne faze napravljena je kalibraciona prava u opsegu koncentracija od 10 do  $150 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (Prilog 2).

### 4.3. OPTIMIZACIJA POSTUPKA EKSTRAKCIJE

Nakon izbora adekvatnog gradijentnog režima i mobilne faze za detekciju polifenolnih kiselina u obezmašćenom brašnu soje sorte Laura, pristupilo se izboru adekvatnog ekstrakcionog postupka u cilju što potpunije ekstrakcije. Prema literaturnim podacima, najveći deo polifenolnih jedinjenja u žitaricama i leguminozama prisutan je u vezanom obliku, kovalentnim vezama povezan sa strukturnim jedinicama ćelijskog zida celulozom, hemicelulozom i ligninom [182,183]. Zbog toga je neophodno izvršiti njihovo oslobađanje pre samog postupka ekstrakcije, što se najčešće postiže baznom ili kiselinskom hidrolizom. Tretman kiselinom razlaže glikozidne veze polimera i oslobađa jednostavne šećere, ali generalno ostavlja estarske veze u tako produkovanim šećerima netaknute [88]. Bazna hidroliza raskida estarske veze kojima su polifenolne kiseline vezane za polisaharide ćelijskog zida i predstavlja efikasan način da se oslobode fenolna jedinjenja iz tih polisaharida [91].

Iako se u velikom broju studija, bazna hidroliza pokazala kao efikasniji način oslobađanja polifenolnih jedinjenja [91,184,185], postoje i studije koje ukazuju na veću efikasnost kiselinske hidrolize [186]. Zbog svega navedenog, u ovom istraživanju ispitan je uticaj direktne bazne hidrolize (metoda 1), direktne kiselinske hidrolize (metoda 2) i ekstrakcije rastvaračem praćene baznom i kiselinskom hidrolizom (metoda 3) na efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna žute soje.

Uzorci obezmašćenog sojinog brašna su pripremljeni po metodama 3.4.1; 3.4.2 i 3.4.3, a sadržaj šest polifenolnih kiselina u pripremljenim ekstraktima analiziran je ranije optimizovanom HPLC metodom. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.2.

**Tabela 4.2.** Sadržaj polifenolnih kiselina u obezmašćenom brašnu soje sorte Laura ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u zavisnosti od načina ekstrakcije

Fenolna kiselina	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3
galna	n.d.	$224,05 \pm 2,85^{\text{A}*}$	<b><math>193,67 \pm 3,12^{\text{B}}</math></b>
<i>trans</i> -cimetna**	$169,38 \pm 3,65^{\text{C}}$	$179 \pm 3,97^{\text{B}}$	<b><math>290,28 \pm 3,33^{\text{A}}</math></b>
hlorogena	n.d.	n.d.	<b><math>151,13 \pm 2,06</math></b>
kafena	n.d.	n.d.	<b><math>68,41 \pm 1,49</math></b>
<i>p</i> -kumarna	$348,1 \pm 3,62^{\text{B}}$	$253,03 \pm 3,81^{\text{C}}$	<b><math>435,78 \pm 4,61^{\text{A}}</math></b>
ferulna	$436,3 \pm 3,68^{\text{A}}$	$248,9 \pm 3,07^{\text{B}}$	<b><math>440,44 \pm 4,02^{\text{A}}</math></b>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C) u superskriptu, za svaku pojedinačnu kiselinu, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za *trans*-cimetnu i ferulnu kiselinu dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani; n.d.-nije detektovano

Dve kiseline, *p*-kumarna i ferulna ekstrahovane su pomoću sve tri metode, što je u skladu sa literaturnim podacima da su to dve dominantne polifenolne kiseline u semenu kako žute, tako i crne soje [41,57]. Alkalna hidroliza (metoda 1) se pokazala efikasnijom od kiselinske hidrolize (metoda 2) prilikom ekstrakcije *p*-kumarne i ferulne kiseline, koje su čvrsto vezane sa ćelijskim komponentama [183,187]. Ovo istraživanje potvrđuje činjenicu da je alkalna hidroliza efikasnija u raskidanju i etarskih i estarskih veza, koje se retko raskidaju postupkom kiselinske hidrolize [182]. Međutim, čini se da nijedan od ova dva tretmana ne može osloboditi vezane fenolne kiseline. Njihova ekstrakcija iz semena soje (i srodnih mahunarki) u velikoj meri otežana je prisustvom velike količine proteina u zrnju, ali i time što mahunarke imaju samo 15-20% fenolnih jedinjenja u slobodnom, rastvorljivom obliku, a ostatak je vezan etarskim ili estarskim vezama sa komponentama ćelijskog zida.

Ipak, dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da ekstrakcija smešom rastvarača pre bazne i kiselinske hidrolize značajno poboljšava izolovanje polifenolnih kiselina iz brašna soje. Izgleda da sistem rastvarača pomaže denaturisanje ćelijske membrane, istovremeno oslobađajući fenolne kiseline.

#### 4.4. PRETRETMAN ULTRAZVUČNOM SONDOM U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLA

U cilju daljeg poboljšanja ekstrakcije polifenolnih kiselina iz obezmašćenog sojinog brašna, izvršeno je nekoliko tretmana uzoraka ultrazvučnom sondom. Uzorci obezmašćenog sojinog brašna su pripremljeni po metodi 3.5, a sadržaj ekstrahovanih polifenolnih kiselina u različito pretretiranim ekstraktima analiziran po optimizovanoj HPLC metodi. Uticaj snage ultrazvučne sonde i vremena sonikacije na efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje prikazan je u Tabeli 4.3.

Pri amplitudi sonde 15% od maksimalne snage produženje vremena sonikacije nije pokazalo značajan uticaj na ekstrakciju polifenolnih kiselina ( $p > 0,05$ ). Sa porastom amplitude na 30%, količina ekstrahovanih slobodnih polifenolnih kiselina, pre svega *trans*-cimetne, *p*-kumarne i ferulne statistički značajno raste ( $p < 0,05$ ). Ultrazvučni pretretman (20 kHz, amplituda 30%, 10 min) usvojen je kao najbolji sa aspekta efikasnosti ekstrakcije i ti uslovi su korišćeni u sledećoj fazi istraživanja.

Poređenjem ove metode i metode 3 (Tabela 4.2), pokazalo se da neke polifenolne kiseline, poput *trans*-cimetne i kafene kiseline, mogu biti oslobođene primenom ultrazvuka bez kiselinske i bazne hidrolize. Međutim, u većini slučajeva ultrazvuk nije bio dovoljan da bi se raskinule sve estarske ili etarske veze i oslobodile fenolne kiseline, uprkos činjenici da smicajna sila koja se stvara tokom kavitacije povećava prenos mase povećanjem rastvorljivosti čvrste faze i difuziju solubilizovanih fenolnih kiselina u rastvarač. Rezultati su takođe potvrdili da su *p*-kumarna i ferulna kiselina snažno vezane u ćelijskim komponentama i nisu ekstrahovane uprkos ultrazvučnom tretmanu (samo primenom ultrazvuka).

**Tabela 4.3.** Uticaj vremena sonikacije i amplitude ultrazvučne sonde na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

Fenolna kiselina	2'		5'	
	15%	30%	15%	30%
galna**	37,92 $\pm$ 1,26 <sup>A*</sup>	35,59 $\pm$ 0,59 <sup>B</sup>	36,16 $\pm$ 0,25 <sup>A</sup>	35,69 $\pm$ 0,43 <sup>A</sup>
<i>trans</i> -cimetna	31,44 $\pm$ 1,12 <sup>B</sup>	72,33 $\pm$ 0,46 <sup>A</sup>	37,58 $\pm$ 0,47 <sup>B</sup>	105,18 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>
hlorogena	n.d.	50,37 $\pm$ 0,71	49,72 $\pm$ 0,38 <sup>B</sup>	60,47 $\pm$ 0,39 <sup>A</sup>
kafena	29,28 $\pm$ 0,79 <sup>B</sup>	33,75 $\pm$ 0,55 <sup>A</sup>	33,18 $\pm$ 0,36 <sup>A</sup>	32,94 $\pm$ 0,16 <sup>A</sup>
<i>p</i> -kumarna	24,60 $\pm$ 0,96 <sup>B</sup>	42,61 $\pm$ 0,87 <sup>A</sup>	32,14 $\pm$ 0,56 <sup>B</sup>	49,39 $\pm$ 0,49 <sup>A</sup>
ferulna	14,16 $\pm$ 0,47 <sup>B</sup>	46,29 $\pm$ 0,33 <sup>A</sup>	15,28 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>	41,22 $\pm$ 0,22 <sup>A</sup>

Fenolna kiselina	10'		15'	
	15%	30%	15%	30%
galna	37,96 $\pm$ 0,18 <sup>B</sup>	<b>38,51</b> $\pm$ 0,27 <sup>A</sup>	38,56 $\pm$ 0,31 <sup>B</sup>	39,18 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>
<i>trans</i> -cimetna	35,64 $\pm$ 0,36 <sup>B</sup>	<b>218,93</b> $\pm$ 0,27 <sup>A</sup>	47,9 $\pm$ 0,17 <sup>B</sup>	106,36 $\pm$ 0,32 <sup>A</sup>
hlorogena	55,92 $\pm$ 0,27 <sup>B</sup>	<b>64,58</b> $\pm$ 0,38 <sup>A</sup>	68,32 $\pm$ 0,30 <sup>A</sup>	66,98 $\pm$ 0,19 <sup>B</sup>
kafena	30,84 $\pm$ 0,21 <sup>B</sup>	<b>41,75</b> $\pm$ 0,22 <sup>A</sup>	38,68 $\pm$ 0,12 <sup>A</sup>	34,86 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>
<i>p</i> -kumarna	26,88 $\pm$ 0,44 <sup>B</sup>	<b>78,78</b> $\pm$ 0,28 <sup>A</sup>	13,76 $\pm$ 0,15 <sup>B</sup>	63,62 $\pm$ 0,29 <sup>A</sup>
ferulna	14,5 $\pm$ 0,24 <sup>B</sup>	<b>52,82</b> $\pm$ 0,40 <sup>A</sup>	17,84 $\pm$ 0,16 <sup>B</sup>	51,19 $\pm$ 0,41 <sup>A</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B) u superskriptu, za svaku pojedinačnu kiselinu, za konstantno eksperimentalno vreme, a u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za galnu kiselinu u zavisnosti od jačine ultrazvučne sonde u konstantnom eksperimentalnom vremenu dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani; n.d.-nije detektovano

#### 4.5. EKSTRAKCIJA ULTRAZVUČNOM SONDOM PRAĆENA BAZNOM I KISELINSKOM HIDROLIZOM

Nakon ultrazvučnog pretretmana (20 kHz, amplituda 30%, 10 min) smeša je podvrgnuta baznoj i kiselinskoj hidrolizi, prema metodi 3.5.1. i iz svake frakcije određen je sadržaj polifenolnih kiselina prikazan u Tabeli 4.4.

Poređenjem rezultata dobijenih u prethodnoj fazi eksperimenta (metoda 1-direktna bazna hidroliza) može se zaključiti da tretman ultrazvukom visoke frekvencije pozitivno

utiče na oslobađanje galne, kafene i kumarne kiseline naknadnom baznom hidrolizom, ali jačina ultrazvučnih talasa ipak nije bila dovoljna za oslobađanje hlorogene kiseline. Slično tome, pretretman ultrazvukom visoke frekvencije pozitivno utiče na oslobađanje hlorogene kiseline naknadnom kiselinskom hidrolizom u poređenju sa direktnom kiselinskom hidrolizom (metoda 2) iz prethodne faze eksperimenta, ali nije dovoljan za oslobađanje kafene kiseline iz sojinog brašna.

**Tabela 4.4.** Sadržaj polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u ekstraktima iz obezmašćenog sojinog brašna nakon pretretmana ultrazvučnom sondom, praćenog baznom i kiselinskom hidrolizom

<b>Fenolna kiselina</b>	<b>Pretretman ultrazvučnom sondom</b>	<b>Bazna hidroliza</b>	<b>Kiselinska hidroliza</b>	<b>Ukupno</b>
galna	$38,51 \pm 0,27$	$44,92 \pm 0,23$	$46,95 \pm 0,21$	$130,38 \pm 0,61$
<i>trans</i> -cimetna	$218,93 \pm 0,27$	$23,58 \pm 0,25$	$20,59 \pm 0,25$	$263,1 \pm 0,76$
hlorogena	$64,58 \pm 0,38$	n.d.	$36,82 \pm 0,26$	$101,4 \pm 0,54$
kafena	$41,75 \pm 0,22$	$23,77 \pm 0,22$	n.d.	$65,52 \pm 0,44$
<i>p</i> -kumarna	$78,78 \pm 0,28$	$417,22 \pm 0,46$	$15,35 \pm 0,27$	$511,35 \pm 0,89$
ferulna	$52,82 \pm 0,40$	$393,21 \pm 0,42$	$20,57 \pm 0,25$	$466,6 \pm 1,06$

n.d.-nije detektovano

## 4.6. PRETRETMAN MIKROTALASIMA U CILJU POVEĆANJA EFIKASNOSTI EKSTRAKCIJE POLIFENOLNIH KISELINA

### 4.6.1. Variranje temperature u različitim vremenskim intervalima

Upotreba mikrotalasa predstavlja još jednu "zelenu" metodu koja se koristi za ekstrakciju bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Ekstrakcija mikrotalasila, pored skraćivanja vremena ekstrakcije, dozvoljava grejanje smeše rastvarača direktnom interakcijom sa slobodnim molekulima prisutnim u sistemu, što dovodi do razaranja biljnog tkiva i oslobađanja komponenti u rastvarač. Uzorci obezmašćenog sojinog brašna pripremljeni su po metodi 3.6.1, a sadržaj ekstrahovanih polifenolnih kiselina u



različito pretretiranim ekstraktima analiziran po optimizovanoj HPLC metodi. Efekti temperature i vremena tretmana na ekstrakciju polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje prikazani su u Tabeli 4.5.

**Tabela 4.5.** Uticaj temperature i vremena tretmana mikrotalasima na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

<b>2'</b>				
<b>Fenolna kiselina</b>	<b>55°C</b>	<b>65°C</b>	<b>75°C</b>	<b>85°C</b>
galna	n.d.	n.d.	n.d.	<b>90,04 ± 0,29</b>
<i>trans</i> -cimetna**	90,9 ± 0,43 <sup>C*</sup>	69,89 ± 0,18 <sup>D</sup>	245,4 ± 0,36 <sup>B</sup>	<b>273,16 ± 0,70<sup>A</sup></b>
hlorogena	n.d.	n.d.	67,85 ± 0,24 <sup>B</sup>	<b>68,47 ± 0,50<sup>A</sup></b>
kafena	27,99 ± 0,10 <sup>C</sup>	25,68 ± 0,21 <sup>D</sup>	43,4 ± 0,23 <sup>A</sup>	<b>40,15 ± 0,37<sup>B</sup></b>
<i>p</i> -kumarna	30,41 ± 0,18 <sup>C</sup>	30,11 ± 0,25 <sup>C</sup>	67,81 ± 0,27 <sup>B</sup>	<b>85,18 ± 0,35<sup>A</sup></b>
ferulna	16,89 ± 0,31 <sup>C</sup>	17,85 ± 0,20 <sup>B</sup>	15,09 ± 0,13 <sup>D</sup>	<b>42,54 ± 0,52<sup>A</sup></b>
<b>5'</b>				
<b>Fenolna kiselina</b>	<b>55°C</b>	<b>65°C</b>	<b>75°C</b>	<b>85°C</b>
galna	n.d.	n.d.	59,66 ± 0,46 <sup>B</sup>	97,61 ± 0,44 <sup>A</sup>
<i>trans</i> -cimetna	87,42 ± 0,62 <sup>D</sup>	256,81 ± 0,77 <sup>A</sup>	248,86 ± 0,56 <sup>B</sup>	235,79 ± 0,36 <sup>C</sup>
hlorogena	n.d.	69,6 ± 0,97 <sup>A</sup>	68,48 ± 0,47 <sup>B</sup>	65,92 ± 0,21 <sup>C</sup>
kafena	28,12 ± 0,20 <sup>D</sup>	44,61 ± 0,51 <sup>A</sup>	41,55 ± 0,40 <sup>B</sup>	36,59 ± 0,31 <sup>C</sup>
<i>p</i> -kumarna	28,29 ± 0,39 <sup>D</sup>	67,41 ± 0,56 <sup>C</sup>	78,21 ± 0,22 <sup>B</sup>	81,32 ± 0,48 <sup>A</sup>
ferulna	15,97 ± 0,46 <sup>B</sup>	14,82 ± 0,25 <sup>C</sup>	15,15 ± 0,23 <sup>C</sup>	52,30 ± 0,33 <sup>A</sup>
<b>10'</b>				
<b>Fenolna kiselina</b>	<b>55°C</b>	<b>65°C</b>	<b>75°C</b>	<b>85°C</b>
galna	n.d.	43,11 ± 0,26 <sup>C</sup>	85,12 ± 1,09 <sup>A</sup>	62,97 ± 0,44 <sup>B</sup>
<i>trans</i> -cimetna	252,45 ± 0,46 <sup>B</sup>	306,79 ± 0,36 <sup>A</sup>	233,71 ± 1,42 <sup>D</sup>	247,55 ± 0,50 <sup>C</sup>
hlorogena	70,18 ± 0,49 <sup>B</sup>	78,18 ± 0,30 <sup>A</sup>	67,08 ± 0,25 <sup>C</sup>	69,96 ± 0,99 <sup>B</sup>
kafena	45,92 ± 0,26 <sup>B</sup>	46,83 ± 0,77 <sup>A</sup>	38,55 ± 0,41 <sup>C</sup>	35,99 ± 0,39 <sup>D</sup>
<i>p</i> -kumarna	69,88 ± 0,59 <sup>D</sup>	87,91 ± 0,54 <sup>B</sup>	81,33 ± 0,32 <sup>C</sup>	99,21 ± 1,39 <sup>A</sup>
ferulna	15,16 ± 0,24 <sup>B</sup>	15,66 ± 0,24 <sup>B</sup>	15,40 ± 0,33 <sup>B</sup>	62,50 ± 0,88 <sup>A</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C, D) u superskriptu za svaku pojedinačnu kiselinu, za konstantno eksperimentalno vreme, a u zavisnosti od temperature, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa. \*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za *trans*-cimetnu kiselinu u zavisnosti od temperature u konstantnom eksperimentalnom vremenu od 2 minuta, dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani; n.d.-nije detektovano

Sa porastom temperature u vremenskom periodu od dva minuta, sadržaj ekstrahovanih fenolnih kiselina, prvenstveno galne, *trans*-cimetne, *p*-kumarne i ferulne kiseline, značajno su povećana ( $p < 0,05$ ). Produženjem vremena ekstrakcije na 5 i 10 min, ove četiri kiseline su zabeležile i najveće promene. Iako je bilo nekoliko sličnih vrednosti pri različitim uslovima, kao optimalni parametri mikrotalasne ekstrakcije usvojeni su temperatura od 85°C i vreme od 2 minuta, prvenstveno zbog skraćenog vremena ekstrakcije, kao i najvišeg sadržaja galne i ferulne kiseline u dobijenim ekstraktima.

#### 4.6.2. Variranje snage mikrotalasa

U nastavku, za vremenski interval od 2 min, varirana je snaga mikrotalasa od 25 do 100 W. Rezultati prikazani u Tabeli 4.6 su vrlo slični rezultatima za kontrolisanu temperaturu (Tabela 4.5), izuzev sadržaja galne kiseline koji je nešto niži. Upoređujući rezultate dobijene variranjem snage mikrotalasa, jasno je da je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) u sadržaju ekstrahovanih fenolnih kiselina postignuta na 75 W, naročito kod *trans*-cimetne, hlorogene, *p*-kumarne i ferulne kiseline.

**Tabela 4.6.** Uticaj snage mikrotalasa na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

Fenolna kiselina	2'			
	25 W	50 W	75 W	100 W
galna	n.d.	n.d.	<b>86,97</b> $\pm$ 0,66 <sup>A*</sup>	60,53 $\pm$ 0,63 <sup>B</sup>
<i>trans</i> -cimetna	177,9 $\pm$ 0,68 <sup>D*</sup>	198,68 $\pm$ 0,52 <sup>C</sup>	<b>238</b> $\pm$ 0,94 <sup>A</sup>	205,71 $\pm$ 0,69 <sup>B</sup>
hlorogena	57,22 $\pm$ 0,40 <sup>C</sup>	59,9 $\pm$ 0,47 <sup>C</sup>	<b>68,52</b> $\pm$ 0,70 <sup>A</sup>	67,52 $\pm$ 0,48 <sup>B</sup>
kafena <sup>**</sup>	37,02 $\pm$ 0,56 <sup>B</sup>	37,85 $\pm$ 0,63 <sup>AB</sup>	<b>39,1</b> $\pm$ 0,36 <sup>A</sup>	37,8 $\pm$ 0,52 <sup>AB</sup>
<i>p</i> -kumarna	13,71 $\pm$ 0,60	14,81 $\pm$ 0,43 <sup>C</sup>	<b>86,58</b> $\pm$ 0,46 <sup>A</sup>	38,25 $\pm$ 0,59 <sup>B</sup>
ferulna	33,49 $\pm$ 0,70 <sup>C</sup>	41,4 $\pm$ 0,39 <sup>B</sup>	<b>41,67</b> $\pm$ 0,69 <sup>B</sup>	63,35 $\pm$ 0,75 <sup>A</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C, D) u superskriptu za svaku pojedinačnu kiselinu u zavisnosti od snage mikrotalasnog zračenja značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za kafenu kiselinu u zavisnosti od snage mikrotalasa, dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani; n.d.-nije detektovano

U slučaju snage mikrotalasa od 100 W, reakciona smeša je pregrejana, temperatura je premašila 100°C, pa je postojala mogućnost degradacije fenolnih kiselina i stoga njihov niži sadržaj u odnosu na snagu mikrotalasa od 75 W. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatima Rezei (Rezaei) i sar. (2013) koji su vršili ekstrakciju fenolnih jedinjenja iz osušene pulpe jabuke. Jača snaga mikrotalasnog zračenja ili produženo vreme ekstrakcije uzrokovali su smanjenje sadržaja ukupnih fenola u dobijenim ekstraktima [188].

#### 4.7. EKSTRAKCIJA MIKROTALASIMA PRAĆENA BAZNOM I KISELINSKOM HIDROLIZOM

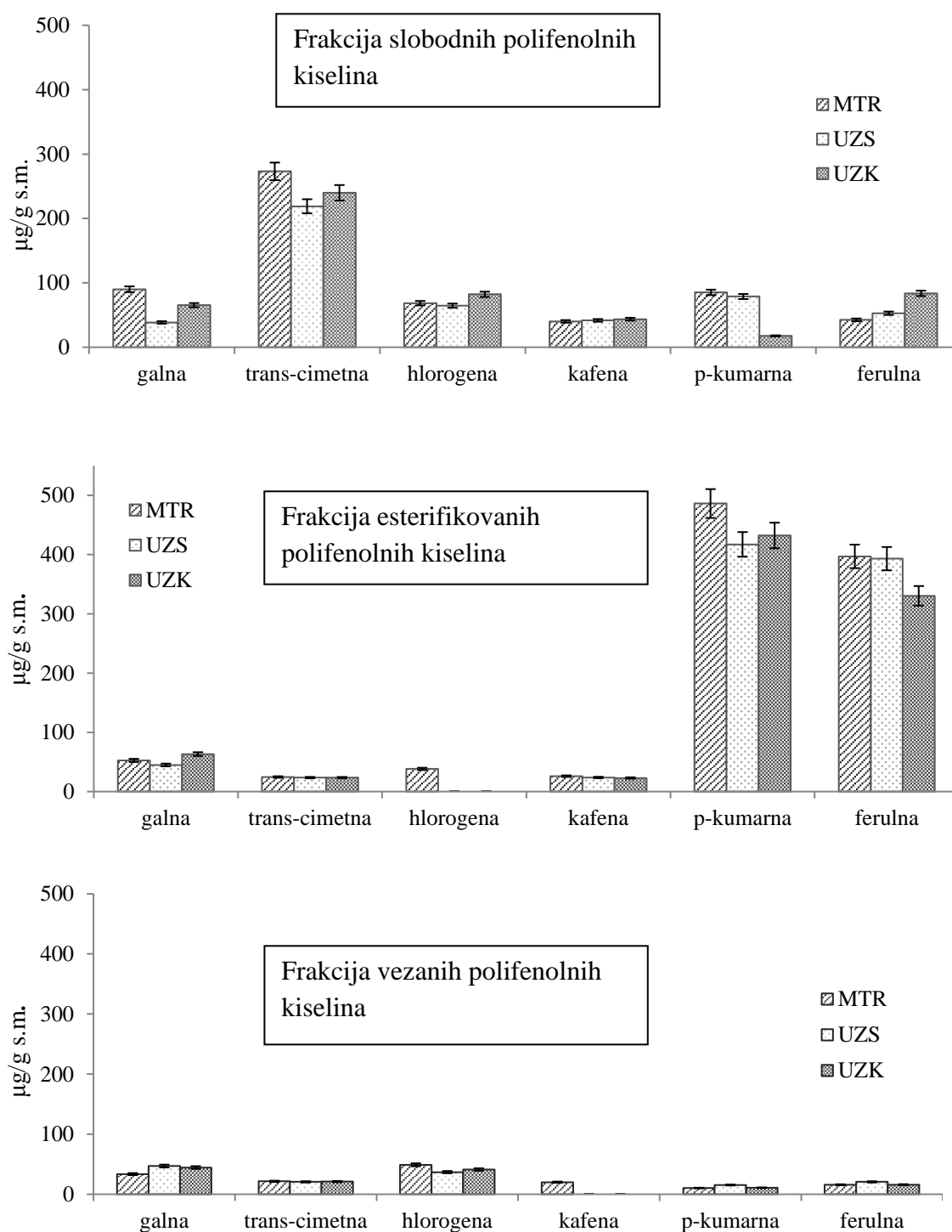
Nakon pretretmana mikrotalasila (85°C, 2 min) smeša je podvrgnuta baznoj i kiselinskoj hidrolizi, prema metodi 3.6.3. i iz svake frakcije određen je sadržaj polifenolnih kiselina optimizovanom HPLC metodom. Rezultati su prikazani u Tabeli 4.7.

**Tabela 4.7.** Sadržaj polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u obezmašćenom sojinom brašnu nakon pretretmana mikrotalasila i naknadne bazne i kiselinske hidrolize

<b>Fenolna kiselina</b>	<b>Pretretman mikrotalasila</b>	<b>Bazna hidroliza</b>	<b>Kiselinska hidroliza</b>	<b>Ukupno</b>
galna	90,04 $\pm$ 0,29	52,62 $\pm$ 0,35	33,55 $\pm$ 0,27	176,51 $\pm$ 0,12
<i>trans</i> -cimetna	273,16 $\pm$ 0,70	24,6 $\pm$ 0,33	21,48 $\pm$ 0,23	319,24 $\pm$ 1,06
hlorogena	68,47 $\pm$ 0,50	38,28 $\pm$ 0,37	49 $\pm$ 0,32	155,75 $\pm$ 1,15
kafena	40,15 $\pm$ 0,37	25,99 $\pm$ 0,19	20,07 $\pm$ 0,18	86,21 $\pm$ 0,69
<i>p</i> -kumarna	85,18 $\pm$ 0,35	486,29 $\pm$ 0,67	10,37 $\pm$ 0,19	581,84 $\pm$ 1,12
ferulna	42,54 $\pm$ 0,52	397,05 $\pm$ 0,77	15,81 $\pm$ 0,20	455,4 $\pm$ 1,20

Na naredna tri grafika (Slika 4.6.) prikazan je sadržaj šest polifenolnih kiselina u različitim frakcijama uzoraka pretretiranih u ultrazvučnom kupatilu, ultrazvučnom sondom i mikrotalasila. Najveći sadržaj u frakciji slobodnih kiselina uočen je kod

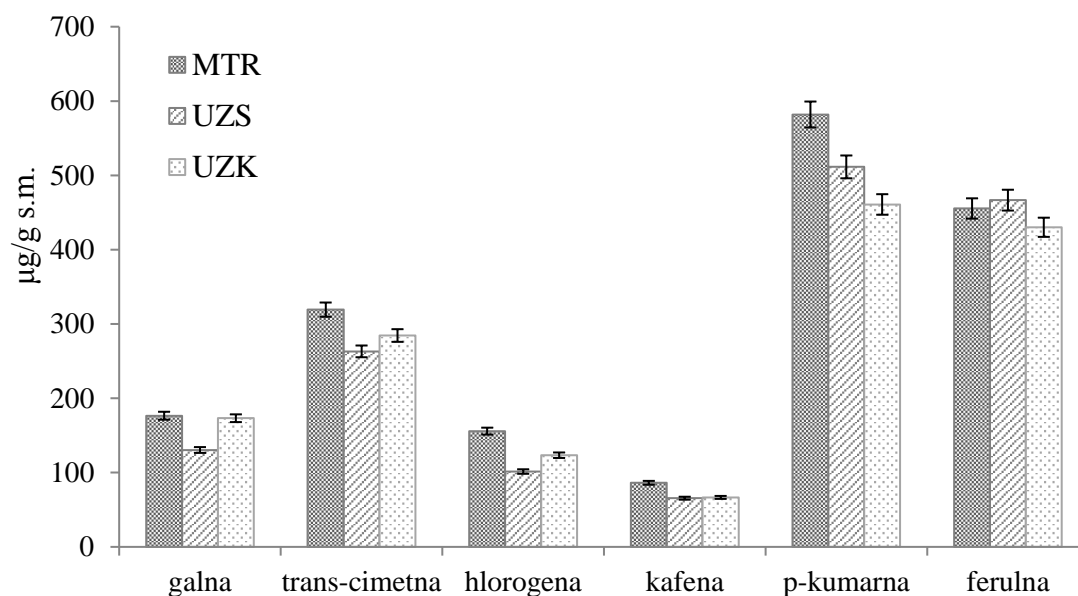
*trans*-cimetne kiseline, dok su *p*-kumarna i ferulna kiselina najzastupljenije u frakciji esterifikovanih kiselina, vezanih etarskim i estarskim vezama za ćelijske komponente.



