

**ZMĚNY RAMANOVA SPEKTRA PROTEINU SÓJI LUŠTINATÉ VLIVEM
RŮZNÝCH NANOČÁSTIC**

**CHANGES IN THE RAMAN SPECTRUM OF SOY PROTEIN ISOLATE DUE TO
VARIOUS NANOPARTICLES**

Jana Čaloudová¹ – Matej Pospiech¹ – Kateřina Křištofová¹ – Bohuslava Tremlová¹

¹Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého třída

1948/1, 612 42 Brno

ABSTRACT

With the increasing trend of replacing animal proteins with plant proteins, the development of methods suitable for reducing the potential allergenicity of soy proteins is becoming increasingly important. One possibility is to reduce the allergenicity of soy protein by interacting with nanoparticles. Raman spectroscopy has demonstrated changes in the intensity of radiation, suggesting the effectiveness of reducing the allergenicity of soy protein. The addition of nanoparticles, especially ferromagnetic (FE) nanoparticles, led to a change in Raman spectra, indicating the formation of new bonds, even at low concentrations (0.15 mg·g⁻¹). It was further confirmed that the incubation time of the sample has an effect on the Raman spectra. These results may be used in the future for the development of foods containing soy protein with reduced allergenicity. For further research in this area, it would be useful to extend the spectrum of nanoparticles used for the plant proteins studied.

Keywords: calcium phosphate, iron oxide, silicon oxide, nanoparticles, soya protein, Raman spectroscopy, food allergy

ÚVOD

S nárůstem obav o lidské zdraví a budoucnost stravování, které je vlivem narůstající populace a jejích nároků na živočišnou produkce dlouhodobě neudržitelné, dochází u čím dál více spotřebitelů ke zvýšení zájmu o částečnou či celkovou náhradu živočišných bílkovin bílkovinami rostlinnými. Jedněmi z nejčastěji využívaných rostlinných bílkovin v potravinářském průmyslu jsou bílkoviny sóji luštinaté (*Glycine max*), které jsou levným

a univerzálním doplňkem s vysokou nutriční hodnotou, vyváženým obsahem aminokyselin a žádoucími funkčními vlastnostmi. Skrze správně zvolené technologické zpracování mohou sójové bílkoviny dosahovat srovnatelných kvalit s živočišnými bílkovinami (Ma et al., 2022; Sui et al., 2021).

Sójové bílkoviny jsou řazeny mezi hlavní potravinové alergeny a u citlivých osob mohou způsobovat řadu alergických reakcí od zvracení, zánětu spojivek, kopřivky, až po anafylaktický šok a smrt. Alergie na sóju postihuje až 0,5 % populace. Sója však obsahuje více než 30 různých alergenů, mezi které se řadí například Gly m 1 až Gly m 8, 7S, P28 a P34. Zásadními výzvami pro řešení problematiky alergií na sójové bílkoviny patří identifikace alergenů sóji, ale také vývoj vhodných postupů vedoucích ke snížení její alergenicity (Lin et al., 2022; Pi et al., 2021).

Jednou z nových metod účinných pro snižování alergenicity potravin je interakce bioaktivních látek, například ve formě polyfenolů, s alergenními bílkovinami. Například studie Pessato et al. (2018) prokázala, že kyselina kávová a epigalokatechin galát (EGCG) se nekovalentně navazují a reagují se syrovátkovými bílkovinami, čímž dochází ke snižování vazebné kapacity IgE v syrovátkových bílkovinách za současného zvýšení jejich tepelné stability. Potenciál možného využití v této oblasti má však také celá řada nanočástic (NP). Mezi nejpoužívanější nanočástice využívané v rámci technologie potravin jsou řazeny NP stříbra, zlata, platiny, mědi či železa, dále oxidu křemičitého, oxidu zinečnatého či oxidu titaničitého (Shafiq et al., 2020). Každý nanomateriál však vykazuje jiný potenciál pro interakci se specifickými alergeny (Aquino a Conte-Junior, 2020). Studie Havlová et al. (2023) popisuje snížení imunoreaktivity tropomyosinu (jednoho z hlavních alergenů jenž obsahují korýši) působením nanočástic oxidu zinečnatého a oxidu titaničitého. V současné době probíhá výzkum spíše na bílkovinách živočišného původu. V souvislosti se sójovým proteinem doposud nebylo publikováno příliš mnoho studií zabývajících se jeho reakcí s přísadkou nanočástic. Možný vliv celé řady nanočástic na snižování alergenicity rostlinných bílkovin tedy není zcela prokázán.

