

redukowana w procesie otrzymywania preparatów białkowych. Głównym surowcem do otrzymywania izolatów i koncentratów białkowych jest soja, chociaż w wielu krajach badana jest przydatność innych nasion [Soetrisno, Holmes 1992; Alamanou, Doxastakis 1995b; Mwasaru i in. 1999; Sánchez-Vioque i in. 1999]. W Polsce warunki klimatyczne sprzyjają uprawie grochu i dlatego nasiona tej rośliny zostały wykorzystane w pracy. W procesie precypitacji białek zastosowano różne czynniki, ponieważ skład chemiczny otrzymywanych preparatów jest uzależniony, obok gatunku rośliny, od metody ich koagulacji [Soetrisno, Holmes 1992; Alamanou i in. 1995b; Lásztity i in. 1995; Fernández-Quintela i in. 1997; Chaing i in. 1999; Mwasaru i in. 1999; Sánchez-Vioque i in. 1999].

METODY

Materiałem do badań były nasiona grochu odm. Piast. Suche nasiona zmielono i z otrzymanej mąki (500 g) prowadzono ekstrakcję białek buforem Tris-HCl o pH 9,2 w stosunku 1:10 w ciągu jednej godziny, na mieszadle magnetycznym, w temperaturze 293 K. Po odwirowaniu ($5500 \times g$; 15 minut) z uzyskanego przesączu (z równoległych prób) koagulowano białka w następujący sposób: 1) kwasem solnym 2 mol do osiągnięcia pH=4,2; 2) przez wprowadzenie roztworu flokulanta Magnafloc M22S (150 mg/dm^3), obniżenie kwasowości 2 mol HCl do pH = 4,2; 3) przez wprowadzenie Ca^{+2} (150 mg/dm^3), następnie roztworu flokulanta Magnafloc M22S (150 mg/dm^3), obniżenie kwasowości 2 mol HCl do pH = 4,2; 4) przez wprowadzenie roztworu flokulanta Superfloc A150 (150 mg/dm^3), obniżenie kwasowości 2 mol HCl do pH = 4,2; 5) przez wprowadzenie Ca^{+2} (150 mg/dm^3), następnie roztworu flokulanta Superfloc A150 (150 mg/dm^3), obniżenie kwasowości 2 mol HCl do pH = 4,2. Osady odwirowywano ($5500 \times g$, 15 minut), przemywano dwukrotnie wodą destylowaną, zamrażano i suszono w temperaturze 298 K w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza. Wysuszone i zmielone preparaty przechowywano w temperaturze ok. 279 K.

Ogólną zawartość białka ($N \times 6,25$) oznaczono metodą Kjeldahla w automatycznym aparacie „Kjel-Tec”, a białko właściwe jako nierozpuszczalne w 10% kwasie trichlorooctowym. Wydajność białka obliczono jako stosunek iloczynu masy koncentratu i zawartości w nim białka do iloczynu masy wyjściowej mąki i zawartości w niej białka i wyrażono w procentach. Skład aminokwasowy białka oznaczono metodą chromatografii jonowymiennej w automatycznym analizatorze aminokwasów T339M, Mikrotechna Praha. Hydrolizę preparatów prowadzono 6 mol HCl [Alexander, Block 1960] po uprzednim utlenieniu

próbki kwasem nadmrowkowym [Moore 1963]. Rozdział elektroforetyczny białek prowadzono zgodnie z procedurą podaną przez Laemmli [1970], na 8% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (PAGE-SDS) na elektroforezrze Mini-Protean firmy Bio-Rad. Rozdział prowadzono w pH 8,8 przy stałym natężeniu prądu, wynoszącym 20 mA. Żele wybarwiano Coomassie Brilliant Blue i rejestrowano przy pomocy komputerowego zestawu Gel-Doc formy Bio-Rad. Masy cząsteczkowe poszczególnych pasm porównywano z odpowiednimi pasmami wzorców białkowych (53, 76, 116, 170 i 242 kDa). Rozdział przesączy przeprowadzono metodą sączenia molekularnego, wypełniając kolumny żelem Sephadex G-50. Na kolumnę nanoszono 5 ml przesączy i zbierano 10 ml frakcje, w których monitorowano poziom białka spektrofotometrycznie (A₂₈₀), przy użyciu spektrofotometru UV/VIS firmy Philips.