**Slika 4.6.** Koncentracija šest polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g s.m.}$ ) u različitim frakcijama uzoraka pretretiranih u ultrazvučnom kupatilu (UZK), ultrazvučnom sondom (UZS) i mikrotalasima (MTR)

Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima istraživanja Kim i sar. (2016) koja se odnose na tranziciju (prelaz, preraspodelu) između slobodnih i vezanih oblika polifenolnih kiselina i drugih funkcionalnih jedinjenja u toku klijanja crne soje. Prema njihovim istraživanjima, slobodni oblici hlorogene, kafene i *p*-kumarne kiseline nisu detektovani ni u jednom uzorku, koncentracija slobodne *p*-kumarne kiseline linearno je opadala, dok su koncentracije vezanih oblika ove tri kiseline pokazale značajan porast tokom klijanja. Sa druge strane, vezani oblici *trans*-cimetne kiseline nisu detektovani u biljnim uzorcima, dok se koncentracija slobodne *trans*-cimetne kiseline povećala tokom klijanja [189]. Ovi rezultati potvrđuju da su neke polifenolne kiseline sintetisane u vidu makromolekulskih komponenata (npr. polifenoli, tanini i lignin) koje ulaze u strukturu ćelijskih zidova. Hlorogena, kafena i *p*-kumarna kiselina mogu se koristiti kao intermedijeri tokom biosinteze lignina. Ferulna kiselina, na primer, verovatno je vezana i za polisaharide, lignin i suberin.

Kiselinskom hidrolizom oslobađaju se najmanje količine polifenolnih kiselina u ispitivanim uzorcima, najviše galne i hlorogene. Takođe, pretretman mikrotalasima se pokazao kao jedini efikasan za ekstrakciju hlorogene kiseline u esterifikovanoj i kafene kiseline u vezanoj frakciji. Na Slici 4.7. dat je grafički prikaz zbirnih rezultata sve tri frakcije polifenolnih kiselina (slobodne, esterifikovane i vezane) u zavisnosti od pretretmana uzoraka (MTR, UZS, UZK). Za pet od šest praćenih kiselina, pretretman mikrotalasima (MTR, 85 °C, 2 min) se pokazao kao najefikasniji način, a za dve od šest kiselina, pretretman ultrazvučnom sondom (UZS, 20 kHz, 30% maksimalne amplitude, 10 min) se pokazao efikasnijim od pretretmana u ultrazvučnom kupatilu (UZK, 30 kHz, za 30 min). Za četiri praćene polifenolne kiseline UZK pretretman bio je efikasniji od UZS pretretmana, ali za kafenu kiselinu ta razlika je zanemarljiva ( $p > 0,05$ ). Iako pretretman ultrazvučnom sondom nije doprineo očekivanoj efikasnijoj ekstrakciji polifenolnih kiselina iz ispitivanih uzoraka, sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost, koje su ispitivane u narednoj fazi eksperimenta, značajno su poboljšane pretretmanom ultrazvučnom sondom i mikrotalasima praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom ekstrakata. HPLC-DAD hromatogrami različito pretretiranih uzoraka dati su Prilogu 3.



**Slika 4.7.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g s.m.}$ ) u različito pretretiranim uzorcima obezmašćenog sojinog brašna (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

#### 4.8. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FENOLA I ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI RAZLIČITO PRETRETIRANIH UZORAKA OBEZMAŠĆENOG SOJINOG BRAŠNA

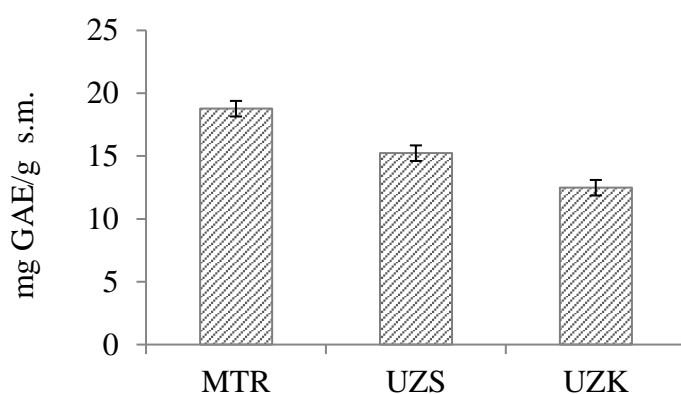
Iz ekstrakata pripremljenih u skladu sa optimalnim parametrima za svaki pretretman, definisanim u prethodnoj fazi eksperimenta, određen je sadržaj ukupnih fenola (TPC) prema metodi 3.2.6. Kako je ranije prikazano, TPC je određen u odnosu na kalibracionu pravu galne kiseline, a vrednosti za svaku pojedinačnu frakciju (slobodne, esterifikovane i vezane polifenolne kiseline) i za svaki pretretman praćen baznom i kiselinskom hidrolizom date su u Tabeli 4.8 Zbirne vrednosti koncentracije ukupnih fenola za sve tri frakcije različito pretretiranih uzoraka prikazane su grafički na Slici 4.8.

**Tabela 4.8.** Sadržaj ukupnih fenola po frakcijama (mg GAE/ g s.m.) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

TPC	Slobodni**	Esterifikovani	Vezani
MTR	5,23 ± 0,13 <sup>A*</sup>	10,68 ± 0,47 <sup>A</sup>	2,86 ± 0,18 <sup>A</sup>
UZS	4,72 ± 0,20 <sup>B</sup>	8,38 ± 0,38 <sup>B</sup>	2,13 ± 0,17 <sup>B</sup>
UZK	3,65 ± 0,17 <sup>C</sup>	6,94 ± 0,25 <sup>C</sup>	1,89 ± 0,11 <sup>B</sup>

\*Vrednosti u okviru iste polifenolne frakcije obeležene različitim slovima (A, B, C) u superskriptu, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za frakciju slobodnih, rastvornih fenola u zavisnosti od vrste pretretmana, dat je u prilogu 4. Za ostale frakcije radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani



**Slika 4.8.** Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/ g s.m.) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

Pretretman obezmašćenog sojinog brašna ultrazvučnom sondom (20 kHz, 30% maksimalne amplitude, 10 min) značajno je poboljšao ekstrakciju fenolnih jedinjenja i sadržaj ukupnih fenola u dobijenim ekstraktima u poređenju sa pretretmanom u ultrazvučnom kupatilu (30 kHz, 30 min). Pretretman uzorka mikrotalasnim zračenjem (na kontrolisanoj temperaturi od 85 °C, 2 min) ima još veći pozitivan efekat na sadržaj ukupnih fenola. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Galo (Gallo) i sar. (2010) koji su vršili ispitivanje efikasnosti ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz četiri biljne vrste primenom ultrazvuka visoke frekvencije i mikrotalasa. Rezultati su pokazali da je efikasnost ekstrakcije biološki aktivnih jedinjenja primenom mikrotalasnog zračenja

bila generalno oko četiri puta veća u odnosu na ekstrakciju sonikacijom. Antioksidativna aktivnost ovako tretiranih uzoraka bila je i nekoliko desetina puta veća od antioksidativne aktivnosti ekstrakata nakon ultrazvučnog tretmana [111]. Do sličnih rezultata došli su i Martino (Martino) i sar. (2006) ispitivanjem efikasnosti ekstrakcije kumarina i srodnih jedinjenja iz žute deteline (porodica leguminoza). Ekstrakcija primenom mikrotalasa se pokazala mnogo efikasnijom sa stanovišta prinosa, vremena i troškova u odnosu na ekstrakciju ultrazvukom i Sokslet ekstrakciju [190].

Antioksidativna aktivnost uzoraka zavisi od niza faktora kao što su skladištenje, uslovi prerade, uslovi životne sredine, fiziološki faktori u biljkama, itd. [191,192] i ne može se u potpunosti opisati korišćenjem jedne metode. Tumačenje antioksidativne aktivnosti je otežano usled činjenice da antioksidansi svoju aktivnost ispoljavaju različitim mehanizmima, deluju kao „hvatači“ slobodnih radikala, kao donori elektrona ili kao donori H-atoma peroksil ili hidrosil radikalima. Samim tim različita je konstanta brzine reakcija prema radikalima ili molekulima koji se koriste za procenu antioksidativne aktivnosti nekog jedinjenja. Shodno tome, prikladno je koristiti nekoliko metoda da bi se procenila i upoređila antioksidativna aktivnost biljnog materijala. U ovom istraživanju, antioksidativna aktivnost ekstrakata sojinog brašna je određena korišćenjem DPPH i FRAP metode. U cilju određivanja antioksidativne aktivnosti DPPH i FRAP metodom biljni ekstrakti pripremljeni različitim pretretmanima razblaženi su 10 puta. Razblaženi ekstrakti su za određivanje antioksidativne aktivnosti DPPH metodom pripremljeni po metodi 3.7.1. Za određivanje antioksidativne aktivnosti FRAP metodom, razblaženi ekstrakti su pripremljeni po metodi 3.7.2. U Tabeli 4.9 prikazana je antioksidativna aktivnost svake pojedinačne frakcije u zavisnosti od pretretmana uzoraka, određena DPPH i FRAP metodom, a na Slici 4.9. dat je zbirni grafički prikaz antioksidativne aktivnosti ekstrakata dobijenih različitim pretretmanima sojinog brašna. Dobijeni rezultati ukazuju na značajne razlike ( $p < 0,05$ ) u antioksidativnoj aktivnosti ekstrakata dobijenih različitim pretretmanima obezmašćenog sojinog brašna. Metanolni ekstrakti, dobijeni pretretmanom mikrotalasa praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom pokazuju najveću antioksidativnu aktivnost (338,21  $\mu\text{mol TE/g s.m}$  i 291, 18  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g s.m.), kao i najveću količinu ekstrahovanih ukupnih fenola (18,77 mg GAE/g s.m.) (Slika 4.8) u odnosu na ekstrakte pretretirane ultrazvučnom sondom, koji opet pokazuju značajno veću antioksidativnu aktivnost



(289,12  $\mu\text{mol TE/g s.m.}$  i 243,87  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g s.m.) i sadržaj ukupnih fenola (15,23 mg GAE/g s.m.) (Slika 4.8) u odnosu na ekstrakte uzoraka pretretiranih u ultrazvučnom kupatilu pre bazne i kiselinske hidrolize (244,58  $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ; 191,59  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g s.m. i 12,48 mg GAE/g s.m.) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.9.** Antioksidativna aktivnost po frakcijama određena DPPH metodom ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP metodom ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$  eq/g s.m.) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

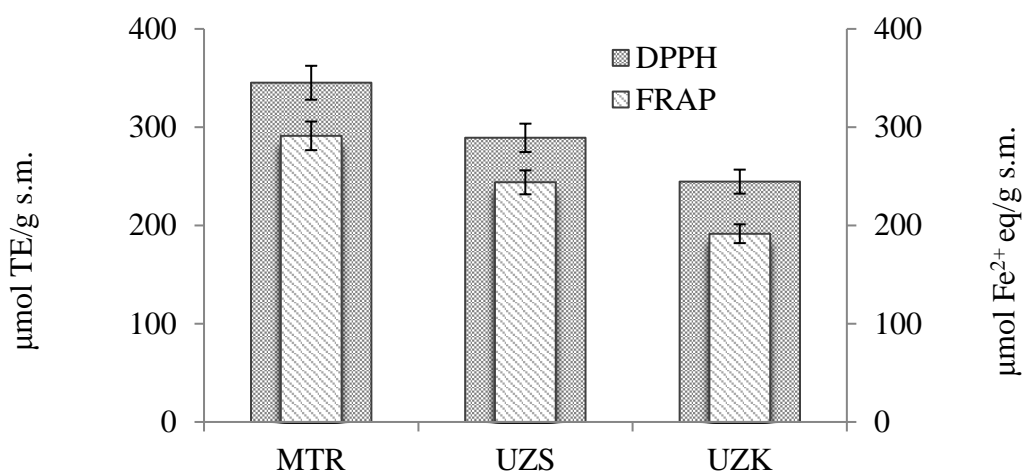
Pretretman	DPPH ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ )		
	Slobodni**	Esterifikovani	Vezani
MTR	269,84 $\pm$ 1,16 <sup>A*</sup>	56,18 $\pm$ 0,72 <sup>A</sup>	12,19 $\pm$ 0,28 <sup>A</sup>
UZS	232,21 $\pm$ 1,13 <sup>B</sup>	47,31 $\pm$ 0,82 <sup>B</sup>	9,60 $\pm$ 0,44 <sup>B</sup>
UZK	198,27 $\pm$ 0,87 <sup>C</sup>	40,42 $\pm$ 0,76 <sup>C</sup>	5,89 $\pm$ 0,45 <sup>C</sup>
Pretretman	FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ eq/g s.m.)		
	Slobodni**	Esterifikovani	Vezani
MTR	37,18 $\pm$ 0,45 <sup>A</sup>	218,09 $\pm$ 1,16 <sup>A</sup>	35,91 $\pm$ 0,66 <sup>A</sup>
UZS	30,76 $\pm$ 0,58 <sup>B</sup>	185,93 $\pm$ 0,82 <sup>B</sup>	27,18 $\pm$ 0,50 <sup>B</sup>
UZK	22,15 $\pm$ 0,25 <sup>C</sup>	150,24 $\pm$ 1,10 <sup>C</sup>	19,20 $\pm$ 0,43 <sup>C</sup>

\*Vrednosti u okviru pojedinačne frakcije, obeležene različitim slovima (A, B, C) u superskriptu, a u zavisnosti od pretretmana za svaku od ispitivanih metoda značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa.

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za frakciju slobodnih, rastvornih fenola u zavisnosti od vrste pretretmana, a za svaku od ispitivanih metoda, dat je u prilogu 4. Za ostale frakcije radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani

Iako, na osnovu sadržaja posmatranih šest pojedinačnih polifenolnih kiselina u obezmašćenom brašnu soje (Slika 4.7) pretretman ultrazvučnom sondom (UZS) nije doprineo njihovoj efikasnijoj ekstrakciji u poređenju sa pretretmanom u ultrazvučnom kupatilu, na osnovu sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata, može se zaključiti da je pretretman ultrazvučnom sondom pozitivno uticao na ekstrakciju drugih klasa fenolnih jedinjenja prisutnih u semenu soje (verovatno izoflavona daidzeina, genisteina i glicitina koji su pored polifenolnih kiselina uglavnom

„odgovorni“ za antioksidativnu aktivnost semena soje). Generalno, može se zaključiti da korišćenje nekonvencionalnih procedura, kao što je mikrotalasna ekstrakcija, može poboljšati ekstrakciju polifenolnih kiselina u semenu soje skraćivanjem vremena tretmana i smanjenom potrošnjom energije u poređenju sa klasičnom ekstrakcijom rastvaračem.



**Slika 4.9.** Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP metodom ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ eq/g s.m.}$ ) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima obezmašćenog sojinog brašna (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

U ovoj disertaciji utvrđen je efikasan protokol ekstrakcije uključujući selekciju rastvarača kako bi se maksimalno povećao prinos ukupnih fenolnih jedinjenja i sadržaja pojedinačnih polifenolnih kiselina, kao i antioksidativna aktivnost u ekstraktima obezmašćenog sojinog brašna. Kao najefikasniji postupak pokazala se kombinacija dve tehnike, ekstrakcije pomoću mikrotalasa i naknadne alkalne i kiselinske hidrolize. Iako pretretman ultrazvučnom sondom nema pozitivan uticaj na ekstrakciju svih šest ispitivanih polifenolnih kiselina, na osnovu TPC, DPPH i FRAP vrednosti, predstavlja poboljšanu tehniku sa aspekta antioksidativne aktivnosti ekstrakta obezmašćenog sojinog brašna.

#### 4.9. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA U SOJINOM BRAŠNU

Kao što je ranije napomenuto, u samlevenom brašnu soje određen je procenat vlage od 11,67% (w/w) i procenat ulja od 20,48% (w/w) koji je korišćen za preračunavanje eksperimentalno dobijenih podataka za sadržaj azota, da bi se dobila njihova količina u sirovom zrnju, kao i u suvoj materiji. U zavisnosti od prirode matriksa i prosečnog sadržaja azota u njemu, postoje standardne metode kojima je određena potrebna količina uzorka i hemikalija za adekvatnu digestiju. I pored toga, biljni materijal je veoma kompleksan, u zavisnosti od prirode jedinjenja koja ulaze u njegov sastav, njihovog odnosa i različitih interakcija između njih, neophodno je za svaku biljnu vrstu odrediti optimalne uslove „razaranja“ kako bi se greška pri određivanju sadržaja proteina svela na minimum. Optimizacija metode izvršena je variranjem odvage uzorka, količine soli, katalizatora i kiseline potrebne za potpunu digestiju uzorka. U Tabeli 4.10 prikazan je sadržaj azota i proteina u sojinom brašnu u zavisnosti od odvage uzorka. Prema literaturnim podacima količina proteina u sirovom zrnju soje kreće se od 36 do 40%, u zavisnosti od sorte, uslova gajenja, klimatskih faktora i dr.

**Tabela 4.10.** Sadržaj azota, proteina u obezmašćenom sojinom brašnu i u sirovom zrnju

Odvaga uzorka, g	Sadržaj azota, %	Sadržaj proteina u obezmašćenom brašnu, % (w/w)*	Sadržaj proteina u sirovom zrnju (brašnu), % (w/w)**
0,2	3,88 ± 0,14	22,15 ± 0,80	15,56 ± 0,56
0,5	9,77 ± 0,12	55,79 ± 0,71	39,19 ± 0,50
1,0	5,75 ± 0,21	32,81 ± 1,20	23,05 ± 0,84

\* Vrednost dobijena korišćenjem N/P faktora za soju; \*\*Vrednost dobijena uzimajući u obzir sadržaj ulja

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da optimalna količina uzorka potrebnog za analizu azota po Kjeldalu iznosi 0,5 g. Manja količina uzorka nije dovoljna zbog same osetljivosti metode, a pri većoj količini uzorka digestija nije potpuna.

Za usvojenu količinu od 0,5 g obezmašćenog brašna, varirana je količina sumporne kiseline, soli i katalizatora (kalijum-sulfata i bakar-sulfata), a rezultati su prikazani u Tabeli 4.11 Korišćenjem K1 (Kjeldalova tableta sastava 5 g  $K_2SO_4$  i 0,1 g  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ) postupak digestije je skraćen, dolazi do potpunog razaranja biljnog materijala i po završetku se dobija bistar rastvor, dok manja količina soli i katalizatora (K2, Kjeldalova tableta sastava 3,50 g  $K_2SO_4$  i 0,4 g  $CuSO_4 \times 5H_2O$ ) produžava postupak digestije i nije dovoljna za potpuno razaranja biljnog materijala. Manja količina soli ne povećava temperaturu ključanja koncentrovane sumporne kiseline u dovoljnoj meri da bi digestija bila potpuna. Prema literaturnim podacima [193], optimalan odnos soli i kiseline iznosi, u zavisnosti od prirode uzoraka između 1,4 i 2, što se i u ovom istraživanju pokazalo kao optimalno (2 ml kiseline na 1 g soli). Veća količina kiseline ne dovodi do značajnog poboljšanja digestije, ili do poboljšanja uopšte, pa je u narednoj fazi eksperimenta usvojena zapremina od 10 ml, pre svega zbog zaštite životne sredine, kao i ekonomičnosti usled smanjene potrošnje hemikalija.

**Tabela 4.11.** Sadržaj nativnih proteina u brašnu soje u zavisnosti od količine kiseline, soli i katalizatora potrebnih za digestiju uzorka

	Sadržaj azota, %	Sadržaj proteina u obezmašćenom brašnu, %	Sadržaj proteina u sirovom zrn (brašnu), %
K1+ 10 ml $H_2SO_4$	9,77 ± 0,22	55,79 ± 1,33	39,19 ± 0,93
K1+ 20 ml $H_2SO_4$	9,76 ± 0,21	55,73 ± 1,17	39,14 ± 0,82
K2+ 10 ml $H_2SO_4$	9,05 ± 0,19	51,68 ± 1,07	36,30 ± 0,76
K2+ 20 ml $H_2SO_4$	9,12 ± 0,26	52,08 ± 1,47	36,58 ± 1,03

Nakon optimizacije metode i određivanja sadržaja proteina u polaznom uzorku, izvršena je ekstrakcija rastvornih proteina prema opisanoj metodi i određen sadržaj nerastvornih proteina zaostalih u talogu. Sadržaj zaostalih proteina u talogu, određen metodom po Kjeldalu iznosio je 27,94%.

#### 4.10. UTICAJ PRETRETMANA ULTRAZVUKOM NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE I TEHNOLOŠKO-FUNKCIONALNA SVOJSTVA PROTEINA

U nastavku istraživanja, po opisanim metodama izvršen je tretman uzoraka obezmašćenog sojinog brašna ultrazvučnom sondom visoke frekvencije u cilju povećanja efikasnosti ekstrakcije proteina i poboljšanja tehnološko-funkcionalnih karakteristika proteinskih izolata, varirajući jačinu ultrazvuka i vreme sonikacije.

##### 4.10.1. Variranje jačine (amplitude) ultrazvučne sonde

Priprema uzoraka obezmašćenog sojinog brašna izvršena je po metodi 3.9.1. Supernatant je osušen u sprej sušnici, a talog u sušnici na 105°C u trajanju od 24 h. Iz supernatanta je određen sadržaj rastvornih proteina metodom po Loriju (3.8.3), a iz taloga sadržaj nerastvornih proteina metodom po Kjeldalu (3.8.1). U Tabeli 4.12 prikazan je sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde.

**Tabela 4.12.** Sadržaj proteina u supernatantu i talogu u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde

Amplituda ultrazvučne sonde, %	Sadržaj proteina u supernatntu, % (Lorijeva metoda)**	Sadržaj proteina u talogu, % (Kjeldalova metoda)**
15	60,24 ± 0,72 <sup>C*</sup>	24,06 ± 0,37 <sup>B</sup>
20	67,15 ± 0,82 <sup>A</sup>	23,62 ± 0,47 <sup>B</sup>
30	62,49 ± 0,69 <sup>B</sup>	27,12 ± 0,25 <sup>A</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B) u superskriptu u okviru iste metode, a u zavisnosti od jačine ultrazvučne sonde značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Rezultat ANOVE i Tukey testa za svaku od metoda u zavisnosti od jačine ultrazvučne sonde, dat je u prilogu 4.

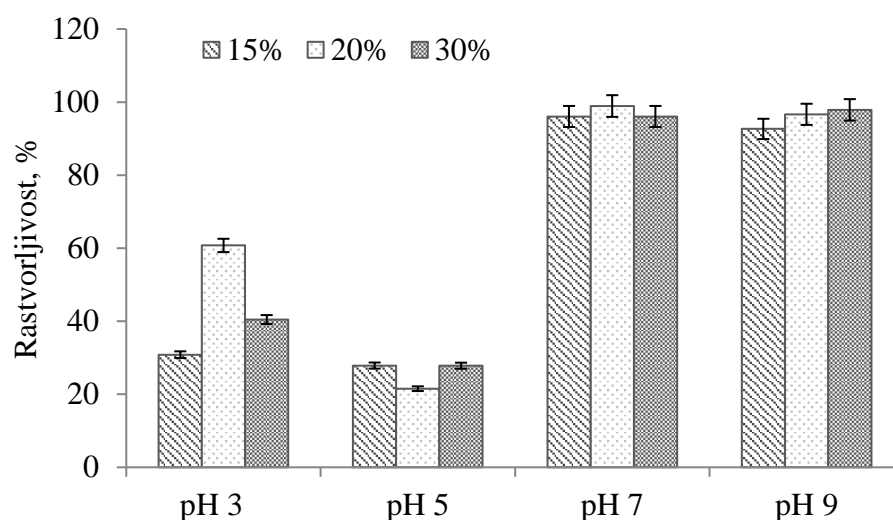
Rezultati dobijeni analizom proteina metodom po Kjeldalu ukazuju na to da promena amplitude ultrazvučne sonde sa 15 na 20% nije pokazala statistički značajan uticaj na ekstrakciju proteina ( $p < 0,05$ ). Daljim povećanjem amplitude na 30%, sadržaj proteina u

talogu se povećava, odnosno smanjuje se efikasnost ekstrakcije. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima dobijenim analizom proteina u supernatantu metodom po Loriju. U Tabeli 4.12 prikazan je procentualni sadržaj proteina u supernatantu (resuspendovanom talogu) izračunat iz izmerenog sadržaja proteina u istom, u odnosu na ukupni sadržaj proteina u polaznom uzorku obezmašćenog sojinog brašna. Sa povećanjem amplitude sa 15 na 20% dolazi do povećanja efikasnosti ekstrakcije. Daljim povećanjem amplitude na 30%, sadržaj proteina u supernatantu se smanjuje. Pregledom literature potvrdili smo da je naš izbor u skladu sa velikim brojem istraživanja, gde je upravo ultrazvučna sonda amplitude 20% korišćena za poboljšanje ekstrakcije proteina iz biljnog materijala i unapređenje njihovih funkcionalnih svojstava [194]. Međutim, od primenjenih pretretmana ne zavisi samo prinos izolovanih proteina već i njihova svojstva od važnosti za primenu u prehrambenoj i drugim industrijama. Zbog toga, za sve uzorke izolovanih proteina ispitana su tehnološko-funkcionalna svojstva poput rastvorljivosti i emulgujućih svojstava.

#### *4.10.1.1. Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na rastvorljivost proteina*

Rastvorljivost proteina je jedan od najbitnijih faktora koji je potrebno ispitati pre potencijalne primene proteinskih izolata, zbog njenog uticaja na druga funkcionalna svojstva i sam kvalitet krajnjeg proizvoda. Za optimalna funkcionalna svojstva proteina soje, potrebna je rastvorljivost proteina veća od 90%. Za proteine soje naročito je važno u postupku izolovanja unaprediti njihovu rastvorljivost u kiseloj sredini, koja je mala i često je limitirajući faktor za njihovu primenu u kiselim matriksima poput voćnih sokova ili fermentisanih proizvoda. Dobra rastvorljivost proteina je u direktnoj korelaciji sa optimalnom sposobnošću geliranja, emulzifikacije i penjenja proteina [195].

Uzorci obezmašćenog sojinog brašna su ekstrahovani po metodi 3.8.2, a pretretman ultrazvučnom sondom izvršen je po metodi 3.9.1. Rastvorljivost (R) je određena na osnovu razlike u sadržaju proteina u uzorku pre i nakon centrifugiranja i izražena u procentima. Sadržaj proteina je određen korišćenjem BSA kao standarda i Lorijeve metode, po ranije opisanom postupku (3.8.3). Rastvorljivost je ispitana u funkciji amplitude ultrazvučne sonde i rezultati su predstavljeni na Slici 4.10.



