

ISPITIVANJE STRUKTURNIH DELOVA ZRNA HIBRIDA KUKURUZA ZP 677 METODOM IC OMETENE TOTALNE REFLEKSIJE

Čedomir Radenović^{1,2*}, Danica Bajuk Bogdanović¹, Milica Radosavljević¹,
Nenad Delić¹, Aleksandar Popović¹, Mile Sečanski¹, Miloš Crevar¹

Izvod

U ovom radu proučavano je zrno i strukturni delovi zrna: endosperm, perikarp i klica kod visokoprinosnog hibrida kukuruza ZP 677 koji je namenjen prevashodno za ishranu domaćih životinja. Primenom infracrvene spektroskopije - Metoda ometene totalne refleksije (*Attenuated Total Reflectance - ATR*), vršeno je registrovanje i proučavanje svih spektralnih traka (vrlo velikog, velikog, malog i vrlo malog intenziteta) *ATR*-spektara zrna hibrida kukuruza, endosperma, perikarpa i klice. Na osnovu izvršenih proučavanja i analiza može se konstatovati sledeće: *ATR* spektre zrna, endosperma, perikarpa i klice hibrida kukuruza karakterišu sve njihove spektralne trake i više parametara: broj traka u spektru, intenzitet traka, kinetika traka i distribucija mesta nastajanja traka u opsegu talasnog broja od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} . Navedeni parametri su posebno ispitivani kako za zrno, tako i za endosperm, perikarp i klicu. Spektralne trake vrlo velikog i velikog intenziteta karakterišu se po navedenim parametrima: po broju, koji se najčešće kreće od 3 do 5, po intenzitetu, po različitoj kinetičkoj formi, kao i po distribuciji mesta nastajanja u opsegu talasnog broja. Ove spektralne trake omogućavaju identifikaciju organskih molekula, jedinjenja, njihovih fragmenata i drugih molekulskih struktura koje ih određuju, kao i identifikaciju različitih oblika pobuđenih stanja molekulskih struktura i valentnih veza organskih molekula. U slučaju spektralnih traka zrna, endosperma, perikarpa i klice koje su vrlo velikog i velikog intenziteta, mogu biti identifikovana sledeća organska jedinjenja: proteini, karotenoidi, celuloza, lipidi, karboksilne kiseline, etri, amino-kiseline, proteinski amidi, alkani, šećeri, ugljeni hidrati, ketoni, alkoholi, fenoli, aldehidi i amini. Spektralne trake zrna, endosperma, perikarpa i klice koje su malog i vrlo malog intenziteta, takođe se karakterišu po navedenim parametrima: po broju traka koji može biti različit, po malom intenzitetu traka, po distribuciji mesta nastajanja, a naročito po frekvenciji oscilovanja valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula. Ove spektralne trake omogućavaju identifikaciju organskih molekula, jedinjenja i njihovih fragmenata, kao i identifikaciju različitih oblika pobuđenih stanja molekulskih struktura i valentnih veza organskih molekula.

Pobuđeno stanje molekulskih struktura i valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula ispoljava se u različitim oblicima oscilatornog kretanja. U radu se navode primeri funkcionalnih grupa organskih molekula u kojima se javljaju sva pomenuta pobuđena stanja molekulskih struktura i valentnih veza: alkohola, amina, alkina, ketona, alkena, estara, lipida, karboksilnih grupa, amida, azotno-vodoničnih grupa, primarnih amina, karboksilnih kiselina, imida, hlornih kiselina, nitrita, alifatičnih karboksilno-vodoničnih veza i aldehida.

Ključne reči: endosperm, infracrveni spektar, klica, perikarp, spektralna traka, *Zea mays* L.

Originalni naučni rad (Original Scientific Paper)

¹ Radenović Č, Radosavljević M, Delić N, Popović A, Sečanski M, Crevar M, Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd

² Bajuk Bogdanović D, Fakultet za fizičku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija

*e-mail: radenovic@sbb.rs

Uvod

Današnje shvatanje savremenih proučavanja biljnih sistema obavezno podrazumeva i uključivanje metoda infracrvene (IC) spektroskopije. Ovim se u suštini obezbeđuje prodor u dijagnostiku stanja pojedinih organa biljke na molekularnom nivou. Primenom infracrvene spektroskopije, naročito sa savremenom tehnikom kakva je (*Attenuated Total Reflectance*) *ATR IC* spektroskopska metoda ometene totalne refleksije, moguće je ostvariti i identifikovanje organskih molekula i njihovih fragmenata (Charter et al., 2010; Greener et al., 2010). Identifikovanje se bazira na instrumentalnom pobuđivanju oscilovanja valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula, tj. molekularnih vibracija u njima, kao i na određivanju rezonantnih frekvencija karakterističnih za organska jedinjenja (Nickolov et al., 2004).

Uspešnom primenom savremenih metoda infracrvene spektroskopije još je moguće dobiti i niz drugih relevantnih rezultata (Maciejewski et al., 2021). Naročito su značajni parametri *ATR* spektralnih traka koje nastaju u funkciji talasnog broja. Isto tako, značajni su i rezultati koji govore o kvalitetu i životnim funkcijama organa biljaka, a to se sve češće izučava primenom metoda infracrvene spektroskopije (Vasiliev et al., 2007; Tarasevich, 2012; Radenović et al., 2015a, 2015b, 2016, Aboud et al., 2019).

Za proučavanje bioloških sistema na molekularnom nivou pominju se najnapredniji naučni instrumenti i metode (Macura and Radenović, 2016). Takve metode su nuklearno-magnetno-rezonantna spektroskopija - NMR (*Magnetic Resonance Tomography - MRT*) i masena spektrometrija (*Mass Spectrometry*), a koje se koriste za dobijanje kvalitativnih i kvantitativnih podataka o hemijskim i fizičkim svojstvima molekula bioloških sistema, kao i za identifikovanje novih biomarkera (podaci o genomu i proteomu ćelija, unutarćelijskom metabolizmu).

Cilj ovog rada je da se primeni metodologija analize infracrvenih spektara i svih spektralnih traka vrlo velikog, velikog, malog i vrlo malog intenziteta, različitih oblika kinetike i distribucije mesta njihovog nastajanja na skali

talasnih brojeva, kako bi se stekla mogućnost identifikacije ne samo organskih molekula, nego i konformacionog stanja valentnih veza u funkcionalnim grupama organskih molekula, kako za zrno, tako i za endosperm, perikarp i klicu kukuruza.

