

Karakterizacija polipeptidnog sastava različitih genotipova soje

- Originalni naučni rad -

Mirjana PEŠIĆ, Biljana VUCELIĆ-RADOVIĆ i Miroљjub BARAĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd

Izvod: U radu je proučavan polipeptidni sastav rastvorljivih proteina tri genotipa soje - Nena, ZPS-015 i L91-4042. Utvrđivanje polipeptidnog sastava izvršeno je SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom i HPLC tehnikom. Polipeptidna analiza je pokazala da sorte soje ispoljavaju značajne genotipske razlike u strukturi proteina i proteinskog kompleksa. Najniži sadržaj dva glavna rezervna proteina soje, β -konglicinina i glicinina detektovan je kod sorte bez Kunitz-ovog tripsin inhibitora (19,49%, odnosno 42,13%) dok je kod sorte ZPS-015 uočen najviši sadržaj β -konglicinin (24,60%), a glicinina je bilo najviše kod genotipa Nena (45,06%). Kod sorte L91-4042 uočena je jedna polipeptidna frakcija čija je molekulska masa bliska γ -konglicininu, a nije prisutna kod ostala dva genotipa. Heterogenost sastava i sadržaja proteinskog kompleksa ispoljen je i kod manje zastupljenih proteinskih frakcija. Okarakterisane genotipske razlike u strukturi proteinskog kompleksa dovedene su u vezu sa ranijim istraživanjima veznim za proizvodnju sojinog sira. Utvrđeno je da na prinos i kvalitet sojinog sira utiče rastvorljivost proteina i odnos glicinin : β konglicinin.

Ključne reči: β -konglicinin, glicinin, polipeptidni sastav, proteini soje, rastvorljivost.

Uvod

Proteini soje odlikuju se visokom nutritivnom vrednošću i povoljnim funkcionalnim osobinama zbog čega su našli široku primenu u prehrambenoj industriji. Predstavljaju složen proteinski kompleks sastavljen od dva glavna rezervna proteina, β -konglicinina i glicinina, i više manje zastupljenih proteina kao što su γ -konglicinin, bazni 7S globulin i biološki aktivni proteini kao što su: tripsin inhibitori, lipoksigenaze i lektini. β -konglicinin i glicinin čine oko 70% rezervnih proteina soje, složene su, multimerne strukture velike molekulske mase. β -konglicinin (7S) je trimer koji sačinjavaju tri podjedinice α , α' i β . Utvrđeno je da se javlja u sedam polimorfni oblika : B₀, B₁, B₂, ..., B₆, pri čemu je svaki oblik sastavljen od istih ili kombinacije različitih podjedinaca.

Glicinin (11S) je heksamer sastavljen od šest podjedinica od kojih se svaka

sastoji od kiselog i baznog polipeptida koji su međusobno povezani disulfidnom vezom. Izolovano je sedam kiselih (A_{1a} , A_{1b} , A_2 , ... A_6) i pet baznih polipeptida (B_{1a} , B_{1b} , B_2 , ... B_4) koji su organizovani u pet glavnih podjedinica $A_{1a}B_2$, $A_{1b}B_{1b}$, A_2B_{1a} , $A_5A_4B_3$, A_3B_4 .

Savremena istraživanja ukazuju da soja sadrži širok spektar bioaktivnih jedinjenja koja su se pokazala kao vrlo efikasana u prevenciji bolesti srca, krvnih sudova i kancera, **Friedman i Brandon**, 2001, **Wang i Wixon**, 1999, što je svrstava u kategoriju funkcionalne hrane. Ovi rezultati su našli potvrdu u zvaničnom prihvatanju od strane američke FDA organizacija koja je u oktobru 1999. godine potvrdila da se konzumiranjem sojinih proteina može smanjiti rizik od srčanih bolesti. U skladu s tim, FDA je propisala da svaki proizvod od soje, koji pretenduje da nosi etiketu funkcionalna hrana, mora sadržati 6,25 g sojinih proteina po obroku, **FDA**, 1999.

Ovakav propis zahteva inkorporaciju daleko većih količina sojinih proteina u prehrambene proizvode od uobičajenih, čime se nameće niz problema u procesu proizvodnje funkcionalne hrane. Iznalaženje novih formi sojinih proteina sa jedinstvenom tehnološkom i nutritivnom funkcionalnošću bio bi pravac u kome treba ići.