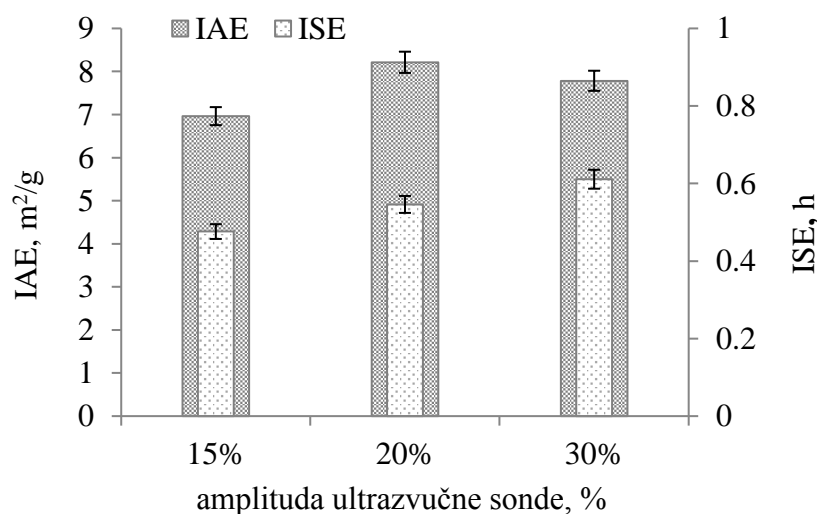
**Slika 4.10.** Rastvorljivost proteinskih izolata u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde pri različitim pH vrednostima

Sa Slike 4.10 može se uočiti da je rastvorljivost najmanja pri pH vrednosti 5 što je i očekivano obzirom da je izoelektrična tačka sojinih proteina u opsegu 4,0-5,0 [196]. Sa povećanjem amplitude sa 15 na 20%, pri svim ispitivanim pH vrednostima, izuzev pH 5, dolazi do povećanja rastvorljivosti proteina, ali je to povećanje statistički značajno ( $p < 0,05$ ) jedino za pH vrednost 3. Povećanje rastvorljivosti ultrazvučno pretretiranih uzoraka sa povećanjem amplitude može se pripisati fenomenu kavitacije. Do sličnih rezultata došli su i Jang (Jiang) i sar. (2014), ispitivanjem uticaja jačine ultrazvuka na rastvorljivost i funkcionalna svojstva proteina u crnom pasulju. Zaključili su da ultrazvuk utiče na promenu u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi proteina. Sa povećanjem amplitude ultrazvuka, dolazi do promena u odnosu zastupljenosti  $\alpha$ -heliksa i  $\beta$ -lanca, do delimičnog razvijanja molekula proteina i reorganizacije hidrofilnih aminokiselinskih ostataka iz unutrašnjosti molekula, prema površini. Time oni postaju dostupni molekulima vode, što se manifestuje povećanjem rastvorljivosti [172]. Daljim povećanjem amplitude ultrazvučne sonde, molekuli proteina se reformišu u makromolekularne agregate, što dovodi do smanjenja rastvorljivosti. U našem istraživanju, ovakvo ponašanje proteinskih izolata soje uočeno je pri pH vrednostima 3 i 7. Suprotno od našeg istraživanja, rezultati istraživanja [176] ukazuju da sa porastom amplitude ultrazvučne sonde frekvencije 20 kHz sa 50 do 100% konstantno raste rastvorljivost proteina i poboljšavaju se funkcionalno-tehnološke karakteristike

proteinskih koncentrata soje. Smatra se da je u jako baznoj sredini povećanje rastvorljivosti direktno povezano sa denaturisanim stanjem proteina koje se ogleda u promeni udela hidrofobnih ostataka i naelektrisanja na površini molekula, kao i elektrostatičkim odbijanjima [197]. Iako na pH 3 postoji značajna razlika u rastvorljivosti proteinskih izolata, u zavisnost od jačine amplitude, pri ostalim vrednostima, a pre svega na pH 7 i 9 razlika između efekata postignutih primenom ultrazvučne sonde pri amplitudi 20% i 30 nije statistički značajna.

#### 4.10.1.2. Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na emulgujuća svojstva

Emulgujući kapacitet proteinskih izolata dobijenih različitim pretretmanima uzoraka obezmašćenog sojinog brašna ispitan je turbidometrijskom metodom po ranije opisanom postupku (3.11.2). Dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 4.11.



**Slika 4.11.** Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na emulgujuća svojstva izolovanih proteina

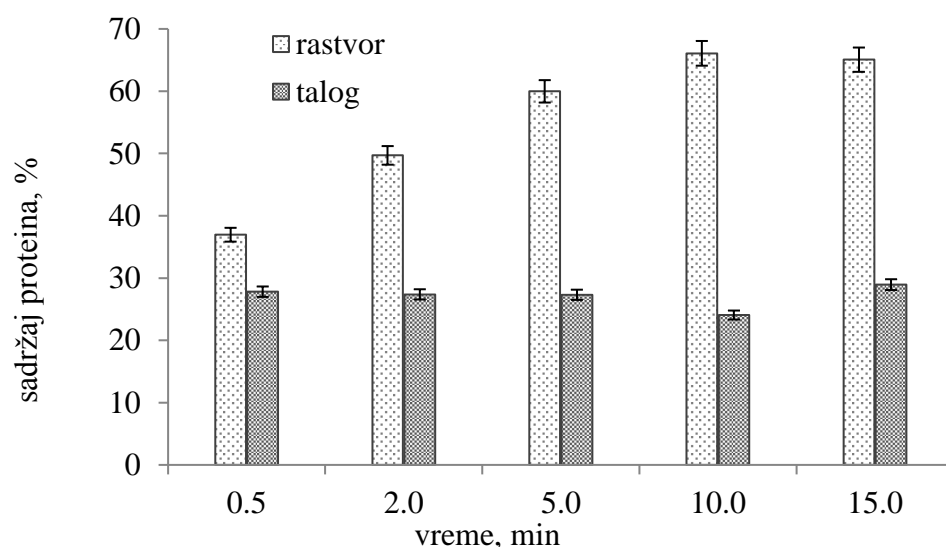
Najveća vrednost indeksa aktivnosti emulzije (IAE) od 8,21 m<sup>2</sup>/g dobijena je za amplitudu od 20%, dok se indeks stabilnosti emulzije (ISE) blago povećava sa porastom amplitude ultrazvučne sonde od 10 do 30%. Povećanje IAE i ISE zabeleženo dejstvom ultrazvučne sonde može se dovesti u vezu sa konformacionim promenama molekula proteina soje



izazvanim dejstvom ultrazvučnih talasa koji su doveli do razlaganja agregiranih proteinskih lanaca na manje jedinice, i to prvo delovanjem ultrazvučnih talasa na centralni deo molekula, a zatim i na bočne lance. Razlaganje složenih agregata proteina soje na manje jedinice uticalo je na povećanje njihove sposobnosti da stabilizuju međugranični sloj ulje/voda, uglavnom zbog veće pokretljivosti. Na međugraničnoj površini došlo je do orijentacije lipofilnih delova molekula proteina ka uljanoj fazi, dok su hidrofilni delovi bili orijentisani ka vodenoj fazi. Ova pojava dovela je do redukcije površinskog napona na granici faza ulje/voda usled čega je sposobnost formiranja emulzije povećana [198]. S obzirom da se amplituda od 20% pokazala kao optimalna u većini ispitivanih metoda, ona je usvojana u narednim fazama istraživanja, zbog uštede energije i smanjenih troškova.

#### 4.10.2. Variranje vremena sonikacije pri konstantnoj amplitudi

Napravljene su nove odvage uzoraka sojinog brašna po prethodno opisanom postupku i smeše su sonicirane ultrazvučnom sondom pri konstantnoj amplitudi od 20% variranjem vremena sonikacije po metodi 3.9.2. Sadržaj rastvornih proteina u različito pretretiranim uzorcima određen je Lorijevom metodom (3.8.3), a sadržaj zaostalih proteina u talogu Kjeldalovom metodom (3.8.1). Na Slici 4.12. prikazan je sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od vremena sonikacije.



**Slika 4.12.** Sadržaj proteina ekstrahovanih iz obezmašćenog sojinog brašna i zaostalih u talogu pri konstantnoj amplitudi, a u zavisnosti od vremena sonikacije

Analizom proteina u talogu zaostalom nakon sonikacije, potvrđeni su rezultati dobijeni analizom proteina u supernatantu metodom po Loriju. Sa porastom vremena sonikacije smanjuje se sadržaj nerastvornih proteina u talogu, što ukazuje na povećanje efikasnosti ekstrakcije sa vremenom. Kao što se na Slici 4.12 vidi sa povećanjem vremena sonikacije dolazi do povećanja sadržaja rastvornih proteina u supernatantu. Do sličnih rezultata došli su i Karki i sar. (2010) u čijem istraživanju je sa produženjem vremena sonikacije, prinos proteina ekstrahovanih iz obezmašćenih sojinih ljuspica porastao za 46% u odnosu na kontrolni uzorak [174].

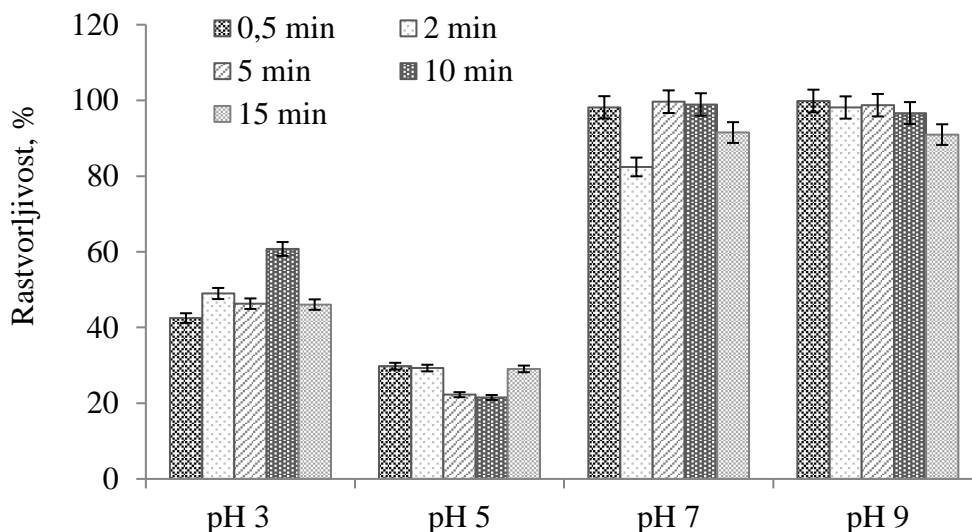
U ovom istraživanju daljim produženjem vremena sonikacije, efikasnost ekstrakcije proteina iz obezmašćenog brašna soje se povećava sve do vremena od 10 minuta kada dostiže maksimum i daljim produženjem vremena sonikacije na 15 minuta dolazi do smanjenja efikasnosti ekstrakcije, što se može objasniti zagrevanjem reakcione smeše usled dejstva ultrazvuka i denaturacijom proteina.

#### *4.10.2.1. Uticaj vremena sonikacije na rastvorljivost proteina*

Kao što je već napomenuto, rastvorljivost proteina je jedan od najbitnijih faktora koji je potrebno ispitati pre potencijalne primene proteinskih izolata, zbog njenog uticaja na druga funkcionalna svojstva i sam kvalitet krajnjeg proizvoda. Od različito pretretiranih uzoraka (metoda 3.9.2), pripremljeni su rastvori za određivanje rastvorljivosti proteinskih izolata na različitim pH vrednostima, po metodi 3.11.1. Rastvorljivost sojinih proteina u zavisnosti od vremena sonikacije prikazana je na Slici 4.13.

Slično kao i prilikom ispitivanja uticaja amplitude ultrazvučne sonde, ne postoji pravilan trend rasta ili opadanja rastvorljivosti u zavisnosti od vremena sonikacije, koji bi mogao da se uoči pri svim pH vrednostima. Pregledom literature, utvrđeno je da u velikom broju istraživanja sa povećanjem vremena sonikacije dolazi do povećanja rastvorljivosti proteina [175,199,200]. Povećanje rastvorljivosti ultrazvučno pretretiranih uzoraka sojinog brašna sa vremenom može se pripisati fenomenu kavitacije. Usled lokalnog porasta temperature i pritiska pod dejstvom ultrazvučnih talasa, kao posledica kavitacije, dolazi do razvijanja molekula proteina, a u nekim izuzetnim slučajevima i do raskidanja peptidnih veza. Ultrazvučni talasi uzrokuju promene u konformacionoj strukturi molekula proteina koje se ogledaju u reorganizaciji

hidrofilnih aminokiselinskih ostataka iz unutrašnjosti molekula, prema površini. Time oni postaju dostupni molekulima vode, što se manifestuje povećanjem rastvorljivosti [198]. U našem istraživanju, samo u veoma kiseljoj sredini (pH 3), delimično postoji ovakav trend.

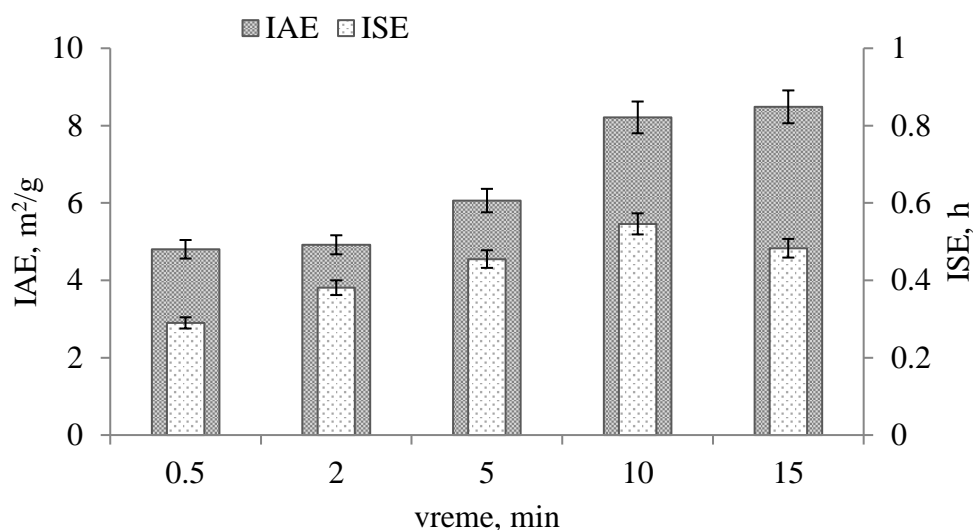


**Slika 4.13.** Zavisnost rastvorljivosti izolovanih proteina od vremena sonikacije

Kao i kod ispitivanja uticaja amplitude ultrazvučne sonde na rastvorljivost (Slika 4.10), i ovde je rastvorljivost najmanja pri pH vrednosti 5 bliskoj izoelektričnoj tački sojinih proteina. Najveću rastvorljivost pokazali su uzorci izolovanih proteina na pH vrednosti 7 i 9 što je i očekivano, obzirom da su to najudaljenije vrednosti od izoelektrične tačke. Sa Slike 4.13 takođe se može zaključiti da je najveća rastvorljivost kod tretmana koji je trajao najkraće, odnosno 0,5 minuta.

#### 4.10.2.2. Uticaj vremena sonikacije na emulgujuća svojstva

Od uzoraka pretretiranih po metodi 3.9.2, pripremljeni su ekstrakti za određivanje emulgujućih svojstava, po metodi 3.11.2. Emulgujući kapacitet ispitan je turbidometrijskom metodom, takođe po ranije opisanom postupku. Dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 4.14.



**Slika 4.14.** Uticaj vremena sonikacije na emulgujuća svojstva izolovanih proteina soje

Najveća vrednost IAE od 8,486 m<sup>2</sup>/g dobijena je za vreme sonikacije od 15 minuta, dok je najveća vrednost ISE od 0,546 h (Slika 4.14) dobijena za vremenski period od 10 minuta. Povećanje IAE i ISE zabeleženo dejstvom ultrazvučne sonde može se dovesti u vezu sa konformacionim promenama molekula proteina soje izazvanim dejstvom ultrazvučnih talasa koji su doveli do razlaganja agregiranih proteinskih lanaca na manje jedinice, i to prvo delovanjem ultrazvučnih talasa na centralni deo molekula, a zatim i na bočne lance. Razlaganje složenih agregata proteina soje na manje jedinice uticalo je na povećanje njihove sposobnosti da stabilizuju međugranični sloj ulje/voda, uglavnom zbog veće pokretljivosti. Na međugraničnoj površini došlo je do orijentacije lipofilnih delova molekula proteina ka uljanoj fazi, dok su hidrofilni delovi bili orijentisani ka vodenoj fazi. Ova pojava dovela je do redukcije površinskog napona na granici faza ulje/voda usled čega je sposobnost formiranja emulzije povećana [201].

Prema literaturnim podacima [202,203] globularni proteini, kao što su glicinin iz soje (11S) i izolat proteina soje, pokazali su bolje emulgujuće sposobnosti sa povećanjem vremena ultrazvučnog pretretmana, što je u saglasnosti sa rezultatima ovog istraživanja. Iako IAE raste sa porastom vremena, ISE raste do određene granice, tj. maksimuma, nakon čega dolazi do blagog opadanja indeksa stabilnosti emulzije. Zbog male razlike u indeksu aktivnosti emulzije tretmana od 10 minuta u poređenju sa tretmanom od 15

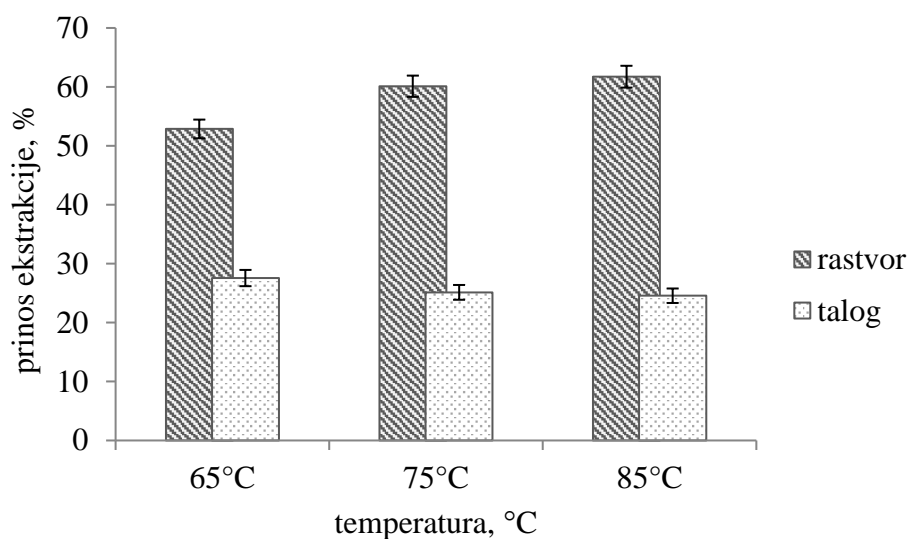
minuta, a velike razlike u ekonomičnosti, optimalni uslovi sa aspekta emulgujućih svojstava su tretman u trajanju 10 minuta sa amplitudom ultrazvučne sonde 20%.

#### **4.11. UTICAJ PRETRETMANA MIKROTALASIMA NA EFIKASNOST EKSTRAKCIJE PROTEINA**

Ekstrakcija mikrotalasima predstavlja jednu od najnovijih i najefikasnijih tehnika ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz biljnog materijala. Mikrotalasno zračenje ima niz prednosti u odnosu na konvencionalne postupke ekstrakcije, za zagrevanje reakcione smeše koristi električnu energiju, postoji kontrola apsorbovane energije od strane reakcione smeše. Mikrotalasi vrše selektivno zagrevanje biljnog materijala čime se povećava prinos ekstrakcije i smanjuje vreme ekstrakcije, što direktno utiče na ekonomičnost samog postupka. Efikasnost zagrevanja mikrotalasima na određenoj frekvenciji i temperaturi zavisi od sposobnosti materijala da apsorbuje elektromagnetnu energiju i rasipa toplotu [204]. U prethodnom delu ovog istraživanja tretman mikrotalasima pokazao je najbolje rezultate vezane za sadržaj ukupnih fenola i antioksidativni kapacitet uzoraka obezmašćenog sojinog brašna. Ovo je u skladu sa brojnim literaturnim podacima [110-112] i teorijskim pretpostavkama, da, zbog istovremene primene visoke temperature i pritiska dolazi do bržeg i potpunijeg razaranja ćelijskog zida. U narednoj fazi istraživanja izvršena je optimizacija parametara mikrotalasnog pretretmana na efikasnost ekstrakcije proteina variranjem temperature i snage mikrotalasa.

##### **4.11.1. Uticaj temperature na efikasnost ekstrakcije proteina**

Uzorci obezmašćenog sojinog brašna rastvoreni su po metodi 3.8.2, a zatim je vršen pretretman mikrotalasnim zračenjem variranjem temperature prema metodi 3.10.1. Svaka pojedinačna temperatura je održavana konstantnom, a snaga mikrotalasa je rasla sve do dostizanja zadate temperature. Nakon završenog postupka ekstrakcije, uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant i talog su osušeni i sadržaj proteina je analiziran po ranije opisanim postupcima. Na Slici 4.15. prikazan je sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od temperature ekstrakcione smeše.



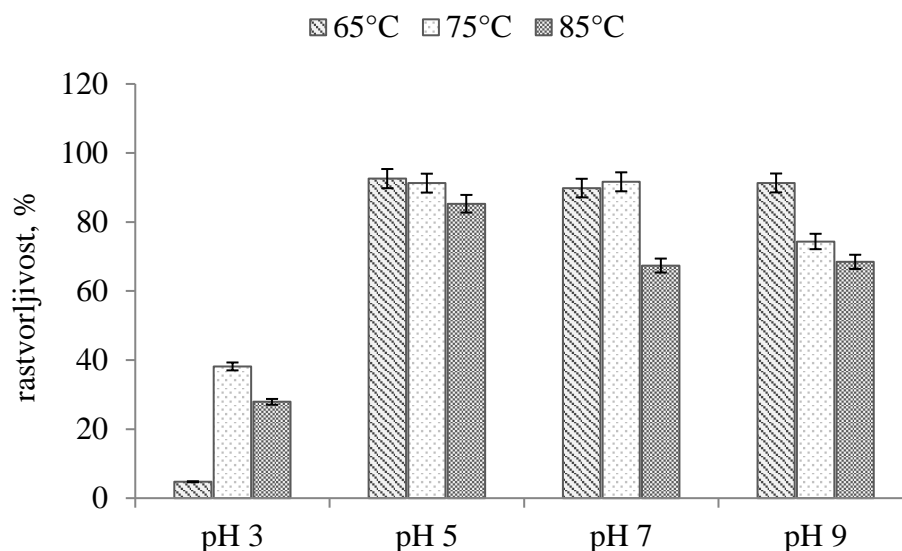
**Slika 4.15.** Sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od temperature ekstrakcione smeše

Sa Slike 4.15 se vidi da sa porastom temperature sa 65 na 75°C, raste prinos ekstrakcije, što je u saglasnosti sa istraživanjima Amponsa (Amponsah) i Najak (Nayak) (2016). U njihovom istraživanju uticaja mikrotalasnog pretretmana na prinos ekstrakcije u sojinom brašnu, proteinskom koncentratu soje i sojinom mleku, porast temperature od 60 do 100°C doveo je do povećanja prinosa ekstrakcije u svim ispitivanim uzorcima [173]. U našem istraživanju daljim povećanjem temperature sa 75 na 85 °C, razlike u povećanju prinosa ekstrakcije nisu statistički značajne ( $p < 0,05$ ). Sadržaj nerastvornih proteina u talogu prati ovaj trend opadanja količine proteina sa porastom temperature.

#### 4.11.1.1. Uticaj temperature na rastvorljivost proteina

Od različito pretretiranih ekstrakata, nakon sprej sušenja, pripremljeni su rastvori za određivanje rastvorljivosti proteinskih izolata prema metodi 3.11.1. Rastvorljivost sojinih proteina u zavisnosti od temperature mikrotalasnog zračenja prikazana je na Slici 4.16. Sa porastom temperature sa 65 na 75 °C, u veoma kiseloj sredini (pH 3), raste rastvorljivost proteina, što je u saglasnosti sa literaturnim podacima [173]. Veoma je značajan izuzetno povoljan uticaj mikrotalasnog zračenja na rastvorljivost sojinih proteina u blizini izoelektrične tačke (pH 5). U poređenju sa pretretmanom ultrazvučnom sondom, gde je maksimalna rastvorljivost postignuta na pH 5 iznosila

svoga 29,783% sonikacijom u trajanju od 0,5 min (frekvencije UZS 20 kHz, amplituda 20%), mikrotalasnim zračenjem za svega 2 min na temperaturi 65 °C, rastvorljivost je povećana na 92,576%. Takođe, sa porastom temperature, na pH vrednostima rastvora 7 i 9, rastvorljivost sojinih proteina je niža u odnosu na ultrazvučno tretirane uzorke.

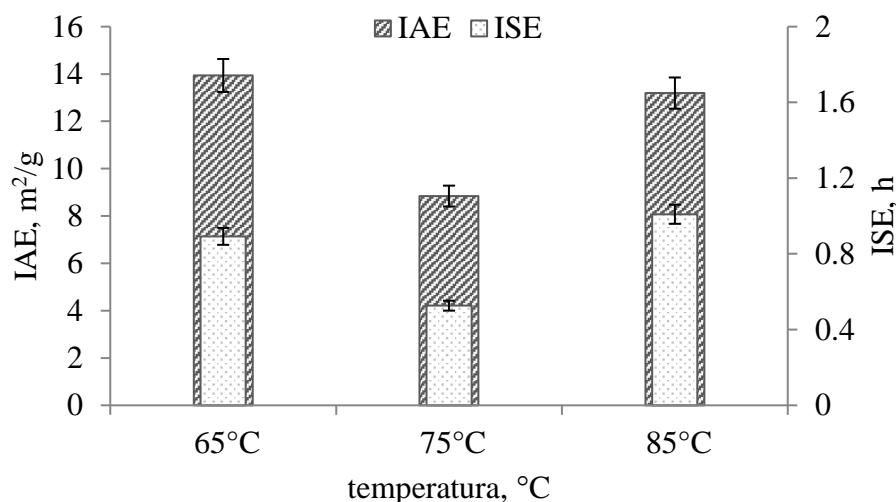


**Slika 4.16.** Uticaj temperature mikrotalasnog zračenja na rastvorljivost proteina

Opadanje rastvorljivosti sojinih proteina sa porastom temperature zabeleženo je i u istraživanju Kaprita (Caprita) i sar. (2010). Konvencionalno zagrevanje sojinog brašna u trajanju od 30 min na 120°C uzrokovalo je smanjenje rastvorljivosti proteina za 21%, a mikrotalasni tretman u trajanju od samo 5 minuta doveo je do pada rastvorljivosti od 18,76% [205]. Brže smanjenje rastvorljivosti uzrokovano mikrotalasnim tretmanom može se objasniti različitim mehanizmom delovanja mikrotalasnih zraka u odnosu na konvencionalno zagrevanje u struji toplog vazduha. Zagrevanje mikrotalasima počinje unutar ćelija i molekula koji sadrže vodu i energija se usled trenja transformiše u toplotu, za razliku od zagrevanja u pećima, gde se toplota prenosi konvekcijom od spolja ka unutrašnjosti molekula. Smanjenje rastvorljivosti proteina zagrevanjem je rezultat umrežavanja molekula proteina usled interakcije disulfidnih veza između velikog broja sulfhidrilnih grupa. Kao rezultat interakcije nastaju nove intermolekulske disulfidne veze [206].

#### 4.11.1.2. Uticaj temperature na emulgjuća svojstva proteina

Priprema uzoraka za određivanje emulgjućih svojstava, izvršena je prema ranije opisanom postupku (3.11.2), a emulgjuća svojstva ispitana su turbidometrijskom metodom, takođe po ranije opisanom postupku. Dobijeni rezultati predstavljeni su na Slici 4.17.



**Slika 4.17.** Uticaj temperature na emulgjuća svojstva izolovanih proteina

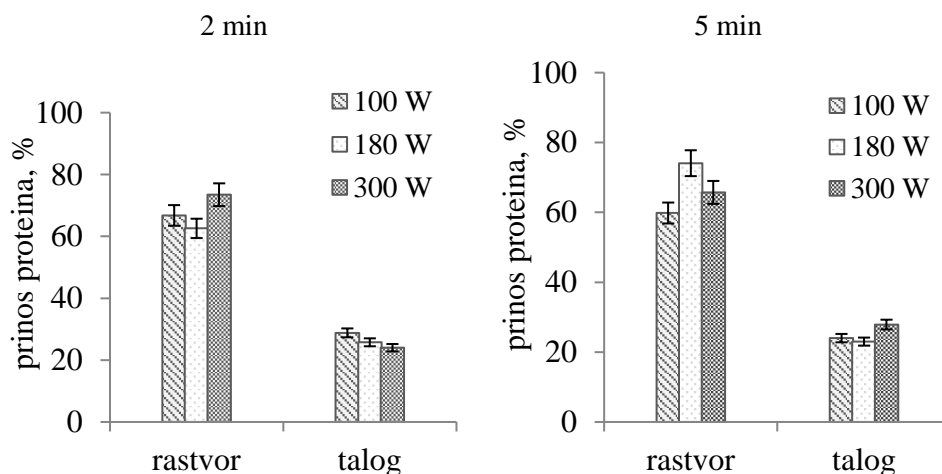
Najveća vrednost IAE od 13,936 m<sup>2</sup>/g dobijena je za uzorak tretiran mikrotalasnim zračenjem na temperaturi od 65 °C, dok je najveća vrednost ISE od 1,009 h dobijena za uzorak tretiran mikrotalasnim zračenjem na temperaturi od 85 °C, ali se ova vrednost statistički značajno ne razlikuje u odnosu na uzorak na 65°C (0,9002 h). U poređenju sa uzorcima tretiranim UZS, za najoptimalniji rezultat sa aspekta IAE i ISE (amplituda 20%, 15 min za IAE i amplituda 30%, 10 min za ISE), zabeleženo je njihovo povećanje dejstvom mikrotalasnog zračenja 1,65 puta za obe vrednosti.