Pro posouzení interakcí mezi NP a bílkovinami se běžně využívají chromatografické a spektroskopické metody, které umožňují sledování interakcí na úrovni změn chemických vazeb. Výhodou využití Ramanovy spektroskopie pro studium interakcí mezi NP a proteiny je schopnost metody měřit komplex protein–NP ve vodných roztocích. Ramanova spektroskopie lze využít nejen k detekci konformačních změn, ale také v případě potvrzení navázání proteinu na NP prostřednictvím výskytu nových charakteristických vazeb (Li et al., 2010).

MATERIÁL A METODIKA

K přípravě vzorků byl využit izolát proteinu sóji luštinaté v laboratorní kvalitě (Kerry, Irsko). Pro potřeby analýz bylo 0,4 g sójového proteinu naváženo a smícháno s extrakčním roztokem do 10 ml odměrné baňky. Následně byl roztok vařen za stálého míchání po dobu 10 minut při 100 °C a 2 minuty míchán na třepačce. Roztok proteinového izolátu byl následně přefiltrován přes injekční mikrofiltr CA 0,45 μm (BRAUN, Německo). Získaný filtrát byl smíchán s fosfátovým pufrům (PBS) na výslednou koncentraci 0,08 μg·ml⁻¹.

Pro účely analýzy byly zvoleny následující nanočástice: oxid křemičitý (SI), oxid železnato-železitý (FE) a fosforečnan vápenatý (CA). Nanočástice byly připraveny v koncentracích 0,0; 0,15; 0,5; 1,5 a 15,0 mg·g⁻¹ a následně byly smíchány s filtrátem sójového proteinu v poměru 1:1. Nulová koncentrace byla připravena z filtrátu sójového proteinu a destilované vody ve stejném poměru. Roztoky byly rozpipetovány do skleněných injekčních lahvíček (vialek) do objemu 3 ml. Vzorky byly následně analyzovány pomocí Ramanova spektrometru (StellarNet, USA) ve spektrálním rozsahu 100 až 2000 vlnových délek cm⁻¹ s použitím laseru (se silou 90 %) o vlnové délce 785 nm, přičemž každý jednotlivý vzorek prošel čtyřmi měřeními. Vzorky byly měřeny bezprostředně po přípravě (čas 0) a následně s odstupem 1 hodiny (čas 1H). Data byla poté statisticky vyhodnocena pomocí softwaru Microsoft Office Excel a XLSTAT s využitím diskriminační analýzy (DA). S využitím parametru level significance 5 % a s nastavením prahu vstupních hodnot vyšších než 0,1 a zároveň nižších než 0,9.

Tabulka 1: Označení vzorků

| Značka | Vzorec | Anglický název | Český název |
|--------|---|----------------------|-------------------------|
| FE | Fe ₃ O ₄ | Iron (II, III) oxide | oxid železnato-železitý |
| CA | Ca ₃ (PO ₄) ₂ | Calcium phosphate | fosforečnan vápenatý |
| SI | SiO ₂ | Silicon (IV) oxide | oxid křemičitý |

VÝSLEDKY A DISKUZE

Změny imunoreaktivity sójového proteinu ve směsích s vybranými nanočásticemi byly měřeny pomocí Ramanova spektrometru. Na záznamu Ramanova spektra jsou patrné rozdíly v intenzitě Ramanova záření po přidavku nanočástic v různých koncentracích (Obrázek 1). Nejvýznamnější nárůsty intenzity Ramanova záření byly pozorovány v oblastech vlnočísél

300–500 cm^{-1} , dále mezi 1300–1400 cm^{-1} a 1450–1700 cm^{-1} . Ramanovo spektrum v oblasti vlnočíslel 1630–1700 cm^{-1} , jenž je charakteristické pro amidové vazby I, je spojováno se strukturálními složkami proteinů sóji (Zhao et al., 2020). S Glycininem, jakožto jedním z hlavních alergenů sóji, jsou spojovány píky v oblastech vlnočíslel 1 242 cm^{-1} a 1 667 cm^{-1} (Yin et al. 2018).