Sastav i struktura proteinskog kompleksa određuju nutritivna, funkcionalna i tehnološka svojstva sojinih proteina, **Kwanyuen i sar.**, 1997, **Murphy i sar.**, 1997, **Tezuka i sar.**, 2000, **Riblett i sar.**, 2001. Znači od sadržaja i odnosa pojedinih frakcija, zatim sadržaja i odnosa pojedinih podjedinica unutar frakcija, potom od heterogenosti aminokiselinskog sastava, zavisice upravo navedena svojstva sojinih proteina. Prema tome, poznavanje proteinske strukture genotipova soje od velikog je značaja za preradu i primenu soje.

Cilj ovog rada bio je da se izvrši karakterizacija proteinskog i polipeptidnog sastava različitih genotipova soje i da se utvrdi uticaj sastava i strukture proteinskog kompleksa na funkcionalna i tehnološka svojstva sojinih proteina.

Materijal i metode

Za potrebe eksperimentalnog rada korišteni su različiti genotipovi soje dobijene od Instituta za kukuruz "Zemun Polje" i to: dve priznate sorte, Nena i ZPS-0.15, i jedna eksperimentalna linija L91-4042, bez Kunitz-ovog tripsin inhibitora.

Seme soje je mehanički oljušteno i samleveno u električnom mikseru i obezmašćeno imerznim postupkom n-heksanom. Rastvorljivi proteini obezmašćenog sojinog brašna ekstrahovani su metodom po **Than**-u i **Shibasaky**-u, 1976.

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je metodom po **Lowry**-u i **sa**, 1951, sa albuminom goveđeg seruma kao standardom. Rastvorljivost proteina je okarakterisana kao procentualni udeo rastvorljivih proteina u odnosu na sadržaj ukupnih proteina određenih metodom po Kjeldal-u.

SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza izvedena je prema metodi **Flinga**-a i **Gregerson**-a, 1986. Odbojeni gelovi, dobijeni poliakrilamidnom gel elektroforezom,

skenirani su PC-skenerom tipa Mustec 12000 SP (Mustec, Germany) i denzitometrirani SigmaGel programom verzija 1.1 (Jandel Scientific).

Karakterizacija proteina primenom HPLC tehnike rađena je gel filtracionom metodom (Vucelić-Radović, 1992., Barać, 2002.) na hromatografskom aparatu firme Waters (*Waters Chromatography Division of Millipore, Milford, USA*). Statistička obrada podataka rađena je u programu Statistica ver. 5.0

Rezultati i diskusija

Sadržaj rastvorljivih proteina brašna ispitivanih sorti i rastvorljivost proteina prikazana je u Tabeli 1. Sorta ZPS-015 pokazuje najveći sadržaj rastvorljivih proteina i najveću rastvorljivost koja se statistički značajno razlikuje (na nivou $p < 0.05$) od vrednosti dobijenih za obe sorte.

Tabela 1. Sadržaj rastvorljivih proteina i rastvorljivost
Soluble Protein Contents and Solubility

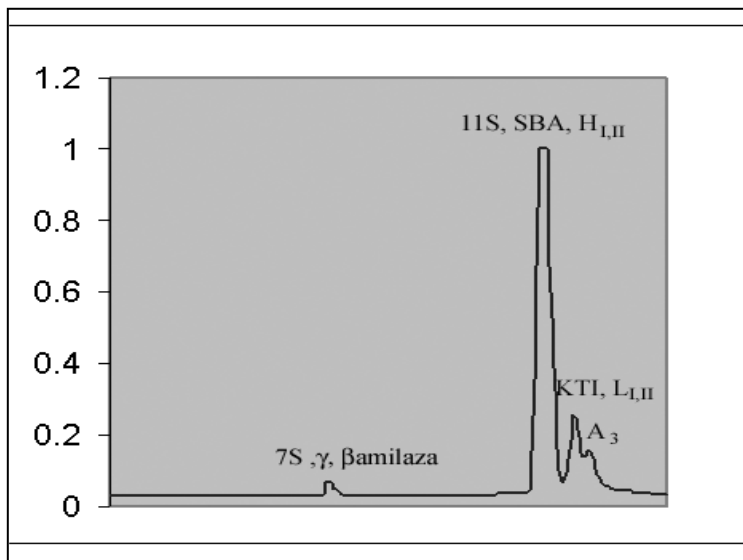
Genotip Genotype	Rastvorljivi proteini Soluble proteins		Ukupni proteini (%Nx6.25) Total proteins	Rastvorljivost % Solubility	Vlaga % Moisture
	mg/ml	mg/g			
L91-4042	17,75±0,08 ^{a†}	399,28±1,00	45,88±0,13 ^a	87,02 ^a	11,09
ZPS-015	19,79±0,76 ^b	432,86±16,7	48,86±0,13 ^b	88,59 ^b	8,58
Nena	17,98±0,40 ^a	408,30±9,1	47,16±0,14 ^b	86,78 ^a	11,92

