

BARBARA BARANIAK, MAŁGORZATA NIEZABITOWSKA,  
HELENA PORZUCEK

## **ZAWARTOŚĆ BIAŁKA OGÓŁEM, INHIBITORÓW TRYPSYNY I STACHIOZY W PREPARATACH BIAŁKOWYCH UZYSKIWANYCH Z MĄKI GROCHU ZA POMOCĄ RÓŻNYCH METOD KOAGULACJI**

### **Streszczenie**

Porównano zawartość wybranych składników (białko, kwasy tłuszczowe, stachioza, aktywność inhibitora tripsyny) w preparatach otrzymanych z różnych odmian grochu (Koral, Poa, Ramir i Piast) w wyniku wytrącenia białek w ich punkcie izoelektrycznym. Badano przydatność polielektrolitów Magnafloc M-22S o charakterze kationowym i Superfloc A-150 o charakterze anionowym w procesie koagulacji preparatów z grochu odmiany Piast. Preparaty białkowe otrzymywano również z mąki, w której białka poddano wcześniej chemicznej modyfikacji: acetylowaniu i sukcynyłowaniu. Zawartość analizowanych składników w preparatach zależała w znacznym stopniu od odmiany grochu. Preparaty wytrącone w obecności polielektrolitów miały więcej kwasów tłuszczowych od preparatu otrzymanego za pomocą kwasu. Zastosowanie wielkocząsteczkowych polielektrolitów znacznie zwiększyło zawartość białka w preparatach otrzymanych po chemicznej modyfikacji w porównaniu z preparatami flokulowanymi bez modyfikacji białek.

**Słowa kluczowe:** groch, preparaty białkowe, metody koagulacji, białko, inhibitory tripsyny, stachioza.

### **Wstęp**

Preparaty białkowe z soi produkowane są w Stanach Zjednoczonych i krajach Europy Zachodniej od wielu lat na skalę przemysłową. Od kilkunastu lat prowadzone są również prace związane z wykorzystaniem do tego celu, jako surowca, nasion fasoli, grochu i łubinu. W krajach azjatyckich i na południu Europy badana jest przydatność nasion roślin paszowych, takich jak ciecierzycza czy groch polny. Otrzymywane

---

*Prof. dr hab. B. Baraniak, Katedra Biochemii i Chemii Żywności, dr M. Niezabitowska, Katedra Chemii, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 15, 20-934 Lublin; dr hab. H. Porzucek, prof. SGGW, Katedra Technologii i Oceny Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa*

koncentraty i izolaty często dorównują, a w niektórych przypadkach nawet przewyższają właściwościami preparaty sojowe.

W Polsce warunki klimatyczne sprzyjają uprawie grochu, fasoli i łubinu. Nasiona tych roślin rozważane są jako surowiec do wytwarzania preparatów białkowych. Najczęściej stosowana metoda otrzymywania koncentratów i izolatów polega na alkalicznej ekstrakcji białek ze zmielonego surowca i ich koagulacji w punkcie izoelektrycznym. Proces otrzymywania preparatów białkowych z zielonych części roślin polega na koagulacji (termicznej lub kwasowej) białek zawartych w soku wyłoczonym z biomasy roślinnej. W procesie precypitacji białek mogą być również wykorzystane polielektrolity. Polielektrolity stosowane w praktyce jako flokulanty, to rozpuszczalne w wodzie poliakryloamidy, polifosforany i chemicznie modyfikowane polimery pochodzenia naturalnego, takie jak: żelatyny, alginiany, karageniany, chitosan, jak również pochodne skrobi i celulozy. Można je podzielić na kationowe, anionowe i niejonowe w zależności od charakteru chemicznego grup funkcyjnych, rozmieszczonych wzdłuż łańcucha. Spośród syntetycznych polimerów najczęściej stosowane są poliakryloamidy, uzyskiwane przez kopolimeryzację akryloamidu i akrylanu lub monomerów mających grupy anionowe. Flokulanty ulegają adsorpcji na powierzchni zdyspergowanych cząsteczek i powodują zmiany stabilności układów koloidalnych. Wzajemne oddziaływania najobszerniej tłumaczy teoria „mostkowania”, która zakłada dwu- lub kilkupunktową adsorpcję długich cząsteczek flokulanta, przez co powstają pętle bądź łańcuchy zlokalizowane już poza warstwą hydratacyjną koloidu [5]. Flokulacja następuje poprzez oddziaływania hydrofobowe, wiązania wodorowe lub przypadkowe szczipienie pętli łańcuchów flokulanta. Na powierzchniach obdarzonych przeciwnymi ładunkami proces adsorpcji flokulanta jest bardziej intensywny, przy czym przyjmują one płaską konfigurację. Zjawisko flokulacji w takim układzie można powodować zmianą kwasowości roztworu czy jego siły jonowej.