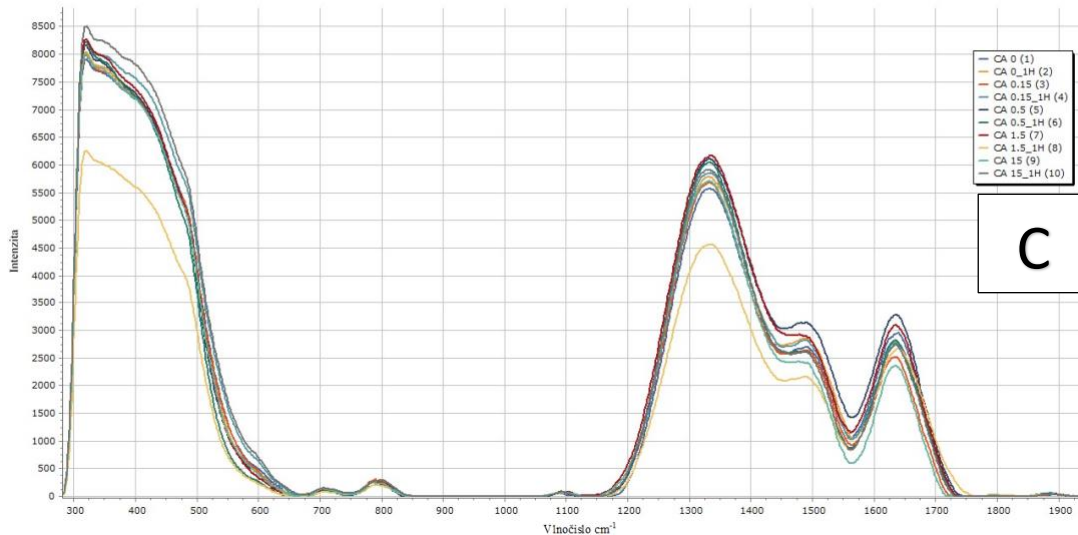
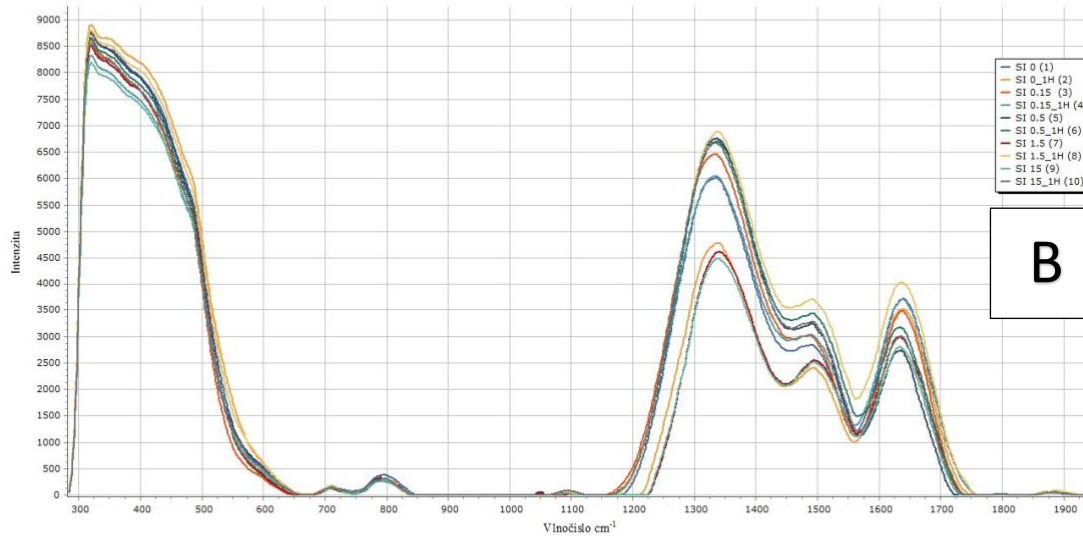
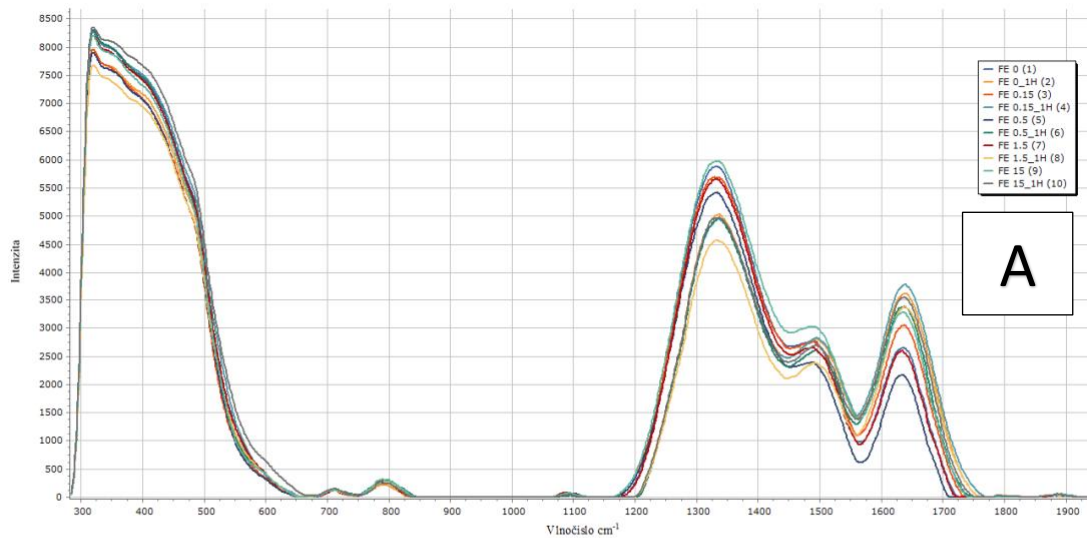
V rámci srovnání výsledků Ramanových spekter vzorků měřených v čase 0 a v čase 1 hodina (pod označením _1H) byly pozorovány rozdílné hodnoty intenzity záření. Nejednalo se však o prokázání stejnoměrného zvýšení či snížení intenzity záření. Navýšení intenzity záření při měření vzorků po působení 1 hodiny bylo pozorováno u vzorků CA 0,15_1H, CA 15_1H, SI 15_1H, SI 1,5_1H, u kterých došlo ve srovnání s jejich protějšky získanými měřeními v čase 0, k navýšení intenzity záření ve všech významných pících (Obrázek 1, B, C). Nárůst intenzity záření v pozdějším čase ve sledovaných pících mohl být způsoben zpožděnou reakcí. Naopak u vzorku CA 1.5_1H bylo pozorováno výrazné snížení intenzity záření ve všech sledovaných pících, zejména v oblastech vlnočíslel 300–350 cm^{-1} a 1300–1380 cm^{-1} (Obrázek 1, C). Vzorky obsahující nanočástice FE v koncentracích 0, 1,5 a 15 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ vykazovaly shodně při měření po 1 hodině, oproti vzorkům měřeným v čase 0, snížení intenzity záření v oblastech významných píků ve vlnočíslech 310–500 cm^{-1} a 1200–1400 cm^{-1} a naopak zvýšení intenzity v oblasti píku 1550–1700 cm^{-1} (Obrázek 1, A).

