

**UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Milica Ž. Pavličević

**UTICAJ SADRŽAJA PODJEDINICA β KONGLICININA NA TEHNOLOŠKE
FUNKCIONALNE OSOBINE PROTEINA SOJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

Milica Ž. Pavličević

**INFLUENCE OF CONTENT OF β CONGLYCININE SUBUNITS ON
TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF SOYBEAN
PROTEINS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Poljoprivredni fakultet, Beograd

Mentor: Dr. Biljana Vucelić Radović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. Prof. dr. Slađana Stanojević, Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr. Ljuba Mandić, Hemijski fakultet, Univerziteta u Beogradu
3. Prof. dr. Mirjana Milovanović, Poljoprivredni fakultet, Univerziteta u Beogradu
4. Dr. Vuk Đorđević, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

Datum odbrane doktorske disertacije:

Uticaj sadržaja podjedinica β konglicinina na tehnološke funkcionalne osobine proteina soje

Rezime

Zbog značajne nutritivne vrednosti i visokog sadržaja proteina, antioksidanasa i nezasićenih masnih kiselina soja se svrstava u kategoriju funkcionalne hranu. Zdravstveni efekti soje u humanoj ishrani su brojni: doprinosi smanjenju koncentracije glukoze i holesterola u krvi, pokazuje antioksidativni efekat, povoljno utiče na održavanje hormonske ravnoteže, sprečava osteoporozi i deluje preventivno na različite tipove kancera.

Na tehnološki značajne funkcionalne osobine proteina semena soje najviše utiču dva glavna rezervna proteina: glicinin (11S protein) i β konglicinin (7S protein). I 11S i 7S proteini se javljaju u više izoformi. Molekul glicinin čine dva neglikozilovana heksamera koji se sastoje iz parova kiselih i baznih polipeptida povezanih disulfidnim mostom. β konglicinin je glikozilovani trimerni protein koji se sastoji iz tri podjedinice- α , α' i β . Pojedine sorte soje, među kojima su naročito brojne domaće sorte, sintetišu dodatnu β' podjedinicu. Premda je efekat ostalih podjedinica β konglicinina na tehnološka funkcionalna svojstva proteina soje intenzivno proučavan, u literaturi postoji veliki broj kontradiktornih podataka. O efektima β' podjedinice na rastvorljivost, emulgujuća i gelirajuća svojstva sojinih proteina veoma malo se zna.

Cilj ovog rada bio je da se ispita efekat polipeptidnog sastava glicinina i β konglicinina na rastvorljivost, emulgujuća i gelirajuća svojstva proteina na različitim pH vrednostima (3, 5, 6 i 8) na seriji od 9 različitih genotipova soje gajenih u dve sukcesivne godine. Uspostavljanje korelacija između specifičnih podjedinica sojinih proteina i željenog svojstva pri datoj pH vrednosti, omogućilo bi ne samo selekciju sorti pogodnih za dati tehnološki proces, već bi uticalo i na osobine gotovih proizvoda. Povećana rastvorljivost obezbeđivala bi lakše usvajanje aminokiselina i bolju svarljivost. Pored povećane biološke vrednosti, visoka rastvorljivost je u pozitivnoj korelaciji sa funkcionalnim svojstvima poput geliranja i penivosti. Poboljšanje emulgujućih i gelirajućih svojstava sojinih proteina

doprinelo bi povećanju opsega proizvoda u koje se sojini proteini mogu dodavati kao emulgatori ili gelirajući agensi.

Kako je posebna pažnja posvećena ispitivanju uticaja β' podjedinice, genotipovi su odabrani prevashodno na osnovu sadržaja β' podjedinice. Nakon dobijanja obezmašćenog brašna, proteini su ekstrahovani prema modifikovanoj metodi po Yagasaki-ju (1997). Uzorak je podeljen na 4 dela i pH je podešen do željene vrednosti (pH 3, 5, 6 i 8). SDS PAGE metodom određen je proteinski sastav svakog genotipa. Da bi se rezultati izrazili po suvoj masi, određen je sadržaj vlage u uzorcima po standardnoj AACC metodi. Kako rastvorljivost predstavlja odnos sadržaja rastvorljivih proteina prema ukupnim proteinima (u %), rastvorljivi proteini su određeni metodom po Bradford-u (1976), dok su ukupni proteini određeni metodom po Kjeldahl-u (2000). Emulgujuće osobine ocenjene su na osnovu vrednosti indeksa stabilnosti emulzije (ESI) i indeksa aktivnosti emulzije (EAI), koji su određeni metodom po Pearce i Kinsella-i (1979). Gelirajuća svojstva određena su merenjem vrednosti dinamičkih modula - modula zadržane energije (G') i modula izgubljene energije (G''). Step en bubrenja gelova određen je kao odnos mase suvog i mase nabubrelog polimera. Za dvodimenzionalnu (2D) elektroforezu uzorci su ekstrahovani tiourea-urea puferom, a intenzitet i broj tačaka je određen denzitometrijski. Efekat pojedinačnih podjedinica ocenjivan je na osnovu korelacionih koeficijenata, dok je zajednički efekat testiran ANOVA testom.

Prevashodno usled razlike u strukturama, različiti sadržaj podjedinica β konglicinina različito je uticao na rastvorljivost na ispitivanom pH. Na pH 6 i pH 8, genotipovi sa većim sadržajem α' i α podjedinice pokazuju i veću rastvorljivost. Ovakvo povećanje rastvorljivosti posledica je prisustva glikozilovanih ekstenzionih regiona i većeg broja polarnih aminokiselinskih ostataka u strukturi α' i α . Suprotno tome, hidrofobna β' podjedinica, koja ne poseduje ekstenzione regione imala je negativan uticaj na rastvorljivostna pH 6 i pH 8. Usled izoelektrične precipitacije, minimum rastvorljivosti bio je na pH 5. Na pH 3 rastvorljivost je prevashodno zavisila od sadržaja kiselih i baznih polipeptida glicinina. Genotipovi sa većim sadržajem β' podjedinice imali su niže vrednosti indeksa stabilnosti emulzije na pH 6, verovatno usled negativne korelacije sa rastvorljivošću. Kako su indeks stabilnosti i indeks aktivnosti emulzije međusobno

negativno korelisani, sadržaj β' podjedinice pokazao je slabu pozitivnu korelaciju sa EAI na pH 6. Reološka merenja proteinskih gelova su pokazala da vrednosti za modul zadržane energije rastu sa povećanjem odnosa 11S/7S i povećanjem odnosa kiselih/baznih polipeptida. Istovremeno, sadržaj β' podjedinice i stepen bubrenja su bili negativno korelisani sa čvrstinom gela. Ovakav uticaj β' podjedinice može se objasniti njenom nemogućnošću da stupa u elektrostatičke interakcije, koje se smatraju glavnim mehanizmom stabilizacije β konglicinskih gelova. Kao posledica hidrofилности α' i α podjedinica, genotipovi sa većim sadržajem α i α' podjedinica pokazuju i veći stepen bubrenja. Genotipovi, koji pored visokog sadržaja β' subjedinice takođe imaju i visok odnos 11S/7S, kao i visok odnos kiselih/baznih polipeptida i dalje pokazuju relativno visoke vrednosti G' . Navedeno ukazuje da je efekat velikih vrednosti odnosa 11S/7S i kiselih/baznih polipeptida na reološke osobine izraženiji od efekta sadržaja β' podjedinice.

Ključne reči: β konglicinin, β' podjedinica, seme soje, rastvorljivost, emulgujuće i reološke osobine

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Prehrambena tehnologija

UDK broj: 547.962.5 :: 532.135 : 635.655 (043.3)

Influence of β conglycinin subunits content on technological functional properties of soybean proteins

Abstract

Because of its nutritive value and high content of proteins, antioxidants and unsaturated fatty acids, soybeans have been regarded as functional food. Health benefits of inclusion of soy in human diet are numerous: it helps diminishing concentration of glucose and cholesterol in blood, has antioxidative effect, helps in regulating hormonal balance, prevents osteoporosis and has protective influence against different types of cancers.

The strongest influence on technological functional properties of soybean proteins is exhibited by two reserve proteins: glycinin (11S protein) i β conglycinin (7S protein). Both 11S and 7S protein are present in different isoforms. Glycinin molecule is composed of two non-glycosilated hexamers that contain pairs of acidic and basic polypeptides linked together by disulfide bonds. β conglycinin is glycosilated trimeric protein composed of three types of subunits - α , α' and β . Some varieties of soybean, among them numerous varieties grown in Serbia, are synthesizing additional β' subunit. Although effects of other subunits of β conglycinin on technological functional properties of soybean proteins have been extensively studied, there is still a high number of contradictory data in literature. Little is known about influence of β' subunit on solubility, emulsifying and gelling properties of soybean proteins.

The aim of this work was to examine effect of polypeptide composition of glycinine and β conglycinine on solubility, emulsifying and gelling properties of soybean proteins at different pH values (3, 5, 6 and 8) on series of 9 different genotypes grown in two successive years. Establishing correlation of specific subunit of soybean protein with desired characteristic on given pH value would allow not only selection of varieties of soybean suitable for particular technological process, but would also have impact on properties of finished product. Higher protein solubility would allow better usage of amino acids and would also give higher digestibility. In addition to enhancing biological value of

products, solubility is also positively correlated with functional properties such as gelling and foaming properties. Enhanced emulsifying and gelling properties would broaden the range of products in which soybean proteins can be used as emulsifying or gelling agent.

Since special attention has been paid to influence of β' subunit, genotypes were primarily selected based on their content of β' subunit. After obtaining defatted flour, proteins were extracted according to modified procedure of Yagasaki. Sample was divided in 4 aliquots and pH of each of them was adjusted to desired value (pH 3, 5, 6 and 8). Subunit content of each genotype was determined by SDS PAGE. To calculate results per dry mass of sample, moisture content was determined by standard AACC method. Since solubility presents ratio of soluble proteins to total proteins (in %), content of soluble proteins was determined by Bradford procedure, while content of total proteins was determined by method of Kjeldahl. Emulsion properties were assessed by values of emulsion stability index (ESI) and of emulsion activity index (EAI), which were determined by procedure of Pearce and Kinsella. Gelling properties were determined by measuring values for dynamic modulus: storage modulus (G') and loss modulus (G''). Degree of swelling of gels was calculated as ratio between mass of dry polymer to mass of swollen polymer. For two dimensional (2D) electrophoresis samples were extracted with thiourea-urea buffer and intensity and number of spots were determined by densitometry. Effect of individual subunit was assessed based on correlation coefficients, while joined effect was examined by ANOVA tests.

Due to differences in structure, different composition of subunits of β conglycinin had different effect on protein solubility at given pH. At pH 6 and pH 8, genotypes with higher content of α' and α subunits showed higher solubility. Such increase in solubility was consequence of presence of glycosylated extension regions and higher number of polar amino acid residues in structure of α' and α . On the contrary, hydrophobic β' subunit that lacks extension regions had negative influence on solubility at pH 6 and pH 8. Due to isoelectric precipitation, minimal solubility was detected at pH 5. At pH 3, solubility mainly depended on content of acidic and basic polypeptides of glycinine. Genotypes with higher content of β' subunit had lower values of emulsion stability index at pH 6, probably due to negative correlation with solubility. Since emulsion stability index and emulsion activity index were negatively correlated, presence of β' subunit was weakly positively

correlated with EAI at pH 6. Rheological measurements of protein gels showed that values of storage modulus were higher for gels with higher ratio of 11S/7S and higher ratio of acidic/basic polypeptides. At the same time, content of β' subunit and degree of swelling were negatively correlated with gel stiffness. Such influence of β' subunit can be explained by its inability to engage in electrostatic interaction that are considered as main mechanism of stabilization of β conglycinin gels. As a consequence of hydrophilic nature of α' and α subunit, genotypes with higher content of α and α' subunit made gels with higher degree of swelling. In the case of genotypes that have high content of β' subunit, high 11S/7S ratio and high acidic/basic polypeptides ratio, values for G' were also relatively high. Such findings indicated that effect of high 11S/7S ratio and high acidic/basic polypeptides ratio on rheological properties were more prominent when compared to effect of content of β' subunit.

Keywords: β conglycinin, β' subunit, soybean, solubility, emulsion and rheological properties

Scientific area: Biotechnical Sciences

Specific scientific area: Food Technology

UDK number: 547.962.5 :: 532.135: 635.655 (043.3)

Veliku zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. Biljani Vucelić Radović na njenom svesrdnom zalaganju i nesebičnoj pomoći kako tokom eksperimentalnog rada tako i tokom tumačenja rezultata i pisanja disertacije.

Takođe sam zahvalna kolegama sa Katedre za hemiju i biohemiju i Katedre za fiziologiju biljaka na praktičnim savetima i spremnosti da podele svoje iskustvo.

Hvala kolegama sa Katedre za agrohemiju zbog pomoći tokom određivanja sadržaja ukupnih proteina.

Hvala dr. Vuku Đorđeviću i Institutu za ratarstvo i povrtarstvo na obezbeđivanju uzoraka soja.

Zahvalna sam članovima komisije, posebno prof. Slađani Stanojević, na sugestijama tokom pisanja disertacije. Prof. Stanojević sam takođe zahvalna i na pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem dipl.inž. Milošu Tomiću i prof. Jasni Đolagić na pomoći tokom određivanja gelirajućih svojstava i njihovog objašnjavanja. Njihovo stpljenje i želja da pomognu učinili su reologiju daleko bližom i zanimljivijom.

Hvala docentu dr. Mirjani Pešić i prof. Miroljubu Baraću na pomoći oko izvođenja SDS poliakrilamidne elektroforeze.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj porodici i prijateljima na njihovom razumevanju i konstantnoj podršci. Hvala mom bratu Strahinji i mom momku Daliboru koji su služili kao besplatni lektori i tehnička podrška.

SADRŽAJ:

1. Uvod	1
2. Pregled literature	
2.1. Proteini soje	3
2.2. Struktura i izoforme β konglicinina	4
2.3. Kristalna struktura β konglicinina i uticaj na funkcionalnost	7
2.4. Zdravstveni efekti ishrane bogate sojom	8
2.5. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na rastvorljivost	15
2.6. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na emulgujuća svojstva	17
2.7. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na gelirajuća svojstva	19
2.8. Razdvajanje sojinih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom	23
3. Naučne hipoteze i cilj rada	26
4. Materijal i metode	
4.1. Priprema uzorka	28
4.2. Ekstrakcija proteina	28
4.3. Određivanje sadržaja vlage	29
4.4. Određivanje ukupnih proteina	29
4.5. Određivanje rastvorljivih proteina i rastvorljivosti	29
4.6. Karakterizacija proteina SDS - poliakrilamidnom elektroforezom	30
4.7. Priprema emulzija	31
4.8. Određivanje stabilnosti i aktivnosti emulzije	31
4.9. Priprema gelova	31
4.10. Određivanje stepena bubrenja	32
4.11. Određivanje dinamičkih modula	32
4.12. Razdvajanje sojinih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom	32
4.13. Statistička analiza	34

5. Rezultati i diskusija	
5.1. Podjedinčni sastav sojinih proteina	35
5.2. 2D elektroforeza sojinih proteina	41
5.3. Rastvorljivost sojinih proteina	47
5.4. Emulgujuće osobine sojinih proteina	
5.4.1. Stabilnost emulzije	53
5.3.2. Aktivnost emulzije	56
5.5. Reološke osobine sojinih proteina	60
6. Zaključak	71
7. Spisak skraćenica	75
8. Prilog	76
9. Literatura	127

1. UVOD

Među biljkama iz porodice leguminoza soja (*Glycine max*) je jedna od najviše izučavanih. Ovakav naučni interes potiče prvenstveno od njene nutritivne vrednosti i uticaja takvih nutritivnih karakteristika na zdravlje čoveka. Seme soje sadrži veliki procenat proteina (u čiji sastav ulaze esencijalne aminokiseline), antioksidanasa (od kojih najveću nutritivnu vrednost imaju izoflavoni), veliki procentualni udeo nezasićenih masnih kiselina (60-65% ukupnih lipida) i povoljan sadržaj vitamina (A,C, niacin i vitamini grupe B) i minerala (sa akcentom na biološki dostupno gvožđe) (Jayakumar i saradnici, 2010; Cahoon, 2003).

Sa nutritivnog aspekta postoje dva problema sa upotrebom sojinih proteina. Premda se karakterišu visokom zastupljenošću esencijalnih aminokiselina, u prvom redu lizina, sojini proteini su siromašni aminokiselinama koje sadrže sumpor. Pored toga, njihova izuzetno kompaktna kvaternarna struktura i prisustvo inhibitora proteinaza uslovljavaju otežanu svarljivost sojinih proteina.

S ekonomske strane isplativo je gajiti one linije koje daju visok prinos, tako da je dodatni problem postojanje negativne korelacije između prinosa i sadržaja proteina (Kirshnan, 2007). Kako je poznato da 11S proteini sadrže više aminokiselina sa sumporom nego 7S proteini, dosta je rađeno na povećanju odnosa 11S/7S proteina, što s druge strane može voditi promeni bilansa esencijalnih aminokiselina. Ovakvo povećanje odnosa postiže se najpre kroz selekciju i oplemenjivanje određenih, najčešće visokoproteinskih (HP) genotipova. Poznato je da različiti genotipovi znače i različito prisustvo pojedinačnih podjedinica kako glicina, tako i β konglicinina, koje s druge strane različito utiču na funkcionalna svojstva celokupnog proteinskog ekstrakta (Pešić i saradnici, 2005). Pored genetskih faktora, na odnos glicinina prema β konglicininu, značajan uticaj imaće i faktori sredine, kao što je, u prvom redu, prisustvo azota u zemljištu. Ovakvi faktori sredine mnogo veći uticaj imaće na konačnu zastupljenost konglicinina, jer su 7S proteini, zbog razlike u brzini sinteze podjedinica mnogo osetljiviji na faktore sredine (Đorđević, 2010). Takođe, povećanje ukupnog sadržaja proteina neće u istoj meri uticati na sadržaj pojedinačnih

podjedinica. Tako je npr. sadržaj β podjedinice negativno korelisan sa sadržajem ukupnih proteina (Fehr, 2003).

Odnos 11S prema 7S proteinu ima krucijalni značaj za tehnološka funkcionalna svojstva celokupnog proteinskog ekstrakta. Tako je npr. povećanje sadržaja β konglicinina dovedeno u vezu sa povećanjem rastvorljivosti (Pešić i saradnici, 2005). Takođe, smanjenje 11S/7S odnosa pozitivno je korelirano sa gelirajućim svojstvima (Pearce i Kinsella, 1978, Yaklich, 2001). Međutim, pri promeni odnosa glicinin/ β konglicinin treba imati na umu da smanjenje ili povećanje odnosa neće u istoj meri uticati na sadržaj pojedinačnih subjedinica. Takođe, takva promena odnosa, povlačiće sa sobom i promenu uslova u kojima bi proteini tako različite strukture kao što su glicinin i β konglicinin ispoljili maksimalni efekat na funkcionalna svojstva. Zatim, zbog sličnosti mehanizama koji dovode do ovih pojava, postoji međuzavisnost ne samo između rastvorljivosti i drugih funkcionalnih svojstava, već i funkcionalnih karakteristika među sobom, što opet znači da nije moguće radikalno menjati jedan faktor bez uticaja na druge.

Na tehnološka svojstva značajno će uticati i konformacija prisutnih proteina. S obzirom na sklonost glicinina i β konglicinina ka asocijativno-disocijativnim procesima, primaran uticaj na prisutnu konformaciju imaće jonska jačina i pH rastvora. Tako će npr. prelazak konglicinina iz 7S u 9S oblik, imati značajan efekat na rastvorljivost ukupnih proteina. Pored odnosa 11S/7S i konformacije proteina, na funkcionalna svojstva utiče i odnos pojedinačnih subjedinica. Tako će, npr. zbog veće hidrofilitnosti, jači uticaj na emulgujuće osobine imati α i α' , nego β subjedinica β konglicinina.

Brojne domaće sorte karakteriše prisustvo β' subjedinice. Ovaj polipeptid okarakterisan je u smislu molekulske mase, aminokiselinskog sastava i stepena glikozilacije (Coates, 1985). Međutim, literaturni podaci koji bi dovodili u vezu sadržaj β' subjedinice i promenu funkcionalnih svojstava gotovo da ne postoje. Dva naučna istraživanja novijeg datuma ukazuju na negativnu korelaciju između sadržaja β' podjedinice i sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina (Đorđević, 2010) i između sadržaja β' podjedinice i čvrstine tofua (Stanojević i saradnici, 2011). Tako da su potrebna dalja ispitivanja koja bi dovela u vezu sadržaj pojedinačnih podjedinica β konglicinina, posebno njegove β' podjedinice i promene tehnoloških funkcionalnih svojstava sojinih proteina.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Proteini soje

Proteini soje čine oko 36 % ukupne mase semena soje (Mateos-Aparicio i saradnici, 2008). Najveći procenat ovih proteina čine globulini. Od mase ukupnih proteina semena, približno 45 % čini glicinin (pripada proteinima tipa legumina), a skoro 25 % β konglicinin (pripada proteinima tipa vicilina) (Hill, 1974). I glicinin (11S protein) i β konglicinin (7S protein) predstavljaju rezervne proteine čija je primarna uloga u biljci obezbeđivanje azota (čime se objašnjava visok sadržaj aminokiselina bogatih azotom) i metaboličke energije tokom klijanja. U nativnom obliku polimorfnu strukturu glicinina čine različite kombinacije pet subjedinica. Javlja se u obliku heksamernog monomera, a i dimera. Svaka podjedinica se sastoji od po jednog kiselog i jednog baznog polipeptida povezanih disulfidnom vezom (Yagasaki i saradnici, 1997).

Osim glicinina i β konglicinina, u globuline semena spada sa oko 3% i γ konglicinin koji se najčešće koekstrahuje sa β konglicininom. Pored globulina, od proteina se u semenu soje nalaze i albumini (10 % ukupnih proteina), inhibitori proteaza (6% ukupnih proteina) i lektini (0.5 % ukupnih proteina) (Mateos-Aparicio i saradnici, 2008).

Inhibitori proteaza se na osnovu specifičnosti dele u dve klase: inhibitor Kunitz-ovog tipa (KTI) koji inhibira tripsin i Bouman-Birk inhibitor (BBI) koji inhibira i tripsin i himotripsin. Ova dva tipa inhibitora doprinose pojavi alergijskih reakcija na soju (Brandon, 2002). Do alergijske reakcije dolazi vezivanjem karakterističnih antitela za kompleks inhibitor-proteaza (čime se dodatno smanjuje digestibilnost sojinih proteina). Ipak, Kennedy (1998) je pokazao da, kroz interakciju sa intracelularnim serin proteazama, BBI može delovati kao antikancerogen.

Hemaglutinini (lektini) soje takođe mogu dovesti do alergijskih reakcija. Njihova alergenost ogleđa se u poremećaju intestinalne mukoze, koji može voditi do poremećaja cirkulacije koji mogu usloviti toksemije. SBA (*Soybean agglutinin*) pripada lektinima i smatra se da kod biljke soje ima ulogu u zaštiti od patogena.

2.2. Struktura i izoforme β konglicinina

β konglicinin je trimerni glikoprotein (Mr:150000-180000) sastavljen iz tri vrste subjedinica: α' (71 000), α (67 000) i β (50 000) (Maruyama, 1999). Međutim, koristeći nomenklaturu predloženu od strane Thanh-a i Shibasaki-a (1977), u pojedinim ekstraktima uočava se prisustvo β' subjedinice (45 800) (Stanojević i saradnici, 2011).

Poznato je 7 različitih izomera β konglicinina u zavisnosti od zastupljenosti pojedinačnih subjedinica: β_3 (B0), $\alpha'\beta_2$ (B1), $\alpha\beta_2$ (B2), $\alpha'\alpha\beta$ (B3), $\alpha_2\beta$ (B4), $\alpha_2\alpha$ (B5), α_3 (B6) (Thanh, Shibasaki, 1978). Prisustvo različitih izomera objašnjeno je od strane Gayler-a i Sykes-a (1981) kroz razlike u vremenu sinteze α i α' i β subjedinice. Obzirom da se α i α' subjedinica sintetišu 15, odnosno 17 dana nakon cvjetanja, dok sinteza β subjedinice počinje tek nakon 22-og dana nakon cvjetanja, sastav nesazrelog i zrelog semena znatno se razlikuje u pogledu sadržaja pojedinačnih subjedinica (Hill, 1974). Pored zrelosti semena, na koncentraciju pojedinačnih subjedinica kako β konglicinina, tako i glicinina, kao i na odnos 11S/7S, značajno utiču faktori sredine, kao što su godina i lokalitet. Fehr i saradnici (2003) pokazuju da je najveći stepen zbirnog uticaja godine i lokaliteta na sadržaj proteina primećen za β subjedinicu β konglicinina.

Thanh i Shibasaki (1977) prvi su odredili aminokiselinsku sekvencu, stepen glikozilacije, kao i pI vrednost α , α' i β subjedinice. Njihovi rezultati su pokazali da postoji visoka homologija u aminokiselinskoj sekvenci između α i α' subjedinice, kao i bliske izoelektrične tačke (α' - 5.18; α - 4.9). I α i α' subjedinica imaju po 2 mola N-vezanih šećera (koje čine prevashodno manozu i glukozoamin) po molu subjedinice. S druge strane, β subjedinica se znatno razlikuje i po aminokiselinskom sastavu i po stepenu glikozilacije od α i α' subjedinice. Naime, β subjedinica sadrži 1mol šećera po molu subjedinicea, što je s nutritivnog aspekta bitnije, ima znatno manje aminokiselina koje sadrže sumpor u poređenju sa α i α' subjedinicom. S obzirom da su metionin i cistein esencijalne aminokiseline, navedeno značajno utiče na smanjenje nutritivne vrednosti sojinih proteina u zavisnosti od prisutnih izomera.

Zheng i saradnici (2009) potvrdili su rezultate Thanh-a i Shibasaki-a (1978), određivši aminokiselinski sastav subjedinic β konglicinina prečišćenih hromatografskim metodama (Slika 1.1).

Amino acid	7S (%)	α' subunit (%)	α subunit (%)	β subunit (%)
Asx	12.04	10.49	12.52	13.26
Glx	24.53	31.55	26.32	20.91
Ser	5.38	4.77	5.41	6.01
Gly	3.47	2.95	3.29	3.94
His	2.84	4.71	2.03	2.77
Arg	8.28	8.73	8.76	8.46
Thr	3.25	2.30	2.84	3.86
Ala	3.99	2.34	3.58	5.05
Pro	4.74	5.35	5.07	4.46
Tyr	3.45	3.67	4.09	3.40
Val	4.09	3.17	3.81	4.94
Met	0.39	0.21	0.50	0.19
Cys	0.03	0.08	0.08	0.11
Ile	4.54	3.24	4.46	4.92
Leu	7.50	5.52	7.09	7.95
Phe	5.38	4.63	5.09	5.08
Lys	6.09	6.29	5.08	4.69
Total	100.00	100.00	100.00	100.00

Slika 1.1: Aminokiselinski sastav β konglicinina (Zheng i saradnici, 2009)

Kao što se vidi iz tabele, sve subjediniice imaju kiseo karakter, a u pogledu aminokiselina, osnovna razlika između α i α' subjediniice jeste u sadržaju histidina i leucina.

Malo je radova koji se bave karakterizacijom β' subjediniice. Prvi β' subjediniicu definišu Thanh i Shibasaki (1977), kao dodatnu "traku" na elektroforetskom profilu proteina soje. Pošto je razlika u molekulskim masama vrlo mala, tj. mala je razlika u elektroforetskoj pokretljivosti, prilikom elektroforeze ovaj protein izgleda kao da "prati" β subjediniicu. Coates i saradnici (1985) pokušali su da odrede, pored molekulske mase, aminokiselinski sastav i stepen glikozilacije β' subjediniice. Utvrdili su da, za razliku od β subjediniice, β' subjediniica sadrži barem dva metionina (kao što se vidi sa Slike 1.2), jer prilikom "cepanja" u reakciji sa cijanogen bromidom daje 4 fragmenta. Takođe, razlika je i u nemogućnosti određivanja N terminalne aminokiselinske sekvence β' subjediniice Edmanovom degradacijom.

	Average mole % ^a			
	α'	α	β	β'
Asx	11.43 ± 0.32 ^b	12.20 ± 0.36 ^b	13.59 ± 0.30 ^c	13.67 ± 0.30 ^d
Thr	2.50 ± 0.11 ^b	2.43 ± 0.08 ^b	2.74 ± 0.10 ^c	3.27 ± 0.32 ^d
Ser	7.00 ± 0.27 ^b	7.07 ± 0.14 ^b	7.49 ± 0.17 ^c	8.29 ± 0.42 ^d
Glx	22.62 ± 2.00 ^b	21.91 ± 1.09 ^b	17.79 ± 0.17 ^c	16.48 ± 0.12 ^d
Pro	6.93 ± 0.21 ^b	7.66 ± 0.32 ^b	5.49 ± 0.20 ^c	5.41 ± 0.37 ^d
Gly	5.31 ± 0.13 ^b	4.90 ± 0.19 ^b	5.13 ± 0.10 ^c	5.25 ± 0.55 ^d
Ala	4.46 ± 0.22 ^b	4.74 ± 0.22 ^b	5.06 ± 0.15 ^c	6.04 ± 0.24 ^d
Val	3.87 ± 0.23 ^b	3.63 ± 0.26 ^b	4.50 ± 0.21 ^c	4.54 ± 0.31 ^d
Met	0.61 ± 0.06 ^b	0.46 ± 0.17 ^b	0.27 ± 0.30 ^c	0.72 ± 0.21 ^d
Ile	4.05 ± 0.16 ^b	4.62 ± 0.24 ^b	4.89 ± 0.20 ^c	5.45 ± 0.19 ^d
Leu	7.36 ± 0.35 ^b	8.52 ± 0.24 ^b	10.29 ± 0.18 ^c	10.48 ± 0.45 ^d
Tyr	1.28 ± 1.01 ^b	1.43 ± 0.59 ^b	1.37 ± 0.82 ^c	1.38 ± 0.17 ^d
Phe	4.78 ± 0.38 ^b	5.02 ± 0.13 ^b	6.08 ± 0.17 ^c	5.32 ± 0.16 ^d
His	3.65 ± 0.16 ^b	1.20 ± 0.07 ^b	2.12 ± 0.51 ^c	0.79 ± 0.16 ^d
Lys	6.96 ± 0.31 ^b	5.77 ± 0.19 ^b	5.09 ± 0.17 ^c	5.84 ± 0.61 ^d
Arg	6.88 ± 0.26 ^b	8.12 ± 0.37 ^b	7.35 ± 0.12 ^c	6.53 ± 0.74 ^d
Cys	0.30 ± 0.02 ^c	0.31 ± 0.08 ^d	0.16 ± 0.23 ^e	0.49 ± 2.95 ^e

Slika 1.2: poređenje aminokiselinske sekvence β' subjediniice sa α , α' i β subjedinicom (Coates i saradnici, 1985)

Osim sadržaja metionina, nema značajnije razlike u aminokiselinskoj sekvenci β' i β subjediniice. Ovakve male razlike u aminokiselinskoj sekvenci, kao i mala razlika u molekularnoj masi, navele su Maruyama-u sa saradnicima (2003) da postuliraju da je gen za β' subjedinicu nastao mutacijom u genu za β subjedinicu.

Ista grupa naučnika je (2003), ispitujući molekulske forme glicinina i β konglicinina, utvrdila da β subjediniica pokazuje veliku heterogenost prilikom elektrofokusranja. Oni su opisali peptid koji su nazvali β^* i, zbog slične elektroforetske pokretljivosti i slične molekulske mase, pokušali da odgovore da li je taj peptid istovetan sa β' subjedinicom. Odgovor je bio da su β^* i β' različiti peptidi, jer β^* nema metionin u svom sastavu i za razliku od β' , podleže Edmanovoj degradaciji. Kako onda dolazi do sinteze β^* peptida? Autori predlažu da je β^* peptid nastao postranslatornom modifikacijom β subjediniice. Ovakva modifikacija je kao posledicu imala promenu u termalnoj stabilnosti β i β^* subjediniice.

Dodatni problemi u određivanju kako strukture subjedinica tako i strukture molekula β konglicinina jeste da se subjedinice obično koekstrahuju sa proteinima manje molekulske mase, kao i da molekul β konglicinina u celini pokazuje sklonost ka asocijaciji. Naime, konformacija molekula β konglicinina u rastvoru veoma zavisi od pH i jonske jačine rastvora. Pri jonskoj jačini većoj od 0.5 i/ili pri pH manjoj od 4,8, β konglicinin postoji u formi monomera (tzv. 7S protein). U intervalu od pH 4,8 do pH 10 i pri jonskoj jačini manjoj od 0,2, molekul β konglicinina u rastvoru gradi dimere (tzv. 9S) (Thanh, Shibasaki, 1979). Usled navedenog, prilikom uobičajenih postupaka ekstrakcije, u rastvoru će biti prisutno više molekulskih formi β konglicinina.

Konformacija molekula β konglicinina, a samim tim i njegov uticaj na funkcionalna svojstva, može se menjati i tokom skladištenja, prevashodno usled vlažnosti vazduha. Kao što su pokazali Hou i Cheng (2004), skladištenjem semena soje u uslovima visoke vlažnosti dolazi do promene u sekundarnoj strukturi β konglicinina, tj. povećava se sadržaj α heliksa na račun smanjenja sadržaja β pločica. Posledice promena u sekundarnoj strukturi su smanjenje površinske hidrofobnosti (što utiče na emulgujuća svojstva proteina) i povećanje sadržaja slobodnih SH ostataka (što menja rastvorljivost proteina).

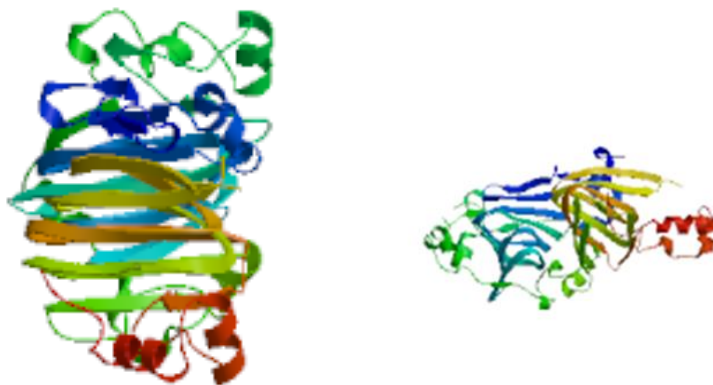
2.3. Kristalna struktura i uticaj na funkcionalnost

Kako je prisustvo β' subjedinice detektovano samo kod određenih sorti, veliki broj istraživanja, pa i kristalografsko određivanje strukture β konglicinina, rađeno je na 'prirodnim' heterotrimerima sastavljenim iz α , α' i β subjedinica, kao i na homotrimerima pojedinačnih subjedinica dobijenim genetskim manipulacijama.

Maruyama i saradnici (2001 i 2004) ispitali su odnos između strukture i funkcije kako „prirodnih“ heterotrimeri β konglicinina, tako i homotrimeri pojedinačnih subjedinica. Subjedinice su povezane hidrofobnim i elektrostatičkim silama i nisu prisutni disulfidni mostovi. Utvrđeno je da sve tri jedinice poseduju tzv. "domen srži" (core domen) koji pokazuje visoku strukturnu homologiju (75 %) između pojedinačnih subjedinica i u kome dominira β bure kao sekundarna struktura (Slika 1.3). Pored domena srži, α i α' subjedinica sadrže i ekstenzioni region na N terminusu koji pokazuje manju strukturnu

homogiju (od sekundarne strukture je procentualno najzastupljenija neuređena struktura) i doprinosi različitim strukturnim svojstvima ovih subjedinica. U sržnom delu sadržan je veći procenat hidrofobnih aminokiselinskih ostataka, dok je ekstenzioni region polarniji, kiseo i menja rastvorljivost na iznad pH 6. Termalna stabilnost subjedinica zavisi od regiona srži.

Zheng i saradnici (2009) utvrdili su da domen srži određuje termalnu stabilnost i površinsku hidrofobnost. Povećana termalna stabilnost β subjedinice vezuje se za postojanje intramolekulskih sonih mostova (Maruyama i saradnici, 2004). Na termalnu stabilnost utiče i stepen glikozilacije, pa α i α' lakše podežu agregaciji pri povišenoj temperaturi. S druge strane, ekstenzioni regioni α i α' , usled polarnosti, utiču na povećanje rastvorljivosti, a samim tim i na razliku u emulgujućim svojstvima. Povećanju rastvorljivosti doprinosi i šećerna komponenta, što je posebno evidentno pri niskim jonskim jačinama (Maruyama i saradnici, 1999, 2001, 2003).



Slika 1.3: struktura β homotrimer (preuzeto iz Maruyama i saradnici, 2004)

2.4. Zdravstveni efekti ishrane bogate sojom

S obzirom na njihovu zastupljenost u ishrani, efekti sojinih proizvoda na zdravlje čoveka ekstenzivno su proučavani. Najšire gledano, prema tome kako deluju na organizam, ti efekti mogu se podeliti na pozitivne (antikancerogeni i antioksidativni efekat, regulacija

koncentracije šećera i lipida u krvi, regulacija apetita, regulacija kognitivnih funkcija, prevencija osteoporoze, stimulacija fagocitoze) i negativne (alergenost, anksiolitička i antitiroidnaaktivnost).

Veliki broj studija govori u prilog tome da sojini proizvodi pokazuju antikancerogeno dejstvo (Barnes i saradnici.(1990), Hawrylewicz i saradnici. (1991),...). Različite klase jedinjenja predlagane su kao ključne za ispoljavanje ovakvog efekta. Izoflavoni, u prvom redu genistein, su izdvojeni kao aktivne komponente soje u radovima Craig-a (1997), Messina-e (1999) i Johnson-a (2000). Međutim, različiti mehanizmi kojima izoflavoni soje ostvaruju antikancerogeno dejstvo predlagani su od strane istraživača. Badger i saradnici (2005) objedinili su ove rezultate i pokazali da izolati sojinih proteina mogu ispoljavati antikancerogeno dejstvo na tri različita načina: sprečavanjem diferencijacije prokancerogena u kancerogene, povećanjem diferencijacije žlezda i na transkripcionom nivou, regulisanjem broja iRNK za gene uključene u procese inicijacije ili proliferacije tumora. Pored efekata na žlezdano tkivo i učešća u regulaciji broja hormona, bitno je istaći da svoj antitumorski efekat, genistein može ispoljiti i kao inhibitor procesa angiogeneze (Messina i saradnici., 1999; Cabanes i saradnici, 2004; Lamartiniere i saradnici, 2002). Međutim, novije studije pokazuju da i druge komponente soje, osim izoflavona, mogu pokazati antitumorsko dejstvo. Tako su Wang i saradnici (2008) utvrdili da i proteini soje, u prvom redu β konglicinin, pokazuju antitumorsko dejstvo u slučajevima leukemije. Takođe, Gullon i Champ (2002) su ispitujući kancer kolona utvrdili da ključno antitumorsko dejstvo imaju dijetetska vlakna soje.

Pokazano je da gojaznost uslovljava aktivaciju inflamatornih puteva koji dovode do "neosetljivosti" na insulin (Hirosumi i saradnici, 2002). Primarni "senzor" ovakvog ćelijskog stresa jeste hepatični endoplazmatični retikulum (ER) i promena njegove funkcije je ključan faktor u razvoju insulinske rezistencije (Nakatani i saradnici, 2005). Cederroth i saradnici (2008) pokazali su da izoflavoni iz soje imaju bitnu ulogu u zaštiti hepatičnog ER-a od stresa i da se stoga mogu koristiti kao terapeutici koji bi sprečavali razvoj rezistencije. Jang i saradnici (2008) pokazali su da je moguće vršiti i prevenciju gojaznosti unosom smeše sojinih proteina koja utiče na aktivaciju AMPK, jednog od principijalnih molekula zaduženih za unutarćelijski transport glukoze. Ista grupa autora je utvrdila (2010)

da proteinski ekstrakt crne soje, bez izoflavona, ispoljava isti efekat u zaštiti ER-a od stresa, ali i da povećava unos glukoze u ćelije, kroz pojačanu transkripciju gena za različite kinaze i sintaze zadužene za povećanje unosa glukoze u ćelije (kroz translokaciju receptora) ili njeno skladištenje. Međutim, ishrana bogata sojom ne utiče samo na promenu odgovora na insulin, već i na njegovo lučenje. Naime, utvrđeno je da genistein kroz inhibiciju tirozin kinaze (Akiyama i saradnici, 1987) i aktivaciju cAMP/PKA puta signalne transdukcije (Liu i saradnici, 2006) stimuliše sekreciju insulina. Kako se efekti sojinih izoflavona i proteina na metabolizam šećera u velikoj meri preklapaju, postavlja se najpre pitanje da li je efekat izoflavona i proteina soje istog intenziteta, a zatim i da li se ostvaruje istim mehanizmima. Wagner i saradnici (2008) pokazali su da se efekti izoflavona i proteina ostvaruju na različite načine - izoflavoni povećaju lučenje insulina, dok proteini deluju na transkripcionom nivou. Ipak, o pojedinačnom efektu glicinina i β konglicinina na metabolizam šećera je veoma malo literaturnih podataka. Treba izdvojiti rad Moriyame i saradnika (2004) koji je pratio efekat prečišćenih 7S i 11S frakcija na različite indikatore metabolizma šećera i lipida. U ovoj studiji, pronađeno je da je efekat izoflavona u poređenju sa efektom β konglicinina na globalni metabolizam zanemarljiv, a da je veliko sniženje koncentracije triglicerida u krvi kao posledica unosa β konglicinina posledica smanjenja koncentracije insulina. Pored proteina i šećera, pokazano je da i dijetetska vlakna iz soje utiču na kontrolu koncentracije glukoze u krvi (Messina, 1999).

Supresija apetita, u prvom redu, zavisi od lučenja holecistokina. Poznato je da unos proteina stimuliše lučenje holecistokina (Li i Owyang, 1996). Liddle (1995) i Cordier-Bussat i saradnici (1997) predložili su mehanizam po kojem je efekat unosa proteina na sekreciju holecistokina posledica produkcije tripsin-senzitivnih holecistokinin oslobađajućih peptida, koji se vezuju direktno za ćelije koje luče holecistokinin. Veldohorst i saradnici (2009) su u svojoj studiji pronašli da je efekat sitosti (izražen kroz praćenje apetitnog profila, nivoa insulina, koncentracije ghrelina,..) mnogo veći u slučaju doručka bogatog sojom nego u slučaju "normalnog" doručka. Dodatna prednost obogaćivanja ishrane sojom je, kao što je pokazala Simmons (2011) u tome što se, pored održavanja efekta sitosti, smanjuje glikemijski indeks (kao posledica dejstva proteina i izoflavona na lučenje i prenos signala insulina). Nishi i saradnici (2001) su pokazali da sojini proteini

imaju veći efekat na oslobađanje holecistokina nego kazein ili gluten iz pšenice. Ista grupa autora je 2003 godine ispitala uticaj prečišćenog β konglicinina na supresiju unosa hrane i nivo holecistokina. Pokazano je da se peptidi nastali parcijalnom hidrolizom β konglicinina vezuju direktno za mukozne ćelije, izazivajući oslobađanje holecistokina koji se vezuje za svoje periferne receptore, uslovljavajući na taj način supresiju unosa hrane i efekat sitosti. Na bazi ovih rezultata, Sufian i saradnici (2011) izučavali su efekat različitih hidrolizata β konglicinina na sekreciju holecistokina. Koristeći različite proteaze, pokazali su da je hidrolizat dobijen dejstvom bromelina najefikasniji u regulisanju sekrecije holecistokina. Hira i saradnici (2011) eksperimentalno su potvrdili da su opisani efekti koje hidrolizat β konglicinina ispoljava na sekreciju holecistokina kod pacova analogni efektima koje isti hidrolizati imaju na sekreciju holecistokina kod ljudi.