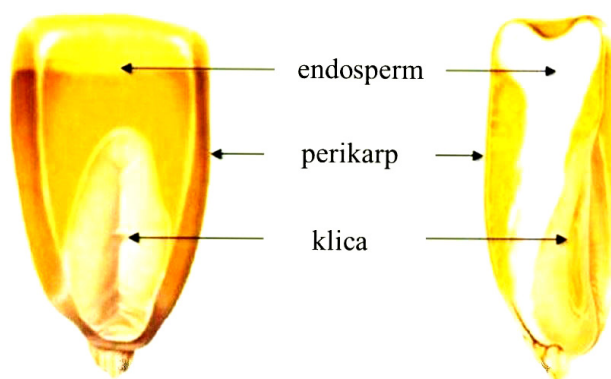
Materijal i metode

Biljni materijal. Za proučavanja *ATR* infracrvenih spektara, korišćena su zrna visokoprinosnog ($18,0 \text{ t ha}^{-1}$) hibrida kukuruza ZP 677. Upotreba hibrida ZP 677 za ishranu domaćih životinja najčešća je u obliku proizvoda od tog hibrida: zrna, prekrupa, krupno samleveno brašno, silaža cele biljke, silaža klipa i silaža zrna (Radenović et al., 2021). U ovom radu korišćeni su i strukturni delovi zrna hibrida ZP 677: endosperm, perikarp i klica (Slika 1 i 2).



Slika 1. Visokoprinosni hibrid kukuruza ZP 677.

Figure 1. The outstanding quality maize hybrid ZP 677.



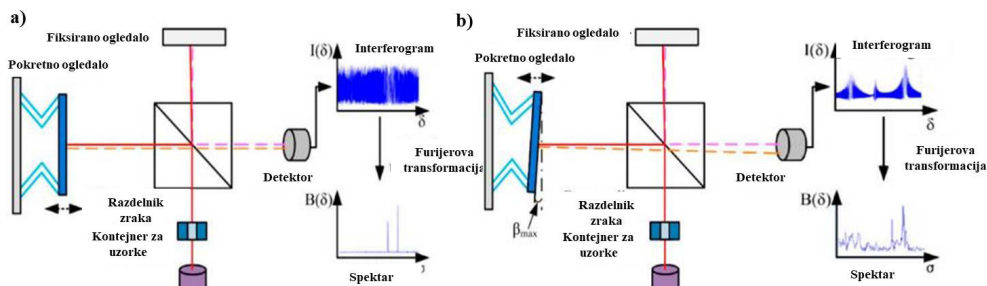
Slika 2. Strukturni delovi zrna kukuruza endosperm, perikarp i klica.
Figure 2. The maize kernel structural parts endosperm, perikarp and germ.

Metod odvajanja endosperma, perikarpa i klice od zrna, u laboratorijskim uslovima, opisan je u radu (Radosavljević i Radenović, 2020), a sadržaj endosperma, perikarpa i klice u zrnu iskazan je u procentima od mase zrna (Radosavljević et al., 2000). Utvrđeno je da zrno hibrida kukuruza ZP 677 sadrži 80,95% endosperma, 5,40% perikarpa i 13,65% klice. Agronomska, morfološka i hemijsko-fiziološka svojstva, uključujući i metode siliranja hibrida kukuruza ZP 677, detaljnije su opisani u radu (Radenović et al., 2021). Proučavani hibrid kukuruza ZP 677 vlasništvo je Instituta za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd, Srbija.

Metode. Nova metoda infracrvene spektroskopije za izučavanje strukturnih karakteristika i prirodnih svojstava zrna hibrida kukuruza i delova zrna: endosperma, perikarpa i klice, uspešno se primenjuje na Fakultetu za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu pod imenom „Ometena totalna refleksija“ - *Attenuated total reflection (ATR)* - tehnika ispitivanja uzoraka koja se koristi u kombinaciji sa infracrvenom spektroskopijom i omogućava da se uzorci u čvrstom ili tečnom stanju ispitaju direktno, bez specijalne pripreme (Larkin, 2011). Treba napomenuti, da moguće razlike nastaju u izvorima zračenja tj. prirodi uzorka, principu apsorpcije zračenja s jedne, ali i upotrebi različitih termičkih i foto-detektora sa druge strane (Jackson, 2006).

Tradicionalna infracrvena spektroskopija ispituje IC zračenje koje prolazi kroz uzorak. Nova *ATR* metoda ispituje IC zračenje koje se odbija od površine uzorka (http://las.perkin-elmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FT-IRATR.pdf), pa je *ATR* metoda pogodna i za uzorke neprozirne za IC svetlost. *ATR* metoda se zasniva na refleksiji IC zraka na granici između *ATR* kristala sa visokim indeksom prelamanja i uzorka sa niskim indeksom prelamanja. Ova nova metoda se zasniva i na specifičnoj osobini totalne unutrašnje refleksije da proizvodi evanescentne (tranzientne, prelazne) IC svetlosne talase, koji se ne reflektuju od ispitivanog uzorka, nego prodiru u uzorak kao u tradicionalnoj IC metodi i apsorbuju se (Zadeh and Yaylayan, 2020). Zbog tih apsorbovanih evanescentnih (tranzientnih) talasa, unutrašnja refleksija nije totalna, već je ometena (oslabljena) i tako je nazvana. Dubina prodiranja evanescentnih talasa u uzorak je 0,5 – 2,0 mikrometra, zavisno od indeksa prelamanja *ATR* kristala i indeksa prelamanja uzorka, kao i od talasne dužine i upadnog ugla svetlosti.

Snop infracrvene svetlosti prolazi kroz *ATR* kristal na takav način da se nekoliko puta reflektuje od unutrašnje površine uzorka (Reignier et al., 2021). Broj refleksija može da varira promenom upadnog ugla i poželjno je da taj broj bude što veći, jer sa svim narednim udarima istog snopa IC svetlosti na uzorak, dobijaju



Slika 3. Šematski dijagram Michelsonovog interferometra konfigurisanog za FTIR.

a) Idealni Michelsonov interferometar;

b) Michelsonov interferometar sa pokretnim nagibom ogledala.

Nprekidne i isprekidane linije predstavljaju različite pravce svetlosti.

(Izvor: Chai et al., 2020)

Figure 3. Schematic diagram of a Michelson interferometer configured for FTIR.

a) Ideal Michelson interferometer;

b) Michelson interferometer with movable mirror tilt.

Solid and dashed lines represent different directions of light.

se novi podaci za izračunavanje srednje vrednosti (Dinache et al., 2021). Snop se po izlasku iz kristala odvodi na detektor i kao rezultat dobija se svojevrсни apsorpcioni spektar kao u tradicionalnoj infra-crvenoj spektroskopiji sa Furijeovom transformacijom (*Fourier transform infrared - FTIR- spectroscopy*) (Slika 3).