[†]Srednje vrednosti sa istim slovom statistički se značajno ne razlikuju ($p < 0,05$)

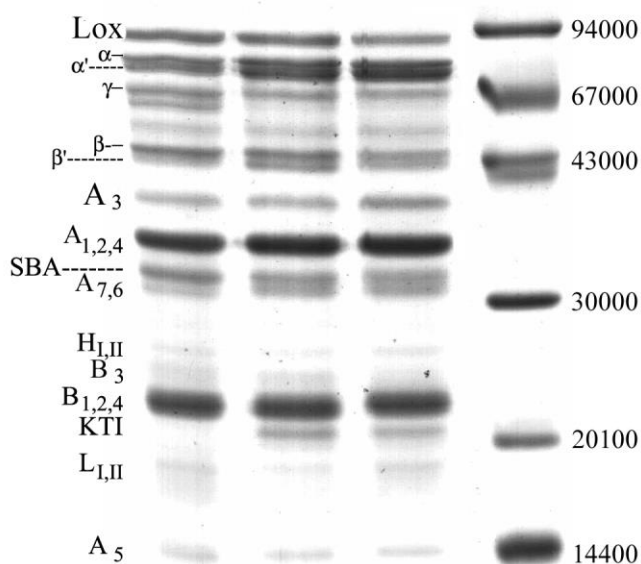
[‡]Means with the Same Letter are not Significantly Different ($p < 0.05$)

Dominantni proteini semena soje prvo su okarakterisani tečnom hromatografijom visokog stepena razdvajanja. HPLC-hromatogram prikazan je na Slici 1.

HPLC gel filtracionom metodom registrovano je četiri maksimuma. Prvi maksimum nalazi se u zoni molekulskih masa koje odgovaraju polipeptidima β konglicinina, γ konglicininu (γ) i β amilazi. Drugi maksimum je u zoni molekulskih masa kiselih i baznih polipeptida glicinina, lektina (SBA) i teških polipeptida 7S globulina ($H_{L,II}$). Treći maksimum odgovara molekulskoj masi Kunitz-ovog tripsin inhibitor (KTI) i lakim polipeptidima baznog 7S globulina ($L_{L,II}$), dok poslednji maksimum odgovara molekulskoj masi A_5 podjedinice glicinina. Primenom ove metode dobija se slabo razdvajanje polipeptidnih frakcija bliskih molekulskih masa, zbog čega je za karakterizaciju polipeptidnog sastava korišćena SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza. Elektroforegram rastvorljivih proteina brašna tri genotipa soje dat je na Slici 2, a polipeptidni i proteinski sastav prikazani su u Tabelama 2 i 3. β -konglicinin karakterišu tri, odnosno četiri polipeptidne trake, šest polipeptidnih traka pripada



Slika 1. HPLC hromatogram rastvorljivih proteina soje
HPLC chromatogram of the soluble soya bean proteins



Slika 2. SDS elektroforegram rastvorljivih proteina: traka 1 genotip L 91- 042, traka 2 genotip ZPS-015, traka 3 genotip Nena, traka 4 standard molekulskih masa
SDS electrophoregram of the soluble proteins: lines 1, 2, 3 and 4 are L 91-4042, ZPS-015, Nena and molecular weight standard, respectively

Tabela 2. Polipeptidni sastav rastvorljivih proteina (prikazane vrednosti su izražene u % u odnosu na ukupan sadržaj rastvorljivih proteina)
 Polypeptide Composition of Soluble Proteins (Values are Expressed as the Percentage of the Total Soluble Proteins)