Z našich výsledků lze usoudit, že délka inkubace vzorku mezi přípravou vzorku se směsí nanočástic a měřením Ramanova spektra měla mírný vliv na podobu výsledných spekter. V případě prodloužení doby inkubace vzorku může docházet ke zkreslení výsledků. Vliv délky inkubace vzorků obsahujících nanočástice oxidu železa na výsledná Ramanova spektra potvrzují také Chourpa et al. (2005). Studie poukazuje na zvýšení intenzity v oblasti pásu vlnočíslel v blízkosti 1580 cm^{-1} u vzorků skladovaných déle než 14 dní, což se shoduje s našimi výsledky. Studie Li et al. (2012) poukazuje ve spojitosti s analýzou nanočástic Fe_3O_4 a SiO_2 také vliv teploty měřeného vzorku a výkonu Ramanova laseru. Oba tyto parametry mají na výsledná Ramanova spektra významný vliv.

Na základě diskriminační analýzy (DA) byly potvrzeny změny v interakcích sójových proteinů a přítomných nanočástic ve vzorcích ($p < 0,05$). U vzorků byla sledována schopnost navázání nanočástic na proteiny formou interakcí a vytvoření komplexů. Bylo potvrzeno, že Ramanova spektroskopie dokáže odlišit navázané a nenavázané částice od vlnových délek specifických pro kontrolní vzorky destilované vody. Z diskriminační analýzy vyplývá,

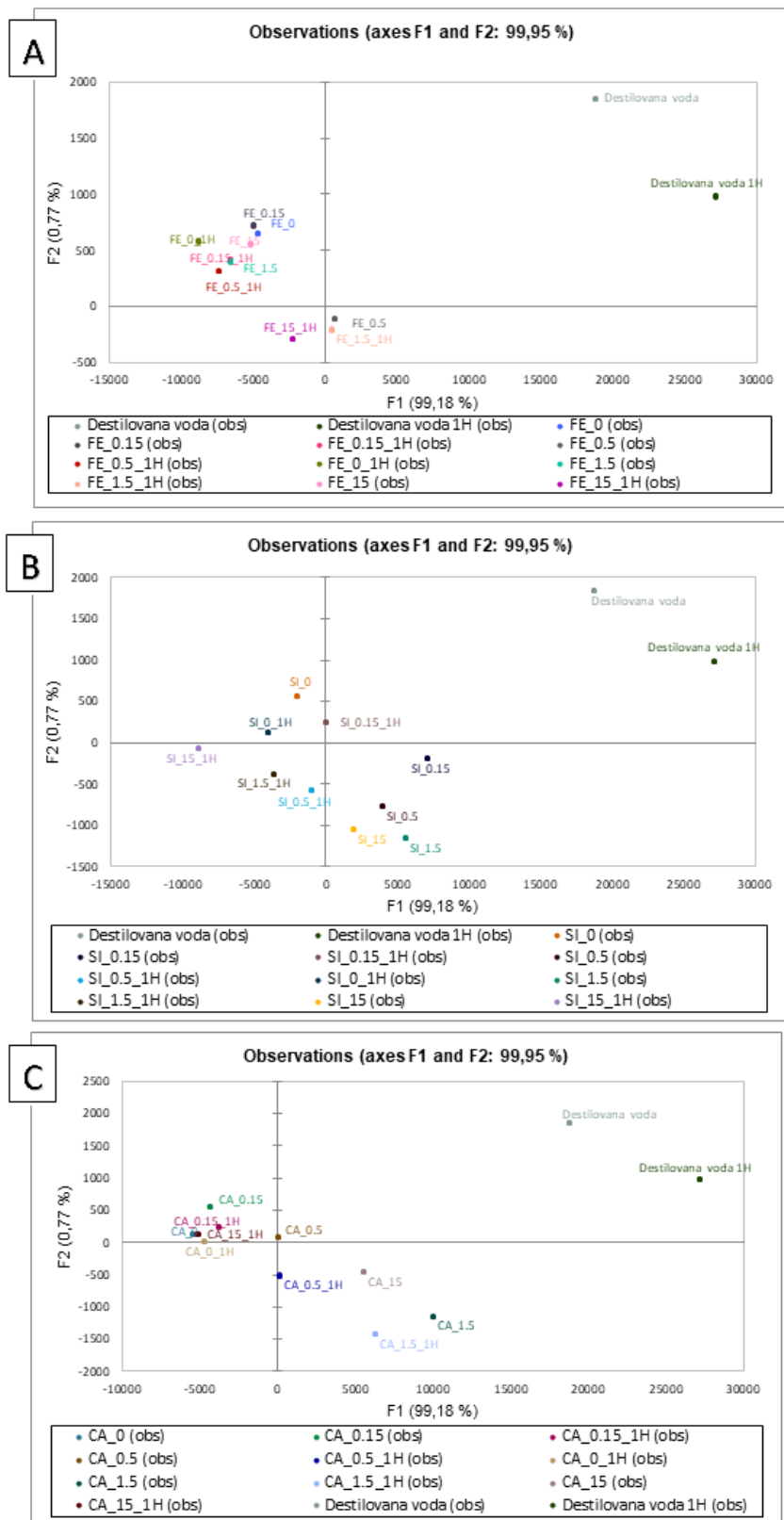
že nejméně vhodnými nanočásticemi k docílení změny interakcí se sójovými proteiny byly nanočástice SI, u nichž byly pozorovány nejslabší interakce s proteinem. Lepších výsledků bylo dosaženo přidavkem FE, a to již v koncentraci $0,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, přičemž nejvýraznější interakce byly zaznamenány ve vzorku obsahujícím FE v koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (Obrázek 2). U vzorků obsahujících přídavek nanočástic CA byly rozdíly patrné již v koncentraci $0,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, se zvyšující se interakcí u koncentrace $0,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$.

