

Bioški aktivni faktori sojinog proteinskog izolata dobijenog iz hidrotermički tretiranog lomljenog zrna

- Originalni naučni rad -

Biljana VUCELIĆ-RADOVIĆ, Miroljub BARAĆ, Slađana STANOJEVIĆ,
Mirjana PEŠIĆ i Maja LJUBIČIĆ
Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun

Izvod: Primena soje i proizvoda na bazi proteina soje ograničena je prisustvom komponenti sa antinutritivnim dejstvom, poput inhibitora proteinaza, fitinske kiseline, lektina. Prisustvo ovih komponenti prouzrokovalo je potrebu za iznalaženjem optimalnih rešenja za poboljšanje kvaliteta proizvoda od proteina soje. Cilj ovog rada bio je da se ispita uticaj na promenu aktivnosti bioški aktivnih komponenti proteinskog izolata lomljenog sojinog zrna nakon prodivavanja vodenom parom (pri nadpritisku 0,5 bar) u kraćim vremenskim intervalima (5, 10 i 15 minuta).

Nakon primenjenog hidrotermičkog tretmana zapaženo je znatno smanjenje tripsin inhibitorne aktivnosti (TIA) sa 72,34% za netretirani proteinski izolat na 6,55% za izolat nakon 15-ominutnog tretmana, pri čemu je nosilac TIA Kunitz-ov tripsin inhibitor (TI) (2,59-1,70%), dok je Bowman-Birk-ov inhibitor registrovan samo kod izolata od netretiranog lomljenog sojinog zrna (3,92%). SDS elektroforezom je ustanovljena promena u prisustvu lektina kod izolata dobijenih od tretiranih uzoraka (0,77-0,21%) u poređenju sa izolatom dobijenog od netretiranog zrna (1,96%). Rezultati ukazuju da sadržaji ukupnog rastvorljivog fosfora (11,35-5,96 mg P/g), fitinskog fosfora (1,09-0,53%) i fitinske kiseline (1,88-3,87%) pri ovako kratkotrajnim tretmanima (5, 10 i 15 min) nisu u direktnoj zavisnosti od dužine tretmana.

Ključne reči: Fitat, hidrotermički tretman, lektin, t sojin proteinski izolat, tripsin inhibitori.

Uvod

Soja se koristi kao funkcionalna hrana, u obliku brašna, griza, koncentrata i izolata. Novija istraživanja ukazuju na, preventivno i terapeutsko delovanje fiziološki aktivnih komponenti iz sojinog zrna, koje pored nutritivne vrednosti povoljno deluju i na zdravlje ljudi, što svrstava soju u grupu funkcionalne hrane. Međutim, neizbalansiran odnos bioški aktivnih komponenti može izazvati poremećaj

metabolizma aminokiselina i vitamina, hipertrofiju pankreasa, neželjene promene u digestivnom traktu, kao i narušavanje ravnoteže mineralnog sastava u organizmu. Oko 40% štetnog delovanja antinutritivnih komponenti posledica je aktivnosti inhibitora proteinaza. Izolovano je više izoformi TI, koje se prema načinu delovanja klasifikuju u Kunitz-ov i Bowman-Birk-ov tip. Uočeno je da inaktivacija TI za 54% ne izaziva hipertrofiju pankreasa. Noviji literaturni podaci ukazuju, da je Bowman-Birk-ov tip TI efikasan u suzbijanju kancerogeneze i u početnoj i u razvijenoj fazi, **Friedman i Brandon**, 2001. Karakterizacija proteina soje pri klijanju semena, pokazuje da TI deluju fitopatogeno i funkcionišu kao rezervni proteini.

Fitinska kiselina je prisutna u soji u obliku Ca-Mg-K-kompleksa i utiče na usvojivost Ca i Zn - tako što formira nerastvorljiv, nehranljiv kompleks, dok se interakcijom sa proteinima smanjuje se proteinska rastvorljivost, time i rastvorljivost proizvoda na bazi sojinih proteina. Hemaglutinini (lektini) koji se nazivaju i sojini aglutinini (SBA), čine 1-3% ukupnih sojinih proteina, **Liener**, 1981 i nalaze se u proteinskim telima semena zajedno sa rezervnim proteinima. O fiziološkoj ulozi lektina postoje različite hipoteze. Uočeno je da kod oglednih životinja dovode do promena na pankreasu i tankom crevu, **Jindel i sar.**, 1984, kao i da inaktivišu pepsin u želucu.