Tipični materijali za ATR kristale su germanijum, KRS-5 (talijum jodid ili talijum bromid) i cink selenid (ZnSe), dok je silicijum idealan za upotrebu u dalekoj IC oblasti elektromagnetnog spektra (zračenje sa talasnim brojem manjim od 200 cm^{-1}). Kada se proučavaju veoma tvrde, čvrste materije uzorka, odlična svojstva dijamanta čine ga idealnim materijalom za najskuplji ATR kristal. U našim istraživanjima koristili smo spektrometar “*Thermo Scientific™ Nicolet™ iS™10 FT-IR™*” spektrofotometar sa monolitnim dijamantskim kristalom “*Thermo Scientific™ Smart iTR™ diamond ATR crystal*” i sa integrisanim programima “*Thermo Scientific™ OMNIC™ Series Software*”, a ATR spektre dobijali smo već specijalno korigovane po algoritmu “*Advanced ATR correction Algorithm*”.

Rezultati i diskusija

Rezultati analize svih ATR spektralnih traka zrna i svih ATR spektralnih traka strukturnih delova zrna: endosperma, perikarpa i klice visokoprinosnog hibrida kukuruza ZP 677 dati su na slikama 4 - 7 i u tabelama 1 i 2.

ATR spektar zrna hibrida kukuruza ZP 677

Proučavani hibrid kukuruza ZP 677, je u dugom vremenskom periodu bio veoma tražen na domaćem tržištu zbog svog visokog potencijala rodnosti i visoke stabilnosti prinosa, a njegovo zrno se najčešće koristi za ishranu domaćih životinja. Zrno pomenutog hibrida je prethodno homogenizovano i pripremljeno (Radosavljević and Radenović, 2020) za registrovanje ATR spektra (Slika 4).

Kod standardnog IR spektrometra širokopojasni izvor emituje sve IC frekvencije u isto vreme u području bliskog IR u rasponu od 14000 do 4000 cm^{-1} . Srednji IR region je u rasponu od 4000 do 400 cm^{-1} , a daleki IR region u rasponu od 400 do 10 cm^{-1} . IR spektar se generiše kao dijagram intenziteta apsorpcije/propustljivosti u odnosu na talasni broj, koji

je proporcionalan energetskej razlici između osnovnog i pobuđenog vibracionog stanja (Amir et al., 2013; Hashimoto et al., 2019). Transmitanca svetlosti se može definisati kao odnos intenziteta upadne svetlosti i intenziteta svetlosti koja prolazi kroz medijum. Označava se sa T . Ukoliko sva svetlost koja pada na površinu objekta prođe kroz objekat, transmitanca je tada 100%, a apsorpcija će biti 0%.

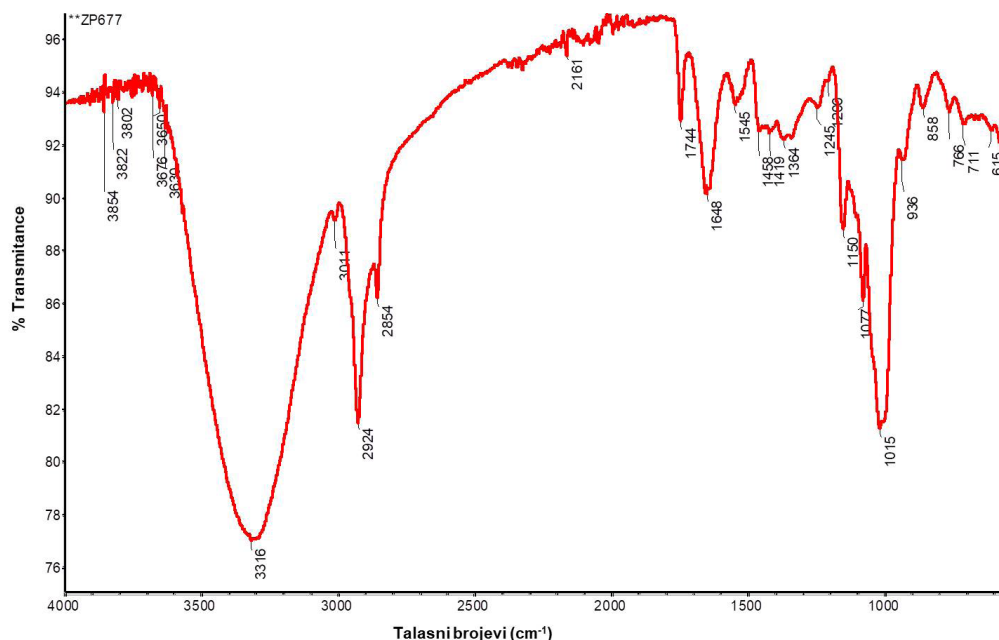
Ispitivani ATR spektar zrna hibrida kukuruza ZP 677 karakteriše 28 spektralnih traka, koje se međusobno razlikuju po intenzitetu, po kinetičkim formama i po mestu nastajanja u opsegu od 400 cm^{-1} do 4.000 cm^{-1} .

Po intenzitetu svih spektralnih traka, kako za zrno, tako i za endosperm, perikarp i klicu, trake su uslovno svrstane u četiri grupe, i to: spektralne trake vrlo velikog intenziteta od 20%T do 6,0%T, spektralne trake velikog intenziteta od 6,0%T do 3,0%T, spektralne trake malog intenziteta od 3,0%T do 1,0%T i spektralne trake vrlo malog intenziteta od 1,0%T do 0,2%T.

Po uslovnoj podeli, intenzitet ATR spektralnih traka zrna hibrida kukuruza ZP 677

može biti: vrlo veliki (ATR trake sa talasnim brojevima pikova: $3316, 2924, 1648$ i 1015 cm^{-1}), veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: $1648, 1150$ i 1077 cm^{-1}), mali (trake sa talasnim brojevima pikova: $2854, 2116, 1545$ i 858 cm^{-1}) i vrlo mali (ATR trake sa talasnim brojevima pikova: $3854, 3822, 3802, 3676, 3650, 3630, 3011, 1458, 1419, 1364, 1345, 1200, 936, 858, 766, 711, 615$ i 576 cm^{-1}), (Slika 4; Tabela 1 i 2).