Sirtori i saradnici (1977) bili su među prvima koji su utvrdili da postoji veza između unosa sojinih proizvoda i inhibicije hiperlipoproteinemije. Premda je bilo spekulirano da su izoflavoni iz soje ti koji dovode do sniženja koncentracije lipida u krvi (Anthony i saradnici (1996), Tovar-Palacio i saradnici (1998), Fukui i saradnici (2002)), pokazali su da izolat sojinih proteina prečišćen od izoflavona pokazuje efekat snižavanja triacilglicerida u krvi. Aoyama i saradnici (2001), ispitujući efekat izolata sojinih proteina, kazeina i β -konglicinina na težinu jetre i nivoe holesterola i triglicerida u plazmi, dokazali su da premda i izolat sojinih proteina (SPI) i β konglicinin pokazuju veće inhibitorno dejstvo na sve pomenute parametre od kazeina, upotreba β konglicinina je dala najniže vrednosti za koncentracije holesterola i triacilglicerida u plazmi. Navedeno ukazuje da β konglicinin soje pokazuje veći hipoholesterijski efekat od glicinina. To je i dokazano od strane Martinez-Villaluenga i saradnici (2008). Oni su pratili efekat genotipova soje koji su sadržali različit procentualni udeo β konglicinina na procese akumulacije lipida i ekspesije adiponektina u adipocitima. Našli su da najizraženiji inhibitorni efekat na akumulaciju lipida i adipogenezu imaju genotipovi sa povećanim udelom β konglicinina. Koje subjedinice u okviru β konglicinina imaju najizraženiji efekat na adipogeni odgovor i inhibiciju sinteze lipida razrešili su de Mejia i saradnici (2010). Ispitujući efekat genotipova soje koji su se razlikovali u sadržaju pojedinačnih subjedinica β konglicinina na aktivnost sintaze i akumulaciju lipida u humanim adipocitima *in vitro*, našli su da najizraženiji efekat

imaju genotipi sa povećanim udelom α i α' subjedinice β konglicinina. Uticaj α' subjedinice β konglicinina na lipidni metabolizam dodatno je potvrđen ispitivanjem Manzoni-eve i saradnika (2003). Oni su pronašli da α' subjedinica β konglicinina izaziva *up*-regulaciju receptora za LDL, na taj način omogućavajući njihov brži klirens iz krvi. Ohara i saradnici (2007) u okviru kliničke studije potvrdili su da tretman β konglicininom (u obliku tableta) značajno snižava koncentraciju serumskih triacilglicerida kod pacijenata sa hiperaciltriglicerolemijom. Slični rezultati su dobijani i kada se tretman β konglicininom kombinuje sa standardnim tretmanima za hiperaciltriglicerolemiju (Ferreira i saradnici, 2012). Pored prevencije hiperlipidemije, β konglicinin sprečava i pojavu hepatične steatoze ("masne jetre"), kao što su utvrdili Yamazaki i saradnici (2012). Interesantno je da su proteinski izolati bogati izoflavonima pokazali daleko slabiji inhibitorski efekat na razvoj arteroskleroze nego sam β konglicinin, što ukazuje na to da izoflavoni ne igraju ulogu u promeni lipidnog metabolizma, kao i da su promene zavisne od koncentracije β konglicinina.

U gastrointestinalnom traktu dolazi do hidrolize β subjedinice β konglicinina na fragmente koji sadrže istu aminokiselinsku sekvencu kao i humani β kaziomorfin 4 (Ohinata i saradnici, 2007). Kako β kaziomorfin 4 spada u klasu opoida, pretpostavljeno je da bi i fragment β subjedinice iste sekvence vezivanjem za opoidni receptor imao isti efekat na emocionalno ponašanje. U pomenutom radu, anksiolitička aktivnost β subjedinice β konglicinina je i dokazana.

Cassidi i saradnici (1994) su utvrdili da unos izolata sojinih proteina bogatih izoflavonima utiče na hormonski status žena, tj. dovodi do povećanja estradiola. Rezultati nekoliko istraživanja (Nikov i saradnici, 2000; Duncan i saradnici, 1999; Lu i saradnici, 2001) ukazuju da je ovakav efekat posledica ne samo delovanja proteina na transkripciju gena za polne hormone, već i toga da izoflavoni mogu delovati kao agonisti ili antagonisti estrogena. Takođe je ustanovljeno da je efekat soje na hormonalni status u velikoj meri zavistan od stanja organizma i godišta subjekta (Kurzer, 2002).

Usled prethodno opisanog uticaja izoflavona na hormonski status, logično bi bilo pretpostaviti da postoji veza između unosa genisteina i sprečavanja osteoporoze. Tokom kliničkih studija, Chen i saradnici (2003) su primetili da sojin ekstrakt obogaćen

izoflavonima ima blag, pozitivan efekat na održvanje gustine kostiju kod žena nakon menopauze. Isti pozitivan efekat primetili su Yamaguchi i Gao (1998) i Morabito i saradnici (2002), koristeći čist genistein u kliničkim studijama.

Međutim, kao i u slučaju antikancerogenog efekta, efekat genisteina na sprečavanje osteoporoze ostaje pod znakom pitanja. Od novijih studija koje opovrgavaju ovakav efekat genisteina, treba izdvojiti rad Kenny-ja i saradnika (2009) koji nisu našli korelaciju između povećanja gustine kostiju i unosa sojinih proteina i/ili izoflavona. Iste godine, Liu i saradnici potvrdili su ove nalaze izučavajući efekte dugotrajnog unosa sojinih izoflavona i povećanja gustine kostiju u kuku i lumbalnom delu kičme.

Shaywitz i saradnici (1999) dokazali su pozitivne efekte estrogena na moždanu aktivnost, što je otvorilo mogućnost da i fitoestrogeni (uključujući izoflavone) pokazuju sličan efekat na moždanu aktivnost. Duffy i saradnici (2001) pokazali su da ishrana bogata sojom poboljšava i memoriju i aktivnost čeonog režnja kod mladih osoba. Isti tim naučnika je 2003 godine dokazao da su izoflavoni aktivne supstance iz soje koje doprinose poboljšanju kognitivne funkcije. Takođe je ovim eksperimentom dokazano da je efekat izoflavona na memoriju konzistentan i nezavistan od starosti pacijenta. Međutim, studija Kreijkamp-Kaspers-a i saradnika (2004) pokazala je da nema značajnijih razlika u kognitivnoj funkciji kod žena koje su u svojoj ishrani koristile izoflavone soje i onih koje to nisu.

Do saznanja koje komponente soje ispoljavaju antitiroidni efekat i kojim mehanizmom došli su Divi i saradnici (1996 i 1997). Milerova i saradnici (2006) ispitivali su pokazatelje funkcije tiroidee kod dece čija je ishrana suplementirana genisteinom. Rezultati su ukazivali na pozitivnu korelaciju izoflavona u serumu i koncentracije slobodnog tiroksina i negativnu korelaciju izoflavona i zapremine tiroidee. Watanabe i saradnici (2000) utvrdili su da efekat izoflavona na koncentraciju tiroksina zavisi od faze menstrualnog ciklusa, dok nivo T3 ostaje nepromenjen. Dillingham i saradnici (2004) pokazali su da kod zdravih muškaraca nema korelacije između unosa izoflavona soje i koncentracije hormona tiroidee.

Jedan od prvih radova koji se bavio ispitivanjem potencijalnog antioksidativnog efekta izoflavona soje je rad Wei-a i saradnici (1995). Oni su ispitivali antioksidativni

efekat različitih izoflavona u tumorskim ćelijama kože miša i u HL-60 ćelijama. Genistein je od svih ispitivanih izoflavona pokazao najizraženiji antioksidativni efekat. Ispitivanja *in vivo*, međutim, pokazala su da su i druge komponente soje osim izoflavona neophodne za postizanje optimalnog antioksidativnog efekta. Tako su Liu i saradnici (2005) prateći koncentracije antioksidativnih enzima (katalaze i superoksiddismutaze) tokom unosa ekstrakta sojinih izoflavona i tofua, dokazali da je povećanje koncentracije ovih enzima bilo izraženije kod pacova hranjenim tofuom nego kod pacova koji su unosili ekstrakt sojinih izoflavona.

Veliki broj autora (Duke, 1934; Burks, 1989; Ogawa i saradnici, 1991 i 1995) opisuju pojavu alergijskih reakcija na soju kod dece i odraslih. Ogawa i saradnici (1991) zaključuju da je β konglicinin glavni alergen soje. Od tada, brojna istraživanja baziraju se na pitanju koja od subjedinica β konglicinina doprinosi njegovim alergenim svojstvima. Ogawa i saradnici (1995) izdvajaju α subjedinicu kao potencijalni alergen na osnovu kvantifikacije IgE antitela i nedostatka unakrsne reaktivnosti α' i β subjedinice sa IgE antitelima seruma pacijenata. Međutim, Krishnan i saradnici (2009) su na osnovu rezultata imunoblot analize pokazali da sve tri subjedinice β konglicinina mogu biti potencijalni alergeni. Efekat alergijske reakcije izazvane glicininom i β konglicininom na gastrointestinalni trakt pokazali su Zhao i saradnici (2010). Pronađeno je da ingestija sojinih proteina dovodi do povećanje sekrecije inflamatornih citokina, kao i da dovodi do povećanja koncentracije enzima kao što su LDH i GOT, utičući tako na proliferaciju ćelija i na njihov integritet. Amigo-Benavent i saradnici (2009) pokazali su da glikozidna komponenta β konglicinina ima značajnu ulogu u izazivanju alergijskih reakcija, jer je dokazano da je nativni β konglicinin imunoreaktivniji od svog neglikozilovanog analoga. Ista grupa autora je 2011 godine u *in vitro* eksperimentu potvrdila da glikozidna komponenta doprinosi sporijoj hidrolizi β konglicinina u gastrointestinalnom traktu, a samim tim produžava trajanje alergijske reakcije. Navedeno može objasniti razliku u alergenim svojstvima glicinina i β konglicinina.

Shen i saradnici (2007) ispitivali su antibakterijski efekat pepsinskog hidrolizata β konglicinina. Koristeći *E.coli* kao primer čestog crevnog patogena, utvrdili su da hidrolizat β konglicinina sprečava razvoj crevne infekcije, inhibirajući rast bakterijske populacije.

Tsuruki i saradnici (2003) izolovali su nakon digestije sojinih proteina tripsinom peptid koji pokazuje stimulatívni efekat na fagocitozu i nazvali ga "Sojmetid 13". Pokazano je da ovaj peptid nastaje hidrolizom α' subjedinice β konglicinina. Svoj efekat Sojmetid 13 ispoljava vezivanjem za fMLP receptor na membrani makrofaga i neutrofila. Motoyama i saradnici (2010) pokazali su da je kroz geneske modifikacije moguće stvoriti novu β subjedinicu β konglicinina koja bi pokazivala izraženiji efekat na stimulaciju fagocitoze.

2.5. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na rastvorljivost

Prisustvo izoformi β konglicinina objašnjava se genetskom razlikom sorti i uticajem faktora sredine na brzinu sinteze pojedinačnih subjedinica. Brojni su radovi u kojima je pokazano da se niskoproteinski (*low protein* - LP) i visokoproteinski (*high protein* - HP) genotipovi razlikuju u subjediničnom sastavu (Pešić i saradnici, 2005; Taški-Ajdukovic i saradnici, 2010). Faktori kao što su temperatura, suša i sadržaj azota, fosfora, kalijuma i sumpora, pored toga što smanjuju koncentraciju ukupnih proteina u semenu (Dornbos i saradnici, 1992; Peack i saradnici, 1997; Fabre i saradnici, 2000), utiču i na sadržaj pojedinačnih subjedinica u β konglicininu. Kako su α' , α i β subjedinica kodirane različitim genskim familijama (Harada i saradnici, 1989; Yoshino i saradnici, 2002), tako je i efekat na ekspresiju ovih gena različit. Tako su Gayler i Sykes (1981) utvrdili da, pošto se β subjedinica sintetiše poslednja, njena koncentracija u 7S frakciji biće najpodložnija uticaju spoljašnjih činioca. Takođe, pronađeno je i da je β subjedinica "osetljivija" na pokazatelje oksidativnog stresa, kao što je koncentracija abscisinske kiseline (Lessard i saradnici, 1991).

Brojni radovi dovode u vezu rastvorljivost proteina i tehnološke parametre kao što su penivost i emulgujuća i gelirajuća svojstva. Rastvorljivost je u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću emulzija, a u negativnoj sa stabilnošću emulzija i gelirajućim svojstvima. Rastvorljivost je funkcija površinske hidrofobnosti, veličine čestica i kompaktnosti tercijarne strukture (Hermansson i saradnici, 1971). Stoga se može zaključiti da će rastvorljivost β konglicinina biti rezultat kako subjediničnog sastava, tako i faktora koji utiču na asocijaciju i/ili denaturaciju - pH, temperatura, jonska jačina i pritisak.

Skonost β konglicinina ka disocijativno-asocijativnim procesima pri određenoj jonskoj jačini na datom pH poznata je još iz radova Thanh-a i Shibasaki-a (1978) i Wolfa (1970). Tako je poznato da se u uslovima niske jonske jačine ($I < 0,1$) i pri $\text{pH} > 5$, β konglicinin nalazi u dimernoj formi čime je znatno smanjena rastvorljivost. Iwabuchi i saradnici (1991) dali su mehanizam termalne denaturacije β konglicinina koja vodi smanjenju rastvorljivosti, usled narušavanja kvaternarne strukture. Temperatura denaturacije β konglicinina je niža nego glicinina (72°C), jer su subjedinice vezane hidrofobnim interakcijama, a ne kao u slučaju glicinina, disulfidnim mostovima.

Utvrđivanjem kristalne strukture β konglicinina, pokušano je da se utvrdi kakav efekat kvaternarna struktura i sadržaj pojedinačnih subjedinica imaju na tehnološke parametre. Međutim, osnovni problemi sa ovakvim rezultatima jesu:

1. Nemogućnost dobijanja "prirodnog" heterotrimerera, već samo rekombinantnih homotrimerera ili kristalizacija iz "null" genotipova;

2. Ispitivanje na neglikozilovanim sistemima, čime se zanemaruje uticaj šećerne komponente na rastvorljivost i emulgujuća, peniva i gelirajuća svojstva.

Utsumi i saradnici (2002) su na rekombinantnim sistemima utvrdili sledeće: ekstenzioni regioni α' i α subjedinice doprinose boljoj rastvorljivosti u baznom pH; termalna stabilnost subjedinica je različita i u različitoj meri utiče na rastvorljivost celokupnog proteina. Redosled temperaturnih stabilnosti subjedinica je $\beta > \alpha' > \alpha$.

Ispitivanjem genotipova koji su deficitarni u α' ili α subjedinici kao i pojedinačnih subjedinica, Maruyama i saradnici (1999 i 2002) pokazali su da postoji negativna korelacija između sadržaja β subjedinice i rastvorljivosti. Oni ukazuju da je, pri niskoj jonskoj jačini, β_3 homotrimer nerastvorljiv u opsegu pH 4.8–8.5. Smatra se da je postojanje ovakve negativne korelacije posledica većeg sadržaja hidrofobnih aminokiselina u β subjedinici u poređenju sa α' ili α subjedinicom. Ovakvi rezultati potvrđeni su radom Mo i saradnici (2011) koji su utvrdili da β subjedinica pokazuje minimum rastvorljivosti u širem pH intervalu u poređenju sa α i α' podjedinicama. Međutim, koristeći drugačiji metod izolovanja subjedinica iz sorte "normalnog" genotipa, Zheng i saradnici (2009), pokazuju da je na pH 7.0 β subjedinica rastvorna, što je u suprotnosti sa navedenim nalazima Utsumi-a (2002) i Maruyama-e (2002). Objašnjenje za ovakve naizgled kontradiktorne podatke,

jeste da šećerna komponenta igra značajnu ulogu u rastvorljivosti (što nije razmatrano u rekombinantnim sistemima) kao i da je odnos dimer/monomer i stepen parcijalne denaturacije zavistan od uslova reakcije, a kao što je navedeno denaturacija i građenje dimera smanjuju rastvorljivost.

Dorđević (2010) je utvrdio su postojanje negativne korelacije između sadržaja β' subjedinice i ekstraktibilnosti. Međutim, usled nepoznanica u strukturi β' subjedinice teško je objasniti mehanizam kojim bi njena povećana koncentracija uticala na smanjenje rastvorljivosti.

Kako do sada nije kristalisan β konglicinin iz sojeva koji sadrže β' subjedinicu, nije poznat efekat koji bi prisustvo ove subjedinice imalo na strukturu β konglicinina i shodno tome, na funkcionalna svojstva.

2.6. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na emulgujuća svojstva

Emulzije se definišu kao disperzni sistemi kod kojih su i disperzno sredstvo i disperzna faza u tečnom stanju. U prehrambenoj tehnologiji često se proizvodima dodaju supstance koje imaju za cilj da "povežu" uljanu i vodenu fazu (emulgatori). Dodatak emulgatora doprinosi povećanju stabilnosti emulzije (kroz smanjenje napona na međufaznoj površini) i aktivnosti emulzije. Aktivnost emulzije se izražava kao procenat zapremine emulzije koji ostaje nakon centrifugiranja. Stabilnost emulzije se definiše kao količina ulja koja se "rasloji" od emulzije za neko fiksno vreme. Pearce i Kinsela su još 1978 godine kao pokazatelje emulgujućih svojstava definisali pojmove: indeks aktivnosti emulzije (EAI) i indeks stabilnosti emulzije (ESI).

Upotreba sojinih proteina kao emulgujućih agenasa omogućena je njihovom delimičnom rastvorljivošću u obe faze (uljanoj i vodenoj), što vodi smanjenju međufaznog napona (Moure i saradnici, 2006). S obzirom na neophodnu amfipatičnost, proteini sa hidrofobnim ostacima izloženim na površini molekula pokazivaće bolje emulgujuće osobine. Kako je β konglicinin polarniji od glicinina, pretpostavljeno je da će sadržaj β konglicinina imati ključnu ulogu u određivanju emulgujućih osobina izolata. Chove i saradnici (2007) potvrdili su ovakav efekat 7S frakcije, našavši da su sojini izolati koji su

pokazivali bolja emulgujuća svojstva bili istovremeno i bogatiji u sadržaju β konglicinina. Međutim, Bernard i saradnici (2001) ukazuju da poboljšana emulgujuća svojstva β konglicinina u odnosu na glicinin ne moraju biti isključivo posledica hidrofobnosti, već i glikozilacije (koja poboljšava rastvorljivost).

Povećanje površinske hidrofobnosti zahteva parcijalnu denaturaciju proteina (Vliet i saradnici, 2002). Stoga će na sposobnost građenja emulzija uticati kako sama konformacija proteina (aminokiselinska sekvenca i kompaktnost i stabilnost tercijarne strukture), tako i faktori koji utiču na "razmotavanje" proteinske globule, menjajući jačinu i broj hidrofobnih, odnosno elektrostatičkih interakcija (pH, jonska jačina, temperatura, pritisak).

Međutim, Molina i saradnici (2001) istakli su da na vrednosti ESI i EAI utiču različiti faktori. Naime, vrednost ESI je u najvećoj meri zavisna od fleksibilnosti tercijarne strukture (čime se objašnjava ograničenje upotrebe sojinih proteina samo u koncentrovanim emulzijama), dok vrednost EAI raste sa porastom koncentracije rastvorljivih proteina i povećanjem površinske hidrofobnosti.

S druge strane, u literaturi postoje kontraverzni podaci o uticaju rastvorljivosti i površinske hidrofobnosti na emulgujuća svojstva. Naime, dok podaci Moline i saradnici (2001) i Wu i saradnici (1998) ukazuju da nema korelacije rastvorljivosti sa vrednostima EAI, Felix i saradnici (1990) utvđuju pozitivnu korelaciju između rastvorljivosti i vrednosti ESI i EAI indeksa. Takođe, bilo bi logično pretpostaviti da će povećanje hidrofobnosti na površini proteina dovesti do smanjenja rastvorljivosti (usled građenja agregata). Ipak Wagner i saradnici (1996) uočili su da povećanje površinske hidrofobnosti doprinosi boljoj rastvorljivosti.

Podjedinični sastav β konglicinina značajno će uticati na rastvorljivost, a samim tim i na emulgujuća svojstva. Naime, iako se β subjedinica karakteriše većim brojem hidrofobnih aminokiselinskih ostataka (Slika 1.2.), napomenuto je da je rastvorljivost poboljšana prisustvom ekstenzionih regiona na α' i α subjedinici β konglicinina. S obzirom na pozitivnu korelaciju između rastvorljivosti i emulgujućih svojstava, razumno pretpostaviti da će ekstenzioni regioni, tj. sadržaj α' i α subjedinice imati pozitivan efekat na vrednosti EAI i ESI. Ovakva pretpostavka potvrđena je radom Tandang-a i saradnika (2005).

Mehanizam kojim konglicinin gradi emulzije kao i promena konformacije β konglicinina na međusloju ispitivani su fluorimetrijskim merenjima. Miriani i saradnici (2011) utvrdili su da povećanje temperature uzrokuje reverzibilne promene β konglicinina u međufaznom sloju, ali da su ove promene mnogo manje istaknute nego kod β konglicinina slobodnog u rastvoru. Takođe, i ovaj rad potvrđuje značaj ekstenzionih regiona α' i α u određivanju emulgujućih osobina. Naime, kao glavna strukturna promena do koje dolazi dejstvom temperature ističe se izlaganje triptofanskih ostataka na površinu molekula. Kako su u α' i α triptofanski ostaci locirani u ekstenzionom regionu, dolazi do "raspoređivanja" α' i α subjedinica tako da je polarniji, ekstenzioni region u kontaktu sa vodenom fazom, a nepolarniji sržni region u kontaktu sa uljanom fazom. Na ovaj način kroz nepolarne interakcije sržnog regiona i uljane faze i elektrostatičke i vodonične interakcije između ekstenzionog regiona i vodene faze, dolazi do stabilizacije emulzije. Ovi rezultati potvrđeni su radom Keerati-u-rai-a i saradnika (2012).

Brojni su radovi u kojima je ispitivan efekat limitirane hidrolize, promene pH, jonske jačine, temperature, pritiska i dodatka redukcionog reagensa na emulgujuća svojstva β konglicinina (Niri i saradnici, 1994; Jiang i saradnici, 2009; Jung i saradnici, 2005; Keerati-u-rai i saradnici, 2009). Opšti zaključak koji se može izvesti iz ovih istraživanja jeste da povećanje stepena neuređenosti strukture i stepena denaturacije proteina poboljšava emulgujuća svojstva. Tako su Jiang i saradnici, 2009 utvrdili da promenom pH dolazi do promene konformacije u strukturu "stopljene globule". Keerati-u-rai i saradnici (2009) pokazali su da emulzije β konglicinina pokazuju manju temperaturnu osetljivost u poređenju sa emulzijama glicinina.

2.7. Uticaj koncentracije i sastava β konglicinina na gelirajuća svojstva

Geliranje je proces u kome dolazi do formiranja trodimenzionalne mreže u kojoj ostaju "zarobljeni molekuli" tečnosti. Geliranje može biti indukovano hlađenjem ili zagrevanjem. Gelovi indukovani hlađenjem (najčešće uz dodatak dvovalentnih jona) i gelovi indukovani zagrevanjem razlikuju se u svojoj strukturi, ali u osnovi leži proces parcijalne denaturacije proteina. Dva pristupa u analizi nagrađenih gelova su teksturalna i

reološka analiza. I teksturalnom i reološkom analizom se, u suštini, prati deformacija materijala, tj. promena njegove geometrije i prostorog oblika. Teksturalna analiza (eng. *textural analysis*) podrazumeva merenje stepena deformacije u gelu koji nastaje kao posledica stresa uzrokovanog kompresijom (tj. dejstvom aksijalne sile) i/ili tenzijom (dejstvo longitudinale sile). Na ovaj način se sila primenjena za izazivanje datog stepena deformacije (eng. *strain*) dovodi u korelaciju sa čvrstinom gela (eng. *gel hardness*). Reološkom analizom utvrđuju se viskozoelastična svojstva gela koristeći dinamičko mehaničku analizu (DMA). Teorija iza DMA analize bazira se na posmatranju gelova kao tzv. Maksvelovih materijala, tj. materijala koji ispoljavaju i elastičnost (kontraktilnost) karakterističnu za čvrste materijale i viskoznost (unutrašnje trenje) koja je karakteristična za tečnosti. Na ovaj način je moguće izraziti odgovor materijala kroz dva dinamička modula (eng. *dynamic modulus*): modul sačuvane energije - G' (ili modul krutosti; eng. *storage module*) i modul izgubljene energije - G'' (ili modul elastičnosti; eng. *loss module*). Razlike u vrednosti G' ukazuju na razlike u elastičnim svojstvima koja zavise od "gustine pakovanja", tj. od čvrstine gela. Razlike u G'' korelisane su sa promenom viskoziteta, tj. sa količinom energije izgubljene u vidu toplote. Određivanje dinamičkih modula za dati gel vrši se primenom oscilatorne sile koja dovodi do promena u strukturi gela koje nastaju kao posledica "tanjenja" i "razmicanja" vlakana polimera. Kako je primenjena vibraciona sila zapravo sinusoidna promenljiva, uvodi se i treća karakteristika u DMA analizi - ugao mehaničkih gubitaka - δ . Kako su i G' i G'' sinusoidne funkcije, δ predstavlja "kašnjenje" u fazi između G' i G'' , tj. $\tan \delta = G''/G'$. DMA eksperiment može biti postavljen tako da se merenja vrše pri konstantnoj temperaturi, ali se menja primenjena frekvecija (eng. *frequency sweep*) ili se frekvecija drži konstantnom, a menja se temperatura (eng. *temperature sweep*). Takođe, DMA eksperiment može biti postavljen kao eksperiment sa velikim i malim deformacijama.

Kod proteinskih gelova značajnu ulogu imaju konformacija i koncentracija pojedinačnih proteina, mehanizam geliranja, dodatak umreživača, kao i jonska sila i pH. Razliku u strukturi β konglicininskih i glicininskih gelova utvrdio je Hermansson (1985). Naime, β konglicininski gelovi su pokazivali veći stepen umreženosti, ali manju uređenost i čvrstinu nego glicininski gelovi. Takođe, kod β konglicininskih gelova pokazana je sklonost ka

dodatnoj agregaciji u dvostruke spirale. Ovakve reološke razlike posledica su razlike u mehanizmu nastanka glicinskih i konglicinskih gelova. Međutim, kao i u slučaju rastvorljivosti i emulgujućih osobina i u slučaju gelirajućih osobina, u literaturi postoje kontradiktorni podaci. Tako, kada su u pitanju toplotom indukovani gelovi, Utsumi i Kinsela (1985) kao glavni mehanizam u formiranju konglicinskih gelova navode vodonično vezivanje, dok Liua i saradnici (2011), usled efekta jonske sile na strukturu, predlažu elektrostatičke interakcije kao mehanizam umrežavanja. S druge strane, u slučaju hladno indukovanih gelova, prvi korak umrežavanja, po Cramp-u i saradnicima (2008), je uspostavljanje intermolekulskih disulfidnih veza (čime se objašnjava neophodna visoka koncentracija proteina u gelu) a zatim uspostavljanje hidrofobnih interakcija i vodoničnih veza među nastalim agregatima.

Dodatni problem sa tumačenjem gelirajućih svojstava jeste zavisnost reoloških svojstava gela od pH, jonske jačine, temperature, brzine mešanja, odnosa 11S/7S i subjedinčnog sastava pojedinačnih proteina.

Tako je poznato (Renkema 2000, 2002, 2004) da postoje dva "izgleda" sojinih gelova: glatki, sa parcijalno denaturisanim proteinima koji grade tanke niti i gelovi sastavljeni nasumičnom agregacijom proteina u klustere. Kakav će gel biti formiran zavisi od navedenih faktora. Tako će na pH 7.6 biti formirani glatki gelovi koji sadrže više glicinina, dok će na pH 3.8 biti formirani granulirani, tanki gelovi sastavljeni prevashodno od agregata β konglicinina a (Renkema, 2000). Navedene observacije se mogu objasniti višim temperaturama denaturacije β konglicinina i razlikom u mehanizmima formiranja gelova. Na pH između 3 i 5 i β konglicinin i glicinin učestvuju u formiranju gela i promena reoloških parametara ukazuje na međusobnu interakciju proteina (Renkema, 2002).

Ker i Chen (1998) utvrdili su da povećanjem brzine mešanja dolazi i do porasta u turbiditetu, viskoznosti i hidrofobnosti rastvora u toku geliranja.

Alvarez i saradnici (2008) utvrdili su da primena visokog pritiska u toku geliranja doprinosi ne samo povećanju površinske hidrofobnosti, već i smanjenju procenta neuređenih struktura u konformaciji proteina na račun povećanog procenta β nabrane strukture. Usled boljeg "pakovanja" povećavaju se i viskozno-elastična svojstva gelova.

Varzakas i saradnici (2011) utvrdili su da se, pri konstantnoj koncentraciji proteina, na nižim temperaturama dobijaju čvršći gelovi. Pošto je pretpostavljeno da je mehanizam formiranja gelova pri ovim temperaturama zapravo nasumična interakcija delimično denaturisanih proteina, čvrstina gela može se objasniti sporijim interakcijama koje vode ka uniformnijem "pakovanju".

Bainy i saradnici (2008) pokazali su da odnos 11S/7S značajno utiče kako na različite strukturne karakteristike gela, tako i na temperature na kojima počinje geliranje. Tako su linije sa većim sadržajem β konglicinina a pokazivale niže temperature geliranja i davale manje čvrste gelove.

Bin Mohamed Salleh i saradnici (2004) i Qi i saradnici (2011) ispitivali su efekat pojedinačnih subjedinica na reološka svojstva konglicinskih gelova. Tako su Bin Mohamed Salleh i saradnici (2004) utvrdili da su gelovi β konglicinina bez α' subjedinice čvršći od gelova β konglicinina koji sadrži sve tri podjedinice, a da je opet gel β konglicinina koji sadrži sve tri podjedinice čvršći od gela β konglicinina koji ne sadrži α subjedinicu. Pošto nije bilo značajne promene u sekundarnoj strukturi proteina nakon zagrevanja (što je u suprotnosti sa rezultatima Varzakas-a i saradnika, 2011), razlika u čvrstini gelova objašnjava se "debljinom" vlakana u gelu i gušćim "pakovanjem". Qi i saradnici (2011) potvrđuju da postoji veza između subjediničnog sastava 7S frakcije na gelove dobije iz sojinih izolata. Međutim, suprotno rezultatima Hermansson-a (1985) i Renkeme (2002), njihovi rezultati ne ukazuju na negativnu korelaciju između sadržaja β konglicinina i čvrstine gelova, već ukazuju na pozitivnu korelaciju između prisustva α' i α subjedinice na čvrstinu gelova. Oni predlažu mehanizam po kome je geliranje uslovljeno građenjem agregata između α' i α subjedinice (kroz disulfidne veze) i naknadnim protein-protein interakcijama sa ostalim subjedinicama β konglicinina i glicinina.

Iz kontradiktornih podataka koji se tiču gelirajućih svojstava proteina soje, evidentno je da je neophodno ustanoviti precizan mehanizam formiranja gelova proteina soje, kao i definisati uslove tokom procesa geliranja.

Što se tiče uticaja sadržaja β' subjedinice na reološke osobine sojinih proizvoda, Stanojević i saradnici (2011) utvrdili su postojanje negativne korelacije između sadržaja β' subjedinice i čvrstine tofua. Dodatna ispitivanja su neophodna kako bi se utvrdio

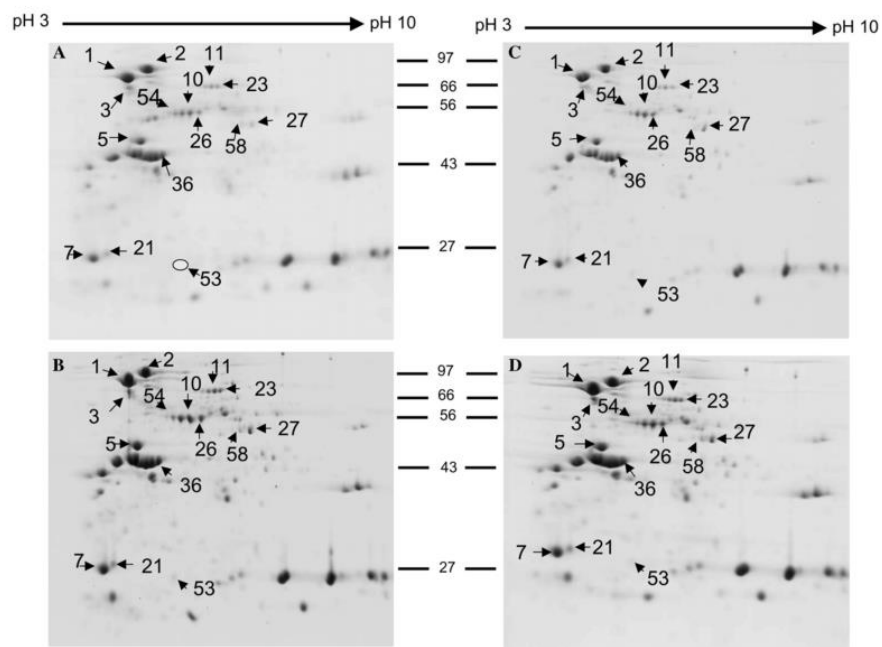
mehanizam ovakvog dejstva, kao i uticaj β' subjedinice na reološke osobine gelova sojinih proteinskih izolata pod različitim uslovima sredine.

2.8. Razdvajanje sojinih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

Dvodimenzionalna elektroforeza (2D) predstavlja metodu koja omogućava razdvajanje proteina istovremeno na osnovu dva kriterijuma: prema njihovoj pI vrednosti i prema njihovoj molekulskoj masi. Najpre se u prvoj dimenziji vrši izoelektrično fokusiranje, tj. separacija proteina na tzv. "stripovima" (trakama gela u kojima su usled prisustva amfolita uspostavljene zone različite pH vrednosti) pri čemu se proteini kreću do one vrednosti pH koja odgovara njihovoj izolektričnoj tački. Nakon toga se proteini prethodno razdvojeni na osnovu pI vrednosti, u drugoj dimenziji (koja zapravo predstavlja SDS PAGE analizu) razdvajaju na osnovu molekulske mase. Kao rezultat ovakvog razdvajanja proteini se u gelu uočavaju u obliku tački.

Kao što su pokazali Natrajan i saradnici (2005), Sarma i saradnici (2008), Komatsu i Ahsan (2009), Lee i saradnici (2010), izbor metode za ekstrakciju proteina iz semena soje ključan je faktor koji određuje broj tačaka na 2D elektroforegramu, kao i stepen horizontalnog i vertikalnog razvlačenja (Slika 1.4).

Kako prijavljuju Komatsu i Ashan (2009) i Lee i saradnici (2010), fenolna ekstrakcija rezultuje u dobijanju velike količine proteina, te se shodno tome dobijaju najintenzivnije tačke na 2D elektroforegramima. Međutim, tiourea-urea ekstrakcija daje znatno bolje razdvajanje u opsegu pH 4-7, u okviru kojeg se razdvajaju podjedinice β konglicinina (Natrajan i saradnici, 2005).

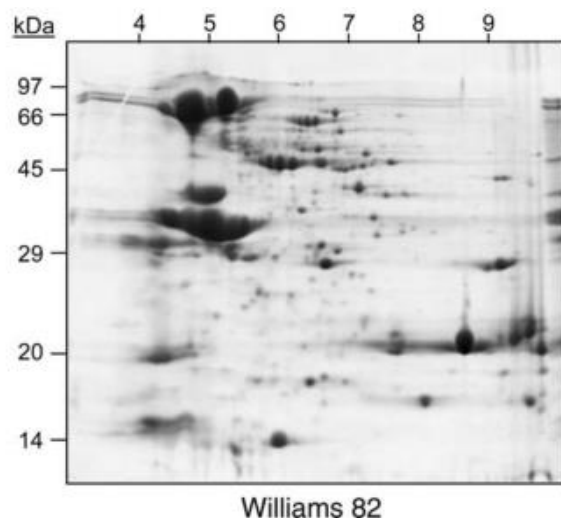


Slika 1.4. 2D elektroforegrami proteina semena soje ekstrahovani različitim metodama ekstrakcije (Natrajan i saradnici, 2005). A- ekstrakcija urea puferom, B- ekstrakcija tiourea-urea puferom, C- fenolna ekstrakcija, D- ekstrakcija TCA/acetonom

Glavni problem kod analize rezultata 2D elektroforegrama proteina semena soje jeste prisustvo horizontalnog, i u nekim slučajevima, i vertikalnog razvlačenja ("streaking") (Slika 1.5).

Vertikalno razvlačenje može biti posledica: prevelike nanete količine uzorka i/ili nedovoljne ekvilibracije i/ili rehidracije stripova (Carette i saradnici, 2006, O'Farrell, 1975). Horizontalno razvlačenje, koje se češće javlja pri 2D elektroforezi proteina semena soje, takođe može biti posledica nekoliko faktora: nedovoljne rastvorljivosti proteina, prisustva interferirajućih supstanci (u prvom redu šećera i proteina), prevelike jonske sile i/ili trajanja izoelektričnog fokusiranja (Hurkman i Tanaka, 1985; O'Farrell, 1975; Görg i saradnici, 2009). Neki od ovih problema mogu se relativno lako prevazići, npr. promenom protoka za izoelektrično fokusiranje (Westermeier i saradnici, 1983) ili obezmašćivanjem uzorka i smanjenjem koncentracije SDS-a, dok je druge, kao što je to prisustvo šećernih komponenti, teže izbeći. S obzirom na visok sadržaj glikoproteina u semenu soje, navedeno

bi moglo objasniti zbog čega je u manjem ili većem stepenu horizontalno razvlačenje uvek prisutno na 2D elektroforegramima proteina semena soje.



Slika 1.5. 2D elektroforegram proteina semena soje sorte Williams 82, ekstrahovanih modifikovanom fenolnom ekstrakcijom (Mooney i Thelen, 2004)

Dodatni problem sa primenom 2D elektroforeze za analizu proteina mogu biti mala reproduktivnost i slabije razdvajanje hidrofobnih proteina (Magdelin i saradnici, 2012). Usled toga što puferi za izoelektrično fokusiranje i rehidraciju moraju sadržati izvesnu količinu soli i haotropnih jedinjenja, hidrofobni proteini su slabije rastvorljivi u poređenju sa polarnijim proteinima. Slabija rastvorljivost dalje uslovljava i nedovoljno fokusiranje ovih proteina i njihovo ugrađivanje ("build-in") u stripove. Usled nedovoljnog fokusiranja i "build-in" proteina, prilikom druge dimenzije dolazi do pojave horizontalnog i vertikalnog razvlačenja na gelu.

3. Naučne hipoteze i cilj rada

Cilj ovog rada bio je da se utvrdi uticaj sadržaja pojedinačnih podjedinica β konglicinina, u prvom redu β' podjedinice na rastvorljivost, emulgujuća i gelirajuća svojstva sojinih proteina. Te osobine su značajne kako za tehnološki proces proizvodnje, tako i za osobine gotovih proizvoda. Rastvorljivost proteina ima nutritivni značaj, jer se na taj način obezbeđuje ne samo lakše usvajanje aminokiselina, već i bolja svarljivost. Pored povećane biološke vrednosti, visoka rastvorljivost je u pozitivnoj korelaciji sa funkcionalnim svojstvima poput geliranja i emulgovanja.

Osnovne hipoteze od kojih se polazilo u ovom radu su:

1. S obzirom na razlike u strukturi β i β' podjedinice u poređenju sa α i α' podjedinicama, može se očekivati da je i uticaj ovih podjedinica na pomenuta funkcionalna svojstva različit.
2. S obzirom na visok sadržaj hidrofobnih aminokiselina i nedostatak ekstenzionih regiona, pretpostavljeno je da će sorte sa većim sadržajem β i β' podjedinice imati manju rastvorljivost na neutralnom pH.
3. Ukoliko se potvrdi pozitivna korelacija između rastvorljivosti i emulgujuće stabilnosti, može se očekivati da će sorte sa većim sadržajem β i β' podjedinice imati niže vrednosti ESI.
4. S obzirom na već utvrđenu negativnu korelaciju između sadržaja β' podjedinice i čvrstine tofua, pretpostavljeno je da će i u proteinskim gelovima veći sadržaj β' podjedinice uticati na smanjenje modula krutosti.

Korelacijom sadržaja podjedinica molekula β konglicinina sa ovim osobinama moguće je pronaći takve sorte koje bi zadržale svoju nutritivnu i biološku vrednost i bile pogodne za primenu u širokom spektru prehrambenih proizvoda. Ovo nije jednostavan zadatak iz tri razloga. Prvo, usled razlike u njihovim strukturama, pod datim uslovima ekstrakcije glicinin i β konglicinin biće prisutni u različitom odnosu u ekstraktu, što znači da će njihov uticaj na funkcionalne osobine proteina biti modifikovan. Drugo, s obzirom na već pomenute međusobne korelacije među funkcionalnim svojstvima, promena jednog svojstva vodiće promeni u svim korelisanim svojstvima. Treće, promena sadržaja β

konglicinina i/ili glicinina vodiće promeni odnosa 11S/7S koji u velikoj meri utiče na funkcionalna svojstva.

Stoga bi rezultati daljih ispitivanja, prikazanih u ovoj disertaciji, zavisnosti uticaja sadržaja podjedinica β konglicinina, posebno sadržaja β' podjedinice, na tehnološka funkcionalna svojstva proteina soje, bili značajni za selekzione programe proizvodnje sorti soje za posebne namene, koje karakteriše specifičan proteinski sastav semena. Rezultati uticaja specifičnog sastava semena na rastvorljivost, emulgujuće i gelirajuće osobine proteina bili bi značajni i zavođenje tehnološkog procesa, kao i za kvalitet i nutritivnu vrednost sojinih proteinskih proizvoda.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Priprema uzorka

Genotipovi soje su selektovani na osnovu njihovog sadržaja β' subjedinice. Ukupno je ispitivano 18 uzoraka, tj. odabrano je 9 različitih genotipova: Novosađanka, Valjevka, Vojvođanka, Proteus, Maple Glen, Armaviskaja, Sava, Trijumf i Favorit. Radi kasnijeg ispitivanja efekta uslova na promenu sastava proteinskih subjedinica, ovih 9 genotipova je praćeno kroz dve godine (2010 i 2011). Novosađanka, Valjevka, Vojvođanka, Sava, Trijumf i Favorit su sorte razvijene od strane Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, Proteus je sorta poreklom iz Amerike, Maple Glen je sorta poreklom iz Kanade, dok je Armaviskaja je sorta poreklom iz Rusije.

Pre ekstrakcije, seme je samleveno u blenderu i dobijeno brašno odmašćeno n-heksanom (Merck) koristeći imerzioni postupak. Brašno je obezmašćivano na 60°C na magnetnoj mešalici u toku 2h, pri čemu je odnos uzorka prema heksanu bio 1: 20 (m/V). Dobijeni talog je 3x ispran n-heksanom, prebačen na sahatno staklo i ostavljen da se suši na vazduhu preko noći.

4.2. Ekstrakcija proteina

Kako bi se izbegao efekat različite ekstraktibilnosti subjedinica β konglicinina i β' konglicinina na datom pH, ekstrakcija je rađena prema modifikovanoj proceduri predloženoj od strane Yagasaki-ja i saradnika (1997). 500 mg obezmašćenoj brašna je ekstrahovano sa 4 ml destilovane vode (pH 6) mešanjem 30 min na mehaničkoj treskalici (Thys 2). Talog je odvojen centrifugiranjem (10 min na 13500 ob/min) (ultracentrifuga Sigma 201 M). Supernatant je podeljen na 4 dela. pH jednog dela je ostavljeno kao pH 6, dok su ostali supernatanti podešeni na pH 3, pH 5, pH 8. Kako bi se postigla željena pH vrednost, uzorci su mešani na magnetnoj mešalici 15 min i talog je odvojen centrifugiranjem. Svaki od uzoraka rađen je u triplikatu.

4.3. Određivanje sadržaja vlage

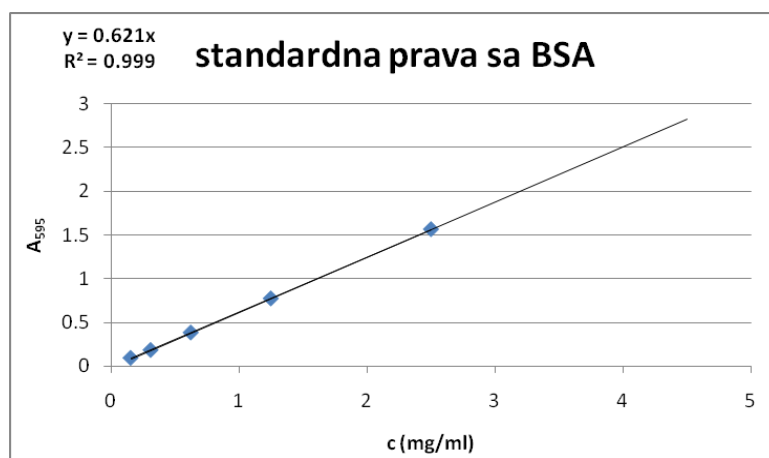
Sadržaj vlage u uzorcima određen je standardnom AACC metodom (u *Methods of the AACC* (Vol-II, 10th ed.), 2000). Svaki uzorak rađen je u triplikatu.

4.4. Određivanje ukupnih proteina

Ukupni sadržaj proteina određen je Kjeldalovom metodom (u *Approved methods of the AACC* (Vol-II, 10th ed.), 2000). Merenja su rađena na uređaju Gerhart Vapodest 50. Sadržaj proteina izračunat je korišćenjem konverzionog faktora 6.25. Svaki uzorak rađen je u triplikatu.

4.5. Određivanje rastvorljivih proteina i rastvorljivosti

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je koristeći Bradford-ovu mikrometodu (Bradford, 1976). 100 μ l uzorka pomešano je sa 5 ml boje. Boja je napravljena rastvaranjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 u 50 ml 95% etanola, nakon čega je u rastvor dodato 100 ml 85% fosforne kiseline i ceo rastvor je razblažen do 1l. Za konstrukciju standardne prave, kao standard je korišćen goveđi serum albumin (BSA) (Slika 3.1.). Sadržaj proteina je određen spektrofotometrijski, merenjem apsorbancije na 595 nm.



Slika 4.1. Standardna prava za određivanje koncentracije rastvorljivih proteina

Rastvorljivost proteina određena je korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Rastvorljivost (\%)} = \frac{\text{sadržaj rastvorljivih proteina (mg/g)}}{\text{sadržaj ukupnih proteina (mg/g)}} \cdot 100\%$$

Koncentracije uzorka preračunate su na suhu masu. Svaki uzorak rađen je u triplikatu.