#### 4.11.2. Uticaj snage mikrotalasa na efikasnost ekstrakcije proteina

U narednoj fazi istraživanja pripremljen je novi set uzoraka za ispitivanje uticaja snage mikrotalasnog zračenja na efikasnost ekstrakcije proteina iz obezmašćenog brašna soje prema metodi 3.10.2. Temperaturni limit je podešen na 120°C da bi se izbegla degradacija bioaktivnih jedinjenja u biljnom materijalu. Nakon završenog pretretmana,



uzorci su centrifugirani na 5000 ob/min u trajanju od 10 minuta. Supernatant i talog su osušeni i sadržaj proteina u njima analiziran je po ranije opisanim postupcima. Na Slici 4.18 prikazan je sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od snage mikrotalasa.

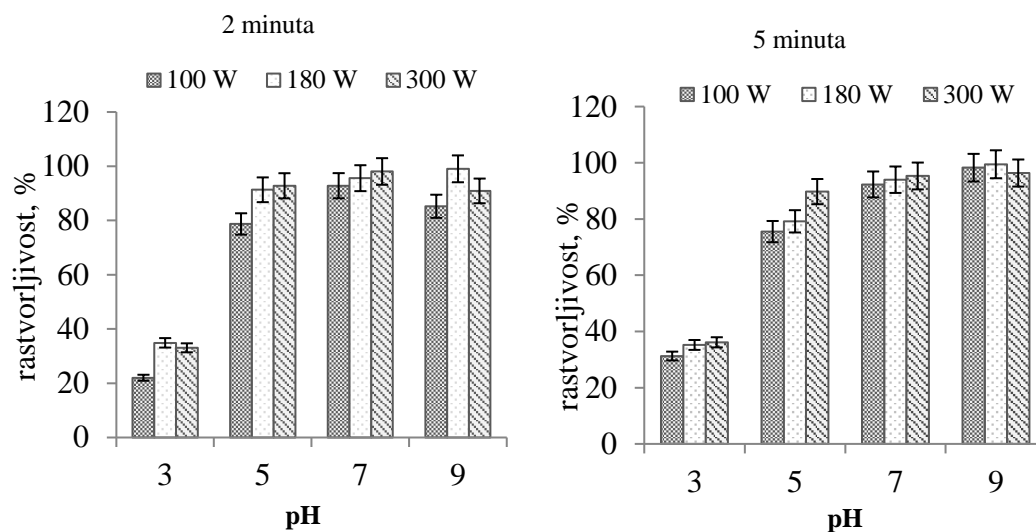


**Slika 4.18.** Uticaj snage mikrotalasa na efikasnost ekstrakcije proteina u vremenskim intervalima od 2 minuta (levo) i 5 minuta (desno)

Sa Slike 4.18. može da se zapazi da u vremenskom intervalu od 2 minuta sa povećanjem mikrotalassne snage na 300W dolazi do povećanja efikasnosti ekstrakcije proteina iz obezmašćenog brašna soje. U vremenskom intervalu od 5 minuta (b), sa porastom snage na 300 W prinos proteina u supernatantu opada, a u talogu raste. U ovom slučaju došlo je do zagrevanja smeše preko 100 °C, pa se može pretpostaviti da je došlo do denaturacije proteina.

#### 4.11.2.1. Uticaj snage mikrotalasa na rastvorljivost proteina

Od različito pretretiranih ekstrakata, nakon sprej sušenja, pripremljeni su rastvori po metodi 3.11.1. Na Slici 4.19 prikazana je zavisnost rastvorljivosti izolovanih proteina od jačine mikrotalassne snage u konstantnim vremenskim intervalima od 2 i 5 minuta. Sa porastom snage, u oba vremenska intervala, uočava se porast rastvorljivosti izuzev u uzorku tretiranom mikrotalassnom snagom od 300 W. Ovo je u skladu prethodnim analizama, gde je ovaj uzorak pokazao manji prinos ekstrakcije usled denaturacije proteina, zbog pregrevanja uzorka.



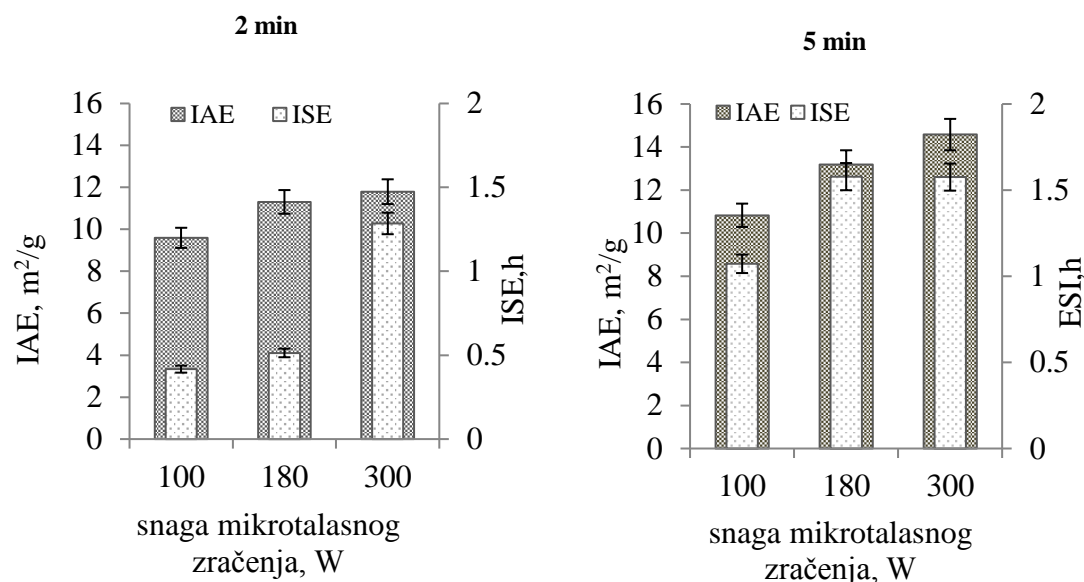
**Slika 4.19.** Zavisnost rastvorljivosti izolovanih proteina soje od snage mikrotalasa pri različitim pH vrednostima u vremenskom periodu od (a) 2 minuta i (b) 5 minuta

Veoma je značajan porast rastvorljivosti proteina u oba vremenska intervala na pH vrednosti 5 blizu izoelektrične tačke. Taj porast je čak izraženiji u periodu od 2 minuta, što potvrđuje činjenicu da mikrotalasnno zračenje ima veoma pozitivan uticaj na funkcionalna svojstva sojinih proteina, ali u veoma kratkom intervalu. U odnosu na uzorke tretirane ultrazvučnom sondom, rastvorljivost je povećana za preko 60%.

#### 4.11.2.2. Uticaj snage mikrotalasa na emulgujuća svojstva proteina

Kako je već istaknuto mikrotalasnno zračenje omogućava zagrevanje smeše rastvarača direktnom interakcijom sa slobodnim molekulima prisutnim u sistemu i dovodi do ubrzanog razaranja biljnog tkiva i oslobađanja komponenti u rastvarač [109]. Brojni literaturni podaci pokazuju da se primenom mikrotalasa skraćuje vreme reakcije, povećava prinos i čistoća dobijenih produkata [110,111]. Dodatna prednost tehnike je ta što kombinuje visoku temperaturu i pritisak za optimalno oslobađanje bioaktivnih supstanci uz istovremeno razaranja ćelijskog zida [112]. Na Slici 4.20 prikazan je uticaj snage mikrotalasnog zračenja na IAE i ISE izolovanih proteina. Povećanje snage mikrotalasnog zračenja, u oba posmatrana vremenska intervala dovodi do povećanja IAE i ISE. Poređenjem dobijenih vrednosti sa onima dobijenim pri tretmanu uzoraka ultrazvučnom sondom, dolazimo do zaključka da je pretretman mikrotalasima pokazao

kao efikasniji kako sa stanovišta prinosa, tako i sa stanovišta poboljšanih tehnološko-funkcionalnih svojstava izolovanih proteina.



**Slika 4.20.** Uticaj snage mikrotalasnog zračenja na emulgujuća svojstva izolovanih proteina

U poslednjih nekoliko decenija mikrotalasno zračenje je veoma prisutno u procesu prerade leguminoza, posebno soje, u cilju uklanjanja neprijatnog mirisa i uništavanja inhibitora tripsina [207-210]. Prilikom dejstva mikrotalasa veoma je bitno voditi računa o tome da ne dođe do pregrevanja uzoraka i degradacije proteina, da bi se održao nutritivni kvalitet brašna. To se postiže izlaganjem uzoraka mikrotalasnom zračenju u veoma kratkom vremenskom periodu, od nekoliko sekundi do svega nekoliko minuta.

#### 4.12. PROMENA SADRŽAJA RAZLIČITIH BIOAKTIVNIH JEDINJENJA U SEMENU ŽUTE SOJE (cv. LAURA) USLED TRETMANA FOLIJARNIM ĐUBRIVIMA NA BAZI BILJNIH EKSTRAKATA

Poslednja faza ovog istraživanja bila je usmerena na mogućnost povećana sadržaja polifenolnih kiselina, ukupnih fenola, ulja, proteina i antioksidativne aktivnosti ekstrakata tretiranjem biljaka soje različitog porekla različitim folijarnim đubrivima. U

toku vegetacionog perioda izvršeno je tretiranje biljaka soje folijarnim đubrivima na bazi biljnih ekstrakata. Svrha ovog oglada bila je, pre svega ispitivanje mogućnosti proizvodnje soje bogatije ciljanom grupom bioaktivnih jedinjenja (polifenolnih kiselina ili proteina) kontrolisanom biofortifikacijom. Takođe, sva primenjena đubriva su biljnog porekla, pa bi, ukoliko pokazuju pozitivan uticaj na nutritivni kvalitet semena soje mogla da se primenjuju i u organskoj proizvodnji, što ima značajan doprinos u zaštiti životne sredine.

#### 4.12.1. Kvantifikacija slobodnih, esterifikovanih i vezanih polifenolnih kiselina

Prema ranije opisanim metodama, izvršen je postupak ekstrakcije obezmašćenog sojinog brašna i analiza sadržaja polifenolnih kiselina u sve tri dobijene frakcije. U Tabeli 4.13 prikazana je koncentracija šest polifenolnih kiselina u zavisnosti od primenjenog folijarnog đubriva.

Najveća koncentracija polifenolnih kiselina u semenu soje detektovana je u slobodnoj rastvornoj formi. Ovo je u skladu sa istraživanjima Aludat (Aludatt) i sar. (2013).

Količina svih šest polifenolnih kiselina značajno varira u odnosu na kontrolni uzorak.

Najveća promena uočena je u sadržaju *p*-kumarne kiseline, čija koncentracija je, kod ekstrakata biljaka tretiranih đubrivima „Calbit-C“, „Cropmax“ i „Zircon“ veća za 39,98%, 42,31% i 40,91% (w/w) u poređenju sa kontrolnim uzorkom. U ovoj frakciji, najmanji efekat na promene sadržaja polifenolnih kiselina pokazalo je đubrivo „Eko-Fus“. U frakciji dobijenoj nakon alkalne hidrolize najveći udeo imaju *p*-kumarna i ferulna kiselina (Tabela 4.14). Ovo je u skladu sa istraživanjima Aludat (Aludatt) i sar. (2013), koji su ustanovili da su ove dve kiseline dominantne polifenolne kiseline, kako u punomasnoj soji, tako i u obezmašćenom sojinom brašnu [211]. U istraživanjima Kim i sar. (2016) potvrđeno je da su *p*-kumarna i ferulna kiselina čvrsto vezane sa strukturnim komponentama ćelijskog zida u semenu crne soje i da se oslobađaju nakon bazne hidrolize [189]. Dobijeni rezultati potvrđuju literaturne podatke [41,189] da se neke polifenolne kiseline u biljnom materijalu sintetišu u obliku makromolekula (npr. fenoli, tanini, lignin) kao potpora strukturi ćelijskog zida. Hlorogena, kafena i *p*-kumarna kiselina čine intermedijare u toku sinteze lignina, dok je ferulna kiselina takođe vezana za polisaharide, lignin i suberin.

**Tabela 4.13.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u slobodnoj, rastvornoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

Đubrivo	Kontrola	Vegard	Eko-Fus	Calbit-C	Cropmax	Zircon
galna kiselina	55,85 ± 0,60 <sup>E*</sup>	55,97 ± 0,74 <sup>E</sup>	63,61 ± 0,53 <sup>C</sup>	70,25 ± 0,52 <sup>A</sup>	67,21 ± 0,50 <sup>B</sup>	58,86 ± 0,42 <sup>D</sup>
hlorogena	80,21 ± 0,47 <sup>C</sup>	76,76 ± 0,65 <sup>D</sup>	70,17 ± 0,74 <sup>E</sup>	89,16 ± 0,76 <sup>A</sup>	88,06 ± 0,49 <sup>A</sup>	84,77 ± 0,53 <sup>B</sup>
kafena	36,66 ± 0,38 <sup>B</sup>	28,71 ± 0,43 <sup>D</sup>	28,12 ± 0,58 <sup>D</sup>	39,22 ± 0,45 <sup>A</sup>	40,05 ± 0,59 <sup>A</sup>	34,72 ± 0,43 <sup>C</sup>
<i>p</i> -kumarna <sup>**</sup>	215,57 ± 0,8 <sup>E</sup>	281,3 ± 1,39 <sup>C</sup>	261,65 ± 1,47 <sup>D</sup>	301,76 ± 1,48 <sup>B</sup>	306,77 ± 1,07 <sup>A</sup>	303,77 ± 1,20 <sup>AB</sup>
ferulna	156,00 ± 0,56 <sup>D</sup>	179,05 ± 1,30 <sup>C</sup>	157,11 ± 1,10 <sup>D</sup>	181,63 ± 1,23 <sup>C</sup>	187,18 ± 1,27 <sup>A</sup>	184,47 ± 1,14 <sup>AB</sup>
<i>trans</i> -cimetna	206,33 ± 0,86 <sup>E</sup>	226 ± 1,0 <sup>D</sup>	187,6 ± 1,25 <sup>F</sup>	233,96 ± 1,50 <sup>C</sup>	238,34 ± 1,19 <sup>B</sup>	264,09 ± 1,40 <sup>A</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C, D E, F) u superskriptu za svaku pojedinačnu kiselinu, u zavisnosti od tretmana, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za kumarnu kiselinu u zavisnosti od primenjenog đubriva, dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani

U našem istraživanju, najveće varijacije u sadržaju *p*-kumarne i ferulne kiseline, uslovljene fertilizacijom, dobijene su upravo u frakciji esterifikovani rastvorljivih polifenolnih kiselina (nakon bazne hidrolize). Tretiranje biljaka folijarnim đubrivom "Vegard" dovelo je do povećanja u sadržaju *p*-kumarne i ferulne kiseline od 93,58%, odnosno 82% (w/w) u odnosu na kontrolni uzorak. Iako tretmani đubrivima "Vegard" i "Eko-Fus" dovode do najmanjih promena u sadržaju slobodnih, rastvorljivih polifenolnih kiselina (Tabela 4.13), njihov uticaj je najizraženiji u frakciji esterifikovanih kiselina (Tabela 4.14). Ovo dokazuje da prihrana biljaka ovim specifičnim đubrivima dovodi do promena ne samo u sadržaju polifenolnih kiselina u semenu soje, već i do njihove različite distribucije unutar ćelijskog materijala, značajno utičući na njihovu ulogu u biljkama (kao što je zaštita od raznih vrsta parazita, virusa, mehaničkog stresa, itd.).

Količina i raspodela polifenolnih kiselina u biljnom materijalu utiče i na njihovu rastvorljivost i pristupačnost u toku digestije u gastrointestinalnom traktu kod ljudi i životinja.

Najmanje količine polifenolnih kiselina oslobađaju se posle kiselinske hidrolize (Tabela 4.15), što je takođe u saglasnosti sa istraživanjima Aludat (Aludatt) i sar. (2013). U našem istraživanju, u ovoj frakciji hlorogena i kafena kiselina nisu detektovane, a promene u sadržaju ostale četiri kiseline značajno su manje u poređenju sa frakcijom slobodnih i esterifikovanih kiselina. Slično kao i u slobodnoj frakciji (Tabela 4.13), i u ovoj frakciji đubriva „Calbit-C“, „Cropmax“ i „Zircon“ utiču na povećanje sadržaja polifenolnih kiselina u odnosu na kontrolni uzorak.

**Tabela 4.14.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u esterifikovanoj, rastvorljivoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

Dubrivo	Kontrola	Vegard	Eko-Fus	Calbit-C	Cropmax	Zircon
galna	57,69 ± 0,64 <sup>B*</sup>	53,98 ± 0,24 <sup>C</sup>	52,55 ± 0,64 <sup>D</sup>	60,85 ± 0,47 <sup>A</sup>	60,45 ± 0,32 <sup>A</sup>	57,53 ± 0,53 <sup>B</sup>
hlorogena	52,1 ± 0,51 <sup>C</sup>	56,13 ± 0,36 <sup>B</sup>	45,86 ± 0,44 <sup>D</sup>	58,4 ± 0,57 <sup>A</sup>	58,75 ± 0,35 <sup>A</sup>	59,59 ± 0,48 <sup>A</sup>
kafena	53,77 ± 0,48 <sup>B</sup>	56,02 ± 0,36 <sup>A</sup>	48,7 ± 0,64 <sup>D</sup>	51,68 ± 0,44 <sup>C</sup>	51,59 ± 0,47 <sup>C</sup>	55,68 ± 0,61 <sup>A</sup>
<i>p</i> -kumarna <sup>**</sup>	177,07 ± 0,73 <sup>F</sup>	342,77 ± 0,66 <sup>A</sup>	247,39 ± 1,58 <sup>D</sup>	264,56 ± 1,27 <sup>C</sup>	223 ± 0,99 <sup>E</sup>	268,39 ± 1,29 <sup>B</sup>
ferulna	146,28 ± 0,38 <sup>F</sup>	266,24 ± 0,73 <sup>A</sup>	201,7 ± 1,53 <sup>D</sup>	223,73 ± 1,03 <sup>B</sup>	185,63 ± 1,35 <sup>E</sup>	207,05 ± 1,09 <sup>C</sup>
<i>trans</i> -cimetna	45,79 ± 0,54 <sup>C</sup>	47,36 ± 0,36 <sup>AB</sup>	45,86 ± 0,59 <sup>C</sup>	48,64 ± 0,57 <sup>A</sup>	48,51 ± 0,45 <sup>A</sup>	46,49 ± 0,54 <sup>BC</sup>

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C, D E, F) u superskriptu za svaku pojedinačnu kiselinu, u zavisnosti od tretmana, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za kumarnu kiselinu u zavisnosti od primenjenog đubriva, dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani

**Tabela 4.15.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u vezanoj, nerastvornoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ )

kiselina	Đubrivo	Kontrola	Vegard	Eko-Fus	Calbit-C	Cropmax	Zircon
galna		$69,41 \pm 0,63^{\text{D}}$	$71,1 \pm 0,57^{\text{C}}$	$75,95 \pm 0,59^{\text{B}}$	$80,16 \pm 0,54^{\text{A}}$	$80,68 \pm 0,56^{\text{A}}$	$80,56 \pm 0,46^{\text{A}}$
hlorogena		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
kafena		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>p</i> -kumarna <sup>**</sup>		$45,05 \pm 0,49^{\text{C}}$	$42,75 \pm 0,21^{\text{D}}$	$44,61 \pm 0,50^{\text{C}}$	$49,26 \pm 0,47^{\text{A}}$	$46,97 \pm 0,54^{\text{B}}$	$48,73 \pm 0,51^{\text{A}}$
ferulna		$43,79 \pm 0,37^{\text{D}}$	$43,08 \pm 0,23^{\text{E}}$	$44,8 \pm 0,52^{\text{C}}$	$51,35 \pm 0,50^{\text{A}}$	$47,66 \pm 0,58^{\text{B}}$	$45,58 \pm 0,59^{\text{C}}$
<i>trans</i> -cimetna		$43,06 \pm 0,30^{\text{D}}$	$44,19 \pm 0,23^{\text{D}}$	$45,59 \pm 0,52^{\text{C}}$	$46,91 \pm 0,43^{\text{B}}$	$51,92 \pm 0,48^{\text{A}}$	$46,71 \pm 0,53^{\text{BC}}$

\*Vrednosti obeležene različitim slovima (A, B, C, D E) u superskriptu za svaku pojedinačnu kiselinu, u zavisnosti od tretmana, značajno se razlikuju ( $p < 0,05$ ). Poređenje je izvršeno na osnovu rezultata Tukey testa;

\*\*Primer rezultata ANOVE i Tukey testa za kumarnu kiselinu u zavisnosti od primenjenog đubriva, dat je u prilogu 4. Za ostale kiseline radi se po analogiji i rezultati nisu prikazani; n.d.- nije detektovano

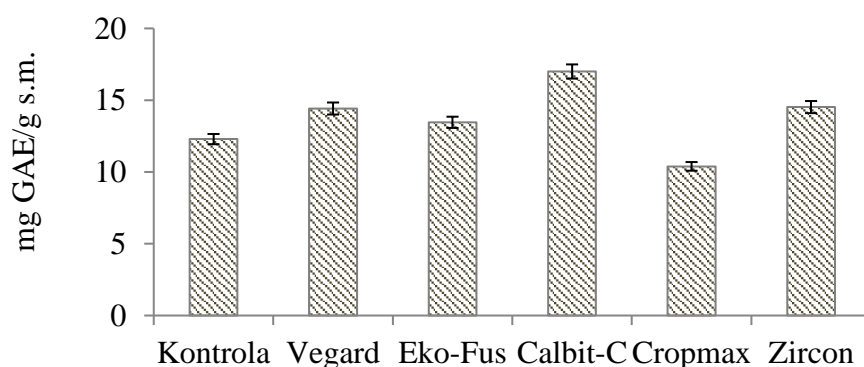


#### 4.12.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti pripremljenih ekstrakata

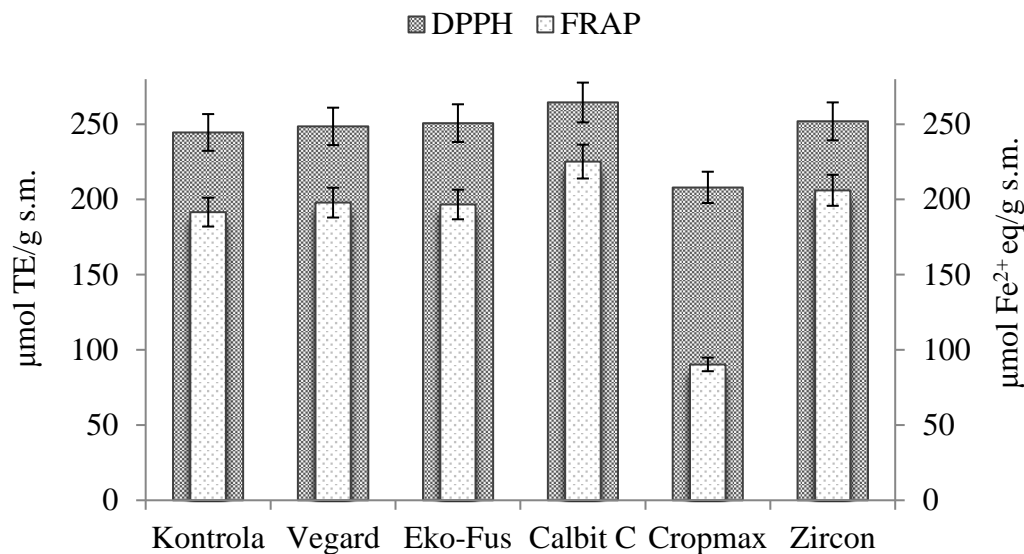
Iz prethodno pripremljenih ekstrakata, a na osnovu ranije opisanih metoda određen je sadržaj ukupnih fenola i antioksidativna aktivnost ekstrakata.

Na antioksidativnu aktivnost neke biljne vrste utiče veliki broj faktora (skladištenje, uslovi prerade, uslovi okoline, fiziološki faktori u biljkama i dr.) [191,192] i postoji nekoliko mehanizama kojima antioksidansi ispoljavaju svoju aktivnost (donori elektrona; “hvatači” slobodnih radikala, donori H atoma). Zbog toga je poželjno koristiti nekoliko metoda u cilju što potpunijeg i preciznijeg tumačenja rezultata. U tu svrhu, u ovom istraživanju je antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata sojinog brašna određena korišćenjem DPPH i FRAP metode. Rezultati su prikazani na Slikama 4.21 i 4.22.

Sva ispitivana đubriva uslovia su značajne promene u sadržaju ukupnih fenola (Slika 4.21) i antioksidativne aktivnosti ekstrakata (Slika 4.22). Jedino ekstrakti biljaka tretiranih đubrivom “Cropmax” pokazuju smanjen sadržaj ukupnih fenola i manju antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak (Slike 4.21 i 4.22). Sva ostala primenjena đubriva pokazala su pozitivan uticaj na TPC, DPPH i FRAP, što je u saglasnosti sa nekoliko studija u kojima je prikazan pozitivan efekat bioloških đubriva na prinos, rast i antioksidativnu aktivnost različitih biljnih vrsta [212-214].



**Slika 4.21.** Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima (mg GAE/g s.m.) u zavisnosti od primenjenog folijarnog đubriva



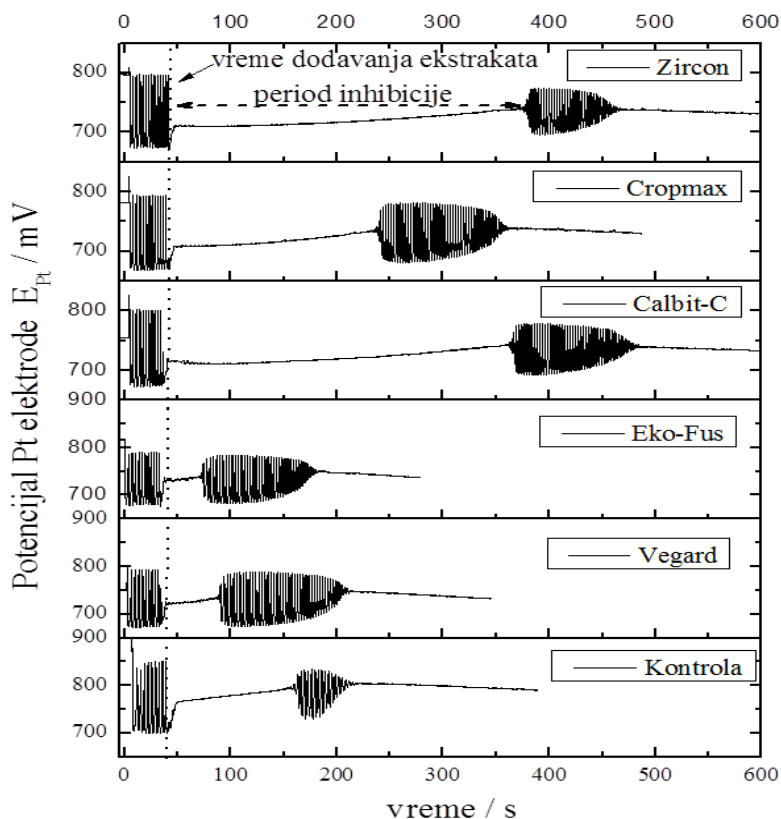
**Slika 4.22.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata biljaka tretiranih različitim đubrivima izražena preko DPPH ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$ ) metode

U ovom delu istraživanja, zbog raznovrsnosti primenjenih folijarnih đubriva, antioksidativna aktivnost je ispitana i primenom Brigs-Raušerove (Briggs-Rauscher) (BR) metode prema opisanom postupku (3.7.3). Ova metoda daje “širu sliku” antioksidativne aktivnosti i može da pokaže postojanje sinergijskih efekata različitih bioaktivnih jedinjenja unutar same biljke [166].