WYNIKI

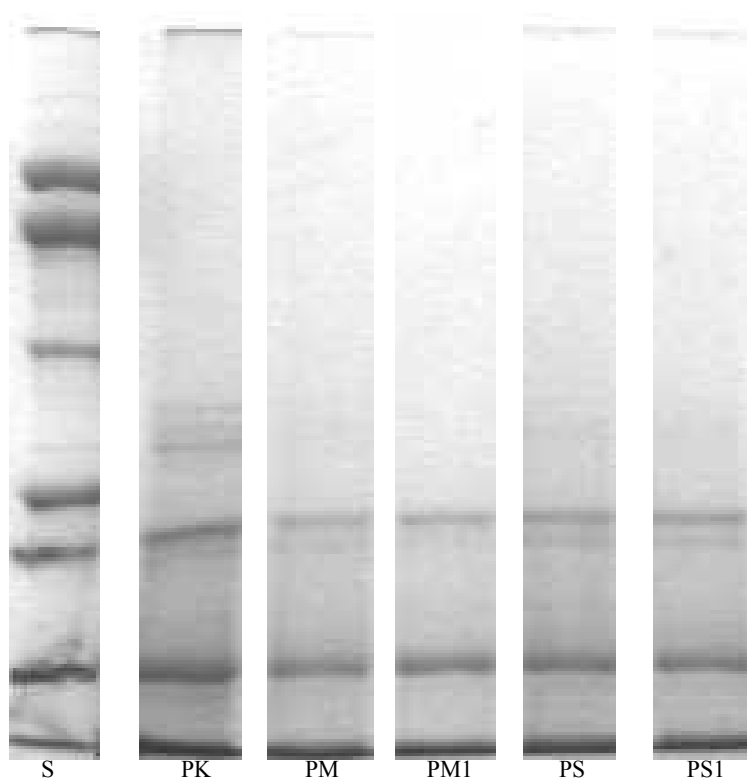
Wszystkie otrzymane w pracy preparaty należy traktować jako koncentraty białkowe, gdyż zawartość w nich białka wahała się w granicach od 80 do 86% (tab. 1). Niezależnie od zastosowanej metody koagulowania poziom białka nie przekroczył 90%, nie można ich zatem zaliczyć do izolatów białkowych. Obecność polielektrolitów jako czynników współstrącających białka nie podniosła w otrzymanych w niniejszej pracy preparatach jego ilości, a otrzymany spadek

Tabela 1. Zawartość białka w koncentratkach otrzymanych różnymi metodami z grochu odm. Piast
Table 1. The protein content in concentrates obtained by various methods from pea cv. Piast

Koncentrat Concentrate	Białko ogółem % s.m. Total protein % d.m.	Białko właściwe % s.m. True protein % d.m.	Białko właściwe % w białku ogółem True protein % of total	Wydajność białka Yield of protein %
PK	88,51	85,47	96,6	63,9
PM	80,42	75,63	94,0	60,5
PM-1	85,31	79,78	93,5	58,7
PS	80,90	76,92	95,1	62,9
PS-1	80,63	75,66	93,8	56,6
M	21,01	18,61	88,5	-

PK – koncentrat wytrącony kwasem Concentrate coagulated by acid; PM – koncentrat koagulowany Magnafloc M22S Concentrate coagulated by Magnafloc M22S; PM1 – koncentrat koagulowany Magnafloc M22S z jonami wapnia Concentrate coagulated by Magnafloc M22S with calcium ions; PS – koncentrat koagulowany Superfloc A150 Concentrate coagulated by Superfloc A150; PS1 – koncentrat koagulowany Superfloc A150 z jonami wapnia Concentrate coagulated by Superfloc A150 with calcium ions; M – mąka grochu Pea flour