Praktyczne wykorzystanie procesu flokulacji znalazło najszersze zastosowanie w procesie oczyszczania wód odpadowych, pochodzących z wielu gałęzi przemysłowych i w technologii cukrownictwa. W procesach biotechnologicznych flokulanty znalazły zastosowanie do wydzielania szczątkowych komórek z homogenatów drożdży [27], w procesie zagęszczania komórek *Escherichia coli* [8], do kondensowania w roztworach wodnych molekuł DNA [26].

Najefektywniejsze w działaniu są flokulanty na bazie poliakryloamidu, które w krajach o zastrzonych przepisach (również w Polsce) budziły zastrzeżenia z uwagi na zbyt wysoki poziom monomerów wolnego akryloamidu w gotowym produkcie. Produkowane obecnie flokulanty nowej generacji charakteryzuje bardzo niska zawartość szkodliwych monomerów [14, 21]. Należy nadmienić, że prowadzone są też intensywne badania nad uzyskaniem bioflokulantów. Szczepy bakterii *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. są zdolne produkować polimery kwasowych polisacharydów

zawierające neutralne cukry (glukozę, galaktozę, ksylozę) i kwas uronowy [9, 28]. Aktywność flokulacyjną *Kluyveromyces* sp. wzmacniają drożdże *Schizosaccharomyces pombe* 972h(-) [10], natomiast szczepy grzybów *Aspergillus* sp. JS-42 są zdolne produkować polimery kwasu uronowego, heksozoamin i neutralnych cukrów [20]. Polisacharydy wytwarzane przez *Klebsiella pneumoniae* H12 zostały wykorzystane w procesie flokulacji bakterii produkujących antybiotyki (*Pseudomonas fluorescens*) - wyizolowanych z gleby, a otrzymany preparat przejawiał bardzo korzystne działanie po zastosowaniu w uprawie roślin [19].

Celem podjętej pracy było określenie przydatności polielektrolitów Magnafloc M-22S o charakterze kationowym i Superfloc A-150 o charakterze anionowym w procesie koagulowania koncentratów białkowych z mąki grochu. Zakresem analiz objęto zawartość białka, stachiozy, kwasów tłuszczowych i aktywności inhibitora trypsyny w preparatach otrzymanych z mąki czterech odmian grochu i w preparatach otrzymanych z mąki po wcześniejszej chemicznej modyfikacji białek grochu.

### **Materiał i metody badań**

Surowcem wyjściowym do badań były nasiona czterech odmian grochu: Koral, Poa, Ramir i Piast. Suche nasiona zmielono, a z otrzymanej mąki uzyskiwano preparaty białkowe.

#### *Otrzymywanie preparatów białkowych niemodyfikowanych*

Z mąki (500 g) prowadzono ekstrakcję białek 0,1M buforem Tris-HCl o pH = 9,2 w stosunku surowiec-bufor 1:10 (m/v) w ciągu 1 godz., przy użyciu mieszadła magnetycznego, w temp. 20°C. Po odwirowaniu (5500 x g; 15 min) z uzyskanego przesączu koagulowano białka kwasem solnym do osiągnięcia minimum rozpuszczalności (pH = 4,2). Z mąki grochu odmiany Piast dodatkowo aglomerowano koncentraty poprzez zastosowanie polielektrolitów. W tym przypadku do roztworu wyekstrahowanych białek dodawano flokulanta (o charakterze kationowym – Magnafloc M-22S lub anionowym – Superfloc A-150) w ilości 150 mg/dm<sup>3</sup>, a następnie obniżano pH kwasem solnym do wartości 4,2.