Poređenjem rezultata TPC, DPPH i FRAP sa rezultatima dobijenim primenom BR metode (Slika 4.23), najveću antioksidativnu aktivnost (najduže vreme inhibicije) pokazuju ekstrakti koji potiču od biljaka tretiranih đubrivima “Zircon” i “Calbit-C”. Ekstrakti biljaka tretiranih đubrivima “Vegard” i “Eko-Fus” pokazuju nešto slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na kontrolni uzorak i međusobno su veoma slični. Interesantno je da se prema BR metodi, antioksidativna aktivnost ekstrakta uzorka tretiranog đubrivom “Cropmax” nalazi između ove dve grupe.

Ovaj rezultat ukazuje na to da u inhibiciji oscilatornog režima ne učestvuju samo polifenolna jedinjenja, nego i druga bioaktivna jedinjenja prisutna u biljnom ekstraktu, kao što su proteini, s obzirom na veoma visok sadržaj proteina u ekstraktima iz biljaka tretiranih “Cropmax” u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. U ovom istraživanju, utvrđen je sinergistički efekat polifenola i proteina na antioksidativnu aktivnost

ekstrakata biljaka tretiranih đubrivom “Cropmax”, ali i prednosti tretmana biljaka đubrivima “Calbit-C” i “Zircon”.

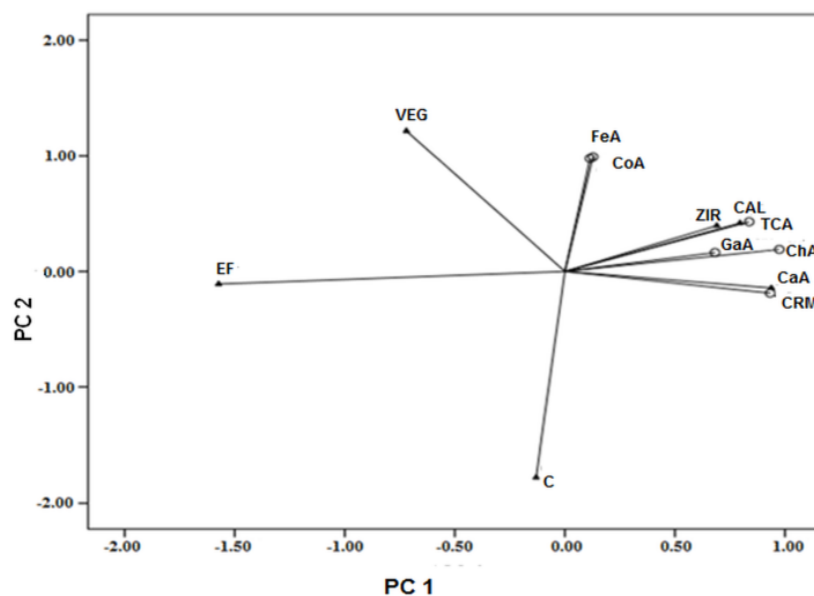


**Slika 4.23.** Briggs-Raušerovi (Briggs-Rauscher) oscilogrami

Najveći pozitivan uticaj na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata u ovom istraživanju ispoljilo je folijarno đubrivo “Calbit-C”, koje sadrži kalcijum u obliku vodorastvornog Ca-lignosulfonata. To je u skladu sa činjenicom da  $\text{Ca}^{2+}$  u obliku funkcionalnog Ca-pektata ulazi u strukturu ćelijskog zida (kao i mnoge polifenolne komponente), čineći je jačom i otpornijom na razne stresore. Takođe igra važnu ulogu u stabilizaciji veza između fosfolipida i proteina ćelijske membrane, održavajući njihovu funkcionalnu stabilnost [215,216].

Druga metoda uvedena u ovom delu istraživanja je analiza glavnih komponenti (na engl. *Principal Component Analysis*, PCA). PCA analiza je vrlo koristan alat za smanjenje velikog broja promenljivih na mali broj tzv. kompozitnih promenljivih (glavne komponente). One objašnjavaju varijabilnost podataka na najsazetiji način. Na taj način se prikazuju neke skrivene međusobne zavisnosti podataka. Na Slici 4.24.

prikazani su rezultati PCA analize, dijagram zavisnosti profila polifenolnih kiselina u sojinom brašnu, od tretmana folijarnim đubrivima.

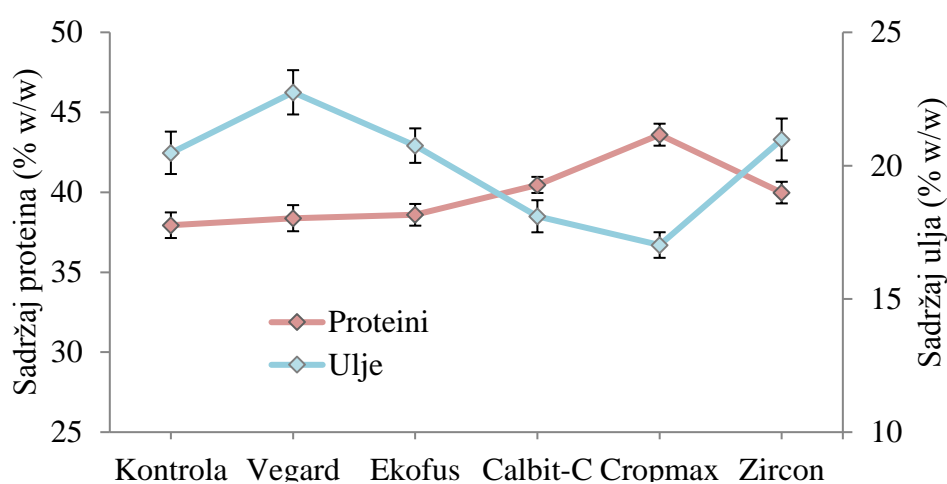


**Slika 4.24.** PCA dijagram zavisnosti profila polifenolnih kiselina u semenu soje, od tretmana đubrivima na bazi biljnih ekstrakata (kontrola-C, Vegard-VEG, Eko-Fus-EF, Calbit-C-CAL, Cropmax-CRM, Zircon-ZIR)

Rezultati PCA ukazuju da je osa 1 (PC1) objašnjena sa 57,31%, a osa 2 (PC2) sa 29,96% u odnosu na ukupnu varijabilnost. PC 1 objašnjena je hlorogenom, kafenom i *trans*-cimetnom kiselinom sa 97,4%, 93,3% i 83,7%, dok je PC 2 objašnjena *p*-kumarnom i ferulnom kiselinom sa 99,1% i 97,8% respektivno. Prema slici 4.24 đubrivo "Cropmax" je indukovalo najveću varijabilnost koncentracije kafene kiseline, a u nižem stepenu varijabilnost koncentracija galne i hlorogene kiseline. „Calbit-C“ i „Zircon“ su uglavnom odgovorni za varijacije u koncentraciji *trans*-cimetne, galne i hlorogene kiseline. Ostali tretmani (posebno "Eko-Fus" i kontrola) nisu odražavali varijacije u sadržaju ispitivanih polifenolnih kiselina. To znači da primena đubriva na bazi biljnih ekstrakata ne utiče samo na prinost, nego i na hemijski sastav zrna, pa se njihovom primenom može ciljano uticati na sastav i koncentraciju polifenolnih jedinjenja u zrnju [49,217].

### 4.12.3. Promena sadržaja nativnih proteina i ulja

Sadržaj ulja u brašnu soje tretirane različitim đubrivima na bazi biljnih ekstrakata određen je gravimetrijski po metodi 3.2.2, i kretao se od 17,02 do 22,75% (w/w). Sadržaj nativnih proteina u sojinom brašnu određen je posredno, određivanjem sadržaja azota metodom po Kjeldalu, po ranije opisanom i optimizovanom postupku. Dobijeni sadržaj azota pomnožen je N/P faktorom konverzije od 5,71, koji je usvojen na osnovu literaturnih podataka [168,169]. Sadržaj proteina u različito tretiranim uzorcima kretao se od 37,94 do 43,6% (w/w), a rezultati su prikazani na Slici 4.25.



**Slika 4.25.** Sadržaj proteina i ulja (% w/w) u semenu soje u zavisnosti od primenjenog folijarnog đubriva (1-kontrola, 2-Vegard, 3-Eko-Fus, 4-Calbit-C, 5-Cropmax and 6-Zircon)

Dva đubriva, "Calbit-C" i "Cropmax" pokazala su negativan uticaj na sadržaj ulja u semenu soje, ali pozitivan uticaj na sadržaj nativnih proteina. U brašnu soje koje potiče od biljaka tretiranih đubrivom "Cropmax", sadržaj proteina veći je za 5,66% u odnosu na kontrolu. Ovo je i očekivano, obzirom da đubrivo "Cropmax" sadrži 2% amino kiselina koje imaju pozitivan efekat na metabolizam azota i povećanje sadržaja nativnih proteina u biljnom materijalu [213,218].

## 5. ZAKLJUČAK

Osnovni cilj ove disertacije bio je da se doprinese razvoju metoda ekstrakcije bioaktivnih jedinjenja iz semena žute soje primenom ultrazvuka visoke frekvencije i mikrotalasa kao novih „zelenih“ tehnologija koje imaju sve veću primenu zbog smanjenog vremena analize, smanjene potrošnje rastvarača, ekonomičnosti i zaštite životne sredine. U okviru ove doktorske disertacije određena je optimalna ekstrakciona smeša za što potpuniju ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz obezmašćenog sojinog brašna sa aspekta antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih fenola u različito pripremljenim ekstraktima. Potom je optimizovana HPLC procedura za detekciju polifenolnih kiselina u semenu žute soje sa aspekta mobilne faze i gradijenta eluiranja iste. Ispitan je uticaj pretretmana uzoraka ultrazvukom visoke frekvencije i mikrotalasnim zračenjem na efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina, antioksidativnu aktivnost, efikasnost ekstrakcije proteina i poboljšanje njihovih tehnološko-funkcionalnih karakteristika. U poslednjoj fazi istraživanja, korišćenjem gorepomenutih metoda ispitan je uticaj tretmana soje u toku vegetacionog rasta različitim folijarnim đubrivima na bazi biljnih ekstrakata, na promene u sadržaju različitih grupa bioaktivnih jedinjenja u sojinom brašnu.

Na osnovu rezultata prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- **Pri ispitivanju uticaja rastvarača na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata obezmašćenog sojinog brašna:**

Dodatak male količine hlorovodonične kiseline u reakcionu smešu značajno povećava efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina, sadržaj ukupnih fenola i antioksidativnu aktivnost dobijenih ekstrakata.

- **Pri ispitivanju uticaja mobilne faze i gradijenta eluiranja na odzivne površine praćenih polifenolnih kiselina:**

Najbolji rezultati dobijeni su kombinovanjem mobilne faze metanol-0,1% mravlja kiselina.

- **Pri ispitivanju efikasnosti ekstrakcije polifenolnih kiselina kombinovanjem različitih metoda:**

Ekstrakcija rastvaračem u kombinaciji sa naknadnom baznom i kiselinskom hidrolizom se pokazala kao efikasnija metoda u odnosu na direktnu baznu i direktnu kiselinsku hidrolizu.

- **Pri ispitivanju uticaja pretretmana ultrazvukom na efikasnost ekstrakcije polifenola variranjem amplitude sonde i vremena sonikacije:**

Od dve ispitane amplitude ultrazvučne sonde, najbolji rezultati u pogledu prinosa ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti su postignuti pri amplitudi od 30%.

Sa porastom vremena sonikacije pri konstantnoj amplitudi maksimalan prinos ekstrakcije se postiže u vremenskom periodu od 10 minuta, čime se značajno utiče na ekonomičnost postupka ekstrakcije.

- **Pri ispitivanju efikasnosti pretretmana ultrazvukom na ekstrakciju polifenolnih kiselina kombinovanjem različitih metoda:**

Pretretman ultrazvučnom sondom visoke frekvencije, praćen baznom i kiselinskom hidrolizom u značajnoj meri doprinosi efikasnosti ekstrakcije u pogledu sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima i njihove antioksidativne aktivnosti u odnosu na uzorke tretirane u ultrazvučnom kupatilu.

Efikasnost pretretmana ultrazvučnom sondom visoke frekvencije, praćena baznom i kiselinskom hidrolizom nije doprinela u očekivanoj meri povećanju prinosa praćenih polifenolnih kiselina. Obzirom da je seme soje bogato i drugim grupama polifenolnih jedinjenja, koje takođe ispoljavaju antioksidativnu aktivnost, može se pretpostaviti da pretretman ultrazvučnom sondom visoke frekvencije, praćen baznom i kiselinskom hidrolizom pozitivno utiče na njihovu ekstrakciju.

- **Pri ispitivanju uticaja pretretmana mikrotalasima na efikasnost ekstrakcije polifenola variranjem temperature i snage mikrotalasnog zračenja:**

Sa porastom temperature raste efikasnost reakcije, maksimalan prinos postiže se već nakon dejstva mikrotalasnog zračenja u periodu od 2 minuta na temperaturi od 85°C. Povećanjem snage od 25 do 75W postoji trend porasta sadržaja ukupnih fenola, antioksidativne aktivnosti i sadržaja praćenih polifenolnih kiselina u ekstraktima. Pri snazi od 100W, dolazi do opadanja ovih vrednosti. Kako ova metoda kombinuje povišenu temperaturu i pritisak, pri snazi mikrotalasnog zračenja od 100W došlo je do

pregrevanja ekstrakcione smeše, pa postoji velika verovatnoća da je došlo do degradacije bioaktivnih komponenata, što se ogledalo u smanjenoj antioksidativnoj aktivnosti i manjem sadržaju ukupnih fenola.

● **Pri ispitivanju efikasnosti pretretmana mikrotalasima na efikasnost ekstrakcije polifenolnih kiselina kombinovanjem različitih metoda:**

Pretretman mikrotalasima, praćen baznom i kiselinskom hidrolizom u značajnoj meri doprinosi efikasnosti ekstrakcije u pogledu sadržaja ukupnih fenola u ekstraktima i njihove antioksidativne aktivnosti u odnosu na uzorke tretirane u ultrazvučnom kupatilu i ultrazvučnom sondom.

Efikasnost pretretmana mikrotalasima, praćena baznom i kiselinskom hidrolizom doprinela je značajnom povećanju prinosa praćenih polifenolnih kiselina u odnosu na pretretmane ultrazvučnom sondom i ultrazvučnim kupatilom

● **Pri ispitivanju uticaja ultrazvučnog pretretmana na efikasnost ekstrakcije proteina iz obezmašćenog sojinog brašna i tehnološko-funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata:**

Najbolji rezultati sa aspekta prinosa ekstrakcije dobijeni su pri amplitudi sonde od 20%. Rastvorljivost proteina raste sa povećanjem vremena sonikacije, najslabija rastvorljivost u svim vremenskim intervalima je na pH=5, što je i bilo očekivano, jer je ova vrednost veoma bliska izoelektričnoj tački proteina soje.

● **Pri ispitivanju uticaja mikrotalasnog pretretmana na efikasnost ekstrakcije proteina iz obezmašćenog sojinog brašna i tehnološko-funkcionalna svojstva dobijenih hidrolizata:**

Veoma je značajan rezultat povećane rastvorljivosti proteina za čak 60% na pH vrednosti 5, i poboljšana emulgujuća svojstva, što može poslužiti kao osnova za uvođenje novih tehnoloških postupaka obrade prirodnih proteina i razvoj funkcionalnih prehrambenih proizvoda na bazi proteina soje.

● **Pri ispitivanju uticaja đubriva na bazi biljnih ekstrakata na promenu sadržaja bioaktivnih jedinjenja u semenu soje:**

Sva primenjena đubriva uslovia su značajne promene u sadržaju ukupnih fenola i antioksidativne aktivnosti ekstrakata

U ovom istraživanju, utvrđen je sinergijski efekat polifenola i proteina na antioksidativnu aktivnost ekstrakata biljaka tretiranih đubrivom "Cropmax".



Najveći pozitivan uticaj na sadržaj ukupnih fenola i antioksidativnu aktivnost ekstrakata ispoljilo je đubrivo na bazi kalcijuma u obliku vodorastvornog Ca-lignosulfonata, što potvrđuje činjenicu da  $\text{Ca}^{2+}$  u obliku funkcionalnog Ca-pektata ulazi u strukturu ćelijskog zida, čineći je jačom i otpornijom na razne stresore.

Analizama je utvrđeno da u *p*-kumarna i ferulna kiselina dve dominantne kiseline u semenu žute soje.

Rezultati ukazuju na mogućnost proizvodnje soje obogaćene različitim klasama bioaktivnih jedinjenja, u zavisnosti od njene dalje namene.

## 6. LITERATURA

- [1] Nagata, T. (1959). Studies on the differentiation of Soybean World with special regard to that of southeast Asia. *Japanese Journal of Crop Science*, 28, 79-82.
- [2] Vratarić, M. (1986). *Proizvodnja soje*. NIRO „Zadrugar“, Sarajevo.
- [3] Lee, J. H., Choung, M. G. (2011). Comparison of nutritional components in soybean varieties with different geographical origins. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54, 254-263.
- [4] Dabrowski, K. J., Sosulski, F. W. (1984). Composition of free and hydrolysable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, 128-130.
- [5] Kozłowska, H., Zadernowski, R., Sosulski, F. W. (1983). Phenolic acids in oilseed flours. *Food / Nahrung*, 27, 449-453.
- [6] Shahidi, F., Naczk, M. (2004). *Phenolic in food and nutraceutical*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- [7] Lee, S. J., Kim, J. J., Moon, H. I., Ahn, J. K., Chun, S. C., Jung, W. S., Lee, O. K., Chung, I. M. (2008). Analysis of isoflavones and phenolic compounds in Korean soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] seeds of different seed weights. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2751-2758.
- [8] Kim, E. H., Kim, S. H., Chung, J. I., Chi, H. Y., Kim, J. A., Chung, I. M. (2006). Analysis of phenolic compounds and isoflavones in soybean seeds (*Glycine max* (L.) Merrill) and sprouts grown under different conditions. *European Food Research and Technology*, 222, 201-208.
- [9] Malenčić, Đ., Cvejić, J., Čeran-Tepavčević, V., Popović, M. (2008). Total polyphenols and phytoestrogens concentration and DPPH-scavenging activity in soybean of different origin, *Proceedings of 7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF*, PH22.
- [10] Xu, B., Chang, S. K. C. (2008). Antioxidant capacity of seed coat, dehulled bean, and whole black soybeans in relation to their distributions of total phenolics, phenolic acids, anthocyanins, and isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8365-8373.

- [11] Adom, K. K., Liu, R. H. (2002). Antioxidant activity of grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6182-6187.
- [12] Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S., Blanchard, C. (2004). The distribution of phenolic acids in rice. *Food Chemistry*, 87(3), 401-406.
- [13] Wong, S. P., Lai, P. L., Jen, H. W. K. (2006). Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry*, 99, 775-783.
- [14] Wilson, R. F. (2004). Seed Composition. In: Boerma, H. R., Specht, J. E. (Eds.), *Soybeans: Improvement, Production, and Uses* (pp. 621-668). American Society of Agronomy, Inc., Madison.
- [15] Hymowitz, T., Collins, F. I. (1974). Variability of sugar content of seed of *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* serb. and Zucco. *Agronomy Journal*, 66(2), 239-240.
- [16] Bellaloui, N., Smith, J. R., Gillen, A. M., Ray, J. D. (2011). Effects of maturity, genotypic background, and temperature on seed mineral composition in near-isogenic soybean lines in the early soybean production system. *Crop Science*, 51(3), 1161-1171.
- [17] Dragičević, D. V., Perić, A. V., Srebrić, B. M., Žilić, M. S., Mladenović Drinić, D. S. (2010). Some nutritional and anti-nutritional factors of ZP soya bean varieties. *Journal of Agricultural Sciences* 55(2), 141-146.
- [18] Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4), 401-436.
- [19] Giada, M. L. R. (2013). Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In Morales-González, J. A. (Ed.), *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - a role for antioxidants*. (pp. 87-112). InTech.
- [20] Lee, Y. S., Lorenzo, B. J., Koufis, T., Reidenberg, M. (1996). Grapefruit juice and its flavonoids inhibit 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 59(1), 62-71.
- [21] Gaulton, A., Bellis, L. J., Bento, A. P., Chambers, J., Davies, M., Hersey, A., Light, Y., McGlinchey, S., Michalovich, D., Al-Lazikani, B., Overington, J. P. (2012). ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic*

- Acids Research*, 40(D1) D1100-D1107.
- [22] Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453-464.
- [23] Matern, V., Lüer, P., Kreuzsch, D. (1999). Biosynthesis of coumarins. In: Barton, D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Sankawa, V. (Eds.), *Comprehensive natural products chemistry: polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives*. (pp. 623-637). Amsterdam: Elsevier Science.
- [24] Pratt, D. E., Hudson, B. J. F. (1990). Natural antioxidant not exploited commercially. In: Hudson, B. J. F. (Ed.), *Food antioxidants*. (pp. 171-180). London: Elsevier Applied sciences.
- [25] Adlercreutz, H., Mazur, W. (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Annals of Medicine*, 29, 95-120.
- [26] Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: new precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3178-3186.
- [27] Thompson, L. U., Robb, P., Serraino, M., Cheung, F. (1991). Mammalian lignan production from various foods. *Nutrition and Cancer*, 16, 43-52.
- [28] Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., García-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., Espín, J. C. (2013). Resveratrol in primary and secondary prevention of cardiovascular disease: a dietary and clinical perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1290, 37-51.
- [29] Liu, Y., Ma, W., Zhang, P., He, S., Huang, D. (2014). Effect of resveratrol on blood pressure: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical Nutrition*, 34(1), 27-34.
- [30] Carter, L. G., D'Orazio, J. A., Pearson, K. J. (2014). Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. *Endocrine-Related Cancer*, 21(3), 209-225.
- [31] Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). *Fruit phenolics*. CRC Press, Florida, USA.
- [32] Schuster, B., Herrmann, K. (1985). Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid

- derivatives in soft fruits. *Phytochemistry*, 24(11), 2761-2764.
- [33] Haddock, E. A., Gupta, R. K., Al-Shafi, S. M. K., Layden, K., Haslam, E., Magnolato, D. (1982). The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants: biogenetic and molecular taxonomic considerations. *Phytochemistry*, 21, 1049-1062.
- [34] Harborne, J. B. (1995). The Flavonoids: Advances in Research Since 1986. *Journal of Chemical Education*, 72(3), A73.
- [35] Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- [36] Strack, D. (1997). Phenolic metabolism. In: Dey, P. M., Harborne, J. B. (Eds.), *Plant Biochemistry*. (pp. 387-416). London, UK: Academic Press.
- [37] Bennet, R. C., Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms, Tansley Review No. 72. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- [38] Winkel-Shirley, B. (1999). Evidence for enzyme complexes in the phenylpropanoid and flavonoid pathways. *Physiologia Plantarum*, 107, 142-149.
- [39] Hahlbrock, K., Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40, 347-369.
- [40] Maas, J. L., Galletta, G. J., Wang, S. Y. (1992). Ellagic acid enhancement in strawberries. In: Bills, D. D., Kung, S. D. (Eds.), *Biotechnology and Nutrition*. (pp. 345-362). Storeham, USA: Butterworth-Heinemann.
- [41] Wallace, G., Fry, S. C. (1994). Phenolic components of the plant cell wall. *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
- [42] Britton G. (1983). *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- [43] Halliwell B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, 9, 1-32.
- [44] Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- [45] Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S.

- S., Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *Japi*, 52(794804), 4.
- [46] Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*, 82(2), 291-295.
- [47] Lee, S. J., Yan, W., Ahn, J. K., Chung, I. M. (2003) Effects of year, site, genotype and their interactions on various soybean isoflavones. *Field Crops Research*, 81, 181-192.
- [48] Wei, Q., Jone, W., Fang, T. (2004). Study on isoflavones isomers contents in Taiwan's soybean and GM soybean. *Journal of Food and Drug Analysis* 12, 324-331.
- [49] Taie, H. A. A., El-Mergawi, R., Radwan, S. (2008). Isoflavonoids, flavonoids, phenolic acids profiles and antioxidant activity of soybean seeds as affected by organic and bioorganic fertilization. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 4, 207-213.
- [50] Amarowicz, R., Carle, R., Dongowski, G., Durazzo, A., Galensa, R., Kammerer, D., Maiani, G., Piskula, M. K. (2009). Influence of postharvest processing and storage on the content of phenolic acids and flavonoids in foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 151-183.
- [51] Yue, X., Abdallah, A. M., Xu, Z. (2010). Distribution of isoflavones and antioxidant activities of soybean cotyledon, coat and germ. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 795-806.
- [52] Heiniö, R. L., Katina, K., Wilhelmson, A., Myllymäki, O., Rajamäki, T., Latva-Kala, K., Liukkonen, K. H., Poutanen, K. (2003). Relationship between sensory perception and flavour-active volatile compounds of germinated, sourdough fermented and native rye following the extrusion process. *LWT-Food Science and Technology*, 36(5), 533-545.
- [53] Katina, K., Laitila, A., Juvonen, R., Liukkonen, K.H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Åman, P., Poutanen, K. (2007). Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food microbiology*, 24(2), 175-186.
- [54] Park, Y. H., Alenscar, S. M., Aguiar, C. L., Mascrenhas, H. A. A., Scamparini, A. R. P. (2002). Conversion of malonyl  $\beta$ -glucoside isoflavones found in some

- cultivars of Brazilian soybeans. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22, 130-135.
- [55] Ribeiro, M. L. L., Mandarino, J. M. G., Carrao-Panizzi, M. C., De Oliveira, M. C. N., Campo C. B. H., Nepomuceno A. L., Ida, E. I. (2007). Isoflavone content and  $\beta$ -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 19-24.
- [56] Cho, K. M., Ha, T. J., Lee, Y. B., Seo, W. D., Kim, J.Y., Ryu, H. W., Jeong, S.H., Kang, Y. M., Lee J.H. (2013). Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours. *Journal of functional foods*, 5(3), 1065-1076.
- [57] Žilić, S., Akilloğlu, H. G., Serpen, A., Perić, V., Gökmen, V. (2013). Comparisons of phenolic compounds, isoflavones, antioxidant capacity and oxidative enzymes in yellow and black soybeans seed coat and dehulled bean. *European Food Research and Technology*, 237, 409-418.
- [58] Mega, J. A., Lorenz, K. (1974). Gas-liquid chromatography separation of the free phenolic acid fractions in various oilseed protein sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 797-802.
- [59] Kim, S. H., Song, H. K., Ahn, J. K., Kim, J. T., Hahn, J. S., Chung, I. M. (2004). Changes of Phenol Compounds according to Storing Years in Soybean. *Korean Journal of Crop Science*, 49(2), 82-88.
- [60] Ávila, M. R., Braccini, A. L., Scapim, C. A., Mandarino, J. M. G., Albrecht, L. P., Bazo, G. L., Cabral, Y. C. F. (2011). Effect of storage period on isoflavone content and physiological quality of conventional and transgenic soybean seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 33(1), 149-161.
- [61] Kunitz, M. (1945). Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. *Science*, 101(2635), 668-669.
- [62] Birk, Y. (1985) The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International journal of peptide and protein research*, 25, 113-131.
- [63] Habib, H., Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(3), 68-85.
- [64] Dragičević, V., Nikolić, B., Živković, S., Waisi, H., Đurović, S., Jovanović, V.,

- Kravić, N., Dodig, D. (2016). The Effect of non-standard foliar fertilizers on harvest and quality of grain of barley. *5th International Symposium in Agricultural Sciences AgroReS* (pp. 63).
- [65] Bilyeu, K.D., Zeng, P., Coello, P., Zhang, Z.J., Krishnan, H.B., Bailey, A., Beuselink, P.R., Polacco, J.C. (2008). Quantitative conversion of phytate to inorganic phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant physiology*, 146(2), 468-477.
- [66] Dos Santos, C. V., Rey, P. (2006). Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in plant science*, 11(7), 329-334.
- [67] Kobrehel, K., Yee, B. C., Buchanan, B. B. (1991). Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of alpha-amylase and trypsin inhibitor proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 266(24), 16135-16140.
- [68] Malenčić, D., Popović, M., Miladinović, J. (2007). Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. *Molecules*, 12(3), 576-581.
- [69] Mulder, G. J. (1838). Sur la composition de quelques substances animales. *Bulletin des Sciences Physiques et Naturelles en Néerlande*, 104-131.
- [70] Jeličić, M. (2012). Povezanost dužine epitopa i uređenosti delova proteina. Master rad, Matematički Fakultet, Univerzitet U Beogradu.
- [71] Branden, C., Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure*. Taylor & Francis.
- [72] Voet, D., Voet, J. G. (2005). Chapter 8. Three-Dimensional structures of proteins. In *Biochemistry*. (3<sup>rd</sup> ed), Wiley.
- [73] Nelson, D. L., Cox, M. M. (2005). *Lehninger Principles of Biochemistry. Fourth edition*. W. H. Freeman & Company
- [74] Osborne, T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*. (pp154). 2<sup>nd</sup> ed., Longmans, Green and Co., London.
- [75] Kinsella, J. E. (1979). Functional properties of soy proteins. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(3), 242.
- [76] Panthee, D. R., Kwanyuen, P., Sams, C. E., West, D. R., Saxton, A. M., Pantalone, V. R. (2004). Quantitative trait loci for  $\beta$ -conglycinin (7S) and glycinin (11S) fractions of soybean storage protein. *Journal of the American*