Protein	Polipeptid Polypeptide	MW	Genotip - Genotype		
			L91-4042	ZPS-015	Nena
Lipoksigenaza Lypoxigenase	1	94195	7,19	6,33	4,96
	α	82681	5,34	7,90	6,90
β -konglicinin β -conglycinine	α'	77563	5,25	5,64	9,11
	β	48971	8,90	8,33	5,46
	β'	42868	-	2,73	2,44
γ -konglicinin γ -conglycinine	1	71486	7,67	5,43	4,17
	1	66121	3,32	-	-
β -amilaza - β -amylase	1	57546	2,92	2,52	3,47
	A ₃	40029	3,68	3,28	6,06
	A _{1,2,4}	35661	16,90	18,89	18,05
Glicinin Glycinine	A ₅	14377	1,04	0,90	1,08
	A _{7,6}	31876	2,26	5,35	5,11
	B ₃	24792	0,13	0,14	0,11
	B _{1,2,4}	23154	20,38	20,08	19,76
SBA	1	32968	10,26	5,46	6,32
Bazni 7S Globulin Basic 7S globuline	H _{1,2}	26599	1,21	0,21	0,39
	L _{1,2}	18850	1,91	0,58	1,41
KTI	1	21008	-	5,24	4,13

glicininu, dve 7S globulinu, a po jedana traka pripada lipoksigenazi (Lox), γ -konglicininu, β amilazi, lektin-u i KTI. Elektroforegram jasno ukazuje da liniji L91-4042 nedostaje traka koja odgovara KTI i β' podjedinici, a prisutna je jedna polipeptidna frakcija čija je molekulska masa bliska γ -konglicininu. Ova polipeptidna frakcija zastupljena je sa 3,32% i nije detektovana kod ostala dva genotipa.

Tabela 3. Proteinski sastav rastvorljivih proteina (prikazane vrednosti su izražene u % u odnosu na ukupan sadržaj rastvorljivih proteina)
 Protein Composition of Soluble Proteins (Values are Expressed as the Percentage of the Total Soluble Proteins)

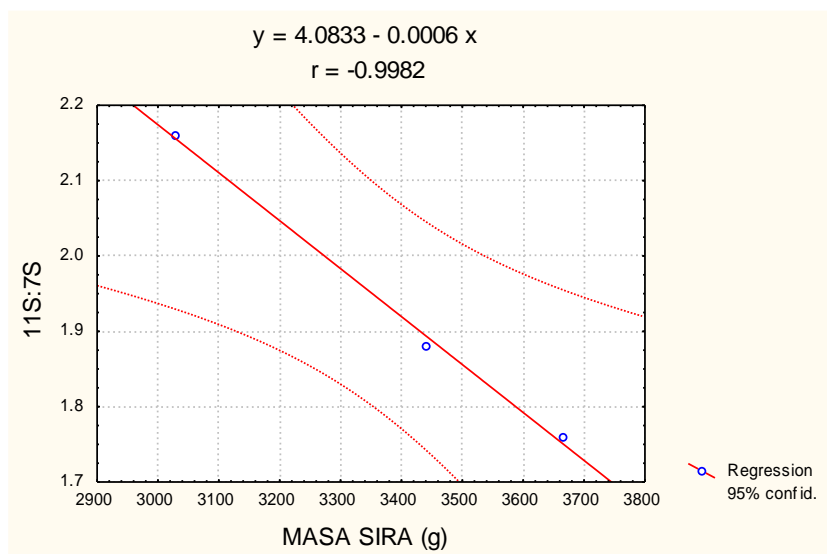
Genotip Genotype	Lox	7S	γ	11S		SBA	B. 7S	KTI
				A	B			
L91-4042	7,19	19,49	7,67	23,88	20,51	10,26	3,12	
				42,13				
ZPS-015	6,33	24,60	5,43	28,42	20,22	5,46	0,79	5,24
				43,30				
Nena	4,96	23,91	4,17	30,30	19,87	6,32	1,80	4,13
				45,06				

