

**НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ  
УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
ТЕХНОЛОШКО-МЕТАЛУРШКИ ФАКУЛТЕТ**

**Предмет:** Реферат о урађеној докторској дисертацији кандидата Сање Б. Ђуровић, дипл. инж. технологије.

Одлуком бр. 35/154 од 11.4.2019. године, именовани смо за чланове Комисије за преглед, оцену и одбрану докторске дисертације кандидата **Сање Б. Ђуровић** под насловом

**„Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла“**

После прегледа достављене Дисертације и других пратећих материјала и разговора са Кандидатом, Комисија је сачинила следећи

**РЕФЕРАТ**

**1. УВОД**

1.1. Хронологија одобравања и израде дисертације

Школске 2005/06 године кандидат **Сања Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, уписала је магистарске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија.

Школске 2006/07 године (26.06.2007.) кандидат **Сања Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, прешла је са магистарских на докторске академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, профил Биохемијско инжењерство и биотехнологија.

У периоду од 02.03.2008. г. до 02.03.2009. г. на основу решења бр. 10/10 од 07.05.2008. кандидату је одобрено мировање због рођења детета.

10.11.2016. - Кандидат **Сања Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије предложила је тему докторске дисертације под називом: „**Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла**“, а Наставно-научно веће Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду усвојило Комисију за оцену научне заснованости предложене теме 24.11.2016. године (бр. одлуке 35/505).

23.2.2017. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета, на основу поднетог реферата комисије, донета је одлука (бр. 35/27) о прихватању предлога теме докторске дисертације **Сање Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, под називом „**Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла**“, а за ментора ове докторске дисертације именована је др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета.

27.3.2017. - На седници Већа научних области техничких наука Универзитета у Београду дата је сагласност на предлог теме докторске дисертације Сање Б. Ђуровић, дипл. инж. технологије, под називом „**Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла**“.

Решењем бр. 141-1 од 28.09.2018. **Сањи Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, одобрено је продужење рока за завршетак докторских студија до краја школске 2018/19 године.

11.4.2019. - На седници Наставно-научног већа Технолошко-металуршког факултета донета је одлука о именовану комисије за оцену и одбрану докторске дисертације **Сање Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, под називом „**Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла**“ (бр. Одлуке 35/154).

## 1.2. Научна област дисертације

Истраживања у оквиру ове дисертације припадају научној области Хемија и хемијска технологија (ужа научна област Хемијска технологија) за коју је матична установа Технолошко-металуршки факултет Универзитета у Београду. За ментора је изабрана др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду која је на основу објављених публикација и искуства компетентна да руководи изработком ове докторске дисертације.

## 1.3. Биографски подаци о кандидату

**Сања Б. Ђуровић** (рођ. Стојаковић) рођена је 26.03.1979. године у Осијеку, Р. Хрватска, где је завршила основну школу. Гимназију “Иво Лола Рибар” завршила је у Сремској Митровици у периоду 1993-1997. године. Основне академске студије на Технолошко-металуршком факултету, Универзитета у Београду, студијски програм Биохемијско инжењерство и биотехнологија уписала је школске 1997/1998. године. Дипломски рад на тему “Испитивање утицаја воде на ензимску синтезу амил-изобутирата у органским растварачима” радила је на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију ТМФ-а под руководством проф. др Зорице Кнежевић-Југовић. Дипломирала је 19.05.2005. године са оценом 10 (десет) на дипломском раду и просечном оценом 8,44 (осам и 44/100) у току студија. Уписала је магистарске студије на Технолошко-металуршком факултету, смер биотехнологија, под менторством др Зорице Кнежевић-Југовић, редовног професора 2005. године. Кандидаткиња је 2006. године, на основу одлуке Технолошко-металуршког факултета прешла на докторске студије. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 9,80 (девет и 80/100) укључујући и Завршни испит са оценом 10 (десет).

Од децембра 2005. године запослена је у Институту за заштиту биља и животну средину, у Београду, у Лабораторији за фитофармацију и заштиту животне средине, на радном месту истраживача-приправника, а од 17.03.2008. године на радном месту истраживача-сарадника. 31.01.2017. године изабрана је у звање стручни саветник. У периоду 2006-2007, ангажована је као учесник на пројекту „Разрада и увођење нових технологија у производњи висококвалитетне хране и сузбијању нових недовољно познатих штетних организама у биљној производњи“ 2 БТН 006817 Б, руководилац пројекта Др Мира Старовић, Министарство просвете, науке и технолошког развоја. У истом периоду учесник је и међународног пројекта „Valorization, sanitation and production of local wines“, у оквиру којег је од 17.09.2006. до 30.09.2006 г. боравила на стручној пракси у Институту „Centro di Ricerca e Sperimentazione in Agricoltura, Basile Caramia“, Бари, Италија, ради усвајања методологије одређивања ократоксина А (ОТА) у вину и соку од грозђа.

У периоду 2008-2011. ангажована је као учесник на пројекту „Оптимизација примене хемијских средстава у заштити биља повећањем ефикасности дијагностичких метода у процени ризика појаве болести, штеточина и корова“ ТР 20051, руководилац пројекта Др Мира Старовић, Министарство просвете, науке и технолошког развоја.

У периоду 2011-2019. ангажована је као учесник на пројекту „Интегрални системи гајења ратарских усева: очување биодиверзитета и плодности земљишта“ ТР 31037, руководилац пројекта Др Милена Симић, Министарство просвете, науке и технолошког развоја.

У периоду 2011-2019. ангажована је као учесник на пројекту „Разрада интегрисаног управљања и примене савремених принципа сузбијања штетних организама у заштити биља“ ТР 31018, руководилац пројекта Др Вељко Гавриловић, Министарство просвете, науке и технолошког развоја.

Поред ангажовања на поменутиим пројектима, у склопу институтских делатности, кандидат Сања Ђуровић ангажована је на пословима анализе пестицида, током процеса њихове регистрације за потребе Министарства пољопривреде, као и приликом обнове регистрације и увоза предметних пестицида у Републику Србију. Кандидат врши и анализе токсиколошки значајних нечистоћа у техничким производима пестицида (за претходно описане намене) и то методама гасне и течне хроматографије (GC, HPLC), као и спектрофотометријским техникама (UV-VIS). Ангажована је и на пословима анализе вештачких ђубрива приликом њихових регистрација за потребе Министарства пољопривреде, као и приликом њиховог увоза у Републику Србију.

Као први аутор и коаутор Сања Ђуровић објавила је укупно један рад у међународном часопису изузетних вредности (M21a), један рад у врхунском међународном часопису (M21), један рад у међународном часопису (M23), три рада у часопису међународног значаја верификованог посебном одлуком (M24), пет радова у водећем часопису националног значаја (M51), три рада у истакнутом часопису националног значаја (M52), један рад у научном часопису (M53), двадесет и три саопштења на скуповима и то: једанаест радова саопштених на међународном скупу штампаних у целини (M33), један рад саопштен на националном скупу штампан у целини (M63), седам радова саопштених на међународном скупу штампаних у изводу (M34) и четири рада саопштена на националном скупу штампана у изводу (M64).

## **2. ОПИС ДИСЕРТАЦИЈЕ**

### 2.1. Садржај дисертације

Докторска дисертација **Сање Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије, написана је на српском језику на 157 страна, садржи 48 слика, 6 једначина, 20 табела и 218 литературних навода. Докторска дисертација састоји се из следећих поглавља: *Увод*, *Теоријски део*, *Експериментални део*, *Резултати и дискусија*, *Закључак* и *Литература*, уз изводе на српском и енглеском језику. На почетку дисертације дат је Резиме на српском и енглеском језику, а на крају дисертације налази се Биографија и три обавезна Прилога: Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије рада и Изјава о коришћењу.

### 2.2. Кратак приказ појединачних поглавља

У *Уводу* је дат кратак осврт на област истраживања и актуелност проблематике у свету. Дата су основна разматрања о значају соје и производа од соје и њиховој употреби у свету и код нас. Дефинисан је предмет истраживања са посебним освртом на садржај полифенола и протеина у сојином брашну и њихове бенефите на људски организам при конзумирању соје. Наведени су основни принципи екстракције биоактивних једињења из биљног материјала, као и неопходност примене одговарајућег неинвазивног претретмана у циљу разарања ћелијског зида и ефикасније екстракције биоактивних једињења из сојиног брашна. Дат је

кратак опис примене ултразвука високог интензитета и микроталаса (примењених и у овој дисертацији) на ефикасност екстракције и побољшање технолошко-функционалних својстава изолованих протеина. На крају увода представљени су циљеви рада.