4.6. Karakterizacija proteina SDS-poliakrilnom elektroforezom

SDS - poliakrilamidna elektroforeza (SDS-PAGE) je rađena prema metodi predloženoj od strane Fling-a i Gregerson-a (1986) na 12 % gelu za razdvajanje i 5 % gelu za koncentrovanje. Proteini iz obezmašćenog brašna ekstrahovani su 0.03 M Tris-HCl puferom, pH 8, sa 0.01 M β -merkaptetanom. Ekstrakt je razblažen puferom za uzorke pH 6.80 (0.055 M Tris-HCl, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v) β -merkaptetanom, 0.0025% (m/v) bromophenol blue, 7% (v/v) glicerol) kako bi se postigla uniformna koncentracija od 2 mg/ml. Nakon kuvanja (100° C, 5 min) i hlađenja do sobne temperature, 25 μ l uzorka naneto je na gel za koncentrovanje. Pufer za razdvajanje bio je sledećeg sastava: 0.05 M Tris pH 8.50, 0.19 M glicin, 0.1% (m/v) SDS. Struja je održavana konstantnom (80 mA/gelu). Gelovi su bojeni sa 0.23 % (w/v) Coomassie brilliant blue R250 (CBB R250) bojom. CBB je rastvoren u rastvoru sledećeg sastava: 3.90 % (m/v) trihlorsirćetnoj kiselini, 17 % (v/v) metanol, 6 % (v/v) sirćetna kiselina. Gelovi su bojeni 1h i obezbojavani sa rastvorom koji je sadržao 18 % (v/v) etanola i 8 % (v/v) sirćetne kiseline preko noći. Kako bi se utvrdile molekulske mase peptide, korišćen je molekularni standard (Pharmacia kit) koji je sadržao proteine sledećih molekularnih masa: 94000 (fosforilaza B), 67000 (goveđi albumin), 43000 (ovoalbumin), 30.0 (karbonska anhidraza), 20100 (tripsin inhibitor) i 14000 (α -laktoalbumin). SDS elektroforeza je rađena u triplikatu kako bi se omogućila statistička obrada podataka.

Seme sorte NS 9 razvijene od strane Instituta za ratarstvo i povrtarstvo (Novi Sad), iskorišćeno je za izolovanje 7S i 11S frakcije.

Procentni udeo pojedinačnih subjedinica izračunat je na osnovu denzitometrijske analize koja je rađena u SigmaGel softveru, verzija 1.1. (Jandel Scientific, USA).

4.7. Priprema emulzija

Emulgjuća svojstva određena su prema metodi predloženoj od strane Pearce-a i Kinsela-e (1978). 15 ml sunconkretovog ulja (Vital, Srbija) homogenizovano je sa 45 ml 0.1% rastvora proteina datog pH u mehaničkom homogenizatoru (Mixsy, Zepter) 1 min pri maksimalnoj brzini. 50 µl dobijene smeše razblaženo je sa 10 ml 0.1 % (m/v) SDS solution. Uzorci su uzimani na 0 min i na 10 min od početka homogenizacije. Apsorbance emulzija nakon 0 min (A_0) i nakon 10 min (A_{10}) su merene na 500 nm. Svaki uzorak rađen je u triplikatu.

4.8. Određivanje stabilnosti i aktivnosti emulzije

Stabilnost i aktivnost emulzije izražene su preko vrednosti indeksa stabilnosti emulzije (ESI) i indeksa aktivnosti emulzije (EAI). ESI i EAI su izračunati preko sledećih formula:

$$ESI(\text{min}) = (A_0 \cdot 10) / \Delta A$$

gde je: $\Delta A = A_0 - A_{10}$, A_0 je apsorbance uzorka nakon 0 min, A_{10} je apsorbance uzorka nakon 10 min.

$$EAI(\text{m}^2/\text{g}) = \frac{4.606 \cdot A_0 \cdot F}{c \cdot \Phi \cdot 10000}$$

gde je: F faktor razblaženja, c je koncentracija proteina (u g/ml), Φ je sadržaj uljane faze.

4.9. Priprema gelova

Proteini su ekstrahovani mešanjem obezmašćenog brašna i vode 1h na sobnoj temperaturi u odnosu 1:8 (m/v) na pH 6.8 Nerastvorljivi deo je odvojen centrifugiranjem (5 min, 14000 obrt/min). Proteini iz supernatanta precipitirani su pri pH 4.8 (2h na 4°C) i liofilizovani. Nakon toga, proteini su rastvoreni u destilovanoj vodi (pH 6.8) do konačne koncentracije proteina 11 % (m/v). Rastvor proteina je deaerisan 5 min, postavljen u staklenu posudu i zagrevan 30 min na 93 °C u vodenom kupatilu. Dobijeni 11 % (m/v) rastvor proteina brzo je ohlađen do sobne temperature i proces geliranja započeo je nakon dodatka 1.8 % (m/m) NaCl i 3 % (m/m) CaCl₂. Svaki uzorak rađen je u triplikatu.

4.10. Određivanje stepena bubrenja

Stepen bubrenja gelova je određen gravimetrijski. Od proteinskih gelova pripremljenih na opisani način isečeni su uzorci veličine 2 cm × 2 cm × 1 mm i zatim su uzorci sušeni do konstantne mase. Stepen bubrenja (q) je određen merenjem mase suvih uzoraka i mase uzoraka koji su bili potopljeni u destilovanoj vodi na 25 °C 24 h, do postizanja ravnotežnog stanja. Stepen bubrenja je preračunat korišćenjem formule:

$$q (\%) = (W_s - W_d) / W_d \times 100,$$

gde je: W_d - masa suvog polimera, a W_s - masa nabubrelog polimera.

4.11. Određivanje dinamičkih modula

Reološke osobine gelova ispitivane su na reometru Discovery Hybrid Rheometer HR2 (TA Instruments) u modu paralelnih ploča (dijametar 25 mm). Reološki parametrigelova, kao što su modul sačuvane energije (G'), modul izgubljene energije (G'') i tangens ugla mehaničkih gubitaka – $\tan \delta$ (G''/G') mereni su u opsegu frekvenci 0.1–100 rad/s pri deformaciji od 1.0 %. Parametri za svaki uzorak mereni su u triplikatu.

4.12. Razdvajanje sojinih proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

Kako bi se isprobalo koji mehanizam reakcije će dati najbolje razdvajanje sojinih polipeptida dvodimenzionalnom (2D) elektroforezom, isprobane su acetonska ekstrakcija, fenolna ekstrakcija, ekstrakcija urea puferom, ekstrakcija Tris puferom, ekstrakcija Tris-urea puferom i ekstrakcija tiorea-urea puferom. *Acetonska ekstrakcija:* Uzorci su usitnjeni u tučkom u avanu, koristeći tečni azot. Proteini iz 500 mg uzorka su ekstrahovani sa 2.5 ml 100 % acetona. Ekstrakcija je rađena na –20°C u toku 2h. Talog je odvojen centrifugiranjem (10 min, 13500 ob/min). Zatim je talog ispran dva puta sa po 0.5 ml 70 % acetona i centrifugiran. Talog je osušen na sobnoj temperaturi tokom noći i uzorak je rastvoren u puferu za izoelektrično fokusiranje (8 M urea, 2 % (w/v) CHAPS, 50 mM DTT, 0.2 % (m/v) amfolita pH 3-10, 0.01 % (m/v) BPB) vorteksiranjem (10 min) i sonifikacijom (1h). *Fenolna ekstrakcija:* Fenolna ekstrakcija rađena je prema metodi Hurkmana i Tanake (1986), s tim što je u puferu za izoelektrično fokusiranje bila veća

koncentracija uree i CHAPS-a, a manja koncentracija tiouree. 1g uzorka usitnjen je tučkom u avanu, koristeći tečni azot. Proteini su zatim ekstrahovani u odnosu 1:1 puferovanim fenolom (2.5 ml fenola puferisanog sa Tris-HCl puferom - pH 8.8) i ekstrakcionim puferom (2.5 ml pufera za ekstrakciju (0.1 M Tris-HCl - pH 8.8), 10 mM EDTA, 0.4% 2-merkaptoetanol, 0.9 M saharoza). Ekstrakt je vorteksiran 5 min i sonifikovan 30 min na 4 °C. Zatim je ekstrakt 2 puta centrifugiran po 15 min na 13500 ob/min na 4 °C. Gornja, fenolna faza je odvojena, a proteini su precipitirani dodatkom hladnog 0.1 M amonijum acetata u 100% metanolu u odnosu 5:1. Ekstrakt je vorteksiran i ostavljen preko noći na -20 °C. Uzorak je centrifugiran 2 puta po 20 min na 14000 ob/min na 4 °C). Talog je ispran hladnim 0.1 M amonijum acetatom u metanolu (2x), 80% acetonom (-20 °C) i hladnim 70% etanolom. Talog je rastvoren u puferu za izoelektrično fokusiranje (1 ml), inkubacijom 1h na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija Tris puferom je rađena na isti način kao što je opisano za pripremu uzoraka za SDS PAGE. *Ekstrakcija urea puferom:* Ekstrakcija urea puferom je rađena prema modifikovanoj metodi Berklman-a i saradnika (1998). 100 mg uzorka je ekstrahovano sa 600 µl urea pufera (8 M urea, 4% CHAPS, 2% amfoliti- pH 3–10). Ekstrakcija je vršena vorteksiranjem (5 min) i sonifikacijom (45 min) na sobnoj temperaturi. Uzorak je potom centrifugiran (15 min, 13500 ob/min). Supernatant je uzet za dalju analizu. *Direktna ekstrakcija u puferu za izoelektrično fokusiranje.* Modifikovana procedura prema Gallardo-u i saradnicima (2001) je korištena za ekstrakciju. 100 mg uzorka je ekstrahovano sa 600 µl pufera za izoelektrično fokusiranje na sobnoj temperaturi. Ekstrakcija je vršena vorteksiranjem (15 min) i sonifikacijom (45 min). Zatim je ekstrakt centrifugiran (2x po 15 min na 13500ob/min) i supernatant je korišten za dalju analizu. *Ekstrakcija Tris-urea puferom:* Proteini iz 500 mg uzorka su ekstrahovani sa 2 ml destilovane vode, mućkanjem na mešalici 15 min na sobnoj temperaturi. Ekstrakt je centrifugiran (15 min, 13500 ob/min). Proteini iz 20 µl supernatanta su reekstrahovani sa 160 µl Tris-urea pufera (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.2% SDS, 5 M urea). 1 h pre izoelektričnog fokusiranja, dodato je 20 µl β merkaptoetanola. Ekstrakt je razblažen puferom za izoelektrično fokusiranje do koncentracije 1 µg/ml. *Tiourea-urea ekstrakcija:* Tiourea-urea ekstrakcija je rađena prema proceduri opisanoj od strane Herman-a i saradnika (2003). 100 mg obezmašćenog brašna je vorteksirano sa 1.5 ml pufera za

ekstrakciju (5 M urea, 2 M tiourea, 4 % (m/v) CHAPS, 65 mM DTT, 0.8 % (m/v) amfolita -pH 3–10)) 5 min na sobnoj temperaturi. Talog je odvojen centrifugiranjem (10 min, 13500 ob/min) i supernatant je korišćen za dalje eksperimente. Uzorak je nanesen na stip (BioRad stip- 7 cm, pH 3-10), tako da je ukupna masa uzorka po stripu iznosila 100 µg. Strip je rehidriran sa uzorkom tokom 12h na sobnoj temperaturi. Izoelektrično fokusiranje vršeno je u Protean IEF Cell (Bio-Rad) pod sledećim uslovima: S01-250V, 15min; S02-4000V, rapid; S03-10000Vh, rapid; temperatura fokusiranja- 20 °C. Nakon izoelektričnog fokusiranja, stripovi su ekvilibrisani najpre u ekvibracionim puferu 1 (0,375 M Tris–HCl (pH 8.8), 6 M urea, 20 % glicerol, % SDS, 0.002 % bromopfenol plavo, 2 % (m/v) DTT) 15 min, a potom u ekvibracionom puferu 2 (0.375 M Tris–HCl (pH 8.8), 6 M urea, 20% glicerol, 2% SDS, 0.002% bromofenol plavo, 2.5% jodoacetamid) 20 min. Zatim su ekvilibrisani stripovi uronjeni 5 min u elektrodni pufer (0.25 M Tris, 1.92 M glicin, 1% SDS) i postavljeni na površinu 12 % akrilamidnog gela. Kontakt između gela i stripa obezbeđen je dodavanjem agaroznog rastvora (0.25 M Tris, 1.92 M glicin, 1% SDS, 0.5% agaroz, 0.002% bromofenol plavo). SDS PAGE (druga dimenzija) je rađen u Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) ćeliji za elektroforezu, pri konstantnom naponu od 250 V, korišćenjem Laemmli-ovog metoda. Gelovi su bojani 1h na sobnoj temperaturi u rastvoru sledećeg sastava: 0.001% (m/v) CBB G250, 40% etanol, 10% sirćetna kiselina, 10% (m/v) trihlorsirćetna kiselina. Gelovi su obezbojavani 24h u rastvoru koji je sadržao 40 % etanol i 10 % sirćetnu kiselinu. Broj i intenzitet tačaka, kao i njihova x i y vrednost tačaka određeni su u softveru SigmaGel, verzija 1.1. (Jandel Scientific, USA).

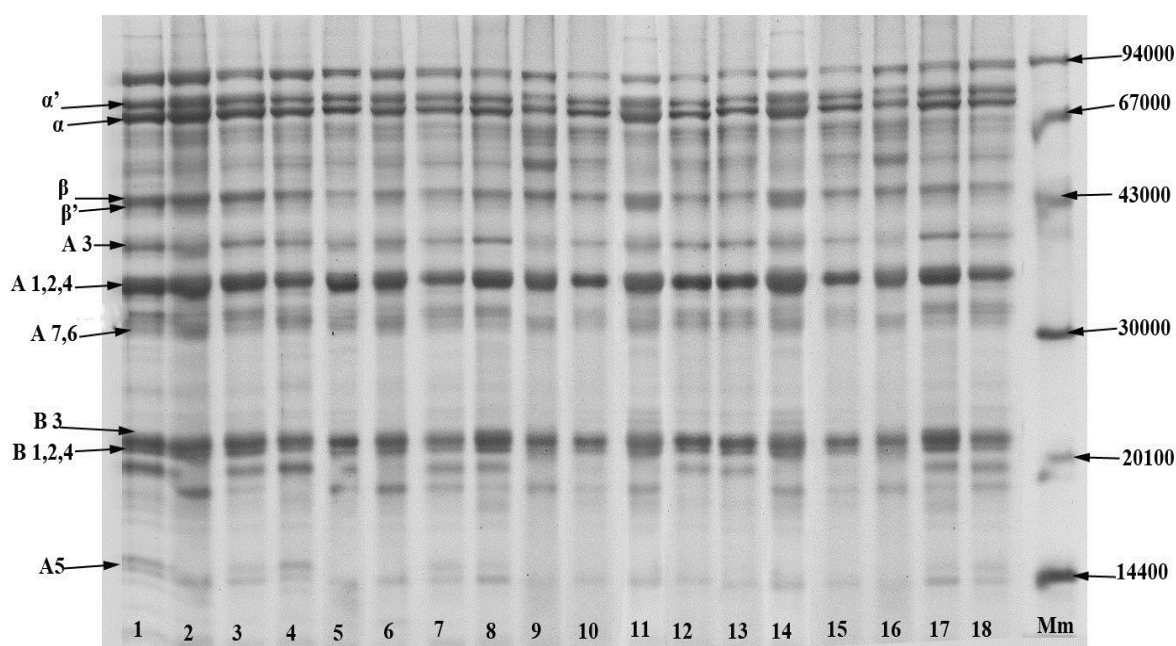
3.13. Statistička analiza

Korelacione matrice i ANOVA testovi rađeni su u Statistica softveru, verzija 8.0 (StatSoft Co., Tulsa, OK). Kao stepen značajnosti uzeto je $p < 0.05$. Analiza glavnih komponenti (PCA) je rađena u SPSS softveru (verzija 2.0, IBM), korišćenjem Verimax rotacije.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. Podjedinični sastav

Nakon urađene SDS elektroforeze (Slika 5.1), denzitometrijom je određen podjedinični udeo datih genotipova (Tabela 5.1). Određivanje pojedinačnih frakcija vršeno je na osnovu poređenja Rf vrednosti datog polipeptida sa Rf vrednostima standarda molekulskih masa.



Slika 5. 1. SDS elektroforegram genotipova soje (1-Valjevka 2010, 2-Armaviskaja 2010, 3-Novosađanka 2011, 4-Trijumf 2010, 5-Armaviskaja 2011, 6-Vojvođanka 2010, 7-Trijumf 2011, 8-Vojvođanka 2011, 9-Favorit 2011, 10-Maple Glen 2010, 11-Valjevka 2011, 12-Proteus 2010, 13-Proteus 2011, 14-Novosađanka 2010, 15-Maple Glen 2011, 16-Favorit 2010, 17-Sava 2011, 18-Sava 2010, Mm-standard molekulskih masa)

Kako bi se izrazio ukupan efekat kiselih i baznih podjedinica glicinina, kisele podjedinice su računane kao suma $A_3 + A_{1,2,4} + A_{7,6} + A_5$ (označeno kao kiselo u Tabeli 5.1), dok su bazne podjedinice računane kao suma $B_3 + B_{1,2,4}$ (označeno kao bazno u Tabeli 5.1).

Tabela 5.1. Podjedinični sastav ispitivanih genotipova soje*

Uzorak	α' (%)	α (%)	β (%)	β' (%)	11S/7S	Kisele (%)	Bazne (%)	K/B
Novosađanka 2010	4.52 ^{ad}	4.60 ^a	4.44 ^{ac}	4.91 ^a	2.22 ^a	23.3 ^a	15.2 ^a	1.53 ^a
Novosađanka 2011	6.57 ^{be}	5.21 ^{ab}	4.47 ^{ab}	3.44 ^b	2.3 ^{ab}	27.3 ^b	18.0 ^b	1.51 ^{ae}
Valjevka 2010	6.14 ^{bc}	5.06 ^{abc}	3.99 ^c	3.28 ^{bc}	1.98 ^c	20.6 ^c	17.2 ^c	1.19 ^b
Valjevka 2011	6.91 ^b	5.86 ^e	4.45 ^{ac}	3.34 ^{bc}	1.8 ^c	21.0 ^{cd}	16.0 ^{ad}	1.31 ^c
Vojvođanka 2010	5.94 ^{bc}	5.22 ^{acd}	5.26 ^b	4.19 ^{ed}	1.93 ^c	24.4	18.6 ^b	1.33 ^c
Vojvođanka 2011	4.66 ^{adf}	5.09 ^{ab}	3.70 ^c	2.78 ^d	2.1 ^{abc}	20.8 ^{cdf}	13.7 ^e	1.52 ^a
Proteus 2010	6.82 ^{bcej}	5.28 ^{ac}	5.17 ^b	0 ^j	2.7 ^d	27.8 ^e	15.9 ^{ad}	1.73 ^d
Proteus 2011	6.36 ^{bj}	6.63 ^f	5.70 ^b	0 ^j	2.29 ^{ab}	24.7 ^d	17.3 ^c	1.42 ^e
Maple Glen 2010	5.02 ^{cf}	4.89 ^{ab}	3.86 ^c	1.77 ^e	2.14 ^{ac}	20.97 ^{cdf}	14.4 ^f	1.45 ^{ae}
Maple Glen 2011	6.72 ^{bcj}	5.33 ^{bdc}	5.12 ^b	1.03 ^f	2.07 ^{ac}	23.5 ^a	15.7 ^{ad}	1.49 ^{ae}
Arnaviskaja 2010	5.91 ^{bck}	5.20 ^{abc}	4.52 ^{ac}	4.64 ^a	1.98 ^{ac}	21.5 ^{cd}	18.9 ^b	1.14 ^b
Arnaviskaja 2011	5.97 ^{bck}	6.64 ^{bf}	5.01 ^{ab}	1.74 ^{ef}	1.96 ^{ac}	22.6 ^a	15.5 ^{ad}	1.46 ^{ae}
Sava 2010	5.65 ^{ck}	5.81 ^{bef}	3.63 ^c	2.36 ^d	2.19 ^{ab}	23.1 ^a	14.9 ^f	1.48 ^{ae}
Sava 2011	5.11 ^{ac}	5.19 ^{acf}	4.99 ^{ab}	3.49 ^{bc}	2.22 ^{ab}	22.5 ^{acdf}	16.7 ^{cd}	1.35 ^c
Trijumf 2010	4.10 ^{ad}	4.84 ^{ab}	4.86 ^a	3.37 ^{bd}	2 ^{ac}	20.5 ^{cd}	13.9 ^{ef}	1.43 ^e
Trijumf 2011	4.22 ^e	5.88 ^{bef}	6.28 ^d	2.07 ^{ef}	2.13 ^{ab}	22.9 ^a	16.4 ^{cd}	1.39 ^{ee}
Favorit 2010	4.61 ^{adf}	3.48 ^d	6.10 ^d	3.78 ^{bc}	1.99 ^{bc}	20.8 ^{cd}	15.8 ^{ad}	1.28 ^c
Favorit 2011	5.76 ^{ck}	5.58 ^{bc}	5.31 ^b	2.86 ^{bd}	1.96 ^{bc}	22.5 ^a	16.6 ^{cd}	1.36 ^c

*Isto slovo znači da, po datoj promenljivoj, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato *t* testom za nezavisne uzorke pri *p* = 0.05), K/B – odnos kiselih/baznih polipeptida glicinina

Kao što se može videti iz Tabele 5.1, odnos glicinina prema β konglicininu (11S/7S) kretao se u opsegu od 1.8-2.7, pri čemu je najveći odnos 11S/7S pronađen u uzorku Proteus 2010, a najmanji u uzorku Valjevka 2011. Ovaj odnos nešto je viši od odnosa koji su našli Pešić i saradnici (2005) i Stanojević i saradnici (2011), ali je u sagnasnosti sa rezultatima nađenim od strane Mujoo, Trinh i saradnici (2003) i Cai i Chang-a (1999). Od ispitivanih genotipova, β' podjedinica nije bila prisutna u uzorcima Proteus 2010 i Proteus 2011, dok se njen sadržaj u ostalim uzorcima kretao od 1.03-4.91 %. Sadržaji podjedinica α' , α i β podjedinica kretali su se u opsegu 4.10-6.91 %, 3.48-6.64% i 3.63-6.28 %. Najmanji sadržaj α' podjedinice bio je u uzorku Trijumf 2010, a najveći u uzorku Valjevka 2011. Najmanji sadržaj α podjedinice detektovan je u uzorku Favorit 2010, a najveći u uzorku Proteus 2011. Sadržaj β podjedinice bio je najmanji u uzorku Sava 2010, a najveći u uzorku Trijumf 2011. Kiseli polipeptidi glicinina su u svim uzorcima bile procentualno zastupljeniji od baznih i kretale su se u opsegu 20.5-27.8 %, dok su bazni polipeptidi bili u opsegu 13.7-18.9 %. Odnos kiselih prema baznim polipeptidima kretao se u opsegu 1.14-1.73, pri čemu je najmanji odnos nađen u uzorku Armaviskaja 2010, a najveći u uzorku Novosađanka 2010.

Kao što se može videti iz Tabele 5.1, podjedinični sastav uzoraka razlikovao se kako u zavisnosti od sorte, tako i u zavisnosti od godine u kojoj je sorta gajena. Kao što su prijavili Zarkadas i saradnici (2007), genetska konstitucija ispitivane sorte ima uticaja ne samo na količinu ukupnih proteina, već i na odnos podjedinica u datim proteinima. Velika variranja u sadržaju β podjedinice mogu se objasniti kako njenom kasnijom sintezom u poređenju sa α i α' (Hajduch i saradnici, 2005), tako i većim uticajem faktora sredine, u prvom redu, nutritivnog stresa na ekspresiju gena za podjedinice 7S (Gayler i saradnici, 1985; Harada i saradnici, 1989). To dodatno objašnjava i vrednosti dobijene za sadržaj 7S u ispitivanim uzorcima, jer se iz Tabele 5.2 može videti da su varijacije u sadržaju ukupnih rastvorljivih proteina, prevashodno posledica smanjenja sadržaja β konglicinina.

Međutim, interesantno je da iako takvo variranje u sadržaju podjedinica uslovljava relativno veliko variranje u sadržaju β konglicinina i glicinina (sadržaj 7S se kretao u opsegu 15.54-20.61 %, a sadržaj 11S u opsegu 34.4- 45.3 %; Tabela 5. 2), sadržaj zbira konglicinina i glicinina pokazao je manje varijacije od očekivanih i za većinu uzoraka se

kretao između 55-60 % (Tabela 5.2). Niske vrednosti za ukupne rastvorljive proteine su pokazali genotipovi Trijumf 2010 i Vojvođanka 2011, dok su visoke vrednosti za ukupne rastvorljive proteine pokazali uzorci Novosađanka 2011 i Vojvođanka 2010 (Tabela 2). Ovakav relativno nizak opseg variranja rastvorljivih proteina ide u prilog tezi predloženoj od strane Đorđevića (2010) da verovatno postoji neki molekularni mehanizam koji reguliše količinu ukupnih rastvorljivih proteina.

Tabela 5.2. Sadržaj 7S, 11S i ukupnih rastvorljivih proteina u ispitivanim genotipovima*

Uzorak	7S (%)	11S (%)	7S + 11S
Novosađanka 2010	18.47 ^a	38.5 ^{ac}	56.97 ^{ac}
Novosađanka 2011	19.69 ^{bc}	45.3 ^b	64.99 ^b
Valjevka 2010	18.54 ^a	37.8 ^{ac}	56.34 ^{ac}
Valjevka 2011	20.56 ^c	36 ^{cd}	56.56 ^{af}
Vojvođanka 2010	20.61 ^c	43 ^e	63.61 ^b
Vojvođanka 2011	16.23 ^d	34.5 ^f	50.73 ^d
Proteus 2010	17.27 ^e	43.7 ^{be}	60.97 ^e
Proteus 2011	18.69 ^{ab}	42 ^{ej}	60.69 ^e
Maple Glen 2010	15.54 ^d	35.37 ^{df}	50.91 ^d
Maple Glen 2011	18.2 ^a	39.2 ^a	57.4 ^c
Armaviskaja 2010	20.27 ^{bc}	40.4 ^j	60.67 ^e
Armaviskaja 2011	17.62 ^e	38.1 ^{ac}	55.72 ^{af}
Sava 2010	17.45 ^e	38 ^{ac}	55.45 ^f
Sava 2011	18.78 ^{ab}	39.2 ^{aj}	57.98 ^{cj}
Trijumf 2010	17.17 ^e	34.4 ^f	51.57 ^d
Trijumf 2011	18.45 ^a	39.3 ^{aj}	57.75 ^{cj}
Favorit 2010	17.97 ^e	36.6 ^{cd}	54.57 ^f
Favorit 2011	19.51 ^{bc}	39.1 ^{aj}	58.61 ^j

*-Isto slovo znači da, po datoj promenljivoj, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato *t* testom za nezavisne uzorke pri *p* = 0.05)

Interesantno, iako rezultati potvrđuju da će i sadržaj β konglicinina i sadržaj glicinina uticati na sadržaj rastvorljivih proteina (Yaklich i saradnici, 2001), uticaj 11S proteina je značajniji od uticaja 7S proteina (Tabela 5.3). Dati rezultati potvrđuju da kod visokoproteinskih sorti dolazi do povećanja u sadržaju glicinina. Međutim, kako postoji

međusobna korelacija između sadržaja 11S i 7S (Tabela 5.3), odnos 11S/7S se bitnije ne menja.

Tabela 5.3. Korelacioni koeficijenti između sadržaja 7S, 11S i ukupnih rastvorljivih proteina*

Sadržaj proteinske frakcije	7S (%)	11S (%)
7S (%)	1	0.50
11S (%)	0.50	1
Ukupni rastvorljivi proteini	0.74	0.95

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Iz tabele 5.1, može se videti da su američka i kanadska sorta imale manji sadržaj β' podjedinice u poređenju sa domaćim sortama. Proteus i Maple Glen definišu se kao HP (visokoproteinske sorte), a po rezultatima prijavljenim od strane Đorđevića (2010), HP sorte karakterišu se smanjenim sadržajem β' podjedinice. Međutim, i ako je u ispitivanim HP sortama sadržaj β' podjedinice zaista bio manji, statistički značajna negativna korelacija nije nađena (Tabela 5.4). Navedeno se može objasniti velikim varijacijama u sadržaju ostalih podjedinica 7S i 11S. Interesantno, α' podjedinica pokazala je pozitivnu korelaciju kako sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina, tako i sa sadržajem 11S. Navedeno bi verovatno objasnilo korelaciju između sadržaja 7S i sadržaja 11S. Takođe, od svih podjedinica β konglicinina, α' podjedinica pokazuje najveći efekat kako na sadržaj 7S, tako i na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina (Tabela 5.4). Tako da se može reći da je sadržaj α' podjedinica glavni faktor koji će određivati efekat sadržaja 7S na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina. Očekivano, sadržaj kiselih i baznih polipeptida pozitivno je korelisan sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina, što dodatno potvrđuje mnogo izraženiji efekat sadržaja 11S na sadržaj ukupnih rastvorljivih proteina u poređenju sa efektom sadržaja 7S. Odnos kiselih i baznih polipeptida bio je negativno korelisan sa sadržajem 7S.

Tabela 5.4. Korelacioni koeficijenti između pojedinačnih podjedinica i sadržaja β konglicinina (7S), glicinina (11S), ukupnih rastvorljivih proteina*

	α' (%)	α (%)	β (%)	β' (%)	11S/7S	Kisele (%)	Bazne (%)	K/B
7S (%)	0.43	0.36	0.28	0.34	-0.44	-0.21	0.42	-0.51
11S (%)	0.56	0.24	0.31	-0.18	0.52	0.89	0.74	0.3
Ukupni rastvorljivi proteini	0.58	0.45	0.34	-0.29	0.28	0.76	0.86	0.17

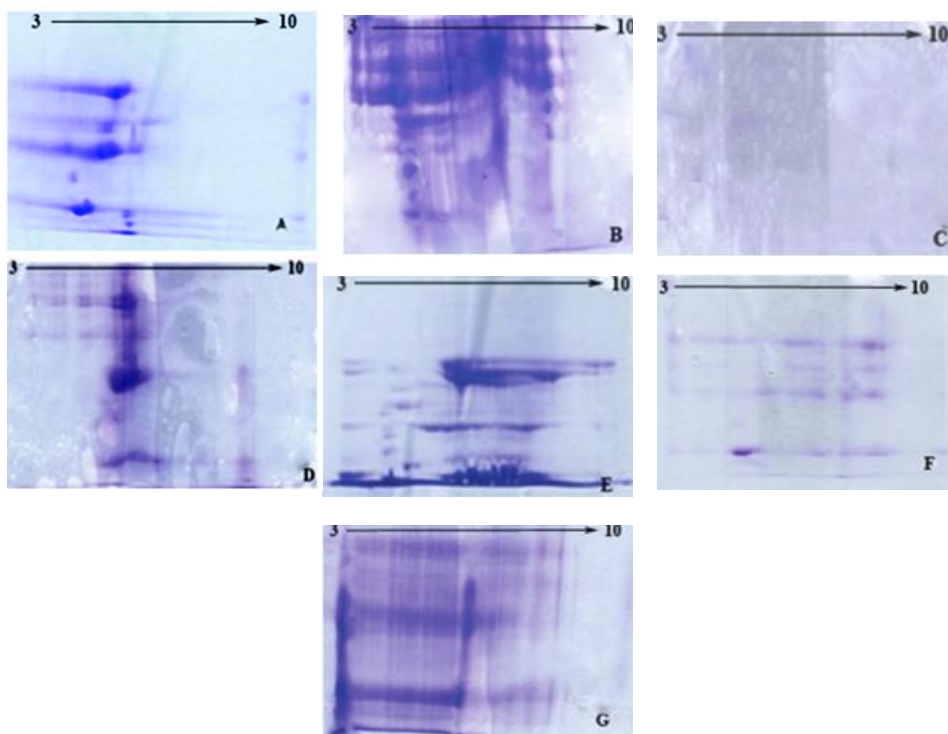
*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$; K/B-odnos kiselih/baznih polipeptida glicinina

U pokušaju da se nađu faktori koji bi u najvećoj meri uticali na variranje među uzorcima, urađena je analiza glavnih komponenti. Analiza glavnih komponenti pokazala je da je prva glavna komponenta (koja objašnjava 59.2 % ukupne varijabilnosti) korelisana sa 5 originalnih promenljivih (α i β' podjedinicama, kiselim i baznim polipeptidima i odnosom 11S/7S), što sugeriše da ove promenljive kovariraju. Međutim, korelacije α , kiselih, baznih polipeptida i odnosa 11S/7S sa prvom glavnom komponentom su bile pozitivne, dok je korelacija prve glavne komponente sa sadržajem β' podjedinice bila negativna, što ukazuje da će genotipovi sa višim 11S/7S odnosom i većim sadržajem α , kiselih i baznih polipeptida imati manji sadržaj β' subjedinice. Druga glavna komponenta (koja objašnjava 22.9 % ukupne varijabilnosti) korelisana je sa sadržajem α' i β subjedinice. Kako je korelacija sadržaja β podjedinice sa drugom glavnom komponentom negativna, dok je korelacija sadržaja α' podjedinice sa drugom glavnom komponentom pozitivna, može se zaključiti da ove dve promenljive kovariraju u suprotnom smeru.

5.2. Dvodimenzionalna elektroforeza sojinih proteina

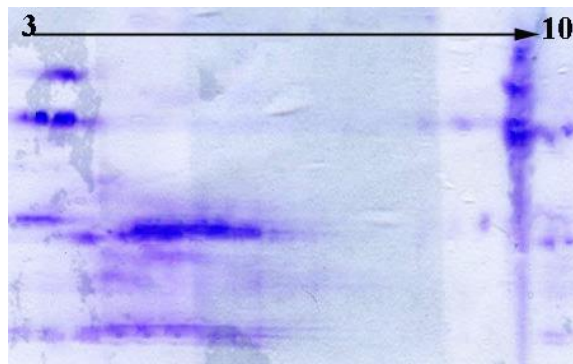
Kako bi se utvrdilo koji metod ekstrakcije proteina soje će dati najbolje razdvajanje polipeptida u uzorku, pre početka izvođenja 2D elektroforeze svih uzoraka, proteini iz uzorka Novosađanka 2010 su ekstrahovani pomoću nekoliko različitih metoda. Korišćene su: acetonska ekstrakcija, fenolna ekstrakcija, ekstrakcija Tris puferom, ekstrakcija Tris-urea puferom, ekstrakcija direktno u puferu za izoelektrično fokusiranje i tiourea-urea ekstrakcija. Na Slici 5.2 predstavljeni su 2D elektroforegrami uzoraka Novosađanka 2010 ekstrahovani različitim metodama ekstrakcije. Ideja ovog ekperimenta je bila da se utvdi da li je moguće koristiti isti proteinski ekstrakt i za SDS PAGE i za 2D elektroforezu. Kako se ekstrakcija uzoraka za SDS PAGE standardno vrši Tris puferom, bilo bi efikasno ukoliko bi se i razdvajanje 2D elektroforezom moglo vršiti istom metodom, jer bi to značilo i da će dati polipeptidi biti prisutni u istoj koncentraciji u oba ekstrakta. Međutim, kao što se može videti sa Slike 5.2- F, u slučaju ekstrakcije sa Tris puferom uočava se veliko horizontalno razvlačenje koje može biti posledica prisustva polarnih kontaminanata i visoke koncentracije soli. Ovakva visoka koncentracija soli produžava korak izoelektričnog fokusiranja. Takvo produženo izoelektrično fokusiranje može uticati na transfer proteina sa stripova na gel, tj. može doći do "build-in" proteina. Acetonska ekstrakcija (Slika 5.2- B) karakterisala se visokim stepenom horizontalnog razvlačenja, što je posledica prisustva lipida i polarnih kontaminanata (Thiellement i saradnici, 2007). Ekstrakcije urea puferom (Slika 5.2 - C) i ekstrakcija Tris-urea puferom dale su mali broj tačaka i veliko horizontalno razvlačenje, što je verovatno bila posledica jonizacije uree u kiselom pH. Direktna ekstrakcija u puferu za izoelektrično fokusiranje (Slika 5.2-D) dala je veću količinu proteina u poređenju sa ekstrakcijom urea puferom, ali i horizontalno razvlačenje spotova koje se može objasniti prisustvom visoke koncentracije jona i haotropnih jedinjenja. Takođe se sa Slike 5.2-A i E može videti da fenolna ekstrakcija daje tačke visokog intenziteta, što je u skladu sa rezultatima prijavljenim od strane Lee i saradnika (2010) i Sarma-e i saradnika (2008). Međutim, iako su tačke dobijene ekstrakcijom sa tiourea-urea puferom nižeg intenziteta (usled niže koncentracije proteina u ekstraktu), one su najbrojnije, što omogućava simultano poređenje i visoko zastupljenih i manje zastupljenih

proteina. Navedeni rezultati su u skladu sa rezultatima prijavljenim od strane Natrajan-a i saradnika (2005). Stoga je ekstrakcija sa tiourea-urea puferom izabrana kao najpovoljnija.

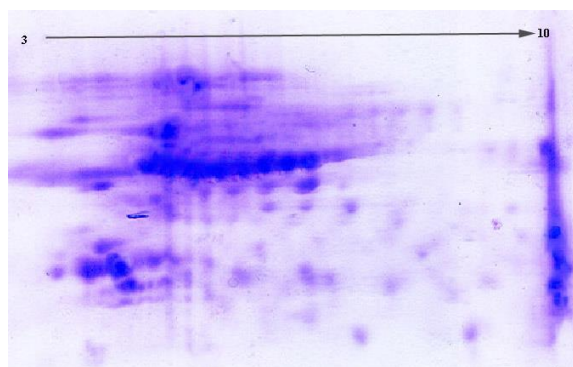


Slika 5.2. 2D elektroforegram uzorka Novosađanka 2010 dobijeni različitim metodama ekstrakcije (A-fenolna ekstrakcija, B-acetonska ekstrakcija, C-ekstrakcija urea puferom, D-direktna ekstrakcija u puferu za izoelektrično fokusiranje, E-ekstrakcija tiourea-urea puferom, F-ekstrakcija sa Tris puferom, G-ekstrakcija sa Tris-urea puferom).

Na Slikama 5.3 i 5.4 predstavljeni su 2D elektroforegrami za uzorke Proteus 2010 (Slika 5.4) i Valjevka 2010 (Slika 5.5). Ova tri uzorka izabrana su kao reprezentativna zbog razlike u sadržaju β' subjedinice. Uzorak Novosađanka 2010 je od svih ispitivanih uzoraka sadržao najveću količinu β' subjedinice; uzorak Proteus 2010 je jedan od dva uzorka koji nisu sadržali β' subjedinicu i uzorak Valjevka 2010 je odabran, jer je sadržao onu količinu β' subjedinice koja je karakteristična za ovdašnje sorte.



Slika 5.3. 2D elektroforegram uzorka Proteus 2010.

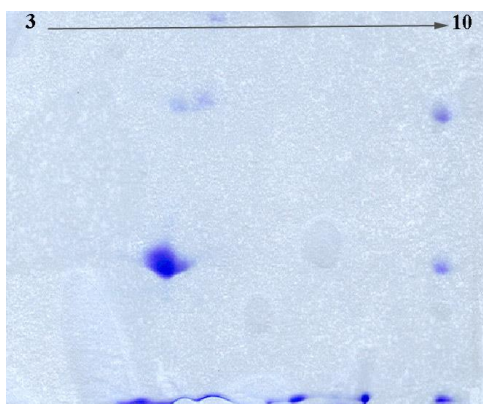


Slika 5.4. 2D elektroforegram uzorka Valjevka 2010

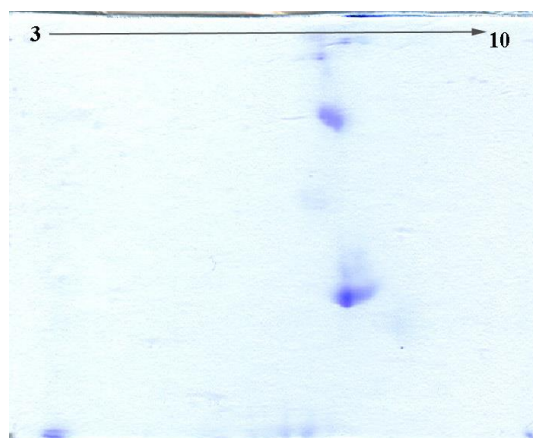
Kako se može uočiti sa Slika 5.2-5.4, postoji par problema sa poređenjem 2D elektroforegrama denzitometrijom. Posebno izraženo horizontalno razvlačenje je uočeno kod uzorka Valjevka 2010. Ovakvo horizontalno razvlačenje moglo bi se objasniti time što uzorak Valjevka ima nizak odnos 11S/7S, tj. visok sadržaj glikozilovanih α i α' subjedinica. Poznato je da prisustvo šećera ometa 2D elektroforezu na taj način što dolazi do međusobne asocijacije ("lepljenja") polipeptida u gelu (Natrajan i saradnici, 2005). Prisustvo povećane količine šećernih ostataka moglo bi da objasni i vertikalno razvlačenje prisutno u uzorcima, jer ometa korak izoelektričnog fokusiranja i dovodi do "zaglavlivanja" proteina u mrežu gela (Thiellement i saradnici, 2007).

Identifikacija tačaka koja bi mogle predstavljati subjedinice β konglicinina urađena je na sledeći način. Iz uzorka NS 9 razdvojene su 7S i 11S proteinske frakcije. Kako je poznato da ova sorta sadrži β' podjedinicu, urađena je 2D elektroforeza datih frakcija sa

ciljem da posluže kao standard (Slika 5.5 i Slika 5.6). Densitometrijska određivanja su vršena merenjem x i y pozicije (koja funkcionišu slično kao Rf vrednost u SDS PAGE), površine i intenziteta tačke. Upotrebom markera molekulskih masa, moguće je odrediti opseg masa u kojem se nalazi tačka kako bi se indentifikovali polipeptidi. Kao što se može videti sa Slike 5.5, 2D elektroforegram 7S frakcije pokazao je nekoliko bleđih i samo jednu intenzivnu tačku, što je značilo da se sve podjedinice od interesa nalaze ispod te tačke.

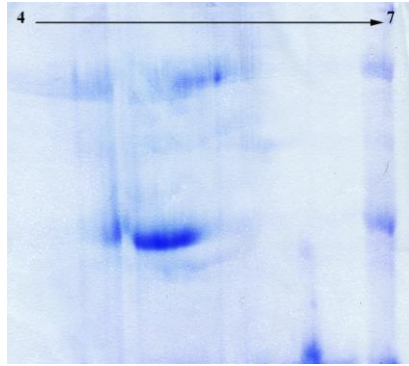


Slika 5.5. 2D elektroforegram izolovane 7S frakcije.



Slika 5.6. 2D elektroforegram izolovane 11S frakcije

Da bi se omogućilo detektovanje pojedinačnih subjedinica, određena je 2D elektroforeza 7S frakcije u opsegu pI 4-7 (Slika 5.7).



Slika 5.7. 2D elektroforegram 7S frakcije region pI 4-7

Sa Slike 5.7, u regionu koji po molekulskoj masi odgovara β i β' podjedinici (opseg masa je bio od 42000-77000), mogu se uočiti 4 relativno dobro razdvojene tačke. Ukoliko se ovi rezultati uporede sa rezultatima Natrajana i saradnika (2005), tačke koje se javljaju u istom regionu, indentifikovali kao β konglicinin β homotrimer. Dodatna tačka koja se javlja u uzorcima Novosađanka 2010 (Tabela 8.2.1) i Valjevka 2010 (Tabela 8.2.2.), ali ne i u uzorku Proteus 2010 (Tabela 8.2.3.) bi mogla predstavljati β' podjedinicu. Ova tačka je većeg intenziteta kod uzorka Novosađanka 2010, koji sadrži veći procenat β' podjedinice i manjeg intenziteta u uzorku Valjevka 2010 (koji sadrži manji procenat β' podjedinice).

Kako razdvajanje uzoraka 2D elektroforezom zavisi od mnoštva faktora (kao što je napomenuto, u prvom redu od prisustva šećernih komponenti), tako se i položaj tačaka na 2D elektroforegramu može menjati. Naime, uzorci sa različitim polipeptidnim sastavom, kao što su uzorci posmatrani u ovom radu mogu, usled razlika u prevoshodno uspešnosti koraka izoelektričnog fokusiranja, pokazati razlike u položaju tačaka. Takođe, merenje intenziteta tačaka u intverznim pikselima je relativno i razlike u intenzitetu pojedinih tačaka ne moraju biti isključivo posledica manje ili veće koncentracije datog proteina, već na njih može uticati i činjenica da i pod istim uslovima, usled razlike u polipeptidnom sastavu, u posmatranim uzorcima neće svi proteini biti pođednako dobro razdvojeni. Još jedan problem jeste denotacija tačaka usled horizontalnog „razvlačenja“. Naime, u uslovima gde se na elektroforegramu javlja visok stepen horizontalnog razvlačenja, biranje tačaka i njihovo poređenje bez informacije o z vrednosti, znatno je otežano.