- Oil Chemists' Society*, 81(11), 1005-1012.
- [77] Barać, M., Stanojević, S., Jovanović, S., Pešić, M. (2004). Soy protein modification-a review. *Acta periodica technologica*, 35, 1-280.
- [78] Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S. N., Bawa A. S. (2008). Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 14-28.
- [79] Berk, Z. (1992) Technology of Production of Edible Flours and Protein Products from Soybeans. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 97, 178.
- [80] Wolf, W. J. (1970). Soybean proteins.Their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 969-976.
- [81] Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H. Y., Stillman, R. J., Shay, N. F., Erdman, J. W. (1998). Soy Protein and Isoflavones: Their Effects on Blood Lipids and Bone Density in Post-menopausal Women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 1375-1379.
- [82] Sagara, M., Kanda, T., NJelekera, M., Teramoto, T., Armitage, L, Birt, N., Birt, C., Yamori, Y. (2004). Effects of Dietary Intake of Soy Protein and Isoflavones on Cardiovascular Disease Risk Factors in High Risk, Middle-Aged Men in Scotland. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(1), 85-91.
- [83] Bonin, M. (2016). Uticaj procesnih parametara na enzimsku hidrolizu pšeničnog gluten. Master rad, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- [84] Waterman, P. Mole, S. (1994). Analysis of Phenolic Plant Metabolites. In *Ecological Methods and Concepts*. Wiley-Blackwell Scientific Publications.
- [85] Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313-7352.
- [86] Sun, J., Chu, Y-F., Wu, X., Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), 7449-7454.
- [87] Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268-3295.
- [88] Fazary, A. E., Ju, Y.H. (2007). Feruloyl esterases as biotechnological tools:

- current and future perspectives. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 39(11), 811-828.
- [89] Krygier, K., Sosulski, F., Hogge, L. (1982). Free, esterified and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 330-334.
- [90] Verma, B., Hucl, P., Chibbar, R. N. (2009). Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions. *Food Chemistry*, 116, 947-954.
- [91] Kim, K.H., Tsao, R., Yang, R., Cui, S.W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466-473.
- [92] Mussatto, S. I., Dragone, G., Roberto, I. C. (2007). Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 231-237.
- [93] White, B. L., Howard, L. R., Prior, R. L. (2010). Release of bound procyanidins from cranberry pomace by alkaline hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(13), 7572-7579.
- [94] Nardini, M., Cirillo, E., Natella, F., Mencarelli, D., Comisso, A., Scaccini, C. (2002). Detection of bound phenolic acids: Prevention by ascorbic acid and ethylenediaminetetraacetic acid of degradation of phenolic acids during alkaline hydrolysis. *Food Chemistry*, 79, 119-124.
- [95] Peričin, D., Radulović-Popović, Lj., Vaštag, Ž., Mađarev-Popović, S., Trivić, S. (2009). Enzymatic hydrolysis of protein isolate from hull-less pumpkin oil cake: Application of response surface methodology. *Food Chemistry*, 115, 753-757.
- [96] Ross, K. A., Beta, T., Arntfield, S. D. (2009). A comparative study on the phenolic acids identified and quantified in dry beans using HPLC as affected by different extraction and hydrolysis methods. *Food Chemistry*, 113(1), 336-344.
- [97] Landbo, A. K., Meyer, A. S. (2001). Enzyme-assisted extraction of antioxidative phenols from black currant juice press residues (*Ribes nigrum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(7), 3169-3177.
- [98] Zheng, Y., Pan, Z., Zhang, R., Jenkins, B. M. (2009). Kinetic modeling for

- enzymatic hydrolysis of pretreated creeping wild ryegrass. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(6),1558-1569.
- [99] Alibhai, Z., Mondor, M., Moresoli, C., Ippersiel, D., Lamarche, F. (2006). Production of soy protein concentrates/isolates: traditional and membrane technologies. *Desalination*, 191, 351-358.
- [100] Wanyo, P., Siriamornpun, S., Meeso, N. (2009). Changes in phenolic compounds, antioxidant and physical properties of mulberry tea influenced by intensity of far-infrared radiation. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 6(4), 470-479.
- [101] Lee, S. C., Kim, J. H., Jeong, S. M., Kim, D. R., Ha, J. U., Nam, K. C., Ahn, D. U. (2003). Effect of far-infrared radiation on the antioxidant activity of rice hulls. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(15), 4400-4403.
- [102] Kannan, V. (2011). Extraction of Bioactive Compounds from Whole Red Cabbage and Beetroot using Pulsed Electric Fields and Evaluation of their Functionality. Dissertations, Theses, & Student Research in Food Science and Technology, University of Nebraska – Lincoln.
- [103] Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67, 21-33.
- [104] Reverchon, E., De Marco, I. (2006). Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38, 146-166.
- [105] Abbas, K. A., Mohamed, A., Abdulmir, A. S., Abas, H. A. (2008). A review on supercritical fluid extraction as new analytical method, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4, 345-353.
- [106] Norhuda, I., Jusoff, K. (2009). Supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) as a clean technology for palm kernel oil extraction. *Journal Of Biochemical Technology*, 1, 75-78.
- [107] Asl, A. H., Khajenoori, M. (2013). Subcritical water extraction. In: Hironori, N. (Ed.), *Mass Transfer-Advances in sustainable energy and environment oriented numerical modeling*. IntechOpen.
- [108] Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction- An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research.

- Pharmacology Review*, 1(1), 7-18.
- [109] Jokić, S., Cvjetko-Bubalo, M., Božić, Đ., Fabek, S., Toth, N., Vorkapić-Furač, J., Radojčić-Redovniković, I. (2012). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 2613-2619.
- [110] Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M. A., Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted extraction of the main phenolic compounds in flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18(4), 275-282.
- [111] Gallo, M., Ferracane, R., Graziani, G., Ritieni, A., Fogliano, V. (2010). Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, 15(9), 6365-6374.
- [112] Chiremba, C., Rooney, L. W., Beta, T. (2012). Microwave-assisted extraction of bound phenolic acids in bran and flour fractions from sorghum and maize cultivars varying in hardness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18), 4735-4742.
- [113] Mason, T.J. (1998). Power ultrasound in food processing—the way forward. In: Povey, M. J. W., Mason, T. J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing*. (pp. 22-25). Thomson Science, London, UK.
- [114] Donya, M., Radford, M., ElGuindy, A., Firmin, D., Yacoub, M. H. (2014). Radiation in medicine: Origins, risks and aspirations. *Global Cardiology Science and Practice*, 4, 437-448.
- [115] Lorimer, J. P., Mason, T. J. (1987). Sonochemistry. Part 1-the physical aspects. *Chemical Society Reviews*, 16, 239-274.
- [116] McClements, J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6, 293-299.
- [117] Delgado-Povedano, M. M., Luque de Castro, M. D. (2013). Ultrasound-assisted analytical emulsification-extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 1-13.
- [118] Folin, O., Ciocalcuteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-650.
- [119] Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W.,

- Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- [120] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [121] Appel, H. M., Govenor, H. L., D'ascenzo, M., Siska, E., Schultz, J. C. (2001). Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *Journal of chemical ecology*, 27(4), 761-778.
- [122] Escarpa, A., González, M. C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427(1), 119-127.
- [123] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30.
- [124] Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4976-4982.
- [125] Benzie, I. F., Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- [126] Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutrition research*, 23(12), 1719-1726.
- [127] Sánchez-González, I., Jiménez-Escrig, A., Saura-Calixto, F. (2005). In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chemistry*, 90(1-2), 133-139.
- [128] Szöllősi, R., Varga, I. S. I. (2002). Total antioxidant power in some species of Labiatae: adaptation of FRAP method. *Acta Biologica Szegediensis*, 46(3-4), 125-127.

- [129] Cao, G., Alessio, H. M., Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free radical biology and medicine*, 14(3), 303-311.
- [130] Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(10), 4619-4626.
- [131] Prior, R.L., Hoang, H.A., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(11), 3273-3279.
- [132] Prior, R. L., Lazarus, S. A., Cao, G., Muccitelli, H., Hammerstone, J. (2001). Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium Spp.*) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1270-1276.
- [133] Yanagida, A., Shoji, T., Kanda, T. (2002). Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 1972-1975.
- [134] Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*, 52, 6532-6538.
- [135] Ruiz, D., Egea, J., Gil, M. I., Tomas-Barberan, F. A. (2005). Characterization and quantitation of phenolic compounds in new apricot (*Prunus armeniaca* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9544-9552.
- [136] Anttonen, M. J., Karjalainen, R.O. (2006). High-performance liquid chromatography analysis of black currant (*Ribes nigrum* L.) fruit phenolics grown either conventionally or organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7530-7538.
- [137] Lin, L. Z., Harnly, J.M. (2007). A screening method for the identification of glycosylated flavonoids and other phenolic compounds using a standard analytical approach for all plant materials. *Journal of Agricultural and Food*

- Chemistry*, 55, 1084-1096.
- [138] McCallum, J. L., Yang, R., Young, J. C., Strommer, J. N., Tsao, R. (2007). Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixedmode ion-exchange reversed-phase column. *Journal of Chromatography A*, 1148, 38-45.
- [139] Harris, C. S., Burt, A. J., Saleem, A., Le, P. M., Martineau, L. C., Haddad, P. S., Bennett, S. A., Arnason, J. T. (2007). A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis*, 18, 161-169.
- [140] Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A., Lopez-Hernandez, J., Ferraces-Casais, P., Lage-Yusty, M. A. (2007). Analysis of non-anthocyanin phenolic compounds in wine samples using high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 30, 1262-1266.
- [141] Mertz, C., Cheynier, V., Gunata, Z., Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616-8624.
- [142] Pawlowska, A. M., Oleszek, W., Braca, A. (2008). Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3377-3380.
- [143] Sakakibara, H., Honda, Y., Nakagawa, S., Ashida, H., Kanazawa, K. (2003). Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 571-581.
- [144] Downey, M. O., Rochfort, S. (2008). Simultaneous separation by reversed-phase high performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *Journal of Chromatography A*, 1201, 43-47.
- [145] Hayase, F., Kato, H. (1984). Antioxidative components of sweet potatoes. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 30(1), 37-46.
- [146] Kumar, S. D., Kumar, H. D. R. (2017). Importance of RP-HPLC in Analytical



- Method Development- A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(12), 4626-4633.
- [147] Ziakova, A., Brandsteterova, E. (2003). Validation of HPLC determination of phenolic acids present in some Lamiaceae family plants. *Journal of Liquid Chromatography*, 26, 443-453.
- [148] Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I., Zagnoni, I. (2003). Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5226-5231.
- [149] Fanali, C., Dugo, L., Rocco, A. (2013). Nano-liquid chromatography in nutraceutical analysis: determination of polyphenols in bee pollen. *Journal of Chromatography A*, 1313, 270-274.
- [150] Marko-Varga, G. A. (1993). Liquid chromatographic determination of phenols and substituted derivatives in water samples. *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, 13, 225-271.
- [151] Lee, H. S., Widmer, B. W. (1996). Phenolic Compounds. In: Nollet, L.M.L. (Ed.), *Handbook of Food Analysis*. (pp. 821-894). Marcel Dekker, New York.
- [152] Robards, K., Antolovich, M. (1997). Analytical chemistry of fruit bioflavonoids: a review. *Analyst*, 122(2), 11R-34R.
- [153] Delage, E., Baron, G. B., Drilleau, J-F. (1991). High-performance liquid chromatography of the phenolic compounds in the juice of some French cider apple varieties. *Journal of Chromatography A*, 555(1-2), 125-136.
- [154] Torres, A. M., Mau-Lastovicka, T., Rezaaiyan, R. (1987). Total phenolics and high-performance liquid chromatography of phenolic acids of avocado. *Journal of agricultural and food chemistry*, 35(6), 921-925.
- [155] Ribereau-Gayon, P. (1972). *Plant Phenolics*. New York, USA; Hafner.
- [156] Pussayanawin, V., Wetzel, D. L. (1987). High-performance liquid chromatography determination of ferulic acid in wheat milling fractions as a measure of bran contamination. *Journal of Chromatography A*, 391, 243-255.
- [157] Dass C. (2001). *Principles and practice of biological mass spectrometry*. Ed.N.Y.J. Wiley.
- [158] Hoffmann E. D., Strooband V. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and*



- Applications*, 3rd Ed. Wiley, N.Y.
- [159] Chernetsova, E., Morlock E. G. (2011). Ambient desorption ionization mass spectrometry (DART, DESI) and its bioanalytical applications. *Bioanalytical Reviews*, 3(1), 1-9.
- [160] Chernetsova, E. S., Ovcharov, M. V., Khomyakov, Y. Y., Bochkov, P. O., Varlamov, A. V. (2011). The use of DART mass spectrometry for express confirmation of empirical formulas of heterocyclic compounds. *Russian Chemical Bulletin*, 59, 2014-2015.
- [161] Wang, L., Weller, C. L. (2006). Recent Advances in Extraction of Nutraceuticals from Plants. *Trends in Food Science and Technology*, 17(6), 300-312.
- [162] Luthria, D. L., Mukhopadhyay, S., Krizek, D. T. (2006). Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(8), 771-777.
- [163] Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- [164] Vuletić, M., Hadži-Tašković Šukalović, V., Marković, K., Kravić, N., Vučinić, Ž., Maksimović, V. (2014). Differential response of antioxidative systems of maize (*Zea mays* L.) roots cell walls to osmotic and heavy metal stress. *Plant Biology*, 16(1), 88-96.
- [165] Pajak, P., Socha, R., Gałkowska, D., Roznowski, J., Fortuna, T. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300-306.
- [166] Milos, M., Makota, D. (2012). Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. *Food Chemistry*, 131, 296-299.
- [167] Cervellati, R., Höner, K., Furrow, S. D., Neddens, C., Costa, S. (2002). The Briggs-Rauscher reaction as a test to measure the activity of antioxidants. *Helvetica Chimica Acta*, 84, 3533-3547.
- [168] Magomya, A. M., Kubmarawa, D., Ndahi, J. A., Yebpella, G. G. (2014).

- Determination of plant proteins via the Kjeldahl method and amino acid analysis: A comparative study. *International Journal of Scientific and Technology Research* 3(4), 68-72.
- [169] Merrill, A. L. (1973). *Energy value of foods* (Vol. 74). DIANE Publishing.
- [170] Olson, B., Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 48(1), 3.4.1-3.4.29.
- [171] Waterborg, J., Matthews, H. (1984). The Lowry method for protein quantitation. *Methods in Molecular Biology*, 1, 1-3.
- [172] Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B., Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62(6), 595-601.
- [173] Amponsah, A., Nayak, B. (2016). Effects of microwave and ultrasound assisted extraction on the recovery of soy proteins for soy allergen detection. *Journal of food science*, 81(11), T2876-T2885.
- [174] Karki, B., Lamsal, B. P., Jung, S., van Leeuwen, J. H., Pometto, A. L., Grewell, D., Khanal, S. K. (2010). Enhancing protein and sugar release from defatted soy flakes using ultrasound technology. *Journal of Food Engineering*, 96(2), 270-278.
- [175] Malik, M. A., Sharma, H. K., Saini, C. S. (2017). High intensity ultrasound treatment of protein isolate extracted from dephenolized sunflower meal: Effect on physicochemical and functional properties. *Ultrasonics Sonochemistry*, 39, 511-519.
- [176] Yildiz, G. (2018). Physicochemical Properties of Soy Protein Concentrate Treated with Ultrasound at Various Amplitudes. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(4), 133-139.
- [177] Kadam, S. U., Tiwari, B. K., Alvarez, C., Donnell C. P. O. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 46, 60-67.
- [178] Kinsella, J. E., Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: A survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7, 219-280.
- [179] Vojdani, F. (1996). Solubility. In: Hall, G. M. (Ed.), *Methods of Testing Protein*

- Functionality*. (pp. 11–60). Blackie Academic & Professional: London, UK.
- [180] Pearce, K. N., Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- [181] Kajdžanoska, M., Petreska, J., Stefova, M. (2011). Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5272-5278.
- [182] Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55.
- [183] Shahidi, F., Yeo, J. D. (2016). Insoluble-Bound Phenolics in Food. *Molecules*, 21, 1216-1238.
- [184] Luthria, D. L., Pastor-Corrales, M. A. (2006). Phenolic acids content of fifteen dry edible bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *Journal of food composition and analysis*, 19(2-3), 205-211.
- [185] Cheng, A., Yan, H., Han, C., Chen, X., Wang, W., Xie, Ch., Qu, J., Gong, Z., Shi, X. (2014). Acid and alkaline hydrolysis extraction of non-extractable polyphenols in blueberries: optimisation by response surface methodology. *Czech Journal of Food Sciences*, 32, 218-225.
- [186] Peng, H., Li, W., Li, H., Zeng, D., Zhang, B. (2017). Extractable and non-extractable bound phenolic compositions and their antioxidant properties in seed coat and cotyledon of black soybean (*Glycine max* (L.) merr). *Journal of Functional Foods*, 32, 296-312.
- [187] Verardo, V., Riciputi, Y., Garrido-Frenich, A., Caboni, M. F. (2015). Short communication: Determination of free and bound phenolic compounds in soy isoflavone concentrate using a PFP fused core column. *Food Chemistry*, 185, 239-244.
- [188] Rezaei, S., Rezaei, K., Haghghi, M., Labbafi, M. (2013). Solvent and solvent to sample ratio as main parameters in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from apple pomace. *Food Science and Biotechnology*, 22(5), 1269-1274.
- [189] Kim, M. Y., Jang, G. Y., Lee, Y., Li, M., Ji, Y. M., Yoon, N., Lee, S. H., Kim, K. M., Lee, J., Jeong, H. S. (2016). Free and bound form bioactive compound

- profiles in germinated black soybean (*Glycine max* L.). *Food Science and Biotechnology*, 25(6), 1551-1559.
- [190] Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F., Collina, S. (2006). Microwave-assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound-assisted extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1125, 147-151.
- [191] Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A., Abdely, C. (2008). Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. *Comptes Rendus Biologies*, 331(11), 865-873.
- [192] Li, H., Tsao, R., Deng, Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Canadian journal of plant science*, 92(6), 1101-1111.
- [193] Persson, J.A., Wennerholm, M., O'Halloran, S. (2008). *Handbook for Kjeldahl Digestion*. Fourth Edition, Publisher: FOSS, DK-3400 Hilleroed, Denmark.
- [194] Martinez, K., Sanchez, C. C. (2016). Improved Functionality of Foamed WPI Solutions by Ultrasound Application. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 2(2), 79-84.
- [195] Lakemond, C. M. M., De Jongh, H. H. J., Hessing, M., Gruppen, H., Voragen, A. G. J. (2000). Soy glycinin: influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1985-1990.
- [196] Garti, N., Lutz, R. (2004). Emulsions: Structure stability and interactions. In: Petsev, D. (Ed.), *Interface Science and Technology*. Elsevier Academic Press.
- [197] Higuera-Barraza, O. A., Del Toro-Sanchez, C. L., Ruiz-Cruz, S., Márquez-Ríos, E. (2016). Effects of high-energy ultrasound on the functional properties of proteins. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 558-562.
- [198] Stefanović, A. (2017). Optimizacija enzimskih postupaka za dobijanje hidrolizata proteina belanceta kao komponenata funkcionalne hrane primenom tehnologije ultrazvuka visokog intenziteta. Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- [199] Yanjun, S., Jianhang, C., Shuwen, Z., Hongjuan, L., Jing, L., Lu, L., Uluko, H., Yanling, S., Wenming, C., Wupeng, G., Jiaping, L. (2014). Effect of power ultrasound pre-treatment on the physical and functional properties of reconstituted milk protein concentrate. *Journal of Food Engineering*, 124, 11-18.
- [200] Zhu, Z., WeiduoZhu, W., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Lu, J., Decker, E. A., McClements, D. J. (2018). Effects of sonication on the physicochemical and functional properties of walnut protein isolate. *Food Research International*, 106, 853-861.
- [201] Stefanović, A. B., Jovanović, J. R., Dojčinović, M. B., Lević, S. M., Nedović, V. A., Bugarski, B. M., Knežević-Jugović, Z. D. (2017). Effect of the controlled high-intensity ultrasound on improving functionality and structural changes of egg white proteins. *Food and Bioprocess Technology*, 10, 1224-1239.
- [202] Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. *Journal of Food Engineering*, 93(4), 386-393.
- [203] Hu, H., Fan, X., Zhou, Z., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., Pan, S., Zhu, L. (2013). Acid-induced gelation behavior of soybean protein isolate with high intensity ultrasonic pre-treatments. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 187-195.
- [204] Vinatoru, M., Mason, T. J., Calinescu I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159-178.
- [205] Caprita, A., Caprita, R. (2010). Modification of the soluble protein content of heat-processed soybean flour. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2), 98-101.
- [206] Zayas, J. F. (2012). *Functionality of proteins in food*. Springer Science & Business Media.
- [207] Esaka, M., Susuki, K., Kubota, K. (1987). Effects of microwave heating on lipoxygenase and trypsin inhibitor activities and water absorption in winged-bean seeds. *Journal of Food Science*, 52,1738-1739.
- [208] Hafez, Y. S., Singh, G. (1983). Effect of microwave heating on nutritional

- quality of soybeans. *Nutrition Reports International*, 28, 413-421.
- [209] Pour-El, A., Nelson, S. O., Peck, E. E. (1981). Biological properties of VHF- and microwave heated soybeans. *Journal of Food Science*, 466, 880-886.
- [210] Yoshida, H. Kajimoto, G. (1988). Effect of microwave treatment on trypsin inhibitor and molecular species of triglycerides in soybean. *Journal of Food Science*, 53,1756-1760.
- [211] Aludatt, M. H., Rababah, T., Ereifej, K., Alli, I. (2013). Distribution, antioxidant and characterisation of phenolic compounds in soybeans, flaxseed and olives. *Food Chemistry*, 139, 93-99.
- [212] Danilčenko, H., Dabkevičius, Z., Jarienė, E., Tarasevičienė, Ž., Televičiūtė, D., Tamošiūnas, A., Jeznach, M. (2017). The effect of stinging nettle and field horsetail extracts on the synthesis of biologically active compounds in germinated leguminous and guinoa seed. *Zemdirbyste-Agriculture*, 104, 337-344.
- [213] Dromantiene, R., Pranckietiene, I., Šidlauskas, G., Pranckietis, V. (2013). Changes in technological properties of common wheat (*Triticum aestivum* L.) grain as influenced by amino acid fertilizers. *Zemdirbyste-Agriculture*, 100, 57-62.
- [214] Verkleij, F.N. (2012). Seaweed extracts in agriculture and horticulture: a Review. *Biological Agriculture and Horticulture*, 8, 309-324.
- [215] Hepler, K. P. (2005). Calcium: A Central regulator of plant growth and development. *Plant Cell*, 17, 2142-2155.
- [216] Murayama, D., Sakashita, Y., Yamazawa, T., Nakata, K., Shinbayashi, Y., Palta, J., Tani, M., Yamauchi, H., Koaze, H. (2016). Effect of Calcium Fertilization on Processing Properties and Storability of Frozen French Fries. *Food Science and Technology Research*, 22, 451-459.
- [217] Konopka, I., Tańska, M., Faron, A., Stępień, A., Wojtkowiak, K. (2012). Comparison of the phenolic compounds, carotenoids and tocopherols content in wheat grain under organic and mineral fertilization regimes. *Molecules*, 17, 12341-12356.
- [218] Liu, X.Q., Lee, K. S. (2012). Effect of mixed amino acids on crop growth. In: Aflakpui G. (Ed.), *Agricultural Science*. (pp. 119-158). IntechOpen.

## ***7. PRILOZI***

## Prilog 1



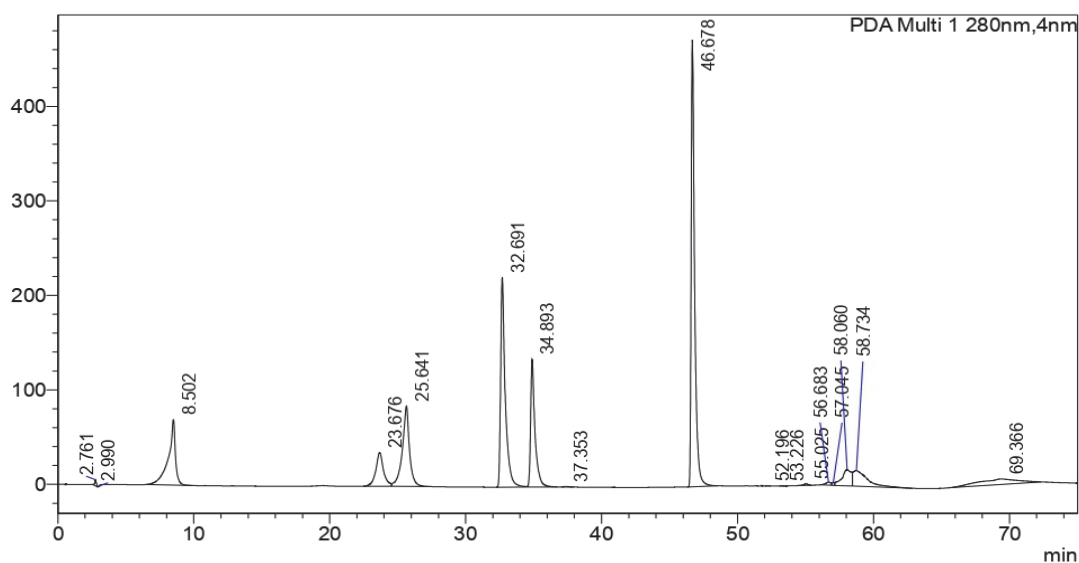
## Analysis Report

## &lt;Sample Information&gt;

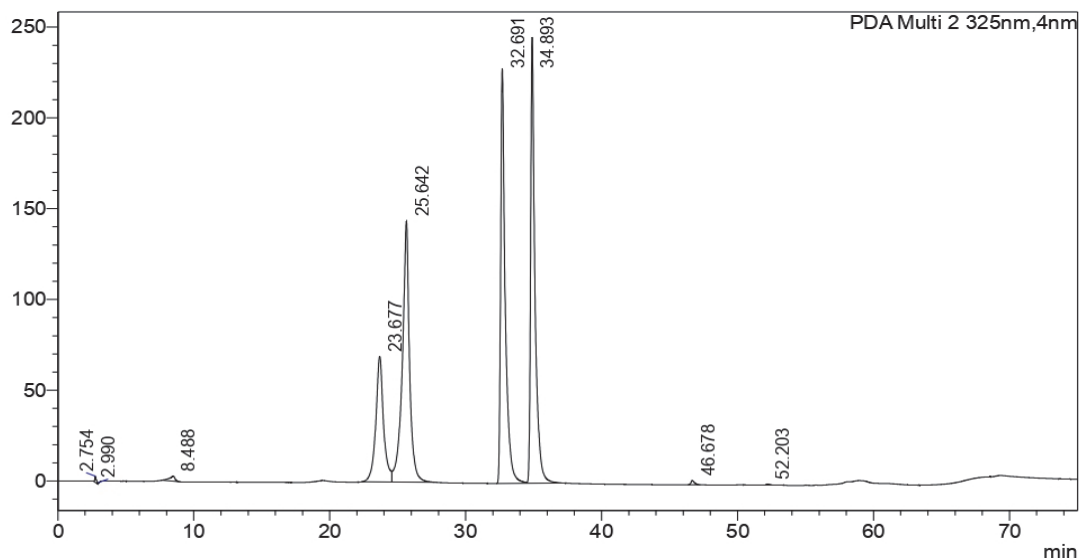
Data Filename : R1 E1.lcd

## &lt;Chromatogram&gt;

mAU



mAU

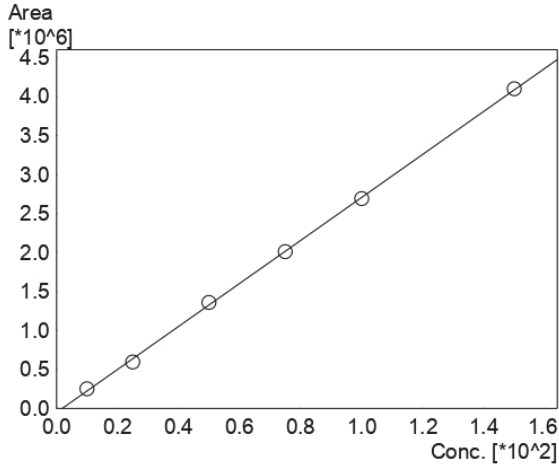


**Slika P 1.1.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  za izabranu mobilnu fazu i gradijent eluiranja, sa vremenom eluiranja i odzivima za pojedinačne polifenolne kiseline, praćene na dve talasne dužine