**Теоријски део** састоји се од шест потпоглавља и то: 1) *Хемијски састав семена соје*; 2) *Полифеноли-основне карактеристике*; 3) *Протеини-основне карактеристике*; 4) *Ефекат соје на здравље људи*; 5) *Методе изоловања полифенола и протеина* и 6) *Методе детекције и квантификације полифенола и протеина*.

У потпоглављу *Хемијски састав семена соје* дат је приказ најзначајнијих једињења присутних у сојином зрну, која је чине махунарком са најповољнијим нутритивним карактеристикама и једном од највише коришћених биљних култура у свету. Укратко је описан и утицај појединих једињења присутних у соји на процесе у људском организму.

У потпоглављу *Полифеноли-основне карактеристике* дата је класификација полифенола, као једне од најраспрострањенијих и најразноврснијих група хемијских једињења уз кратак опис и хемијске структуре најзначајнијих представника сваке појединачне групе. Детаљније су описане две најзаступљеније групе полифенолних једињења у зрну соје, полифенолне киселине и флавоноиди. У наставку су описани основни путеви синтезе полифенола у биљкама и њихов значај и допринос у одбрамбеним механизмима биљака. Различити услови оксидативног стреса као што је интензивно UV-зрачење, механичко оштећење биљног ткива или инфекција биљака паразитима индукују биосинтезу полифенола. Оксидативни стрес доводи до оштећења примарних биомолекула: протеина, липида, нуклеинских киселина и угљених хидрата, што може бити узрок читавог низа поремећаја у метаболизму и изазвати дисфункцију и смрт ћелија. Као такав, оксидативни стрес и слободни радикали (као продукти оксидативног стреса) сматрају се иницијаторима и/или пропаторима болести попут кардиоваскуларних поремећаја, упалних процеса, канцера и дијабетеса. Полифенолна једињења спадају, заједно са алфа-токоферолом и бета-каротеном, у групу неензимских антиоксиданаса, супстанци које, присутне у малим количинама у односу на супстрат, инхибирају или потпуно спречавају његову оксидацију. Значај антиоксиданаса у исхрани и њихова вредност у превенцији кардиоваскуларних болести у последње време нарочито се истражују и разматрају. Успоравање оксидативних процеса у ћелијама услед узимања различитих дијететских суплемената или у храни услед додатака различитих природних и синтетских антиоксиданаса од посебног је значаја. Сматра се да највећу антиоксидативну активност у семену соје испољавају изофлавоноиди, а после њих и полифенолне киселине. Антиоксидативна активност полифенолних киселина је у вези са супституентима, њиховим положајем на ароматичном прстену и структуром бочног низа и расте са порастом броја хидроксилних и метокси група на фенолном прстену.

У наредном потпоглављу *Протеини-основне карактеристике*, укратко је описан сваки од четири нивоа структуре протеина и неколико начина класификације биљних протеина (према сложености, биолошкој функцији, субцелуларној локацији, и др.) од којих ниједна није комплетна, него се међусобно допуњују. У наставку је акценат стављен на протеине соје, који садрже све есенцијалне аминокиселине изузев оних са сумпором у довољној количини тако да прерађевине од соје представљају квалитетну храну. Сојини протеини се користе у исхрани као нутритивни додаци који замењују протеине пореклом из животињских производа као што су млеко, месо и јаја. Главна предност сојиних протеина у поређењу са протеинима из других биљних извора је уравнотежен састав аминокиселина. Описане су главне компоненте сојиних протеина, а затим и својства четири комерцијална протеинска производа од соје. Разматрана су основна технолошко-функционална својства протеина соје уз наглашавање да је растворљивост једно од најважнијих функционалних својстава. Друга својства, као што су способност емулговања, стварања пене, гелирање и др. такође зависе од растворљивости. У многим случајевима, примена сојиних протеина је лимитирана због неусаглашености између њихове растворљивости и других функционалних својстава. Да би се достигле жељене вредности протеини се подвргавају разним физичким, хемијским и

ензимским модификацијама. Примењени поступци узрокују физичке и хемијске промене, а тиме и различита функционална својства протеинских производа од соје. На крају потпоглавља дат је табеларни приказ примене одређених протеинских производа (форми) соје у прехранбеној индустрији, у зависности од њихових функционалних својстава.

У потпоглављу *Ефекат соје на здравље људи* дата су основна сазнања, на основу прегледа литературе о утицају одређених компонената соје на превенцију неких обољења, пре свега кардиоваскуларних и о бенефитима које организму доноси конзумирање соје и производа од соје.

У потпоглављу *Методe изоловања полифенола и протеина* наведени су основни кораци припреме биљног материјала (уситњавање, хомогенизација, обезмашћивање) који претходе екстракцији биоактивних једињења, а затим и најчешће коришћени растварачи и смеше у зависности ов врсте једњења које је потребно екстраховати из биљног материјала. Због комплексности биљног материјала, али и веома велике разноврсности полифенолних једињења, не постоји универзална метода за екстракцију свих група полифенолних једињења. Такође, избор растварача зависи и од сврхе екстракције, односно даље намене екстрахованих полифенола. Соја и сродне махунарке садрже велике количине нерастворних полифенола, тако да екстракцији полифенола претходи њихова хидролиза која има за циљ ослобађање полифенола везаних за структурне јединице ћелијског зида, као што су целулоза, хемицелулоза, лигнин, пектин и др. У наставку су описане три врсте хидролизе полифенола и главни фактори који утичу на степен њихове хидролизе. Иако ензимска хидролиза представља много специфичнији и ефикаснији начин за ослобађање полифенолних једињења, у широј употреби су још увек заступљеније методе базне и киселинске хидролизе. Слично као и код полифенола, и приликом екстракције протеина, избор екстракционог средства зависи од природе протеина које желимо да екстрахујемо. Поред тога, приликом мљења биљног материјала и разарања ћелијског зида може доћи до ослобађања штетних компонената и инхибитора који могу модификовати, инактивирати, преципитирати или деградирати протеине. Због тога су потребне специфичне технике за разарање ћелијских зидова уз истовремену заштиту протеина од ослобођених штетних компонената.

У последњих неколико деценија, истраживања у области екстракционих технологија су се углавном фокусирали на ефикасне и иновативне технике за прераду биљног материјала, као еколошке алтернативе (на енгл. *eco-friendly*) за добијање и пречишћавање биоактивних једињења. Неке од њих, уз предности које испољавају, су описане у наставку потпоглавља, уз детаљан опис екстракције потпомогнуте ултразвуком високог интензитета и микроталасима које су примењене и у овом истраживању. Ултразвук високе јачине ( $10-1000 \text{ W cm}^{-2}$ ) и фреквенције од 20-100 kHz има леталан ефекат на микроорганизме и примењује се приликом чувања хране. Детаљно је описан механизам деловања ултразвучних таласа, и феномена кавитације који се дејством ултразвука јавља, уз истицање да је пренос акустичне енергије кроз супстрат брз и равномеран, што скраћује време третмана и смањује потрошњу енергије. Микроталасно зрачење је нејонизујуће зрачење фреквенције између 300 MHz и 300 GHz. Заснива се на директном дејству таласа на материјале који имају способност да конвертују део електромагнетне енергије у топлоту. Сам процес загревања микроталасима се може објаснити помоћу два феномена, јонске кондукције и ротације дипола. Додатна предност технике је и то што комбинује високу температуру и притисак за оптимално ослобађање биоактивних супстанци уз истовремено разарање ћелијског зида. Бројни литературни подаци показују да се применом микроталаса скраћује време реакције, повећава принос и чистоћа добијених продуката.