Pouzdan način da se utvrdi da se ispod date tačke zaista nalazi β' podjedinica 7S jeste isecanje tačke sa gela i njena dalja analiza masenom spektrometrijom.

Za razliku od SDS PAGE koja je veoma reproduktivna metoda, usled blažih denaturacionih uslova koji se moraju koristiti u 2D elektroforezi, a pri kojima ne dolazi do potpune disocijacije polipeptidnih pođedinca, usled izrazite sklonosti sojinih proteina ka asocijaciji, kao i uticaja polipeptidnog sastava, rezultate 2D elektroforeze je teško porediti. Međutim, i pored velikog stepena asocijacije sojinih proteina, horizontalnog i vertikalnog razvlačenja na gelu, rezultati 2D elektroforeze ukazuju da je moguće razlikovati sorte koje se razlikuju u sintezi β i β' podjedinice.

5.3. Rastvorljivost sojinih proteina

Nakon određivanja sadržaja vlage i sadržaja ukupnih i rastvorljivih proteina za date uzorke, dobijeni rezultati predstavljeni su u Tabeli 5. 5:

Tabela 5.5. Sadržaj vlage, ukupnih i rastvorljivih proteina ispitivanih genotipova soje*

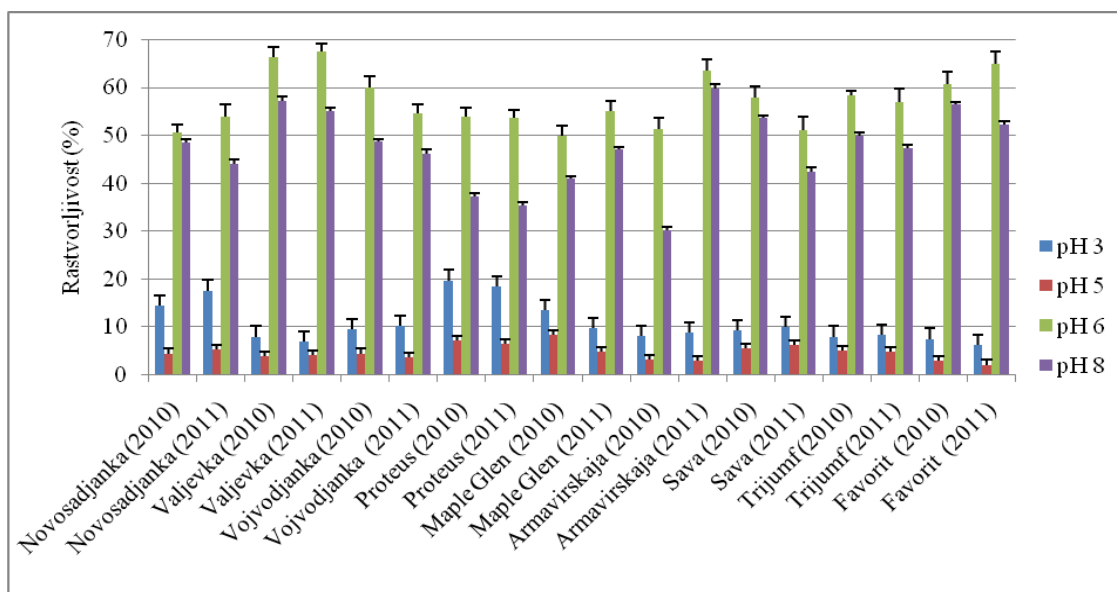
Uzorci	Ukupni proteini (mg/g)	Sadržaj vlage (%)	Rastvorljivi proteini (mg/g)			
			pH	pH	pH	pH
			6	3	5	8
Novosađanka 2010	476.01 ^a	10.06 ^a	238.36 ^{cf}	68.35 ^a	21.3 ^a	195.72 ^a
Novosađanka 2011	375.7 ^{be}	11.32 ^b	195.4 ^a	66.12 ^a	20.1 ^a	169.82 ^b
Valjevka 2010	396.14 ^{cd}	8.44 ^c	263.4 ^b	31.7 ^{bc}	15.4 ^b	219.05 ^c
Valjevka 2011	406.79 ^d	19.88 ^d	273.82 ^{bj}	27.86 ^b	15.1 ^b	231.61 ^d
Vojvođanka 2010	368.32 ^b	10.72 ^{ab}	198.9 ^a	34.82 ^c	16.4 ^c	188.22 ^e
Vojvođanka 2011	351.49 ^e	12.96 ^e	176.93 ^d	35.92 ^c	12.7 ^d	162.99 ^b
Proteus 2010	519.06 ^k	19.60 ^d	265.56 ^b	102.2 ^d	37.3 ^j	192.12 ^a
Proteus 2011	508.04 ^k	15.00 ^f	242.5 ^{cf}	93.22 ^f	32.4 ^k	178.98 ^{be}
Armavirskaja 2010	470.91 ^a	16.74 ^j	244.34 ^c	38.1 ^e	14.9 ^b	189.64 ^{be}
Armavirskaja 2011	427.55 ^f	14.8 ^f	286.28 ^j	37.84 ^e	12.2 ^d	227.4 ^{cd}
Maple Glen 2010	448.18 ^j	12.82 ^e	213.71 ^e	60.23 ^l	37.4 ^e	189.07 ^{ae}
Maple Glen 2011	476.77 ^a	13.68 ^e	271.39 ^b	46.48 ^k	22.9 ^{af}	210.85 ^c
Sava 2010	404.72 ^{cd}	8.32 ^c	234.37 ^{cf}	37.19 ^{ce}	22.5 ^{af}	215.83 ^c
Sava 2011	343.85 ^e	10.11 ^a	179.02 ^d	34.45 ^c	21.3 ^{af}	146.13 ^e
Trijumf 2010	378.10 ^b	10.94 ^{ab}	221.46 ^e	30.09 ^b	18.9 ^c	188.27 ^b
Trijumf 2011	354.03 ^e	13.45 ^e	201.74 ^a	29.4 ^b	17.1 ^c	167.52 ^b
Favorit 2010	381.57 ^b	11.96 ^{be}	230.91 ^f	28.51 ^b	11.4 ^d	199.77 ^a
Favorit 2011	414.78 ^{df}	14.11 ^f	268.79 ^b	25.76 ^j	8.71 ^l	233.88 ^d

*-Isto slovo znači da, po datoj promjenljivoj, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato t testom za nezavisne uzorke pri $p = 0.05$)

Kako se može videti iz Tabele 5.5, sadržaj vlage u uzorcima varirao je od 8.32 % do 19.88 %. Sadržaj ukupnih proteina kretao se od 343.85 mg/g suve mase (kod uzorka Sava 2011) do 476.77 mg/g suve mase (kod uzorka Maple Glen 2011). Sadržaj rastvorljivih

proteina na pH 6 kretao se od 179.02 mg/g suve mase do 286.28 mg/g suve mase. Sadržaj rastvorljivih proteina na pH 3 kretao se od 25.76 mg/g suve mase do 102.2 mg/g suve mase. Sadržaj rastvorljivih proteina na pH 5 kretao se od 8.71 mg/g suve mase do 37.4 mg/g suve mase. Sadržaj rastvorljivih proteina na pH 8 kretao se od 146.13 mg/g suve mase do 233.88 mg/g suve mase.

Rezultati za rastvorljivost proteina na datom pH, prikazani su na Slici 5. 8. Sa Slike 5.8, može se uočiti da svi uzorci pokazuju najveću rastvorljivost na pH 6 i najmanju rastvorljivost na pH 5. Maksimalna rastvorljivost na pH 6 u skladu je sa rezultatima prijavljenim od strane Wolf-a (1970). Minimalna rastvorljivost na pH 5 može se objasniti izoelektričnom precipitacijom podjedinica β konglicinina (Thanh i Shibasaki, 1977). Smanjena rastvorljivost na pH 3 u poređenju sa rastvorljivošću na pH 8 može se objasniti dimerizacijom 7S u 9S do koje dolazi u kiseloj sredini (Zheng i saradnici, 2009). Međutim, s obzirom na to da se na pH 3 11S se nalazi u obliku trimera (Lakemond i saradnici, 2000), ovo može objasniti zašto je rastvorljivost na pH 3 veća nego što bi se očekivalo. Smanjenje rastvorljivosti na pH 8 u poređenju sa rastvorljivošću na pH 6, može se objasniti većim stepenom asocijacije proteina.



Slika 5.8. Rastvorljivost ispitivanih genotipova soje na različitom pH

Na svim pH vrednostima, nađena je pozitivna korelacija između rastvorljivosti i sadržaja rastvorljivih proteina (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Korelacioni koeficijenti između sadržaja rastvorljivih proteina i rastvorljivosti na datom pH*

Rastvorljivost (%)	Rastvorni proteini (mg/g)			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
pH 3	0.62	0.26	-0.14	-0.28
pH 5	0.35	0.44	-0.36	-0.18
pH 6	-0.55	-0.66	0.62	0.38
pH 8	-0.52	-0.23	0.41	0.51

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Može se uočiti da je sadržaj rastvorljivih proteina na pH 3 bio negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 6 i pH 8. Navedene korelacije mogu značiti da su različiti polipetidi iz proteinskog ekstrakta utiču na rastvorljivost pri pH 3, pH 6 i pH 8. To dodatno potkrepljuje nalaze da rastvorljivost na pH 6 i pH 8 prevashodno zavisi od sadržaja 7S podjedinica, dok rastvorljivost na pH 3 zavisi od podjedinica glicinina. Takođe, sadržaj rastvorljivih proteina na pH 5 bio je negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 6, što je i očekivan rezultat, jer je rastvorljivost na pH 6 zavisila od sadržaja α' , α i β podjedinice, koje su na pH 5 istaložene i ne čine deo rastvorljivih proteina.

Ukoliko se posmatra korelacija pojedinačnih subjedinica sa sadržajem ukupnih proteina prisutnih u semenu, dobijaju se rezultati prikazani u Tabeli 5.7.

Tabela 5.7. Korelacioni koeficijenti sadržaja podjedinica 7S i 11S sa sadržajem ukupnih proteina*

Sadržaj podjedinice (%)	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
Ukupni proteini (mg/g suve mase)	0.51	0.4	0.11	-0.49	0.56	0.33	0.41	0.38

*Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Interesantno, slično kao u slučaju korelacije sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina, α' podjedinica pokazuje veći efekat na sadržaj ukupnih proteina od α i β podjedinice. Međutim, za razliku od efekta α' podjedinice, povećanje sadržaja β' podjedinice uslovalo je smanjenje ukupnih proteina u semenu. Ovi rezultati bi mogli da budu dodatno objašnjenje zašto visokoproteinske sorte soje sadrže nižu količinu β' podjedinice. Međutim, suprotno rezultatima Fehr-a i saradnika (2003) nije nađena negativna korelacija između sadržaja β podjedinice i ukupnih proteina. Kiseli polipeptidi glicinina pokazivali su, kao i u slučaju ukupnih rastvorljivih proteina mnogo veći efekat na povećanje sadržaja ukupnih proteina od baznih polipeptida.

U Tabeli 5.8, prikazani su koeficijenti korelacije između podjedinica 7S i 11S i rastvorljivosti na datom pH. Može se videti da su genotipovi sa većim sadržajem α i α' podjedinice pokazivali bolju rastvorljivost na pH 6 i pH 8. Ovi rezultati su u skadu sa rezultatima Utsumi-a i saradnika (2002) i mogu se objasniti prisustvom kiselih, polarnih ekstenzionih regiona na α i α' . U isto vreme, sadržaj α i α' bio je negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 5, što je posledica njihove izoelektične precipitacije na datoj pH vrednosti. Sadržaj β' podjedinice na pH 6 i pH 8 bio je negativno korelisan sa rastvorljivošću. Ovakva negativna korelacija može biti objašnjena nedostatkom ekstenzionih regiona i prisustvom većeg broja hidrofobnih aminokiselinskih ostataka. Sadržaj β podjedinice takođe je bio negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 6 i pH 8, ali ove korelacije nisu bile statistički značajne. Kao i za β' podjedinicu, moguće objašnjenje negativne korelacije je prisustvo hidrofobnih aminokiselinskih ostataka u regionu srži (Maruyama i saradnici, 2002). Odnos 11S/7S pokazao je negativnu korelaciju sa

rastvorljivošću na pH 6 i pH 8 što se može objasniti rigidnijom strukturom glicinina u poređenju sa β konglicininom u neutralnoj i slabo baznoj sredini. Međutim, odnos 11S/7S bio je pozitivno korelisan sa rastvorljivošću na pH 3. Ova pozitivna korelacija može se objasniti dobrom rastvorljivošću kiselih polipeptida u pH opsegu 2.0-4.0 i 6.5-12.0 (Diaz i saradnici, 2003). Takva rastvorljivost može objasniti i postojanje pozitivnih korelacija između sadržaja kiselih polipeptida i rastvorljivosti na pH 3. Kako su bazni polipeptidi slabo rastvorljivi u opsegu pH 3-10 (Santiago i saradnici, 1998), povećan odnos kiselih/baznim polipeptidima je bio pozitivno korelisan sa rastvorljivošću na pH 3. Upravo slaba rastvorljivost baznih polipeptida može da objasni zašto je sadržaj baznih polipeptida imao znatno jači efekat na smanjenje rastvorljivosti na pH 6 u poređenju sa sadržajem kiselih polipeptida.

Tabela 5. 8. Koeficijenti korelacije između podjedinica 7S i 11S i rastvorljivosti na datom pH*

Rastvorljivost (%)	Sadržaj podjedinice (%)							
	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
pH 3	-0.33	-0.47	0.23	0.31	0.67	0.43	0.62	0.65
pH 5	-0.67	-0.7	0.21	0.34	0.49	-0.32	0.42	0.48
pH 6	0.89	0.91	-0.52	-0.71	-0.47	-0.63	-0.94	-0.68
pH 8	0.93	0.95	-0.41	-0.78	0.29	-0.41	-0.97	-0.32

*Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Rezultati ANOVA testa pokazuju negativnu korelaciju između sadržaja $\alpha + \alpha' + \beta$ i rastvorljivosti na pH 5 na $\alpha = 0.05$ ($F(1, 17) = 5.68, p = 0.0027$). Međutim, rezultati ANOVA testa pokazali su da postoji pozitivna korelacija između sadržaja kiselih + baznih polipeptida i rastvorljivosti na pH 3, tako da je njihov zajednički efekat statistički značajan na $\alpha = 0.05$ ($F(3, 35) = 3.17, p = 0.0035$).

Ukoliko se posmatraju efekti sadržaja 7S i 11S na rastvorljivost pri promeni pH, uočava se da su genotipovi sa većim sadržajem glicinina pokazivali bolju rastvorljivost na pH 3 i pH 5 i smanjenu rastvorljivost na pH 6 i pH 8 (Tabela 5.9). Obrnuto je važno za genotipove sa većim sadržajem β konglicinina.

Tabela 5.9. Koeficijenti koralacije između sadržaja 7S i 11S i rastvorljivosti na datom pH*

Rastvorljivost (%)	Sadržaj proteina (%)	
	7S	11S
pH 3	-0.32	0.86
pH 5	-0.65	0.42
pH 6	0.93	-0.79
pH 8	0.96	-0.82

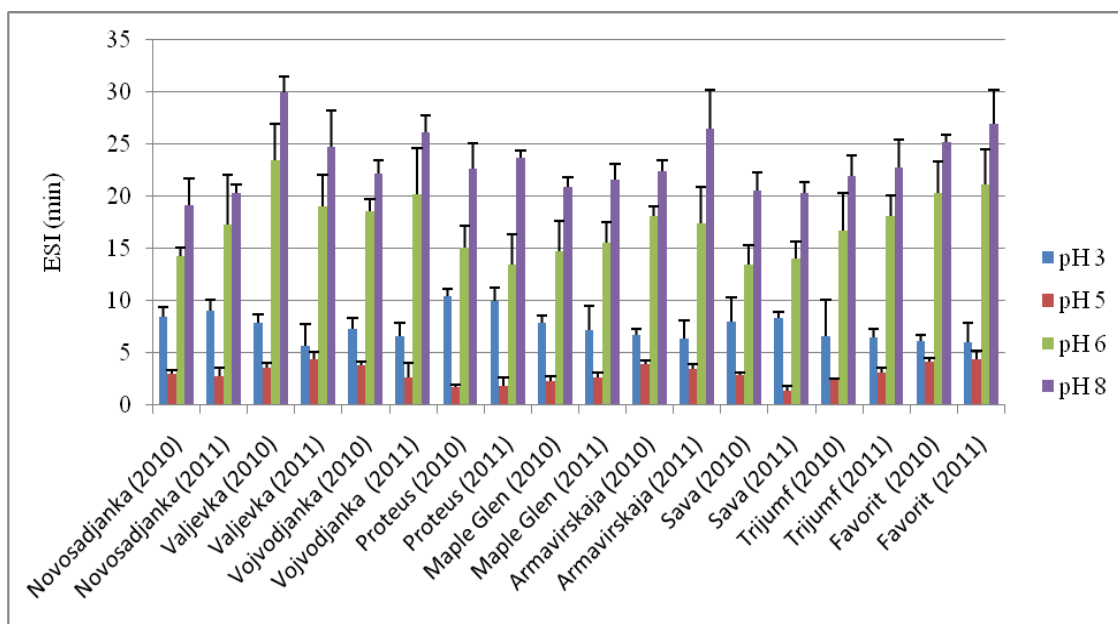
*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Promene u rastvorljivosti na različitom pH mogu se objasniti pomoću 3 glavne komponente. Prva glavna komponenta (koja objašnjava 50.9 % ukupne varijabilnosti) korelisana je sa rastvorljivošću na pH 3, pH 5 i pH 6, ali kako je korelacija sa rastvorljivošću na pH 6 negativna, a korelacije sa rastvorljivošću na pH 3 i pH 5 pozitivne, može se očekivati da će uzorci sa većom rastvorljivošću na pH 6 pokazivati manju rastvorljivost na pH 3 i pH 5. Rastvorljivost na pH 8 korelisana je sa drugom glavnom komponentom (koja objašnjava 16.2 % ukupne varijabilnosti) tako da se može smatrati da varira nezavisno od rastvorljivosti na pH 6, pH 3 i pH 5. Takođe kako je evidentno da su promene u rastvorljivosti na pH 3 praćene promenama u odnosu 11S/7S, može se zaključiti sa je odnos 11S/7S glavni faktor koji utiče na rastvorljivost na pH 3.

5.4. Emulgujuće osobine sojinih proteina

5.4.1. Stabilnost emulzije

Kako se može videti sa Slike 5.9, ESI vrednosti za sve uzorke bile su najmanje na pH 5. Najviše vrednosti za ESI uzorci su imali na pH 8, dok su vrednosti ESI na pH 6 bile više u poređenju sa vrednostima ESI na pH 3.



Slika 5.9. ESI vrednosti ispitivanih genotipova pri promeni pH

Kako bi se utvrdilo da li su ovakvi rezultati posledica promene rastvorljivosti, određene su korelacije između rastvorljivosti i ESI vrednosti na datom pH. Rezultati su prikazani u Tabeli 5.10. Kako se može primetiti, vrednosti ESI pokazuju korelaciju sa rastvorljivošću, na svim pH, osim na pH 5. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili Felix i saradnici (1990) i potvrđuju stanovište Chove-a i saradnika (2007) da je rastvorljivost glavni faktor koji utiče na povećanje ESI. Moguće objašnjenje za negativnu korelaciju između ESI i rastvorljivosti na pH 5 jeste da i u sastav emulzije na pH 5 ulaze isti polipeptidi koji stabilizuju emulziju na pH 6 i pH 8. S obzirom na vezu između rastvorljivosti na datim pH vrednostima i sadržaja 7S, razumno je pretpostaviti da će

podjedinice 7S biti uključene u stabilizaciju emulzije na datim pH vrednostima. Kako na pH 5 dolazi do izoelektrične precipitacije β konglicinina, polipeptidi nisu prisutni u rastvoru, te samim tim stabilnost emulzije opada.

Tabela 10: Koeficijenti korelacije između rastvorljivosti i ESI vrednosti na datom pH*

Rastvorljivost (%)	ESI			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
pH 3	0.75	-0.61	-0.66	-0.68
pH 5	0.54	-0.79	-0.73	-0.72
pH 6	-0.74	0.85	0.85	0.84
pH 8	-0.51	0.50	0.47	0.54

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Iz Tabele 5.10 takođe se s obzirom na smer korelacija, može pretpostaviti da su različiti proteini bili različito zastupljeni u formiranju emulzije na datom pH. Kako je na rastvorljivost na pH 3 najveći uticaj imao sadržaj kiselih polipeptida glicinina, može se pretpostaviti da će njihov sadržaj biti glavni faktor koji će određivati stabilnost emulzije na pH 3. Suprotno tome, na pH 8 i pH 6 očekuje se da će α i α' 7S imati ključnu ulogu u stabilizaciji emulzije na ovim pH vrednostima. Određivanje koeficijenata korelacije između sadržaja pojedinačnih podjedinica i ESI vrednosti na datom pH, potvrdilo je ove pretpostavke (Tabela 5.11).

Tabela 5. 11: Koeficijenti korelacije između sadržaja podjedinica 7S i 11S i vrednosti ESI*

ESI	Sadržaj podjedinice (%)							
	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
pH 3	-0.41	-0.55	0.32	0.43	0.68	0.43	0.44	0.61
pH 5	-0.48	-0.52	0.29	0.38	0.32	-0.34	0.26	0.27
pH 6	0.85	0.92	-0.31	-0.61	-0.36	-0.1	-0.92	-0.42
pH 8	0.91	0.97	-0.42	-0.65	-0.32	-0.18	-0.88	-0.36

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Odnos 11S/7S je bio negativno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8 (Tabela 5.11) što je u saglasnosti sa rezultatima koje su Pešić i saradnici (2005) i može se objasniti smanjenom rastvorljivošću glicinina na ovim pH vrednostima. Međutim, na pH 3 sadržaj kiselih polipeptida, kao i sadržaj baznih polipeptida, kao i odnos kiselih/baznim polipeptidima su bili pozitivno korelisani sa ESI vrednostima. Ovi rezultati mogu biti objašnjeni disocijacijom disulfidnih veza između kiselih i baznih polipeptida, što vodi povećanju površinske hidrofobnosti. Sadržaj α i α' podjedinica bio je pozitivno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8. Tandag i saradnici (2005) takođe su našli da je sadržaj α' subjedinice pozitivno korelisan sa ESI. Međutim, verovatno usled smanjene rastvorljivosti sadržaj β podjedinice bio je negativno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8, iako date korelacije nisu bile statistički značajne. Ali, statistički značajna negativna korelacija je nađena između sadržaja β' podjedinice i vrednosti ESI na pH 6 i pH 8. Različiti efekti α i α' podjedinice u poređenju sa efektima β i β' objašnjava se većom fleksibilnošću ekstenzionih regiona α i α' (u poređenju sa rigidnim regionom kore u β i β' podjedinici), kao i glikozilaciji koja omogućava bolji kontakt sa vodenom fazom (Maruyama i saradnici 1999, 2000 i 2004).

Zajednički efekat subjedinica β konglicinina ($\alpha + \alpha' + \beta$) bio je pozitivno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8 ($F(3, 57) = 44.05, p = 0.0015, p < 0.05$).

Dakle, s obzirom na vezu između rastvorljivosti i ESI vrednosti dobijeni rezultati za ESI mogu se objasniti na sledeći način: najniže vrednosti ESI na pH 5 posledica su izoelektrične precipitacije 7S. Kao rezultat smanjenja rastvorljivosti i promene veličine čestica (Mo i saradnici, 2011), ESI na pH 3 je niži u poređenju sa ESI na pH 8. Verovatno objašnjenje za povećan ESI na pH 8 u poređenju sa ESI na pH 6 jeste u tome što promenom pH ka baznijim vrednostima, dolazi do formiranja "stopljene globule" (Jiang i saradnici, 2009).

Ukoliko se vrednosti za ESI dovedu u korelaciju sa ukupnim proteinima, dobijaju se rezultati prikazani u Tabeli 5.12. Za razliku od rezultata prijavljenih od strane Pešić i saradnika (2005), gde odnos monomernog ka dimernom glicininu uslovljava pozitivnu korelaciju između sadržaja ukupnih proteina i ESI vrednosti, kod ispitivanih genotipova nije nađena takva zavisnost.

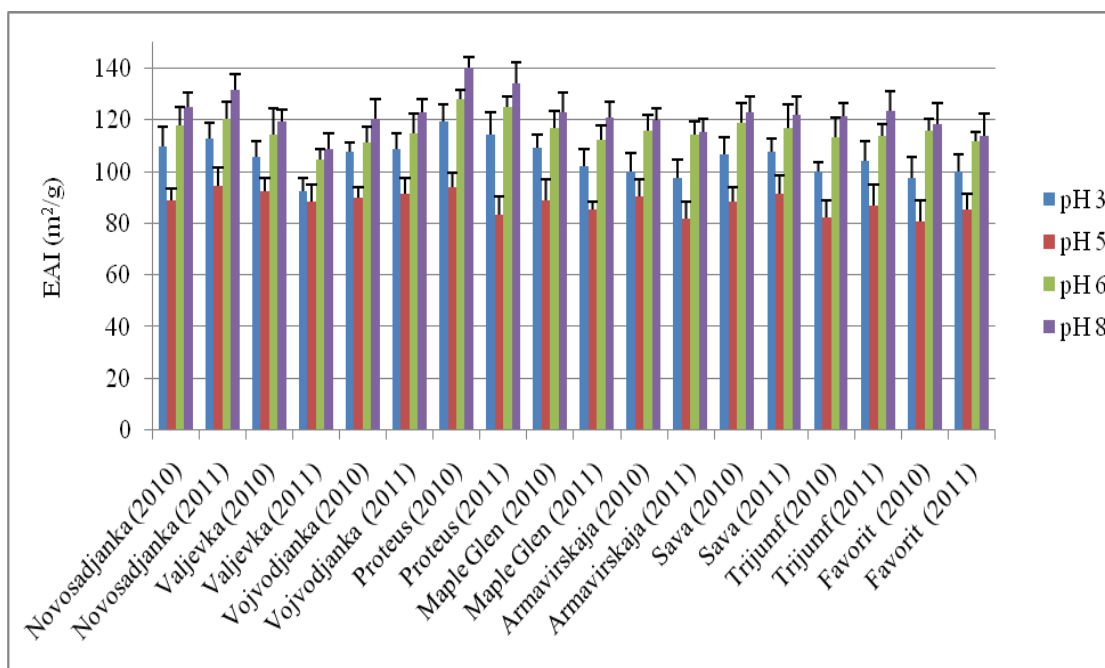
Tabela 5. 12: Korelacioni koeficijenti između vrednosti ESI i sadržaja ukupnih proteina*

ESI	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
Ukupni proteini (mg/g suve mase)	0.41	-0.29	-0.25	-0.39

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

5.4.2. Emulgujuća aktivnost

Slično kao i za ESI, EAI vrednosti su bile najmanje na pH 5 i najveće na pH 8 (Slika 5.10). Premda bi povećanje hidrofobnosti do koga je došlo denaturacijom 7S na pH 5 trebalo da dovede do nešto viših vrednosti EAI na pH 5, verovatno su drugi faktori, kao što su protein-protein interakcije, uslovile niže vrednosti EAI na pH 5 od očekivanih.



Slika 5.10. EAI vrednosti ispitivanih genotipova na različitom pH

Ponovo je radi objašnjenja potražena zavisnost sa rastvorljivošću (Tabela 5.13).

Tabela 13: Koeficijenti korelacije između rastvorljivosti i EAI vrednosti na datom pH*

Rastvorljivost (%)	EAI			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
pH 3	0.63	0.08	0.62	0.66
pH 5	0.51	-0.05	0.36	0.39
pH 6	-0.64	0.08	-0.69	-0.59
pH 8	-0.41	-0.1	-0.43	-0.62

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Za razliku od ESI, vrednosti EAI bile su negativno korelisane sa rastvorljivošćuna pH 6 i pH 8 i pozitivno korelisane sa rastvorljivošću proteina na pH 3. Objašnjenje za nedostatak korelacije na pH 5 može biti u maloj ukupnoj koncentraciji proteina, što dovodi i do lakog narušavanja strukture emulzije. Pošto su glavni faktori koji su određivali rastvorljivost na pH 3 bili sadržaj kiselih polipeptida i odnos 11S/7S (Tabela 5.8), a na pH 6 i pH 8 sadržaj α i α' (Tabela 5.8), tj. sadržaj 7S (Tabela 5.9), pretpostavljeno je da različite proteinske frakcije utiču na stabilnost i na aktivnost emulzije i da će primarni efekat na aktivnost emulzije imati odnos 11S/7S i sadržaj kiselih polipeptida. Rezultati korelacione matrice (Tabela 5.14) potvrdili su ovu pretpostavku.

Tabela 5.14: Koeficijenti korelacije između sadržaja podjedinica 7S i 11S i vrednosti EAI*

EAI	Sadržaj podjedinice (%)							
	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
pH 3	-0.26	-0.34	0.22	0.33	0.69	0.58	0.91	0.61
pH 5	-0.34	-0.45	0.14	0.21	0.43	0.28	0.77	0.42
pH 6	-0.78	-0.86	0.33	0.47	0.53	0.36	0.96	0.51
pH 8	-0.82	-0.9	0.27	0.39	0.82	0.3	0.97	0.73

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Kao što je pretpostavljeno, za razliku od ESI vrednosti, EAI vrednosti su pokazale pozitivnu korelaciju sa odnosom 11S/7S na svim ispitivanim pH vrednostima. Ovi rezultati

su u skladu sa rezultatima koje su prijavili Pešić i saradnici (2005) i Santiago i saradnici (1998) i potvrđuju nalaze da genotipovi sa nižim sadržajem 7S imaju više vrednosti za EAI. Ovi rezultati dodatno su podržani postojanjem negativnih korelacija između sadržaja α i α' subjedinica sa vrednostima EAI na pH 6 i pH 8. Takođe, ANOVA test je pokazao da je zajednički uticaj $\alpha+\alpha+\beta$ subjedinice bio negativno korelisan sa vrednostima EAI na pH 5, pH 6 i pH 8 ($F(1,17) = 6.34, p = 0.05$). Na pH 6, sadržaj β' podjedinice bio je pozitivno korelisan sa EAI na pH 6 i pH 8, ali samo je na pH 6 korelacija bila statistički značajna. Sadržaj β podjedinice takođe je bio pozitivno korelisan sa EAI na pH 6 i pH 8, premda te korelacije nisu bile statistički značajne pri nivou značajnosti $p = 0.05$. Navedeno pokazuje da povećanje hidrofobnosti igra značajniju ulogu u aktivnosti, nego u stabilnosti emulzije, što odgovara hipotezi Moline i saradnika (2001). Pozitivna korelacija je nađena između sadržaja kiselih polipeptida, odnosa kiselih i baznih polipeptida, kao i zajedničkog sadržaja kiselih i baznih polipeptida i vrednosti EAI na pH 3. Ovakva pozitivna korelacija je očekivana kada se ima u vidu efekat kiselih subjedinica na rastvorljivost na pH 3. Pozitivna korelacija je takođe nađena između sadržaja kiselih polipeptida i vrednosti EAI na pH 6 i na 8. Ovi rezultati se mogu objasniti promenom forme 11S usled promene pH. Takve promene vode povećanju hidrofobnosti na interfaznoj površini (Chove, Grandson i Lewis, 2007). Takođe, rezultati ukazuju da kiseli polipeptidi pokazuju više EAI vrednosti u poređenju sa glicininom, što je u skladu sa rezultatima Yuan-a i saradnika (2009).

Kako bi se potvrdilo da različiti faktori deluju na aktivnost i na stabilnost emulzije, nađeni su korelacioni koeficijenti između EAI i ESI vrednosti na ispitivanim pH (Tabela 5.15). Iz tabele se može videti da je negativna korelacija nađena između vrednosti ESI i EAI na pH 6 i pH 8, dok je pozitivna korelacija nađena između vrednosti ESI i EAI na pH 3. Ovakava pozitivna korelacija na pH 3 ima smisla, jer su vrednosti i ESI i EAI na pH 3 zavisne od sadržaja kiselih polipeptida i odnosa 11S/7S.

Tabela 15: Korelacioni koeficijenti između ESI i EAI vrednosti na datom pH*

ESI	EAI			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
pH 3	0.75	-0.37	0.27	0.41
pH 5	0.26	0.24	0.11	0.21
pH 6	-0.36	0.28	-0.53	-0.39
pH 8	-0.35	0.31	-0.39	-0.49

*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Kako nije nađena zavisnost između sadržaja ukupnih proteina i stabilnosti emulzije, pokušano je da se utvrdi da li takva zavisnost postoji u slučaju aktivnosti emulzije (Tabela 5.16). Kao što se može videti iz Tabele 16, takva zavisnost je zaista nađena u slučaju vrednosti EAI na pH 6 i EAI na pH 8. Kako su sadržaj kiselih polipeptida, kao i sadržaj glicina bio pozitivno korelisan sa sadržajem ukupnih proteina (Tabela 5.7), a u isto vreme pokazao pozitivnu korelaciju sa EAI na pH 6 i EAI na pH 8 (Tabela 5.14), ovakva zavisnost može se pripisati uticaju sadržaja kiselih polipeptida.

Tabela 5.16: Korelacioni koeficijenti između vrednosti EAI i sadržaja ukupnih proteina*

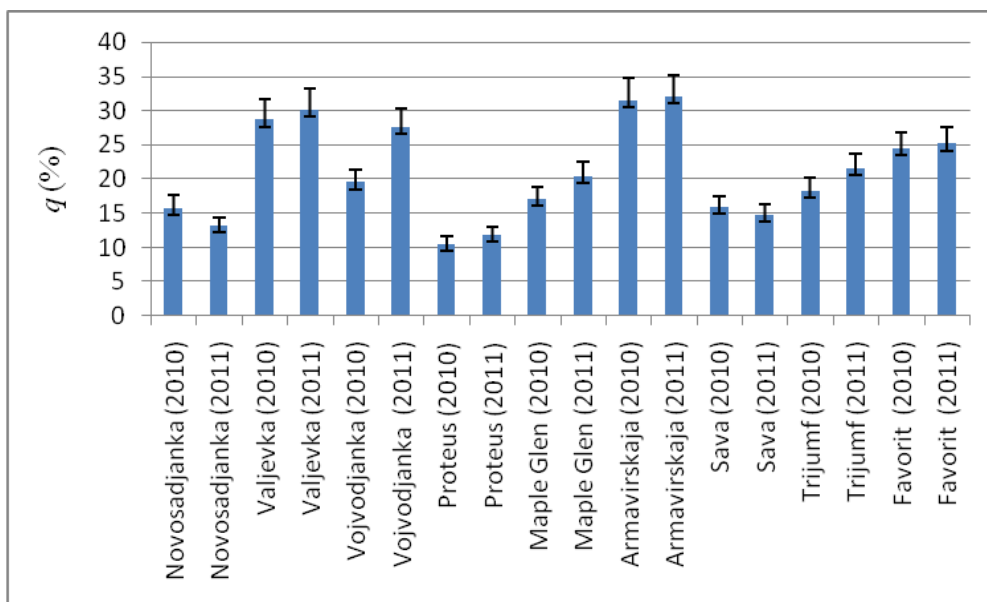
EAI	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
Ukupni proteini (mg/g suve mase)	0.36	0.07	0.48	0.53

*Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$

Tri glavne komponente utiču na stabilnost emulzije, aktivnost emulzije i rastvorljivost. Prva glavna komponenta (koja objašnjava 62.7 % ukupne varijabilnosti) je korelisana sa rastvorljivošću i ESI vrednostima na svim pH, dok su vrednosti EAI korelisane sa drugom glavnom komponentom. Usled jačine i smera njihove korelacije sa glavnim komponentama, sledeće karakteritike kovariraju u istom smeru: ESI i rastvorljivost na pH 3, ESI i rastvorljivost na pH 6 i ESI i rastvorljivost na pH 8. Navedeno ukazuje na pozitivnu korelaciju između rastvorljivosti i stabilnosti emulzije. Suprotno tome, smanjenje rastvorljivosti izaziva povećanje emulgujuće aktivnosti.

5.5. Reološke osobine sojinih proteina

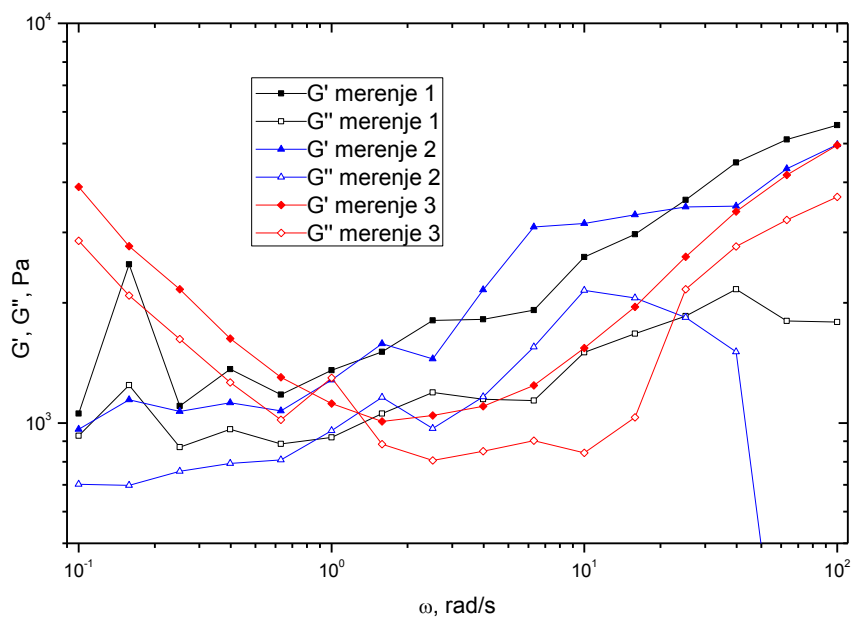
Kako bi se dobili poredivi rezultati, tj. da bi se postiglo da ukupna koncentracija proteina u gelu bude uniformna, najpre su određeni stepeni bubrenja gelova (Slika 5. 11).



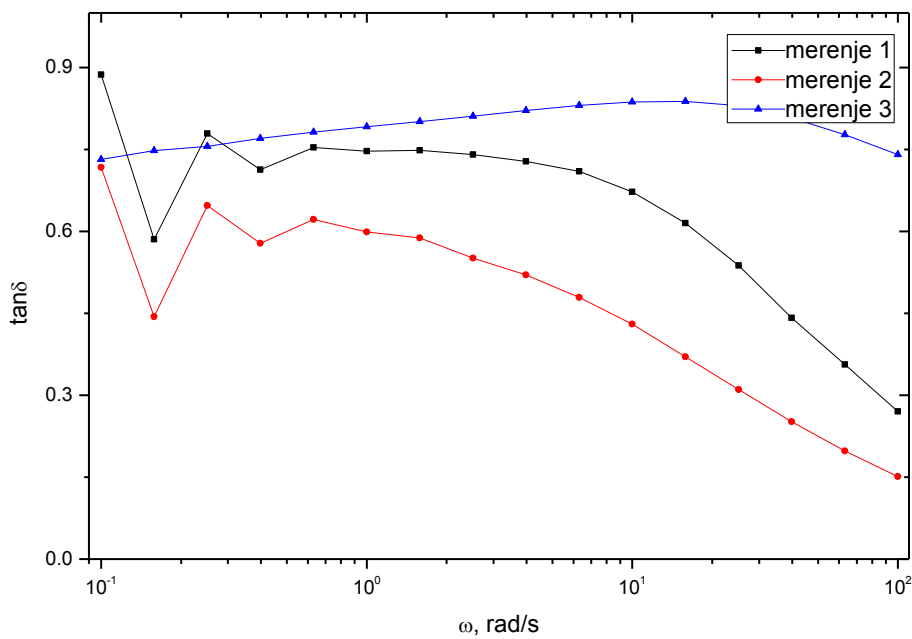
Slika 5.10. Stepeni bubrenja (q) proteinskih gelova za ispitivane uzorke

Kao što se može videti sa Slike 5.10, stepeni bubrenja veoma su varirali među uzorcima i kretali su se u opsegu 13.22 % - 30.14 %. Navedeno ukazuje na različit stepen umreženosti, tj. na varijacije u poroznosti gelova, što je u skladu sa rezultatima koje su prijavili Renkema i saradnici (2004). Kako bi se potvrdila pretpostavka da će gelovi sa većim stepenom bubrenja imati "lošije" reološke osobine, merene su vrednosti za modul kutosti (G'), modul elastičnosti (G''), kao vrednosti tangensa ugla mehaničkih gubitaka ($\tan \delta$) u opsegu frekvencije 0.1-100 rad/s.

Radi ilustracije, na Slici 5.11 i Slici 5.12, prikazana su merenja vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Valjevka (2010) koja je dao "meke" gelove i uzorka Proteus (2010) koji je dao „čvrste“ gelove.