Na základě výsledků DA analýzy bylo potvrzeno, že inkubační čas mezi smícháním nanočástic s proteinem a měřením neměl významný vliv na výsledek měření, protože nedošlo k vytvoření samostatných diskriminačních skupin. Nejvýznamnější rozdíly byly prokázány například u vzorků CA 15 a CA 15_1H nebo FE 1,5 a FE 1,5_1H, u ostatních dvojic byla zachována skupinová soudržnost.



Obrázek 1: Grafy záznamu Ramanova spektra vzorku sójového proteinu s přidavkem nanočástic v čase 0 a v čase 1 hodina (_1H)

(A – přidavek FE (oxid železnato-železitý), B – přidavek SI (oxid křemičitý), C – přidavek CA (fosforečnan vápenatý))



Obrázek 2: Grafy diskriminační analýzy vzorků obsahujících proteiny sóji a nanočástice v různých koncentracích

(A – přídavek FE (oxid železnato-železitý), B – přídavek SI (oxid křemičitý),

C – přídavek CA (fosforečnan vápenatý))

ZÁVĚR

Jednou z nových metod účinných pro snižování alergenicity potravin je využití interakce proteinů s nanočásticemi. Jejich aplikace je v současné době spojena spíše s výzkumem živočišných bílkovin. Vlivem nárůstu obliby rostlinných alternativ živočišných potravin se však do popředí zájmu dostávají také rostlinné bílkoviny. Jedním z nejvýznamnějších zdrojů je sója luštiná. Pro posouzení interakcí mezi nanočásticemi a bílkovinami se běžně využívají chromatografické a spektroskopické metody, přičemž výhodou využití Ramanovy spektroskopie je schopnost metody analyzovat komplex protein–nanočástice ve vodných roztocích. Na základě diskriminační analýzy byly potvrzeny změny v interakcích sójových proteinů a přítomných nanočástic ve vzorcích ($p < 0,05$). Přídavek nanočástic FE (Fe_3O_4) měl vliv na změnu vazeb sójových proteinů, a to již v koncentraci $0,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, přičemž nejvýraznější interakce byla zaznamenána ve vzorku obsahujícím nanočástice FE v koncentraci $15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$. V rámci této studie bylo potvrzeno, že vlivem doby inkubace vzorku docházelo k postupnému navázání nanočástic na sójový protein. Získané výsledky mohou být v budoucnu využity při vývoji potravin obsahujících sójové bílkoviny se sníženou alergicitou. Pro další výzkum v této oblasti by bylo vhodné rozšířit spektrum využitých nanočástic a sledovaných rostlinných bílkovin.

PODĚKOVÁNÍ

Príspevek byl zpracován s podporou projektu ITA VETUNI 2023 (2022ITA23).