У последњем потпоглављу *Методe детекције и квантификације полифенола и протеина* описана је метода за одређивање садржаја укупних фенола уз навођење њених ограничења у зависности од природе биљног материјала. Прегледом литературе, утврдили смо да је ова метода, уз модификације, опште прихваћена за одређивање садржаја укупних фенола у воћу и поврћу. У наставку, наведене су неке од основних метода за одређивање антиоксидативне

активности. Антиоксидативна активност биљног материјала не може се у потпуности описати једном методом, због чињенице да на њу утичу многи фактори (складиштење, услови прераде, услови околине, физиолошки фактори у биљкама). Због тога је прикладно користити неколико метода да би се проценила и упоредила антиоксидативна активност различитих супстанци биљног порекла. Описане су најчешће коришћене хроматографске технике за раздвајање и изоловање полифенолних једињења, са посебним акцентом на течну хроматографију високих перформанси (HPLC), уз наглашавање да се увођењем реверзно-фазних колона знатно побољшава раздвајање различитих класа полифенолних једињења. У наставку су набројане и укратко описане методе за квантификацију протеина, од којих су две неспецифичне, Лоријева (Lowry) и Кјелдалова (Kjeldahl) метода коришћене и у овом истраживању. Објашњени су њихови принципи, предности и недостаци. На крају потпоглавља описане су методе за одређивање функционалних својстава изолованих протеина соје (растворљивости, емулгујућег капацитета и стабилности емулзије) коришћене у овом истраживању.

У поглављу *Материјали и методе* наведени су материјали и опрема коришћени у току израде ове дисертације, а затим су наведене методе коришћене у току експерименталног рада и обраде резултата. Прво су описани услови обезмашћивања сојиног брашна и методе одређивања влаге и уља у сировом зрну. Након тога, описана је детаљно метода за одређивање садржаја укупних фенола уз израду калибрационе праве са галном киселином као стандардом, наведено је осам екстракционих смеша које су испитане са аспекта ефикасности екстракције укупних фенола, као и начин извођења двостепене екстракције. У наставку је описана оптимизација HPLC методе за квантификацију шест праћених полифенолних киселина са аспекта промене мобилне фазе и градијента елуирања, а при константном протоку од  $1 \text{ cm}^3/\text{min}$  и температури колоне од  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Затим су детаљно описане три методе екстракције полифенолних киселина из сојиног брашна: 1) директна базна хидролиза; 2) директна киселинска хидролиза и 3) екстракција органским растварачем праћена базном и киселинском хидролизом. У наставку поглавља детаљно су описани услови претретмана ултразвуком високе јачине (варирање амплитуде ултразвучне сонде и времена третмана) и претретмана микроталасима (варирање снаге микроталаса, температуре и времена третмана) и накнадне базне и киселинске хидролизе у циљу што потпуније екстракције полифенолних киселина из обезмашћеног сојиног брашна. У овом поглављу описани су и поступци за одређивање антиоксидативне активности екстраката и то: 1) DPPH методом (способност неутрализације 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил радикала); 2) FRAP методом (заснована на редукцији гвожђе(III)-трипиридил-триазин комплекса) и осцилаторном Бригс-Раушеревом (Briggs-Rauscher) методом. Један од циљева дисертације је био и оптимизација екстракције протеина из сојиног брашна, тако да је у наставку детаљно описан поступак екстракције протеина и две неселективне методе за одређивање садржаја протеина: 1) Кјелдалова (Kjeldahl) метода и 2) Лоријева (Lowry) метода. Затим је описан начин претретирања екстраката ултразвуком високе фреквенције и микроталасима и све променљиве које су вариране у циљу што ефикасније екстракције протеина. На крају поглавља детаљно су описане и процедуре за одређивање функционалних својстава различито претретираних екстраката и то: 1) процедура за одређивање растворљивости и 2) процедура за одређивање индекса активности и стабилности емулзије.

Поглавље *Резултати и дискусија* обухвата приказ резултата добијених у експерименталном раду при изради ове дисертације, њихову анализу и дискусију која укључује поређење са резултатима добијеним на основу прегледа литературе у сличним испитаним системима. У овом поглављу налази се укупно 12 потпоглавља и то: 1) Избор адекватног екстракционог средства и испитивање потребе за двостепеном екстракцијом; 2) Оптимизација HPLC методе за детекцију полифенолних киселина; 3) Оптимизација поступка екстракције; 4) Претретман ултразвучном сондом у циљу повећања ефикасности екстракције полифенола; 5) Екстракција ултразвучном сондом праћена базном и киселинском

хидролизом; 6) Претретман микроталасима у циљу повећања ефикасности екстракције полифенолних киселина; 7) Екстракција микроталасима праћена базном и киселинском хидролизом; 8) Одређивање садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности различито претретираних узорак обезмашћеног сојиног брашна; 9) Одређивање садржаја протеина у сојиним брашну; 10) Утицај претретмана ултразвуком на ефикасност екстракције и технолошко-функционална својства протеина; 11) Утицај претретмана микроталасима на ефикасност екстракције и технолошко-функционална својства протеина и 12) Промена садржаја различитих биоактивних једињења у семену жуте соје (cv. *Laura*) услед третмана фолијарним ђубривима на бази биљних екстраката.

У првом потпоглављу приказани су резултати утицаја састава екстракционе смеше на садржај укупних фенола. Показано је да са повећањем поларитета растварача опада растворљивост полифенолних једињења, што је у складу и са литературним подацима. Међутим, закишељавање метанола 10%-ним раствором хлороводоничне киселине (10% HCl) значајно је побољшало екстракцију полифенолних једињења из обезмашћеног сојиног брашна. Након избора оптималне екстракционе смеше, утврђено је да не постоји потреба за двостепеном екстракцијом услед веома мале разлике ( $STD < 2\%$ ) у садржају укупних фенола при једноственој (3,65 mg ekv.GK/g с.м.) и двоственој (3,67 mg ekv.GK/g с.м.) екстракцији.

У другом потпоглављу извршена је оптимизација HPLC методе за детекцију полифенолних киселина. Поређене су три мобилне фазе и три градијента елуирања, а праћење је вршено на две таласне дужине 280 и 325 nm. Сва три градијентна режима су усвојена на основу прегледа литературе за анализе истих или сличних полифенолних киселина, а на основу истог или сродног матрикса. Евентуалне измене су извршене у циљу усклађивања са дужином колоне коришћене у овом истраживању. На основу одзивних површина и времена елуирања шест стандарда полифенолних киселина изабрана је двокомпонентна мобилна фаза: А: 0,1% раствор мравље киселине и Б: метанол и следећи градијент: на 0' 95% А; на 25' 70% А; на 35' 60% А; на 40' 52% А; на 50' 30% А; на 55' 0% А; на 65' 95% А; на 75' 95% А. Две полифенолне киселине гална и транс-циметна су дале боље одзиве на таласној дужини 280 nm, а преостале четири: хлорогена, кафена, *p*-кумарна и ферулна на таласној дужини 325 nm.

У трећем потпоглављу испитане су три методе екстракције полифенолних киселина из обезмашћеног сојиног брашна. Због чињенице да се највећа количина полифенолних једињења у соји налази у везаном облику, ковалентним везама повезана са структурним јединицама ћелијског зида целулозом, хемицелулозом и лигнином, неопходно је извршити њихово ослобађање пре самог поступка екстракције. У ту сврху, испитане су базна хидролиза, киселинска хидролиза и екстракција растварачем праћена базном и киселинском хидролизом. Две киселине, *p*-кумарна и ферулна екстраховане су помоћу све три методе, што је у складу са литературним подацима да су то две доминантне полифенолне киселине у семену како жуте, тако и црне соје. Ово истраживање потврђује податке добијене прегледом литературе да је базна хидролиза ефикаснија у раскидању и етарских и естарских веза, које се ретко раскидају поступком киселинске хидролизе. Ипак, добијени резултати указују на чињеницу да екстракција смешом растварача пре базне и киселинске хидролизе значајно побољшава изоловање полифенолних киселина из брашна соје. Изгледа да систем растварача помаже денатурисање ћелијске мембране, истовремено ослобађајући полифенолне киселине.