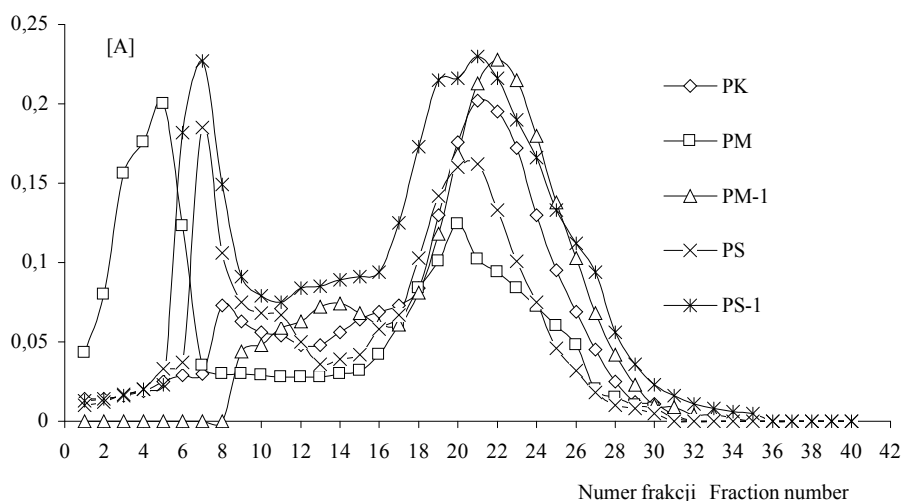
zawartości, wynoszący ok. 8%, był znacznie mniejszy niż uzyskany przez Alamanou i Doxastakis [1995a]. Cytowani autorzy wytrącając białka wyekstrahowane z nasion łubinu polimerem N-izopropylu akryloamidu z biakrylamidem metylu otrzymali preparat z ponaddwukrotnie niższym poziomem białka w stosunku do izolatu wytrąconego w punkcie izoelektrycznym, natomiast w preparacie uzyskanym poprzez ultrafiltrację i dializę spadek zawartości białka wynosił odpowiednio 16% i ok. 9%.



Rycina 1. Rozdział elektroforetyczny białek preparatów otrzymanych różnymi metodami z mąki grochu odm. Piast; S – standardy (242, 170, 116, 76, 53 kDa); PK, PM, PM1, PS, PS1 – objaśnienia jak w tabeli 1

Figure 1. SDS-PAGE analysis of protein concentrates obtained by various methods from pea cv. Piast; S – standards (242, 170, 116, 76, 53 kDa); PK, PM, PM1, PS, PS1 – explanations see Table 1

Wydajność izolacji białka odzyskanego w koncentratkach uzależniona była od metody zastosowanej do ich wytrącania (tab. 1). Otrzymany wynik dla preparatu wytrąconego kwasem jest nieco wyższy od rezultatu otrzymanego przez Klepacką i Porzucek [1994] dla koncentratu uzyskanego z grochu odmiana Poa, a niższy od tych, jakie otrzymały te autorki dla preparatów wytrąconych z grochu odmiany Wat i Koral, i od wydajności uzyskanej przez Soetrisno i Holmes [1992] dla odmiany Miranda. Obecność jonów wapnia w procesie wytrącania koncentratów polielektrolitami spowodowała w niniejszej pracy mniejsze zróżnicowanie w wydajności otrzymanego białka od wartości uzyskanych przez Soetrisno i Holmes [1992], którzy analizowali skuteczność wykorzystania jonów wapnia i magnezu jako koagulantów białek wyekstrahowanych z mąki grochu odm. Miranda. Wobec braku danych dotyczących stężenia zastosowanych soli należy przypuszczać, że stosowano dość wysokie ilości, gdyż otrzymano w preparatach wysoki poziom białka.



Rycina 2. Rozdział chromatograficzny (Sephadex G-50) przesączy po wytrąceniu koncentratów
 Figure 2. Sephadex G-50 elution of filtrates after protein concentrates

Wszystkie otrzymane w pracy koncentraty zawierały białko o masie cząsteczkowej 71–73 kDa, co może wskazywać na to, że jest to podjednostka konwicyliny – białka charakterystycznego dla nasion grochu (ryc. 1). Białko to jest trimerem złożonym z trzech podjednostek o masie 71 kDa [Pasqualini i in., 1991], a więc polipeptyd o zbliżonej masie cząsteczkowej jest prawdopodobnie

podjednostką tej frakcji. Masy cząsteczkowe polipeptydów otrzymanych w wyniku elektroforetycznego rozdzielania analizowanych preparatów dowodzą, że białka tych preparatów, niezależnie od metody zastosowanej do ich wytrącania, są mieszaniną głównie podjednostek wchodzących w skład globulin.

