

**ZMĚNA RAMANOVA SPEKTRA PROTEINŮ SÓJI LUŠTINATÉ
PO INKUBACI S BIOAKTIVNÍMI LÁTKAMI**

**CHANGE OF RAMAN SPECTRUM OF SOYBEAN PROTEINS AFTER
INCUBATION WITH BIOACTIVE SUBSTANCES**

Kateřina Křištofová¹ – Matej Pospiech¹ – Jana Čaloudová¹ – Bohuslava Tremlová¹

**¹Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno**

<https://doi.org/10.11118/978-80-7509-996-9-0216>



ABSTRAKT

Alergenní proteiny v sóji představují významnou překážku pro její plné využití ve stravě lidí. Alergické reakce se mohou projevit různými příznaky, jakou jsou kožní vyrážky, dýchací či zažívací potíže. Sójové boby jsou uvedeny na seznamu alergenů vydaném Evropskou Unií. Cílem příspěvku je poukázat na možnosti snížení imunoreaktivity proteinů rostlinného původu, konkrétně proteinů sóji luštinaté (*Glycine max*), přidávkou bioaktivních látek – kyselina gallová, kvercetin, β -karoten. Vzorky zahrnovaly odlišné koncentrace bioaktivních látek – 0;0,15;0,5;1,5 a 15 mg/g. Měření proběhlo na Ramanově spektrometru. Nejvyšších interakcí bylo zaznamenáno v případě koncentrace 0,15 a 1,5 mg/g, vyšší koncentrace poukázaly na maskování látkou samotnou. Přídavek kyseliny gallové a kvercetinu v koncentracích 0,15 a 1,5 mg/g se jeví jako nejvhodnější vazbu s proteiny sóji. Mechanismus vzniku polyfenol-proteinových komplexů je předmětem dalších výzkumů.

Klíčová slova: Ramanova spektroskopie, sója, imunoreaktivita, bioaktivní látky

ABSTRACT

The allergenic proteins in soybeans represent a significant barrier to their full use in the human diet. Allergic reactions can manifest themselves in a variety of symptoms such as skin rashes, respiratory and digestive problems. Soybeans are included in the list of allergens issued by the European Union. The aim of this work is to point out the possibilities of reducing the immunoreactivity of proteins of plant origin, specifically soybean (*Glycine max*) proteins, by the addition of bioactive substances-gallic acid, quercetin, β -carotene. The samples included different concentrations of bioactive substances - 0;0.15;0.5;1.5 and 15 mg/g. The measurements were performed on a Raman spectrometer. The highest interactions were observed for concentrations of 0.15 and 1.5 mg/g, higher concentrations indicated masking by the substance itself. The addition of gallic acid and quercetin at concentrations of 0.15 and 1.5 mg/g seems to be the most suitable for soybean proteins binding. The mechanism of formation of polyphenol-protein complexes is the subject of further investigations.

Keywords: Raman spectroscopy, soybean, immunoreactivity, bioactive substances

ÚVOD / INTRODUCTION

Sója (*Glycine max*) je luštěnina, patří do čeledi Fabaceae. Jedná se o významnou plodinu v potravinářském průmyslu. Představuje zdroj proteinů rostlinného původu, který dominuje ve stravě vegetariánů. Celkový obsah bílkovin v sójových bobech se pohybuje v závislosti na podmínkách pěstování kolem 400 g/kg sóji, v případě sójového oleje je to zhruba polovina. Produkty ze sójových bobů zahrnují zejména fermentované produkty, jako jsou například miso, tofu, sójová omáčka, a zvýrazňovače chuti (Wiederstein et al., 2023).

Proteiny ze sóji mohou způsobovat alergickou reakci. Sója je proto zařazena na seznam prioritních alergenů, které podléhají označení. Seznam alergenních látek je uveden v příloze II Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1169/2011, který pojednává o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. Jednotlivé alergeny (14) jsou v seznamu označeny pod konkrétním číslem, sójové boby a výrobky z nich jsou v seznamu uvedeny pod číslem 6.