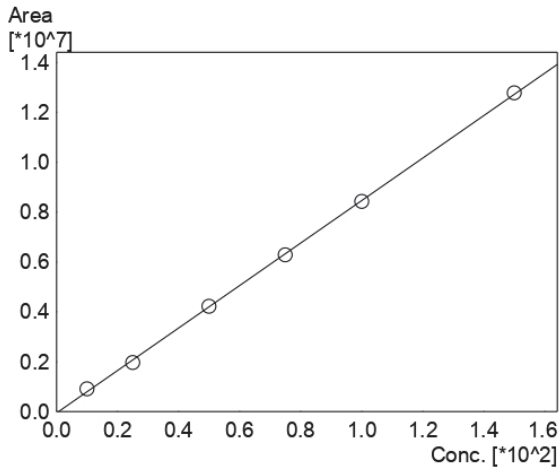
Prilog 2

ID# : 1  
 Name : GALNA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=27590.0 \cdot x-51161.3$   
 Rr1=0.9998127 Rr2=0.9996254 RSS=3.803853e+009  
 MeanRF: 2.619270e+004 RFSD: 1.399754e+003 RFRSD: 5.344062  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



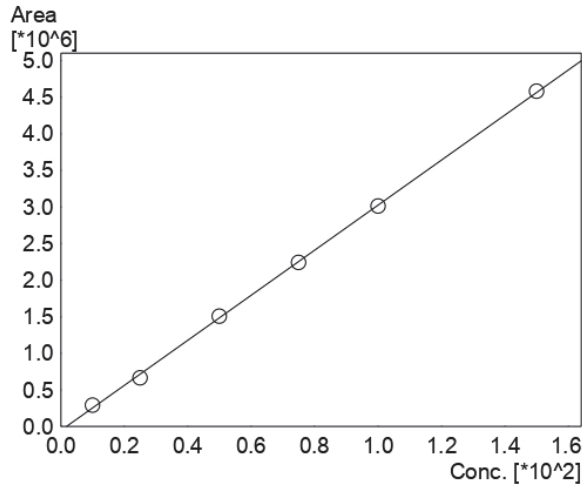
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	251081	251081
2	25	596097	596097
3	50	1358019	1358019
4	75	2011272	2011272
5	100	2691165	2691165
6	150	4097288	4097288

ID# : 2  
 Name : CIMETNA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=85209.0 \cdot x-60275.5$   
 Rr1=0.9998297 Rr2=0.9996595 RSS=3.297441e+010  
 MeanRF: 8.455874e+004 RFSD: 4.052937e+003 RFRSD: 4.793043  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



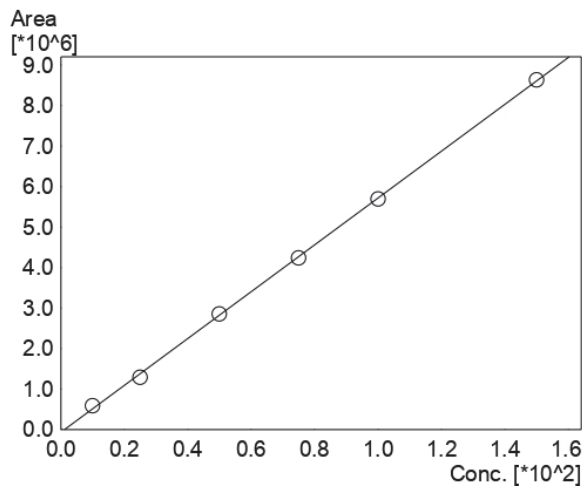
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	912671	912671
2	25	1963999	1963999
3	50	4219176	4219176
4	75	6282927	6282927
5	100	8420315	8420315
6	150	12774955	12774955

ID# : 3  
 Name : HLOGENA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=30814.5 \cdot x - 56589.1$   
 Rr1=0.9997907 Rr2=0.9995813 RSS=5.302528e+009  
 MeanRF: 2.940904e+004 RFSD: 1.475928e+003 RFRSD: 5.018622  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



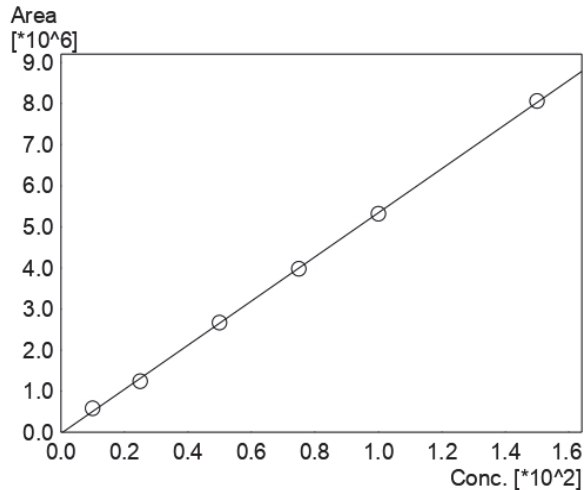
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	292828	292828
2	25	662844	662844
3	50	1506145	1506145
4	75	2241847	2241847
5	100	3011576	3011576
6	150	4579164	4579164

ID# : 4  
 Name : KAFENA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=57813.8 \cdot x - 67544.3$   
 Rr1=0.9998106 Rr2=0.9996213 RSS=1.688252e+010  
 MeanRF: 5.641118e+004 RFSD: 2.501220e+003 RFRSD: 4.433909  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



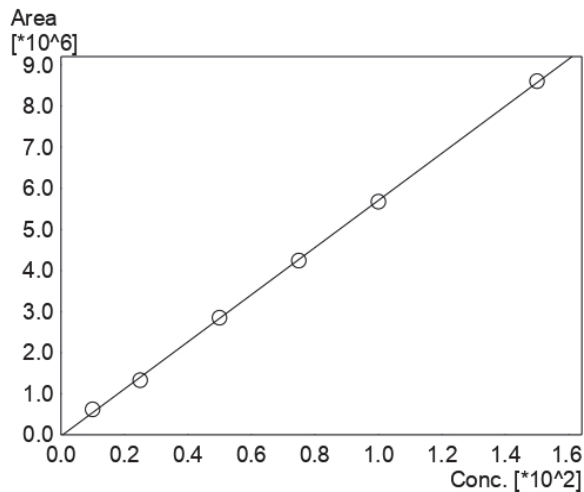
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	587539	587539
2	25	1288619	1288619
3	50	2857774	2857774
4	75	4240224	4240224
5	100	5694493	5694493
6	150	8629750	8629750

ID# : 5  
 Name : KUMARNA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=53728.4*x-31202.2$   
 Rr1=0.9998293 Rr2=0.9996587 RSS=1.314070e+010  
 MeanRF: 5.350614e+004 RFSD: 2.704541e+003 RFRSD: 5.054637  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	581162	581162
2	25	1241247	1241247
3	50	2669636	2669636
4	75	3975070	3975070
5	100	5314516	5314516
6	150	8059799	8059799

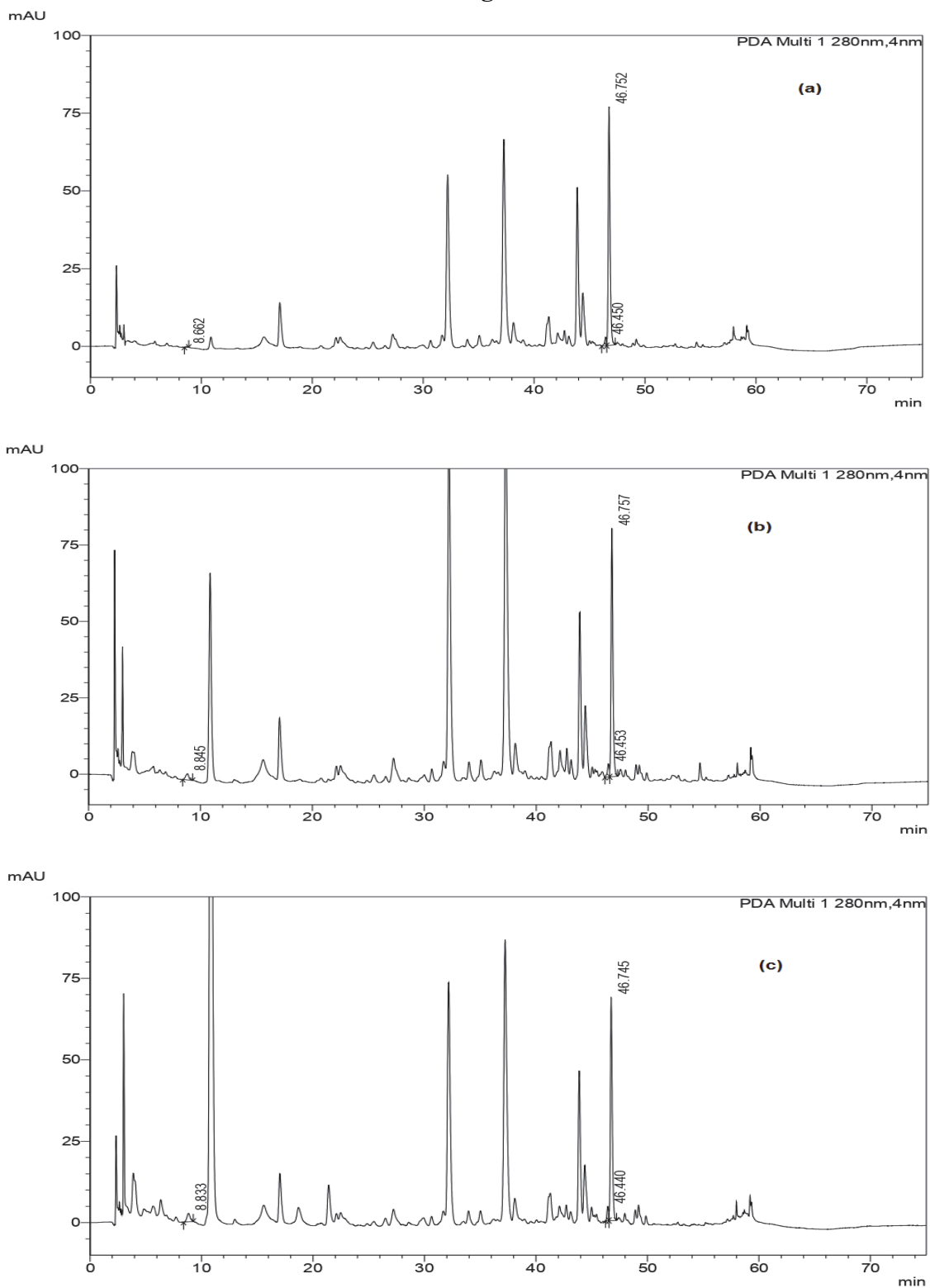
ID# : 6  
 Name : FERULNA  
 Quantitative Method : External Standard  
 Function :  $f(x)=57358.5*x-35391.3$   
 Rr1=0.9998290 Rr2=0.9996580 RSS=1.500627e+010  
 MeanRF: 5.707140e+004 RFSD: 2.832996e+003 RFRSD: 4.963951  
 FitType : Linear  
 ZeroThrough : Not Through  
 Weighted Regression : None  
 Detector Name : PDA



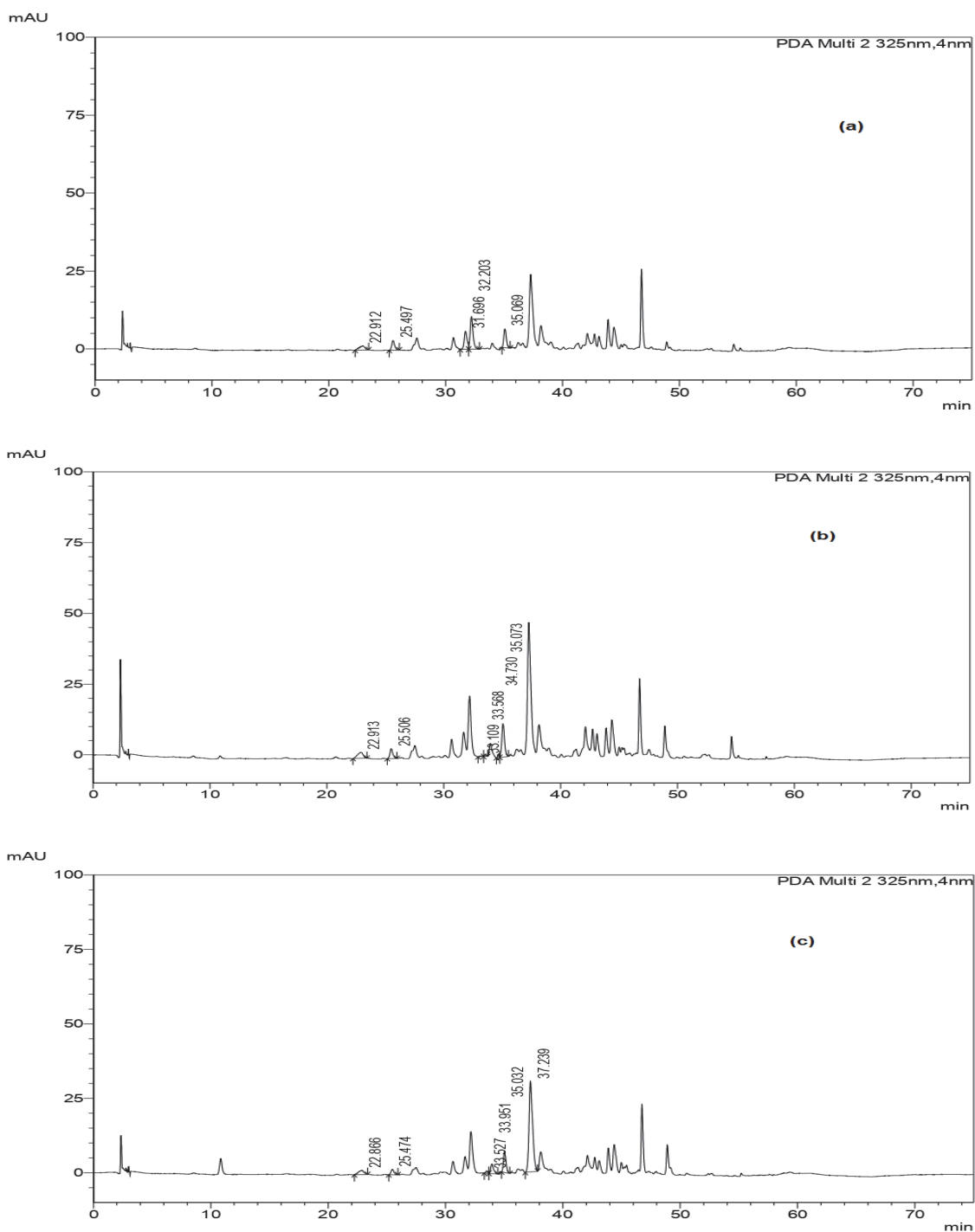
#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	10	618904	618904
2	25	1325626	1325626
3	50	2845710	2845710
4	75	4241276	4241276
5	100	5668294	5668294
6	150	8604811	8604811

**Slika P 2.1.** Kalibracione prave šest polifenolnih kiselina u koncentracionom opsegu 10-150  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

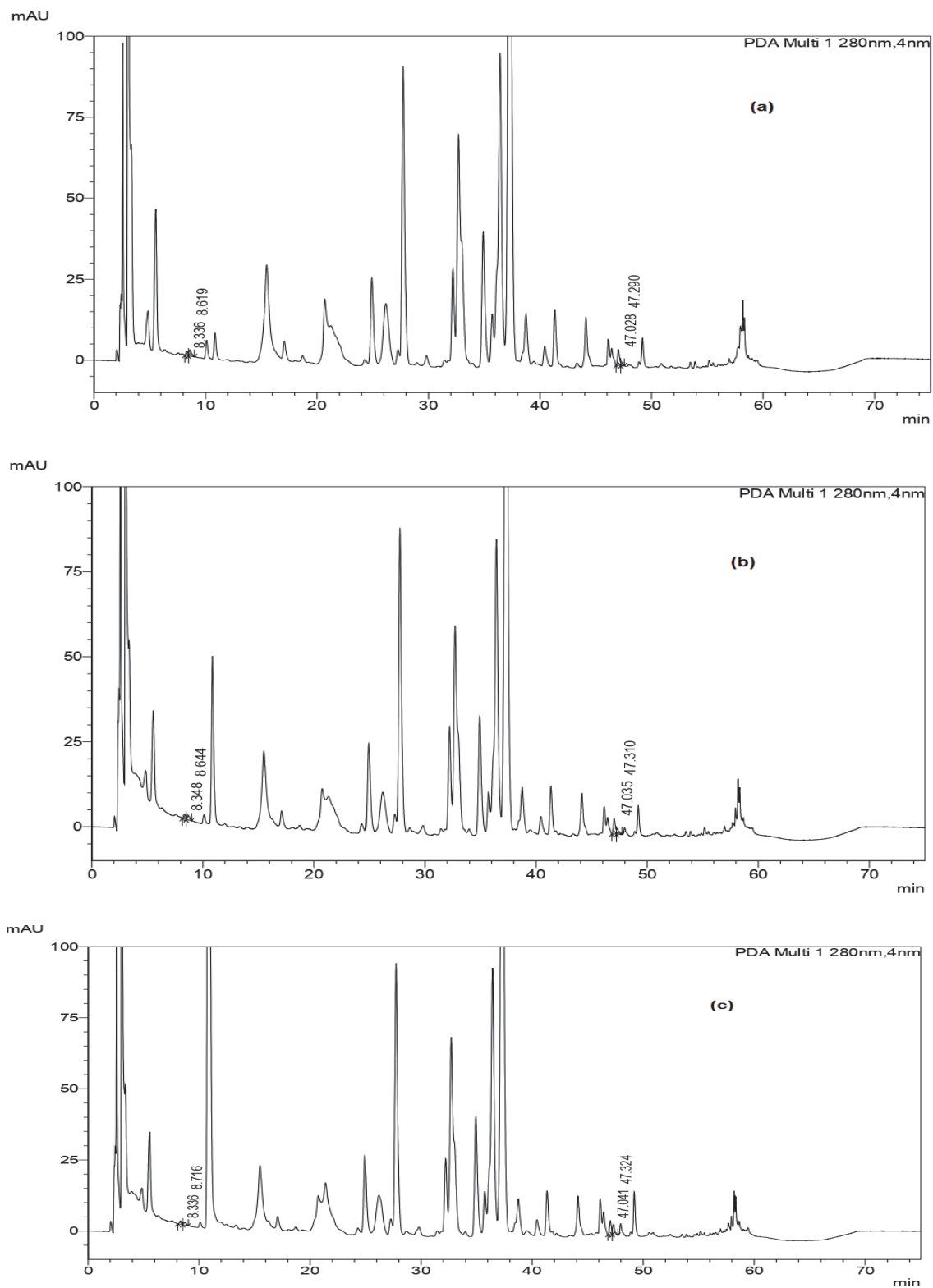
## Prilog 3



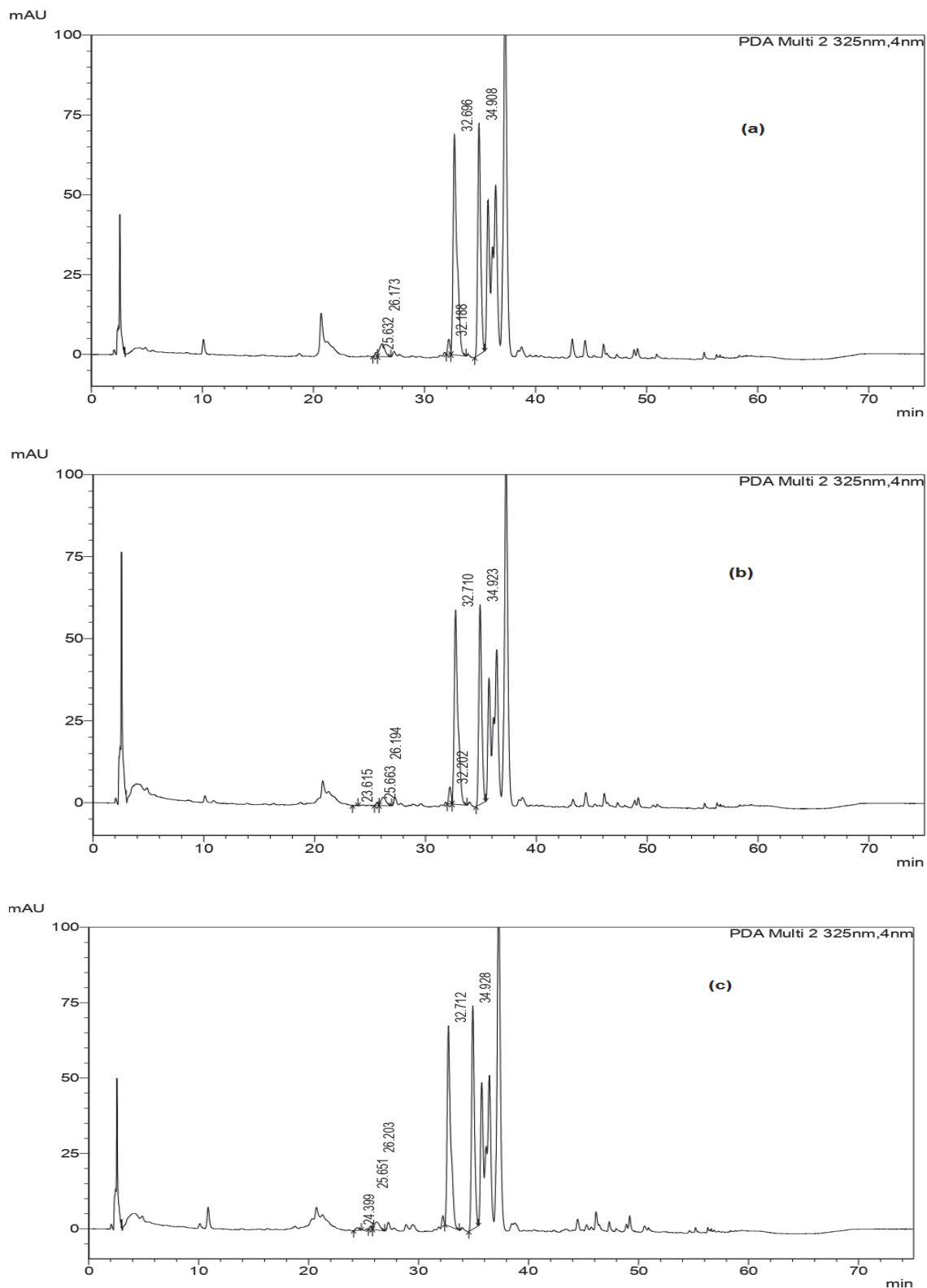
**Slika P 3.1.** Hromatogrami slobodnih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR



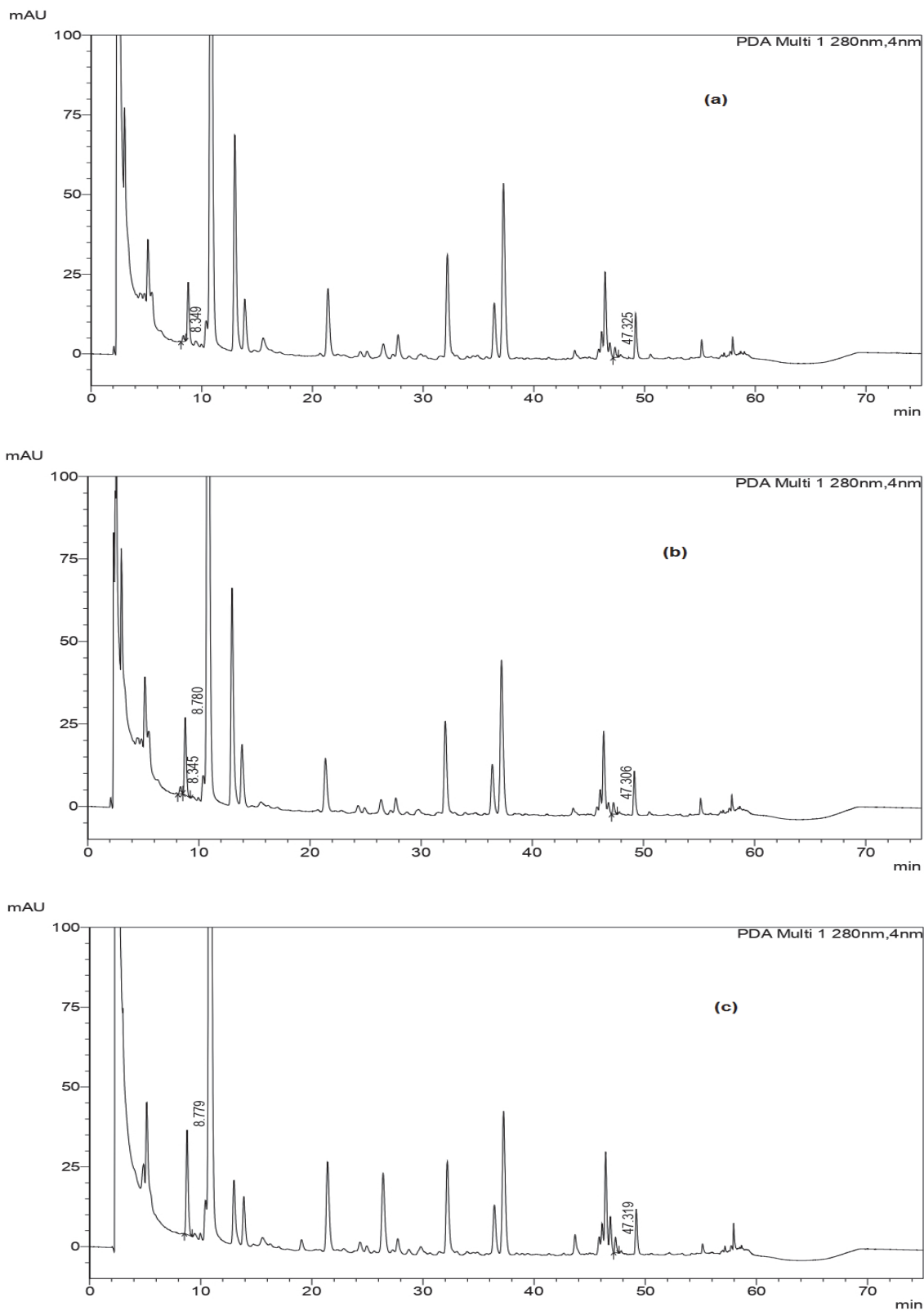
**Slika P 3.2.** Hromatogrami slobodnih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR



**Slika P 3.3.** Hromatogrami esterifikovanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

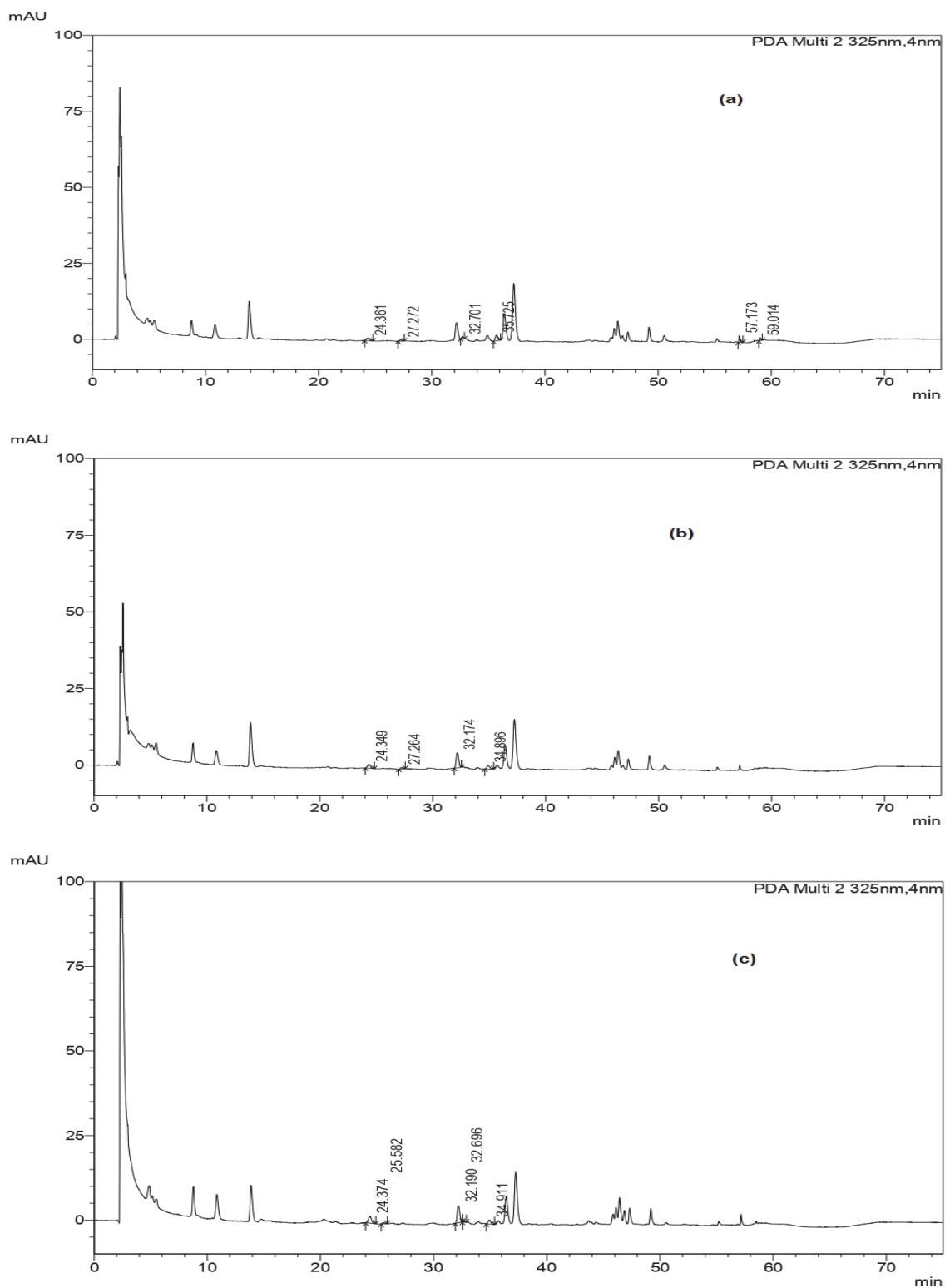


**Slika P 3.4.** Hromatogrami esterifikovanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR



**Slika P 3.5.** Hromatogrami vezanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR





**Slika P 3.6.** Hromatogrami vezanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

## Prilog 4

Results for: Tabela. 4.2. galna i *trans*-cimetna.MTWGeneral Linear Model: sadržaj *trans*-cimetne kiseline versus metoda

Factor	Type	Levels	Values
metoda	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for sadržaj *trans*-cimetne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
metoda	2	27093	27093	13546	1013,51	0,000
Error	6	80	80	13		
Total	8	27173				

S = 3,65592    R-Sq = 99,70%    R-Sq(adj) = 99,61%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

metoda	N	Mean	Grouping
3	3	290,3	A
2	3	179,0	B
1	3	169,4	C

Means that do not share a letter are significantly different.