У четвртој и петом потпоглављу извршена је оптимизација претретмана ултразвучном сондом у циљу што потпуније екстракције полифенолних киселина из обезмашћеног сојиног брашна. Испитан је утицај амплитуде ултразвучне сонде и времена соникације на ефикасност екстракције. Резултати показују да при амплитуди 15% од максималне снаге, продужење времена соникације нема значајан утицај на ефикасност екстракције ( $p > 0,05$ ), али са порастом амплитуде на 30%, количина екстрахованих полифенолних киселина, пре свега транс-циметне, *p*-кумарне и ферулне статистички значајно расте ( $p < 0,05$ ). Ултразвучни претретман сондом 20 kHz, амплитуде 30%, у трајању од 10 минута усвојен је као најбољи са

аспекта ефикасности екстракције, а у наредном кораку овако претретирани екстракти подвргнути су базној и киселинској хидролизи и одређивању садржаја полифенолних киселина у тако добијеним фракцијама.

У шестом и седмом потпоглављу извршена је оптимизација претретмана микроталасима при контролисаним условима у микроталасном реактору у циљу што потпуније екстракције полифенолних киселина из обезмашћеног сојиног брашна. Испитан је утицај температуре (55, 65, 75 и 85 °C), снаге микроталаса (25, 50, 75 и 100 W) и времена третмана (2, 5 и 10 минута) на ефикасност екстракције полифенолних киселина. Са порастом температуре у временском периоду од два минута, садржај екстрахованих полифенолних киселина, првенствено галне, транс-циметне, *p*-кумарне и ферулне киселине, значајно се повећава ( $p < 0,05$ ). Продужењем времена микроталасног претретмана на 5 и 10 минута, са порастом температуре ове четири киселине су забележиле и највеће промене. Иако је било неколико сличних вредности при различитим условима, као оптимални параметри микроталасне екстракције усвојени су температура од 85 °C и време од 2 минута, првенствено због скраћеног времена екстракције, као и највишег садржаја галне и ферулне киселине у добијеним екстрактима. За временски период од 2 минута, у наредној фази варирана је снага микроталаса. Резултати показују сличност са резултатима добијеним при контролисаној температури, изузев у случају галне киселине, чији садржај је нешто нижи. Упоредјујући резултате добијене варирањем снаге микроталаса, јасно је да је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) у садржају екстрахованих полифенолних киселина постигнута при снази микроталаса од 75 W, нарочито за транс-циметну, хлорогену, *p*-кумарну и ферулну киселину. У случају снаге микроталаса од 100 W, реакциона смеша је прегрејана, температура је порасла изнад 100 °C, што указује на могућност деградације полифенолних киселина и снижења њиховог садржаја, односно смањења ефикасности екстракције у односу на снагу микроталаса од 75 W. Након оптималног претретмана микроталасима са аспекта количине екстрахованих полифенолних киселина (85 °C, 2 min), екстракт сојиног брашна подвргнут је базној и киселинској хидролизи и одређивању садржаја полифенолних киселина у тако добијеним фракцијама. Поређењем садржаја полифенолних киселина у три фракције: слободне (након различитих претретмана); естерификоване (након базне хидролизе) и везане (након киселинске хидролизе), могу се извући следећи закључци: Највећи садржај у фракцији слободних киселина уочен је код транс-циметне киселине, док су *p*-кумарна и ферулна киселина најзаступљеније у фракцији естерификованих киселина, везаних етарским и естарским везама за ћелијске компоненте. Ови резултати потврђују да су неке полифенолне киселине синтетисане у виду макромолекулских компонената (нпр. полифеноли, танини и лигнин) које улазе у структуру ћелијских зидова. Хлорогена, кафена и *p*-кумарна киселина могу се користити као интермедијери током биосинтезе лигнина. Ферулна киселина, на пример, вероватно је везана и за полисахариде, лигнин и суберин. Киселинском хидролизом ослобађају се најмање количине полифенолних киселина у испитиваним узорцима, највише галне и хлорогене. Такође, претретман микроталасима се показао као једини ефикасан за екстракцију хлорогене киселине у естерификованој и кафене киселине у везаној фракцији.

У осмом потпоглављу извршена је анализа садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности екстраката добијених у претходној фази истраживања. Претретман обезмашћеног сојиног брашна ултразвучном сондом (20 kHz, 30% максималне амплитуде, 10 мин) значајно је побољшао екстракцију фенолних једињења и садржај укупних фенола у добијеним екстрактима у поређењу са претретманом у ултразвучном купатилу (30 kHz, 30 мин). Претретман микроталасима (85 °C, 2 мин) има још већи позитиван ефекат на садржај укупних фенола. Резултати су показали да је ефикасност екстракције полифенолних једињења применом микроталасног зрачења била генерално око четири пута већа у односу на екстракцију соникацијом. Антиоксидативна активност екстраката мерена је коришћењем две методе DPPH и FRAP. Метанолни екстракти, добијени претретманом микроталасима праћеним базном и киселинском хидролизом показују највећу антиоксидативну активност



(338,21  $\mu\text{mol TE/g}$  с.м. и 291,18  $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{eq/g}$  с.м.), као и највећу количину екстрахованих укупних фенола (18,77 mg GAE/g с.м.) у односу на екстракте претретиране ултразвучном сондом, који опет показују значајно већу антиоксидативну активност (289,12  $\mu\text{mol TE/g}$  с.м. и 243,87  $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{eq/g}$  с.м.) и садржај укупних фенола (15,23 mg GAE/g с.м.) у односу на екстракте узорка претретираних у ултразвучном купатилу непосредно пре базне и киселинске хидролизе (244,58  $\mu\text{mol TE/g}$  с.м.; 191,59  $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{eq/g}$  с.м. и 12,48 mg GAE/g с.м.) ( $p < 0,05$ ). Иако на основу садржаја посматраних шест полифенолних киселина у обезмашћеном брашну соје, претретман ултразвучном сондом није допринео њиховој ефикаснијој екстракцији у поређењу са претретманом у ултразвучном купатилу, на основу садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности екстраката, може се закључити да је претретман ултразвучном сондом позитивно утицао на екстракцију других класа фенолних једињења присутних у семену соје (вероватно изофлавона даидзеина, генистеина и глицитеина који су поред полифенолних киселина углавном одговорни за антиоксидативну активност семена соје).

У овој дисертацији утврдили смо ефикасан протокол екстракције укључујући селекцију растварача како бисмо максимално повећали принос укупних фенолних једињења и садржаја појединачних полифенолних киселина, као и антиоксидативну активност у екстрактима обезмашћеног сојиног брашна. Као најефикаснији поступак показала се комбинација две технике, екстракције помоћу микроталаса и накнадне алкалне и киселинске хидролизе. Иако претретман ултразвучном сондом нема позитиван утицај на екстракцију свих шест испитиваних полифенолних киселина, на основу антиоксидативне активности екстраката, представља побољшану технику за екстракцију биоактивних једињења из обезмашћеног сојиног брашна.

У *деветом потпоглављу* извршена је оптимизација Кјелдалове методе за одређивање садржаја нативних протеина у сојином брашну варирајући количину узорка, количину соли, катализатора и киселине неопходних за потпуно разарање биљног материјала. Резултати су показали да 0,5 g сојиног брашна, 10 ml концентроване сумпорне киселине и Кјелдалова таблета састава 5g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  и 0,1g  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  омогућавају потпуну дигестију узорка. Након одређивања садржаја протеина у полазном узорку, у *десетом потпоглављу* анализиран је утицај претретмана узорка обезмашћеног сојиног брашна ултразвучном сондом високе фреквенције на ефикасност екстракције протеина и технолошко-функционална својства протеинских изолата, варирајући амплитуду ултразвука (15, 20 и 30% од максималног капацитета) и време соникације (0,5; 2; 5; 10 и 15 минута). Са повећањем амплитуде са 15 на 20% долази до повећања ефикасности екстракције, док се даљим повећањем амплитуде на 30%, садржај протеина у супернатанту смањује. За све три амплитуде испитана је растворљивост на различитим рН вредностима (рН 3, 5, 7 и 9). Иако у киселој средини на рН 3 постоји значајна разлика у растворљивости протеинских изолата у зависности од јачине амплитуде, при осталим вредностима, а пре свега на рН 7 и 9, разлика у растворљивости изолованих протеина соје при амплитуди ултразвучне сонде 20 и 30% није статистички значајна. Повећање растворљивости ултразвучно претретираних узорка са повећањем амплитуде може се приписати феномену кавитације. Утврђено је да ултразвук утиче на промену у секундарној и терцијарној структури протеина. Са повећањем амплитуде ултразвука, долази до промена у односу заступљености две основне секундарне структуре,  $\alpha$ -хеликса и  $\beta$ -ланаца, као и до делимичног развијања молекула протеина и реорганизације хидрофилних аминокиселинских остатака из унутрашњости молекула према површини. Тиме они постају доступни молекулима воде, што се манифестује повећањем растворљивости. Даљим повећањем амплитуде ултразвучне сонде, молекули протеина се реформишу у макромолекуларне агрегате, услед чега може доћи до смањења растворљивости. Највећа вредност индекса активности емулзије (ИАЕ) од 8,213  $\text{m}^2/\text{g}$  добијена је за амплитуду од 20%, док се индекс стабилности емулзије (ИСЕ) благо повећава са порастом амплитуде ултразвучне сонде од 10 до 30%. Обзиром да се амплитуда од 20%