Potravinové alergie představují celosvětový zdravotní problém, vyskytují se u 2–10 % populace, v případě sóji se pohybují v rozmezí 0,3–3 % (Wiederstein et al., 2023). Imunoreaktivita proteinů sóji se pojí specifickou imunitní reakcí na některé z proteinů v sójových bobech, které jsou považovány za alergenní. V sóji bylo identifikováno nejméně 16 různých proteinů. Mezi hlavní alergenní proteiny patří zejména β -konglycinin (7S) a glycinin (11S), které utváří 70–80 % celkové frakce globulinů semen a jsou označeny jako alergenní pro člověka. Alergická reakce zahrnuje nejčastěji nevolnost, zvracení, průjem, dušnost, sípaní a kožní reakce (Mulalapele a Xi, 2021).

Polyfenolické látky, které vytváří komplexy s bílkovinami potravin mohou mít vliv na jejich funkci a strukturu. Interakcí proteinu třešňí Pruav 1 s kyselinou gallovou a kvercetinem došlo ke snížení jeho koncentrace (Lu et al., 2018). Studie Zhang et al (2020) popisuje snížení alergenicity ovalbuminu při konjugaci s kvercetinem.

MATERIÁL A METODIKA / MATERIAL AND METHODS

K analýze byl použit proteinový izolát sóji v laboratorní kvalitě (Kerry, Irsko). Protein byl smíchán s extrakčním roztokem. Následoval var po dobu 10 minut za stálého míchání vzorku. Roztok proteinového izolátu byl přefiltrován přes 0,45 μ m filtr. Získaný filtrát byl smíchán s fosfátovým pufrům (PBS) na koncentraci 0,08 μ g/ml.

Bioaktivní látky, zvolené k analýze, zahrnovaly - kyselinu gallovou (GAL), kvercetin (KVE) a β -karoten (KAR). Tyto látky byly připraveny v koncentracích 0;0,15;0,5;1,5;15 mg/g, poté byly smíchány s filtrátem proteinu v poměru 1:1. Nulová koncentrace byla připravena z filtrátu proteinu a destilované vody ve stejném poměru. Roztoky byly rozpipetovány do skleněných vialek v odpovídajícím množství, tzn. nejméně do $\frac{3}{4}$ vialky, takovým způsobem aby nedošlo k zanesení povrchu vialek, zejména v úrovni snímání spekter laserem.

Vzorky byly podrobeny analýze pomocí Ramanova spektrometru (StellarNet, USA) ve spektrálním rozsahu 100–1000 cm^{-1} , síla laseru byla nastavena na 90 %. Jednotlivé vzorky byly měřeny ve 4 opakováních ve dvou časových intervalech - bezprostředně po přípravě (0 hodin) a s odstupem 1 hodiny.

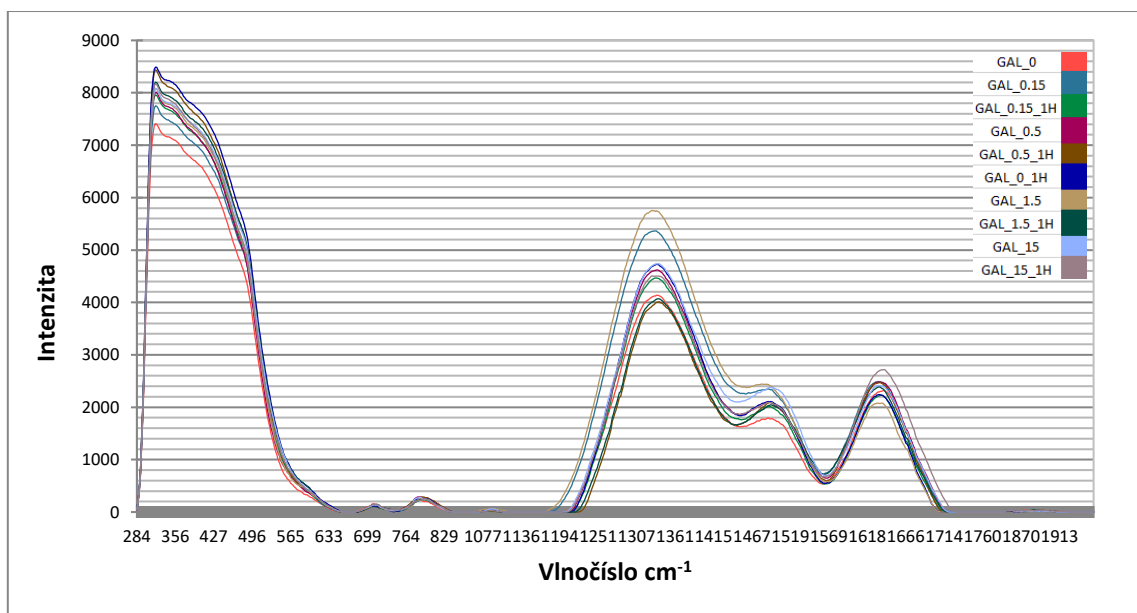
Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno v softwaru Microsoft Office Excel a XLSTAT diskriminační analýzou dat (DA) - level signifikance 5 %, práh vstupních hodnot $>0,1$ a $<0,9$.