ABSTRAKT

S narůstajícím trendem nahrazování živočišných bílkovin rostlinnými narůstá důležitost vývoje metod vhodných ke snižování potenciální alergenicity sójových bílkovin. Jednou z možností je snížení alergenicity sójových bílkovin pomocí interakce s nanočásticemi. Ramanova spektroskopie prokázala změny v intenzitě záření, což naznačuje účinnost snižování alergenicity sójových proteinů. Přídavek nanočástic, zejména ferromagnetických (FE), vedl ke změně Ramanova spektra, což svědčí o vzniku nových vazeb a to již při nízkých koncentracích ($0,15 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$). Dále bylo potvrzeno, že doba inkubace vzorku má vliv na Ramanova spektra. Tyto výsledky mohou být v budoucnu využity při vývoji potravin obsahujících sójové bílkoviny

se sníženou alergenicitou. Pro další výzkum v této oblasti by bylo vhodné rozšířit spektrum využitých nanočástic sledovaných rostlinných bílkovin.

Klíčová slova: fosforečnan vápenatý, oxid železnato-železitý, oxid křemičitý, nanočástice, sójový protein, Ramanova spektroskopie, potravinové alergie

LITERATURA

- Aquino, A., Conte-Junior, C. A. (2020): A Systematic Review of Food Allergy: Nanobiosensor and Food Allergen Detection. *Biosensors*, 10(12): 194.
- Havlová, L., Pospiech, M., Javůrková, Z., Bartlová, M., Těšíková, K., Dordevic, D., Dordevic, S., Zemancová, J., Tremlová, B. (2023): Effect of selected bioactive substances and nanoparticles on the immunoreactivity of edible packages containing chitosan, by the ELISA method. *Food and Agricultural Immunology*, 34(1): 2222933.
- Chourpa, I., Douziech-Eyrolles, L., Ngaboni-Okassa, L., Fouquenot, J.-F., Cohen-Jonathan, S., Soucé, M., Marchais, H., Dubois, P. (2005): Molecular composition of iron oxide nanoparticles, precursors for magnetic drug targeting, as characterized by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst*, 130(10): 1395–1403.
- Li, L., Mu, Q., Zhang, B., Yan, B. (2010): Analytical strategies for detecting nanoparticle–protein interactions. *Analyst*, 135(7): 1519–1530.
- Li, Y.-S., Church, J. S., Woodhead, A. L. (2012): Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 324(8): 1543–1550.
- Lin, X., Ye, L., He, K., Zhang, T., Sun, F., Mei, T., Wu, X. (2022): A new method to reduce allergenicity by improving the functional properties of soybean 7S protein through covalent modification with polyphenols. *Food Chemistry*, 373 (Pt B): 131589.
- Ma, Z., Li, L., Wu, C., Huang, Y., Teng, F., Li, Y. (2022): Effects of combined enzymatic and ultrasonic treatments on the structure and gel properties of soybean protein isolate. *LWT*, 158: 113123.

- Pessato, T.B., de Moraes, F.P.R., de Carvalho, N.C., Figueira, A.C.M., Fernandes, L.G.R., Zollner, R.D.L., Netto, F.M. (2018): Protein structure modification and allergenic properties of whey proteins upon interaction with tea and coffee phenolic compounds. *Journal of Functional Foods*, 51: 121–129.
- Pi, X., Sun, Y., Fu, G., Wu, Z., Cheng, J. (2021): Effect of processing on soybean allergens and their allergenicity. *Trends in Food Science & Technology*, 118: 316–327.
- Shafiq, M., Anjum, S., Hano, C., Anjum, I., Abbasi, B. H. (2020): An Overview of the Applications of Nanomaterials and Nanodevices in the Food Industry. *Foods*, 9(2): 148.
- Sui, X., Zhang, T., Jiang, L. (2021): Soy Protein: Molecular Structure Revisited and Recent Advances in Processing Technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*, 12:119–147.
- Yin, H., Huang, J., Zhang, H. (2018): Study on Isolation and Raman Spectroscopy of Glycinin in Soybean Protein. *Grain & Oil Science and Technology*, 1(2): 72–76.
- Zhao, H., Shen, C., Wu, Z., Zhang, Z., Xu, C. (2020): Comparison of wheat, soybean, rice, and pea protein properties for effective applications in food products. *Journal of Food Biochemistry*. 44(4): 13157.

Kontakní adresa

Mgr. Ing. Jana Čaloudová, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Palackého třída 1948/1, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: h21289@vfu.cz