O zróżnicowanych interakcjach czynników zastosowanych do wytrącania białek świadczą chromatogramy otrzymane po rozdzielaniu uzyskanych przesączy na żelu Sephadex G-50 (ryc. 2). Wszystkie analizowane przesącze wykazały maksimum absorpcji w pobliżu frakcji dwudziestej, ale zawartość białka była uzależniona od metody użytej do koagulowania preparatu. Dla koncentratu wytrąconego kwasem i flokulantem Magnafloc M22S w obecności jonów wapnia uzyskano tylko jeden pik, a maksimum absorpcji (0,228) było najwyższe w przypadku tego drugiego preparatu. Natomiast pozostałe przesącze wykazały obecność białka we wcześniej zebranych frakcjach, przy czym najwyższe wartości absorpcji dla obydwu pików wykazał przesącz po wytrąceniu białek flokulantem Superfloc A150 w obecności jonów wapnia.

Poziom poszczególnych aminokwasów, a szczególnie aminokwasów egzogennych jest podstawowym czynnikiem pozwalającym ocenić wartość biologiczną białka. Białko koncentratów otrzymanych z mąki grochowej było uboższe w aminokwasy egzogenne od białka mąki, z której je otrzymano, niezależnie od stosowanej metody wytrącania preparatów (tab. 2). Wskaźnik EAAI dla mąki osiągnął wartość 86,64, podczas gdy dla koncentratu koagulowanego kwasem 80,62, a w przypadku preparatów wytrączanych w obecności polielektrolitów Magnafloc M22S i Superfloc A150 odpowiednio 75,67 i 76,84 (tab. 2). Niemniej poziom aminokwasów egzogennych w koncentratkach był w większości wyższy niż wzorce zalecane przez FAO/WHO. Tylko zawartość aminokwasów siarkowych (cysteiny i metioniny) była nieco niższa w preparatach koagulowanych Superfloc A150 bez jonów i z jonami wapnia oraz poziom fenyloalaniny we wszystkich analizowanych koncentratkach. Wynika to z faktu, że do wzorca odnoszona jest suma dwóch aminokwasów aromatycznych – fenyloalaniny i tyrozyny, a w pracy nie oznaczano tyrozyny. Wysoki poziom aminokwasów aromatycznych otrzymali w izolatach wytrączanych kwasem z mąki ciecierzycy, prowadząc alkaliczną ekstrakcję białek zarówno w obecności siarczanu (IV) sodu jak bez tego związku, Sánchez-Vioque i in. [1999]. Natomiast niski poziom niemal wszystkich niezbędnych aminokwasów uzyskali Soetrisno i Holmes [1992] w koncentratkach z mąki grochu. Autorzy ci obok koagulacji kwasowej zastosowali do wytrącania preparatów siarczan magnezu i chlorek wapnia. Obecność jonów tych metali zwiększyła na ogół poziom poszczególnych aminokwasów, ale otrzymane ilości były niższe od wzorców podawanych przez FAO/WHO. Największy wzrost otrzymano w poziomie aminokwasów siarko-

Tabela 2. Zawartość aminokwasów (g/16g N) w koncentratkach otrzymanych różnymi metodami z grochu odm. Piast

Table 2. The amino acid content (g/16g N) in concentrates obtained by various methods from pea cv. Piast

Aminokwas Amino acid	Koncentrat Concentrate					M	Wzorce FAO WHO Standards
	PK*	PM	PM-1	PS	PS-1		
Lys	6,06	5,81	6,77	6,45	6,41	6,71	5,8
Thr	4,55	5,10	5,63	4,24	4,17	5,40	3,4
Arg	5,98	5,43	5,09	6,51	6,39	5,23	
Asp	12,71	9,88	13,84	11,62	10,62	11,41	
Ser	6,10	5,57	6,82	6,63	5,38	5,14	
Glu	15,66	14,33	15,37	15,82	13,84	16,09	
His	3,14	2,36	3,00	2,29	2,63	2,68	
Phe	4,75	4,72	5,43	5,46	5,56	5,51	6,3
Met	1,68	1,64	2,20	1,39	1,18	1,63	2,5 met + cys
Cys	0,90	0,97	1,03	0,85	1,09	1,86	
Leu	10,45	8,93	10,22	10,56	9,54	7,76	6,6
Ile	4,57	3,96	4,44	3,74	4,27	4,69	2,8
Val	4,67	4,35	5,27	4,99	4,65	5,52	3,5
Pro	1,71	1,75	1,97	1,83	1,74	1,90	
Gly	5,74	6,85	6,50	6,80	5,83	6,80	
Ala	4,90	4,40	5,45	4,65	4,82	5,62	
Ogółem Total	93,57	86,05	99,03	93,83	88,12	93,95	
EAAI	80,62	75,67	86,70	76,84	78,22	86,64	
Aminokwas ograniczający Limiting amino acid	Met	Met	Met	Met	Met	Met	
CS	42	41	55	35	30	41	

