

PROMENE POLIPEPTIDNE STRUKTURE SOJINOG PROTEINSKOG IZOLATA PRI TERMIČKOJ INAKTIVACIJI ANTINUTRITIVNIH KOMPONENTI

Dragutin P. Veličković, Biljana V. Vucelić-Radović, Miroљjub B. Barać, Sladjana P. Stanojević

Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj nadpritiska 0,5 bara, radne temperature 96°C u trajanju od 5, 10 i 15 minuta u autoklavu na promene polipeptidne strukture dobijenih proteinskih izolata iz lomљeng sojinog zrna. Potvrđena je termostabilnost molekula glicinina (47,14-53,08%), i manja stabilnost β -konglicinina (15,31-25,45%). Denzitometrijska analiza SDS-elektroforegrama ukazuje na izraženu termostabilnost kiselih $A_{1,2,4}$ (27,50-26,31%) i baznih $B_{1,2,3,4}$ (18,24-15,12%) polipeptida glicinina. Sadržaj α -polipeptida β -konglicinina pokazuje linearnu zavisnost od trajanja primenjenih tretmana (10,92-8,99%). Nakon ovih tretmana zapažena je smanjena tripsininhitorska aktivnost (TIA), pri čemu je nosilac TIA Kunitz-ov TI (5,00-8,80%), dok je Bowman-Birk-ov inhibitor registrovan samo kod izolata iz netretiranog lomљenog sojinog zrna (3,92%).

KLJUČNE REČI: *soja, proteinski izolat, autoklav, antinutritivne komponente, β - i γ -konglicinin, glicinin, SDS-PAGE*

UVOD

Soja predstavlja važan izvor biološki vrednih proteina, bogatih esencijalnim aminokiselinama, što im daje veću upotrebnu vrednost u odnosu na većinu drugih proteina biljnog porekla. Soja se u prehrambenoj industriji koristi kao izvor proteina u obliku brašna, griza, koncentrata i izolata. Medjutim, šira primena soje i proizvoda na bazi proteina soje ograničena je prisustvom komponenti proteinske strukture sa antinutritivnim dejstvom, kao što su inhibitori proteinaza i lektini. Danas su poznate metode za uklanjanje njihove aktivnosti, koje su uglavnom odnose na primenu različitih temperaturnih vrednosti.

Termička obrada proteina soje na temperaturama iznad 70°C, pored uklanjanja aktivnosti inhibitora proteinaza, dovodi do promene u nativnoj strukturi i osobina glavnih globulinskih frakcija, a time i tehnoloških karakteristika, što je potrebno detaljnije definisati.

Termički tretman ekstrakta proteina uzrokuje najmanje tri istovremene, promene - disocijaciju 7S i 11S proteina na podjedinice (narušavanje kvaternerne strukture), narušavanje

Dr. Dragutin P. Veličković, redovni profcсор., Dr. Biljana V. Vucelić-Radović, vanredni profesor., mr. Miroљjub B. Barać, asistent., mr. Sladjana P. Stanojević, asistent., Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Jugoslavija.

sekundarne strukture disosovanih podjedinica i reasocijaciju denaturisanih podjedinica u rastvorljive i nerastvorljive agregate (1).

Nakon tretmana sojinog brašna u autoklavu (100°C) u trajanju od 15, 30 i 45 minuta, pri atmosferskom pritisku, najizraženiju termostabilnost pokazuje glicinin (32,29-34,09%) i β -konglicinin (29,69-24,51% - zavisno od dužine trajanja tretmana), (2). Usled tretmana, delimično samlevenog semena soje, vodenom parom pod povišenim pritiskom (0,5; 1 i 2 bar) kao jednim od mogućih rešenja termičke inaktivacije tripsin inhibitora, Veličković i saradnici u svojim radovima (3,4) ističu veću otpornost dominantnih proteina, kao i različit karakter promene glicinina i β -konglicinina. Elektroforetska analiza polipeptidnog sastava proteina ovih uzoraka ukazala je na izraženu termostabilnost kiselih i baznih polipeptida glicinina.