Cilj ovog rada je bio da se primenom termičkog tretmana, produvanjem vodenom parom lomljenog sojinog zrna (pod nad pritiskom 0,5 bar) u kraćim vremenskim intervalima (5, 10 i 15 min), ispita karakter promene sadržaja i aktivnosti biološki aktivnih parametara u sojinim proteinskim izolatima, obzirom da su u literaturi prisutni podaci koji ukazuju na njihovu rezidualnu aktivnost.

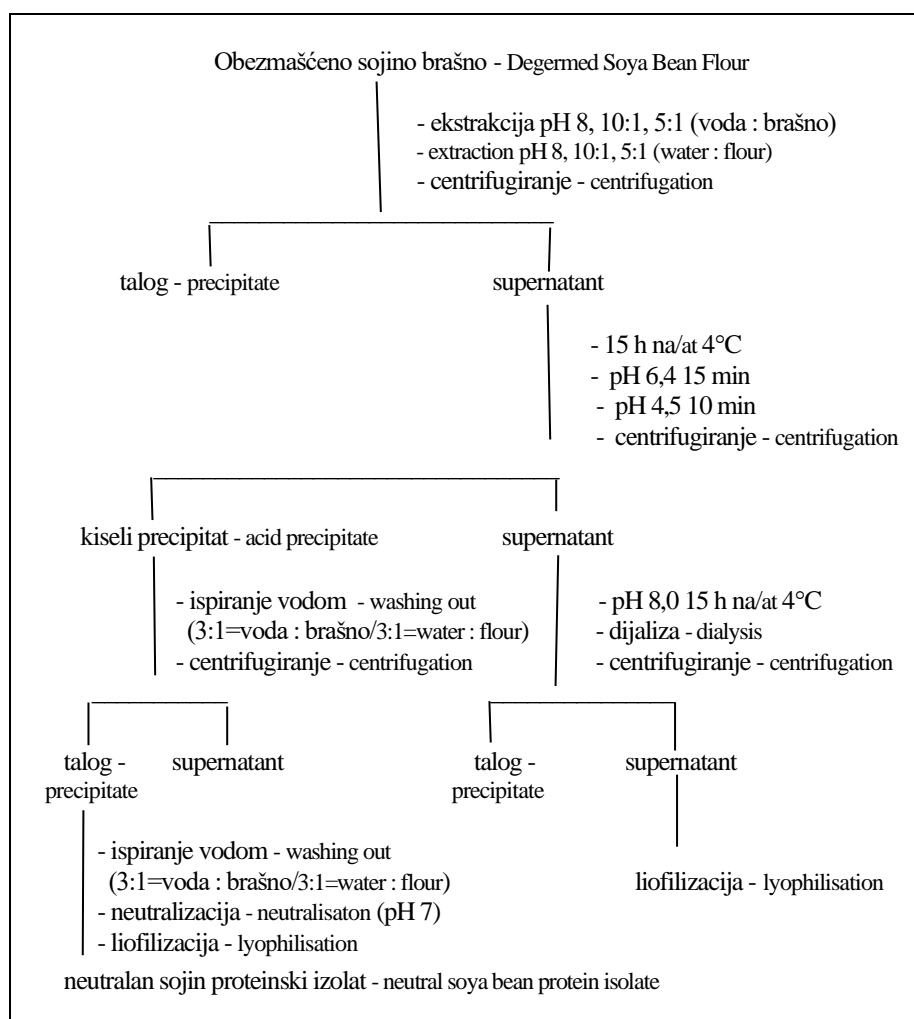
Materijal i metode

U ovom eksperimentu je korišćena semenska soja sorte 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 vodenom parom u protoku (pri nad pritisku od 0,5 bar) u trajanju od 5, 10 i 15 minuta. Usitnjavanje je vršeno do veličine čestica tako da 80% prolazi kroz sito od 80 mesh. Ova punomasna brašna su zatim obezmašćena imerzionim postupkom (u trajanju od 1 sata i 30 min, pri odnosu n-heksana i brašna od 1:20, uz stalno mešanje i zagrevanje do maksimalne temperature od 40°C). Sojino brašno je odvojeno od rastvarača ceđenjem pod sniženim pritiskom.

Od ovako dobijenog sojinog brašna pravljene su proteinski izolati po modifikovanoj metodi **Johnson-a** i **Kikuchi-a**, 1989 (Slika 1). Modifikacija ove metode se sastoji u termičkom tretiranju polazne sirovine. Naime, prema dostupnoj literaturi, nema poznatih podataka o pripremi sojinog proteinskog izolata (SPI) od prethodno tretiranog uzorka, već se eventualne modifikacije pripreme SPI (dodatak aditiva, toplotni tretmani ...) vrše pre sušenja dobijenog precipitata.