Denzitometrijska analiza pokazuje da postoje razlike u sadržaju polipeptidnih frakcija. Sorta L91-4042 sadrži najviše manje zastupljenih proteinskih frakcija: lipoksigenaze (7,19%), γ -konglicinina (7,67%), lektina (10,26%) i baznog 7S globulina (3,12%) a najmanje dva glavna dominantnih rezervnih proteina soje, β -konglicinina i glicinina (19,49%, odnosno 42,13%). Kod sorte ZPS-015 uočen je najviši udeo β -konglicinina (24,60%) koji sadrži najviše α i β' podjedinica. Glicinina je bilo najviše kod genotipa Nena 45,06%, koja je ujedno imala i skoro duplo veći sadržaj kisele A_3 podjedinice. Interesantno je da sorta Nena sadrži najviši udeo α podjedinice β konglicinina što ukazuje na polimorfizam i veću zastupljenost B_1 i B_3 polimorfni oblika nego kod druga dva genotipa. Razlikama u sadržaju kiselih podjedinica, čiji se udeo kretao od 23,88% kod genotipa L91-4042 pa do 30,30% kod sorte Nena, mogu se objasniti razlike u sadržaju glicinina.

Dobijene rezultate uporedili smo sa našim ranijim istraživanjima vezanim za proizvodnju sira od soje, *Prijić i sar.*, 2002. Naime, od ova tri genotipa napravljen je tofu i najveći prinos sira dala je sorta ZPS-015, a najmanji linija L91-4042, čiji je i kvalitet bio najslabiji.

Prvo što smo uočili je da sorta ZPS-015 ima najveću rastvorljivost proteina, dok se ostala dva genotipa u pogledu rastvorljivosti statistički ne razlikuju. Kako genotipovi L91-4042 i Nena daju različit kvalitet sira očito je da pored rastvorljivosti proteina na kvalitet utiče još nešto.

Korelacionom i regresionom analizom utvrđene su korelacije između mase proizvedenog sira i sadržaja glavnih proteina pojedinih genotipova. Rezultati su prikazani u Tabeli 3. Uočena je pozitivna korelacija sa udelima glavnih proteina i to



Grafikon 1. Linearna regresija između odnosa 11S:7S i mase tofu-a
Linear regression between 11S:7S ratio and weight of tofu

jako visoka sa udelom β konglicinina, a srednja sa udelom glicinina. Slabija korelacija sa udelom glicinina verovatno je posledica negativne korelacije mase sira i udela baznih podjedinica glicinina. Jako visoke negativne korelacije uočene su sa udelima lektina (-0.98), baznog 7S globulina (-0.99) i sa odnosom glicinina i β konglicinina (11S:7S).

Testiranjem značajnosti korelacionih faktora dobili smo da je statistički značajna samo korelacija između mase sira i odnosa glicinin : β -konglicinin ($p < 0,05$). Masa sira se povećava sa smanjenjem odnosa 11S:7S. Zavisnost između ove dve promenljive je skoro funkcionalna jer je koeficijent korelacije po apsolutnoj vrednosti blizak jedinici (-0,998) (Grafikon 1). Ovi rezultati bi mogli biti putokaz kod odabira i selekcije sorti za proizvodnju sira od soje.

Zaključak

Polipeptidna analiza je pokazala da sorte soje ispoljavaju značajne genotipske razlike u strukturi proteina i proteinskog kompleksa. Kod sorte bez Kunitz-ovog tripsin inhibitora te razlike su najizraženije. Heterogenost proteinskog kompleksa utiče na tehnološko funkcionalna svojstva sojinih proteina. Na prinos i kvalitet sira od soje utiče rastvorljivost proteina i odnos dve glavne proteinske frakcije glicinin: β -konglicinin. Smanjenjem ovog odnosa dobija se veći prinos sira. Poznavanje proteinske strukture genotipova soje u velikoj meri može doprineti definisanju postojećih i selekcionisanju novih sorti soje sa specifičnim funkcionalnim svojstvima što je od velikog značaja za preradu i primenu soje.

Zahvalnica

Rad na karakterizaciji proteina soje finansiralo je Ministarstvo za nauku, tehnologije i razvoj R Srbije u okviru "Nacionalnog programa biotehnologijem i agroindustrije". Naziv projekta je Program proizvodnje i prerade ratarskih kultura : teksturirani sojini proteini - ljuspice (sojine ljuspice) (ev.br. BTN 2.3.5.0400.B); neutralni, bojeni i aromatizovani sojini odresci (ev.br. BTN.2.3.3.0403.B); ekstrudirana sojina hraniva (ev.br. BTN.2.3.8.0406.B)

Literatura

- Barać, M.** (2002): Hemijska i enzimaska modifikacija proteinskog koncentrata soje. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd-Zemun.
- FDA** (1999): Food labeling health claims: soy protein and coronary heart disease. Food and Drug Administration. Final rule. Fed. Regist. **64** (206): 57700-57733.