U nama dostupnoj literaturi, nisu prisutni podaci o promenama sojinog proteinskog izolata pripremljenog od prethodno tretiranog uzorka, već se eventualne modifikacije pripreme izolata (dodavanje aditiva, toplotni tretman ...) vrše pre sušenja dobijenog precipitata. U ovom radu smo želeli da ispitamo uticaj tretiranja lomljenog sojinog zrna na promenu polipeptidne strukture sojinog proteinskog izolata, a u cilju inaktivacije tripsin inhibitora, u autoklavu pri nad pritisku - 0,5 bar i kraćim vremenskim intervalima - 5,10 i 15 minuta.

EKSPERIMENTALNI DEO

U ovom radu je korišćena semenska sorta soje Hodgson, zrno soje je lomljeno do veličine 1/6-1/10 semena, a zatim je hladnom strujom vazduha odstranjena semenjača. Lomljeno zrno je, u jednom sloju, zagrevano u laboratorijskom autoklavu na radnoj temperaturi 96°C i nad pritisku 0,5 bar u trajanju od 5,10 i 15 min. Usitnjavanje je vršeno do veličine čestica tako da 80% prolazi kroz sito od 80 mesh. Ova punomasna brašna su zatim obezmaščena imerzionim postupkom (u trajanju od 1 sata i 30 min., pri odnosu n-heksana i brašna - 1: 20, uz stalno mešanje i zagrevanje do maksimalne temperature od 40°C). Sojino brašno je odvojeno od rastvarača cedjenem pod sniženim pritiskom.

Od ovako dobijenog sojinog brašna pravljene su proteinski izolati po modifikovanoj metodi Johnson-a i Kikuchi-a (5). Aktivnost inhibitora određena je modifikovanom standardnom analitičkom metodom po Liu-u i Markakis-u (6) i izražena u procentima, pri čemu je smatrano da netretirani proteinski izolat poseduje 100% aktivnosti. Rastvorljivi proteini određeni su metodom Lowry-a i saradnika (7).

Osnovne komponente rastvorljivih proteina, kao i njihova različita otpornost pri zagrevanju utvrđene su poliakrilamidnom gel- elektroforezom u nativnim uslovima (PAGE), prema Davis-u i Ornstein-u (8). Kompleksna struktura, kao i heterogenost u pogledu karakteristika polipeptida koji ulaze u sastav glavnih proteina, kao i njihovu strukturu i promene nastale tokom tretmana utvrđene su poliakrilamidnom gel- elektroforezom u disociacionim uslovima (SDS-PAGE), prema Fling-u i Gregson-u (9).

Korišćen je vertikalni uredjaj LKB 2001-001 VEU, sa izvorom napona Macrodrive 5 i rashladnim uredjajem Multitemp II (LKB, Sweden). Obojeni gelovi skenirani su na laserskom denzitometru Ultra Scan XL, istog proizvođača. Denzitometrija je vršena uz primenu SigmaGel softvera, (Jandel, Nemačka)

REZULTATI I DISKUSIJA

Prvih 5 minuta tretmana dovodi do smanjenja prinosa izolata od 34,67% - za netretirani

uzorak, do 18,36%, što je praćeno smanjenjem inhibitorne aktivnosti od 72,34% do 41,11%. Pri dužim tretmanima (10 i 15 min.) dolazi do zanemarljivog smanjenja inhibitorne aktivnosti (41,02%), ali se prinos smanjuje i opada do 13,18% i 9,42% (Tabela 1, prinos izolata je računat u odnosu na suhu supstancu obezmašćenog brašna). Sadržaj rastvorljivih proteina ne pokazuje proporcionalnu zavisnost od dužine tretmana. Najveći sadržaj rastvorljivih proteina zadržava izolat pripreman nakon 10 minuta tretmana (99,7%).

Denzitometrijskom analizom elektroforegrama nakon elektroforeze u nativnim uslovima kao nosilac TIA registrovan je Kunitz-ov tripsin inhibitor (8,80-5,00%); dok Bowman-Birk-ov inhibitor, koji se ekstrahuje sa rastvorljivim proteinima nativnog izolata u količini od 3,92%, nije registrovan ni u jednom od izolata od tretirane soje (Tabela 1).

Tabela 1. Promena tripsininhibitorske aktivnosti* i proteinskog sastava** izolata od tretirane soje (%)

uzorak komponenta	t r e t m a n u a u t o k l a v u			Netretirano
	5 min.	10 min.	15 min.	
TIA	41,11	41,02	41,02	72,34
KTI	8,80	5,16	5,00	4,49
BBI	/	/	/	3,92
rastvorljivi proteini	87,5	99,7	59,9	82,2
prinos	18,36	13,18	9,42	34,67
β-konglicinin	15,31	25,45	19,45	25,88
glicinin				
dimer	11,84	15,95	15,21	17,78
monomer	20,74	24,44	23,25	24,43
γ-konglicinin	14,59	20,31	18,67	14,86
mali fragmenti	15,07	3,86	6,15	/

* Vrednosti su dobijene denzitometrijskom analizom PAGE-gelova (*10, **11).

Sadržaj 7S kao i 11S-frakcije u proteinskim ekstraktima ovih izolata (29,90-45,76% i 32,58-40,39%) u saglasnosti je sa literaturnim podacima, naime, čine oko 1/3 ukupnih proteina (12), (Tabela 1). Pojava proteinskih fragmenata male molekulske mase (20 000-14 000) posledica je primenjenih termičkih tretmana (15,07-3,86%) obzirom da u proteinskim izolatima od netretirane soje nisu registrovani, (Tabela 1). Prisustvo ovih komponenti ograničava primenu ovih izolata kao emulgatora.

Poliakrilamidna-gel elektroforeza u disocijacionim uslovima pripremljenih izolata ukazuje na najmanju otpornost lipoksigenaze nakon ovih tretmana. Odsustvo polipeptida lipoksigenaze uočeno je već posle 5 minuta tretmana. Iako ne pokazuje bitno učešće u polipeptidnom sastavu dobijenih izolata, β-amilaza je ipak registrovana sa 0,30-0,86%, (Tabela 2).

Tabela 2. Polipeptidni sastav Tris-ekstrakta priteinskih izolata od termički tretirane soje (%)

uzorak komponenta	tretman u autoklavu			
	5 min.	10 min.	15 min.	netretirano
lipoksigenaza	/	/	/	0,85
β-konglicinin				
α'	5,87	5,78	5,52	4,74
α	10,92	11,49	8,99	11,82
β	3,71	4,41	5,24	2,70
β'	3,11	2,98	0,51	2,71
γ-konglicinin	1,88	2,58	2,60	1,45
β-amilaza	0,30	0,59	0,86	1,18
glicinin				
A ₃	3,65	3,76	5,24	3,63
A _{1,2,4}	26,31	27,50	27,38	24,91
A ₇	0,70	0,54	1,93	2,70
A ₆	0,32	0,22	0,29	1,60
B _{1,2,3,4}	17,48	15,12	18,24	20,30
SBA	2,36	2,87	2,46	1,96
A₅/H_{1,11}/TI	/	/	/	17,33
i mali	11,98	9,72	12,47	/
fragmenti	6,21	6,00	7,07	/

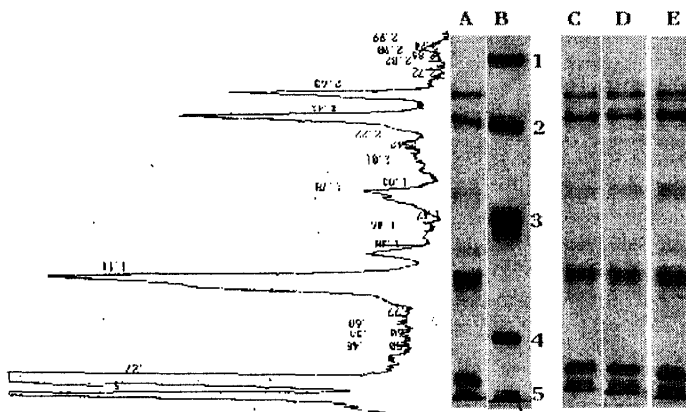
* Sve vrednosti su dobijene nakon denzitometrijske analize SDS-PAGE-gelova

Kisele podjedinice glicinina znatno učestvuju u proteinskom sastavu ovih izolata, nema velikog odstupanja u njihovoj zastupljenosti u zavisnosti od tretmana (30,02-30,98%), pri čemu je najdominantnija komponenta molekulske mase 36100 (A_{1,2,4}-podjedinice - 26,31-27,50%). Takođe, bitno učešće u polipeptidnom sastavu dobijenih izolata imaju i komponente molekulske mase 21100 (bazne podjedinice glicinina - B_{1,2,3,4} -15,12-18,24%, Slika 1). Ovo potvrđuje veliku termostabilnost glicinina (47,14-53,08%), što omogućuje njegova kompaktna kvaternerna struktura, stabilizovana velikim brojem disulfidnih, vodikovskih, elektrostatičkih i hidrofobnih veza.

Imajući u vidu rezultate poliakrilamidne gel-elektroforeze u nativnim uslovima o količini tripsin inhibitora u ovim uzorcima, (Tabela 1), može se uočiti da poliakrilamidnom gel-elektroforezom proteinske smeše u ispitivanim disocijacionim uslovima (SDS-PAGE) nisu dobro razdvojene komponente malih molekulskih masa A₅, H_{1,11} i TI, (Tabela 2, Slika 1).

Uočena je različita otpornost podjedinica β -konglicina. Naime, β - (3,71-5,24%) i β' - (0,51-3,11%) - podjedinice ovog proteina pokazale su se osetljivije na primenjeni toplotni tretman u odnosu na α' - (5,52-5,87%) i α - (8,99-11,49%) - podjedinice, (Tabela 2).

Na elektroforegramima Tris-ekstrakta izolata uočava se bleda traka polipeptida molekulske mase 51000, koja odgovara γ -konglicinu, (Slika 1), čije učešće pokazuje blagi porast u zavisnosti od dužine tretmana (1,88-2,60%).



Slika 1. Elektroforetska i denzitometrijska analiza SDS-PAGE-gelova. A- izolat iz netretirane soje; B-standard molekulske masa: 1- 94 000, 2- 67 000, 3- 43 000, 4- 30 000, 5- 14 4000. Izolati iz tretirane soje u autoklavu 5 minuta-C, 10 minuta-D i 15 minuta-E

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti, da primenjeni tretman ima bitnog uticaja na pad tripsininhitorske aktivnosti već nakon 5 minuta (sa 72,34 na 41,11%), pri čemu je nosilac tripsininhitorske aktivnosti Kunitz-ov TI (5,00-8,80%). Dalje produženje tretmana nema bitnog praktičnog opravdanja, jer dolazi do znatno veće promene u prinosu izolata (18,36-9,42%) nego u tripsininhitorskoj aktivnosti (41,11-41,02%).

Kod dobijenih izolata je potvrđena temostabilnost glicinina i to naročito njegovih kiselih polipeptida (30,02-30,98%), pri čemu je najdominantnija komponenta molekulske mase 36000-A_{1,2,4} (26,31-27,50%).

Podjedinice β -konglicina (β , β' i α' , α), pokazuju različitu temostabilnost, pri čemu je najveću temostabilnost pokazala α -podjedinica ovog proteina (8,99-11,49%).

Pri ovim uslovima, kao najpovoljniji izolat mogao bi se izdvojiti izolat pripremljen od uzorka tretiranog 10 minuta: tripsininhitorska aktivnost ovog izolata je ista kao nakon 15 minuta tretmana (41,02%); pokazuje najveći sadržaj rastvorljivih proteina (99,7%); nema bitne razlike ni u zastupljenosti lektina (2,87%); učešće degradacionih produkata male molekulske težine je najniže (3,86%); odnos glicinina i β -konglicina je najpovoljniji, a prinos je zadovoljavajući (13,18%) - tako da se ovaj izolat može koristiti kao aditiv u cilju stabilizacije emulzija.

LITERATURA

1. Morr, C.V.: Current Status of Protein Functionality in Food Systems. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **67** (1990), 265-271.
2. Veličković, D., Vucelić-Radović, B., Barać, M., Simić, D. and N. Ristić: Characterization of The Change of Soybean Flour Protein Composition During Thermal Inactivation of Trypsin Inhibitors. *Rev. of Res. Work Fac. of Agri. Belgrade.* **39** (1994), 41-48.
3. Veličković, D., Vucelić-Radović, B., Barać, M., Simić, D. and N. Ristić: Effect of Soybean Flour Steaming on Polypeptide Content and Composition of Extractable Proteins. *Rev. of Res. Work Fac. of Agri. Belgrade.* **40** (1995-a), 145-153.
4. Veličković, D., Vucelić-Radović, B., Barać, M. i S. Stanojević: Uticaj pritiska vodene pare i dužine trajanja termičkog tretmana na proteinski sastav sojinog brašna. Monografija: Savremeni trendovi u prehrambenoj tehnologiji, ur. Obradović D.B., Janković M.A., Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, (1995-b), 226-237.
5. Johnson, D.W. and S. Kikuchi: Processing for Producing Soy Protein Isolates. *Proceedings of The World Congress: Vegetable Proteins, Utilisation in Human Foods and Animal Feed Stuffs*, ed. Applewhite, T.H. A.O.C.S., Champaign, USA, (1989), 66-77.
6. Liu, K., P. Markakis: An Improved Colorimetric Method for Determining Antitryptic Activity in Soybeans Products. *J. Biol. Chem.*, **66** (1989), 415-421.
7. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall: Protein Measurement with The Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193** (1951), 265-275.
8. Davis, J. and L. Ornstein: Disc Electrophoresis, Background and Theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121** (1964), 321-427.
9. Fling, S.P. and D.S. Gregersocn: Peptide and Protein Molecular Weight Determination by Electrophoresis Using a High Molarity Tris Buffer System without Urea. *Anal. Biochemistry*, **155** (1986), 83-88.
10. Veličković, D., Vucelić-Radović B., Barać, M. and S. Stanojević: Effect of Soybean Thermal Inactivation on Trypsin Inhibitor Activity of Protein Isolate. *Rev. of Res. Work Fac. Agr. Belgrade*, **42** (1997), 229-234.
11. Veličković, D., Vucelić-Radović B., Barać, M. and S. Stanojević: Characterization of The Composition of The Isolated Soybean Protein During Thermal Inactivation of The Tripsin Inhibitors. *Rev. of Res. Work Fac. Agr. Belgrade*, in press, (1999).
12. Wolf, W.J. and J.C. Cowan: Soybeans as a food source. *CRC Crit. Rev. Food Technol.*, **2** (1971), 81-86.

CHANGE OF SOYBEAN ISOLATE POYPEPTIDE COMPOSITION DURING THERMAL INACTIVATION OF TRYPSIN INHIBITORS

Dragutin P. Veličković, Biljana V. Vucelić-Radović, Miroљjub B. Barać, Sladjana P. Stanojević

The change of polypeptide composition of soybean isolates, prepared from samples treated by autoclaving in the aim of trypsin inhibitors inactivation (0.5 bar; 5, 10 and 15 min.) was investigated.

By densitometric analysis of SDS-PAGE-gels, the composition of soybean isolated protein was determined. According to our results, glycinin showed the highest content among proteins of soybean isolates. Depending on duration of soybeans heating, the percentage of glycinin in resulting isolate was 47.14-53.08%. High content of acidic (30.02-30.98%) and basic (15.12-18.24%) polypeptides of glycinin was registered. High content of α -subunit of β -conlycinin was determined (11.49-8.99%).

The presence of Bowman-Birk TI as well as lypoxigenase, was not registered in any of protein isolates.

Prispeo 26. novembra 1999.

Prihvaćen 11. januara 2000.