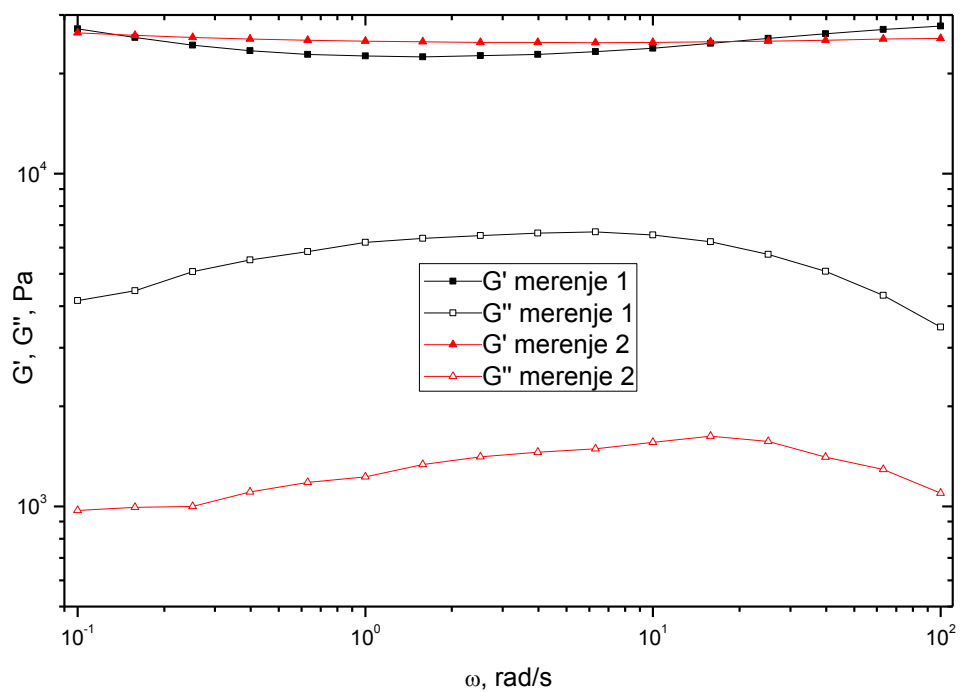


A

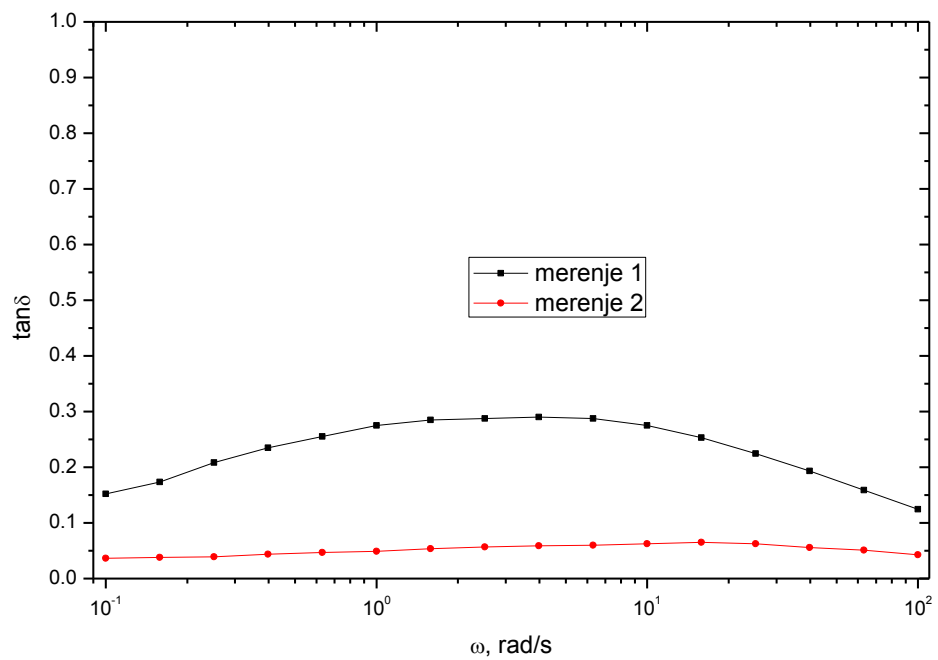


B

Slika 5.11: Vrednosti G' , G'' (A) i $\tan \delta$ (B) za uzorak Valjevka 2010



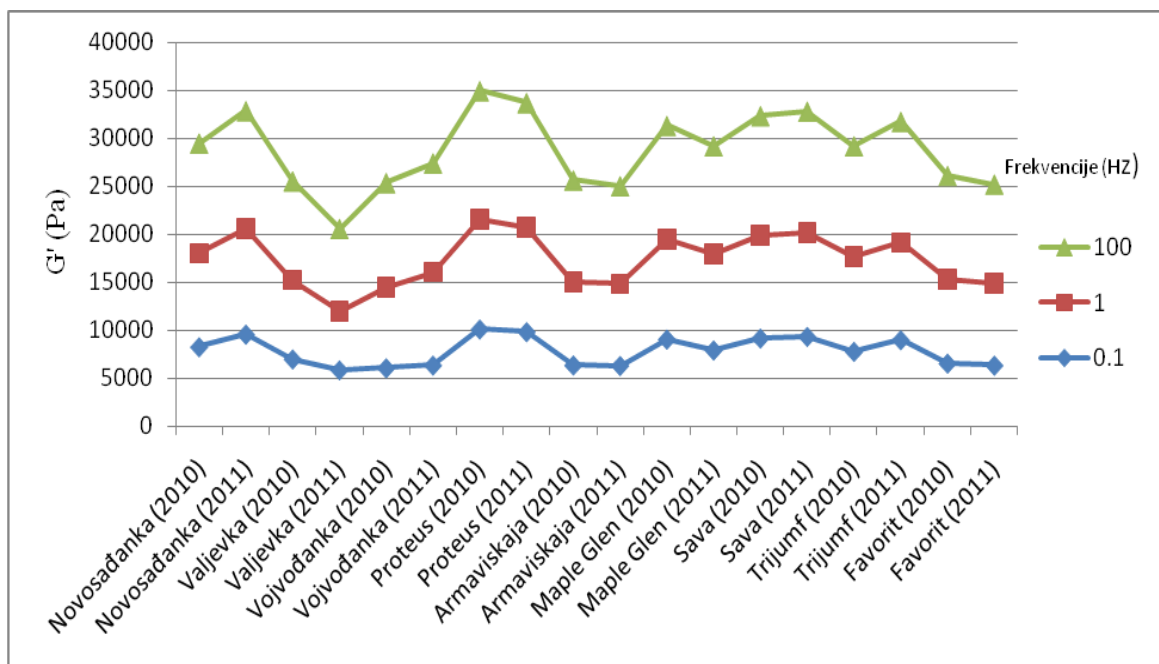
A



B

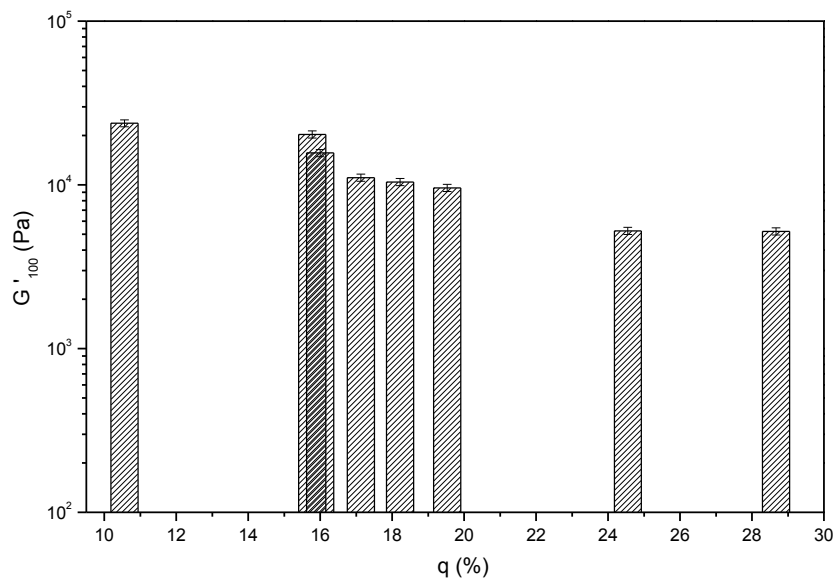
Slika 5.12: Vrednosti G' , G'' (A) i $\tan \delta$ (B) za tri merenja za uzorak Proteus 2010

Kako se može videti sa Slika 5.11 i 5.12 vrednosti za G' su manje, tj. vrednosti za G'' (i konsekvntno tan δ) su više za uzorak koji daje “mekše” gelove, što znači da se “mekši” gelovi karakterišu većom viskoznošću. Međutim, pored ovih, očekivanih, rezultata može se uočiti da su u slučaju "čvršćih" gelova variranja za vrednosti i G' i G'' znatno manja nego u slučaju "mekših" gelova. Ovakvi rezultati upućuju na činjenicu da kod "mekših" gelova dolazi do formiranja neuniformne mreže, tj. do stvaranja konglomerata u gelu. Ovakvi rezultati u skladu su sa rezultatima dobijenim od strane Renkema-e i saradnika (2000, 2004). Ukoliko se prihvate nalazi Renkeme da gelovi koji pokazuju veću viskoznost takođe imaju i veći sadržaj β konglicinina, to dalje znači da bi morala postojati korelacija između pođediničnog sastava 7S i 11S sa svojstvima gela. Kako bi se kroz korelacije potvrdila ili opovrgla ovakva pretpostavka, najpre je bilo potrebno odlučiti na kojoj frekvenciji će se uzimati vrednosti G' za uspostavljanje korelacija. Kako se može videti sa Slike 5.13, vrednosti G' pokazivale su najveće varijacije među uzorcima na frekvenciji 100 rad/s. Stoga su srednje vrednosti G' (označene u daljem tekstu G'_{100}) uzimane za uspostavljanje korelacija.

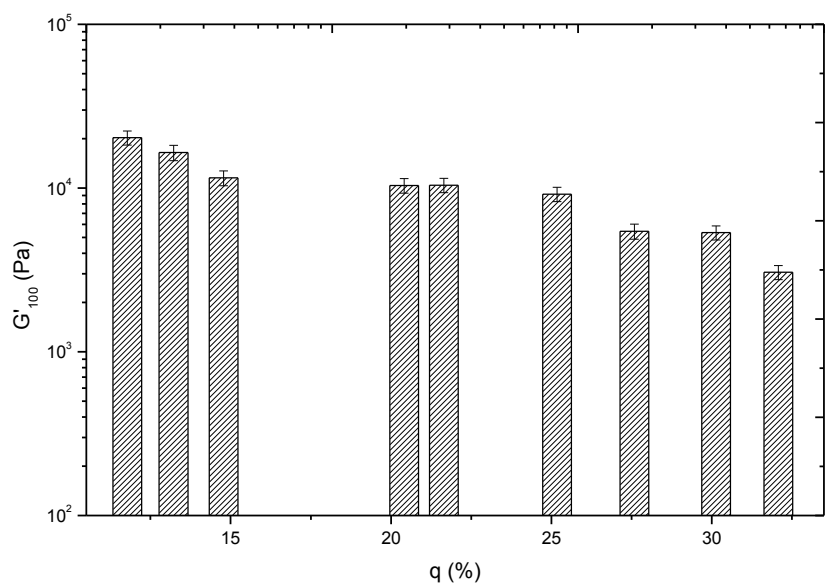


Slika 5.13: Srednje vrednosti za G' za ispitivane uzorke u opsegu frekvencija 0.1-100 rad/s

Ukoliko se sada razmataju vrednosti stepena bubrenja i G'_{100} za dati proteinski gel, dobijaju se rezultati prikazani na Slici 5.14:



A



B

Slika 5.14: Zavisnost vrednosti G'_{100} i stepena bubrenja (q). A- rezultati za uzorke iz 2010; B- rezultati za uzorke iz 2011

Sa Slike 5.14 može se uočiti dagelovi sa nižim stepenom bubrenja imaju veće vrednosti G'_{100} . Da bi se objasnila zavisnost stepena bubrenja od sastava uzorka, urađene su korelacije sa pojedinačnim podjedinicama 7S i 11S (Tabela 5.17)

Tabela 5.17: Koeficijenti korelacije između sadržaja podjedinica 7S i 11S i vrednosti q^*

Sadržaj podjedinice (%)	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
q (%)	0.57	0.46	-0.23	-0.31	-0.65	-0.26	-0.78	-0.61

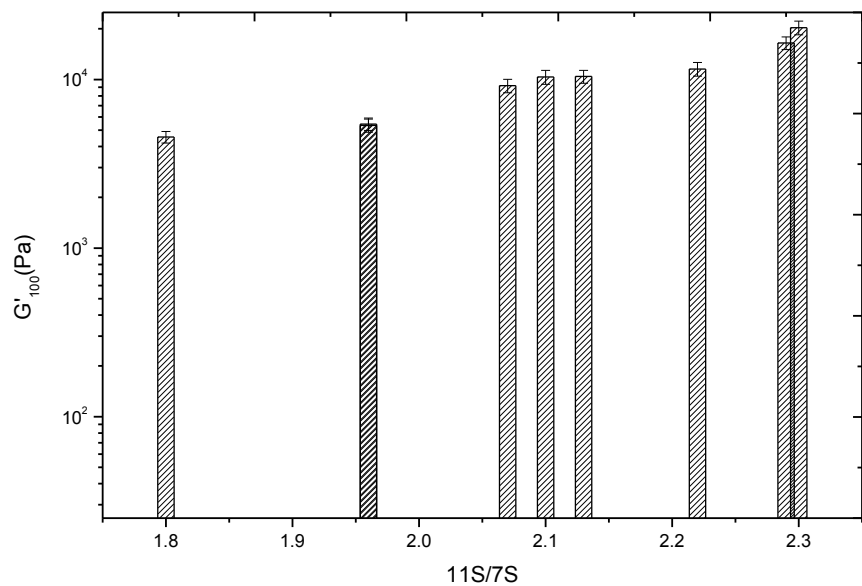
*-Boldovane vrednosti su bile statistički značajne pri $p < 0.05$, K/B-odnos kiselih prema baznim polipeptidima

Može se zaključiti da se vrednosti stepena bubrenja mogu objasniti kroz postojanje pozitivne korelacije između sadržaja α' i α i stepena bubrenja. α' i α se karakterišu visokim sadržajem polarnih aminokiselina (Zheng i saradnici, 2009) i glikozidnih ostataka, što olakšava adsorpciju vode. Ova zavisnost je još izraženija ukoliko se posmatra zajednički efekat sadržaja α' i α subjedinice i stepena bubrenja ($F(2,51) = 88.06$, $p = 0.0019$, $p < 0.05$). Stepenn bubrenja bio je negativno korelisan sa sadržajem kiselih polipeptida, odnosno 11S/7S, kao i odnosom kiselih/baznih polipeptida. Zbog svoje rigidnije strukture i veće nepolarosti, gelovi sa visokim odnosom 11S/7S ne učestvuju u adsorpciji vode i imaju znatno manje stepene bubrenja.

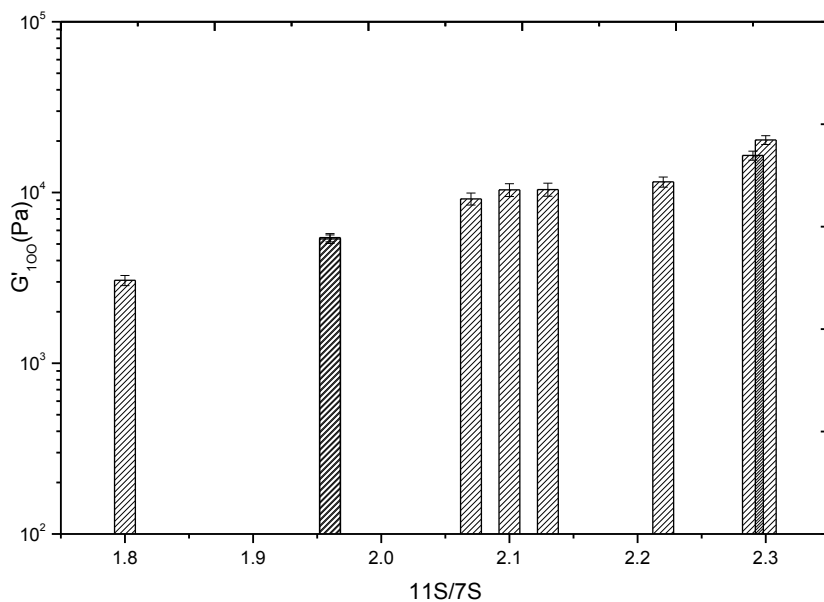
S obzirom da je sadržaj kiselih polipeptida, kao i odnos 11S/7S i odnos K/B bili negativno korelisani sa stepenom bubrenja, očekivano je da će ove vrednosti biti u pozitivnoj korelaciji sa G'_{100} . Zavisnosti vrednosti G'_{100} od odnosa 11S/7S i odnosa kiselih prema baznim polipeptidima prikazani su na Slikama 5. 15 i 5.16.

Sa Slike 5.15, može se videti da gelovi sa višim odnosom 11S/7S grade uniformne mreže sa malim porama i pokazuju veće vrednosti G'_{100} . Promena odnosa 11S/7S imala je najveći uticaj na vrednosti G'_{100} . Povećanje odnosa 11S/7S za 71 % rezultuje u povećanju G'_{100} za 220 %. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima koje su dobili Renkema i saradnici (2000) i Varzakas i saradnici (2011). Kao što su Renkema i saradnici (2000) objavili, na pH vrednosti na kojoj su gelovi pripremani (pH 6.8) prevashodno je 11S uključen u proces geliranja i nastali gelovi su stabilizovani disulfidnim vezama (Renkema i saradnici, 2004).

Pri datoj jonskoj sili, β konglicinin postoji u rastvoru kao smeša monomera (7S) i dimera (9S), što može rezultovati u stvaranju β -konglicinskih klastera koji sprečavaju formiranje uniformne mreže.



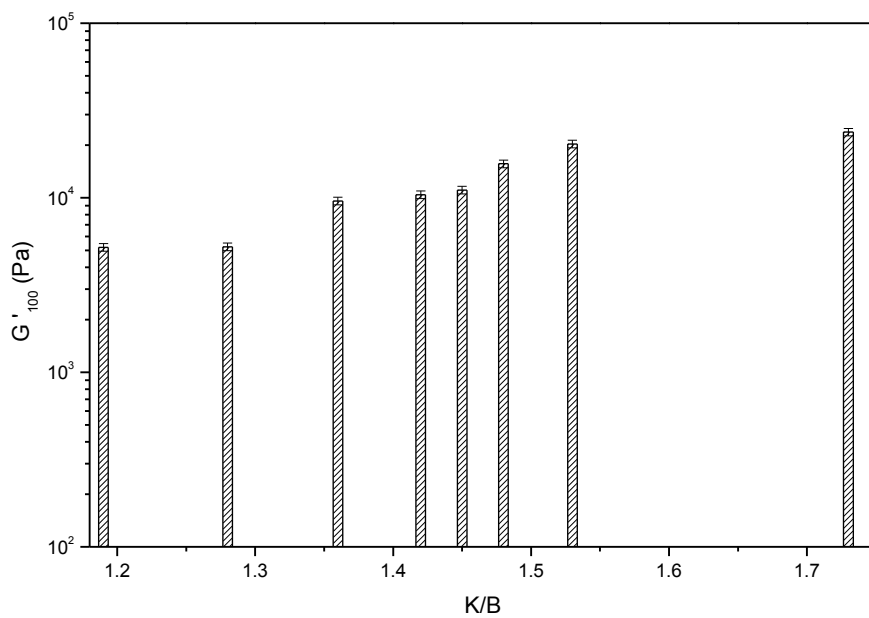
A



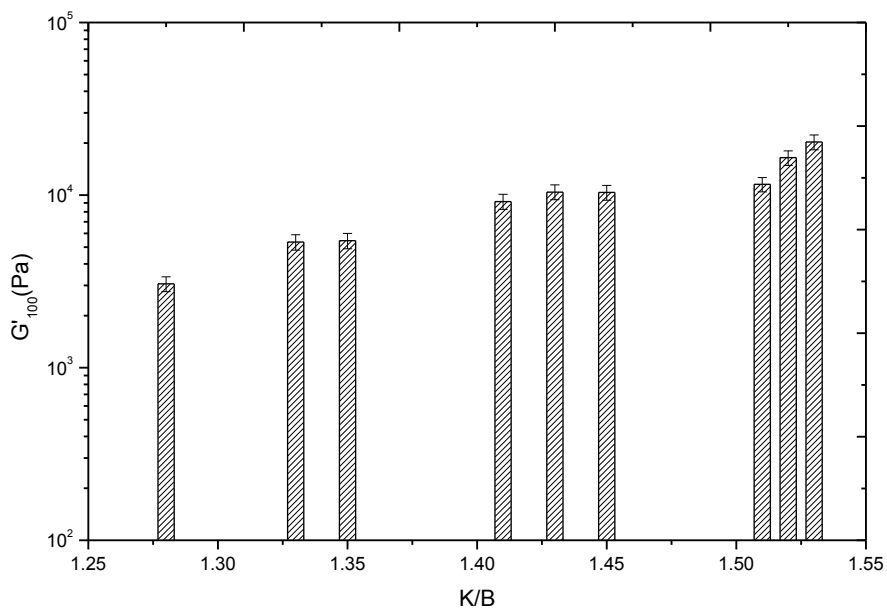
B

Slika 5.15: Zavisnost G'_{100} od odnosa 11S/7S. A- rezultati za uzorke iz 2010, B-rezultati za uzorke iz 2011

Gelovi sa visokim odnosom kiselih/baznih polipeptida (Slika 5.16) karakterišu se visokim vrednostima G'_{100} .



A



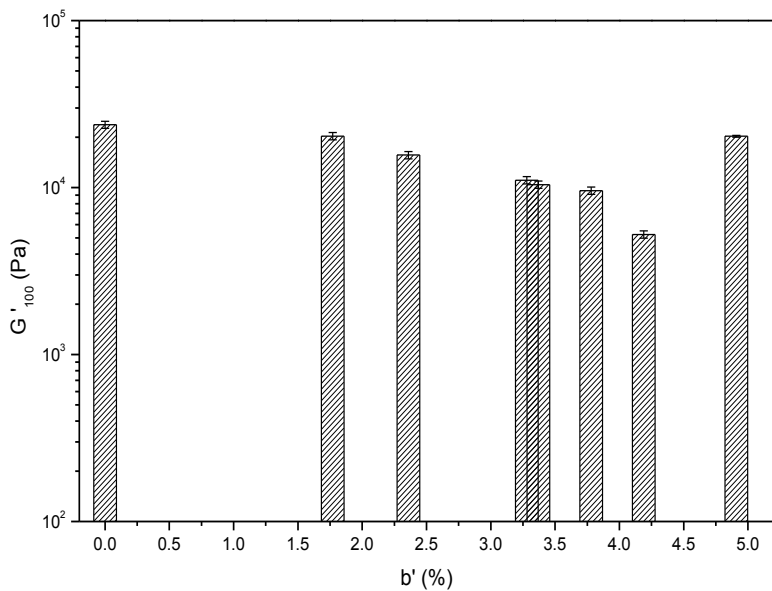
B

Slika 5.16: Zavisnost G'_{100} od odnosa kiselih prema baznim polipeptidima (K/B). A-zavisnost za uzorke iz 2010, B-zavisnost za uzorke iz 2011

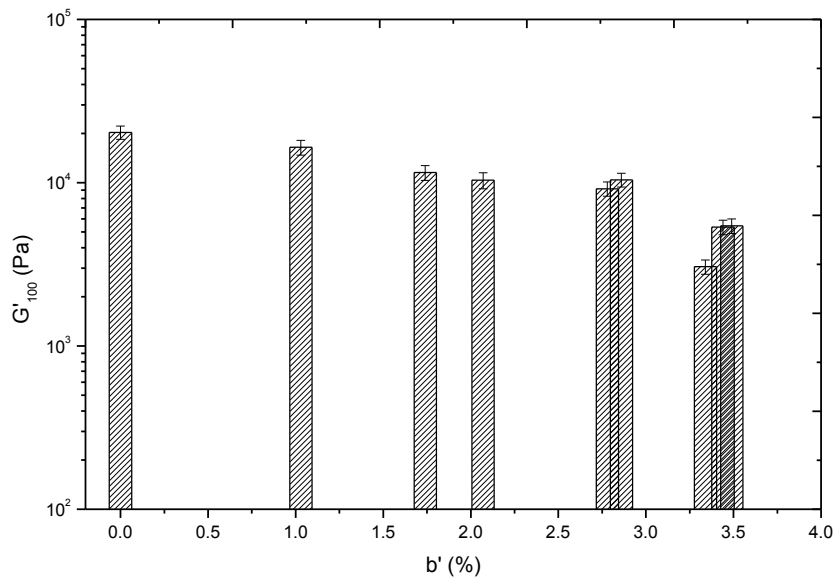
Pozitivna korelacija između odnosa kiselih/baznih polipeptida i vrednosti G'_{100} može se objasniti učešćem kiselih polipeptida u građenju glicininske mreže (Nik i saradnici, 2011). Međutim, s obzirom da su u gelovi pripremani na pH blizu neutralnog, dodatni faktor može biti relativno niska rastvorljivost baznih polipeptida na datom pH. S obzirom da su u neutralnoj sredini kiselih polipeptidi dobro rastvorljivi, navedeno bi moglo da objasni njihov pozitivan efekat u poređenju sa baznim polipeptidima. Dodatno objašnjenje može biti da, usled slabe rastvorljivosti baznih polipeptida u gelu stvaraju agregate (Renkema i saradnici, 2002), pa daju gelove znatno neuniformnije strukture u poređenju sa gelovima dobijenim iz uzoraka sa većim odnosom kiselih/baznih polipeptida.

Pomalo iznenađujuće, kada se razmotri zavisnost vrednosti G'_{100} od sadržaja β' , vidi se da su gelovi sa nižim sadržajem β' podjedinice imali veće vrednosti G'_{100} . Na osnovu hidrofobne strukture β' podjedinice moglo bi se očekivati da je postoji pozitivna korelacija između sadržaja β' podjedinice i vrednosti G'_{100} . Dva su moguća objašnjenja za takvu zavisnost. Prvo zbog postojanja ranije nađene negativne korelacije između rastvorljivosti i sadržaja β' podjedinice, moguće je da β' podjedinica dovodi do građenja agregata u gelu i na taj način smanjuje njegovu elastičnost. Drugo moguće objašnjenje je u tome što β' podjedinica, zbog velikog sadržaja nepolarnih aminokiselina, ne može da stupa u građenje elektrostatičkih veza koje su predložene kao glavni mehanizam za stabilizaciju konglicinskih gelova. Takođe, usled malog sadržaja aminokiselina koje sadrže sumpor (Coates i saradnici, 1985), ne mogu da grade disulfidne mostove koje Maruyama i saradnici (1999, 2004) navode kao dodatan mehanizam stabilizacije gelova pravljenih od 7S proteina. Usled sličnosti strukture, sadržaj β podjedinice takođe je bio negativno korelisan sa vrednostima modula krutosti, premda ta korelacija nije bila statistički značajna. Njihov zajednički efekat na čvrstinu gela ($F(2,51) = 55.67$, $p = 0.029$ pri $p < 0.05$) takođe je negativan. Isti razlozi koji objašnjavaju negativan uticaj sadržaja β i β' podjedinice na čvrstinu gela, objašnjavaju i uticaj sadržaja α i α' podjedinice (Tabela 5. 18). Naime, iako bi se očekivalo da zbog pozitivne korelacije sa stepenom bubrenja sadržaj α i α' podjedinice bude negativno korelisan sa vrednostima G'_{100} , statistički značajna korelacija nije nađena. Ovo može ukazivati na prevagu stabilizacije gelova elektrostatičkim silama i disulfidnim mostovima u poređenju sa efektom adsorpcije vode. Ovakvi nalazi u skladu su sa

rezultatima dobijenim od Qi i saradnika (2011), a suprotni rezultatima prijavljenim od strane Bin Mohamed i saradnika (2004).



A



B

Slika 18: Zavisnost G'_{100} od sadržaja β' podjedinice. A- zavisnost za uzorke iz 2010, B- zavisnost za uzorke iz 2011

Tabela 5.18: Koeficijenti korelacije između sadržaja podjedinica 7S i 11S i vrednosti G'_{100} *

Sadržaj podjedinice (%)	α'	α	β	β'	Kisele	Bazne	11S/7S	K/B
G'_{100}	-0.32	-0.28	-0.45	-0.73	0.79	0.48	0.97	0.65

*- Boldovane vrednosti bile su statistički značajne pri $p < 0.05$

Međutim, sa Slike 5.15 i 5.16. može se videti da su vrednosti G'_{100} bile relativno visoke kod genotipova koji imaju i visok sadržaj β' subjedinice i visok odnos 11S/7S i visok odnos kiselih/baznih polipeptida. Navedeno ukazuje da je efekat visokih odnosa 11S/7S i kiselih/baznih polipeptida izraženiji od efekta sadržaja β' podjedinice. Dakle, radije nego razvrstavanje prema efektima pojedinačnih podjedinica, uticaj sastava na čvrstinu gela treba posmatrati kao zajednički efekat prisutnih polipeptida.

Iz rezultata analize glavnih komponenti, može se zaključiti da 3 komponente objašnjavaju variranje u reološkim svojstvima. Odnos 11S/7S, stepen bubrenja i sadržaj β' podjedinice korelisani su sa prvom glavnom komponentom. Druga glavna komponenta korelisana je sa sadržajem baznih i kiselih polipeptida i sadržajem β podjedinice. Treća glavna komponenta korelisana je sa dve originalne promenljive (sadržajem α' i sadržajem α). Ovakve korelacije ukazuju da će gelovi sa visokim stepenom bubrenja i visokim sadržajem β' podjedinice ispoljiti "loša" reološka svojstva, dok će gelovi sa visokim odnosom 11S/7S i visokim odnosom kiselih/baznih polipeptida imati visoke vrednosti G'_{100} .

6. ZAKLJUČAK

Rezultati ovih istraživanja vode do sledećih zaključaka:

1. S obzirom na razlike u subjediničnom sastavu između istog genotipa iz dve različite godine, može se zaključiti da i faktori sredine utiču na podjedinični sastav proteina soje, a samim tim i na tehnološka funkcionalna svojstva proizvoda od soje. Sve domaće sorte soje karakterisale su se prisustvom β' podjedinice, a HP sorte karakterišu se smanjenim sadržajem β' podjedinice. Iako je uočeno da je u visokoproteinskim sortama soje bio manji sadržaj β' podjedinice, korelacija β' podjedinice i sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina nije bila statistički značajna, što se može objasniti velikim varijacijama u sadržaju ostalih podjedinica 7S i 11S proteina. Sadržaj α' podjedinice bio je negativno korelisan kako sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina, tako i neočekivano sa sadržajem 11S. Ovakav uticaj sadržaja α' podjedinice bi mogao da objasni korelaciju između sadržaja 7S i 11S u ukupnim rastvorljivim proteinima. Objašnjenje zašto je sadržaj 11S pokazao veću korelaciju sa sadržajem ukupnih rastvorljivih proteina u poređenju sa sadržajem 7S, može se pronaći u postojanju jake pozitivne korelacije između sadržaja kiselih i baznih polipeptida i sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina. Ovakva zavisnost objasnila bi zašto kod visokoproteinskih sorti dolazi do povećanja sadržaja 11S. Međutim kako takvo povećanje 11S nije dovoljno da značajnije promeni odnos 11S/7S nije nađena statistički značajna korelacija između odnosa 11S/7S i sadržaja ukupnih rastvorljivih proteina.
2. Rezultati 2D elektroforeze ukazuju da ekstrakcija Tris puferom nije pogodan metod ekstrakcije za analizu sojinih proteina 2D elektroforezom. Kao najefikasniji metod pokazala se ekstrakcija tiourea-urea puferima. Na osnovu 2D elektroforeze 7S frakcije, mogu se pronaći tačke koje po masi i pI vrednosti odgovaraju podjedinicama β konglicinina i razlikovati sorte koje se razlikuju po sintezi β i β' podjedinice.

3. Iako je na svim pH vrednostima, nađena je pozitivna korelacija između rastvorljivosti i sadržaja rastvorljivih proteina, sadržaj rastvorljivih proteina na pH 3 bio je negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 6 i pH 8 i sadržaj rastvorljivih proteina na pH 5 bio je negativno korelisan sa rastvorljivošću na pH 6. Ovakvi rezultati ukazuju da različiti polipeptidi utiču na rastvorljivost pri pH 3, pH 6 i pH 8. Takvi rezultati potvrđeni su postojanjem pozitivnih korelacija između sadržaja 7S i rastvorljivosti na pH 6 i pH 8 i sadržaja 11S i rastvorljivosti na pH 3. Od podjedinica 7S, pozitivnu korelaciju sa rastvorljivošću na pH 6 i pH 8 pokazao je sadržaj α i α' podjedinice, dok je sadržaj β' podjedinice na pH 6 i pH 8 bio negativno korelisan sa rastvorljivošću. Ovakve razlike u efektu podjedinica na rastvorljivost mogu se objasniti razlikama u strukturi, tj. većom hidrofobnošću β' i β podjedinice u poređenju sa α i α' podjedinicama. Na rastvorljivost na pH 3 najveći uticaj pokazao je odnos 11S/7S i odnos kiselih/baznih polipeptida. Veći uticaj sadržaja kiselih polipeptida u pređenju sa uticajem sadržaja baznih polipeptida može se objasniti slabijom rastvorljivošću baznih polipeptida na posmatranom pH. Neočekivano, sadržaj β' podjedinice bio je negativno korelisan sa sadržajem ukupnih proteina, što bi moglo biti dodatno objašnjenje zašto visokoproteinski genotipi pokazuju niski sadržaj β' podjedinice.

4. Iako očekivano (zbog njihove hidrofobnosti), β' i β podjedinice nisu pokazale pozitivnu korelaciju sa vrednostima EAI na pH 6 i pH 8. Međutim, zbog negativnog uticaja na rastvorljivost, sadržaj β' podjedinice je negativno korelisan sa vrednostima ESI na pH 6 i pH 8. Sadržaj α i α' podjedinica bio je pozitivno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8. Odnos 11S/7S je negativno korelisan sa ESI na pH 6 i pH 8.

Na svim posmatranim pH vrednostima, osim na pH 5, vrednosti ESI pokazuju korelaciju sa rastvorljivošću. S obzirom na postojanje takve korelacije, isti faktori koji su uticali na povećanje rastvorljivosti na datom pH uticaće i na vrednosti ESI. Dakle, sadržaj α i α' podjedinica bio je pozitivno korelisan sa vrednostima ESI na pH 6 i pH 8, dok je sadržaj β' podjedinice na datim vrednostima pokazivao negativnu korelaciju sa ESI vrednostima. Premda je i sadržaj β podjedinice bio negativno

korelisan sa vrednostima ESI na pH 6 i pH 8, ova korelacija nije bila statistički značajna. Na pH 3 sadržaj kiselih polipeptida, kao i sadržaj baznih polipeptida, kao i odnos kiselih prema baznim polipeptidima su bili pozitivno korelisani sa ESI vrednostima.

5. Za razliku od ESI, vrednosti EAI bile su negativno korelisane sa rastvorljivošću na pH 6 i pH 8 i pozitivno korelisane sa rastvorljivošću na pH 3. S obzirom na nađenu negativnu korelaciju između rastvorljivosti i vrednosti EAI, može se očekivati da će faktori koji doprinose smanjenju rastvorljivosti na datoj pH usloviti povećanje vrednosti EAI i zaista genotipovi sa većim sadržajem α i α' podjedinice pokazivali su manje vrednosti EAI na pH 6 i pH 8, dok su genotipovi sa većim sadržajem β' podjedinice imali manje vrednosti EAI na pH 6 i pH 8. Sadržaj β podjedinice takođe je bio pozitivno korelisan sa EAI na pH 6 i pH 8, premda te korelacije nisu bile statistički značajne pri nivou značajnosti $p = 0.05$. Kako je EAI bio pozitivno korelisan sa rastvorljivošću na pH 3, logično bi bilo pretpostaviti da će faktori koji doprinose povećanju rastvorljivosti na pH 3, imati i pozitivan uticaj na vrednosti EAI. Ova pretpostavka potvrđena je kroz postojanje pozitivnih korelacija između odnosa 11S/7S i sadržaja kiselih polipeptida sa vrednostima EAI na pH 3. Ovi rezultati se mogu objasniti promenom forme 11S iz dimera u monomer usled promene pH. Ukoliko se uzme u obzir pozitivna korelacija između vrednosti EAI na svim ispitivanim pH, kao i pozitivna korelacija između sadržaja β' podjedinice i vrednosti EAI na pH 6, može se zaključiti da je hidrofobnost krucijalni faktor koji utiče na aktivnost emulzije. Za razliku od vrednosti ESI, vrednosti EAI na pH 6 i pH 8 bile su pozitivno korelisane sa sadržajem ukupnih proteina. Kako je već ranije pomenuto, nađeno je da je sadržaj glicinina, kao i sadržaj kiselih polipeptida pozitivno korelisan sa sadržajem ukupnih proteina. S obzirom na pozitivnu korelaciju sadržaja glicinina i sadržaja kiselih polipeptida na vrednosti EAI, ovakva zavisnost može se pripisati uticaju sadržaja kiselih polipeptida i ukupnoj količini glicinina u datom genotipu.
6. Glavni faktori koji utiču na reološke osobine sojinih gelova su: odnos 11S/7S, stepen bubrenja, odnos kiselih/baznih polipeptida i sadržaj β' podjedinice.

Genotipovi sa visokim odnosom 11S/7S davali su gelove sa većim vrednostima modula krutosti i pri dinamičko mehaničkoj analizi su pokazivali manje varijacije. Objašnjenje ovakvog uticaja leži u rigidnosti strukture glicinina i njegovoj hidrofobnosti, što omogućava građenje uniformnijih gelova većeg stepena umreženosti. Nasuprot tome, gelovi sa većim stepenom bubrenja pokazivali su niže vrednosti modula krutosti. Zbog njihovog visokog stepena glikozilacije i velikog sadržaja polarnih aminokiselina, gelovi sa većim sadržajem α' i α podjedinice pokazivali su veće vrednosti stepena bubrenja. Međutim, sadržaj α i α' podjedinice nije pokazivao negativnu korelaciju sa vrednostima za modul krutosti. Objašnjenje leži u mogućnosti građenja elektrostatičkih i disulfidnih veza koje mogu stabilizovati strukturu gela. Verovatno usled nemogućnosti građenja ovog tipa veza, sadržaj β' podjedinice bio je negativno korelisan sa vrednostima modula krutosti. Međutim, s obzirom na to da je ovakva korelacija bila znatno niža u poređenju sa korelacijom između odnosa 11S/7S i modula krutosti, gelovi koji imaju i visok sadržaj β' podjedinice i visok odnos 11S/7S će pokazivati relativno visoke vrednosti za modul krutosti.

7. Navedeni rezultati ukazuju da će genotipovi sa većim sadržajem β' i β podjedinica β konglicinina pokazivati slabiju rastvorljivost, ali će imati pozitivan efekat na sposobnost građenja emulzije. Genotipovi sa većim sadržajem α i α' podjedinica pozitivno će uticati na rastvorljivost i stabilnost emulzije na neutralnim pH vrednostima. Premda će genotipovi sa većim sadržajem β' podjedinice graditi "mekše" gelove, efekat ovog polipeptida na reološka svojstva može biti amortizovan nekim drugim faktorima, kao što je odnos 11S/7S. Takođe, premda će genotipovi sa većim sadržajem α i α' podjedinica pokazivati veće stepene bubrenja, uticaj sadržaja α i α' podjedinica na modul krutosti takođe će zavisiti od njihove mogućnosti da stabilizuju strukturu gela građenjem disulfidnih veza.

7. SPISAK SKRAĆENICA

11S-glicinin

7S- β konglicinin

9S-dimerni oblik β konglicinina

AMPK- AMP-aktivirana protein kinaza

ANOVA-analiza varijanse

BBI-Bouman-Bark-ov inhibitor

BSA- goveđi serum albumin

cAMP- ciklični adenzin monofosfat

DMA-dinamičko mehanička analiza

EAI- indeks aktivnosti emulzije

ER-endoplazmatični retikulum

ESI- indeks stabilnosti emulzije

GOT- aspartat transaminaza

IgE-imunoglobulin E

iRNK- informaciona ribonukleinska kiselina

KTI- inhibitor Kunitz-ovog tipa

LDH- laktat dehidrogenaza

LDL-lipoprotein male gustine

PKA- protein kinaza A

q- stepen bubrenja

SDS PAGE-poliakrilamidna elektroforeza u denaturacionim uslovima

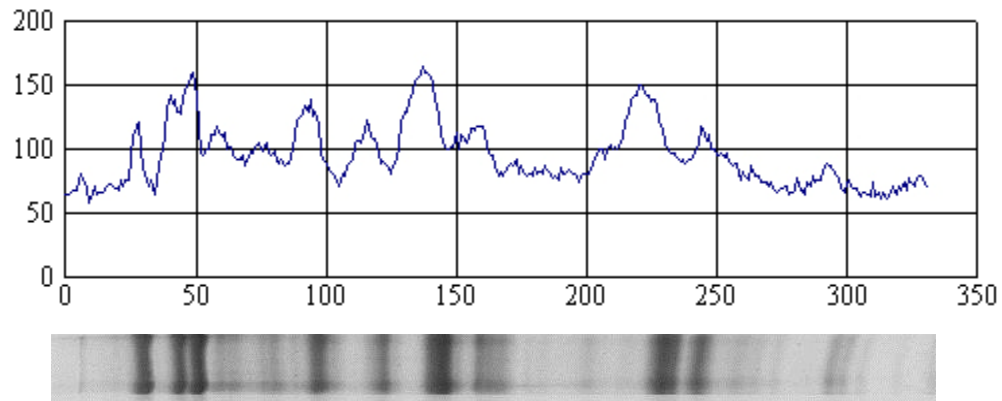
SPI- izolat sojinih proteina

tan δ - tangens ugla mehaničkih gubitaka

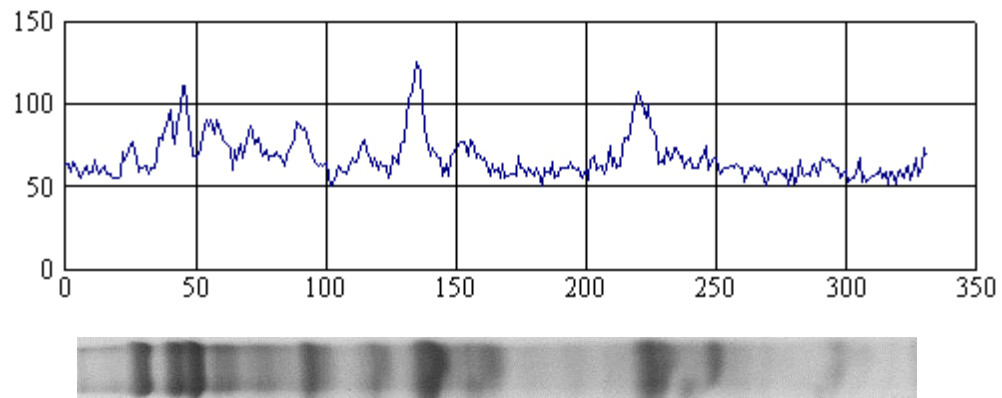
TCA-trihlorsirćetna kiselina

8. PRILOG

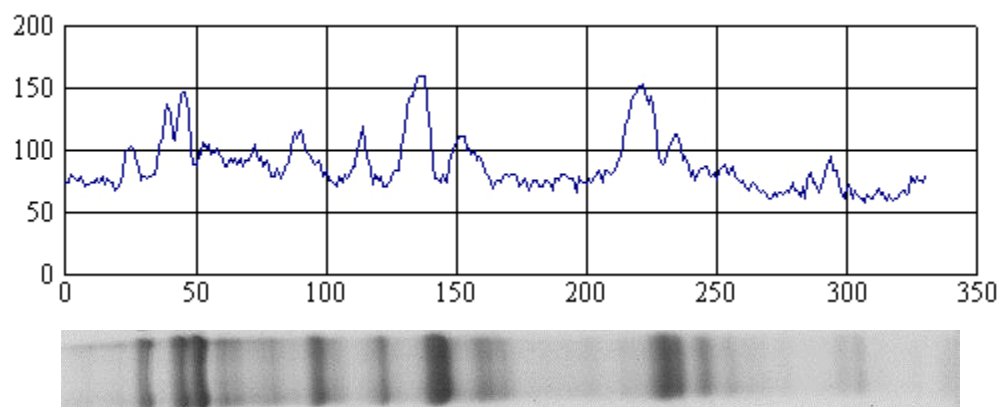
PRILOG 8.1: SDS PAG elektroforegrami i denzitogrami pojedinačnih uzoraka



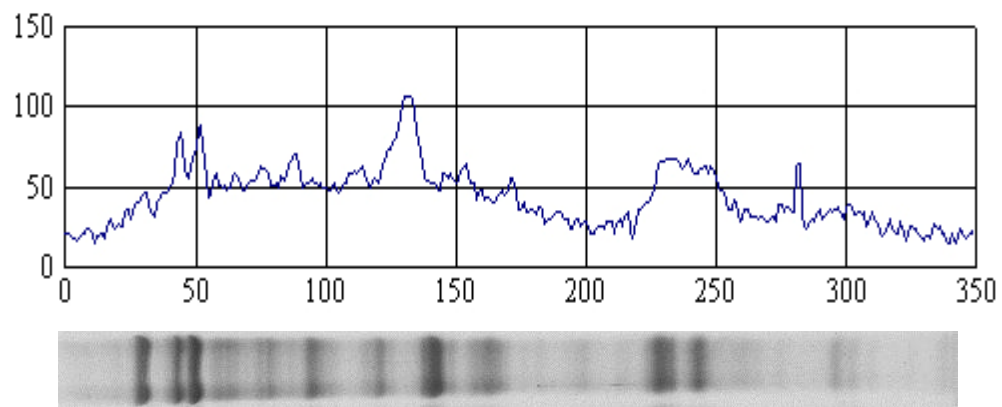
Slika 8.1.1. SDS PAG elektroforegram uzorka Valjevka 2010



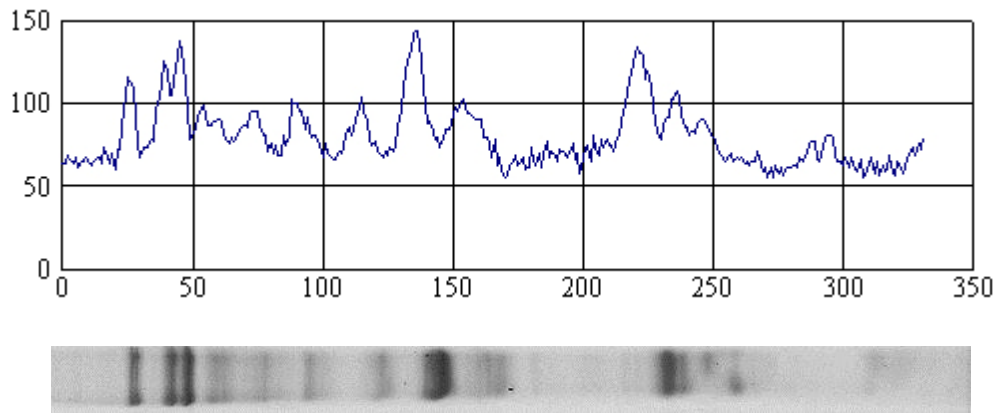
Slika 8.1.2. SDS PAG elektroforegram uzorka Arnaviskaja 2010



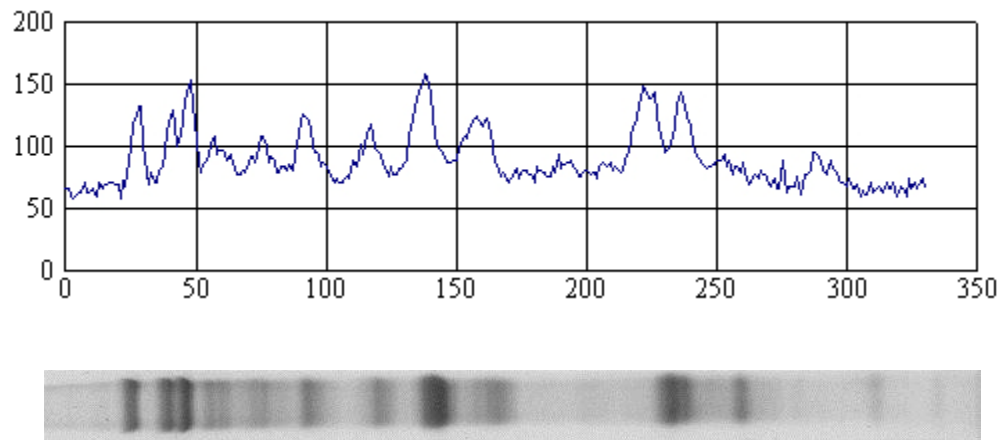
Slika 8.1.3. SDS PAG elektroforegram uzorka Novosađanka 2011