Aktivnost tripsin inhibitora određena je modifikovanom standardnom analitičkom metodom po **Li-u** i **Markakis-u**, 1989. Sadržaji TI u proteinskim

Slika 1. Prikaz dobijanja sojinog proteinskog izolata
Preparation of Soya Bean Protein Isolate



Prinos dobijenih neutralnih sojinih proteinskih izolata*				
Yield of produced neutral soya bean protein isolates*				
tretman - treatment	5 min	10 min	15 min	0 min
prinos - % - yield	25,92	23,97	14,36	67,85

*Prinos računat na osnovu % ukupnih proteina

*Yield is calculated on the basis of the percentage of total proteins

izolatima su utvrđeni nakon poliakrilamidne-gel elektroforeze u nativnim uslovima (PAGE), prema **Davis-u** i **Ornstain-u**, 1964. Promena sadržaja sojinih lektina ispitana je poliakrilamidnom-gel elektroforezom u disocijacionim uslovima (SDS-PAGE), prema **Fling-u** i **Gregerson-u**, 1986. Korišćen je vertikalni uređaj LKB 2001-001 VEU sa izvorom napona Macrodrive 5 i rashladnim uređajem Multitemp

II (LKB, Sweden). Obojeni gelovi skenirani su na laserskom denzitometru Ultra Scan XL, istog proizvođača. Denzitometrija je vršena primenom Sigma Gel softvera (Jandel, Nemačka). Sadržaj fitinske kiseline određen je mikro-metodom, na osnovu razlike u sadržaju rastvorljivog fosfora pre i posle taloženja fitata, *Velicković i sar.*, 1999.

Rezultati i diskusija

Uočava se mala razlika, svega 1,95%, u prinosu proteinskog izolata pripremljenog od soje tretirane 5 i 10 min (Slika 1). Međutim, razlika u rezidualnoj tripsin inhibitorskoj aktivnosti ova dva izolata je 9,36% (22,00 TUI/mg), (Tabela 1), tako da je sa aspekta primene SPI u prehrambenoj industriji prihvatljivije da se izolat

Tabela 1. Promena antinutritivnih komponenti termički tretiranog sojinog proteinskog izolata i brašna

Changes in Antinutritional Factors in Hydrothermally Treated Soya Bean Protein Isolate and Flour

Uzorak: sojin proteinski izolat - Sample: soya bean protein isolate				
Produvanje vodenom parom (0,5 bar) - Steaming				
Komponenta - Component	5 min	10 min	15 min	Netretirano - Untreated
TUI/mg	51,00	29,00	15,40	170
* TIA (%)	21,70	12,34	6,55	72,34
**KTI (%)	2,59	1,70	2,57	4,49
**BBI (%)	/	/	/	3,92
Fitinska kiselina - % - phytic acid	3,87	1,88	2,98	2,87
Fitinski fosfor - % - phytic phosphorus	1,09	0,53	0,84	0,81
Fitinski fosfor - mgP/g- phytic phosphorus	10,86	5,27	8,42	8,08
Ukupni rastvorljiv fosfor (mgP/g)	11,35	5,96	8,73	8,70
Total soluble phosphorus (mg P g ⁻¹)	11,35	5,96	8,73	8,70
#SBA (%)	0,77	0,29	0,21	1,96
Uzorak: Sojino brašno - Sample: soya bean flour				
Komponenta - Component	5 min	10 min	15 min	Netretirano - Untreated
TUI/mg	102,0	69,0	37,0	235,0
* TIA (%)	43,40	29,30	15,70	100
**KTI (%)	2,48	1,01	0,78	4,76
**BBI (%)	/	/	/	0,62
#SBA (%)	0,15	0,39	0,56	2,32