## General Linear Model: sadržaj ferulne kiseline versus metoda

Factor	Type	Levels	Values
metoda	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for sadržaj ferulne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
metoda	2	71823	71823	35912	2755,00	0,000
Error	6	78	78	13		
Total	8	71902				

S = 3,61042    R-Sq = 99,89%    R-Sq(adj) = 99,85%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

metoda	N	Mean	Grouping
3	3	440,4	A
1	3	436,3	A
2	3	248,9	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela. 4.3. galna.MTW****General Linear Model: sadržaj galne kiseline - 2 min versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	2	15; 30

Analysis of Variance for sadržaj galne kiseline - 2 min, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	1	8,1433	8,1433	8,1433	8,43	0,044
Error	4	3,8644	3,8644	0,9661		
Total	5	12,0077				

S = 0,982904    R-Sq = 67,82%    R-Sq(adj) = 59,77%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
15	3	37,9	A
30	3	35,6	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**General Linear Model: sadržaj galne kiseline - 5 min versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	2	15; 30

Analysis of Variance for sadržaj galne kiseline - 5 min, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	1	0,3314	0,3314	0,3314	2,62	0,181
Error	4	0,5056	0,5056	0,1264		
Total	5	0,8370				

S = 0,355528    R-Sq = 39,59%    R-Sq(adj) = 24,49%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
15	3	36,2	A
30	3	35,7	A

Means that do not share a letter are significantly different.

**General Linear Model: sadržaj galne kiseline - 10 min versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	2	15; 30

Analysis of Variance for sadržaj galne kiseline - 10 min, using Adjusted SS for

Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	1	0,45375	0,45375	0,45375	8,90	0,041
Error	4	0,20400	0,20400	0,05100		
Total	5	0,65775				

S = 0,225832    R-Sq = 68,99%    R-Sq(adj) = 61,23%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
30	3	38,5	A
15	3	38,0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**General Linear Model: sadržaj galne kiseline -15 min versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	2	15; 30

Analysis of Variance for sadržaj galne kiseline - 15 min, using Adjusted SS for

Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	1	0,57660	0,57660	0,57660	12,04	0,026
Error	4	0,19160	0,19160	0,04790		
Total	5	0,76820				

S = 0,218861    R-Sq = 75,06%    R-Sq(adj) = 68,82%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
30	3	39,2	A
15	3	38,6	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Results for: Tabela 4.5. *trans*-cimetna u vremenu 2 min.MTWGeneral Linear Model: sadržaj *trans*-cimetne kiseline versus temperatura

Factor	Type	Levels	Values
temperatura	fixed	4	55; 65; 75; 85

Analysis of Variance for sadržaj *trans*-cimetne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
temperatura	3	97822	97822	32607	154208,43	0,000
Error	8	2	2	0		
Total	11	97824				

S = 0,459837    R-Sq = 100,00%    R-Sq(adj) = 100,00%

Unusual Observations for sadržaj *trans*-cimetne kiseline

Obs	sadržaj trans-cimetne kiseline	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
11	273,970	273,160	0,265	0,810	2,16 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

temperatura	N	Mean	Grouping
85	3	273,2	A
75	3	245,4	B
55	3	90,9	C
65	3	69,9	D

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.6. kafena kis-snaga.MTW****General Linear Model: sadržaj kafene kiseline versus snaga mikrotalasa**

Factor	Type	Levels	Values
snaga mikrotalasa	fixed	4	25; 50; 75; 100

Analysis of Variance for sadržaj kafene kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
snaga mikrotalasa	3	6,6590	6,6590	2,2197	7,96	0,009
Error	8	2,2308	2,2308	0,2789		
Total	11	8,8898				

S = 0,528062    R-Sq = 74,91%    R-Sq(adj) = 65,50%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

snaga mikrotalasa	N	Mean	Grouping
75	3	39,1	A
50	3	37,9	A B
100	3	37,8	A B
25	3	37,0	B

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.8. TPC****General Linear Model: sadržaj slobodnih fenola versus pretretman (1-MTR, 2-UZS, 3-UZK)**

Factor	Type	Levels	Values
pretretman	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for sadržaj slobodnih fenola, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pretretman	2	3,8801	3,8801	1,9400	66,54	0,000
Error	6	0,1749	0,1749	0,0292		
Total	8	4,0550				

S = 0,170750    R-Sq = 95,69%    R-Sq(adj) = 94,25%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

pretretman	N	Mean	Grouping
1	3	5,2	A
2	3	4,7	B
3	3	3,7	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.9. DPPH.MTW****General Linear Model: DPPH versus pretretman (1-MTR, 2-UZS, 3-UZK)**

Factor	Type	Levels	Values
pretretman	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for DPPH, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pretretman	2	113967	113967	56984	87329,72	0,000
Error	6	4	4	1		
Total	8	113971				

S = 0,807782    R-Sq = 100,00%    R-Sq(adj) = 100,00%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

pretretman	N	Mean	Grouping
1	3	269,8	A
2	3	56,2	B
3	3	12,2	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**General Linear Model: FRAP versus pretretman (1-MTR, 2-UZS, 3-UZK)**

Factor	Type	Levels	Values
pretretman	fixed	3	1; 2; 3

Analysis of Variance for FRAP, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
pretretman	2	341,54	341,54	170,77	867,58	0,000
Error	6	1,18	1,18	0,20		
Total	8	342,72				

S = 0,443659    R-Sq = 99,66%    R-Sq(adj) = 99,54%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

pretretman	N	Mean	Grouping
1	3	37,2	A
2	3	30,8	B
3	3	22,1	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.12 proteini.MTW****General Linear Model: Sadržaj proteina-rastvor versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	3	15; 20; 30

Analysis of Variance for Sadržaj proteina-rastvor, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	2	74,664	74,664	37,332	67,19	0,000
Error	6	3,334	3,334	0,556		
Total	8	77,998				

S = 0,745401    R-Sq = 95,73%    R-Sq(adj) = 94,30%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
20	3	67,2	A
30	3	62,5	B
15	3	60,2	C

Means that do not share a letter are significantly different.

**General Linear Model: Sadržaj proteina-talog versus jačina sonde**

Factor	Type	Levels	Values
jačina sonde	fixed	3	15; 20; 30

Analysis of Variance for Sadržaj proteina talog, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
jačina sonde	2	21,755	21,755	10,877	79,61	0,000
Error	6	0,820	0,820	0,137		
Total	8	22,575				

S = 0,369639    R-Sq = 96,37%    R-Sq(adj) = 95,16%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

jačina sonde	N	Mean	Grouping
30	3	27,1	A
15	3	24,1	B
20	3	23,6	B

Means that do not share a letter are significantly different.



**Results for: Tabela 4.13. kumarna.MTW****General Linear Model: sadržaj slobodne p-kumarne kiseline versus đubrivo**

Factor Type Levels Values  
 đubrivo fixed 6 1; 2; 3; 4; 5; 6

1-kontrola; 2-Vegard; 3-Eko-fus; 4-Calbit-C; 5-Cropmax; 6-Zircon

Analysis of Variance for sadržaj p-kumarne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
đubrivo	5	18637,3	18637,3	3727,5	2340,89	0,000
Error	12	19,1	19,1	1,6		
Total	17	18656,4				

S = 1,26187 R-Sq = 99,90% R-Sq(adj) = 99,85%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

đubrivo	N	Mean	Grouping
5	3	306,8	A
6	3	303,8	A B
4	3	301,4	B
2	3	281,3	C
3	3	261,6	D
1	3	215,6	E

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.14. kumarna.MTW****General Linear Model: sadržaj esterifikovane p-kumarne kiseline versus đubrivo**

Factor Type Levels Values  
 đubrivo fixed 6 1; 2; 3; 4; 5; 6

1-kontrola; 2-Vegard; 3-Eko-fus; 4-Calbit-C; 5-Cropmax; 6-Zircon

Analysis of Variance for sadržaj p-kumarne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
đubrivo	5	45363,9	45363,9	9072,8	7033,89	0,000
Error	12	15,5	15,5	1,3		
Total	17	45379,4				

S = 1,13572 R-Sq = 99,97% R-Sq(adj) = 99,95%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

đubrivo	N	Mean	Grouping
2	3	342,8	A
6	3	268,4	B
4	3	264,6	C
3	3	247,4	D
5	3	223,0	E
1	3	177,1	F

Means that do not share a letter are significantly different.

**Results for: Tabela 4.15. kumarna.MTW****General Linear Model: sadržaj vezane p-kumarne kiseline versus đubrivo**

Factor Type Levels Values  
đubrivo fixed 6 1; 2; 3; 4; 5; 6

1-kontrola; 2-Vegard; 3-Eko-fus; 4-Calbit-C; 5-Cropmax; 6-Zircon

Analysis of Variance for sadržaj p-kumarne kiseline, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
đubrivo	5	96,374	96,374	19,275	88,23	0,000
Error	12	2,621	2,621	0,218		
Total	17	98,995				

S = 0,467392 R-Sq = 97,35% R-Sq(adj) = 96,25%

Grouping Information Using Tukey Method and 95,0% Confidence

đubrivo	N	Mean	Grouping
4	3	49,3	A
6	3	48,7	A
5	3	47,0	B
1	3	45,1	C
3	3	44,6	C
2	3	42,7	D

Means that do not share a letter are significantly different.

## Prilog 5

## Spisak skraćenica

**HPLC** - tečna hromatografija visokih performansi ili tečna hromatografija pod visokim pritiskom (na engl. *High Pressure Liquid Chromatography*)

**LDL**- lipoprotein niske gustine - (na engl. *Low-Density Lipoprotein*)

**OH** - hidroksilna grupa

**OCH<sub>3</sub>** - metoksi grupa

**CA4H** - *trans*-cinamat-4-monooksigenaza

**CHS** - halkon-sintaza

**4CL** - hidrokicimetna koenzim A ligaza

**PAL** - fenilalaninska amonijak-liaza

**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina

**BHA** - butil-hidroksianizol (na engl. *butylated hydroxyanisole*)

**BHT** - butil-hidroksitoluen (na engl. *butylated hydroxytoluene*)

**TBHQ** - terc-butil-hidrohinon (na engl. *tert-butylhydroquinone*)

**NAD(P)H** - Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

**ROS** - slobodni radikali kiseonika (na engl. *reactive oxygen species*)

**RNS** - slobodni radikali azota (na engl. *reactive nitrogen species*)

**FIR** - daleko infracrveno zračenje (na engl. *Far Infrared Radiation*)

**PEF** - impulsno električno polje (na engl. *Pulsed Electric Field technology*)

**SFE** - ekstrakcija superkritičnim fluidima (na engl. *Solid Phase Extraction*)

**FC**-Folin-Čokalteov reagens (na engl. *Folin-Ciocalteu*)

**FD** - Folin-Denisov reagens (na engl. *Folin-Denis*)

**TPC** - sadržaj ukupnih fenola (na engl. *Total Phenol Content*)

**FRAP** - sposobnost redukcije gvožđa Fe<sup>3+</sup> do Fe<sup>2+</sup> (na engl. *Ferric Ion Reducing Antioxidant Power*)

**DPPH** - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

**ORAC** - merilo antioksidativnog kapaciteta (na engl. *Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

**MTR** - mikrotalasni reaktor

**UZS** - ultrazvučna sonda

**UZK** - ultrazvučno kupatilo

**PTFE** - politetrafluoroetilen

**SDS** - natrijum-dodecil-sulfat

**TROLOX** - 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilna kiselina

**TPTZ** - 2,4,6-tripiridil-s-triazin

**BR** - Brigs-Raušer (na engl. *Briggs-Rauscher*)

**IAE** - indeks aktivnosti emulzije

**ISE** - indeks stabilnosti emulzije

**PCA** - analiza glavnih komponenti (na engl. *Principal Component Analysis*)

## Prilog 6

### Spisak slika

#### UVOD

**Slika 1.1.** Soja: zrele mahune soje pred berbu (levo); semena soje različite boje zrna (desno)

#### TEORIJSKI DEO

**Slika 2.1.** Osnovna struktura flavonoida

**Slika 2.2.** Opšte formule i nazivi najzastupljenijih hidroksibenzoevih kiselina

**Slika 2.3.** Opšte formule i nazivi najzastupljenijih hidroksicimetnih kiselina

**Slika 2.4.** Hemijska struktura nekih najznačajnijih predstavnika polifenolnih jedinjenja

**Slika 2.5.** Šematski prikaz međusobne povezanosti primarnog i sekundarnog metabolizma u biljkama

**Slika 2.6.** Biosinteza hidroksicimetnih kiselina, hidroksibenzoevih kiselina i flavonoida

**Slika 2.7.** Nivoi strukture proteina

**Slika 2.8.** Mikrotalasni reaktor korišćen za pretretman obezmašćenog sojinog brašna

**Slika 2.9.** Spektar elektromagnetnog zračenja

**Slika 2.10.** Ultrazvučni homogenizator Sonoplus, frekvence 20 kHz, ultrazvučna sonda tip VS70T (levo); Ultrazvučni pretretman pripremljenih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna (desno).

**Slika 2.11.** Šema tečnog hromatografa sa standardnim delovima

#### EKSPERIMENTALNI DEO

**Slika 3.1.** Soksletova aparatura za obezmaščivanje sojinog brašna

**Slika 3.2.** Kalibraciona prava galne kiseline u opsegu koncentracija 25-250  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$

**Slika 3.3.** Mehanizam reakcije DPPH radikala sa antioksidansima

**Slika 3.4.** Strukturna formula TROLOX-a

**Slika 3.5.** Kalibraciona prava TROLOX-a u opsegu koncentracija 0-1000  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

**Slika 3.6.** Kalibraciona prava  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  u koncentracionom opsegu od 0 do 750  $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$

**Slika 3.7.** Digestiona jedinica sa uzorcima sojinog brašna pre početka procesa digestije (levo); nakon završenog postupka digestije biljnog materijala (desno)

**Slika 3.8.** Izgled destilacione jedinice korišćene u ovom istraživanju sa pripremljenim uzorkom za destilaciju

**Slika 3.9.** Šematski prikaz Lorijeve metode

**Slika 3.10.** Sprej sušnica B-290 (BÜCHI, Švajcarska) korišćena u ovom istraživanju

**Slika 3.11.** Kalibraciona prava goveđeg seruma albumina (BSA) u koncentracionom opsegu od 0 do 0,5 mg/cm<sup>3</sup>

## REZULTATI I DISKUSIJA

**Slika 4.1.** Zavisnost sadržaja ukupnih fenola od polarnosti rastvarača izražene kao logaritam koeficijenta raspodele, logP

**Slika 4.2.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije 100 µg/cm<sup>3</sup> praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitim gradijentu

**Slika 4.3.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije 100 µg/cm<sup>3</sup> praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitim gradijentu eluiranja

**Slika 4.4.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije 100 µg/cm<sup>3</sup> praćenih na dve talasne dužine pri istoj mobilnoj fazi, a različitim gradijentu eluiranja

**Slika 4.5.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije 100 µg/cm<sup>3</sup> praćenih na dve talasne dužine pri istom gradijentu eluiranja, a različitim mobilnim fazama

**Slika 4.6.** Koncentracija šest polifenolnih kiselina (µg/g s.m.) u različitim frakcijama uzoraka pretretiranih u ultrazvučnom kupatilu (UZK), ultrazvučnom sondom (UZS) i mikrotalasima (MTR)

**Slika 4.7.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina (µg/g s.m.) u različito pretretiranim uzorcima obezmašćenog sojinog brašna (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

**Slika 4.8.** Sadržaj ukupnih fenola (mg GAE/ g s.m.) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

**Slika 4.9.** Antioksidativna aktivnost određena DPPH metodom ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP metodom ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ eq/g s.m.}$ ) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima obezmašćenog sojinog brašna (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

**Slika 4.10.** Rastvorljivost proteinskih izolata u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde pri različitim pH vrednostima

**Slika 4.11.** Uticaj amplitude ultrazvučne sonde na emulgujuća svojstva izolovanih proteina

**Slika 4.12.** Sadržaj proteina ekstrahovanih iz obezmašćenog sojinog brašna i zaostalih u talogu pri konstantnoj amplitudi, a u zavisnosti od vremena sonikacije

**Slika 4.13.** Zavisnost rastvorljivosti izolovanih proteina od vremena sonikacije

**Slika 4.14.** Uticaj vremena sonikacije na emulgujuća svojstva izolovanih proteina soje

**Slika 4.15.** Sadržaj proteina u rastvoru i talogu u zavisnosti od temperature ekstrakcione smeše

**Slika 4.16.** Uticaj temperature mikrotalasnog zračenja na rastvorljivost proteina

**Slika 4.17.** Uticaj temperature na emulgujuća svojstva izolovanih proteina

**Slika 4.18.** Uticaj snage mikrotalasa na efikasnost ekstrakcije proteina u vremenskim intervalima od 2 minuta (levo) i 5 minuta (desno)

**Slika 4.19.** Zavisnost rastvorljivosti izolovanih proteina soje od snage mikrotalasa pri različitim pH vrednostima u vremenskom periodu od (a) 2 minuta i (b) 5 minuta

**Slika 4.20.** Uticaj snage mikrotalasnog zračenja na emulgujuća svojstva izolovanih proteina

**Slika 4.21.** Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima ( $\text{mg GAE/g s.m.}$ ) u zavisnosti od primenjenog folijarnog đubriva

**Slika 4.22.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata biljaka tretiranih različitim đubrivima izražena preko DPPH ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g s.m.}$ ) metode

**Slika 4.23.** Brigs-Raušerovi (Briggs-Rauscher) oscilogrami

**Slika 4.24.** PCA dijagram zavisnosti profila polifenolnih kiselina u semenu soje, od tretmana đubrivima na bazi biljnih ekstrakata (kontrola-C, Vegard-VEG, Eko-Fus-EF, Calbit-C-CAL, Cropmax-CRM, Zircon-ZIR)



**Slika 4.25.** Sadržaj proteina i ulja (% w/w) u semenu soje u zavisnosti od primenjenog folijarnog đubriva (1-kontrola, 2-Vegard, 3-Eko-Fus, 4-Calbit-C, 5-Cropmax and 6-Zircon)

## PRILOZI

**Slika P 1.1.** Hromatogrami mešanog standarda šest polifenolnih kiselina koncentracije  $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  za izabranu mobilnu fazu i gradijent eluiranja, sa vremenom eluiranja i odzivima za pojedinačne polifenolne kiseline, praćene na dve talasne dužine

**Slika P 2.1.** Kalibracione prave šest polifenolnih kiselina u koncentracionom opsegu  $10\text{-}150 \mu\text{g}/\text{cm}^3$

**Slika P 3.1.** Hromatogrami slobodnih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

**Slika P 3.2.** Hromatogrami slobodnih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

**Slika P 3.3.** Hromatogrami esterifikovanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

**Slika P 3.4.** Hromatogrami esterifikovanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

**Slika P 3.5.** Hromatogrami vezanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 280 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

**Slika P 3.6.** Hromatogrami vezanih frakcija polifenolnih kiselina različito pretretiranih uzoraka obezmašćenog sojinog brašna, na talasnoj dužini od 325 nm (a) UZK; (b) UZS; (c) MTR

## Prilog 7

### Spisak tabela

#### TEORIJSKI DEO

**Tabela 2.1.** Podela fenolnih jedinjenja prema broju C atoma u lancu

**Tabela 2.2.** Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i antocijanina u oljuštenom zrnju i opni žute i crne soje

**Tabela 2.3.** Podela globularnih proteina na osnovu rastvorljivosti

**Tabela 2.4.** Približna (aproksimativna) distribucija glavnih komponenta sojinih proteina

**Tabela 2.5.** Funkcionalna svojstva proteina soje i njihova primena u prehrambenoj industriji

#### REZULTATI I DISKUSIJA

**Tabela 4.1.** Sadržaj ukupnih fenola (mg ekv. GK/g s.m.) u obezmašćenom brašnu soje ekstrahovanom različitim ekstrakcionim smešama, određen korišćenjem dva tipa Folinovih reagenasa i vrednosti logaritamskog koeficijenta raspodele jedinjenja u sistemu *n*-oktanol/voda kao mere lipofilnosti rastvarača

**Tabela 4.2.** Sadržaj polifenolnih kiselina u obezmašćenom brašnu soje sorte Laura ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u zavisnosti od načina ekstrakcije

**Tabela 4.3.** Uticaj vremena sonikacije i amplitude ultrazvučne sonde na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g}$  s.m.)

**Tabela 4.4.** Sadržaj polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u ekstraktima iz obezmašćenog sojinog brašna nakon pretretmana ultrazvučnom sondom, praćenog baznom i kiselinskom hidrolizom

**Tabela 4.5.** Uticaj temperature i vremena tretmana mikrotalasima na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g}$  s.m.)

**Tabela 4.6.** Uticaj snage mikrotalasa na ekstrakciju slobodnih polifenolnih kiselina iz obezmašćenog brašna soje ( $\mu\text{g/g}$  s.m.)

**Tabela 4.7.** Sadržaj polifenolnih kiselina ( $\mu\text{g/g}$  s.m.) u obezmašćenom sojinom brašnu nakon pretretmana mikrotalasima i naknadne bazne i kiselinske hidrolize

**Tabela 4.8.** Sadržaj ukupnih fenola po frakcijama (mg GAE/ g s.m.) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

**Tabela 4.9.** Antioksidativna aktivnost po frakcijama određena DPPH metodom ( $\mu\text{mol TE/g s.m.}$ ) i FRAP metodom ( $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ eq/g s.m.}$ ) u ekstraktima dobijenim različitim pretretmanima (MTR, UZS, UZK) praćenim baznom i kiselinskom hidrolizom

**Tabela 4.10.** Sadržaj azota, proteina u obezmašćenom sojinom brašnu i u sirovom zrnu

**Tabela 4.11.** Sadržaj nativnih proteina u brašnu soje u zavisnosti od količine kiseline, soli i katalizatora potrebnih za digestiju uzorka

**Tabela 4.12.** Sadržaj proteina u supernatantu i talogu u zavisnosti od amplitude ultrazvučne sonde

**Tabela 4.13.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u slobodnoj, rastvornoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ ): galna kiselina (GaA), hlorogena kiselina (ChA), kafena kiselina (CaA), *p*-kumarna kiselina (CoA), ferulna kiselina (FeA) i *trans*-cimetna kiselina (TCA)

**Tabela 4.14.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u esterifikovanoj, rastvorljivoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ ): galna kiselina (GaA), hlorogena kiselina (ChA), kafena kiselina (CaA), *p*-kumarna kiselina (CoA), ferulna kiselina (FeA) i *trans*-cimetna kiselina (TCA)

**Tabela 4.15.** Sadržaj šest polifenolnih kiselina u vezanoj, nerastvornoj frakciji obezmašćenog sojinog brašna u zavisnosti od vrste primenjenog folijarnog đubriva ( $\mu\text{g/g s.m.}$ ): galna kiselina (GaA), hlorogena kiselina (ChA), kafena kiselina (CaA), *p*-kumarna kiselina (CoA), ferulna kiselina (FeA) i *trans*-cimetna kiselina (TCA)

## **Prilog 8**

### **BIOGRAFIJA**

Sanja Đurović (rođ. Stojaković) rođena je 26.03.1979. g. u Osijeku, R. Hrvatska. Gimnaziju “Ivo Lola Ribar” završila je u Sremskoj Mitrovici u periodu 1993-1997 g. Osnovne akademske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 1997/1998. godine. Diplomski rad na temu “Ispitivanje uticaja vode na enzimsku sintezu amil-izobutirata u organskim rastvaračima” radila je na Katedri za biohemijско inženjerstvo i biotehnologiju TMF-a pod rukovodstvom prof.dr Zorice Knežević-Jugović. Diplomirala je 2005. godine sa ocenom 10 na diplomskom radu i prosečnom ocenom 8,44 u toku studija. Iste godine upisala je magistarske studije na Tehnološko-metalurškom fakultetu, smer biotehnologija, pod mentorstvom dr Zorice Knežević-Jugović, redovnog profesora. Kandidatkinja je 2006. g. na osnovu odluke Tehnološko-metalurškog fakulteta prešla na doktorske studije. Položila je sve ispite predviđene planom i programom doktorskih studija uključujući i završni ispit. Od decembra 2005. zaposlena je u Institutu za zaštitu bilja i životnu sredinu, Beograd, u Laboratoriji za fitofarmaciju i zaštitu životne sredine, na radnom mestu istraživača-pripravnik, a od 17.03.2008. g. na radnom mestu istraživača-saradnika. 31.01.2017. godine kandidatkinja je izbrana u zvanje stručni savetnik. U periodu od 2006. do danas učesnik je 4 projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (2 BTN 006817 B; TR 20051; TR 31018; TR 31037) i jednog međunarodnog projekta.

Koautor je šest radova u međunarodnim časopisima, jedanaest radova u časopisima nacionalnog značaja i dvadeset dva saopštenja na domaćim i međunarodnim skupovima. Tečno govori engleski jezik i služi se francuskim jezikom.

**Prilog 9**

**Izjava o autorstvu**

Ime i prezime autora Sanja Đurović

broj indeksa 4047/2006

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom

**UTICAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ I  
BIOLOŠKA SVOJSTVA POLIFENOLA I PROTEINA IZ SEMENA ŽUTE SOJE  
RAZLIČITOG POREKLA**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio/la intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Prilog 10**

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Ime i prezime autora Sanja Đurović  
Broj indeksa 4047/2006  
Studijski program Biohemijsko inženjerstvo i biotehnologija  
Naslov rada **UTICAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE NA  
SADRŽAJ I BIOLOŠKA SVOJSTVA POLIFENOLA I  
PROTEINA IZ SEMENA ŽUTE SOJE RAZLIČITOG  
POREKLA**  
Mentor Dr Zorica Knežević-Jugović, redovni profesor

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la radi pohranjenja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog naziva doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis autora

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Prilog 11

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Svetozar Marković" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**UTICAJ RAZLIČITIH POSTUPAKA EKSTRAKCIJE NA SADRŽAJ I  
BIOLOŠKA SVOJSTVA POLIFENOLA I PROTEINA IZ SEMENA ŽUTE SOJE  
RAZLIČITOG POREKLA**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci. Kratak opis licenci je sastavni deo ove izjave).

**Potpis autora**

U Beogradu, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. **Autorstvo.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. **Autorstvo – nekomercijalno.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. **Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. **Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. **Autorstvo – bez prerada.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. **Autorstvo – deliti pod istim uslovima.** Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.