*Objaśnienia jak w tabeli 1 Explanations see Table 1

wych i efekt ten był podobny do uzyskanego w niniejszych badaniach po zastosowaniu jonów wapnia wspólnie z flokulantem Magnafloc M22S. Jak wynika z danych w tabeli 2, również zawartość leucyny, kwasu asparaginowego, seryny i kwasu glutaminowego była wyższa w koncentratkach wytrąconych flokulantem Magnafloc M22S w obecności jonów wapnia, niższa natomiast w preparatach, do izolowania których wykorzystano Superfloc A150 (w porównaniu z koncentratami koagulowanymi tymi flokulantami, ale bez wspomaganie procesu jonem metalu). Obecność jonów wapnia podwyższyła także wartość wskaźnika aminokwasów egzogennych, szczególnie dla preparatu wytrąconego flokulantem Magnafloc M22S. Koncentraty otrzymane w niniejszej pracy charakteryzował wysoki poziom lizyny w przeciwieństwie do preparatów wytrąconych kwasem z grochu, fasoli i soi przez Fernández-Quintela i in. [1997]. Wysoki poziom

leucyny w koncentratkach otrzymanych w niniejszej pracy dobrze koresponduje z wynikami, jakie otrzymali Sánchez-Vioque i in. [1999] w izolatach z ciecierzycy, natomiast wyższy jest od zawartości tego aminokwasu w izolatach otrzymanych kwasem z odtłuszczonych kiełków kukurydzy, pszenicy, żyta, ryżu i jęczmienia [Lásztity i in. 1995]; od poziomu w izolatach z grochu, fasoli i soi analizowanych przez Fernández-Quintela i in. [1997] i od zawartości jakie uzyskali w koncentratkach z nasion łubinu Alamanou i Doxastakis [1995 b] oraz od poziomu tego aminokwasu w preparatach z grochu otrzymanych przez Soetrisno i Holmes [1992]. Fakt, że skład aminokwasowy białka koncentratów uzależniony jest obok gatunku rośliny od metod stosowanych zarówno w procesie ekstrakcji jak i koagulacji preparatów, potwierdzają wyniki niniejszej pracy, jak i badania innych autorów [Soetrisno, Holmes 1992; Alamanou i in. 1995 b; Lásztity i in. 1995; Fernández-Quintela i in. 1997; Chaing i in. 1999; Mwasaru i in. 1999; Sánchez-Vioque i in. 1999].

Tabela 3. Zawartość aminokwasów (% odzyskanych aminokwasów) w koncentratkach otrzymanych różnymi metodami z grochu odm Piast
 Table 3. The amino amid content (% of recovered amino acid) in concentrates obtained by various methods from pea cv. Piast

Aminokwas Amino acid	Koncentrat Concentrate					M
	PK	PM	PM-1	PS	PS-1	
Lys	6,48	6,75	6,84	6,87	7,27	7,14
Phe	5,07	5,49	5,49	5,82	6,31	5,87
Met	1,79	1,90	2,22	1,48	1,34	1,75
Cys	0,96	1,13	1,04	0,90	1,24	1,97
Thr	4,84	5,92	5,69	4,52	4,73	5,75
Leu	11,17	10,38	10,32	11,26	10,83	8,26
Ile	4,88	4,60	4,48	3,99	4,85	4,99
Val	4,99	5,06	5,32	5,32	5,28	5,88
Arg	6,39	6,31	5,14	6,94	7,25	5,56
Asp	13,58	11,48	13,98	12,38	12,05	12,15
Ser	6,52	6,47	6,88	7,07	6,11	5,47
Glu	16,74	16,66	15,52	16,86	15,70	17,13
Pro	1,82	2,03	1,99	1,95	1,97	2,03
Gly	6,13	7,96	6,56	7,25	6,62	7,23
Ala	5,24	5,11	5,50	4,95	5,47	5,98
His	3,35	2,74	3,03	2,44	2,98	2,85
Cykliczne Cyclic	5,07	5,49	5,49	5,82	6,31	5,87
Siarkowe Sulphuric	2,75	3,03	3,26	2,38	2,58	3,73
Hydrofilowe Hydrophilic	57,90	56,33	57,86	57,08	56,09	56,05
Hydrofobowe Hydrophobic	34,23	35,14	34,17	34,72	35,02	34,37
Hydrofobowe/Hydrofilowe Hydrophobic/Hydrophilic	0,59	0,62	0,60	0,61	0,62	0,61