- Fling, S.P.** and **D.S. Gregerson** (1986): Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* 155: 83-88.
- Friedman, M.** and **D.L. Brandon** (2001): Nutritional and health benefits of soy protein. *J. Agric. Food Chem.* 49 (3): 1069-1086.
- Kwanyuen, P., V.R. Pantalone, J.W. Burton** and **R.F. Wilson** (1997): A new approach to genetic alteration of soybean protein composition and quality. *JAOCS* 74 (8): 983-987.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr** and **R.J. Randall** (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Murphy, P. A., Chen, H. P., Hauck, C. C.,** and **Wilson, L. A.** (1997) Soybean protein composition and tofu quality. *Food Technol.* 51 (3), 86-110
- Prijić, Lj., B. Vucelić-Radović, M. Barać, M. Srebrić, S. Žilić** and **M. Pešić** (2002): Soja kao izvor zdravstveno bezbednog sira. Tematski zbornik Eko konferencije "Zdravstveno bezbedna hrana" 25-28. septembar, 2002., Novi Sad, str. 147-152.
- Riblett, A.L., T.J. Herald, K.A. Schmidt** and **K.A. Tilley** (2001): Characterization of β -conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4983-4989.
- Tezuka, M., H. Taira, Y. Igarashi, K. Yagasaki** and **T. Ono** (2000): Properties of tofus and soy milks prepared from soybeans having different of glycinin. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1111-1117.
- Than, V.H.** and **K. Shibasaki** (1976): Major proteins of soybean seeds. A straightforward fractionation and their characterization. *J. Agric. Food Chem.* 24: 1117-1121.
- Vucelić-Radović, B.** (1992): Proučavanje biohemijskih osobina proteina semena soje (*Glycine* sp.) s posebnim osvrtom na antinutritivne faktore. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd-Zemun.
- Wang, C.** and **R. Wixon** (1999): Phytochemicals in soybeans - their potential health benefits. *Inform* 10: 315-321

Primljeno: 21.05.2003.

Odobreno: 03.09.2003.

* *
*

Characterisation of Polypeptide Composition of Various Soya Bean Genotypes

- Original scientific paper -

Mirjana PEŠIĆ, Biljana VUCELIĆ-RADOVIĆ i Mirosljub BARAĆ
Faculty of Agriculture, University of Belgrade, Belgrade-Zemun

Summary

The polypeptide composition of soluble proteins of three soya bean genotypes - Nena, ZPS-015 and L91-4042, the latter without Kunitz trypsin inhibitor were studied. SDS-polyacrilamid gel electrophoreses and scanning densitometry of the obtained gels were used to estimate the polypeptide composition. Polypeptide analyses indicated that soybean genotypes express significant differences in both, the protein structure and the protein complex. The lowest content of two major storage proteins, β -conglycinin (7S) and glycinin (11S) was detected in the line without Kunitz trypsin inhibitor (19.49% i 42.13% respectively), the highest β -conglycinin content was in the line ZPS-015 (24.60%) and the glycinine content in the line Nena (45.06%). One polypeptide fraction with a molecular weight close to the molecular weight of γ -conglycinin was noticed only in the soybean genotype L91-4042. The various magnitude in the protein complex was observed in the γ -conglycinin content. The differences in the protein content and the protein structure was also observed in minor protein fractions. The difference in the polypeptide composition of the investigated genotypes was related to previous investigations of soya bean cheese production. The solubility of the soybean protein and the 11S:7S ration has strong influence to the mass and the quality of tofu. Very strong negative correlation exists between the 11S:7S ration and the mass of tofu. Understanding the soya bean genotype protein structure could contribute to characterisation of the existing soya bean lines and to selection of the new soya bean lines with specific functional properties. It is very important for soya bean processing and utilisation.

Received: 21/05/2003

Accepted: 03/09/2003

Adresa autora:

Mirjana PEŠIĆ

Poljoprivredni fakultet

Institut za Prehrambenu tehnologiju i biohemiju

Nemanjina 6

11080 Beograd-Zemun

Srbija i Crna Gora

e-mail: mpesic@agrifaculty.bg.ac.yu

J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke 64, 225-226 (2003/1-2), 157-165

165