показала као оптимална у већини испитиваних метода, она је усвојана у наредним фазама истраживања, а варирано је време соникације. Са порастом времена соникације, ефикасност екстракције протеина из обезмашћеног брашна соје се повећава све до времена од 10 минута, када достиже максимум, и даљим продужењем времена соникације на 15 минута долази до смањења ефикасности екстракције, што се може објаснити загревањем реакционе смеше услед дејства ултразвука и денатурацијом и агрегацијом протеина. Слично као и приликом испитивања утицаја амплитуде ултразвучне сонде, не постоји правилан тренд раста или опадања растворљивости у зависности од времена соникације, који би могао да се уочи при свим рН вредностима. Највећа растворљивост добијена је код третмана који је трајао најкраће, и то на рН вредностима 7 и 9, што је и очекивано, обзиром да су то најудаљеније вредности од изоелектричне тачке сојиних протеина. Прегледом литературе утврђено је да су глобуларни протеини, као што су глицинин из соје (11 S) и изолат протеина соје, показали боље емулгујуће способности са повећањем времена ултразвучног претретмана, што је у сагласности са резултатима овог истраживања. Иако ИАЕ расте са порастом времена, ИСЕ расте до одређене границе, тј. максимума, након чега долази до благог опадања.

У *једанаестом потпоглављу* анализиран је утицај микроталасног зрачења на ефикасност екстракције протеина и технолошко-функционална својства протеинских изолата, варирајући температуру (65, 75 и 85 °C) и снагу микроталаса (100, 180 и 300 W) у времену од 2 и 5 минута. Са порастом температуре расте ефикасност екстракције, док у случају растворљивости не постоји правилан тренд са порастом температуре. Веома је значајан изузетно повољан утицај микроталасног зрачења на растворљивост сојиних протеина у близини изоелектричне тачке (рН 5). У поређењу са претретманом ултразвучном сондом, где је максимална растворљивост изолованих сојиних протеина постигнута на рН 5 износила свега 29,78%, микроталасним зрачењем за свега 2 минута на температури 65 °C, растворљивост је повећана на 92,58%. Такође забележено је повећање ИАЕ и ИСЕ дејством микроталаса 1,65 пута у односу на ултразвучни третман. Са порастом снаге микроталаса у временском интервалу од 2 минута, расте принос екстракције, међутим при дужем временском интервалу (5 мин), са порастом снаге, на почетку расте, а потом опада принос екстракције. У овом случају дошло је до загревања смеше преко 100 °C, па се може претпоставити да је дошло до денатурације протеина. У оба временска интервала, са порастом снаге микроталаса значајно је повећана растворљивост протеина у близини изоелектричне тачке. Тај пораст је чак израженији у периоду од 2 минута, што потврђује чињеницу да микроталасно зрачење има веома позитиван утицај на функционална својства сојиних протеина, али деловањем у веома кратком интервалу. У односу на узорке третиране ултразвучном сондом, растворљивост је повећана за преко 60%. Такође, повећање снаге микроталасног зрачења, у оба посматрана временска интервала доводи и до повећања ИАЕ и ИСЕ.

У последњем, *дванаестом потпоглављу* извршено је одређивање садржаја полифенолних киселина, укупних фенола, уља, протеина и антиоксидативне активности екстраката добијених из биљака третираних различитим фолијарним ђубривима. Сврха овог дела истраживања била је, пре свега испитивање могућности производње соје богатије циљаном групом биоактивних једињења (полифенолних киселина или протеина) контролисаном биофортификацијом. Такође, сва примењена ђубрива су биљног порекла, па би, уколико покажу позитиван утицај на нутритивни квалитет семена соје могла да се примењују и у органској производњи, што има значајан допринос у заштити животне средине. Примењене су методе оптимизоване у претходним фазама истраживања. Резултати су показали да прихрана биљака овим специфичним ђубривима доводи до промена не само у садржају полифенолних киселина у семену соје, већ и до њихове различите дистрибуције унутар ћелијског материјала, значајно утичући на њихову улогу у биљкама. Количина и расподела полифенолних киселина у биљном материјалу утиче и на њихову растворљивост и приступачност у току дигестије у гастроинтестиналном тракту код људи и животиња. Сва

испитивана ђубрива условила су значајне промене у садржају укупних фенола и антиоксидативне активности екстраката. У овом истраживању, утврђен је синергистички ефекат полифенола и протеина на антиоксидативну активност екстраката, као и позитиван утицај ђубрива на бази аминокиселина на садржај протеина.

У поглављу *Закључак* јасно и прегледно су изнети закључци изведени на основу резултата представљених у претходним поглављима који су у сагласности са постављеним циљевима рада.

У поглављу *Литература* дат је списак коришћене литературе.

### 3. ОЦЕНА ДИСЕРТАЦИЈЕ

#### 3.1. Савременост и оригиналност

Чињеница је да се у последњих неколико деценија код људи све више развија свест о конзумирању хране без адитива, као и о потреби за заменом синтетских антиоксиданаса (у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији) природним антиоксидансима. Забрана употребе синтетских антиоксиданаса у неколико земаља због нежељених дугорочних токсиколошких ефеката, укључујући мутагене, канцерогене и тератогене ефекте довела је до потребе за проналаском адекватне замене у виду природних антиоксиданаса. Већина природних антиоксиданаса су фенолна једињења тј. полифеноли, а најважније групе природних антиоксиданаса су токоферол, флавоноиди и фенолне киселине. Антиоксиданси имају способност неутралисања слободних радикала, групе једињења са веома штетним дејством по све живе организме. Слободни радикали су веома реактивни и имају способност оксидације биомолекула, што доводи до повратних и неповратних оштећења ћелија и патолошких промена на ткивима. Присуство антиоксиданаса у храни и суплементима помаже организму да смањи оксидативни стрес. Полифенолним једињењима се, поред антиоксидативног, приписује антиинфламаторно, антибактеријско, антифунгално и антикарциногено дејство, тако да имају велики значај, како у исхрани, тако и у медицини, улазећи у састав неких лекова.

Екстракција биоактивних једињења из биљног материјала је први корак у употреби фитохемикалија као додатака у производњи дијететских суплемената, састојака хране, фармацеутских и козметичких производа. Биљни материјал може садржати низ фенолних једињења која варирају од једноставних (нпр. фенолне киселине, антоцијани) до високо полимеризованих супстанци (нпр. танини) у различитим количинама. Због свега наведеног не постоји универзални поступак екстракције погодан за екстракцију свих биљних фенола. Све чешће се за екстракцију биоактивних једињења из биљног материјала користе нове технике као што су ултразвук високог интензитета и микроталасно зрачење. Обе технике представљају ефикасне и иновативне тзв. „зелене“ технологије за прераду биљног материјала које осигуравају већи принос, скраћују време третмана и смањују потрошњу енергије и растварача. Екстракција потпомогнута ултразвуком је бржа од традиционалних метода, јер се контактна површина између чврсте и течне фазе повећава делимичним разарањем ћелијског зида. Време екстракције се скраћује на само неколико минута у односу на 2-20 сати са традиционалним методама (мацерација/мешање). Примена ултразвука високог интензитета је веома заступљена у прехранбеној индустрији, користи се и у процесима стерилизације, екстракције, сушења и емулзификације прехранбених производа. Микроталасно зрачење узорака омогућава загревање смеше растварача директном интеракцијом са слободним молекулима присутним у систему, што доводи до убрзаног разарања биљног ткива и ослобађања ћелијских компоненти у растварач. Овај поступак обично повећава принос биоактивних једињења и смањује трошкове екстракције због скраћења времена третмана и смањене количине растварача. Додатна предност технике је та што комбинује високу

температуру и притисак за оптимално ослобађање биоактивних супстанци уз истовремено разарање ћелијског зида.