Roztwory flokulantów przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta: naważki zwilżano 1-2 cm<sup>3</sup> alkoholu etylowego i rozpuszczano w wodzie destylowanej.

Osady odwirowywano (5500 x g; 15 min), przemywano dwukrotnie wodą destylowaną, suszono poprzez wymrażanie, a zmielone preparaty przechowywano w temp. ok. 6°C.

*Otrzymywanie preparatów białkowych modyfikowanych chemicznie*

Białka mąki grochu modyfikowano bezwodnikiem kwasu octowego (acetylowanie) i bezwodnikiem kwasu bursztynowego (sukcynylowanie) w ilości po 0,2 cm<sup>3</sup> każdego związku w przeliczeniu na 1g białka zawartego w mące. Proces prowadzono w trakcie ekstrakcji białek 0,1M buforem Tris-HCl o pH = 7,5 w stosunku 1:10. Modyfikacja trwała 1 godz. w temp. 20°C, przy pH = 7,5, którego wartość utrzymywano 30% roztworem NaOH.

Ekstrakty wirowano (5500 x g; 15 min), a z przesączu koagulowano preparaty 2M kwasem solnym, doprowadzając pH do wartości 3,6 lub flokulantem Magnafloc M-22S (150 mg/ dm<sup>3</sup>), obniżając kwasowość 2M HCl do pH = 3,6 oraz flokulantem Superfloc A-150 (150 mg/ dm<sup>3</sup>), obniżając kwasowość 2M HCl do pH = 3,6

Osady wirowano (5500 x g; 15 min), przemywano dwukrotnie wodą destylowaną, suszono przez wymrażanie, a zmielone preparaty przechowywano w temp. ok. 6°C.

Otrzymywanie preparatów powtórzono dwukrotnie. Zarówno preparaty, jak i mąkę grochu poddano dalszym badaniom.

Posługując się automatycznym zestawem „Kjel-Tec” oznaczano w preparatach białko ogółem (N x 6,25) oraz w preparatach otrzymanych z grochu odmiany Piast oznaczano białko nierozpuszczalne w 10% kwasie trichloooctowym (białko właściwe). Tłuszcz ekstrahowano heksanem w aparacie Soxtec HT-6, a skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej (chromatograf firmy Unicam). Aktywność inhibitora trypsyny oznaczano wg Hamerstranda i wsp. [13]. Aktywność resztkową obliczano jako procentową pozostałość aktywności inhibitora w koncentracji białkowym, przyjmując aktywność w wyjściowej mące za 100%. W celu oznaczenia stachiozy naważkę preparatu (0,2 g) zawieszano w 1 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i wytrząsano przez 10 min w mikrowstrząsarce. Następnie dodawano 1 cm<sup>3</sup> 100% acetonitrylu, mieszano i wirowano (10 000 obr./min; 20 min). Klarowny roztwór używano do oznaczeń. Identyfikację jakościową stachiozy określano metodą wzorca wewnętrznego (firmy Sigma). Rozdziały prowadzono w warunkach izokratycznych, stosując chromatograf cieczowy LC-5A firmy Laboratorni Pristroje Praha, w kolumnie SUPELCOSIL LC-NH<sub>2</sub> firmy SUPELCO (250 mm x 4,6 nm) z rejestratorem YT, typ TZ 4620. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody redestylowanej i dejonizowanej w stosunku 75:25 (v/v). Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę wynosiła 1 ml/min. Zawartość stachiozy określano metodą wzorca zewnętrznego. Skład aminokwasowy białek oznaczano metodą chromatografii jonowymiennej w automatycznym analizatorze aminokwasów T339M, Mikrotechna Praha. Hydrolizę preparatów prowadzono 6M HCl po uprzednim utlenieniu aminokwasów siarkowych kwasem nadmanganowym.

Oznaczenia analityczne każdej próbki wykonano w dwóch powtórzeniach.