VÝSLEDKY A DISKUZE / RESULTS AND DISCUSSION

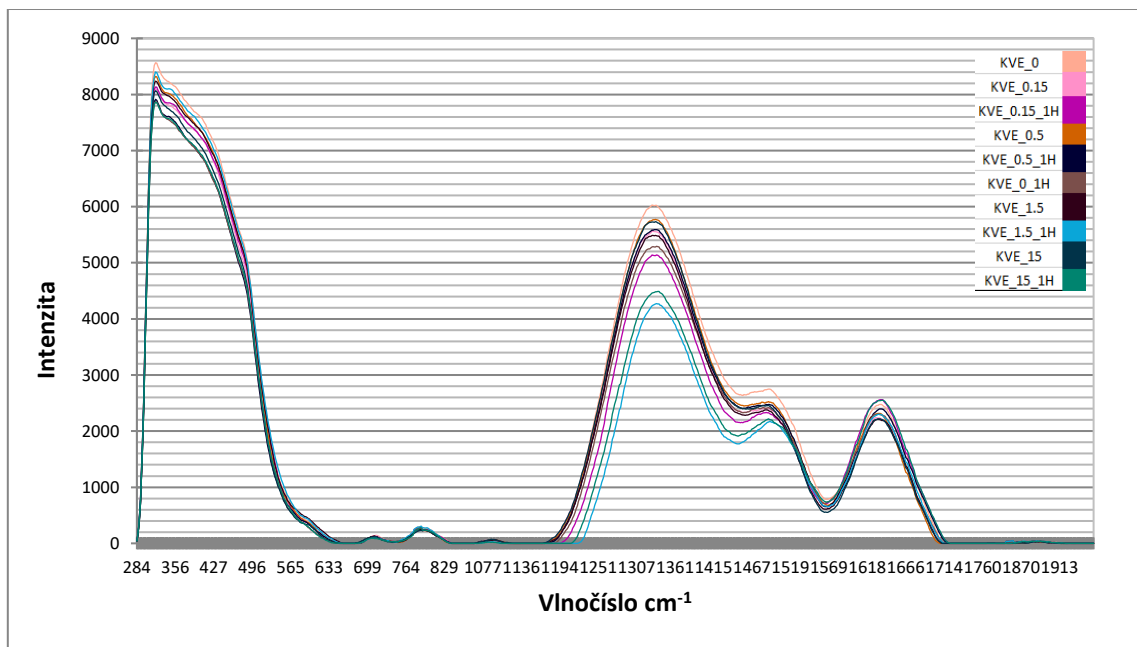
Změny proteinů byly měřeny pomocí Ramanova spektrometru. Přídavkem bioaktivních látek byly zaznamenány vazebné interakce mezi proteiny sóji luštinaté a bioaktivními látkami – kyselinou gallovou a kvercetinem. Tyto interakce se vyvíjely v závislosti na času inkubace (0 hodin a 1 hodina). U vzorků, které byly měřeny po 1 hodině bylo patrné navýšení intenzity Ramanova spektra. Nejvíce patrných změn lze pozorovat v případě bioaktivních látek, které ve své struktuře obsahují fenolové jádro (kyselina gallová, kvercetin).

Ramanova spektra sójového proteinu s přídavkem kyseliny gallové (Obrázek 1) se pohybují v rozmezí vlnových čísel 1157–1756 cm^{-1} . Významné navýšení intenzity bylo pozorováno při koncentraci 0,15 a 1,5 mg/g. Obdobných výsledků bylo zaznamenáno také v případě přídavku kvercetinu v rozmezí vlnových čísel 1163–1730 cm^{-1} (Obrázek 2). Proteiny s fenolovým jádrem interagují v rozmezí vlnových čísel 1480–1730 cm^{-1} (Kuhar et al., 2021). Tato rozmezí jsou charakteristická pro změny intenzity Ramanova spektra amidových vazeb I a II (Movasaghi et al., 2007). Záznam Ramanových spekter s přídavkem β -karotenu (Obrázek 3) v rozmezí vlnových čísel 1172–1723 cm^{-1} poukazuje na mírné změny intenzity při koncentraci 0,15 a 15 mg/g. Toto rozmezí je charakteristické pro C-C a C=C vazby, kdy karotenoidy mají vysoké zastoupení C=C vazeb (Harrison, 2022).

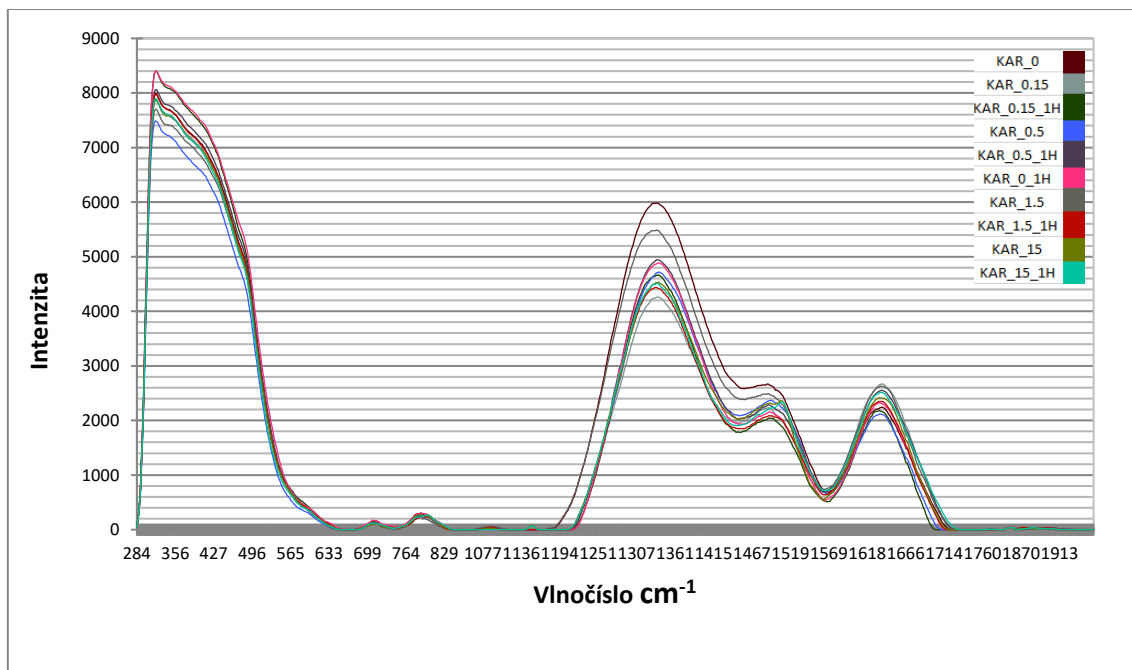
Diskriminační analýzou (DA) byly potvrzeny pozitivní změny v interakcích proteinů sójových bobů a přítomností bioaktivních látek ve vzorcích ($p < 0,05$). Největší rozdíly, v případě kyseliny gallové (Obrázek 4), byly zaznamenány v koncentraci 1,5 mg/g. Koncentrace 0,5 mg/g poukazuje na projev proteinu ve vztahu protein-kyselina gallová (GAL). Na záznamu lze vidět rovněž blízké umístění bodů kyseliny gallové v koncentraci 15 mg/g, které vytváří shluk, poukazující na projev samotné látky. Nejvíce patrné změny v případě kvercetinu (KVE) byly zaznamenány při koncentraci 1,5 mg/g (Obrázek 5) a v případě β -karotenu (KAR) se jednalo o koncentraci 0,15 mg/g (Obrázek 6). Obecně nejnižší interakce jsou patrné při koncentracích 0,5 mg/g.



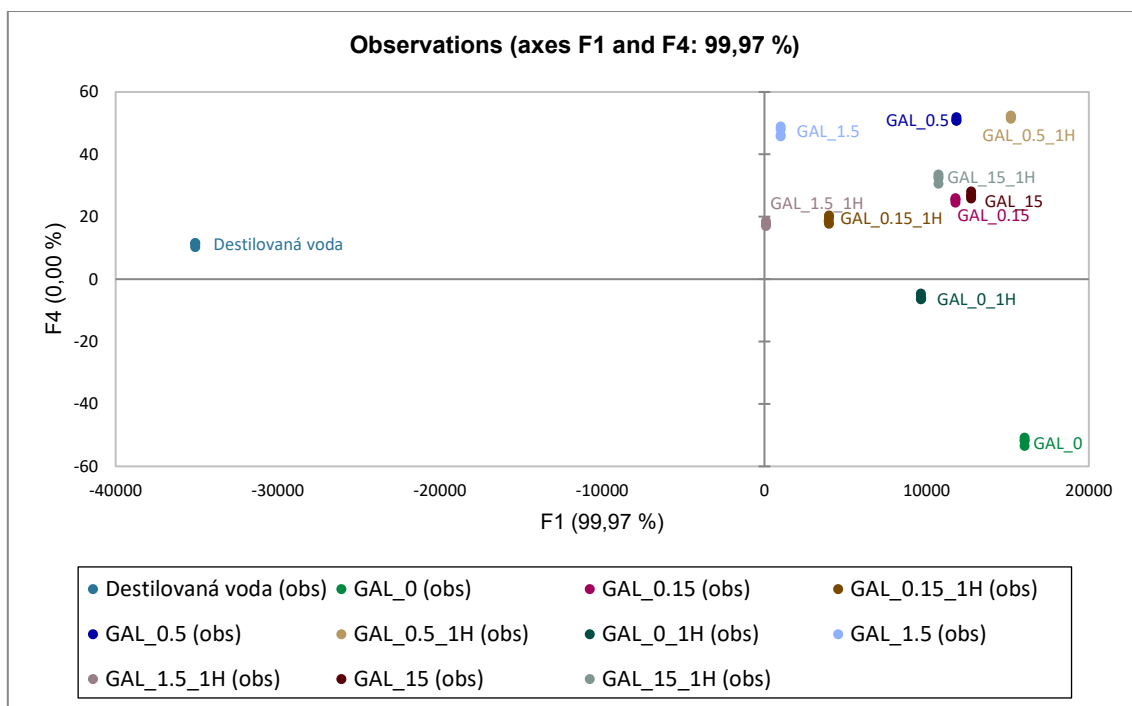
Obrázek 1: Změny intenzity Ramanova spektra s přidavkem kyseliny gallové v čase 0 a 1 hodina



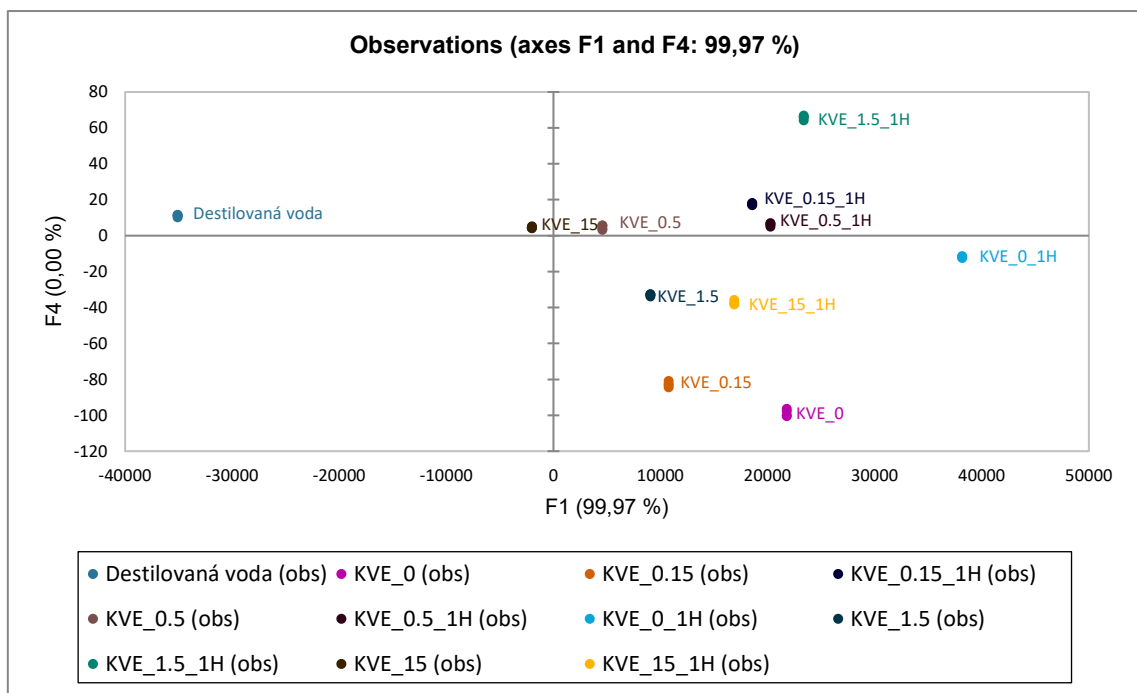
Obrázek 2: Změny intenzity Ramanova spektra s přidavkem kvercetinu v čase 0 a 1 hodina



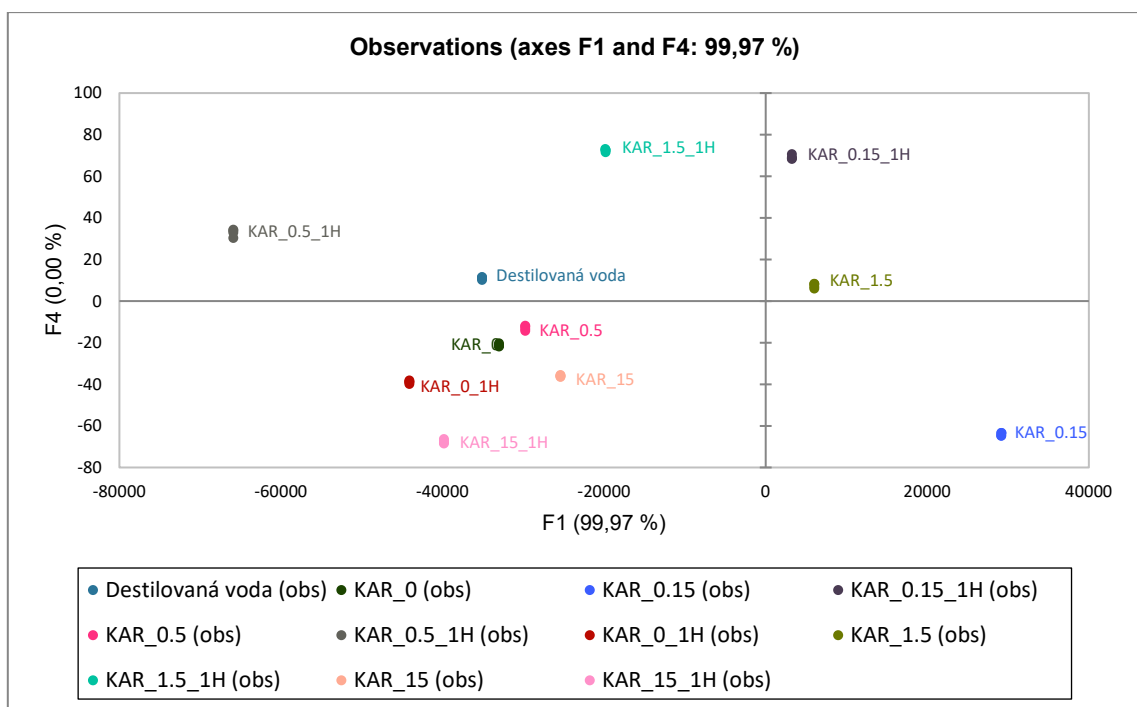
Obrázek 3: Změny intenzity Ramanova spektra s přidavkem β -karotenu v čase 0 a 1 hodina



Obrázek 4: Diskriminační analýza Ramanova spektra pro kyselina gallovou



Obrázek 5: Diskriminační analýza Ramanova spektra pro kvercetin



Obrázek 6: Diskriminační analýza Ramanova spektra pro β -karoten

ZÁVĚR / CONCLUSIONS

Z měření vyplývá, že nejreaktivnější bioaktivní látky s proteiny sóji jsou kyselina gallová a kvercetin v koncentraci 0,15 a 1,5 mg/g. Interakce s proteiny může být využita ke snižování imunoreaktivity sójových bobů v důsledku vzniku molekulárních interakcí alergenních proteinů a bioaktivních látek má v potravinové bezpečnosti významný potenciál. Nicméně ve spojení s rostlinnými proteiny doposud není k dispozici dostatek odborných studií. Přesnější mechanismus a optimalizace vznikajících kovalentních polyfenol-protein interakcí zůstává předmětem dalších výzkumů.

PODĚKOVÁNÍ / ACKNOWLEDGEMENT

Příspěvek byl podpořen projektem ITA VETUNI (2022ITA23).

LITERATURA / REFERENCES

Harrison, E. H. (2022): Carotenoids, β -Apocarotenoids, and Retinoids: The Long and the Short of It. *Nutrients*, 14 (7).

Kuhar, N., Sanchita, S., Umapathy, S. (2021): Potential of Raman spectroscopic techniques to study proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 258.

Lu, Y., Li, S., Xu, H., Zhang, T., Xiao L., et al. (2018): Effect of Covalent Interaction with Chlorogenic Acid on the Allergenic Capacity of Ovalbumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (37): 9794–9800.

Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I. U. (2007): Raman Spectroscopy of Biological Tissues (2007): *Applied Spectroscopy Reviews*, 42 (5): 493–541.

Mulalapele, L. T., Xi, J. (2021): Detection and inactivation of allergens in soybeans: A brief review of recent research advances. *Grain & Oil Science and Technology*, 4 (4): 191–200.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady č. 1169/2011 ze dne 15. října o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. *Úřední Věstník Evropské unie*.

Wiederstein, M., Baumgartner, S., Lauter, K. (2023): Soybean (*Glycine max*) allergens—A Review on an Outstanding Plant Food with Allergenic Potential. Online. *ACS Food Science & Technology*, 3(3): 363–378.

Zhang, T., Hu, Z., Cheng, Y., Xu, H., Velickovic, T. C., et al. (2020): Changes in Allergenicity of Ovalbumin in Vitro and in Vivo on Conjugation with Quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68 (13): 4027–4035.

Kontaktní adresa / Contact Information: Mgr. Kateřina Křištofová, Department of Plant Origin Food Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic. e-mail: H21281@vfu.cz