Као полазни матрикс изабрана је соја, пра свега због чињенице да је веома богат извор природних антиоксиданаса, полифенолних киселина и флавоноида, али и протеина јединственог аминокиселинског састава и високе нутритивне вредности, међутим још увек нема широку примену за хуману употребу, првенствено у прехранбеној и фармацеутској индустрији, већ се углавном користи као сточна храна. Резултати многобројних истраживања указују на то да садржај полифенола треба посматрати као важну и специфичну нутритивну и технолошку особину сојиног зрна и као потенцијално мерило антиоксидативне активности. Семе соје садржи високе концентрације фенолних киселина и флавоноида, међу њима највише изофлавона. Фенолне киселине, лигнин и изофлавони детектовани у соји имају вишештруку корист за здравље људи, животиња и биљака. Изофлавони и феноли соје имају улогу антиоксиданаса у борби против срчаних обољења и неких врста канцера који су у вези са нивоом хормона, као што су рак дојке, простате, дебелог црева. У току израде ове дисертације извршена је оптимизација параметара ултразвучног и микроталасног претретмана, али и њихова комбинација са базном и киселинском хидролизом у циљу што ефикасније екстракције полифенолних једињења и повећања антиоксидативне активности добијених екстраката.

Како је соја пре свега богат извор пуновредних протеина, други део истраживања био је посвећен оптимизацији параметара ултразвучног и микроталасног претретмана у циљу што ефикасније екстракције и побољшања технолошко-функционалних својстава изолованих протеина. Са нутритивног становишта, правилним комбиновањем различитих намирница, биљни протеини могу да обезбеде потребне количине есенцијалних аминокиселина неопходних за нормалну функцију људског организма. Осим њихове улоге као нутритива, протеини играју значајну улогу у структурном формирању хране путем процеса као што су емулзификација, стварање пене, желирање и формирање теста. Зрно соје, као и нуспроизводи приликом производње уља, су веома погодни извори протеина за производњу протеинских хидролизата који се углавном користе као додаци храни или пићу. Прегледом доступне литературе као највећи недостатак сојиних протеина приликом примене у прехранбеној индустрији наводи се слаба растворљивост. Растворљивост протеина је један од најбитнијих фактора који је потребно испитати пре потенцијалне примене протеинских изолата, због њеног утицаја на друга функционална својства и сам квалитет крајњег производа. За оптимална функционална својства протеина соје, потребна је растворљивост протеина већа од 90%. У овом истраживању, оптимизацијом параметара микроталасног претретмана постигнута је растворљивост протеина од 92,58% у близини изоелектричне тачке, што представља веома важан допринос овог истраживања.

У овој докторској дисертацији испитан је и утицај фолијарних ђубрива на бази биљних екстраката на промене у садржају полифенолних киселина, антиоксидативне активности, протеина и уља у сојином брашну. У току вегетационог периода, биљке соје су третиране новом генерацијом ђубрива. Сва примењена ђубрива су на бази биљних екстраката, па је њихова употреба могућа и у органској производњи. Њихова употреба је важна са аспекта повећања приноса и нутритивног квалитета биљног материјала, а без штетног деловања на животну средину.

Утврђен је позитиван утицај претретмана ултразвуком високог интензитета и микроталасним зрачењем на екстракцију полифенолних киселина из сојиног брашна и антиоксидативну активност добијених екстраката. Такође, претретман ултразвуком високог интензитета и микроталасним зрачењем позитивно утиче на екстракцију протеина из сојиног брашна и технолошко-функционална својства изолата. Уочен је и синергистички ефекат полифенолних једињења и протеина на антиоксидативну активност екстраката, чиме су у потпуности испуњени захтеви за савременост и оригиналност спроведеног научног истраживања.

### 3.2. Осврт на референтну и коришћену литературу

Током израде докторске дисертације кандидат је извршио детаљан преглед научне и стручне литературе из релевантних научних области везаних за проблематику докторске дисертације.

Цитирано је 218 литературних навода који су омогућили да се јасно представи стање у испитиваној научној области, као и да се сагледа актуелност проблематике. Већину прегледане литературе чине радови публиковани у врхунским међународним часописима од стране еминентних стручњака у испитиваној научној области. На основу овог пресека стања у литератури изложене су основне смернице за истраживања која су спроведена у овој докторској дисертацији. Из образложења предложене теме докторске дисертације и објављених радова у пријави, коју је кандидат поднео, као и из пописа литературе која је коришћена у истраживању, уочава се адекватно познавање предметне области истраживања, као и познавање актуелног стања истраживања у овој области у свету.

### 3.3. Опис и адекватност примењених научних метода

У пријави докторске дисертације су постављени задаци који су остварени коришћењем одговарајућих експерименталних техника и савремених аналитичких инструменталних метода према оригиналним или модификованим методама из литературе, као и адекватном анализом и обрадом података.

Концентрација укупних фенола након претретмана узорака ултразвуком високог интензитета и микроталсним зрачењем одређена је спектрофотометријски употребом *Folin-Denis* и *Folin Ciocalteu* реагенаса и изражена преко еквивалента галне киселине по граму суве материје узорка (mg GAE/g с.м.). *Folin-Denis* и *Folin Ciocalteu* реагенси могу бити неприкладни за биљне екстракте са високим садржајем других лако оксидујућих супстанци као што су редукујући шећери и аскорбинска киселина јер они могу да интерферирају са фенолним једињењима. Упркос овим ограничењима, метода је веома једноставна и најчешће коришћена метода за процену укупног садржаја фенола у воћу и поврћу. У прилог коришћењу *Folin Ciocalteu* реагенса за квантификацију полифенола у сојиним брашну иде и чињеница да зрно соје, као резервне материје садржи пре свега протеине и скроб, па онда уља, а у врло малом обиму једноставне дисахариде и моносахариде.

Анализа полифенолних киселина из различито претретираних екстраката извршена је методом реверзно-фазне течне хроматографије високих перформанси (RP-HPLC), која је оптимизирана модификацијом реакционих услова (састава мобилних фаза и градијентног режима истих). Квантификација полифенолних киселина је извршена на основу екстерног стандарда полифенолних киселина и резултати су изражени у  $\mu\text{g/g}$  суве материје.

Антиоксидативна активност различито претретираних екстраката је испитана спектрофотометријским методама заснованим на праћењу промене концентрације неког од реактаната или продуката реакције антиоксиданаса са слободним радикалима. DPPH метода, представља једноставан, брз и осетљив начин за испитивање антиоксидативне активности одређеног једињења или биљног екстракта. Ова метода пружа податке о реактивности потенцијалних антиоксиданаса са стабилним, слободним 1,1-дифенил-2-пикрил-хидразил радикалом (DPPH). Сам DPPH радикал је пурпурне боје и има максимум апсорпције на 517 nm. Резултати су изражени као  $\mu\text{mol TROLOX}$  еквивалента/mg суве материје. Друга метода коришћена за одређивање антиоксидативне активности је FRAP метода заснована на редукацији гвожђе(III)-трипиридил-триазин комплекса ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) до  $\text{Fe(II)}$ -трипиридил-триазин комплекса. Редуковани  $\text{Fe(II)}$ - трипиридил-триазин комплекс поседује интензивно плаву боју, која се одређује спектрофотометријски на 593 nm. Резултати су изражени као  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg суве материје. Трећа метода за одређивање антиоксидативне активности

коришћена у овом истраживању јесте Бригс-Раушерова (Briggs-Rauscher) осцилаторна метода. Ова метода даје “ширу слику” антиоксидативне активности и може да покаже постојање синергистичких ефеката различитих биоактивних једињења унутар саме биљке. Динамика ове реакције је праћена потенциометријски. Као радна електрода је коришћена Pt електрода, а као референтна Ag/AgCl електрода. На антиоксидативну активност утиче низ фактора и постоји неколико механизма којима антиоксиданси испољавају своју активност (донори електрона, „хватачи“ слободних радикала, донори Н атома). Због тога је пожељно користити што више метода за одређивање антиоксидативне активности како би се добила комплетна слика реалне способности одређених биоактивних једињења да делују као антиоксиданси и спречавају нежељене реакције слободних радикала у организму.