## Wyniki i dyskusja

Otrzymane preparaty różniły się zawartością białka, a decydowała o tym zarówno odmiana grochu, jak i metoda zastosowana do koagulacji białek (tab. 1).

Tabela 1

Zawartość białka ogółem, inhibitorów trypsyny i stachiozy w preparatach białkowych i w mące różnych odmian grochu.

The total content of protein, trypsin inhibitor, and stachyose in protein preparations and a flour of various pea varieties

Wyszczególnienie Specification		Białko (N x 6,25) [% s.m.] Total protein [% d.m.]	Inhibitor trypsyny [mg/100g białka] Trypsin inhibitor [mg/100g of protein]	Stachioza [mg/100g preparatu] Stachyose [mg/100g of preparation]
Koral	PK	84,7	9,9	0,35
	Mąka Flour	26,8	307,9	0,44
Poa	PK	85,6	11,0	0,20
	Mąka Flour	26,4	358,7	0,44
Ramir	PK	84,8	9,3	0,29
	Mąka Flour	24,9	400,4	0,44
Piast	PK	88,5	38,7	0,39
	PM	80,4	44,5	0,39
	PS	80,9	46,5	0,48
	Mąka Flour	21,0	388,4	0,63

Objaśnienia / Abbreviations:

PK – preparat wytrącony kwasem / a preparation coagulated using acid,

PM – preparat wytrącony polielektrolitem Magnafloc M-22S / a preparation coagulated using a 'Magnafloc M-22S' polyelectrolyte.

PS – preparat wytrącony polielektrolitem Superfloc A-150 / a preparation coagulated using a 'Superfloc A-150' polyelectrolyte.

Poziom białka w preparatach warunkowany jest wieloma czynnikami. Decyduje o tym zawartość białka w surowcu, która uzależniona jest przede wszystkim od gatunku rośliny [6, 11, 15, 23], obróbka wstępna surowca [17, 23, 25], jak i metoda zastosowana do wytrącania białek [2, 3, 18, 24]. Zastosowanie polielektrolitów, jako czynników współstrącających, nie wpłynęło dodatnio na zawartość białka w uzyskanych preparatach. Zanotowano nawet zmniejszenie zawartości o ok. 8%. Wartość ta była znacznie mniejsza od tej, którą stwierdzono w pracy Alamanou i wsp.

[2]. Cytowani autorzy wytrącając białka wyekstrahowane z nasion łubinu polimerem N-izopropylu akryloamidu z biakrylamidem metylu otrzymali preparat z ponad dwukrotnie niższym poziomem białka w stosunku do izolatu wytrąconego w punkcie izoelektrycznym, natomiast w preparacie uzyskanym poprzez ultrafiltrację i dializę spadek zawartości białka wyniósł odpowiednio 16 i ok. 9%.

Tabela 2

Zawartość białka i chemiczne wskaźniki preparatów białkowych otrzymanych kwasem i polielektrolitem Magnafloc M-22S z mąki grochu odmiany Piast.

The protein content in and chemical indexes of the protein preparations obtained from a 'Piast' pea flour variety using an acid and a 'Magnafloc M-22S' polyelectrolyte.

Metoda wytrącania białek Method of protein precipitation	Składnik Component					
	Białko ogółem [% s.m] Total protein [% d.m.]	Białko właściwe [% s.m.] True protein [% d.m.]	Białko właściwe [% ogółem] True protein [% of total]	EAAI	Aminokwas ograniczający Limiting amino-acid	CS
Kwas Acid	88,5	85,5	97	81	Met	42
M-22S	80,4	75,6	94	76	Met	41