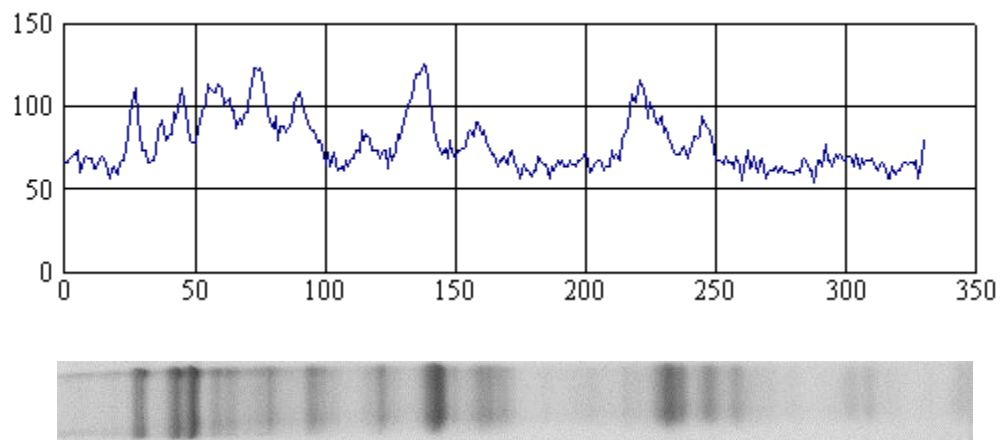
Slika 8.1.4. SDS PAG elektroforegram uzorka Trijumf 2010



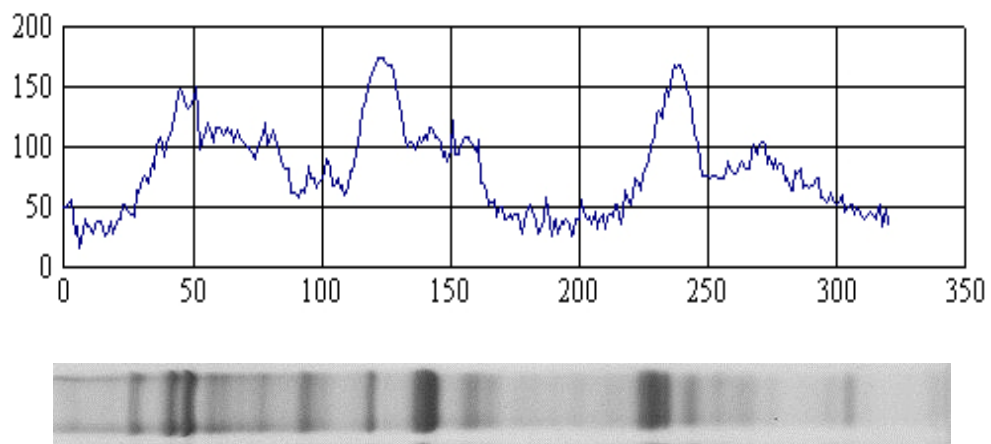
Slika 8.1.5. SDS PAG elektroforegram uzorka Armaviskaja 2011



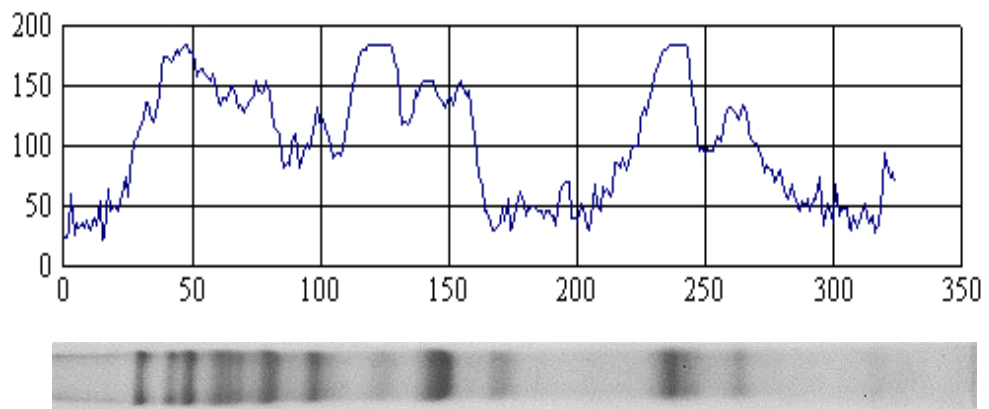
Slika 8.1.6. SDS PAG elektroforegram uzorka Vojvodanka 2010



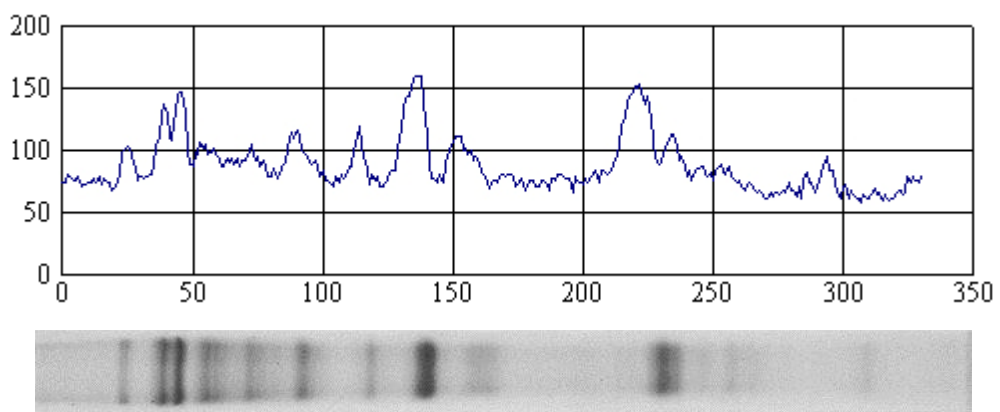
Slika 8.1.7. SDS PAG elektroforegram uzorka Trijumf 2011



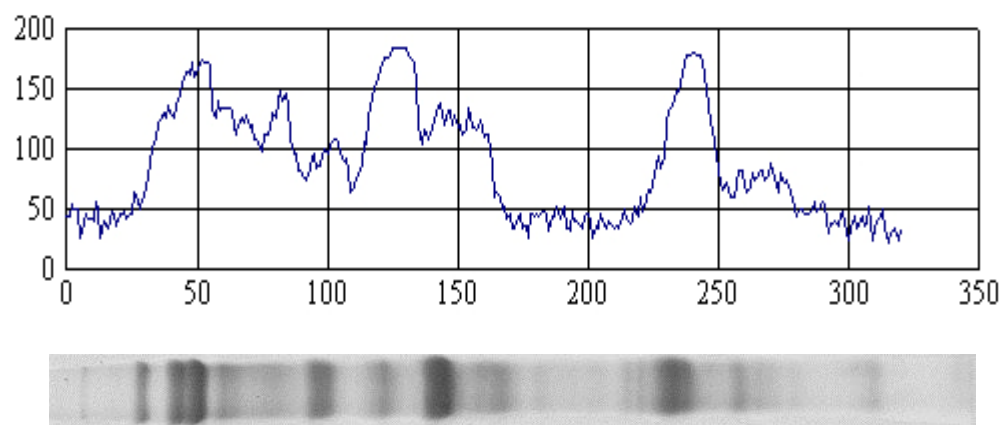
Slika 8.1.8. SDS PAG elektroforegram uzorka Vojvođanka 2011



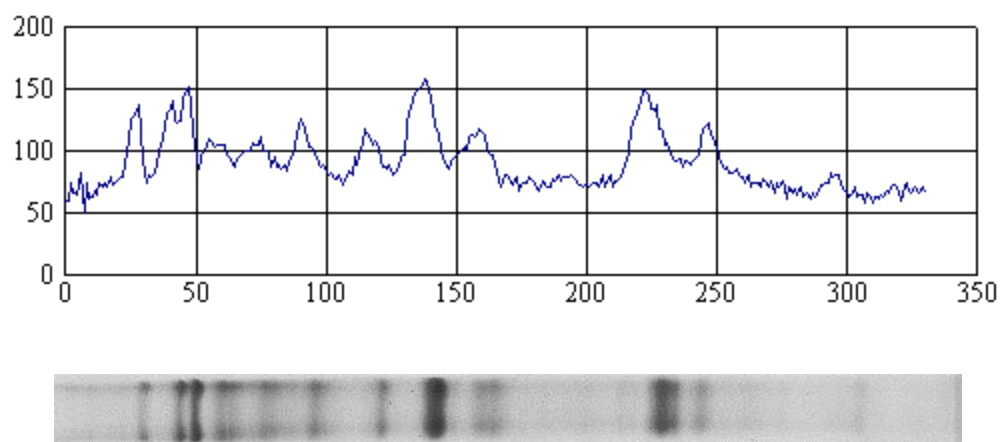
Slika 8.1.9. SDS PAG elektroforegram uzorka Favorit 2011



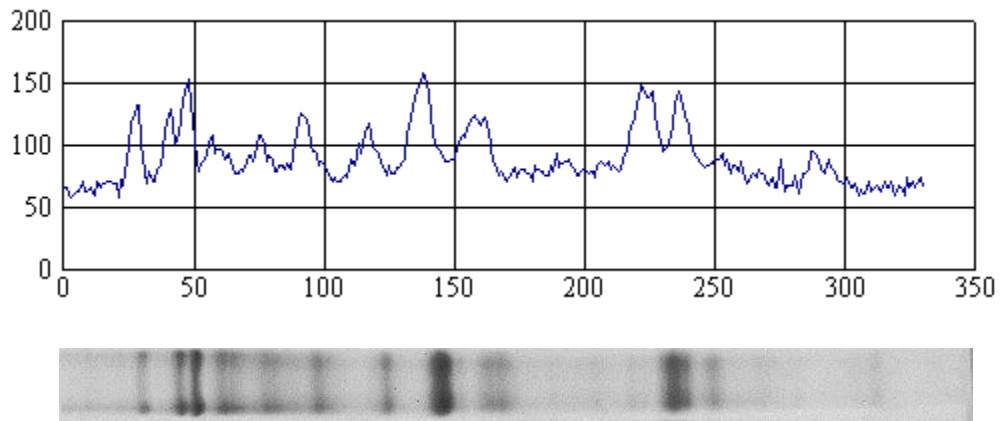
Slika 8.1.10. SDS PAG elektroforegram uzorka Maple Glen 2010



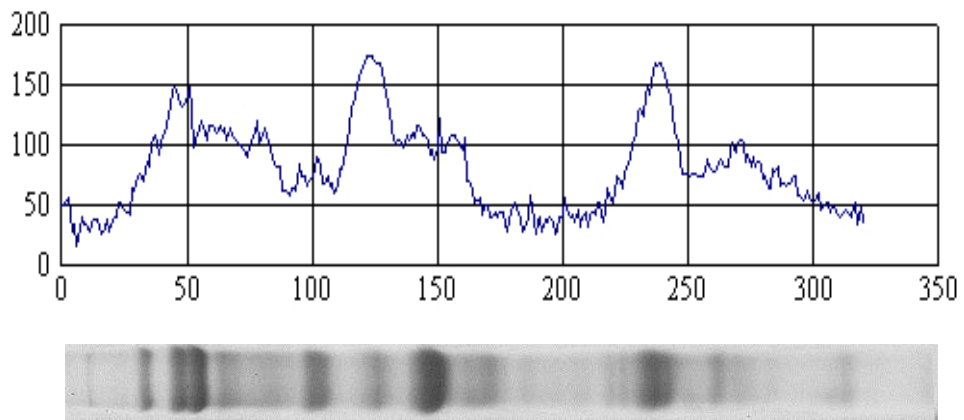
Slika 8.1.11. SDS PAG elektroforegram uzorka Valjevka 2011



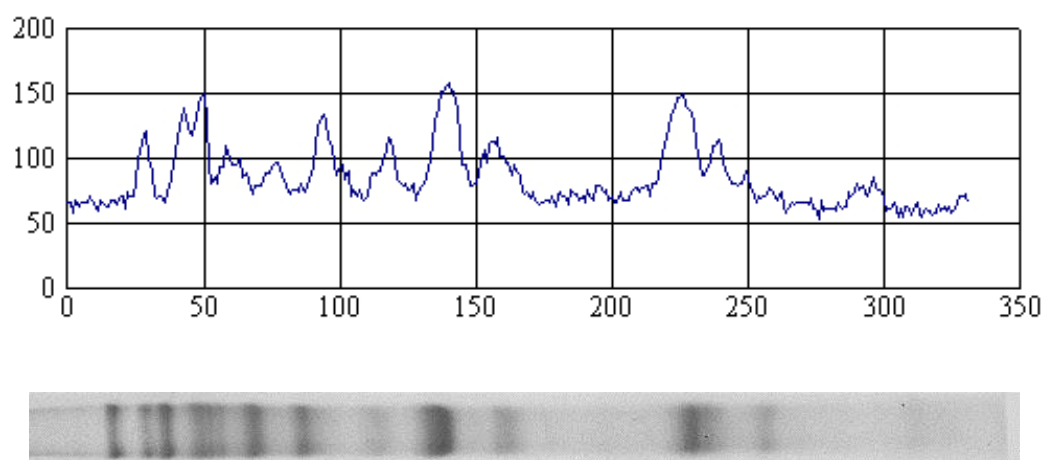
Slika 8.1.12. SDS PAG elektroforegram uzorka Proteus 2010



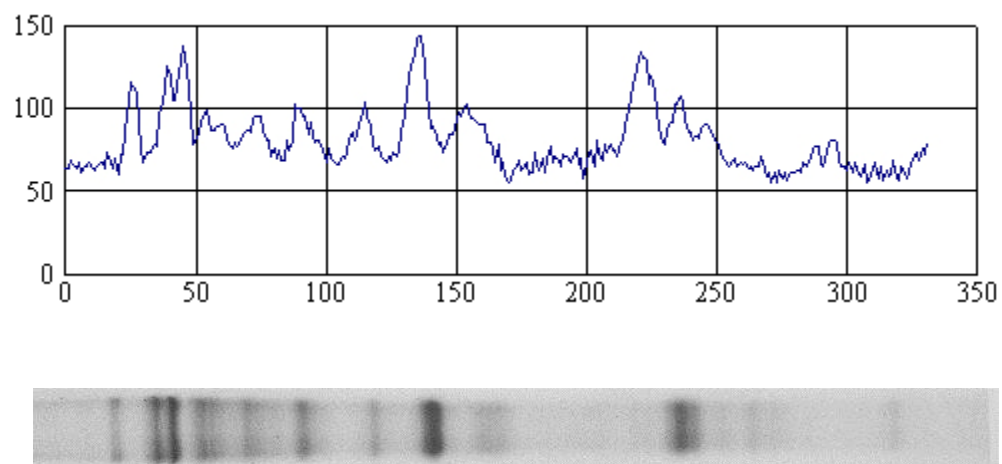
Slika 8.1.13. SDS PAG elektroforegram uzorka Proteus 2011



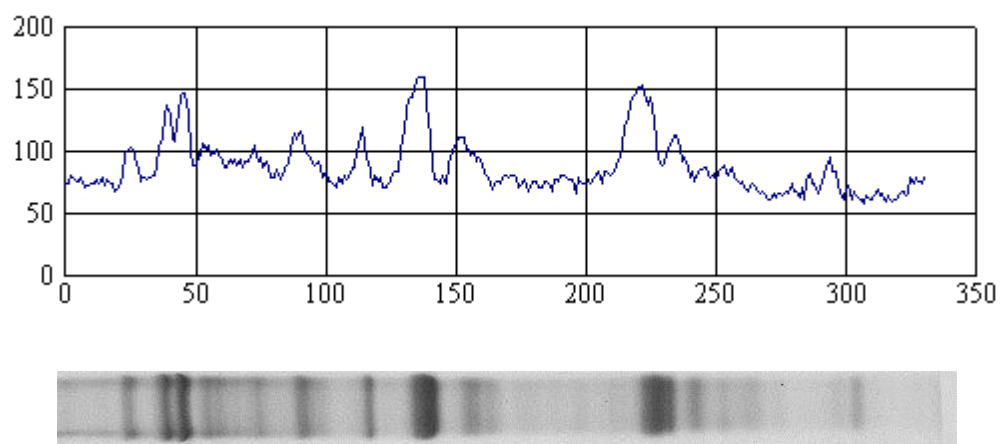
Slika 8.1.14. SDS PAG elektroforegram uzorka Novosađanka 2010



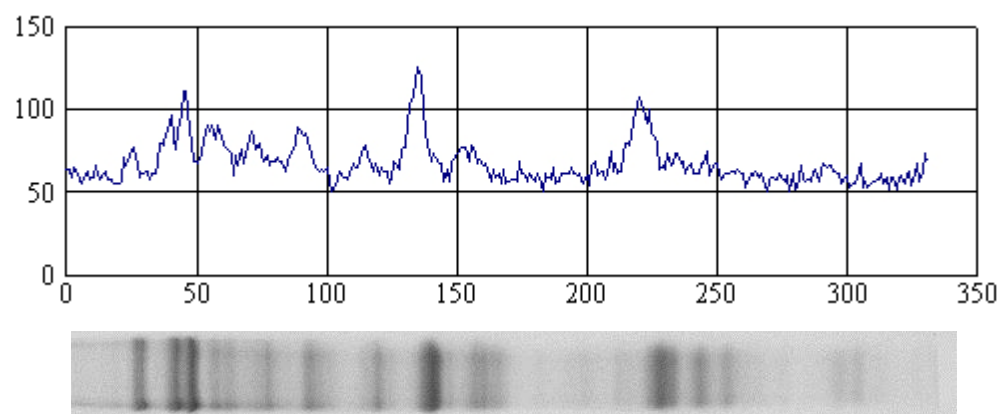
Slika 8.1.15. SDS PAG elektroforegram uzorka Maple Glen 2011



Slika 8.1.16. SDS PAG elektroforegram uzorka Favorit 2010



Slika 8.1.17. SDS PAG elektroforegram uzorka Sava 2011



Slika 8.1.18. SDS PAG elektroforegram uzorka Sava 2010

PRILOG 8.2: Densitometrijski rezultati 2D elektroforeze

Tabela 8.2.1. Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Proteus 2010

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
12239	97	158	145
13322	97	177	173
15244	97	291	250
17949	97	298	261
16637	97	347	290
13754	97	350	270
14923	97	355	283
14785	97	363	279
17949	97	383	399
14239	97	382	288
14875	97	383	145
10349	97	345	280
16037	97	347	290
17149	97	377	333
13222	97	307	399
18745	97	400	405
18468	97	412	175
18029	97	414	368
17149	97	377	336
18923	97	413	395
5794	97	585	234

Tabela 8.2.2: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Novosađanka 2010

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13011	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13567	97	355	283
14092	97	363	279
14265	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
6025	97	585	234

Tabela 8.2.3: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Valjevka 2010

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13005	97	158	145
13027	97	177	173
15532	97	291	250
16451	97	298	261
16897	97	347	290
12266	97	350	270
14762	97	355	283
15108	97	363	279
13972	97	372	277
17521	97	383	399
13402	97	382	288
15543	97	383	145
10127	97	345	280
16018	97	347	290
17226	97	377	333
13386	97	307	399
18643	97	400	405
18872	97	412	175
17654	97	414	368
16531	97	377	336
17943	97	413	395
5124	97	585	234

Tabela 8.2.4: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Proteus 2011

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13313	97	158	145
14056	97	177	173
14931	97	291	250
16674	97	298	261
17211	97	347	290
14125	97	350	270
15587	97	355	283
16032	97	363	279
17558	97	383	399
15105	97	382	288
13089	97	383	145
11463	97	345	280
15878	97	347	290
17698	97	377	333
14216	97	307	399
18834	97	400	405
18594	97	412	175
18876	97	414	368
16898	97	377	336
18541	97	413	395
4325	97	585	234

Tabela 8.2.5: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Novosađanka 2011

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
14521	97	158	145
13954	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13567	97	355	283
14092	97	363	279
14265	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
6025	97	585	234

Tabela 8.2.6: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Valjevka 2011

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13011	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13567	97	355	283
14092	97	363	279
14265	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
16678	97	377	333
17731	97	307	399
19431	97	400	405
17952	97	412	175
16684	97	414	368
16075	97	377	336
16951	97	413	395
5136	97	585	234

Tabela 8.2.7: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka
Vojvođanka 2010

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
14012	97	158	145
13065	97	177	173
15041	97	291	250
16021	97	298	261
16663	97	347	290
13021	97	350	270
14052	97	355	283
13645	97	363	279
14315	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
7291	97	585	234

Tabela 8.2.8: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka
Vojvođanka 2011

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13365	97	158	145
13021	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13674	97	355	283
14092	97	363	279
13512	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5215	97	585	234

Tabela 8.2.9: Intenzitet, površina i pozicija tačkaka na 2D elektroforegramu uzorka Maple Glen 2010

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13894	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13567	97	355	283
14092	97	363	279
15213	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
6025	97	585	234

Tabela 8.2.10: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Maple Glen 2011

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
11088	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
11103	97	350	270
13411	97	355	283
15021	97	363	279
15123	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
4131	97	585	234

Tabela 8.2.11: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Armaviskaja 2010

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tački	X pozicija tački	Y pozicija tački
12118	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12735	97	350	270
12051	97	355	283
13021	97	363	279
12031	97	372	277
16031	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5473	97	585	234

Tabela 8.2.12: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Armaviskaja 2011

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
12894	97	158	145
12012	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
12896	97	355	283
15093	97	363	279
15612	97	372	277
17096	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5187	97	585	234

Tabela 8.2.13: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Sava 2010

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
12954	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
15364	97	355	283
14014	97	363	279
13021	97	372	277
16328	97	383	399
13697	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
3026	97	585	234

Tabela 8.2.14: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Sava 2011

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
13011	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
14032	97	350	270
16671	97	355	283
15032	97	363	279
11069	97	372	277
17036	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
4963	97	585	234

Tabela 8.2.15: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Favorit 2010

Intenzitet tačke (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
15039	97	158	145
13654	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
11635	97	350	270
13984	97	355	283
14165	97	363	279
13396	97	372	277
18152	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
7431	97	585	234

Tabela 8.2.16: Intenzitet, površina i pozicija tačkaka na 2D elektroforegramu uzorka Favorit 2011

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina	X pozicija	Y pozicija
12215	97	158	145
12967	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
11675	97	350	270
17896	97	355	283
15031	97	363	279
14415	97	372	277
13961	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5237	97	585	234

Tabela 8.2.17: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Trijumf 2010

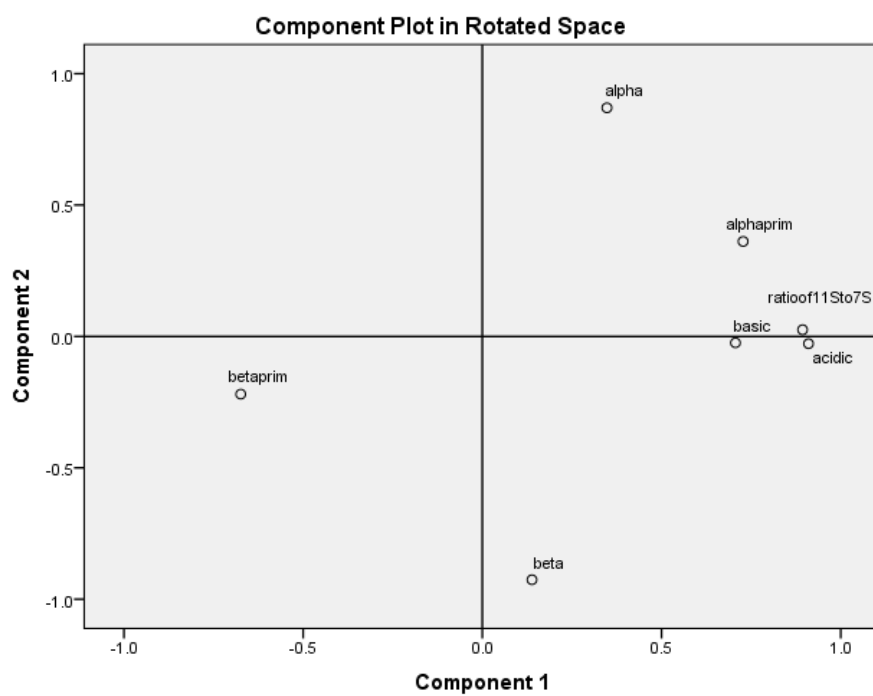
Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
12036	97	158	145
13312	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
14412	97	355	283
15399	97	363	279
12967	97	372	277
16548	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5946	97	585	234

Tabela 8.2.18: Intenzitet, površina i pozicija tačaka na 2D elektroforegramu uzorka Trijumf 2011

Intenzitet (u inverznim pikselima)	Površina tačke	X pozicija tačke	Y pozicija tačke
12011	97	158	145
11134	97	177	173
15041	97	291	250
16841	97	298	261
17017	97	347	290
12986	97	350	270
13567	97	355	283
14092	97	363	279
12215	97	372	277
17329	97	383	399
13937	97	382	288
15172	97	383	145
10689	97	345	280
15974	97	347	290
17423	97	377	333
13409	97	307	399
18897	97	400	405
18641	97	412	175
17964	97	414	368
16213	97	377	336
17641	97	413	395
5178	97	585	234

PRILOG 8.3. PCA analiza pođediničkog sastava

	Komponenta	
	1	2
kisele	0.910	
11S/7S	0.894	
α'	0.728	0.361
bazne	0.706	
β'	-0.674	-0.220
β	0.138	-0.926
α	0.348	0.870



PRILOG 8.4 . Rastvorljivost različitih genotipova pri promeni pH vrednosti*

Uzorak	Rastvorljivost (%)			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
Novosađanka 2010	14.36 ± 1.37 ^a	4.46 ± 0.13 ^{ab}	50.62 ± 1.66 ^{ad}	41.58 ± 0.52 ^{af}
Novosađanka 2011	17.6 ± 1.03 ^a	5.35 ± 0.12 ^b	53.83 ± 2.72 ^{ab}	48.1 ± 0.89 ^{be}
Valjevka 2010	8 ± 0.78 ^b	3.89 ± 0.2 ^{ac}	66.29 ± 2.19 ^{ce}	54.90 ± 0.93 ^c
Valjevka 2011	6.85 ± 0.69 ^{bd}	4.1 ± 0.07 ^a	67.48 ± 1.74 ^{ce}	57.19 ± 0.77 ^{cd}
Vojvođanka 2010	9.47 ± 0.87 ^{bc}	4.46 ± 0.18 ^a	59.94 ± 2.36 ^c	48.61 ± 0.49 ^{be}
Vojvođanka 2011	10.22 ± 0.93 ^c	3.62 ± 0.43 ^c	54.63 ± 1.91 ^{ab}	46.21 ± 0.94 ^b
Proteus 2010	19.69 ± 1.13 ^e	7.19 ± 0.15 ^d	53.79 ± 1.88 ^{ab}	37.16 ± 0.76 ^{af}
Proteus 2011	18.35 ± 0.57 ^f	6.37 ± 0.41 ^{de}	53.53 ± 1.74 ^{ab}	35.31 ± 0.82 ^f
Maple Glen 2010	13.44 ± 0.83 ^a	8.34 ± 0.57 ^d	49.8 ± 2.15 ^{ad}	41.03 ± 0.49 ^a
Maple Glen 2011	9.75 ± 0.75 ^{bc}	4.8 ± 0.19 ^{ab}	55.14 ± 2.07 ^b	46.95 ± 0.57 ^{be}
Armavirskaja 2010	8.07 ± 0.24 ^b	3.16 ± 0.34 ^c	51.27 ± 2.26 ^{ab}	40.29 ± 0.62 ^{af}
Armavirskaja 2011	8.85 ± 0.89 ^b	2.85 ± 0.25 ^f	63.57 ± 2.24 ^{ce}	59.8 ± 0.87 ^d
Sava 2010	9.19 ± 0.63 ^{bc}	5.56 ± 0.31 ^b	57.91 ± 2.31 ^{be}	53.56 ± 0.66 ^c
Sava 2011	10.12 ± 0.58 ^c	6.18 ± 0.52 ^e	51.07 ± 2.77 ^{ab}	42.49 ± 0.88 ^{ae}
Trijumf 2010	7.96 ± 0.76 ^b	5.01 ± 0.49 ^b	58.26 ± 1.03 ^{be}	49.84 ± 0.65 ^{be}
Trijumf 2011	8.3 ± 0.67 ^b	4.83 ± 0.32 ^a	56.98 ± 2.82 ^{ab}	47.32 ± 0.59 ^{be}
Favorit 2010	7.47 ± 0.44 ^{bd}	3 ± 0.11 ^{cf}	60.72 ± 2.45 ^{ce}	52.34 ± 0.57 ^{ce}
Favorit 2011	6.21 ± 0.48 ^d	2.1 ± 0.15 ^f	64.79 ± 2.69 ^{ce}	56.39 ± 0.43 ^{cd}

Srednje vrednosti su date sa standardnom greškom.

*-Isto slovo znači da, po datoj varijabili, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato t testom za nezavisne uzorke pri p = 0.05)

PRILOG 8.5. Vrednosti indeksa stabilnosti emulzije različitih genotipova pri promeni pH*

Uzorak	ESI (min)			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
Novosađanka 2010	8.43 ± 0.96 ^a	2.95 ± 0.4 ^a	19.13 ± 2.78 ^a	14.25 ± 2.14 ^{ae}
Novosađanka 2011	9.03 ± 1.02 ^{ab}	2.78 ± 0.73 ^{ab}	20.28 ± 3.7 ^{ab}	17.34 ± 0.84 ^b
Valjevka 2010	7.87 ± 0.84 ^{acf}	3.53 ± 0.52 ^{abd}	29.95 ± 3.45 ^c	23.47 ± 1.5 ^c
Valjevka 2011	5.68 ± 2.04 ^{de}	4.41 ± 0.64 ^c	24.74 ± 3.05 ^{de}	19.02 ± 3.15 ^{bd}
Vojvođanka 2010	7.25 ± 1.14 ^{cf}	3.74 ± 0.46 ^{cd}	22.15 ± 1.08 ^{bdf}	18.63 ± 1.26 ^b
Vojvođanka 2011	6.54 ± 1.38 ^{cd}	2.62 ± 0.39 ^{af}	26.13 ± 3.32 ^e	20.26 ± 1.62 ^d
Proteus 2010	10.39 ± 0.72 ^b	1.71 ± 0.75 ^e	22.62 ± 2.2 ^d	15.04 ± 2.46 ^{ae}
Proteus 2011	9.94 ± 1.32 ^b	1.85 ± 0.44 ^e	23.75 ± 2.85 ^{df}	13.46 ± 1.6 ^{afj}
Maple Glen 2010	7.92 ± 0.66 ^{acf}	2.28 ± 0.36 ^{ae}	20.87 ± 2.94 ^{ab}	14.76 ± 0.96 ^{ae}
Maple Glen 2011	7.15 ± 2.4 ^{cf}	2.67 ± 0.42 ^{abf}	21.59 ± 1.98 ^{abd}	15.55 ± 1.5 ^e
Armavirskaja 2010	6.67 ± 0.85 ^c	3.93 ± 0.47 ^{cd}	22.38 ± 1.09 ^{df}	18.14 ± 1.05 ^{bg}
Armavirskaja 2011	6.31 ± 2.02 ^{de}	3.4 ± 0.43 ^{ad}	26.49 ± 2.6 ^e	17.36 ± 2.78 ^{bg}
Sava 2010	7.95 ± 1.88 ^{acf}	2.85 ± 0.26 ^{abf}	20.54 ± 1.86 ^{ab}	13.5 ± 1.74 ^{afj}
Sava 2011	8.3 ± 0.6 ^{ac}	1.4 ± 0.21 ^e	20.3 ± 1.68 ^{ab}	14 ± 1.08 ^{ae}
Trijumf 2010	6.61 ± 3.52 ^c	2.36 ± 0.37 ^{ae}	21.92 ± 1.98 ^b	16.73 ± 1.98 ^b
Trijumf 2011	6.49 ± 0.78 ^{de}	3.14 ± 0.33 ^{bd}	22.8 ± 2.1 ^{df}	18.11 ± 2.7 ^{bg}
Favorit 2010	6.08 ± 0.66 ^{de}	4.18 ± 0.42 ^c	25.22 ± 2.26 ^{de}	20.3 ± 1.52 ^d
Favorit 2011	5.98 ± 1.85 ^{de}	4.33 ± 0.81 ^c	26.97 ± 2.87 ^e	21.11 ± 3.3 ^{cd}

Srednje vrednosti su date sa standardnom greškom.

*-Isto slovo znači da, po datoj varijabili, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato *t* testom za nezavisne uzorke pri *p* = 0.05)

PRILOG 8.6. Vrednosti indeksa aktivnosti emulzije različitih genotipova pri promeni pH*

Uzorak	EAI (m ² /g)			
	pH 3	pH 5	pH 6	pH 8
Novosađanka 2010	109.59 ± 7.68 ^a	88.96 ± 4.44 ^{ag}	117.91 ± 6.96 ^a	125.28 ± 5.32 ^a
Novosađanka 2011	112.88 ± 6.12 ^b	94.4 ± 7.36 ^b	120.32 ± 6.72 ^b	131.82 ± 5.8 ^c
Valjevka 2010	105.64 ± 5.96 ^{ad}	92.61 ± 5.16 ^c	114.12 ± 10.1 ^c	119.23 ± 3.68 ^{dg}
Valjevka 2011	92.31 ± 5.32 ^c	88.25 ± 6.64 ^{ag}	104.58 ± 4.16 ^d	108.8 ± 5.2 ^f
Vojvođanka 2010	104.62 ± 4.72 ^d	89.76 ± 4.42 ^{ag}	111.34 ± 6.12 ^e	120.42 ± 7.44 ^{dgl}
Vojvođanka 2011	108.75 ± 6.59 ^{ad}	91.7 ± 5.96 ^c	115.01 ± 7.28 ^{cg}	122.82 ± 5.23 ^{adgl}
Proteus 2010	119.29 ± 7.64 ^e	94.05 ± 5.85 ^{bc}	128.35 ± 3.93 ^f	140.84 ± 4.72 ^g
Proteus 2011	114.28 ± 8.43 ^b	83.25 ± 7.15 ^d	124.82 ± 4.44 ^{bf}	134.3 ± 8.2 ^c
Maple Glen 2010	109.12 ± 5.32 ^a	88.92 ± 8.2 ^{ag}	116.79 ± 6.65 ^{ac}	123.13 ± 7.4 ^{alm}
Maple Glen 2011	102.4 ± 6.14 ^{df}	85.44 ± 3.07 ^{de}	112.27 ± 5.9 ^{ce}	120.9 ± 5.96 ^{dl}
Armavirskaja 2010	100.05 ± 7.16 ^{fg}	90.39 ± 6.64 ^c	115.85 ± 6.32 ^{cg}	119.95 ± 4.51 ^{dg}
Armavirskaja 2011	97.58 ± 7.4 ^{ck}	81.6 ± 6.72 ^{df}	114.21 ± 5.4 ^{cg}	115.36 ± 5.18 ^k
Sava 2010	106.76 ± 6.65 ^{ad}	88.2 ± 5.96 ^{ag}	119.05 ± 7.37 ^b	123.24 ± 5.9 ^{al}
Sava 2011	107.9 ± 5.18 ^a	91.3 ± 7.56 ^{cg}	117.07 ± 8.88 ^a	121.8 ± 7.42 ^{dl}
Trijumf 2010	99.90 ± 3.71 ^{gk}	82.24 ± 6.75 ^{df}	113.2 ± 7.9 ^c	121.36 ± 5.16 ^{dl}
Trijumf 2011	103.98 ± 7.89 ^{df}	86.78 ± 8.12 ^{eg}	114.09 ± 4.43 ^{cg}	123.58 ± 7.37 ^{al}
Favorit 2010	97.39 ± 8.38 ^c	80.93 ± 7.8 ^{df}	115.9 ± 4.5 ^{cg}	118.37 ± 8.38 ^d
Favorit 2011	100.2 ± 6.47 ^{fg}	85.36 ± 6.14 ^{de}	111.74 ± 3.71 ^e	121.36 ± 8.5 ^{dl}

Srednje vrednosti su date sa standardnom greškom.

*-Isto slovo znači da, po datoj varijabli, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato *t* testom za nezavisne uzorke pri *p* = 0.05)

PRILOG 8.7: Vrednosti stepena bubrenja (q) i G'_{100} za pojedinačne uzorke*

Uzorak	q (%)	G'_{100} (Pa) x 10^3
Novosađanka 2010	15.8 ± 1.88^{ag}	20.3 ± 1.52^a
Novosađanka 2011	13.2 ± 1.21^b	16.2 ± 1.78^b
Valjevka 2010	28.7 ± 2.92^c	5.2 ± 0.36^c
Valjevka 2011	30.1 ± 3.09^{cf}	5.3 ± 0.52^c
Vojvođanka 2010	19.5 ± 1.87^d	9.6 ± 1.19^e
Vojvođanka 2011	27.6 ± 2.64^c	5.4 ± 0.48^c
Proteus 2010	10.6 ± 1.08^e	23.8 ± 1.23^g
Proteus 2011	11.8 ± 1.2^{be}	20.7 ± 2.01^a
Maple Glen 2010	17.1 ± 1.75^a	11.1 ± 0.75^f
Maple Glen 2011	20.4 ± 2.03^d	10.4 ± 1.07^{ef}
Armavirskaja 2010	31.5 ± 3.24^{cf}	5.08 ± 0.41^c
Armavirskaja 2011	32.2 ± 3.17^{cf}	3.1 ± 0.33^d
Sava 2010	16 ± 1.52^g	15.7 ± 0.89^b
Sava 2011	14.8 ± 1.49^g	11.5 ± 1.19^f
Trijumf 2010	18.2 ± 1.94^{dg}	10.4 ± 0.73^{ef}
Trijumf 2011	21.6 ± 2.07^d	10.1 ± 1.04^e
Favorit 2010	24.5 ± 2.35^k	5.2 ± 0.45^c
Favorit 2011	25.2 ± 2.33^{ck}	9.2 ± 0.93^e

Srednje vrednosti su date sa standardnom greškom.

*-Isto slovo znači da, po datoj varijabili, uzorci pripadaju istoj grupi (izračunato t testom za nezavisne uzorke pri $p = 0.05$)

PRILOG 8.8: Analiza glavnih komponenti za rastvoljivost i podjedinični sastav

Rotirani komponentni matriks

	Komponenta		
	1	2	3
Rastvorljivost na pH 6	-0.931	-0.276	0.337
Rastvorljivost na pH 5	0.912	-0.110	-0.213
β'	0.818	0.118	
11S/7S	0.811	0.478	
Rastvorljivost na pH 3	0.810	0.496	
Bazni polipeptidi		0.927	0.382
α'		0.757	
Kiseli polipeptidi	0.549	0.672	
Rastvorljivost na pH 8	-0.304	-0.655	-0.900
β		0.126	0.860
α	0.157	0.356	
Ukupni proteini	0.541	0.496	
Rastvorni proteini	-0.773	-0.458	0.212

PRILOG 8.9: Analiza glavnih komponenti za rastvorljivost, ESI i EAI:

Rotirani komponentni matriks

	Komponenta		
	1	2	3
ESI na pH5	0.982		-0.143
ESI na pH6	0.928	-0.285	0.136
Rastvorljivost na pH5	-0.886	0.108	0.162
ESI na pH8	0.868	-0.242	-0.215
Rastvorljivost na pH6	0.805	-0.358	-0.422
Rastvorljivost na pH3	-0.617	0.537	0.498
ESI na pH3	-0.587	0.566	0.180
EAI na pH5		0.959	0.172
EAI na pH3	-0.462	0.856	
EAI na pH6	-0.456	0.838	-0.106
EAI na pH8	-0.124	0.737	0.638
Rastvorljivost na pH 8	0.973		-0.176
Ukupni proteini	-0.215	0.456	0.673
Rastvorni proteini	0.785		-0.345

PRILOG 8.10: Analiza glavnih komponenti za pođedični sastav, stepen bubrenja i G'

Rotirani komponentni matriks

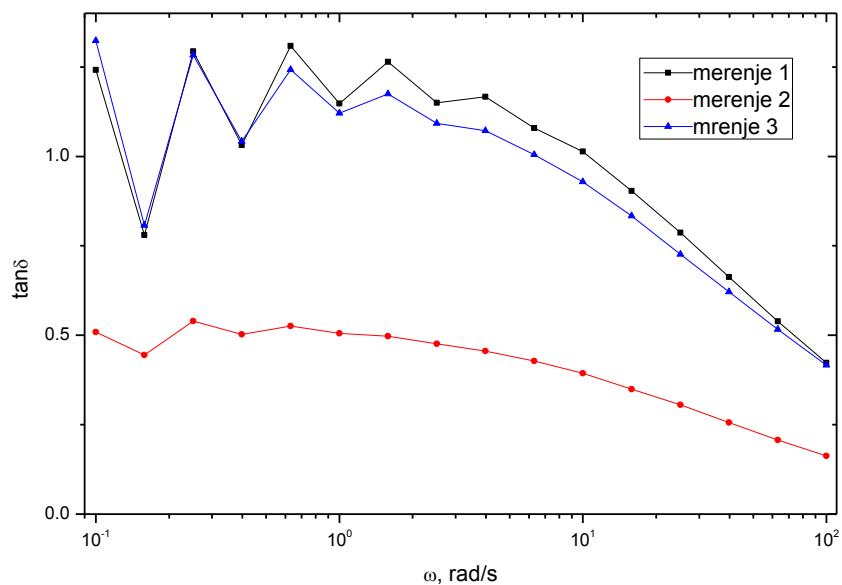
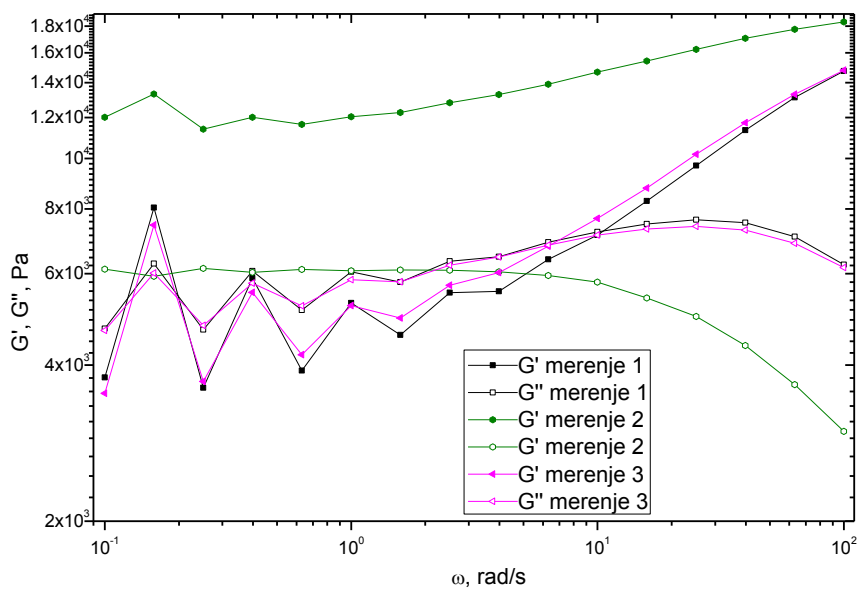
	Komponenta		
	1	2	3
11S/7S	0.951	0.101	0.172
Stepen bubrenja	-0.806	-0.379	
G'	0.796	0.543	
β'	-0.710	0.355	-0.423
Kiseli polipeptidi	0.667	0.494	0.384
β		0.760	
basic	0.463	0.669	0.181
α		-0.169	0.893
α'	0.212	0.337	0.853
Ukupni proteini	0.874	0.232	
Rastvorni proteini	-0.343	-0.584	

PRILOG 8.11: Analiza glavnih komponenti za stepen bubrenja, reološka i emulgujuća svojstva i rastvorljivost

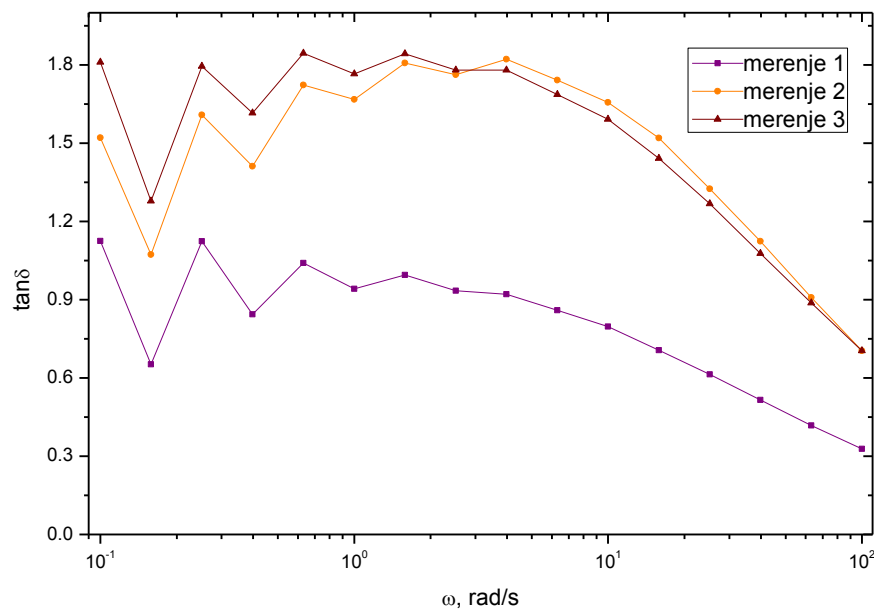
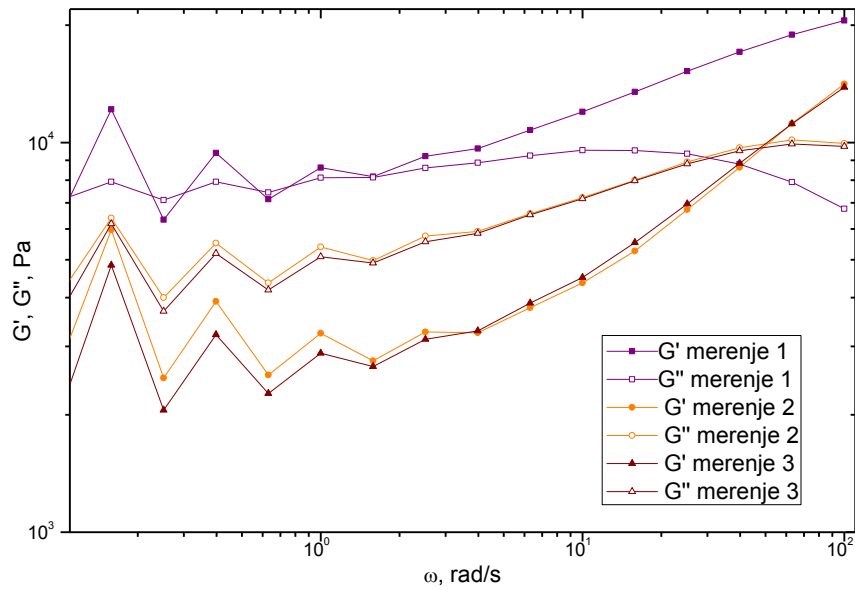
Rotirani komponentni matriks