Садржај протеина у сировом узорку одређен је посредно, преко одређивања садржаја азота методом по Кјелдалу (Kjeldahl), а затим је множењем садржаја азота фактором конверзије (N/P) израчунат садржај протеина. Од технолошко-функционалних својстава различито претретираних протеина разматрани су растворљивост при различитим рН вредностима и емулгациона својства. Растворљивост протеинских изолата одређена је спектрофотометријски. Разблажени узорци (10% v/v) су центрифугирани при великом броју обртаја (15 минута, 14,900 g на 4°C) да би се исталожили нерастворни протеини. После тога, анализиран је садржај протеина у супернатанту и почетном узорку стандардном методом по Лорију и на основу одређених односа израчуната је растворљивост протеина. Емулгациона својства одређена су спектрофотометријском методом и изражена су као индекс активности емулзије и индекс стабилности емулзије.

Анализа варијансе (ANOVA) праћена Tukey тестом коришћена је за упоређивање ефеката ултразвучног и микроталасног претретмана, као и ефеката различитих ђубрива на садржај биоактивних једињења у семену соје. Разлике у вредностима су сматране статистички значајним, уколико је  $p$  вредност била мања од 0,05 ( $p < 0,05$ ). Све статистичке анализе, укључујући прорачуне су спроведене помоћу OriginPro 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA).

### 3.4. Применљивост остварених резултата

У последњих неколико деценија соја је све више препозната као веома важан извор полифенолних једињења, пре свега изофлавонона и полифенолних киселина. Биљни полифеноли су веома добри антиоксиданси који имају способност неутралисања слободних радикала и смањивања оксидативног стреса у организму и као такви су нашли широку примену као суплементи у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији. Стога је један од циљева овог истраживања био развој и оптимизација поступка екстракције полифенолних киселина из сојиног брашна добијеног из култура соје карактеристичних за наше подручје и то жуте соје (cv. *Laura*). Управо је ово један од најзначајнијих практичних доприноса ове докторске дисертације, јер је синергистички ефекат ултразвука високог интензитета као и микроталаса и субсеквентне базне и киселинске хидролизе детаљно објашњен на реалном индустријском супстрату. Резултати су показали да претретман узорака ултразвуком фреквенције 20 kHz и микроталасима у контролисаним условима доводи до делимичног разарања ћелијских зидова и поспешује екстракцију полифенола из сојиног брашна. Испитана је и метода комбиновања ултразвука високог интензитета и микроталаса и накнадне базне и киселинске хидролизе. Обе испитане методе значајно повећавају садржај укупних фенола и антиоксидативну активност екстраката. Како је соја пре свега протеинска биљка, са садржајем протеина од око 40%, један од циљева овог истраживања био је и оптимизација поступка екстракције и побољшање технолошко-функционалних својстава протеина применом ултразвучних таласа и микроталаса. Иако сојини протеини спадају у квалитетне протеине због јединственог аминокиселинског састава и велике биолошке вредности, као и расположивости у великим количинама, њихова шира

комерцијална примена као протеинских додатака исхрани је ограничена због недовољне дигестивности и мале растворљивости, нарочито у близини изоелектричне тачке (pH 5). Растворљивост протеина је најбитније функционално својство, будући да протеин мора бити растворан да би се успешно имплементирао у различите прехранбене производе. Друга функционална својстава (емулговање, капацитет везивања воде и уља, пенивост) такође зависе од растворљивости протеина. Побољшање растворљивости, емулгујућих и других функционалних својстава сојиних протеина доприноси повећању лепезе производа у које се ови протеини могу додавати као емулгатори или биоактивни агенси. У овој тези показано је да се применом микроталасног зрачења у кратком временском интервалу могу значајно унапредити технолошко-функционална и биолошка својства сојиних протеина, нарочито у близини изоелектричне тачке.

Један од циљева ове дисертације био је и добијање сојиног брашна побољшаних нутритивних карактеристика. У ту сврху биљке соје су у току вегетационог периода третиране ђубривима на бази биљних екстраката. Резултати указују да је биофортификацијом могуће утицати на акумулацију одређене класе биоактивних једињења (у нашем раду полифенолних киселина и протеина) у сојином зрну. Ови резултати имају изузетан практичан значај из неколико разлога:

- сва примењена ђубрива су на бази биљних екстраката, па се могу веома ефикасно имплементирати и у органској производњи;
- семе соје са повећаним садржајем полифенолних киселина и већим антиоксидативним капацитетом може представљати добар садни материјал отпорнији на услове животне средине, што посредно доприноси повећању приноса;
- семе соје са повећаним садржајем полифенолних киселина представља бољу полазну сировину за екстракцију полифенола и даљу примену екстраката као адитива у прехранбеној и козметичкој индустрији;
- семе соје са повећаним садржајем протеина представља бољу полазну сировину при производњи протеинских форми соје;
- утврђен је и синергистички ефекат полифенола и протеина на антиоксидативну активност биљног материјала, што представља веома важан допринос овог истраживања разумевању одбрамбених механизма биљке на разне врсте оксидативног стреса.

### 3.5. Оцена достигнутих способности кандидата за самостални научни рад

Кандидат Сања Б. Ђуровић, дипл. инж. технологије, је током израде докторске дисертације испољила изузетну стручност и самосталност у претраживању и коришћењу научне литературе, планирању и реализацији експеримената, као и коришћењу различитих техника и метода. Кандидат је нарочито показао велику посвећеност и стручност приликом развоја метода за квантитативно одређивање појединачних фенолних киселина савременим хроматографским техникама. При анализи, обради и дискусији резултата је показала самосталност, систематичност и креативност. На основу досадашњег залагања и постигнутих резултата Комисија је мишљења да кандидат поседује све квалитете неопходне за самостални научно-истраживачки рад.

## 4. ОСТВАРЕНИ НАУЧНИ ДОПРИНОС

### 4.1. Приказ остварених научних доприноса

Главни научни доприноси ове докторске дисертације могу се сврстати у три групе:

1. Развој иновативног биотехнолошког поступка заснованог на комбинованој примени ултразвучног и микроталасног претретмана и накнадне базне и киселинске хидролизе, за екстракцију полифенолних киселина из сојиног брашна уз повећање садржаја укупних фенола и антиоксидативне активности екстраката. Наведени научни допринос подразумева неколико појединачних доприноса:
  - дефинисани су оптимални процесни параметри ултразвучног претретмана (снага ултразвука, фреквенца, време соникације) обезмашћеног сојиног брашна са аспекта количине изолованих полифенолних киселина и антиоксидативне активности екстраката;
  - дефинисани су оптимални процесни параметри микроталасног претретмана (снага микроталаса, температура, време третмана) обезмашћеног сојиног брашна са аспекта количине изолованих полифенолних киселина и антиоксидативне активности екстраката.
2. Развој иновативног биотехнолошког поступка заснованог на претретману ултразвучним таласима и микроталасима за екстракцију и побољшање технолошко-функционалних својстава сојиних протеина. Наведени научни допринос подразумева неколико појединачних доприноса:
  - дефинисани су оптимални процесни параметри ултразвучног претретмана (снага ултразвука, фреквенца, време соникације) сојиног брашна са аспекта приноса, растворљивости и емулгујућих својстава изолованих протеина;
  - дефинисани су оптимални процесни параметри микроталасног претретмана (снага микроталаса, температура, време третмана) сојиног брашна са аспекта приноса, растворљивости и емулгујућих својстава изолованих протеина.
3. Утврђена је корелација садржаја испитиваних полифенолних киселина и антиоксидативних активности добијених екстраката одређених на основу различитих механизма, као и синергистички ефекат полифенола и протеина на антиоксидативну активност биљног материјала, што представља веома важан допринос овог истраживања разумевању одбрамбених механизма биљке на разне врсте оксидативног стреса.
4. Утврђена је корелација интензитета ултразвука и микроталасног третмана и структурних промена у молекулу протеина соје као и функционалних својстава изолованих протеина.
5. Остварена су нова сазнања о могућности примене ђубрива на бази биљних екстраката за производњу соје обogaћене различитим групама биоактивних једињења, у зависности од њене даље намене.