Zastosowanie polielektrolitu Magnafloc M-22S w procesie otrzymywania preparatów białkowych z soku zielonych części roślin również zmniejsza poziom białka ogólnego i właściwego w otrzymanych koncentraty [4]. Wielkość tych zmian uzależniona jest od gatunku rośliny. Zastosowanie tego czynnika różnicuje także skład aminokwasowy białka. Jak wynika z danych w tab. 2., użycie flokulanta Magnafloc M-22S w procesie otrzymywania koncentratu z grochu odmiany Piast wpłynęło na obniżenie wartości wskaźnika aminokwasów egzogennych w porównaniu z preparatem otrzymanym za pomocą kwasu. Podobne zależności występują w przypadku preparatów otrzymanych z soku lucerny, natomiast koncentraty flokulowane z soku liści tytoniu i gryki charakteryzowały się wyższym poziomem aminokwasów egzogennych od preparatów wytrąconych kwasem. Tylko w przypadku tytoniu czynnik wytrącający białka spowodował zmianę aminokwasu ograniczającego [4]. Fakt, że skład aminokwasowy białka koncentratów uzależniony jest od gatunku rośliny i metod stosowanych zarówno w procesie ekstrakcji, jak i koagulacji preparatów znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów [3, 7, 11, 17, 23, 24].

Dużo lepsze efekty uzyskano stosując polielektrolity do wytrącania preparatów z mąki, której białka poddano procesowi chemicznej modyfikacji. Zablokowanie grup aktywnych aminokwasów poprzez acylowanie spotęgowało adsorpcję polielektrolitu na molekułach białkowych i zwiększyło efekt mostkowania. Tylko w przypadku

użycia bezwodnika kwasu bursztynowego łącznie z polielektrolitem Superfloc A-150 nie zwiększyła się zawartość białka w otrzymanym preparacie. Podobny efekt uzyskano stosując wytrącanie zmodyfikowanych chemicznie białek – z grochu odmiany Piast – w punkcie izoelektrycznym. W przypadku trzech pozostałych odmian grochu, po chemicznej modyfikacji białek (zarówno po acetylacji, jak i sukcylnylacji) zanotowano zmniejszenie zawartości białka ogółem w preparatach wytrączanych w punkcie izoelektrycznym (tab. 3).

Tabela 3

Zawartość białka ogółem, inhibitorów trypsyny i stachiozy w preparatach otrzymanych z mąki różnych odmian grochu po chemicznej modyfikacji białek.

The total content of protein, trypsin inhibitor, and stachyose in protein preparations obtained from flour of various pea variety after the protein chemical modification.

Wyszczególnienie Specification		Białko N x 6,25 [% s.m.] Total protein [% d.m.]	Inhibitor trypsyny [mg/100 g białka] Trypsin inhibitor [mg/100 g of protein]	Stachioza [mg/100 g preparatu] Stachyose [mg/100 g of preparation]
Koral	PKS	77,8	n.w	Nw
	PKA	82,4	n.w	Nw
Poa	PKS	75,3	n.w	Nw
	PKA	78,9	n.w	Nw
Ramir	PKS	76,1	n.w	Nw
	PKA	71,8	n.w	Ślady / Trace
Piast	PKS	81,1	10,4	0,72
	PKA	88,6	5,0	0,97
	PMS	88,6	54,6	0,72
	PMA	86,6	59,6	1,35
	PSS	80,1	70,3	0,72
	PSA	88,5	69,0	0,82

Objaśnienia / Abbreviations:

PKS – preparat wytrącony kwasem po procesie sukcylnylowania białek/an acid-coagulated preparation from a succinylated pea protein;

PKA – preparat wytrącony kwasem po procesie acetylowania białek/an acid-coagulated preparation from an acetylated pea protein;

PMS – preparat wytrącony polielektrolitem Magnafloc M-22S po procesie sukcylnylowania białek/a 'Magnafloc M 22S' polyelectrolyte-coagulated preparation from a succinylated pea protein;

PKA – preparat wytrącony polielektrolitem Magnafloc M-22S po procesie acetylowania białek/a 'Magnafloc M 22S' polyelectrolyte-coagulated preparation from an acetylated pea protein;

PSS – preparat wytrącony polielektrolitem Superfloc A-150 po procesie sukcylnylowania białek/a 'Superfloc A-150' polyelectrolyte-coagulated preparation from a succinylated pea protein;

PSA – preparat wytrącony polielektrolitem Superfloc A-150 po procesie acetylowania białek/a 'Superfloc A-150' polyelectrolyte-coagulated preparation from an acetylated pea protein.