	Komponenta			
	1	2	3	4
Stepen bubrenja	0.956	0.245		
Rastvorljivost na pH 3	0.924	0.247	0.170	-0.154
EAI na pH6	-0.914			
Rastvorljivost na pH 6	0.902	-0.380		0.159
G'	-0.875	-0.238	0.303	-0.266
Rastvorljivost na pH8	0.695	0.406	0.411	0.110
ESI na pH3		-0.915	-0.249	-0.107
ESI na pH 6	0.267	0.770	-0.413	-0.280
Rastvorljivost na pH5	-0.583	0.636	-0.384	
EAI na pH 3	-0.353	-0.506	0.280	-0.378
EAI na pH 5		0.135	-0.934	
ESI at pH 8	0.296	0.268	0.624	-0.620
EAI at pH 8		0.181	-0.170	0.884
ESI at pH5	0.244		0.298	0.717
Ukupni proteini	-0.639		0.412	0.320
Rastvorni proteini	0.761	0.232	-0.103	-0.116

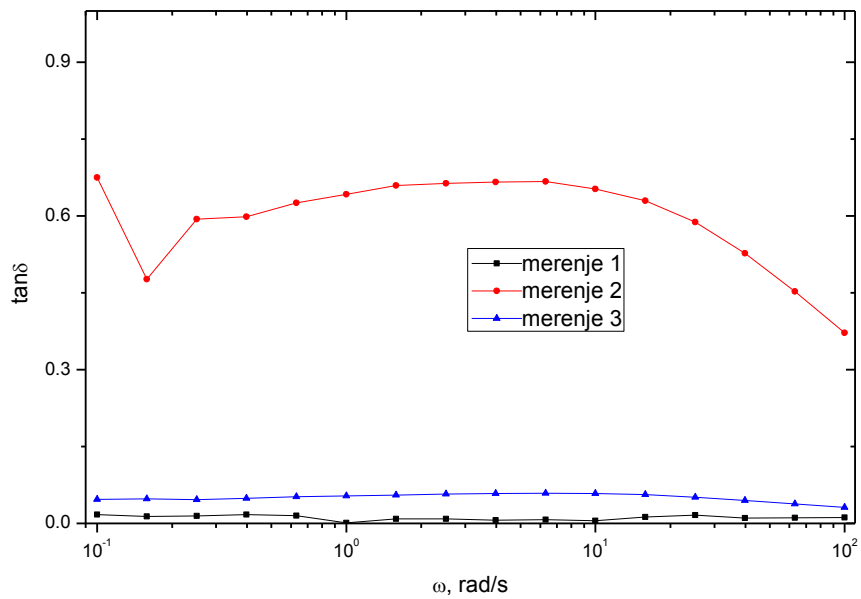
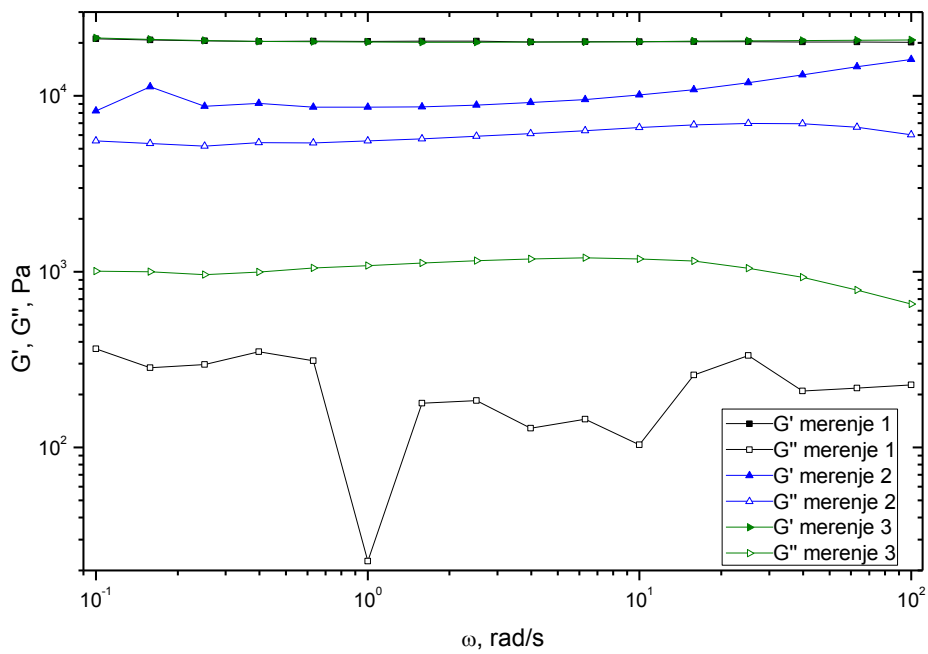
PRILOG 8.12: Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za pojedinačne uzorke



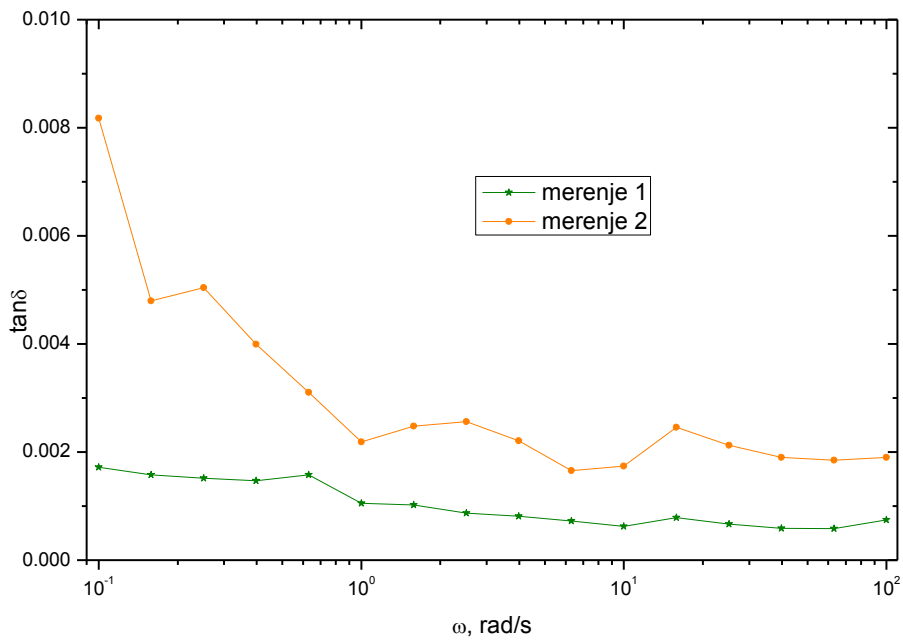
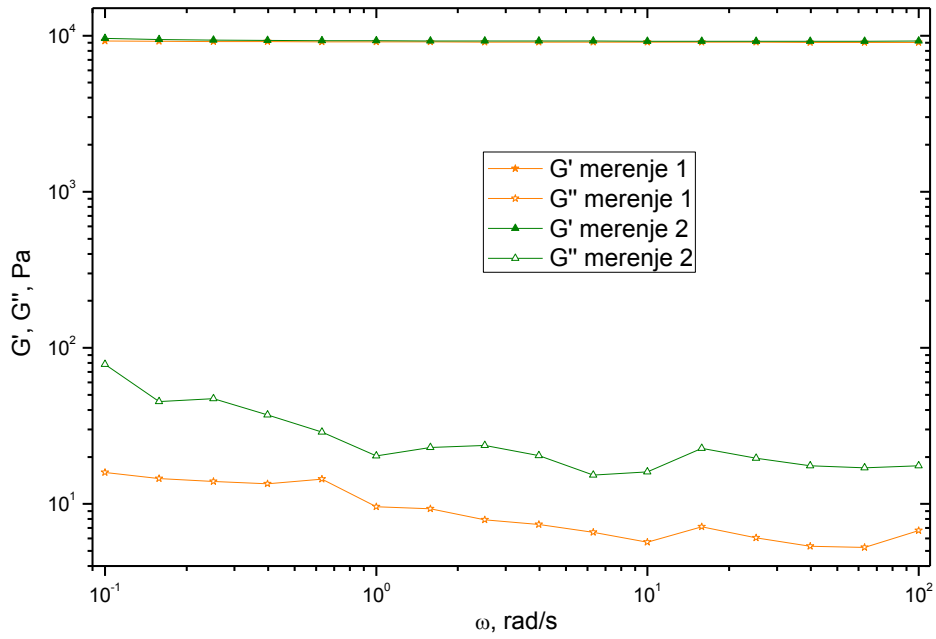
Slika 8.12.1. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Sava 2011



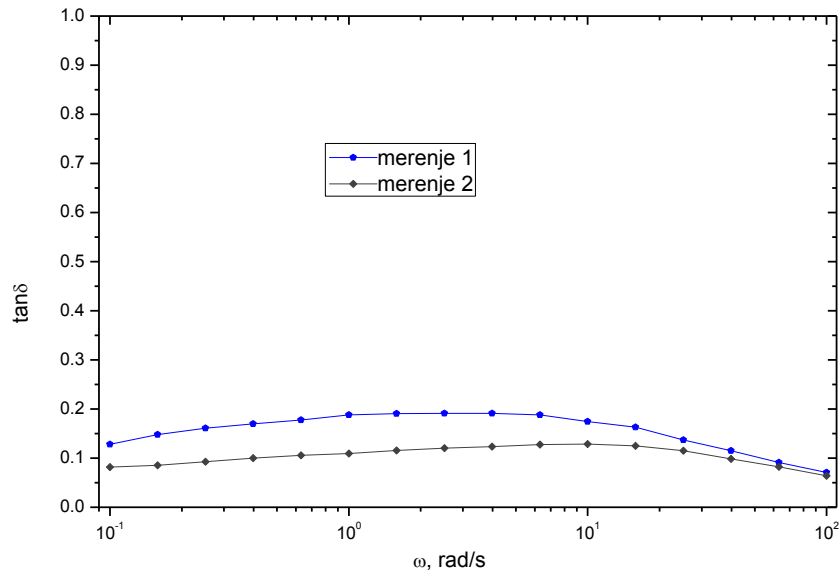
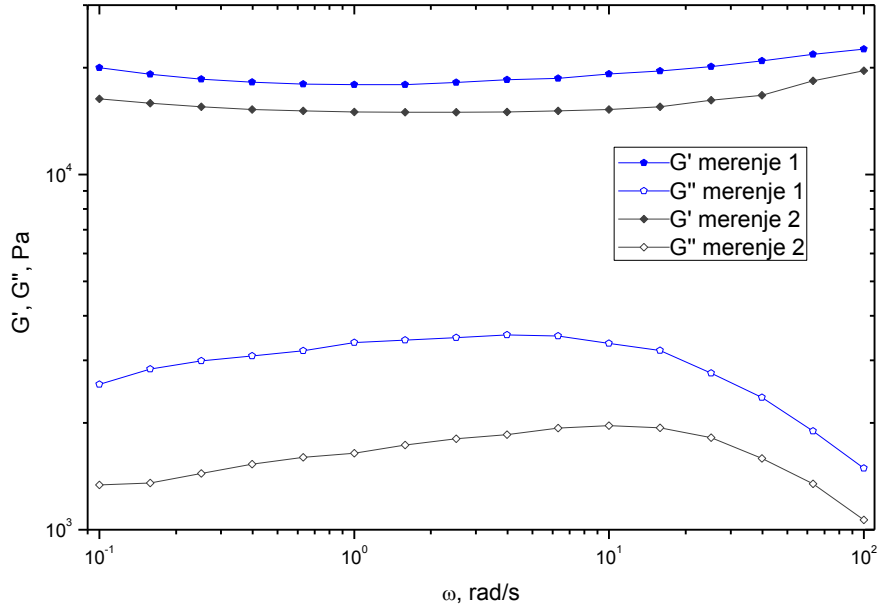
Slika 8.12.2. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Trijumf 2011



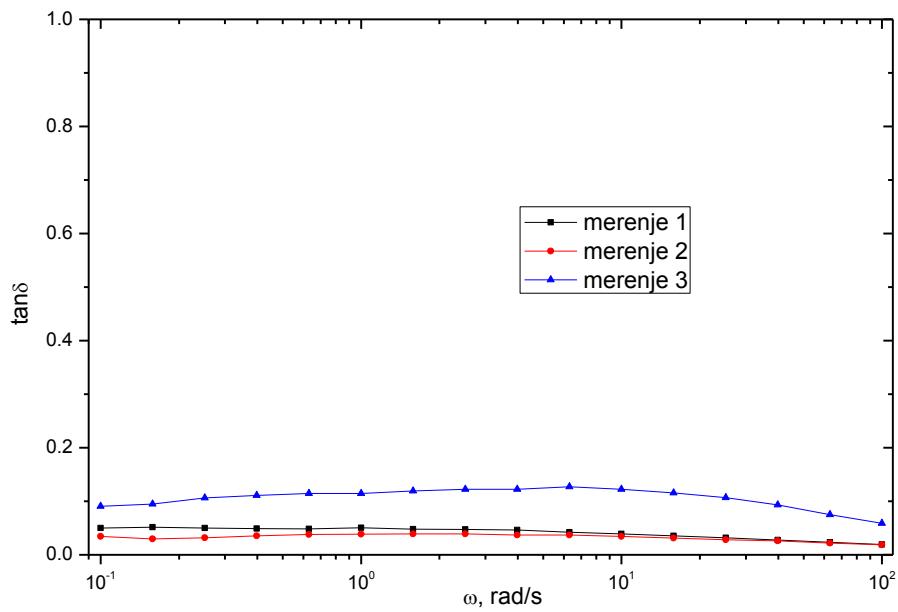
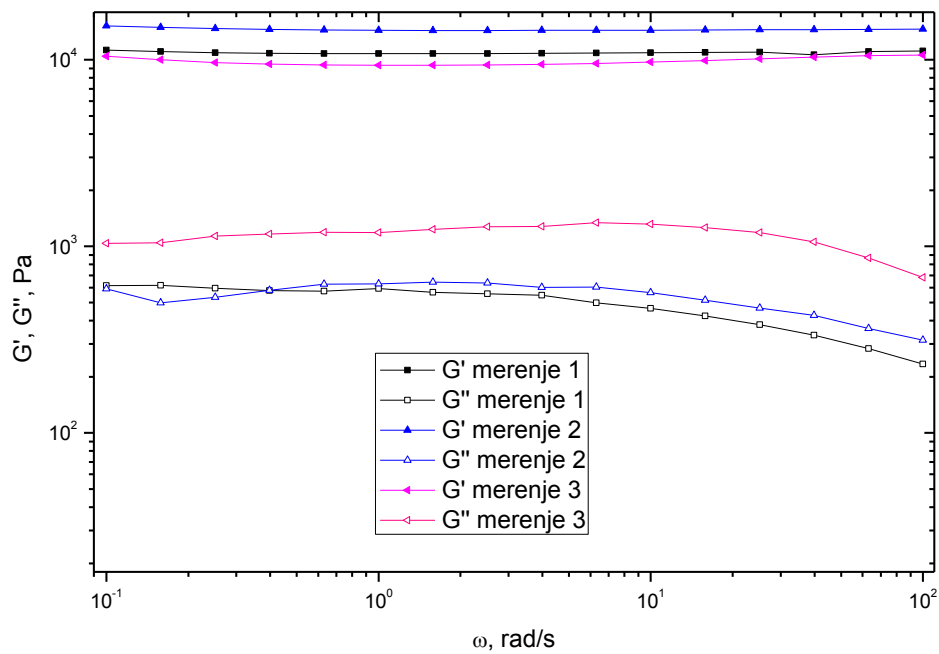
Slika 8.12.3. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Novosađanka 2010



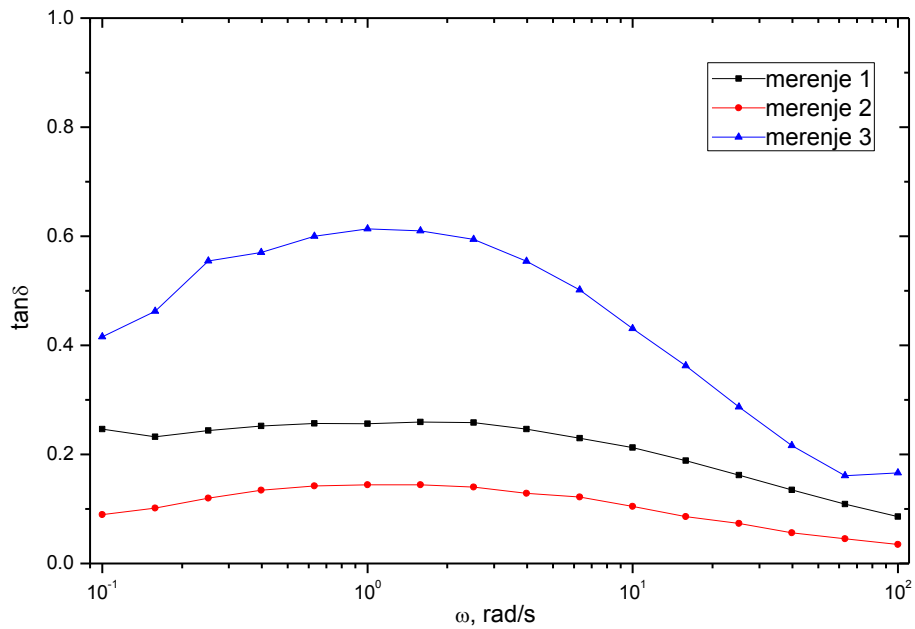
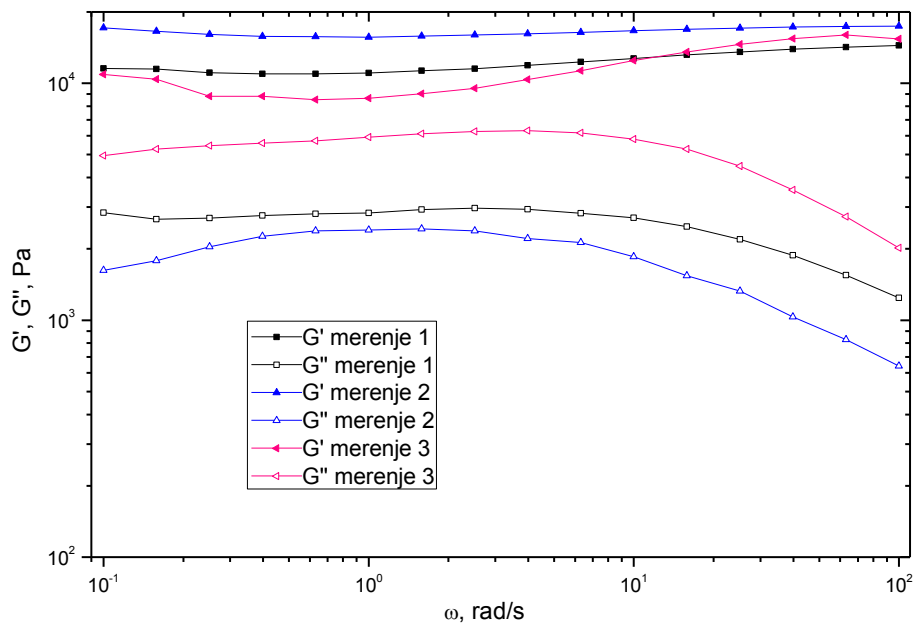
Slika 8.12.4. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Vojvodanka 2010



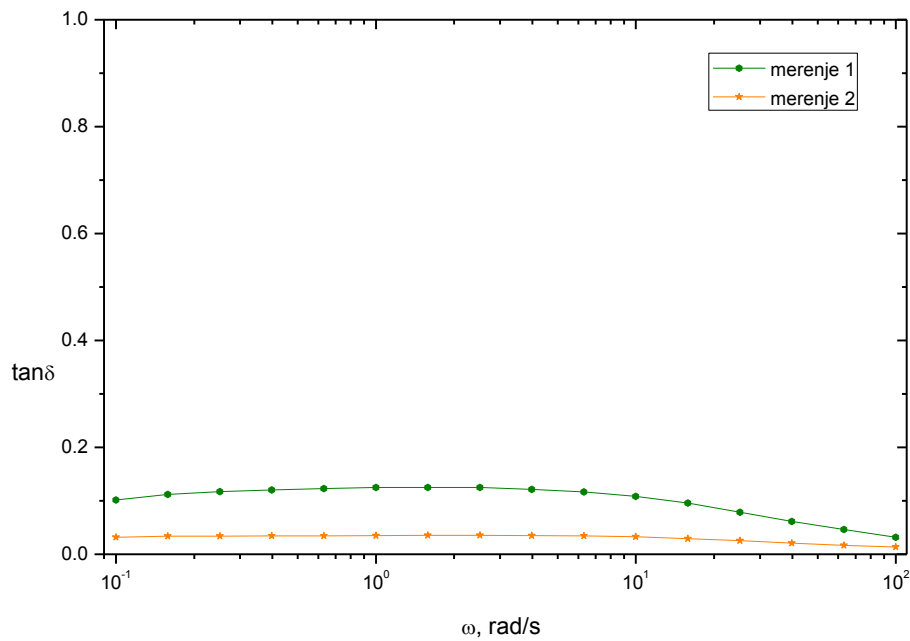
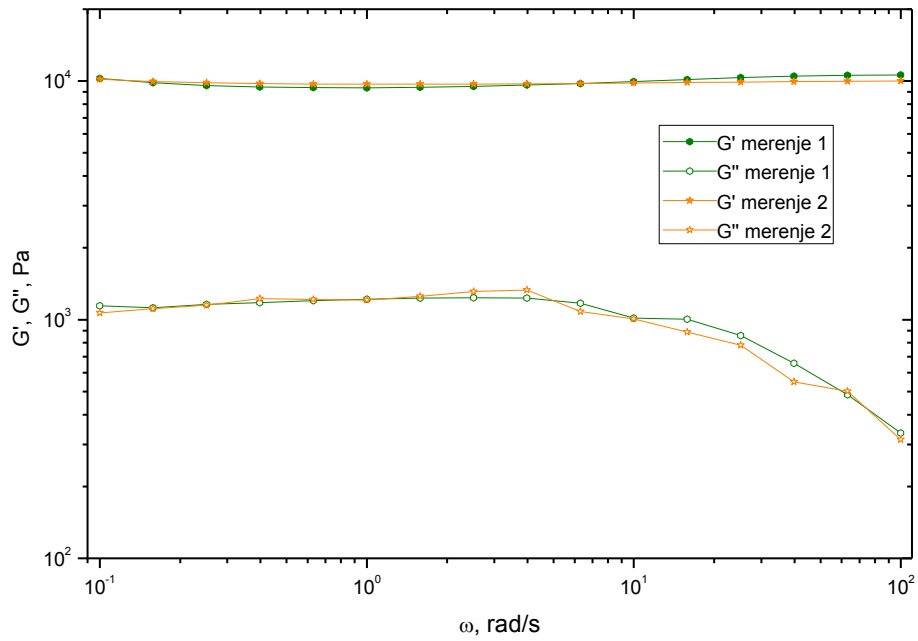
Slika 8.12.5. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak - Proteus 2011



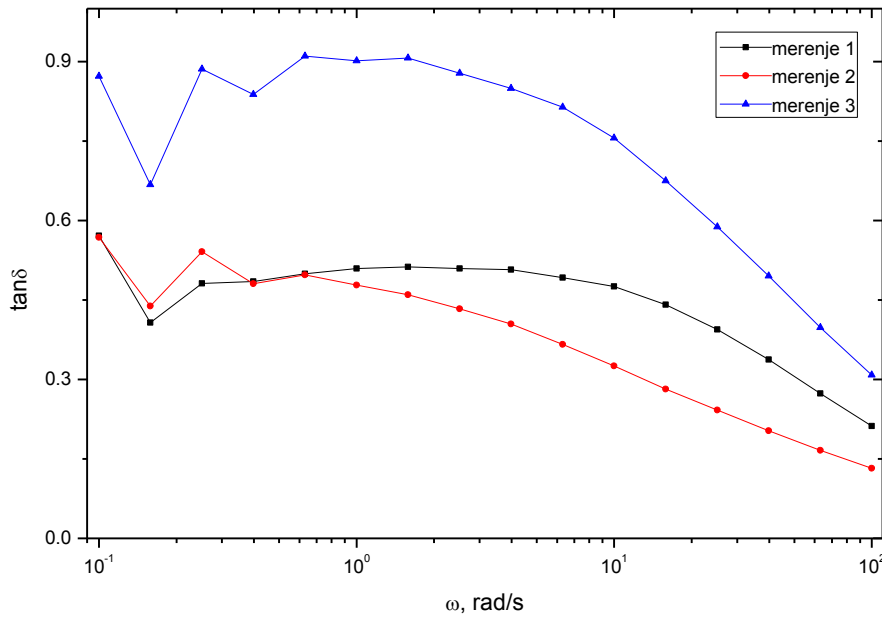
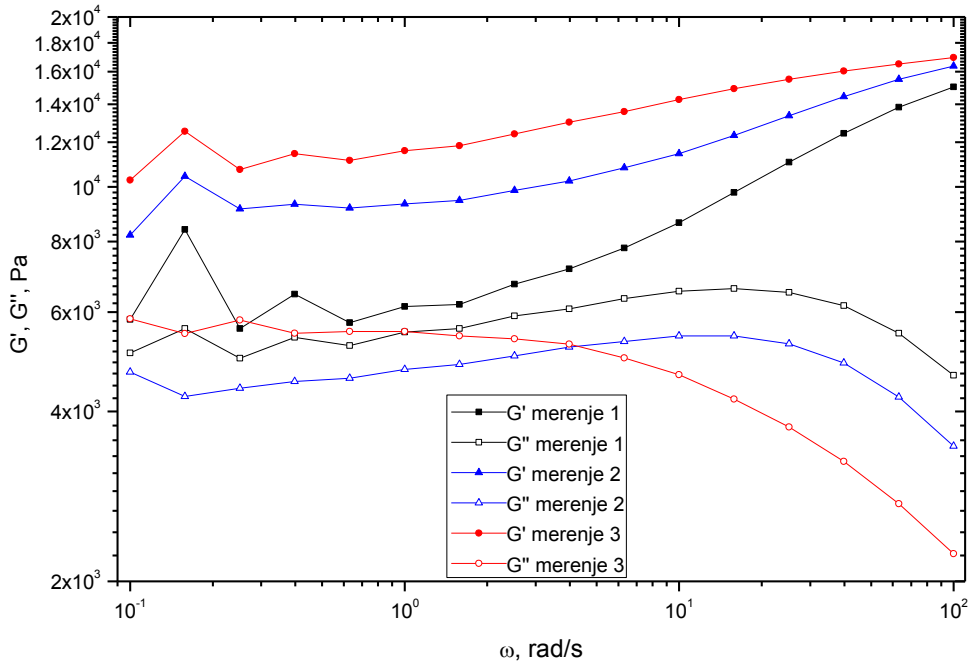
Slika 8.12.6. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Maple Glen 2010



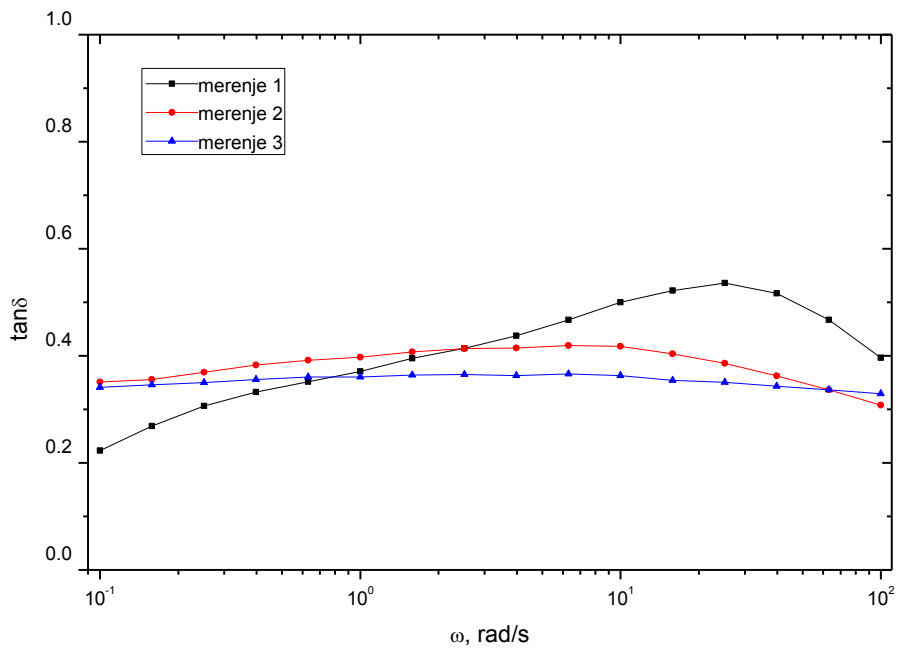
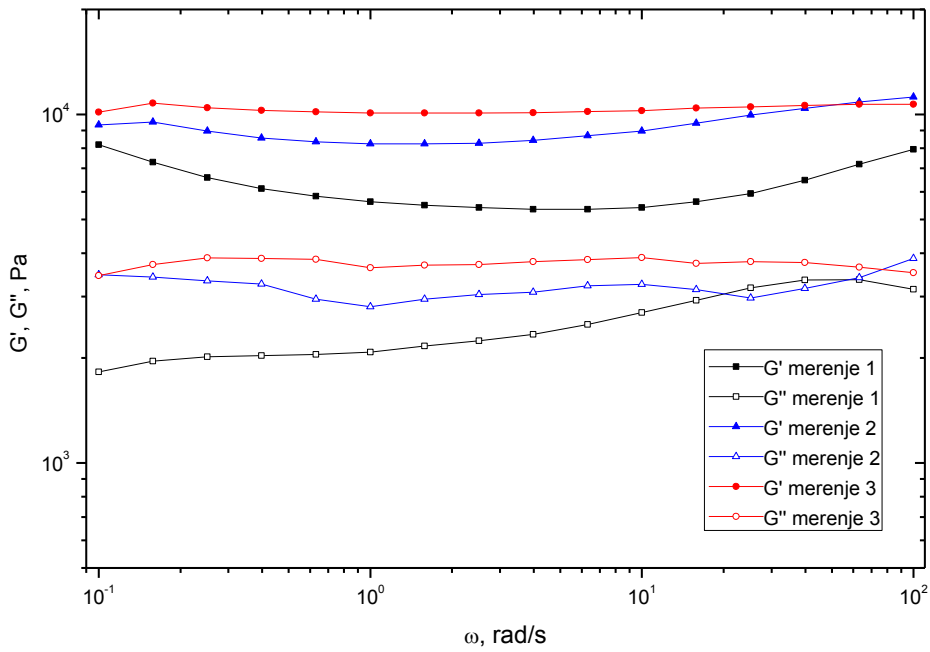
Slika 8.12.7. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za Uzorak – Sava 2010



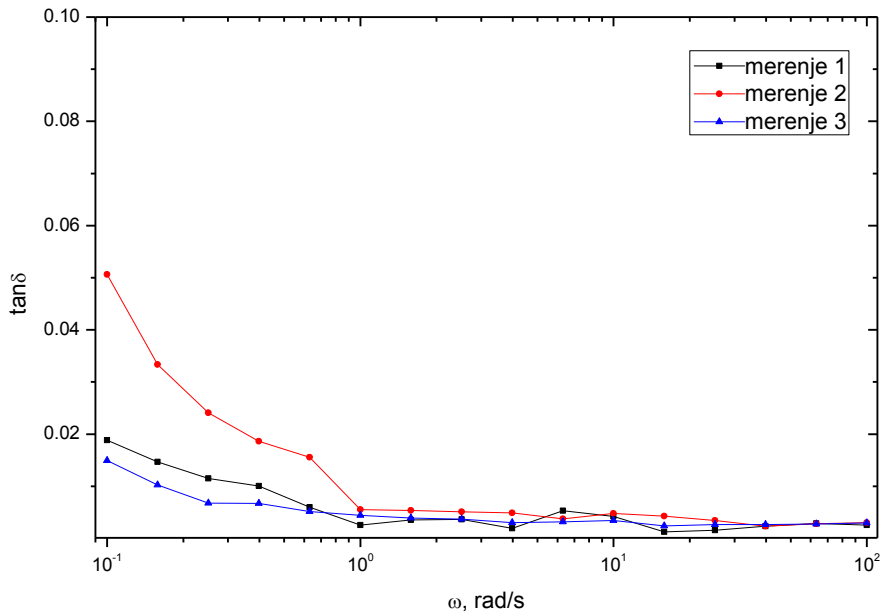
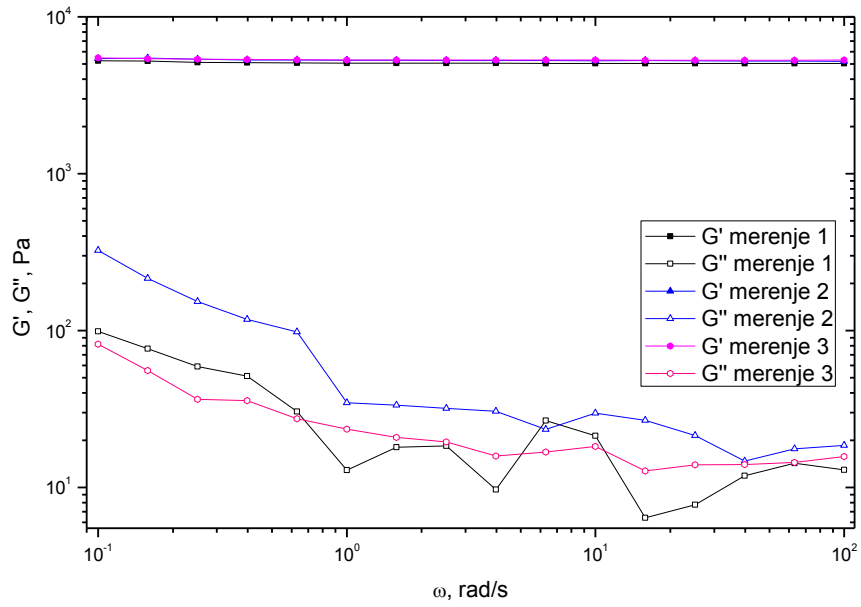
Slika 8.12.8. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Trijumf 2010



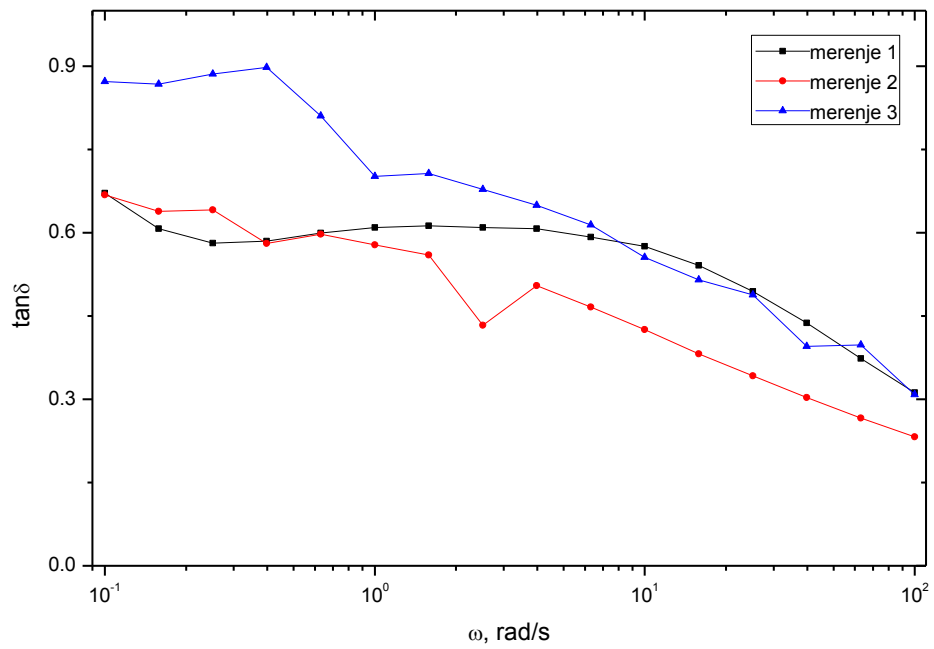
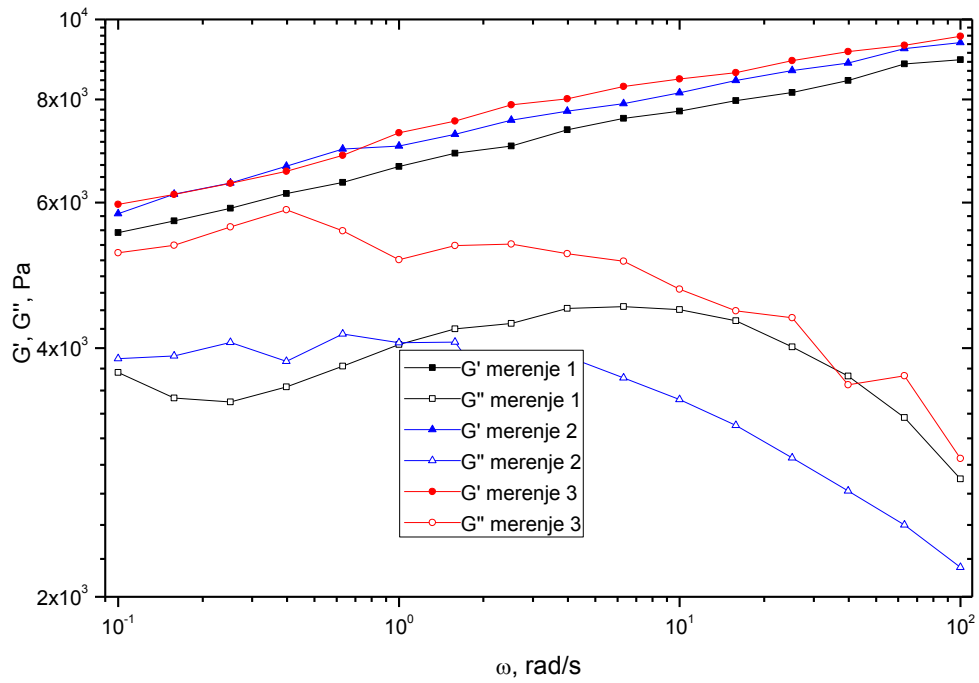
Slika 8.12.9. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Novosađanka 2011



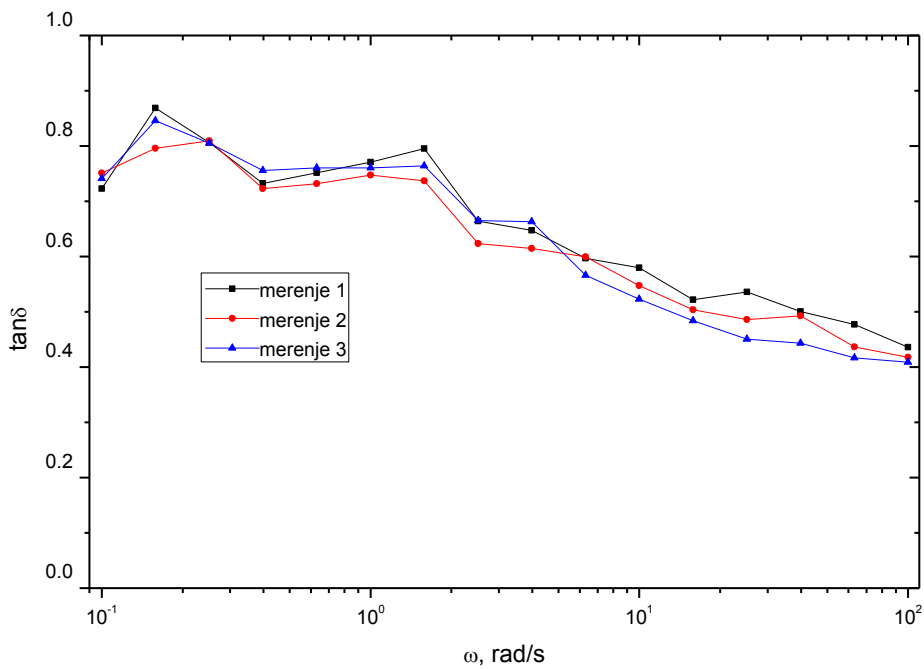
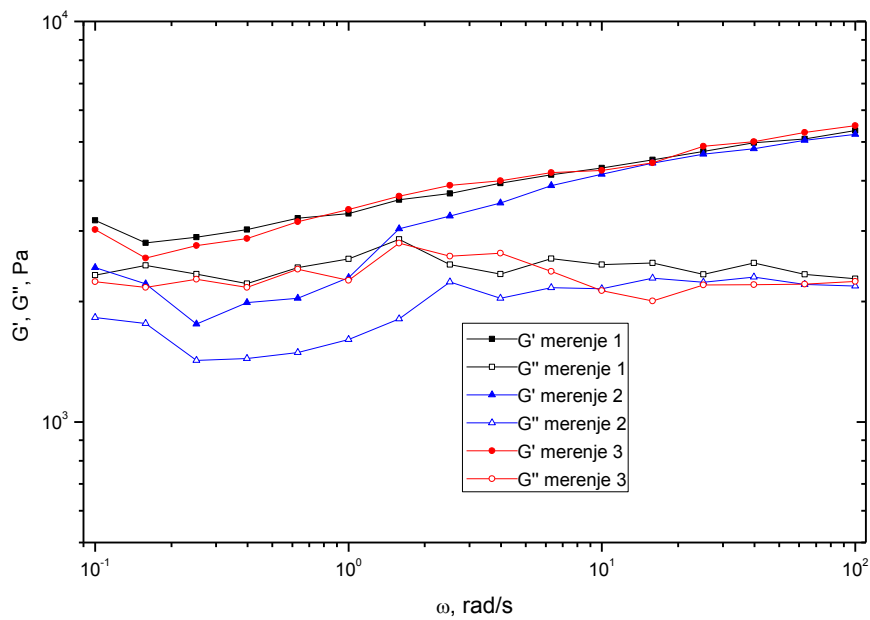
Slika 8.12.10. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Maple Glen 2010