Spektralne trake vrlo velikog i velikog intenziteta prvo su detektovane u našim radovima (Radenović et al., 2015a, 2015b, 2016). Međutim, u ovom radu, pored njih, u ATR spektru zrna hibrida ZP 677 registrovne su i spektralne trake malog i vrlo malog intenziteta, pojedinačno izdvojene ili grupisane i često kompleksne prirode. Ovakve spektralne trake u literaturi nisu ni pominjane, niti izučavane. Iz tih razloga, u fokusu ovoga rada, pored spektralnih traka sa vrlo velikim i velikim intenzitetom, posebno se razmatraju i spektralne trake malog i vrlo malog intenziteta, sa kompleksnim kinetičkim formama (Slika 4; Tabela 1 i 2).



Slika 4. ATR spektar zrna hibrida kukuruza ZP 677 sa svim spektralnim trakama
Figure 4. ATR spectrum of a kernel of the maize hybrid ZP 677 with all spectral bands.
X - axis: Wavenumbers (cm^{-1}), Y - axis: Transmittance (%)

Tabela 1. Karakteristike spektralnih traka ATR spektara zrna i strukturnih delova zrna: endosperma, perikarpa i klice kod hibrida kukuruza ZP 677.

Table 1. Characteristics of ATR spectral bands of grains and structural parts of grains: endosperms, pericarps and germs in maize hybrid ZP 677.

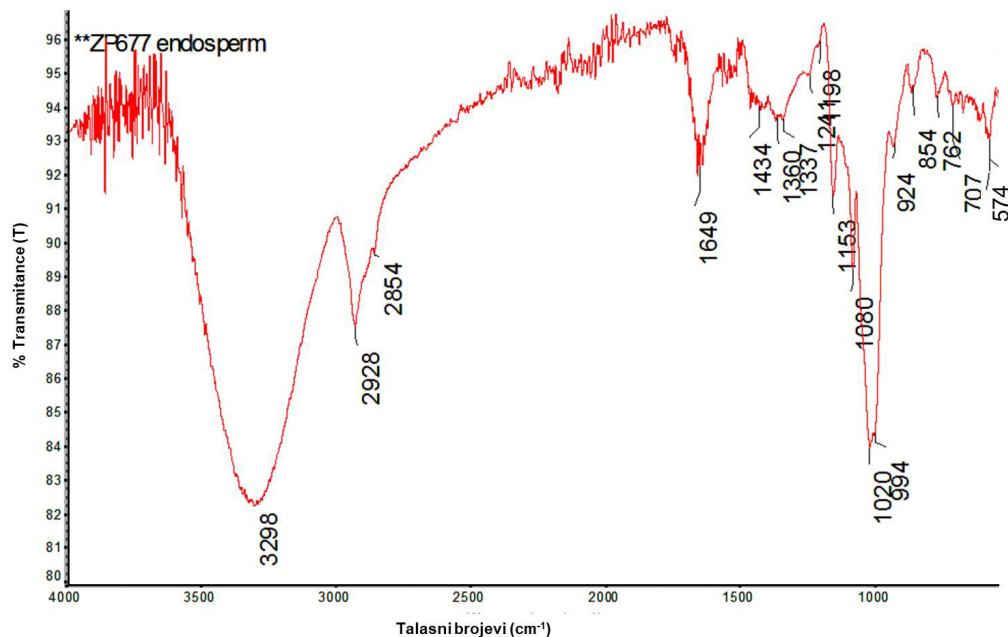
Redosled spektralnih traka	IST (%T)	TBPST (cm ⁻¹)	IST (%T)	TBPST (cm ⁻¹)	IST (%T)	TBPST (cm ⁻¹)	IST* (%T)	TBPST (cm ⁻¹)
	Zrno		Endosperm		Perikarp		Klica	
1.	0,2	3854	18,2	3298	18,4	3341	14,0	3298
2.	0,2	3822	5,1	2928	7,6	2917	2,0	3011
3.	0,2	3802	0,2	2854	0,2	2889	6,1	2958
4.	0,3	3676	6,1	2649	0,3	2822	11,9	2925
5.	0,3	3650	0,2	2434	5,9	1728	5,1	2850
6.	0,4	3630	0,2	2360	2,3	1632	13,9	1743
7.	16,5	3316	0,2	2337	0,2	1597	8,0	1651
8.	0,3	3011	0,2	1241	3,6	1524	2,0	1550
9.	9,9	2924	0,2	1198	1,4	1425	0,2	1462
10.	1,8	2854	7,8	1153	0,2	1368	0,2	1421
11.	1,6	2116	11,8	1080	2,6	1327	0,2	1401
12.	4,6	1744	0,2	1020	3,7	1149	0,9	1374
13.	6,1	1648	13,6	994	12,0	1033	4,2	1243
14.	1,8	1545	13,8	924	0,2	899	1,1	1163
15.	0,2	1458	1,6	854			0,3	1106
16.	0,3	1419	0,2	762			0,2	1075
17.	0,2	1364	0,4	707			0,3	1047
18.	0,2	1245	0,5	574			0,3	994
19.	0,2	1200					2,0	926
20.	7,1	1150					0,2	852
21.	4,5	1077					1,6	717
22.	7,9	1015						
23.	0,2	936						
24.	1,0	858						
25.	0,2	766						
26.	0,2	711						
27.	0,2	615						
28.	0,4	576						

ISP - Intenzitet spektralne trake; TBPST -Talasni broj pika spektralne trake; *Intenzitet spektralne trake (izražen u % Transmitance) je razlika u vrednosti (%T na ordinati) najniže tačke spektralne trake i vrednosti (%T na ordinati) najviše tačke spektralne trake (pik).

Tabela 2. Forme oscilovanja valentnih veza i molekularskih struktura funkcionalnih grupa organskih molekula u spektralnim trakama malog i vrlo malog intenziteta kod zrna hibrida kukuruza ZP 677 i delova zrna: endosperm, perikarp i klica.

Table 2. Forms of vibration movements of valence bonds and molecular structures of functional groups of organic molecules in spectral bands of low and very low intensity in grains of maize hybrid ZP 677 and in grain parts: endosperm, pericarp and germs.

Zrno	Talasni broj (cm ⁻¹)			Forme oscilovanja valentnih veza kod sledećih funkcionalnih grupa organskih molekula
	Endosperm	Perikarp	Klica	
3854	3298	3341	3298	
3822	2928	2917	3011	Alcohols, (O — — H)
3802	2854	2889	2958	Amines, (N — — H), (C — — H)
3676	2649	2822	2925	
3650	2434	1728	2850	Alkynes, (C ≡ ≡ N), (C ≡ ≡ C)
3630	2360	1632	1743	Ketones, (= = C = = O)
3316	2337	1597	1651	
3011	1241	1524	1550	Alkenes, (C = = C)
2924	1198	1425	1462	Ester, (O — — CH ₂ — —)
2854	1153	1368	1421	
2116	1080	1327	1401	Lipids, (C = = O)
1744	1020	1149	1374	Carbonyl group (C = = O) (ester)
1648	994	1033	1243	Amides, (N — — CH ₂ — —, (— — CO — — N = =))
1545	924	899	1163	
1458	854		1106	Nitrogen-hydrogen group, (— — NH — —)
1419	762		1075	Primary amines, (— — CONH ₂)
1364	707		1047	
1245	574		994	Carboxylic acids, (— — CO ₂ H)
1200			926	Imides, (— (— CO — — N — — CO — —))
1150			852	Acid chlorides, (— — COCl)
1077			717	
1015				Nitrites, (— — C ≡ ≡ N)
936				Amides, (N — — CH ₂ — —)
858				
766				Carbonyl group (C = = O) (amide)
711				Aliphatic carbon-hydrogen bond
615				
576				Aldehydes, (— — CHO)



Slika 5. ATR spektar endosperma zrna hibrida kukuruza ZP 677 sa svim spektralnim trakama.
 Figure 5. ATR spectrum of kernel endosperms of the maize hybrid ZP 677 with all spectral bands.

ATR spektar endosperma zrna hibrida ZP 677

Endosperm zrna je laboratorijskim postupkom izdvojen i homogenizovan čime je pripremljen za registrovanje ATR spektra sa svim spektralnim trakama (Slika 5; Tabela 1 i 2).

Registrovane su različite ATR spektralne trake endosperma u poređenju sa ATR spektralnim trakama zrna ovoga hibrida, kako po kinetičkoj formi, tako i po svom intenzitetu i mestu nastajanja u opsegu od 400 cm^{-1} do 4.000 cm^{-1} . Ustanovljen je različit intenzitet spektralnih traka endosperma i to: vrlo veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: 3298, 2649, 1153, 1080, 994 i 924 cm^{-1}), veliki (traka sa talasnim brojem pika: 2928 cm^{-1}), mali (traka sa talasnim brojem pika: 854 cm^{-1}) i vrlo mali (trake sa talasnim brojevima pikova: 2854, 2434, 2360, 2337, 1241, 1198, 1020, 762, 707 i 574 cm^{-1}) (Slika 5; Tabela 1 i 2).

ATR spektar perikarpa zrna hibrida ZP 677

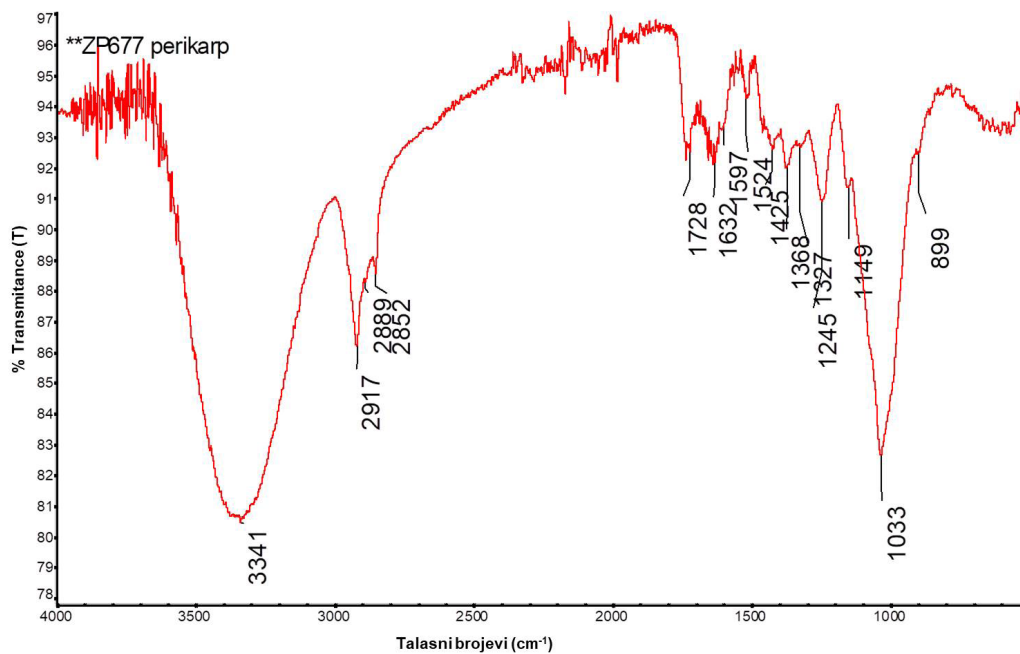
Za registrovanje ATR spektra sa svim spektralnim trakama, perikarp zrna hibrida kukuruza pripremljen je po identičnim postupcima kao i endosperm (Slika 6; Tabela 1 i 2).

Intenzitet spektralnih traka perikarpa zrna hibrida kukuruza ZP 677 može biti: vrlo veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: 3341, 2917 i 1033 cm^{-1}), veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: 1728, 1524 i 1179 cm^{-1}), mali (trake sa talasnim brojevima pikova: 1632, 1425 i 1327 cm^{-1}) i vrlo mali (trake sa talasnim brojevima pikova: 2889, 2822, 1597, 1368 i 899 cm^{-1}) (Slika 6; Tabele 1 i 2).

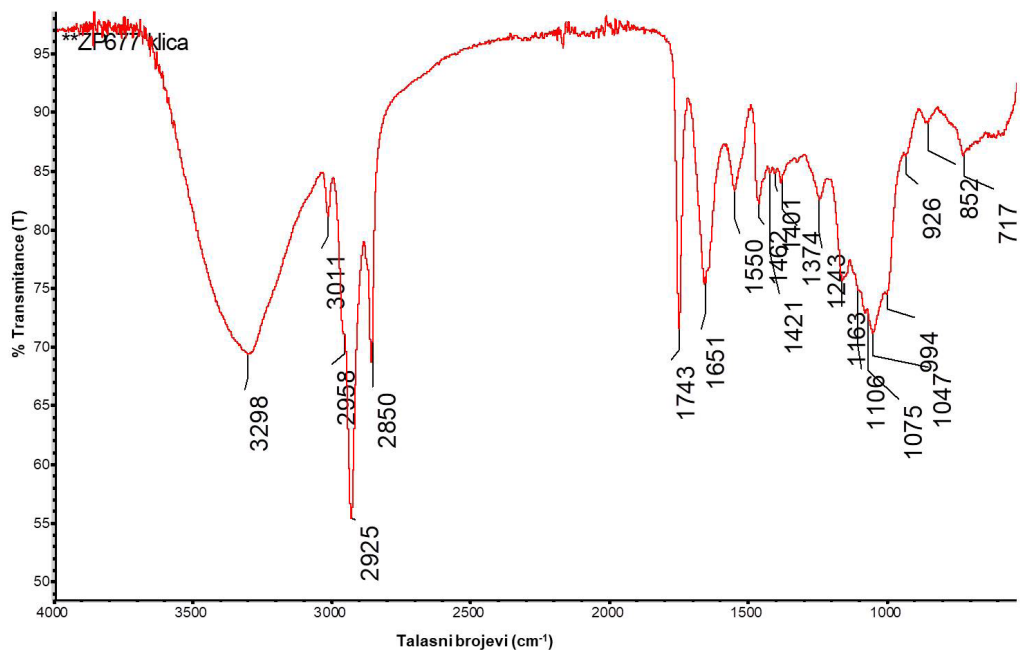
ATR spektar klice zrna hibrida kukuruza ZP 677

Pre registrovanja ATR spektra klice zrna hibrida kukuruza, izvršeno je identično pripremanje kao i kod perikarpa.

Na slici 7 primećuju se velike međusobne razlike ATR spektralnih traka klice, kako po



Slika 6. ATR spektar perikarpa zrna hibrida kukuruza ZP 677 sa svim spektralnim trakama.
Figure 6. ATR spectrum of kernel pericarps of the maize hybrid ZP 677 with all spectral bands.



Slika 7. ATR spektar klice zrna hibrida kukuruza ZP 677 sa svim spektralnim trakama.
Figure 7. ATR spectrum of kernel germs of the maize hybrid ZP 677 with all spectral bands.

intenzitetu traka, tako i po kinetičkoj formi i po mestu nastajanja u opsegu od 400 cm^{-1} do 4.000 cm^{-1} (Slika 7; Tabele 1 i 2). Intenzitet spektralnih traka klice zrna hibrida kukuruza ZP 677 može biti: vrlo veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: 3298, 2958, 2925, 1743 i 1651 cm^{-1}), veliki (trake sa talasnim brojevima pikova: 2958, 2850 i 1243 cm^{-1}), mali (trake sa talasnim brojevima pikova: 3011, 1550, 1163, 926 i 717 cm^{-1}) i vrlo mali (trake sa talasnim brojevima pikova: 1462, 1421, 1401, 1106, 1075, 1047, 994 i 852 cm^{-1}) (Slika 7; Tabele 1 i 2).

Kao što je već napomenuto, ATR spektralne trake vrlo velikog i velikog intenziteta zrna hibrida ZP 677 i strukturnih delova zrna: endosperma, perikarpa i kllice, daju mogućnost identifikacije organskih molekula i fragmenata koji su sadržani u njima, a to su: amini, proteini, lipidi, etri, šećeri, ketoni, aldehidi i drugi (Tabela 1). Pošto se radi o hibridu kukuruza koji je pouzdano proveren i veoma tražen za ishranu domaćih životinja, nije bez značaja i činjenica koja su sve organska jedinjenja sadržana u zrnu. Međutim, ATR spektralne trake malog i vrlo malog intenziteta, registrovane pri ispitivanju zrna hibrida kukuruza ZP 677 i strukturnih delova zrna, daju mogućnost identifikacije instrumentalno pobuđenih stanja valentnih veza i molekulskih struktura funkcionalnih grupa organskih molekula (Tabela 2). Ovako pobuđena stanja ispoljavaju se u vidu različitih oblika oscilatornog kretanja valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula. Poznati su razni oblici oscilovanja (vibracija) valentnih veza kao što su: simetrično i asimetrično oscilovanje valentnih veza i molekulskih struktura (stretching), deformaciono oscilovanje valentnih veza i molekulskih struktura (scissoring), ljuljanje valentnih veza i molekulskih struktura (rocking), mahanje valentnih veza i molekulskih struktura (wagging), izvrtnje valentnih veza i molekulskih struktura (twisting), kao i drhtanje, treperenje, trešenje valentnih veza i molekulskih struktura (trembling). Poslednji vid oscilatornog kretanja valentnih veza i molekulskih struktura (trembling), prvo je otkriven u medicini (Puschmann et al., 2011; Pan et al., 2020).

Međutim, u našim radovima takođe je zapažen ovaj oblik valentnih oscilacija kod spektralnih traka malog i vrlo malog intenziteta (Tabela 2), registrovanih pri IC ispitivanjima zrna kukuruza (Radenović et al., 2018; 2019; 2021).

Pretpostavlja se da spektralne trake malog i vrlo malog intenziteta, kompleksne prirode i sa različitim kinetičkim parametrima, daju mogućnost identifikacije nestabilnog (pobuđenog) stanja funkcionalnih grupa organskih molekula, njihovih fragmenata, ali i bioloških sistema (Kols et al., 1993; Radenović, 1998; Macura and Radenovic, 2016; Radenović et al., 2018; 2019; 2021). Treba napomenuti da su nestabilna stanja bioloških sistema (tkivo, ćelija, membrana), posledica pobuđenog stanja organskih molekula, fragmenata, radikala, atoma ili jona i da su ona neminovno uslovljena pojavom delovanja kinetičke energije i kao posledica tog njihovog različitog karaktera kretanja (oscilacije, vibracije, rotacije, translacije i drugi različiti oblici kretanja), može doći do smanjenja intenziteta potiranjem bliskih spektralnih traka ili do uvećavanja intenziteta superpozicijom bliskih spektralnih traka, a često i do nejednakih kinetičkih formi spektralnih traka i do različitih mesta nastajanja traka na skali talasnih brojeva. Ovakvo ponašanje prvenstveno se sreće kod spektralnih traka zrna, endosperma, perikarpa i kllice sa malim i vrlo malim intenzitetom. Slični mehanizmi se dešavaju i kod različitih procesa oscilatornog transporta jona kroz pobuđenu ćelijsku i tilakoidnu membranu (Kols et al., 1993; Radenović 1998; Radenović et al., 2018; 2019; 2021).