### 4.2. Критичка анализа резултата истраживања

Прегледом доступне литературе из ове области истраживања која разматра имплементирање нових технолошких поступака у циљу побољшања екстракције биоактивних једињења из биљног материјала, као и разматрањем резултата добијених у овој докторској дисертацији, уочава се да резултати из ове докторске дисертације значајно допуњују постојећа сазнања из поменуте области. Наиме, оптимизацијом кључних процесних параметара (јачина ултразвука, фреквенца, време соникације, јачина микроталаса, време и температура реакционе смеше), значајно је побољшана екстракција полифенола из сојиног брашна и антиоксидативна активност добијених екстраката. Такође, оптимизацијом кључних



процесних параметара значајно је повећана ефикасност екстракције и унапређена су технолошко-функционална својства сојиних протеина, чиме је постигнут значајан допринос њиховој употреби у прехранбеној индустрији као компонената функционалне хране. Велики значај имају и резултати добијени применом нове генерације ђубрива на бази биљних екстраката за производњу соје обogaћене различитим групама биоактивних једињења, у зависности од њене даље намене.

#### 4.3. Верификација научних доприноса

Кандидат Сања Б. Ђуровић је резултате истраживања добијене у оквиру израде своје докторске дисертације потврдила објављивањем радова у часописима међународног значаја и саопштењима на међународним и националним скуповима. Резултати истраживања проистекли из ове дисертације објављени су до сада у оквиру два рада у научним часописима међународног значаја (категоризације M21-један рад и M23-један рад) и седам саопштења на међународним и националним скуповима од којих је пет штампано у целини. Кандидат се током израде дисертације бавио истраживачким радом у оквиру ужих научних области технолошког инжењерства, али и биљне физиологије и пољопривреде, у оквиру којих је коаутор још четири рада у часописима међународног значаја (категоризације M21a-један рад и M24-три рада), десет радова у часописима националног значаја и шеснаест саопштења на скуповима међународног и националног значаја, од којих је седам штампано у целини.

#### Научни радови који су део дисертације

##### Категорија M21:

1. **Ђуровић, S.**, Nikolić, B., Luković, N., Jovanović, J., Stefanović, A., Šekuljica, N., Mijin, D., Knežević-Jugović, Z.: The impact of high-power ultrasound and microwave on the phenolic acid profile and antioxidant activity of the extract from yellow soybean seeds, *-Industrial Crops and Products*, vol. 122, pp. 223–231, 2018 (ISSN: 0926-6690, **IF(2017/2018)=3,849**). (<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.078>)

##### Категорија M23:

1. **Ђуровић, S.**, Dragičević, V., Waisi, H., Pagnacco, M., Luković, N., Knežević-Jugović, Z., Nikolić, B.: Enhancement of antioxidant activity and the content of bioactive compounds in yellow soybean induced by plant extracts based products, *-Archives of Biological Sciences*, Published online: April 9, 2019, (ISSN: 0354-4664, eISSN:1821-4339, **IF(2017)=0,648**). (<https://doi.org/10.2298/ABS190123024D>)

##### Категорија M33:

1. Nikolić B., Dragičević V., Stojiljković M., Waisi H., **Ђуровић S.**, Spasojević I., Simić M., Effect of different Mo fertilizers on yield, chemical composition of seed and some physiological parameters in two soybean (*Glycine max.* Merr.) cultivars, Editor: Dušan Kovačević, In *Book of Proceedings of „Agrosym 2014“- Fifth International Scientific Agrucultural Symposium*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 163-168, October 23-26th 2014, ISBN: 978-99955-751-9-9.

2. Dragičević V., Nikolić B., Waisi H., Stojiljković M., **Ђуровић S.**, Spasojević I., Perić V., Alterations in factors that affect availability of mineral nutrients in soybean grain induced by foliar fertilising, Editor: Alessandro Piccolo, In *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*

(CBTA), 2:12 (28 Apr 2015), *Special Issue dedicated to: CEFood 2014: "Food Chain Integration"*, Ohrid, Macedonia, 21-24th May 2014, ISSN: 2196-5641  
(<http://www.chembioagro.com/content/2/1/12>; DOI: 10.1186/s40538-015-0034-4)

3. Stefanović, A., Jovanović, J., **Stojaković, S.**, Jugović, B., Bugarski, B., Knežević-Jugović, Z., Enhancing protein release and functionality of soy proteins from defatted soy flakes using high-intensity ultrasound-assisted extraction, Editor: Miladin Gligorić, In *Proceedings of V International Congress "Engineering, Environment and Materials in the Processing Industry"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 324-334, March 15-17th 2017, CD Proceedings, ISBN 978-99955-81-22-0.

4. Knezevic-Jugovic, Z., Sekuljica, N., Jovanovic, J., Stefanovic, A., **Stojakovic, S.**: Improved extraction of soybean protein from defatted soybean flakes in terms of yield and protein functional properties, Editors: Blahušiak, M., Mihal, M., In *Book of Proceedings of 44th International Conference of the Slovak Society of Chemical Engineering*, Demänovská dolina, Slovakia, 767–774, 2017, CD Proceedings, ISBN 978-80-89597-58-1.

5. **Đurović, S.**, Nikolić, B., Dragičević, V., Waisi, H., Knežević-Jugović, Z., Influences of foliar fertilizers and genotype on polyphenol and antioxidant status of yellow soybean seeds, Editor: Dušan Kovačević, In *Book of Proceedings of VIII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2017"*, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 968-973, 05-08th October, 2017, (ISBN 978-99976-718-1-3 COBISS.RS-ID 6954776),  
([http://www.agrosym.rs.ba/index.php/en/agrosym/agrosym\\_2017/](http://www.agrosym.rs.ba/index.php/en/agrosym/agrosym_2017/)).

#### Категорија М34:

1. Dragičević V., Nikolić B., Waisi H., Stojiljković M., Spasojević I., **Đurović S.**, Variations in some antioxidants in soybean grain affected by foliar fertilizers, Editors: Sofija Sovilj and Aleksandar Dekanski, In *Book of Abstracts of 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries (ICOSECS 8)*, organized by Society of Albanian Chemists et al., Serbian Chemical Society, Belgrade, 2013, pp. 259, ISBN: 978-86-7132-053-5.

2. Nikolić B., Dragičević V., Waisi H., Stojiljković M., Spasojević I., **Đurović S.**, Milićević Z., Influence of different non-standard fertilizers on yield and nutritive values of seeds of two soybean genotypes, Editor: Levent Ozturk, In *COST Action Project FA 0905 „Mineral-Improved Crop Production for Healthy Food and Feed“ Final Conference Proceedings Book*, Sabanci University, Istanbul, Turkey, 17-19th March 2014, Ela Quality Resort, Antalya-Belek, Turkey, pp. 112-113, ISBN: 978-605-4348-72-5

## 5. ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

На основу претходно изнетих разматрања резултата докторске дисертације **Сање Б. Ђуровић**, дипл. инж. технологије под називом „**Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла**“ сматрамо да су испуњени сви циљеви и задаци рада на овој тези и да она својим садржајем и квалитетом значајно доприноси области Хемијска технологија, што је и потврђено објављивањем радова у међународним часописима, као и публиковањем резултата на конференцијама од међународног и националног значаја. Такође, Комисија је мишљења да је кандидат испољио изузетну научно-истраживачку способност у свим фазама израде ове

докторске дисертације. Комисија предлаже Наставно-научном већу Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду да се докторска дисертација под називом „Утицај различитих поступака екстракције на садржај и биолошка својства полифенола и протеина из семена жуте соје различитог порекла“ кандидата **Сање Б. Ђуровић** прихвати, изложи на увид јавности и упуту на коначно усвајање Већу научних области техничких наука Универзитета у Београду. Такође, да се након завршетка ове процедуре, кандидат позове на усмену одбрану докторске дисертације пред Комисијом у истом саставу.

#### **ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ**

.....  
**Проф. др Зорица Кнежевић-Југовић, редовни професор,**  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
**др Богдан Николић, виши научни сарадник,**  
Институт за заштиту биља и животну средину,  
Београд

.....  
**Проф. др Душан Мијин, редовни професор,**  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет

.....  
**Проф. др Дејан Безбрадица, редовни професор,**  
Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет