

## PROTEINSKA STRUKTURA VISOKOPROTEINSKIH GENOTIPOVA SOJE

Vuk Đorđević<sup>1</sup>, Ksenija Taški-Ajduković<sup>2</sup>, Miloš Vidić<sup>1</sup>,  
Milka Vujaković<sup>2</sup>, Jegor Miladinović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

<sup>2</sup>Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad

**Izvod:** Kvalitet proizvoda od soje zavisi od sadržaja proteinskih frakcija rezervnih proteina. Cilj ovog rada je utvrđivanje proteinske strukture visokoproteinskih genotipova soje, kao i određivanje relativnog sadržaja glicininskih i -konglicininskih subjedinica. Ogled je izveden na poljima Instituta za ratarstvo i povrtarstvo tokom 2004. i 2005. godine, a proteinska struktura određena je pomoću SDS PAGE i analizirana denzitometrijski. Dobijeni rezultati pokazuju da usled povećanja ukupnih proteina dolazi i do povećanja sadržaja proteinskih frakcija. Genotip KO5311 pokazao je najpovoljniju proteinsku strukturu i mogao bi imati značaj u oplemenjivanju soje na specifičan proteinski sastav. Uticaj godine na proteinske frakcije ustanovljen je samo kod ' i subjedinice konglicinina i sadržaj ukupnih proteina.

**Glavne reči:** soja, sadržaj proteina, glicinin, konglicinin

### Uvod

Soja (*Glycine max* L. Merr.) je važna biljna vrsta zbog visokog sadržaja proteina (oko 40%) i ulja (20%) u zrnu. Pored prinosa, značajna pažnja u oplemenjivačkim programima posvećuje se hemijskom sastavu zrna. Sojina sačma, kao izvor visoko-kvalitetnih proteina, koristi se za ishranu životinja. Sa povećanjem potrošnje mesa pokazala se potreba za većim količinama kvalitetne i bezbedne hrane za ishranu životinja. Pored ishrane životinja, sojini proteini imaju značajnu ulogu u ljudskoj ishrani. Konditorski, farmaceutski i mnogi drugi proizvodi sadrže soju ili preradevine od soje, a za dobijanje pojedinih proizvoda neophodna je odgovarajuća proteinska struktura. Takođe, poznat je i pozitivan uticaj ishrane koja sadrži soju na zdravlje ljudi (Pešić, 2003). Zbog toga se povećanje sadržaja proteina u zrnu, kao i specifična proteinska struktura, sve češće javlja kao cilj u oplemenjivačkim programima.

Oko 70% rezervnih proteina u zrnu soje čine globulini, proteini rastvorljivi u rastvorima soli. Glavne proteinske frakcije su 11S, 7S i 2S. Prema dosad prihvaćenoj klasifikaciji rezervnih proteina soje, glavne frakcije nazivaju se glicinin i -konglicinin (Thanh et al., 1978; Derbyshire et al., 1976). Glicinin čini oko 60% rezervnih proteina dok preostalih 40% čini -konglicinin (Nielsen et al., 1989). Glicinin je heksamerni protein molekulske mase između  $320 \times 10^3$  i  $375 \times 10^3$  (Badley et al., 1975). Heksamerna struktura molekula glicinina sastoji se od dva trimera koga čine dva monomera. Monomeri se sastoje od dva polipeptidna lanca, kiselog i baznog, koji su povezani disulfidnim mostom. -konglicinin je

trimer molekulske mase  $150-175 \times 10^3$  (Than et al., 1977). Molekul -konglicinina sastoji se od tri homologne subjedinice (  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  ) (Than et al., 1978).

Dve najveće frakcije rezervnih proteina soje siromašne su u pogledu sumpornih aminokiselina. Glicini sadrže nešto više sumpora (3 do 4,5%; Fukushima, 1991) od -konglicinina (manje od 1%; Derbyshire et al., 1976). Kako ljudski organizam i monogastrične životinje ne sintetišu sumporne aminokiseline, od esencijalnog je značaja da se njihov sadržaj u zrnu soje poveća. Kako navode Pešić i sar. (2005) konglicinin ima pozitivan uticaj na ekstrakciju i rastvorljivost proteina. Odnosno, genotipovi sa povišenim sadržajem konglicinina pogodniji su za proizvodnju tečnih proizvoda od soje. Prema tome poznavanje proteinske strukture genotipova soje u velikoj meri može doprineti selekcionisanju novih sorti soje sa specifičnim funkcionalnim svojstvima, što je od velikog značaja za preradu i primenu soje.

Cilj ovog rada je bio da se utvrdi struktura rezervnih proteina visoko-proteinskih genotipova soje, selekcionisanih u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo, pomoću gel elektroforeze i denzitometrijske analize, kao i uticaj godine i genotipa na ekspresiju proteinskih subjedinica rezervnih proteina soje.

## Materijal i metod

Deset genotipova soje koji pripadaju II grupi zrenja, selekcionisanih u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo uključeno je u ova ispitivanja. Ogled je izveden na eksperimentalnim poljima Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad tokom 2004. i 2005. godine. Sadržaj ukupnih proteina u semenu (izračunato na 0% vlage) određen je tehnikom Near Infrared Spectroscopy (NIR) na aparatu PERTEN DA 7000 prema protokolu Balešević-Tubić i sar. (2007).

Proteini su ekstrahovani iz 40 mg samlevenog zrna pomoću 1 ml ekstrakcionog pufera (0,03 M TRIS-HCl, pH 8,0 sa 0,01 M -mercaptoethanol) tokom 60 min. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani 20 min na 11.000g. Koncentracija proteina u ekstraktu određena je Bradford metodom (Bradford, 1976) uz korišćenje BSA (Bovine serum albumin) kao standarda.

Proteini su razdvojeni elektroforezom u denaturišućim uslovima (SDS-PAGE) prema proceduri Laemmli (1970) na gelu debljine 1 mm pomoću elektroforetske jedinice, Carl Roth, Germany. U 50  $\mu$ l ekstrakta dodato je 50  $\mu$ l SDS pufera (0,15 M TRIS-HCl, pH 6,8, 3% w/v SDS, 5% v/v b-mercaptoethanol, 7% v/v glycerol, 0,03% Bromphenol Blue) i zagrevano 3 min u ključalom vodenom kupatilu. Nakon hlađenja na sobnoj temperaturi po 15  $\mu$ l uzorka je nanošeno na gel. Za određivanje molekulske mase korišćen je Wide Molecular Weight Range, SigmaMarkers standard. Na poslednja dva mesta na suprotnoj strani gela je nanesen je uzorak sorte Vojvođanka koja je korišćena kao standard.

Nakon elektroforeze, gelovi su bojeni sa 0,1% Coomassie Brilliant Blue R-250 tokom 2 h, a reakcija je zaustavljena dodavanjem rastvora za fiksiranje (3 methanol: 1 glacial acetic acid: 6 voda).

Proteinske frakcije su kvantifikovane denzitometrijski korišćenjem ImageJ programa. Za svaki genotip određena je površina specifične proteinske trake i podeljena sa vrednošću standardene sorte (Vojvođanka). Dobijena vrednost predstavlja relativan sadržaj proteinskih frakcija.

Podaci su obrađeni dvofaktorijskom analizom varijanse, a značajnost razlika testirana je LSD testom.

## Rezultati i diskusija

Kako je soja značajan izvor proteina za ishranu ljudi i životinja, u mnogim oplemenjivačkim programima posebna pažnja se, pored prinosa, posvećuje i stvaranju sorti izmenjenog hemijskog sastava zrna. Osnovni problem koji se javlja prilikom oplemenjivanja na povišen sadržaj proteina jeste postojanje negativne korelacije između prinosa i sadržaja proteina (Burton et al., 1987). Međutim, učinjen je značajan napredak u prevazilaženju ovog problema. Pokazalo se da je moguće oplemenjivanje na povećan sadržaj pojedinih proteinskih frakcija bez negativnog uticaja na ukupni sadržaj proteina (Fehr i sar., 2003; Krishnan et al., 2007).

Tab. 1. Ukupan sadržaj proteina i relativna ekspresija proteinskih subjedinica glicinina u zrnu soje

Tab. 1. Total protein content and relative protein expression of the subunits of glycinin in soybean seed

Genotip <i>Genotype</i>	Sadržaj proteina <i>Protein content</i>			Kiseli polipeptid <i>Acidic polypeptide</i>			Bazni polipeptid <i>Basic polypeptide</i>		
	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>
KO5311	42,68	41,73	42,20	1,68	1,93	1,81	1,29	2,23	1,76
KO5312	41,92	41,12	41,52	1,40	1,66	1,53	1,60	1,86	1,73
KO5313	42,58	42,00	42,29	1,67	1,31	1,49	2,46	1,42	1,94
KO5314	42,99	43,56	43,27	1,41	1,26	1,34	1,60	1,45	1,53
KO5315	44,44	43,70	44,07	1,02	1,15	1,08	1,23	1,38	1,31
KO5316	43,02	43,49	43,25	1,65	1,20	1,42	1,96	1,41	1,69
KO5317	44,66	43,79	44,22	1,26	1,42	1,34	1,45	1,62	1,53
KO5318	45,16	43,02	44,09	1,47	1,60	1,54	1,69	1,84	1,77
KO5319	38,62	38,45	38,53	1,23	1,31	1,27	1,40	1,42	1,41
Vojvođanka	38,51	37,27	37,89	1,17	1,00	1,09	1,26	1,00	1,13
Prosek godine <i>Average year</i>	42,45	41,81		1,40	1,38		1,59	1,56	
Genotip <i>Genotype</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,23				0,10			0,08
	LSD <sub>0,01</sub>	0,31				0,13			0,10
Godina <i>Year</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,10				0,04			0,03
	LSD <sub>0,01</sub>	0,14				0,06			0,05
Genotip x Godina <i>Genotype x Year</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,33				0,14			0,11
	LSD <sub>0,01</sub>	0,44				0,19			0,14

Sadržaj ukupnih proteina kod ispitivanih genotipova kretao se od 37,89% koliko je izmereno kod standardne sorte Vojvođanka do 44,22% kod genotipa KO5317 (Tab. 1). Svi ispitivani genotipovi imali su povećan sadržaj proteina u zrnu u poređenju sa standardnom sortom Vojvođanka. Najviše proteina u zrnu soje izmereno je kod genotipova KO5317, KO5318 i KO5315. Rezultati dobijeni u ovom radu su u saglasnosti sa rezultatima Burton i sar. (1982), Steinke (1992) i

Poysa i sar. (2006), koji su ispitivali genotipove sa povišenim sadržajem proteina. Prosečan sadržaj ukupnih proteina razlikovao se u zavisnosti od godine. Usled različitih meteoroloških uslova tokom ovih godina, sadržaj proteina bio je viši u 2004. u poređenju sa 2005. godinom.

Sadržaj kiselih polipeptida glicinina, varirao je između 1,07 (genotip KO5315) i 1,81 (genotip KO5311). Svi genotipovi, osim KO5315, imaju značajno veći sadržaj kiselih polipeptida od standarda (Tab. 1). Nisu zabeležene razlike u sadržaju ovih polipeptida između godina, što je u saglasnosti sa rezultatima Fehr et al. (2003).

Najviši nivo baznog polipeptida zabeležen je kod genotipa KO5313, ali su i svi ostali testirani genotipovi imali veći sadržaj ovog polipeptida u poređenju sa standardnom sortom Vojvodanka (Tab. 1). Nisu utvrđene statistički značajne razlike u sadržaju baznih polipeptida glicinina između godina, što potvrđuje rezultate koje su dobili Fehr et al. (2003). Imajući u vidu da proučeni visoko-proteinski genotipovi imaju povećan sadržaj oba polipeptida glicinina, može se pretpostaviti da je povećanje ukupnog sadržaja proteina pozitivno uticalo na povećanje glicinina kod ovih genotipova.

Tab. 2. Relativna proteinska ekspresija subjedinica konglicinina u zrnu soje  
Tab. 2. Relative protein expression of the subunits of b conglycinin in soybean seed

Genotip <i>Genotype</i>	subjedinica <i>a subunit</i>			' subjedinica <i>' subunit</i>			subjedinica <i>b subunit</i>		
	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>	2004	2005	Prosek sorte <i>Average genotype</i>
KO5311	1,85	1,89	1,87	2,13	1,93	2,03	1,82	2,27	2,04
KO5312	1,26	1,94	1,60	1,67	1,59	1,63	1,23	1,78	1,50
KO5313	2,00	1,27	1,64	2,09	1,36	1,73	1,92	1,40	1,66
KO5314	1,19	1,08	1,13	1,22	1,07	1,14	1,01	1,07	1,04
KO5315	1,05	1,21	1,13	1,09	1,11	1,10	0,94	2,08	1,51
KO5316	1,93	1,47	1,70	1,83	1,51	1,67	1,78	1,60	1,69
KO5317	1,11	1,28	1,19	1,04	1,23	1,14	1,15	1,48	1,32
KO5318	1,31	1,51	1,41	1,26	1,61	1,44	1,26	1,59	1,42
KO5319	1,33	1,39	1,36	1,40	1,43	1,41	1,10	1,38	1,24
Vojvodanka	1,15	1,00	1,08	1,16	1,00	1,08	0,91	1,00	0,95
Prosek godine <i>Average year</i>	1,42	1,40		1,49	1,38		1,31	1,56	
Genotip <i>Genotype</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,11				0,17			0,19
Godina <i>Year</i>	LSD <sub>0,01</sub>	0,15				0,22			0,26
Genotip x Godina <i>Genotype x Year</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,05				0,07			0,09
Genotip x Godina <i>Genotype x Year</i>	LSD <sub>0,01</sub>	0,07				0,10			0,12
Genotip x Godina <i>Genotype x Year</i>	LSD <sub>0,05</sub>	0,16				0,23			0,27
Genotip x Godina <i>Genotype x Year</i>	LSD <sub>0,01</sub>	0,21				0,31			0,37

Najviši sadržaj subjedinice konglicinina imao je genotip KO5311, a najniži sorta Vojvodanka (Tab. 2). Genotipovi KO5314, KO5315 i KO5317 nisu

se statistički značajno razlikovali od standarda, dok su ostali genotipovi imali veći sadržaj subjedinice.

Subjedinica konglicinina imala je najveću ekspresiju kod genotipa KO5311 a najmanju kod sorte Vojvođanka. Genotipovi KO5314, KO5315 i KO5317 bili su na nivou standarda, dok su ostali genotipovi imali povećan sadržaj ove subjedinice u odnosu na standardnu sortu.

Najniži sadržaj subjedinice konglicinina imala je sorta Vojvođanka, dok je najviši sadržaj ove subjedinice bio kod genotipa KO5311. Svi genotipovi, osim genotipa KO5314, imali su viši sadržaj subjedinice konglicinina u poređenju sa standardnom sortom.

Utvrđene su statistički značajne razlike u sadržaju i subjedinice konglicinina između godina, dok se sadržaj subjedinice nije statistički razlikovao. Do istih rezultata o uticaju godine na sadržaj pojedinih subjedinica konglicinina došli su Fehr et al. (2003).

Povećanjem sadržaja glicinina poboljšava se kvalitet i nutritivna vrednost sojinih proteina. Genotip KO5314 je imao značajno veći sadržaj glicinina i neizmenjen sadržaj konglicinina, te bi se mogao koristiti prilikom stvaranja sorti sa željenom aminokiselinskom kompozicijom. KO5311 je imao značajno veći sadržaj subjedinica glicinina i konglicinina, što znači da je povećanje ukupnih proteina uslovalo i povećanje sadržaja obe rastvorljive frakcije rezervnih proteina. Pošto određeni prehrambeni proizvodi zahtevaju specifičnu kompoziciju proteina, ovaj genotip se može koristiti u programima oplemenjivanja visokoproteinskih sorti.

## Zaključak

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na varijabilnost proteinske strukture visokoproteinskih genotipova i na mogućnost oplemenjivanja soje na specifičan proteinski sastav. Polipeptidna analiza je pokazala da visokoproteinski genotipovi soje ispoljavanju značajne genotipske razlike u strukturi rezervnih proteina. Povećanje ukupnih proteina dolazi usled povećanja sadržaja pojedinačnih proteinskih frakcija. Uticaj godina ispoljava se na sadržaj ukupnih proteina i i subjedinice konglicinina. Genotip KO5311 je pokazao najpovoljniju proteinsku strukturu i mogao bi se iskoristiti pri oplemenjivanju soje na specifičan proteinski sastav.

## Zahvalnica

Autori se zahvaljuju mr Bojani Stanić na pomoći prilikom denzitometrijske analize.

Ovaj rad je urađen uz podršku Ministarstva nauke Republike Srbije, kao deo projekta broj 6852.

## Literatura

Badley RA, Atkinson D, Hauser H, Oldani D, Green JP, Stubbs JM (1975): The structure, physical and chemical properties of the soybean protein glycinin. *Biochim Biophys Acta* 412: 214-228.

- Balešević-Tubić, S., Đorđević V., Tatić M., Kostić M., Ilić A. (2007): Application of near infrared spectroscopy in determination of protein and oil content in soybean seed. Arhiv za poljoprivredne nauke. In press
- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Burton, J. W., Purcell, A. E., Walter, W. M. Jr., (1982): Methionine concentration in soybean protein from populations selected for increased percent protein. *Crop Science*, 22, 430-432.
- Burton JW (1987): Quantitative genetics: results relevant to soybean breeding. In Wilcox, J. R. (Eds.), *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*, American Society of Agronomy: Madison, WI, pp 211-247.
- Derbyshire E, Wright DB, Boulter D (1976): Legumin an vicilin, storage proteins of legume seed. *Phytochemistry* 15:3-24.
- Fehr WR, Hoeck JA, Johnson SL, Murphy PA, Nott JD, Padilla GI, Welke GA (2003): Genotype and Environment Influence on Protein Components of Soybean. *Crop Sci* 43: 511-514.
- Fukushima D (1991): Recent progress of soybean protein foods: chemistry, technology and nutrition. *Food Review International* 7:323-351.
- Krishnan HB, Savithiry SN, Ahmed AM, Randall L N (2007): Identification of Glycinin and b-Conglycinin Subunits that Contribute to the Increased Protein Content of High-Protein Soybean Lines. *J Agric Food Chem* 55: 1839-1845.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Nielsen NC, Dickinson CD, Cho TJ, Thanh VH, Scallion BJ, Fischer RL, Sims TL, Drews GN, Goldberg RB (1989): Characterization of the Glycinin Gene Family in Soybean. *The Plant Cell* 1:313-328
- Pešić M. (2003): Uticaj proteinske molekulske structure genotipova na tehnološke funkcionalne osobine soje. Magistarska teza. Univerzitet u Beogradu. Poljoprivredni fakultet.
- Pešić M, Vecelic-Radulovic B, Barac M, Stanojevic S (2005): The influence of genotypic variation in protein composition of emulsifying properties of soy proteins. *JAOCS* 82: 667-672.
- Poysa V, Woodrow L, & Yu K (2006): Effect of soy protein subunit composition on tofu quality. *Food Research International* 39: 309-317.
- Steinke, F. H. (1992): Nutritional value of soybean protein foods. In F. H. Steinke, D. H. Waggle, & M. N. Volgarev (Eds.), *New Protein Foods in Human Health: Nutrition, Prevention and Therapy*, Boca, Raton FL: CRC Press, pp.59-66.
- Thanh VH, Shibasaki K (1977): -conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physiochemical properties of the monomeric forms. *Biochim Biophys Acta* 490: 370-384.
- Thanh VH.; Shibasaki K (1978): Major proteins of soybean seeds. Subunit structure of -conglycinin. *J Agric Food Chem* 26: 692-695.
- Yaklich RW (2001): -Conglycinin and Glycinin in High-Protein Soybean Seeds. *Agric Food Chem* 49:729-735.

## PROTEIN COMPOSITION OF HIGH-PROTEIN SOYBEAN GENOTYPES

Vuk Đorđević<sup>1</sup>, Ksenija Taški-Ajduković<sup>2</sup>, Miloš Vidić<sup>1</sup>,  
Milka Vujaković<sup>2</sup>, Jegor Miladinović<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

<sup>2</sup>National Laboratory for Seed Testing, Novi Sad

**Summary:** The quality of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] food products been associated with subunit composition of storage proteins. The objective of this study was to estimate protein composition of seed storage proteins, glycinin and  $\beta$ -conglycinin, among high-protein soybean genotypes. The trials were carried out at Experimental Fields of Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad, Serbia during 2004 and 2005. The protein structure was estimated by scanning SDS-PAGE gels using densitometry.

Our study confirmed observation that high-protein cultivars accumulated higher amount of both glycinin and  $\beta$ -conglycinin. Genotype KO5311 had the optimal protein composition and could be beneficial in breeding programs aimed at altering composition of seed storage proteins. The significant differences were observed among years for the protein content,  $\alpha$  and  $\beta$ -subunits of  $\beta$ -conglycinin.

**Key words:**  $\beta$ -conglycinin, glycinin, protein composition, soybean