Imajući u vidu sve navedeno, moguće je postaviti nekoliko karakterističnih pitanja: 1) Kako doći do pouzdanog saznanja o postojanju organskih molekula, a možda i njihovih fragmenata, čija priroda i aktivnost uslovljava nastajanje spektralnih traka zrna, endosperma, perikarpa i kllice malog i vrlo malog intenziteta, različite kinetičke forme, nejednakog mesta nastajanja? 2) Kako doći do pouzdanog saznanja o formama različitog vibracionog kretanja valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula (Radenovic et al., 2018, 2019, 2021) (Slika 4 – 7; Tabela 2)? 3)

Kakva je priroda nastajanja pobuđenog stanja funkcionalnih grupa, a moguće i molekulskih struktura, čije valentne veze poprimaju različito oscilatorno kretanje, što se neminovno prenosi na spektralne trake zrna, perikarpa, endosperma i klice koje su malog i vrlo malog intenziteta i koje nastaju na talasno određenim domenima infracrvenog spektra? Još se može analizirati i distribucija domena nastajanja spektralnih traka vrlo velikog, velikog, malog i vrlo malog intenziteta u zavisnosti od objekta registrovanja infracrvenog ATR spektra zrna, endosperma, perikarpa i klice. Takođe, diskutabilno je i pitanje distribucije domena nastajanja malih i vrlo malih spektralnih traka. Ono ima bar dva svoja aspekta. Prvi se odnosi na funkcionalnu ulogu koju pojedini strukturni delovi zrna imaju u sklopu ostvarivanja životnih funkcija (Radenović et al., 2018), a drugi aspekt se odnosi na kvalitet strukturnih delova zrna i konačno na potrebu strukturnih delova zrna u ishrani domaćih životinja (Radenović et al., 2021, 2019).

Zaključak

Primenom ATR metode IC spektroskopije vršeno je registrovanje i svestrano proučavanje vrlo velikih, velikih, malih i vrlo malih spektralnih traka zrna, endosperma, perikarpa i klice, hibrida kukuruza ZP 677, u objektima pogodnim za ishranu domaćih životinja.

Na osnovu svih izvršenih proučavanja može se konstatovati da IC ATR spektre zrna hibrida kukuruza i IC ATR spektre strukturnih delova zrna: endosperma, perikarpa i klice, karakterišu specifične spektralne trake, determinisane brojem traka u spektru, intenzitetom, kinetikom i distribucijom mesta nastajanja traka, u opsegu talasnog broja od 400 cm^{-1} do 4.000 cm^{-1} . Navedeni parametri su u celosti ispitivani, kako za zrno, tako i za strukturne delove zrna.

Ustanovljeno je da su se spektralne trake vrlo velikog i velikog intenziteta odlikovale po različitom ukupnom broju koji se najčešće kretao od 3 do 5, različitom intenzitetu i kinetičkoj formi, kao i različitom distribucijom

mesta nastajanja u domenu talasnih brojeva spektra. Ove spektralne trake omogućavaju da se identifikuju organska jedinjenja, njihovi fragmenti i molekulske strukture koje ih određuju. Identifikovana su sledeća organska jedinjenja: proteini, karotenoidi, lipidi, celuloza, karboksilne kiseline, etri, amino-kiseline, proteinski amidi, alkani, šećeri, ugljeni hidrati, ketoni, alkoholi, fenoli, aldehidi i amini.

Ispitujući spektralne trake zrna i strukturnih delova zrna, malog i vrlo malog intenziteta, ustanovljeno je da su one određene sledećim parametrima: brojem, intenzitetom, distribucijom mesta nastajanja na skali talasnih brojeva, kao i frekvencijom oscilovanja valentnih veza funkcionalnih grupa i molekulskih struktura organskih molekula. Spektralne trake malog i vrlo malog intenziteta, daju mogućnost identifikovanja pobuđenog stanja molekulskih struktura i valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula.

Pobuđeno stanje molekulskih struktura i valentnih veza funkcionalnih grupa organskih molekula ispoljava se u različitim oblicima oscilatornog kretanja valentnih veza, što je potvrđeno i našim istraživanjima.

Navedeni su primeri funkcionalnih grupa organskih molekula u kojima se javljaju sva pomenuta pobuđena stanja molekulskih struktura i valentnih veza.

Zahvalnica

Istraživanja navedena u ovom radu su delom finansirana od strane Instituta za kukuruz „Zemun Polje“ - Beograd i Fakulteta za fizičku hemiju Univerziteta u Beogradu, a delom od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (grant br. 451-03-68/2022-14/200040).

Literatura

About SA, Altemimi AB, R S Al-Hilphy A, Yi-Chen L, Cacciola FA (2019): Comprehensive Review on Infrared Heating Applications in Food Processing. *Molecules*, 24(22): 4125.

- Amir RM, Anjum FM, Khan MI, Khan MR, Pasha I, Nadeem M (2013): Application of Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat. *J. Food Sci. Technol.*, 50: 1018-1023.
- Charter FC, Lange H, Ley VS, Baxendale RI, Wittkamp B, Goode GJ, Gaunt LN (2010): *Organic Process Research & Development*, 14 (2): 393-404.
- Chai J, Zhang K, Xue Y, Liu W, Chen T, Lu Y, Zhao G (2020): Review of MEMS Based Fourier Transform Spectrometers. *Micromachines*, 11: 214.
- Dinache A, Pascu M-L, Smarandache A. (2021): Spectral Properties of Foams and Emulsions. *Molecules*, 26(24):7704.
- Greener J, Abbasi B, Kumacheva E. (2010): Attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy for on-chip monitoring of solute concentrations. *Lab Chip*. 10(12):1561-6.
- Hashimoto K, Badarla VR, Kawai A, Ideguchi T (2019): Complementary Vibrational Spectroscopy. *Nat. Commun.*, 10: 4411.
- Jackson M, Mantsch HH (2006): Infrared spectroscopy, ex vivo tissue analysis. In *Biomedical Spectroscopy. Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp.131-156, John Wiley & Sons Ltd.
- Kols OR, Maksimov GV, Radenovich ChN (1993): *Biophysics of Rhythmic Excitation*. Moscow: Publishing. Moscow State University [in Russian].
- Larkin P (2011): *Infrared and Raman Spectroscopy*, Elsevier - Oxford, ISBN: 978-0-12-386984-5.
- Maciejewski K and Chomicz-Kowalska A (2021): Foaming Performance and FTIR Spectrometric Analysis of Foamed Bituminous Binders Intended for Surface Courses. *Materials*, 14: 2055.
- Macura S and Radenović Č (2016): In order to acquire better knowledge of a biological system, besides the genome and proteome it is necessary to know its metabolome, i.e. concentrations of all metabolites and their interactions, *Written Correspondence, Mayo Clinic, Rochester & Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade*.
- Nickolov ZS, Paruchuri V, Shah DO, Miller JD (2004): FTIR-ATR Studies of Water Structure in Reverse Micelles during the Synthesis of Oxalate Precursor Nanoparticles. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, 232: 93-99.
- Pan MK, Li YS, Wong SB, Ni CL, Wang YM, Liu WC, Lu LY, Lee JC, Cortes EP, Vonsattel JG, Sun Q, Louis ED, Faust PL, Kuo SH. (2020): Cerebellar oscillations driven by synaptic pruning deficits of cerebellar climbing fibers contribute to tremor pathophysiology. *Sci Transl Med.*, 15; 12(526) : eaay 1769.
- Puschmann A, and Wszolek ZK (2011): Diagnosis and treatment of common forms of tremor. *Seminars in neurology*, 31(1): 65-77.
- Radenovich CH, Maksimov GV, Tutyaev EV, Shutova VV, Delich N, Chamdzhia Z, Pavlov J, Jovanovic J (2016): Identification of organic compounds in corn hybrids (*Zea mays* L.) of Serbian breeding using infrared spectra. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*, 51(5): 645-653 [in Russian].
- Radenović Č (1998): Transport Processes Across the Membrane. In: *Contemporary Biophysics, Velarta*, pp 1-90, Belgrade.
- Radenović ČN, Maksimov GV, Grodzinskij DM (2015a): Identification of Organic Molecules in Kernels of Maize Inbred Lines Displayed with Infrared Spectra. *Fisiol. rast. genet.*, 47(1): 15-24.
- Radenović ČN, Maksimov GV, Tyutyaev EV, Syusin IV, Shutova VV., Secanski MD, Srdić JŽ, Videnović ŽV, Popović AS (2015b): Structural Properties of Maize Hybrids Established by Infrared Spectra, *Matica srpska J. Nat. Sci.*, 129: 35-44.
- Radenović ČN, Maksimov GV, Shutova Slatinskaya OV, Protopopov FF, Delić NS, Grčić NM, Pavlov JM, Čamdžija ZF (2019): Complete study of nature and importance of spectral bands contained in infrared spectra of leaves of maize inbred lines with significant breeding properties. *Russian Agricultural Sciences*, 45(4): 334-339.
- Radenović ČN, Maksimov GV, Shutova VV, Delić NS, Milenković MV, Pavlović MD,