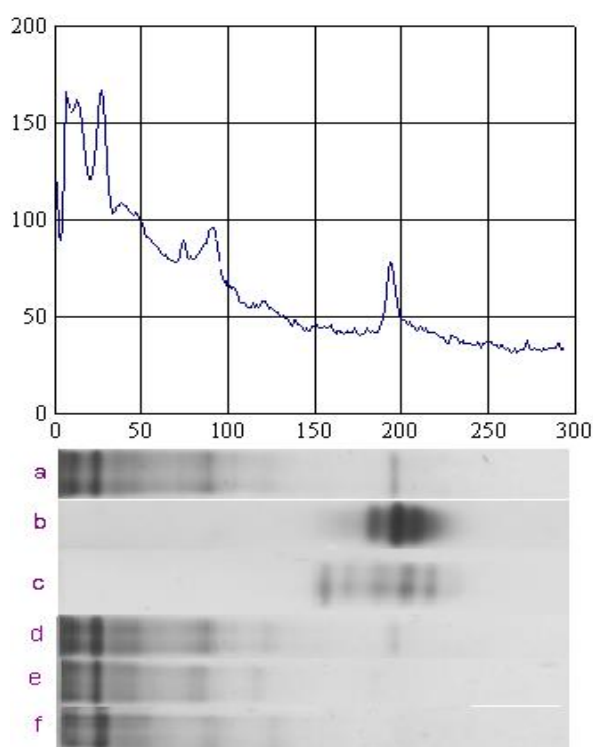
*TIA - računato u odnosu na TIA-netretiranog brašna - TIA - calculated in relation to TIA of untreated flour

**KTI, BBI - vrednosti dobijene na osnovu denzitometrijske analize elektroforegrama nakon PAGE - KTI, BBI - values obtained on the basis of electrophoregram densitometric analysis after PAGE

#SBA - sadržaj lektina dobijen na osnovu denzitometrijske analize elektroforegrama nakon SDS-PAGE - SBA - lectin content obtained on the basis of electrophoregram densitometric analysis after PAGE after SDS-PAGE

priprema od soje tretirane 10 min vodenom parom u protoku, obzirom da tretman od 15 min znatno smanjuje prinos SPI -14,36% (Slika 1).

Analizom TIA izolata (21,70-6,55%), i odgovarajućeg brašna (43,40-15,70%) uočava se znatno manja rezidualna TIA izolata (Tabela1). Denzitometrijskom analizom elektroforegrama nakon elektroforeze u nativnim uslovima, kao nosilac TIA registrovan je Kunitz-ov TI i kod SPI (2,59-1,70%), i u brašnu (2,48-0,78%), Tabela 1, dok Bowman-Birk-ov TI koji se ekstrahuje sa rastvorljivim proteinima nativnog izolata u količini od 3,92% (i nativnom brašnu 0,62%) nije registrovan ni u jednom uzorku od tretirane soje (Slika 2). Odsustvo Bowman-Birk-ovog TI u tretiranim uzorcima hidrotérmičkim postupkom ukazuje na to da vlažan termički tretman doprinosi većem stepenu degradacije molekula Bowman-Birk-ovog inhibitora, obzirom da ovaj inhibitor nije registrovan ni nakon tretmana lomljenog zrna u autoklavu, *Veličković i sar.*, 2002, dok je zabeleženo njegovo prisustvo u uzorcima tretiranim mikrotalasima, *Barać i sar.*, 2002, gde je registrovana i monomerna i polimerna forma ovog TI.



Slika 2. Elektroforetska i denzitometrijska analiza PAGE-gela: a - ekstrakt sojinog proteinskog izolata; b - standard KTI; c - standard BBI; d, e, f - sojin proteinski izolat pripremljen od lomljenog zrna tretiranog 5,10 i 15 minuta
 Electrophoregram and densitometric analysis of PAGE-gel: a - extract of the soya bean protein isolate; b - KTI standard; c - BBI standard; d, e, f - soya bean protein isolate prepared from cracked soy bean grain treated for 5, 10 and 15 minutes

Naša istraživanja ukazuju da nema direktne zavisnosti trajanja hidrotremičkog tretmana i sadržaja fitinske kiseline u ispitivanim SPI (Tabela 1). Obzirom da veće prisustvo fitinske kiseline smanjuje rastvorljivost, usvojivost i svarljivost proteina, sa aspekta primene SPI u tehnologiji hrane najpovoljniji je izolat nakon 10 mintretmana, koji sadrži 1,88% fitinske kiseline (Tabela 1).

Denzitometrijska analiza elektroforegrama, nakon poliakrilamidne gel elektroforeze u disocijacionim uslovima (Slika 2), ukazuje na linearni pad udela lektina (0,77-0,21%) u polipeptidnom sastavu uzoraka u zavisnosti od trajanja hidrotremičkog tretmana (5-15 min).

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da primenjeni termički tretman ima uticaja na pad TIA proteinskog izolata već nakon 5 min tretmana (sa 72,34% na 21,70%). Rezidualna TIA se kod proteinskih izolata od tretiranih uzoraka bitno smanjuje (21,70-6,55%), pri čemu je nosilac TIA - Kunitz-ov TI (2,59-1,70%), dok je Bowman-Birk-ov inhibitor registrovan samo u netretiranom uzorku (3,92%).

Iako je prinos SPI dobijenog nakon 5 min hidrotremičkog tretmana najveći (25,92%) njegov sastav je manje povoljan, jer je sadržaj fitinske kiseline (3,87%) povećan u odnosu na netretirani uzorak (2,97%), što ukazuje na smanjenu rastvorljivost i svarljivost proteina soje. Kao najprihvatljiviji uzorak za proizvodnju hrane može se izdvojiti SPI pripreman od lomljenog sojinog zrna tretiranog 10 min obzirom na to da je rezidualna TIA ovog SPI (12,34%) ispod 20%, što se smatra prihvatljivim sa aspekta ishrane; sadržaj fitinske kiseline je najmanji (1,88%), što ukazuje na najbolju rastvorljivost i usvijivost ovih proteina, pokazuje značajan pad sadržaja lektina (0,29%) u odnosu na netretirani uzorak (1,95%), a prinos (23,97%) je u skladu sa literaturnim podacima (20-30%), računato na osnovu sadržaja ukupnih proteina.

Literatura

- Barać, M., B. Vucelić-Radović, S. Stanojević i M. Pešić** (2002): Uticaj načina termičke obrade na inhibitorsku aktivnost lomljenog zrna soje. Zb. rad. X Jugoslovenskog kongresa o ishrani, Beograd, str. 85-87.
- Davis, J. and L. Ornstein** (1964): Disk electrophoresis, background and theory. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121: 321-349.
- 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. Biochemistry 155: 83-88.
- Friedman, M. and D. Brandon** (2001): Nutritional and health benefits of soya proteins. J. Agric. Food Chem. 46 (3): 1069-1086.
- Jindal, S., G.L. Soni and R. Singh** (1984): Biochemical and histopathological studies in albino rats feed on soybean lecithin. Nutr. Rep. Int. 29: 95-106.

- Johnson, D.W.** and **S. Kikuchi** (1984): Processing for proucing soy protein isolates. Book of Proceedings of The World Congress:Vegetable Protein Utilization in Human Foods and Animal Feed Stuffs, ed. T.H Applewhite, A.O.C.S., Champaign, USA, pp. 66-77.
- Liener, I.E.** (1981): Factors affecting the nutritional quality of soya products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 406-415.
- Liu, K.** and **P. Markakis** (1989): An improved colorimetric method for determining antitryptic activity in soybeans products., *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Veličković, D., B. Vucelić-Radović, S. Blagojević, M. Barać, S. Stanojević** and **M. Ljubičić** (1999): A modification of a method for phytic acid determination. *J. Serb. Chem. Soc.* **64** (4): 303-310.
- Veličković, D., B. Vucelić-Radović, S. Blagojević, M. Barać** i **S. Stanojević** (2002): Promene polipeptidne strukture sojinog proteinskog izolata pri termičkoj inaktivaciji antinutritivnih komponenti. *Acta Periodica Tehnologica* **31** (A): 193-199.

Primljeno: 20.03.2003.

Odobreno: 03.09.2003.

* *
*

Functional Food Factors of Soya Bean Protein Isolate Prepared from Hydrothermally Treated Grain

- Original scientific paper -

Biljana VUCELIĆ-RADOVIĆ, Miroљjub BARAĆ, Slađana STANOJEVIĆ,
Mirjana PEŠIĆ and Maja LJUBIČIĆ
Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun

S u m m a r y

The influence of the treatment duration and steam pressure on inactivation of biologically active components is presented in this paper. Steaming of cracked soya bean grains used for the protein isolate preparation of efficiently inactivated trypsin inhibitors (TI). Residual activity of Kunitz inhibitor was only detected (2.59-1.70%).

The most suitable properties for utilisation in food technology were found for soya bean protein isolate (SPI) prepared from cracked soya bean grains hydrothermally treated for 10 minutes, using steam pressure of 1.5 bar. Such SPI contained 12.34% of residual TI activity, and compared to the untreated sample it contained similar levels of lectin (0.29%) and phytic acid (1.88%).

Received: 20/03/2003

Accepted: 03/09/2003

Adresa autora:

Slađana STANOJEVIĆ
Institut za prehrambenu tehnologiju i biohemiju
Poljoprivredni fakultet
Nemanjina 6
11080 Beograd-Zemun
Srbija i Crna Gora
e-mail: sladja@agrifaculty.bg.ac.yu