

UDK 541.124.7:633.34

Termička inaktivacija izoenzima lipoksigenaze u sojinom zrnu

- Originalan naučni rad -

Sladana ŽILIC¹, Irina BOŽOVIĆ¹, Sladana ŠOBAJIĆ²,
Milica RADOSAVLJEVIĆ¹, Stojan SAVIĆ³ i Rade JOVANOVIĆ¹

¹Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

²Institut za bromatologiju, Farmaceutski fakultet, Beograd

³Institut za stočarstvo, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Izvod: U ovom radu proučavan je uticaj temperature na aktivnost izoenzima lipoksigenaze i promene kvaliteta sojinog ulja. Zrno soje sorti ZPS Bosa i ZPS 015 podvrgnuto je tretmanima mikronizacije, vlažne ekstruzije i mikrotalasnog prženja. U zavisnosti od termičkog tretmana prerade, zrno je izlagano temperaturi od 60 do 150°C u trajanju od 25 do 30 sekundi tokom ekstruzije, do 5 minuta tokom mikrotalasnog prženja. Gubitak polinezasićenih masnih kiselina bio je značajan sa povećanjem temperature, dok je, u zavisnosti od genotipa, ukupna aktivnost lipoksigenaze opadala sa povećanjem temperature i dužine vremena zagrevanja.

Ključne reči: Lipoksigenaza, masne kiseline, toplotni tretman.

Uvod

Soja je jedna od najekonomičnijih poljoprivrednih kultura koja se može najviše iskoristiti zbog svog jedinstvenog hemijskog sastava. Međutim, soja sadrži i mnogo minornih komponenti od kojih su neke poznate kao biološki aktivne (tripsin inhibitor, lipoksigenaza, hemaglutinin, fitaze, flotulenske supstance, goitrogeni faktori, izoflavoni, saponini) i koje uslovljavaju obaveznu termičku preradu sojnog zrna pre upotrebe u ishrani ljudi i životinja. Poslednjih godina neke od ovih supstanci, prvenstveno izoflavoni, postaju prepoznatljive po snažnim sposobnostima u prevenciji humanog kancera i drugih bolesti, *Messina i sar.*, 1994.

Biološki aktivne enzimske forme sojinog zrna, prvenstveno izoenzimi lipoksigenaze, zadržavaju enzimsku aktivnost i posle žetve izazivajući promene teksture, mirisa, boje i hranljivog sastava. Izoenzimi lipoksigenaze katališu procese peroksidacije masnih kiselina uslovljavajući destrukciju prvenstveno esencijalnih polinezasićenih masnih kiselina, linolne i linolenske, kojima je soja izuzetno bogata. Sojino ulje sadrži oko 20 do 60% linolne kiseline i oko 2 do 15% linolenske kiseline koje sisari, uključujući i čoveka, ne mogu da sintetišu, **Hammond** i **Glatz**, 1989. Utvrđeno je da su depresija rasta, dermatoze, problemi jetre, oštećenja bubrega, povećanje osetljivosti na infekcije, umanjene reproduktivne sposobnosti tipični simptomi nedostatka esencijalnih masnih kiselina u ishrani ljudi i životinja iz čega proizilazi njihova značajna zdravstvena uloga, **Chapkin**, 1992. Međutim, prisustvo dvostrukih veza u ovim masnim kiselinama čine ih osetljivim na oksidaciju, te je hemijska stabilnost sojinog ulja, kao i punomasnih sojinih proizvoda, veoma problematična. Oksidacijom masnih kiselina u prisustvu lipoksigenaze nastaju hidroperoksidi, a potom isparljive komponente aldehidi, ketoni i alkoholi koji su odgovorni za pojavu karakterističnih mirisa sirovog sojinog brašna na zeleno zrno i travu, **Hugues i sar.**, 1994. Katalitičkom aktivnošću lipoksigenaze u prisustvu kiseonika pri procesu peroksidacije ugljovodoničnog lanca polinezasićenih masnih kiselina nastaju veoma reaktivni slobodni hidroperoksidni radikali koji pripajaju vodonik iz okolnih ugljovodoničnih lanaca dovodeći do polimerizacije, umrežavanja enzima, strukturnih proteina i lipida. Hidroperoksidni radikali takođe izazivaju i degradaciju proteina biomembrana, destrukciju elektron transportnog sistema i akumulaciju toksičnih komponenti, kao i ko-oksidaciju pigmenata za koje je poznato da imaju izraženo antioksidativno dejstvo, **Wilson** i **McDonald**, 1986. Sekundarni produkti lipidne peroksidacije u procesu Amador i Millard reakcije mogu reagovati sa terminalnim grupama amino kiselina u proteinima, prvenstveno triptofana, lizina i metionina, i na taj način utiču na smanjenje iskoristljivosti ovih esencijalnih amino kiselina, **Murthy** i **Sun**, 2000. Nastali aldehidi ili ketoni reaguju sa nukleinskim kiselinama pri čemu dolazi do pogrešne transkripcije, a time nekompletne sinteze proteina, **McDonald**, 1999.

Materijal i metode

Za ova istraživanja korišćene su dve domaće sorte ZPS Bosa i sorta ZPS 015, stvorene u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", različite genetičke osnove.

Osim iz sirovog zrna soje, analize aktivnosti izoenzima lipoksigenaze i sadržaja masnih kiselina izvršena je i iz proizvoda dobijenih nakon tretmana prerade: vlažne ekstruzije na 100, 125 i 140°C, mikronizacije na 100, 125, 140 i 150°C i prženja zrna u mikrotalasnoj pećnici snage 800W i frekvencije mikrotalasa 2450 MHz u trajanju od 1, 2, 3, 4 i 5 minuta.

Micronizing Co. (Velika Britanija) je patentirala tehnološki proces koji se zasniva na dejstvu bliskih infracrvenih zraka talasne dužine od 1,8 do 3,4 μm koje emituju usijane keramičke pločice. Kada infracrveni zraci prodru u unutrašnjost

zrna, zagrevaju je izazivajući vibraciju molekula vode. Nastaje svojevrsno kuvanje sadržaja zrna u okviru njegovog omotača. Zagrejano zrno, izloženo pritisku i silama valjaka, se pahulja. Prženje se odvija na temperaturi do 160°C i traje 40-90 sekundi. Ceo proces prerade i dobijanja flekica traje 2-3 minuta, *Lawrence*, 1972. Primenjen je postupak vlažne ekstruzije. Postupak se zasniva na delovanju temperature koja nastaje usled trenja materijala koji se pomoću specijalno dizajniranog puža potiskuje kroz cilindar i traje 25-30 sekundi, *Bekrić i sar.*, 1992. Mikrotalasno zagrevanje zasniva se na dejstvu mikrotalasa koji u spektru zauzimaju područje neposredno pored infracrvenog spektra i čije se talasne dužine kreću od jednog milimetra do nekoliko centimetara.

Aktivnost izoenzima lipoksigenaze određen po Axelrod-ovoj metodi nakon ekstrakcije 0,2 M natrijum fosfatnim puferom pH 6,5. Kao supstrat koristi se rastvor linolne i arahidonske kiseline. Promena apsorbance se prati na 234nm u roku od pet minuta da bi se odredila lipoksigenaze 1. Hidroperoksidni produkti reakcije katalizovane lipoksigenazom 2 imaju apsorptivni maksimum na 238nm. Promena absorbance za određivanje aktivnosti lipoksigenaze 3 meri se pet minuta na 280nm, *Axelrod i sar.*, 1971, Više masne kiseline određene su gasnom hromatografijom na aparatu marke Varian 14000, sa FID detektorom iz ulja predhodno ekstrahovanog metodom po Soxhlet-u uz dietiletar kao rastvarač. Korišćene su metalne kolone dimenzija 300 x 0,32 cm, kao stacionarna faza 20% LAC-3R-728 na Chromosorb-u W/AW (80-100 *mesh*).

Rezultati i diskusija

Aktivnost lipoksigenaze 1 je osobina koja je najviše varirala (11,04%). Ovakvo visoka vrednost koeficijenta varijacije posledica je naglog pada aktivnosti lipoksigenaze 1 već nakon izlaganja zrna niskim temperaturama od 90 do 100°C. Nije utvrđena statistički značajna razlika između vrednosti aktivnosti lipoksigenaze 1 koje su utvrđene nakon svih termičkih tretmana kada je temperatura bila iznad 100°C (Tabela 1). Aktivnost lipoksigenaze 1 sa povećanjem temperature tokom procesa ekstruzije i mikronizacije postepeno se smanjivala kod obe ispitivane sorte. Pri procesu mikrotalasnog zagrevanja nakon 1-og minuta zagrevanja, odnosno na temperaturi od oko 60°C zabeleženo je čak i neznatno povećanje aktivnosti lipoksigenaze kod obe ispitivane sorte. Ovo povećanje verovano je rezultat denaturacije antioksidanasa pri čemu se raskida njihov kompleks sa enzimom i oslobađa aktivno mesto enzima za reakciju sa masnom kiselinom. Daljim povećanjem temperature dolazi do postepene denaturacije enzima, a time i smanjenja njegove aktivnosti. Za razliku od lipoksigenaze 1, pri procesu mikronizacije i ekstruzije, dolazi do postepenog povećanja aktivnosti lipoksigenaze 2 i 3. Pri procesu mikrotalasnog zagrevanja aktivnost ovih enzimskih formi se povećava do 3-eg minuta zagrevanja, a nakon toga opada. Interesantna je pojava da iako se aktivnost lipoksigenaze 3 povećavala do 3-eg minuta zagrevanja, ove aktivnosti su nakon 1-og i 2-og minuta ipak bile manje nego aktivnost u sirovoj

Tabela 1. Aktivnost izoenzima lipoksigenaze nakon termičke prerade
Activity of the Isoenzyme Lipoxygenase after Heat Treatments

Tretmani Treatments	Temp (°C)	Lipoksigenaza 1 Lipoxygenase 1 ($\mu\text{mol}/\text{mL min}$)		Lipoksigenaza 2 Lipoxygenase 2 ($\mu\text{mol}/\text{mL min}$)		Lipoksigenaza 3 Lipoxygenase 3 ($\mu\text{mol}/\text{mL min}$)	
		ZPS Bosa	ZPS 015	ZPS Bosa	ZPS 015	ZPS Bosa	ZPS 015
		Sirovo Crude		5,63 ^b	5,34 ^c	0,072	0,130
Mikrot. 1 Microwave 1	≈ 59	5,82 ^{ab}	6,03 ^a	0,065	0,122	0,262	0,299
Mikrot. 2 Microwave 2	≈ 89	0,861 ^f	0,554 ^g	0,099	0,152	0,251	0,293
Mikrot. 3 Microwave 3	≈ 108	0,026 ^{hi}	0,016 ^{hi}	0,805	0,736	0,411	0,401
Mikrot. 4 Microwave 4	≈ 120	0,022 ^{hi}	0,016 ^{hi}	0,612	0,703	0,241	0,345
Mikrot. 5 Microwave 5	≈ 135	0,019 ^{hi}	0,0057 ⁱ	0,498	0,545	0,139	0,178
VI. ekstr. Wet extract.	100	1,527 ^c	2,607 ^d	0,041	0,114	0,084	0,089
VI. ekstr. Wet extract.	125	0,113 ^{hi}	0,136 ^{hi}	0,384	0,372	0,399	0,364
VI. ekstr. Wet extract.	140	0,07 ^{hi}	0,078 ^{hi}	0,444	0,519	0,472	0,462
Mikroniz. Micronisat.	100	2,742 ^d	2,803 ^d	0,122	0,139	0,155	0,217
Mikroniz. Micronisat.	125	0,291 ^h	0,171 ^{hi}	0,423	0,435	0,141	0,185
Mikroniz. Micronisat.	140	0,097 ^{hi}	0,064 ^{hi}	0,638	1,01	0,332	0,366
Mikroniz. Micronisat.	150	0,044 ^{hi}	0,062 ^{hi}	1,70	1,481	0,649	0,520
CV (%)		11,04					
LSD 0,01		0,2772					