- Beljanski MV (2018): The study by the methods of infrared spectroscopy of the stretching and twisting vibrations of chemical bonds in functional groups of organic compounds contained in grains of maize inbred lines. *Fisiol. rast. genet.*, 50(4): 322-330.
- Radenović ČN, Maksimov VG, Bajuk Bogdanović D, Hao J, Radosavljević MM, Delić N, Čamdžija FZ (2021): The infrared spectrum of the ultra quality maize hybrid preferable for human consumption: the identification of organic molecules and excited state of functional groups in spectral bands of the kernel, endosperm, pericarp and the germ. *Фізіологія рослин і генетика*, 53(4): 279-291.
- Radenović, ČN, Delić, NS, Radosavljević MM, Jovanović ŽV, Sečanski MD, Popović AS, Crevar MS, Radosavljević ND (2021a): High-yielding and chemically enriched maize hybrids bred in Serbia - the best basis for super quality feed and food. *Military technical courier*, 69(1): 114-147.
- Radosavljević M, Bekrić V, Božović I, Jakovljević J (2000): Physical and chemical properties of various corn genotypes as a criterion of technological quality. *Genetika*, 32(3): 319-329.
- Radosavljević M and Radenović Č (2020): Laboratory procedures and operating techniques for the extraction of endosperms, pericarps and germs from kernels of maize hybrids. Internal publication of the Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade, pp. 1-3.
- Reignier J, Méchin F, Sarbu A, (2021): Chemical Gradients in PIR Foams as Probed by ATR-FTIR Analysis and Consequences on Fire Resistance. *Polym. Test.*, 93: 106972.
- Tarasevich BN (2012): IR spectra of the main classes of organic compounds. Moscow: Publishing. Moscow State University [in Russian].
- Vasiliev AV, Grinenko EV, Schukin AO, Fedulina TG (2007): Infrared spectroscopy of organic and natural compounds. St. Petersburg: St. Petersburg. Gos. Forestry technical. Acad.
- Zadeh RG, Yaylayan V (2020): Monitoring of methylglyoxal/indole interaction by ATR-FTIR spectroscopy and qTOF/MS/MS analysis. *Curr Res Food Sci.*, 23(3): 67-72.

ASSAYING OF STRUCTURAL PARTS OF HYBRID ZP677 GRAIN BY IC METHOD DISORDERED TOTAL REFLECTION

Čedomir Radenović, Danica Bajuk Bogdanović, Milica Radosavljević,
Nenad Delić, Aleksandar Popović, Mile Sečanski, Miloš Crevar

Summary

In this paper, the grain and structural parts of the grain of maize hybrid ZP 677 were studied, using Infrared Spectroscopy - Attenuated Total Reflectance (ATR). The ATR spectra of grain, endosperm, pericarp and germ of maize hybrid are characterized by a number of bands, band intensity, band kinetics and band location distribution in the wavelength range 400 cm⁻¹ to 4000 cm⁻¹. These parameters were specifically tested for both, the grain and the endosperm, pericarp and germ. Spectral bands that are very high and high intensity usually range from 3 to 5, characterized by different intensity, kinetic forms, as well as by the distribution of origin in the wavelength range. These spectral bands enable the identification of the following organic compounds: proteins, carotenoids, ethers, cellulose, lipids, carboxylic acids, amino acids, protein amides, alkanes, sugars, carbohydrates, ketones, alcohols, phenols, aldehydes and amines. Spectral bands of grains, endosperm, pericarp and germs that are low and very low intensity are also characterized by the number of bands, low bandwidth, distribution of the place of origin, and especially by the oscillation frequency of valence bonds of functional groups of organic molecules. Spectral bands that are low and very low intensity enable the identification of organic molecules, compounds and their fragments, as well as the identification of various forms of excited states of molecular structures and excited states of valence bonds of organic molecules.

The excited state of molecular structures and the excited state of valence bonds of functional groups of organic molecules are manifested in various forms of oscillatory motion. Examples of functional groups of organic molecules in which all the mentioned excited states of molecular structures and excited states of valence bonds occur are alcohols, amines, alkynes, ketones, alkenes, ester, lipids, carbonyl group (ester), amides, nitrogen-hydrogen group, (NH), primary amines, carboxylic acids, amides, acid chlorides, nitrites, amides, carbonyl group (amide), aliphatic carbon-hydrogen bond and aldehydes.

Key words: endosperm, infrared spectrum, pericarp, germ, spectral band, *Zea mays* L.

Primljen: 08.03.2022.

Prihvaćen: 05.04.2022.