Objaśnienia jak w tabeli 1 Explanations see Table 1

Zawartość aminokwasów w ich całkowitej ilości, sklasyfikowaną zgodnie z budową rodników, przedstawia tabela 3. Jak wynika z danych, największe różnice w udziale procentowym poszczególnych grup w zależności od stosowanej metody nie przekraczają 2%. Podobne zależności otrzymali w swoich badaniach Mwasaru i in. [1999], porównując koncentraty koagulowane w punkcie izoelektrycznym z ekstraktów nikli indyjskiej i wspanię chińskiej, uzyskiwanych w zmiennych warunkach. Stosunek ilości aminokwasów hydrofobowych do hydrofilowych wynosił w koncentratkach otrzymanych w niniejszej pracy od 0,59 do 0,63. Wartości te są zgodne z danymi, jakie uzyskali Mwasaru i in. [1999] dla izolatów z nikli indyjskiej.

WNIOSKI

1. Jakość białka preparatów otrzymanych z grochu jest determinowana metodą zastosowaną w procesie ich koagulacji.
2. Mąka grochu i otrzymane z niej preparaty białkowe posiadają większe ilości aminokwasów egzogennych od zalecanych wzorców FAO/WHO.
3. Obecność jonów wapnia zwiększyła zawartość białka ogółem, białka właściwego oraz poziom w nim aminokwasów egzogennych w przypadku zastosowania flokulanta Magnafloc M22S.

PIŚMIENICTWO

- Alamanou S., Doxastakis G. 1995a. Thermoreversible size selective swelling polymers as a means of purification and concentration of lupin seed proteins (*Lupinus albus ssp. Graecus*). Food Hydrocolloids 9, 2, 103–109.
- Alamanou S., Doxastakis G. 1995b. Physico-chemical properties of lupin seed proteins (*Lupinus albus, ssp. Graecus*). Lebensm. Wiss. u. Technol. 28, 641–643.
- Alexander P., Block R.J. 1960. A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry. Vol. 2. The composition, structure and reactivity of proteins. New York, Pergamon Press, 6–7.
- Chiang W.D., Shih C.J., Chu Y.H. 1999. Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. Food Chem. 65, 189–194.
- Fernández-Quintela A., Macarulla M.T., Del Barrio A.S., Martínez J.A. 1997. Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. Plants Foods Human Nutr. 51, 331–342.
- Klepacka M., Porzucek H. 1994. Some properties of chemically modified bean, lupin, and pea proteins. Pol. J. Food Nutr. Sci. 3, 3, 45–56.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

- Lásztity R., Tömösközi S., Nagy J., Bajkai T., Sarkadi L. 1995. Investigation of some functional and nutritive properties of cereal germ proteins. *Periodica Polytechnica* 39, 1, 63–76.
- Moore S. 1963. On determination of cystine and cysteic acid. *J. Biol. Chem.* 238, 2, 235–237.
- Mwasaru M.A., Muhammad K., Bakar J., Che Man Y.B. 1999. Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. I. Physicochemical properties. *Food Chem.* 67, 435–443.
- Pasqualini S., Lluch C., Antonielli M. 1991. Seed storage proteins in several genetic lines of *Vicia faba*. *Plant Physiol. Biochem.* 29, 5, 507–515.
- Sánchez-Vioque R., Clemente A., Viogue J., Bautista J., Millán F. 1999. Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chem.* 64, 237–243.
- Soetrisno U.S.S., Holmes Z.A. 1992. Protein yields and characteristics from acid and salt coagulations of yellow pea (*Pisum sativum* L. Miranda) flour extractions. *J. Agric. Food Chem.* 40, 970–974.