a-hi, statistička značajnost razlike srednjih vrednosti za $P < 0,01$ - statistical significance of mean values at $P < 0,01$

soji. Isto se može zapaziti i kod lipoksigenaze 2 nakon 1-og minuta zagrevanja u mikrotalasnoj peći i nakon procesa ekstruzije na 100°C . Na osnovu ovih rezultata možemo pretpostaviti da su inhibitori lipoksigenaze 2 i 3 u sirovom sojinom zrnu termostabilniji, te da su potrebne znatno više temperature za njihovu denaturaciju i oslobađanje izoenzima 2 i 3 iz oksidaciono neaktivnog kompleksa. Postepenom degradacijom lipoksigenaznih inhibitora povećava se aktivnost lipoksigenaze 2 i 3 i dostiže svoj maksimum nakon njihove potpune degradacije. Daljim povećanjem temperature tokom procesa prerade dolazi do denaturacije izoenzima lipoksigenaze smanjenja njihove aktivnosti. Nije isključena ni mogućnost da su niže temperature od oko 60 do 100°C inicijalne za procese inhibiranja lipoksigenaza 2 i 3, pa su

aktivnosti ovih izoenzimskih formi pri dejstvu ovih temperatura nešto niže od aktivnosti u sirovom sojinom zrnu (Tabela 1). *Esaka i sar.*, 1987, ispitivali su uticaj mikrotalasnog zagrevanja na aktivnost lipoksigenaze u zrnu pirinča pri različitim uslovima čuvanja. Sirovo i tretirano pirinčano brašno (snaga mikrotalasne peći, 850 W, 3 minuta vreme zagrevanja, vlažnost zrna 21%) pakovano je u vakum i patent zatvaračima zatvorene vrećice i ostavljena da stoji 16 nedelja na sobnoj temperaturi (25°C) i u frižideru na 4-5°C. Uzorci pirinča tretirani mikrotalasima koji su stajali u vrećicama sa patent zatvaračima na sobnoj temperaturi imali su mnogo veću aktivnost lipoksigenaze (0,54ΔA/min) nego sirovi uzorci (0,04ΔA/min) koji su bili izloženi uticaju istih spoljnih faktora. Autori su ovo objasnili odsustvom ili umanjanim prisustvom antioksidanasa u pirinču koji je bio izložen dejstvu mikrotalasa.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su primenjeni toplotni tretmani znato uticali na smanjenje sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (PMK), linolne (18:2) i linolenske (18:3) kod obe ispitivane sorte. Nakon mikrotalasnog prženja izraženije je smanjenje sadržaja linolenske kiseline što se

Tabela 2. Sadržaj nezasićenih masnih kiselina nakon termičke prerade
Content of Unsaturated Fatty Acids after Heat Treatments

Tretmani Treatments	Temp (°C)	C (18:1) %		C (18:2) %		C (18:3) %	
		ZPS Bosa	ZPS 015	ZPS Bosa	ZPS 015	ZPS Bosa	ZPS 015
Sirovo Crude		25,9	26,3	53,6	51,9	7,2	8,0
Mikrot. 1 Microwave 1	≈ 59	27,2	25,3	53,2	51,6	5,9	6,9
Mikrot. 2 Microwave 2	≈ 89	26,9	26,5	53,0	51,7	5,7	6,6
Mikrot. 3 Microwave 3	≈ 108	26,7	26,3	53,3	50,1	6,2	7,2
Mikrot. 4 Microwave 4	≈ 120	25,5	26,9	52,4	50,0	7,1	7,2
Mikrot. 5 Microwave 5	≈ 135	27,1	27,0	51,1	50,3	6,3	6,7
VI. ekstr. Wet extract.	100	27,1	26,7	50,6	52,5	6,8	6,7
VI. ekstr. Wet extract.	125	28,1	26,8	51,1	50,6	6,7	6,7
VI. ekstr. Wet extract.	140	25,1	27,2	49,8	50,2	7,0	6,8
Mikroniz. Micronisat.	125	29,2	29,9	49,8	51,1	6,4	5,7
Mikroniz. Micronisat.	140	29,2	30,6	49,0	50,4	6,9	5,0
Mikroniz. Micronisat.	150	28,8	30,3	49,8	49,3	6,7	5,7

kod sorte ZPS Bosa odrazilo na povećanje sadržaja mononezasićene oleinske kiseline (18:1), a kod sorte ZPS 015 na povećanje zasićene kiseline sa istim brojem ugljenika u lacu (stearinska 18:0) (Tabele 2 i 3). Temperatura izazvana infracrvenim zračenjem tokom procesa mikronizacije uslovia je smanjenje sadržaja PMK u proseku za 9% i povećanje sadržaja 18:0 i 18:1 masnih kiselina u proseku za 11% kod sorte ZPS Bosa. Kod sorte ZPS 015 smanjenje sadržaja PMK iznosilo je oko 7%, a povećanje sadržaja 18:0 i 18:1 masnih kiselina oko 11%. Iako je mikronizacija imala gotovo isti uticaj na ukupan sadržaj PMK kod obe ispitivane sorte soje, može se uočiti da je nakon ovog tretmana kod sorte ZPS Bosa bio veći gubitak linolne kiseline (8%), a kod sorte ZPS 015 linolenske kiseline (34%). Slična zakonitost se ispoljava i nakon ekstruzije soje. Sadržaj palmitinske kiseline (16:0) nije se bitnije menjao pod uticajem temperature na zrno oba genotipa soje.

Tabela 3. Sadržaj zasićenih masnih kiselina nakon termičke prerade
Content of Saturated Fatty Acids after Heat Treatments

Tretmani Treatments	Temp (°C)	C (16:0) %		C (18:0) %	
		ZPS Bosa	ZPS 015	ZPS Bosa	ZPS 015
Sirovo Crude		10,0	10,1	4,1	4,2
Mikrot. 1 Microwave 1	≈ 59	9,9	10,1	3,8	6,1
Mikrot. 2 Microwave 2	≈ 89	9,8	10,2	3,7	5,3
Mikrot. 3 Microwave 3	≈ 108	10,0	10,2	3,9	6,2
Mikrot. 4 Microwave 4	≈ 120	10,6	10,4	3,9	5,9
Mikrot. 5 Microwave 5	≈ 135	10,5	10,7	5,0	5,3
VI. ekstr. Wet extract.	100	10,1	9,9	4,9	4,2
VI. ekstr. Wet extract.	125	10,1	10,2	4,5	5,6
VI. ekstr. Wet extract.	140	10,0	10,3	4,4	5,5
Mikroniz. Micronisat.	125	10,0	9,7	4,5	3,5
Mikroniz. Micronisat.	140	10,3	10,0	5,2	4,0
Mikroniz. Micronisat.	150	9,8	10,	4,9	4,7

Zaključak

Aktivnost lipoksigenaze 1 sa povećanjem temperature postepeno se smanjivala kod obe ispitivane sorte, dok se aktivnost lipoksigenaze 2 i 3 povećavala sa povećanjem temperature do određene granice, nakon čega opada. Termički tretmani usloveli su smanjenje sadržaja polinezasićenih masnih kiseline i povećanje sadržaja mononezaćine 18:1 i/ili nezasićene 18:0 masne kiseline, dok se sadržaj palmitinske kiseline nije bitnije menjao.

Literatura

- Axelrod, B., T.M. Cheesbrough** and **S. Laakso** (1971): Lipoxygenase from soybeans. *Methods in Enzymology* 71: 441-451.
- Bekrić, V., I. Božović** i **M. Radosavljević** (1992): Usporedno ispitivanje tehnologije suve ekstruzije i mikronizacije u preradi sojinog i kukuruznog zrna, kukuruzne klice i endosperma. Zb. rad. V Simpozijuma Tehnologija stočne hrane, Divčibare, Jugoslavija, 1992, str. 149-157.
- Chapkin, R.S.** (1992): Reappraisal of the Essential Fatty Acids. In: *Fatty Acid and Their Health Implication*, ed. by C.K. Chow, Marcel Dekker, New York, USA, pp. 429-435.
- Esaka, M., K. Suzuki** and **K. Kubota** (1987): Effect of microwave heating on lipoxygenase and trypsin inhibitor activities and water absorption of widgeen seeds. *J. Food Sci.* 52: 1738-1739.
- Hammond, E.G.** and **B.A. Glatz** (1989): Biotechnology Application of Fats and Oils. In: *Developments in Food Biotechnology*, ed. R. King and P. S. J. Cheatham, John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 173-217.
- Huges, M., P. Bovin, F. Gauillard, J. Nikolas, J-M. Thiry** and **F. Richard-Forget** (1994): Two lipoxygenases from germinated barley: heat and killing stability. *J. Food Sci.* 59: 885-889.
- Lawrence, T.L.J.** (1972): *Developments in Cereals Processing-Growing Pigs*. In: *Cereals Processing and Digestion*, ed. Tech. Pub. U.S. Feed Grains Council, London, Great Britain, pp. 77.
- McDonald, M.B.** (1999): Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology* 27 (177): 237-246.
- Messina, M., V. Messina** and **K.D.R. Setchell** (1994): *The Simple Soybean and Your Health*, ed. Avery Publishing Group, Garden Park, New York USA.
- Murthy, N.U.M.** and **Q.W. Sun** (2000): Protein modification by Amadori and Millard reactions during seed storage: roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *J. Exp. Bot.* 51 (348): 1221-1228.
- Wilson, D.O. Jr.** and **M.B. McDonald** (1986): The lipids peroxidation model of seed ageing. *Seed Sci. Technol.* 14 (2): 269-300.

Primljeno: 26.11.2002.

Odobreno: 16.12.2002.

Thermal Inactivation of the Isoenzyme Lipoxygenase in Soya Bean Grain

- Original scientific paper -

Sladana ŽILIC¹, Irina BOŽOVIĆ¹, Sladana ŠOBAJIĆ²,
Milica RADOSAVLJEVIĆ¹, Stojan SAVIĆ³ and Rade JOVANOVIĆ¹

¹Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

²Institute of Bromatology, Faculty of Pharmacy, Belgrade

³Institute for Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Novi Sad

S u m m a r y

Effects of increased temperatures on the lipoxygenase activity and qualitative changes of soya bean oil were observed in the present study. Grain of soya bean cultivars ZPS 015 and ZPS Bosa was subjected to treatments of micronisation, wet extrusion and microwave roasting. Depending on a technological processing procedure, grain was exposed to temperatures of 60 to 150°C for 25 to 30 seconds during extrusion and for 5 minutes during microwave roasting. The loss in polyunsaturated fatty acids was essentially over increased temperatures. Depending on a genotype, the total lipoxygenase activity decreased over increased temperatures and duration of heating.

Received: 26/11/2002

Accepted: 16/12/2002

Adresa autora:

Sladana ŽILIC

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 10

11185 Beograd-Zemun

Jugoslavija

e-mail: szilic@mrizp.co.yu