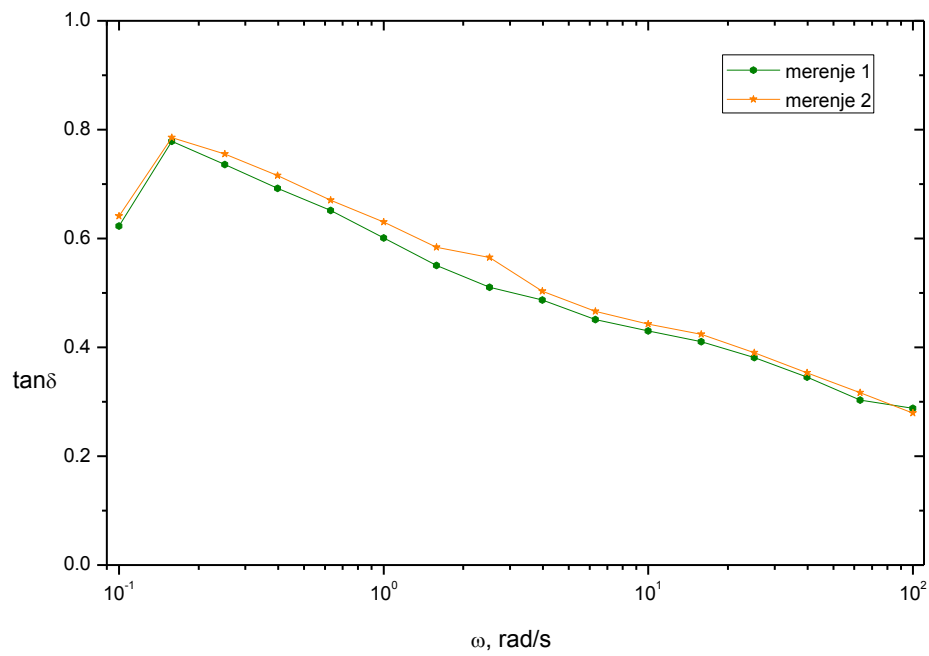
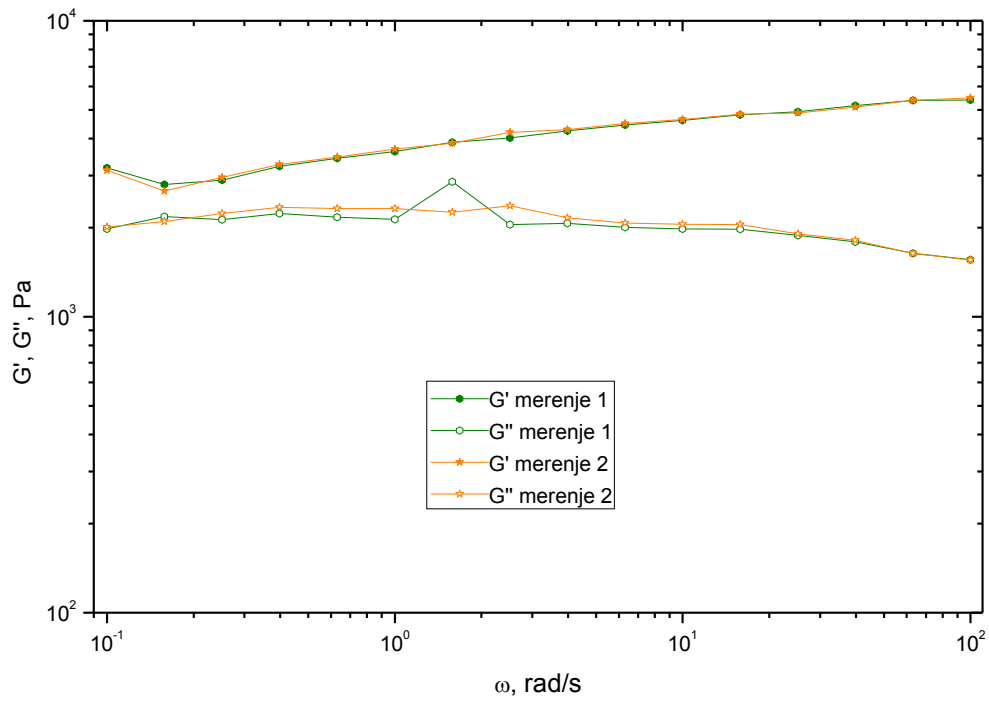
Slika 8.12.11. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Favorit 2010



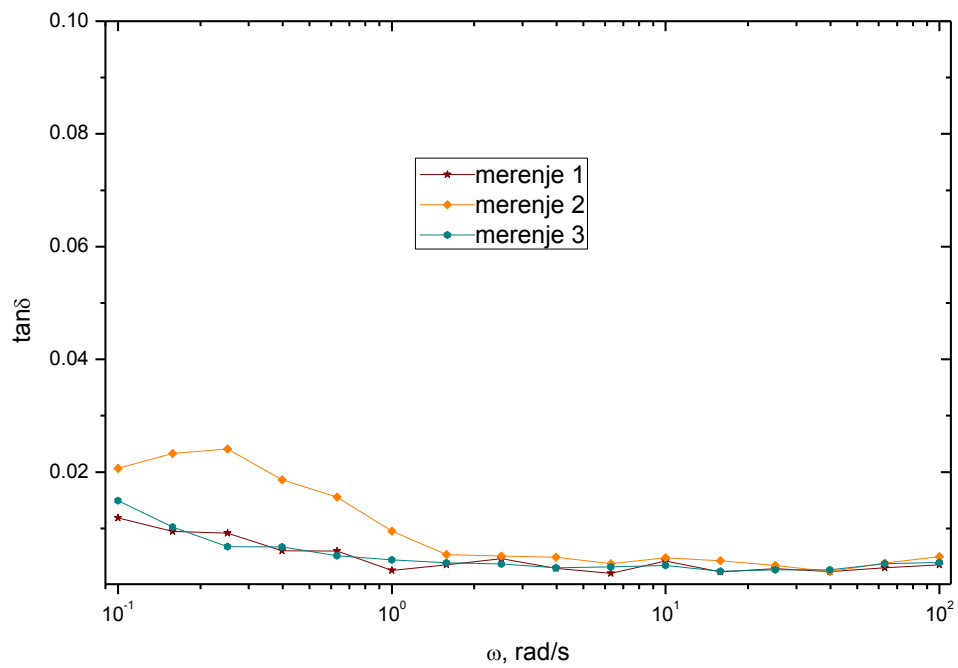
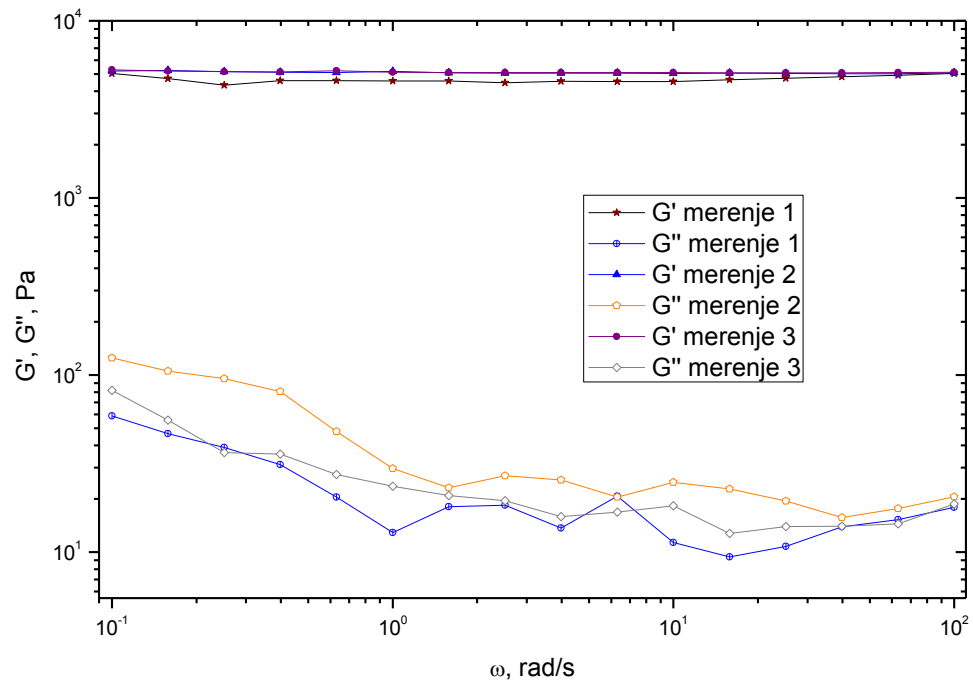
Slika 8.12.12. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Favorit 2011



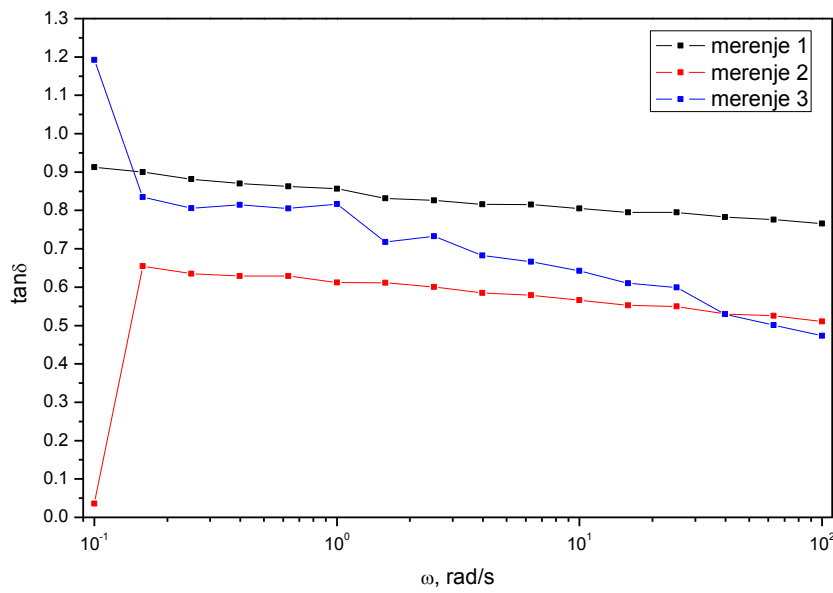
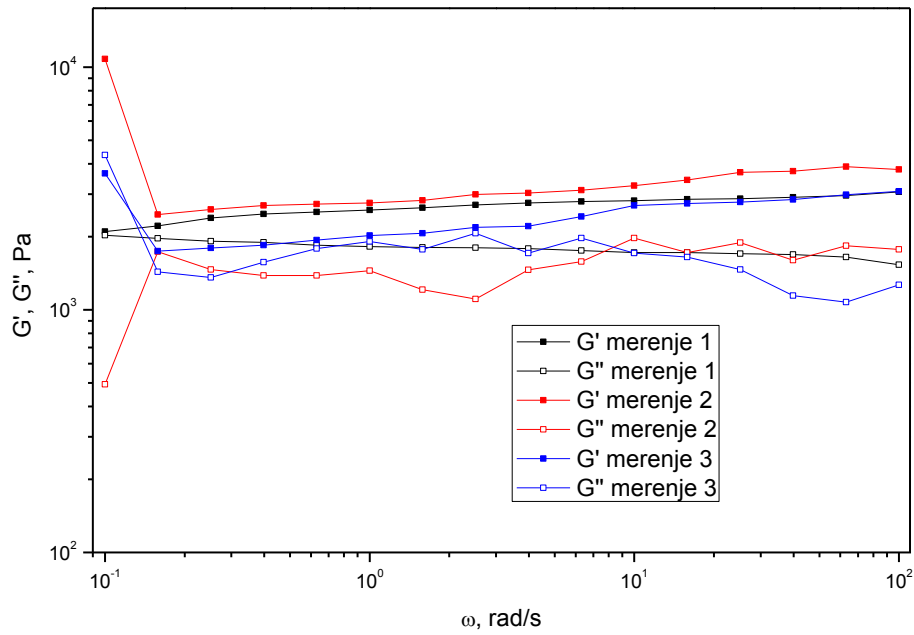
Slika 8.12.13. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Valjevka 2011



Slika 8.12.14. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Vojvođanka 2010



Slika 8.12.15. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Amaviskaja 2010



Slika 8. 12. 16. Vrednosti G' , G'' i $\tan \delta$ za uzorak Armaviskaja 2011

9. Literatura

1. AACC(2000). Crude Protein-micro Kjeldhal method. In *Approved methods of the AACC* (Vol-II, 10th ed.) AACC method 46-13.
2. AACC (2000). Moisture and volatile matter in soy flours. In *Approved methods of the AACC* (Vol-II, 10th ed.) AACC method 44-31.
3. Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S., Itoh N., Shibuya M, Fukami Y. (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 262(12): 5592-5595.
4. Alvarez P., Ramaswamy H., Ismail A. (2008) High pressure gelation of soy proteins: Effect of concentration, pH and additives. *Journal of Food Engineering*, 88(3): 331–340.
5. Amigo-Benavent M., Athanasopoulos V.I., Ferranti P., Villamiel M., Dolores del Castillo M. (2009) Carbohydrate moieties on the in vitro immunoreactivity of soy β -conglycinin. *Food Research International*, 42: 819–825.
6. Amigo-Benavent M., Clemente A., Ferranti P., Caira S. and Dolores del Castillo M. (2011) Digestibility and immunoreactivity of soybean β -conglycinin and its deglycosylated form. *Food Chemistry*, 129(4): 1598–1605.
7. Anthony M., Clarckson T., Hughes C., Morgan T., Burke G. (1996) Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus. *The Journal of Nutrition*, 126: 43-50.
8. Aoyama T., Kohno M., Saito T. (2001) Reduction by phytate-reduced soybean conglycinin of plasma triglyceride level of young and adult rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65: 1071–1075.
9. Badger T.M., Ronis M.J.J., Simmen R., Simmen F. (2005) Soy protein isolate and protection against cancer. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(2): 146S-149S.
10. Bainy E. M., Tosh S.M., Corredig M., Woodrow L., Poysa V. (2008) Protein subunit composition effects on the thermal denaturation at different stages during

- the soy protein isolate processing and gelation profiles of soy protein isolates. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 85:581–590.
11. Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D., Carlson J. (1990) Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Progress in Clinical and Biological Research*, 347: 239-253.
 12. Berkelman T., Stenstedt T., Bjellqvist B., Laird N., McDowell M., Olsson I., Westermeier R. (1998) 2D Electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and methods, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ,.
 13. Bernard E.C., Grandison A.S., Lewis M.J. (2001) Emulsifying properties of soy protein isolate fractions obtained by isoelectric precipitation. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81: 759–763.
 14. Bin Mohamed S.R., Maruyama N., Takahashi K., Yagasaki K., Higasa T., Matsumura Y., Utsumi S.(2004) Gelling properties of soybean β Conglycinin having different subunit compositions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(5): 1091-109.
 15. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
 16. Brandon D.L., Friedman M. (2002) Immunoassays of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:6635-6642.
 17. Burks A. W., Castell H. B., Fiedorek S. C., Williams L. W., Connaughton C., Brooks, J. R. (1989) Enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting determination of antibody response to major component proteins of soybeans in patients with soy protein intolerance. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 8:195-203.
 18. Cabanes, A., Wang, M., Olivo, S.DeAssis, S., Gustafsson, J-A., Khan, G., Hilakivi-Clarke, L.(2004) Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 25 (5):741-748.

19. Cai T., Chang K. C. (1999) Processing effect on soybean storage proteins and their relationship with tofu quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 720–727.
20. Carrette O. Burkhard P.B., Sanchez J.C. Hochstrasser D.F. (2006) State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nature Protocols*, 1: 812–823.
21. Cassidy, A., Griffin, B. (1999) Phyto-oestrogens: a potential role in the prevention of CHD? *Proceedings of Nutrition Society*, 58: 193–199.
22. Cederroth C.R., Vinciguerra, M., Gjinovci A., Kühne, F., Klein, M., Cederroth M., Caille D., Suter M., Neumann, D., James, R.W., Doerge, D.R., Wallimann T., Meda P., Foti M., Rohner-Jeanrenaud F., Vassalli J.D., Nef, S. (2008) Dietary Phytoestrogens Activate AMP-Activated Protein Kinase With Improvement in Lipid and Glucose Metabolism. *Diabetes*, 57(5): 1176–1185.
23. Chen F., Hao Y., Piao X. S., Ma X, Wu G. Y., Qiao S. Y., Li D. F and Wang J. J. (2011) Soybean-derived β -conglycinin affects proteome expression in pig intestinal cells *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 89:743-753.
24. Chove B.E., Grandison A.S., Lewis M.J. (2007) Some functional properties of fractionated soy protein isolates obtained by microfiltration. *Food Hydrocolloids*, 21(8): 1379-1388.
25. Coates J.B., Medeiros J.S., Thanh V.H., Nielsen N.C. (1985) Characterization of the subunits of β -conglycinin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 243(1): 184-194.
26. Cordier-Bussat M., Bernard C., Haouche S., Roche C., Abello J., Chayvialle J. A., Cuber, J. C. (1997) Peptones stimulate cholecystokinin secretion and gene transcription in the intestinal cell line STC-1. *Endocrinology*, 138: 1137–1144.
27. Craig WJ. (1997) Phytochemicals: Guardians of our health. *Journal of American Dietary Association*, 97:199-204.
28. Cramp G.L., Kwanuyen P., Daubert C.R. (2008) Molecular interactions and functionality of a cold-gelling soy protein isolate. *Journal of Food Science*, 73(1): E16-24.

29. De Mejia E., Martinez-Villaluenga C., Roman M., Bringe N.A. (2010). Fatty acid synthase and *in vitro* adipogenic response of human adipocytes inhibited by α and α' subunits of soybean β -conglycinin hydrolysates. *Food Chemistry*, 119 (4): 1571-1577.
30. Diaz K., Mayers D.J. Bian Y., Lihono M.A., Wu S., Murphy P. (2003) Functional properties of acidic and basic subunits of glycinin (11S) soy protein fraction. *Journal of American Oil Chemisist's Society*, 80:551-555.
31. Dillingham B.L., McVeigh B.L., Lampe J.W., Duncan A.M. (2005). Soy protein isolates of varying isoflavone content exert minor effects on serum reproductive hormones in healthy young men. *The Journal of Nutrution*, 135(3):584-591.
32. Divi R.L., Chang H.C., Doerge, D.R. (1997). Identification, characterization and mechanisms of anti-thyroid activity of isoflavones from soybean. *Biochemical Pharmacology*, 54: 1087- 1096.
33. Divi R.L., Doerge D.R. (1996). Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chemical Research in Toxicology*, 9:16-23.
34. Dornbos D.J.R, Mullen R.E.(1992) Soybean seed protein and oil contents and fatty acid composition adustments by drought and temperature. *Journal of American Oil Chemisist's Society*, 69: 228-231.
35. Duffy R., Jarret N., Fluck E., Cassey K, File S., Wiseman H. (2001). Dietary soy improves memory in humans. 4th International Symposium on the role of soy in preventing chronic disease. San Diego, California.
36. Duffy R., Wiseman H, File S. (2003). Improved cognitive function in postmenopausal women after 12 weeks of consumption of a soya extract containing isoflavones. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75(3):721–729.
37. Duke, W. W. (1934). Soybean as a possible important source of allergy. *Journal of Allergy*, 5: 300-302.
38. Duncan AM. , Underhill KE, Xu X, Lavalleur J, Phipps WR., Kurzer MS.(1999) Modest hormonal effects of soy isoflavones in postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10):3479-3484.

39. Đorđević V. (2010) Biohemijske promene visokoproteinskih genotipova soje. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
40. Fabre F, Planchon C. (2000) Nitrogen nutrition, yield and protein content in soybean. *Plant Science*, 152: 51-58.
41. Fehr W. R., Hoeck J.A., Johnson S.L., Murphy P.A., Nott J.D., Padilla G.I. and Welke G.A.(2003) Genotype and Enviromental Influence on Protein Components of Soybean. *Crop Science*, 43:511-4.
42. Felix A., Hill R.A. and Diarra B.(1990) *In vitro* and *in vivo* digestibility of soya-bean straw treated with various alkalis. *Animal Production*, 51(1): 47-61.
43. Ferreira E.S., Silva M.A., Demonte A. and Neves V.A.(2012) β conglycinin combined with fenofibrate or rosuvastatin have exerted distinct hypocholesterolemic effects in rats. *Lipids in Health and Disease*, 11: 11-18.
44. Fling, S.P.; Gregerson, D.S. (1986) Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity Tris buffer system without urea. *Analytical Biochemistry*, 155: 83–88.
45. Fukui K., Kojima M., Tachibana N. (2004) Effects of soybean conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68: 1153–1155.
46. Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vanderkerckhove, J., Job, D.(2001) Proteomic Analysis of Arabidopsis Seed Germination and Priming. *Plant Physiology*, 126: 835–848.
47. Gayler K.R, Sykes G.E.(1981) β -conglycinin in developing soybean seeds. *Plant Physiology*, 67: 958-961.
48. Görg, A., Drews, O., Luck, C., Weiland, F., Weiss, W. (2009) 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, 30: S122-S132.
49. Guillon, F., Champ, M.M.J. (2002) Carbohydrate fractions of legumes: uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*, 88: 293-306.
50. Hajduch, M., Ganapathy, A., Stein, J.W., Thelen, J.J. (2005) A Systematic Proteomic Study of Seed Filling in Soybean. Establishment of High-Resolution

- Two-Dimensional Reference Maps, Expression Profiles, and an Interactive Proteome Database. *Plant Physiology*, 137(4):1397-1419.
51. Harada J.J, Barker S.J, Goldberg R.B.(1989) Soybean β -conglycinin genes are clustered in several DNA regions and are regulated by transcriptional and posttranscriptional processes. *Plant Cell*, 1: 415–425.
 52. Hawrylewicz, E. J., Huang, H. H. & Blair, W. H.(1991) Dietary soybean isolate and methionine supplementation affect mammary tumor progression in rats. *Journal of Nutrition*, 121:1693-1698.
 53. Herman, E.M., Helm, R.M., Jung, R., Kinney, A.J.(2003) Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean, *Plant Physiology*, 132:36–43.
 54. Hermansson A.M., Sivik E. and Skjoldernbrand E. (1971) Functional properties of proteins for food- factors affecting solubility, foaming and swelling of fish protein concentrate. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie*, 4: 201.
 55. Hermansson A.M. (1985) Structure of soya glycinin and conglycinin gels. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 36: 822–832.
 56. Hill J.E, Breidenbach R.W.(1974) Proteins of soybean seed. Isolation and characterization of major components. *Plant Physiology*, 53:742-746.
 57. Hira T., Mori N., Nakamori T., Furuta H., Asano K., Chiba H., Hara H. (2011). Acute effect of soybean β -conglycinin hydrolysate ingestion on appetite sensations in healthy humans. *Appetite*, 57: 765–768.
 58. Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., Görgün CZ., Uysal KT., Maeda K., Karin M., Hotamisligil GS.(2002)A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420 (6913): 333-336.
 59. Hou H.J., Chang K.C. (2004) Structural Characteristics of Purified β -Conglycinin from soybeans stored under four Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 7931-7937.
 60. Hurkman W., Tanaka C.(1986)Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant physiology*, 81: 802-806.

61. Iwabuchi S., Watanabe H. and Yamauchi F. (1991) Thermal Denaturation of β conglycinin. Kinetic Resolution of Reaction Mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39: 27-33.
62. Jang E.H, Ko J.H, Ahn C.W., Lee H.H., Shin J.K., Chang S.J., Park C.S., Kang J.K.(2010) *In vivo* and *in vitro* application of black soybean peptides in the amelioration of endoplasmic reticulum stress and improvement of insulin resistance; *Life Sciences*, 86: 267–274.
63. Jang E-H., Moon J-S., Ko J.H., Ahn C-W., Lee H-H., Shin J-K., Park C-S. Kang J-H. (2008) Novel black soy peptides with antiobesity effects: activation of leptin-like signaling and AMP-activated protein kinase. *International Journal of Obesity*, 32: 1161–1170.
64. Jiang, J., Chen, J. and Xiong, Y.L.(2009) Emulsifying Properties of Soy Protein Isolate Subjected to Acid and Alkaline pH-Shifting Processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (16): 7576–7583.
65. Johnson, I.T. (2000) Anti-tumour properties in Functional Foods. Woodhead Publishing, Cambridge, England, 141-162.
66. Jung, S., Murphy, P. A. and Johnson, L. A.(2005) Physicochemical and Functional Properties of Soy Protein Substrates Modified by Low Levels of Protease Hydrolysis. *Journal of Food Science*, 70: C180–C187.
67. Keerati-u-raia M., Miriania M., Iametti S., Bonomib F., Corrediga M. (2012) Structural changes of soy proteins at the oil–water interface studied by fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 93: 41– 48.
68. Kennedy A. R.(1998) The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68: 1406S-1412S.
69. Kenny AM., Mangano KM., Abourizk RH., Bruno RS., Anamani DE., Kleppinger A., Walsh SJ., Prestwood KM., Kerstetter JE. (2009). Soy proteins and isoflavones affect bone mineral density in older women: a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition*, 90(1):234-242.

70. Ker Y.C. and Chen R.H. (1998) Shear-induced Conformational Changes and Gelation of Soy Protein Isolate Suspensions. *Food Science and Technology*, 31(2): 107–113.
71. Komatsu, S., Ahsan, N.(2009) Soybean proteomics and its application to functional analysis.*Journal of proteomics*, 72: 325-336.
72. Kreijkamp-Kaspers S., Kok L., Grobbee DE., de Haan EH., Aleman A., Lampe JW., van der Schouw YT.(2004). Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial.*The Journal of the American Medical Association*,292(1):65-74.
73. Krisnan H.B., Natrajan S.S., Mahmud A. A., Nelson R. L.(2007) Identification of Glycinin and β Conglycinin Subunits that Contribute to the increased protein content of high protein soybean Lines. *J. Agric. Food. Chem.*,55:1839-1845.
74. Krishnan H.B., Kim W.S., Jang S., Kerley M.S. (2009) All Three Subunits of Soybean conglycinin are potential food allergens. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 938–943.
75. Kurzer M.S. (2002). Hormonal effects of soy in premenopausal women and men.*The Journal of Nutrition*, 132(3):570S-573S.
76. Laemmli, U. (1970)Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature*,227:680–685.
77. Lakemond, C., Jongh, H., Hessing, M., Gruppen, H., Vorgen,A. (2000). Soy Glycinin: Influence of pH and ionic strength on solubility and molecular structure at ambient temperatures..*J. Agric. Food Chem.*, 48 (6), 1985–1990.
78. Lamartiniere C. A., Cotroneo M.S., Fritz W.A., Wang J., Mentor-Marcel R. and Elgavish A.(2002) Genistein Chemoprevention: Timing and Mechanisms of Action in Murine Mammary and Prostate. *Journal of Nutrition* ,132: 552–558.
79. Lee, D.G., Houston, N.L., Stevenson, S.E., Ladics, G.S., McClain, S. Thelen, J.J.(2010) Mass spectrometry analysis of soybean seed proteins: optimization of gel-free quantitative workflow. *Analytical Methods*, 2: 1577–1583.

80. Lessard P.A., Allen R.D., Bernier F., Crispino J.D., Fujiwara T., Beachy R.N. (1991) Multiple nuclear factors interact with upstream sequences of differentially regulated beta-conglycinin genes. *Plant Molecular Biology*, 16(3): 397-413.
81. Li Y., Owyang C (1996). Peptone stimulates CCK-releasing peptide secretion by activating intestinal submucosal cholinergic neurons. *The Journal of Clinical Investigation*, 97(6): 1463–1470.
82. Liddle, R. A. (1995) Regulation of cholecystokinin secretion by intraluminal releasing factors. *American Journal of Physiology*, 269: G319–G327.
83. Liu D., Zhen W., Yang Z., Carter JD., Si H., Reynolds, KA. (2006). Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β -cells through cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes*, 55:1043–1050.
84. Liu, J. B., Sam K. C. Chang and D. Wiesenborn. (2005) Antioxidant properties of soybean isoflavone extract and tofu in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53:2333-2340.
85. Liu J., Ho S.C., Su Y., Chen W., Cai-xia Z., Dhen Y. (2009). Effect of long-term intervention of soy isoflavones on bone mineral density in women: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone*, 44: 948–953.
86. Liua C., Yanga X.Q., Ahmadb I., Tanga C.H., Lia L., Zhua J.H., Qia J.R. (2011) Rheological Properties of Soybean β -Conglycinin in Aqueous Dispersions: Effects of Concentration, Ionic Strength and Thermal Treatment. *International Journal of Food Properties*, 14(2): 264-279.
87. Lu L.J., Anderson K., Grady J., Nagamani M. (2001) Effects of an isoflavone-free soy diet on ovarian hormones in premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86 (7): 3045-3052.
88. Magdeldin, S., Zhang Y., Yoshida Y. Yamamoto, T. (2012) Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis – A Practical Perspective. Gel electrophoresis- Principles and basics. Chapter 7. Edited by Sameh Magdelin. Publisher: InTech.
89. Manzoni C., Duranti M., Eberini I., Scharnag H., März W., Castiglioni S. and Lovati M.R. (2003) Subcellular Localization of Soybean 7S Globulin in HepG2

- Cells and LDL Receptor Up-Regulation by Its α Constituent Subunit; *Journal of Nutrition*, 133: 2149–2155.
90. Martinez-Villaluenga C., Dia VP., Berhow M., Bringe N.A., Gonzalez de Mejia E. (2009). Protein hydrolysates from β -conglycinin enriched soybean genotypes inhibit lipid accumulation and inflammation *in vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 523: 1007–1018.
 91. Maruyama N., Sato R., Wada Y., Matsumura Y., Goto H., Okuda E., Nakagawa S., Utsumi S.(1999) Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycinin constituent subunits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* ,47: 5278–5284.
 92. Maruyama N., Utsumi S.(2000) Investigation of structure-function relationships of soybean β coglycinin cultivars using mutasozbea cultivars. *Soy Protein Reaseach*, 21(3): 12-17.
 93. Maruyama N., Adachi M., Takahashi K., Yagasaki K., Kohno M., Takenaka Y., Okuda E., Nakagawa S., Mikami B., Utsumi S.(2001) Crystal structures of recombinant and native soybean beta-conglycinin beta homotrimers. *European Journal of Biochemistry*, 268(12):3 595-604.
 94. Maruyama N., Salleh M. R. M., Takahashi K., Yagasaki K., Goto H., Hontani N., Nakagawa S., Utsumi S. (2002) Structure-physicochemical function relationships of soybean β -conglycininheterotrimers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4323–4326.
 95. Maruyama Y., Maruyama N., Mikami B., Utsumi S.(2004)Structure of the core region of the soybean β -conglycinin α' subunit.*Acta Crystallographica*, D60: 289-297 .
 96. Maruyama, N., Fukuda, T., Inui, N., Hayashi, M., Sawada, M., Kotoh, J., Moriyama, T., Utsumi, S. (2003) Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry*, 64: 701–708.

97. Mateos-Aparicio I., Redondo Cuenca A., Villanueva-Suarez M.J., Zapata-Revila M.A. (2008) Revision: Soybean, a promising health source. *Nutricion Hospitalaria*, 23(4):305-12.
98. Messina, M.J.(1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(3): 439-450.
99. Milerová J., Cerovská J., Zamrazil V., Bílek R., Lapčík O., Hampl R. (2006) Actual levels of soy phytoestrogens in children correlate with thyroid laboratory parameters. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 44: 171–174.
100. Miriani M., Keerati-u-rai M., Corredig M., Iametti S., Bonomi F.(2011) Denaturation of soy proteins in solution and at the oil/water interface: A fluorescence study. *Food Hydrocolloids*, 25: 620-626.
101. Mo X., Wang D., Sun X.S. (2011) Physicochemical Properties of β and α' Subunits Isolated from Soybean β -Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1217–1222.
102. Molina E., Papadopoulou A., Ledward D.A.(2001)Emulsifying properties of high pressure treated soy protein isolate and 7S and 11S globulins. *Food Hydrocolloids*, 15: 263-269.
103. Mooney, BP., Thelen, JJ. (2004) High-throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated work flow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification. *Phytochemistry* 65: 1733–1744.
104. Morabito N., Crisafulli A., Vergara C. (2002). Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(10): 1904–1912.
105. Moriyama T., Kishimoto K., Nagai K (2004) Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 68:352–359.

106. Motoyama T., Amari Y., Tandang-Silvas M.R., Cabanos C., Kimura A., Yoshikawa M., Takaiwa F., Utsumi S., Maruyama N.(2010)Development of transgenic rice containing a mutated subunit of soybean β -conglycinin for enhanced phagocytosis-stimulating activity. *Peptides*, 31: 1245–1250.
107. Moure A., Sineiro J., Domínguez and Parajó, J. C. (2006) Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39: 945-963.
108. Mujoo, R., Trinh, D. T., Ng, P. (2003) Characterization of storage proteins in different soybean varieties and their relationship to tofu yield and texture. *Food Chemistry*, 82: 265–273.
109. Nakatani Y., Kaneto H., Kawamori D., Yoshiuchi K., Hatazaki M., Matsuoka T., Ozawa K., Ogawa S., Hori, M., Yamasaki, Y., Matsuhisa, M.(2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes.*The Journal of Biological Chemistry*, 280: 847-851.
110. Natrajan, S., Xu, C., Caperna T.J., Garret W.M. (2005) Comparison of protein solubilization methods suitable for proteomic analysis of soybean seed proteins. *Analytical Biochemistry*, 342: 214–220.
111. Nik, MA., Alexander, M., Poysa, V., Woodrow, L. Corredig, M.(2011) Effect of soy protein subunit composition on the rheological properties of soymilk during acidification. *Food Biophysics*, 6(1): 26-36.
112. Nikov GN., Hopkins NE., Boue S., Alworth WL. (2000) Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environmental Health Perspectives*, 108:867–872.
113. Nir I., Feldman Y., Aserin A., Garti N. (1994) Surface Properties and Emulsification Behavior of Denatured Soy Proteins. *Journal of Food Science*, 59: 606–610.
114. Nishi T., Hara H. and Tomita F.(2003) Soybean β -Conglycinin Peptone Suppresses Food Intake and Gastric Emptying by Increasing Plasma Cholecystokinin Levels in Rats. *Journal of Nutrition*,133: 352–357.

115. Nishi T., Hara H., Hira T., Tomita, F. (2001) Dietary protein peptic hydrolysates stimulate cholecystokinin release via direct sensing by rat intestinal mucosal cells. *Experimental Biology and Medicine*, 226: 1031–1036.
116. Nishi T., Hara H., Tomita F (2003). Soybean β -Conglycinin peptone suppresses food intake and gastric emptying by increasing plasma cholecystokinin levels in rats. *The Journal of Nutrition*, 133: 352–357.
117. O'Farrell P. (1975). High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 250(10): 4000- 4021.
118. Ogawa T., Bando N., Tsuji H., Okajima H., Nishikawa K., Sasaoka K. (1991). Investigation of the IgE-Binding Proteins in Soybeans by Immunoblotting with the Sera of the Soybean-Sensitive Patients with Atopic Dermatitis. *Journal of Nutritional Science and Biology*, 37 (6): 555-565.
119. Ogawa T., Bando N., Tsuji H., Nishikawa K., Kitamura K.(1995) Alpha-subunit of beta-conglycinin, an allergenic protein recognized by IgE antibodies of soybean-sensitive patients with atopic dermatitis.*Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59(5):831-833.
120. Ohara S., Tamesada M., Saitou M., Komatsu R., Yoshino T., Tsubakio T., Itakura H. (2007). Serum triacylglycerol-lowering effect of soybean β -conglycinin in mildly hypertriacylglycerolemic individuals. *The European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 12 (1): 12-16.
121. Ohinata K., Agui S., Yoskihawa M. (2007) Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β conglycinin β subunit, have anxiolytic activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71 (10): 2618-2621.
122. Peack N.C., Imsande J., Shoemaker R.C.(1997) Nutritional control of soybean seed storage protein. *Crop Science*, 37: 498-503.
123. Pearce, K.N., Kinsella, J.E. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26:716–723.

124. Pešić B.M., Vucelić-Radović B.V., Barać M.B., Stanojević S.P. (2005) The influence of genotypic variation in protein composition on emulsifying properties of soy proteins. *Journal of American Oil Chemisist Society*, 82(9):667-672.
125. Qi G., Venkateshan K., Mo X., Zhang L. and Sun X.S.(2011) Physicochemical Properties of Soy Protein: Effects of Subunit Composition. *Journal of Agririltural and Food Chemistry*, 59: 9958–9964.
126. Renkema J. M. S., Gruppen H., van Vliet T.(2002) Influence of pH and Ionic Strength on Heat-Induced Formation and Rheological Properties of Soy Protein Gels in Relation to Denaturation and their protein compositions. *Journal of Agririltural and Food Chemistry*, 50 (21): 6064–6071.
127. Renkema J.M.S, Lakemond C.M.M., Jongh H.H.J, Gruppen H., van Vliet T. (2000) The effect of pH on heat denaturation and gel forming properties of soy proteins. *Journal of Biotechnology*, 79: 223-30.
128. Renkema J. M. S. (2004) Relations between rheological properties and network structure of soy protein gels. *Food Hydrocolloids*, 18(1): 39-47.
129. Santiago, LG., Gonzalez RJ., Remondetto GE., Bonaldo AG. (1998) Emulsifying ability of proteins evaluated by response surface methodology. *Food Science Lebensmittel Wissenchaft and Technology*, 31(3): 259-264.
130. Sarma, D.A., Oehrle, N.W., Emerich, D.W. (2008) Plant protein isolation and stabilization for enhanced resolution of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 379:192–195.
131. Shaywitz S.E., Shaywitz B.A., Pugh K.R., Fulbright R.K., Skudlarski P., Mencl W.E., Constable R.T., Naftolin F., Palter S.F., Marchione K.E., Katz L., Shankweiler D.P., Fletcher J.M., Lacadie C., Keltz M., Gore JC (1999) Effect of estrogen on brain activation patterns in postmenopausal women during working memory tasks. *The Journal of the American Medical Association*, 281: 1197–202.
132. Shen C.L., Chen W.H., Zou S.X.(2007) In vitro and in vivo effects of hydrolysates from conglycinin on intestinal microbial community of mice after *Escherichia coli* infection; *Journal of Applied Microbiology*, 102, 283–289.

133. Simmons A., Miller C., Clinton S., Vodovotz Y. (2011). A comparison of satiety, glycemic index, and insulinemic index of wheat-derived soft pretzels with or without soy. *Food and Function*, 2(11): 678–683.
134. Sirtori C.R., Agradi E., Conti F., Mantero O., Gatti E. (1977). Soybean protein diet in the treatment of type II hyperlipoproteinaemia. *The Lancet*, 309: 275–277.
135. Stanojević P. S., Barać M.B., Pesić M.B., Vucelić-Radović B.V. (2011) Assessment of Soy Genotype and Processing Method on Quality of Soybean Tofu. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 7368–7376.
136. Sufian M.K.N.B., Hira T., Nakamori T., Furuta H., Asano K., Hara H. (2011) Soybean β -conglycinin bromelain hydrolysate stimulates cholecystokinin secretion by enteroendocrine STC-1 cells to suppress the appetite of rats under meal-feeding conditions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 75 (5): 848-853.
137. Tandang M.R., Atsuta N., Maruyama N., Adachi M., Utsumi S. (2005) Evaluation of the solubility and emulsifying property of soybean proglycinin and rapeseed procruciferin in relation to structure modified by protein engineering. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22):8736-44.
138. Taški-Ajduković K., Đorđević V., Vidić M. and Vujaković M. (2010) Subunit composition of seed storage proteins in high-protein soybean genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45 (7): 721-729.
139. Thanh V.H. and Shibasaki K. (1977) Beta-conglycinin from soybean proteins. Isolation and immunological and physicochemical properties of the monomeric forms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 490: 370–384.
140. Thanh V.H. and Shibasaki K. (1978) Major proteins of soybean seed. Subunit Structure of β conglycinine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26 (3): 692-5.
141. Thanh V.H. and Shibasaki K. (1979) Major proteins of soybean seed. Reversible and Irreversible Dissociation of β conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(4): 805-9.

142. Thiellement, H., Zivy, M., Damerval, C., Mechin, V. (2007) Plant proteomics: methods and protocols, Humana Press Inc, Totowa, NJ, p. 1.
143. Tovar-Palacio C., Potter S., Hafermann J., Shay N. (1997). Intake of soy protein and soy protein extracts alter blood cholesterol levels and hepatic apolipoprotein gene expression in the gerbil. *The Journal of Nutrition*, 128: 839-842.
144. Tsuruki, T., Kishi, K., Takahashi, M., Tanaka, M., Matsukawa, T. & Yoshikawa, M. (2003) Soymetide, an immunostimulating peptide derived from soybean β -conglycinin, is an fMLPagonist. *FEBS Letters*, 540: 206-210.
145. Utsumi S. and Kinsela J. E. (1985) Forces Involved in Soy Protein Gelation: Effects of Various Reagents on the Formation, Hardness and Solubility of Heat-Induced Gels Made from 7S, 11S, and Soy Isolate. *Journal of Food Science*, 50: 1278–1282.
146. Utsumi S., Maruyama N., Satoh R., Adachi M. (2002) Structure-function relationships of soybean proteins revealed by using recombinant systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 30: 284–288.
147. Varzakas T., Labropoulos A., Anestis S. (2011) Rheological Properties of a Soy Protein Isolate and Concentrate: Effect of Gel Strength. 11 International Congress on Engineering and Food.
148. Veldhorst M.A., Nieuwenhuizen A.G., Hochstenbach-Waelen A., Westerterp K.R., Engelen MP., Brummer RJ., Deutz NE., Westerterp-Plantenga M.S. (2009). Effects of high and normal soyprotein breakfasts on satiety and subsequent energy intake, including amino acid and 'satiety' hormone responses. *European Journal of Nutrition*, 48(2): 92-100.
149. Vliet, V.T., Martin, A.H. and Bos, M.A. (2002) Gelation and interfacial behavior of vegetable proteins. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7(5-6): 462-468.
150. Hurkman W.J., Tanaka C.K. (1986) Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Plant Physiology*, 81: 802–806.

151. Wagner J.D., Zhang L., Shadoan M.K., Kavanagh K., Chen H., Trenasari K., Kaplan J.R. and Adams M.R. (2008) Effects of soy protein and isoflavones on insulin resistance and adiponectin in male monkeys. *Metabolism*, 57 (7-1): S24–S31.
152. Wagner J.R., Sorgentini D.A., Anon M.C. (1996) Thermal and Electrophoretic behaviour, Hydrophobicity and Some Functional properties of Acid Treated Soy Isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 1881-9.
153. Wang W., Bringe N.A., Berhow M.A., Gonzales de Mejia E. (2008) β -Conglycinins among Sources of Bioactives in Hydrolysates of Different Soybean Varieties That Inhibit Leukemia Cells in Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 4012–4020.
154. Watanabe S., Terashima K., Sato Y., Arai S., Eboshida A. (2000) Effects of isoflavone supplement on healthy women. *Biofactors*, 12(1-4): 233-241.
155. Wei H., Bowen R., Cai Q., Barnes S., Wang Y. (1995) Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Experimental Biology and Medicine*, 208: 124-130.
156. Westermeier, R., Postel, W., Weser, J., Görg, A. (1983) High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 8(4): 321-330.
157. Wolf, W.J. (1970) Soybean proteins: their functional, chemical, and physical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18 (6): 969-976.
158. Wu W.U., Hettiarachchy N.S., Qi M. (1998) Hydrophobicity, solubility and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of American Oil Chemists Society*, 75:845-850.
159. Yagasaki, K., Takagi, T., Sakai, M., and Kitamura, K. (1997) Characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45:656-660.
160. Yaklich, R.W. (2001) β -Conglycinin and glycinin in high-protein soybean seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 729–735.
161. Yamaguchi M., Gao Y.H. (1998). Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochemical Pharmacology*, 55 (1): 71-76.

162. Yamazaki T., Kishimoto K., Miura S., Ezaki O. (2012) Dietary β -conglycinin prevents fatty liver induced by a high-fat diet by a decrease in peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 protein; *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2):123-132
163. Yoshino M., Kanazawa A., Tsutsumi K., Nakamura I., Takahashi K., Shimamoto Y. (2002) Structural variation around the gene encoding the α subunit of soybean β -conglycinin and correlation with the expression of the α subunit. *Breed Science*, 52: 285–292.
164. Yuan, D.B., Yang, X-Q., Tang, C-H., Zheng Z-X, Min, W., Ahmad, I., Yin, S-W. (2009) Physicochemical and functional properties of acidic and basic polypeptides of soy glycinin. *Food Research International*, 42: 700–706.
165. Zarkadas, G., Gagnon, C., Poysa, V., Khanizadeh, S., Cober, R., Chang, V., Gleddie, C. (2007) Protein quality and identification of the storage protein subunits of tofu and null soybean genotypes, using amino acid analysis, one- and two-dimensional gel electrophoresis, and tandem mass spectrometry. *Food Research International*, 40(1):111-128.
166. Zhao Y., Qin G.X., Sun Z.W., Zhang B. and Wang T. (2010) Stability and immunoreactivity of glycinin and β -conglycinin to hydrolysis in vitro. *Food And Agricultural Immunology*, 21(3): 253-263.
167. Zheng H.G, Yang X.Q., Ahmad I., Min W., Zhe J.H., Yuan D.B. (2009) Soybean β -conglycinin constituent subunits: Isolation, solubility and amino acid composition. *Food Research International*, 42: 998–1003.

Biografija autora

Pavlićević Milica rođena je 13.10.1983. godine u Beogradu. Prirodni smer XV beogradske gimnazije završila je 2002 године. 2009-te godine završava Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer biohemija sa prosečnom ocenom 8.24 i diplomskim radom sa naslovom „Uticaj metilglioksala na promene koncentracija amino, guanidino i tiolnih grupa humanog serum albumina“ (ocena 10). Iste godine upisuje doktorske studije na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer prehrambena tehnologija. Obuku za primenu GC-MS i LC-MS metoda prošla je u okviru toksikološke laboratorije na Vojno-medicinskoj akademiji u Beogradu. Od maja 2009 do aprila 2010 radila je kao saradnik na projektu Evropske unije FP6 "CROPWAT". Od juna 2013 član je FOODBIOCHEM grupe u okviru projekta Evropske unije "AREA". Školskih 2014/15, 2012/13 i 2011/12 radila je kao honorarni asistent na predmetu Biohemija hrane na Poljoprivrednom fakultetu, dok je školskih 2015/16, 2013/14, 2012/13, 2011/12, 2010/11 i 2009/10 radila kao honorarni asistent na predmetu Osnovi biohemije na Poljoprivrednom fakultetu. Školske 2009/10 honorarno je držala vežbe na predmetu Organska hemija na Poljoprivrednom fakultetu. 28.02.2013-te godine izabrana je u zvanje istraživač saradnik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Милица Павлићевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 31/09

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

Утицај садржаја подјединица β конглицинина на технолошке функционалне особине протеина соје

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора Милица Павлићевић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 31/09

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов докторске дисертације Утицај садржаја подјединица β конглицинина на технолошке функционалне особине протеина соје

Ментор Проф. др Биљана Вуцелић Радовић

Потписани/а Милица Павлићевић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај садржаја подјединица β конглицинина на технолошке функционалне особине протеина соје

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство - некомерцијално. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство - без прераде. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.