W preparatach otrzymanych z tych odmian grochu po chemicznej modyfikacji białek nie stwierdzono również aktywności inhibitora trypsyny i obecności stachiozy (tab. 3). W preparatach wytrąconych kwasem z mąki grochu odmian Koral, Poa i Ramir, bez chemicznej modyfikacji białek, aktywność inhibitora trypsyny była również niższa niż w preparatach otrzymanych z grochu odmiany Piast (tab. 1). Natomiast w preparatach wytrączanych w obecności flokulantów, po chemicznej modyfikacji białek grochu Piast, aktywność inhibitorów trypsyny była wyższa od oznaczonej w preparatach flokulowanych z mąki bez wcześniejszej modyfikacji białek. Inhibitory trypsyny są związane z frakcją albumin, a ich aktywność wzrasta po oddzieleniu frakcji globulinowej, co potwierdzają badania Genovese i Lajolo [12]. Polielektrolity mogą wykazywać wobec chemicznie modyfikowanych albumin efekt ochronny – adsorbując się na molekułach białkowych zwiększają ich udział w otrzymanych preparatach.

Tabela 4

Zawartość kwasów tłuszczowych w tłuszczu preparatów białkowych otrzymanych z różnych odmian grochu.

The fatty acids content of the protein preparations fat concentrates obtained from various pea varieties.

Wyszczególnienie Specification		Zawartość kwasów tłuszczowych Fatty acids content					
		Suma Total		Nasycone Saturated		Nienasycone Unsaturated	
		[% s.m.] [% d.m.]	[g/100g] białka [g/100g] of protein	[% s.m.] [% d.m.]	[g/100g] białka [g/100g] of protein	[% s.m.] [% d.m.]	[g/100g] białka [g/100g] of protein
Koral	PK	7,84	9,26	1,29	1,52	6,55	7,73
	Mąka Flour	2,08	7,76	0,34	1,27	1,74	6,49
Poa	PK	6,05	7,07	1,05	1,23	5,00	5,84
	Mąka Flour	2,10	7,96	0,35	1,33	1,75	6,63
Ramir	PK	6,59	7,77	1,24	1,46	5,35	6,31
	Mąka Flour	2,02	8,11	0,37	1,48	1,65	6,62
Piast	PK	2,55	2,88	0,43	0,49	2,12	2,39
	PM	5,13	6,39	0,76	0,94	4,37	5,45
	PS	4,56	5,64	0,73	0,90	3,83	4,74
	Mąka Flour	0,82	3,90	0,14	0,68	0,68	3,22

Objaśnienia jak w tab. 1/

Footnotes see Tab. 1.



Stwierdzone wartości nie są uzależnione od aktywności inhibitora trypsyny w wyjściowych mąkach. Uzyskane w pracy zmniejszenie aktywności inhibitora trypsyny w preparatach białkowych w stosunku do wyjściowej mąki potwierdzają wyniki otrzymane przez innych badaczy [1, 11, 16].

Zawartość kwasów tłuszczowych w preparatach białkowych otrzymanych kwasem z grochu odmiany Poa, Ramir i Piast była mniejsza niż w wyjściowej mące (tab. 4), natomiast większa w preparatach z grochu odmiany Koral. Zastosowanie w procesie precypitacji flokulantów znacznie podwyższyło poziom kwasów tłuszczowych, a w szczególności nienasyconych. Pomimo, że kwasy nienasycone są substratem działalności lipooksygenazy, ich zawartość w tłuszczu preparatów białkowych należy uznać za pożądaną, z uwagi na ich hipolipidemiczne oddziaływanie. W badaniach prowadzonych przez Sánchez-Vioque i wsp., [22] metoda ekstrakcji białek z mąki ciecierzycy miała zasadniczy wpływ na zawartość kwasów tłuszczowych polarnych lipidów. Wyniki niniejszej pracy wskazują, że obok gatunku i odmiany stosowanych nasion, skład tłuszczu preparatów determinują również warunki ekstrakcji substancji białkowych i ich następnej precypitacji.

### Wnioski

1. Skład chemiczny preparatów białkowych uzależniony jest od metody zastosowanej w procesie koagulowania białek i od ich modyfikacji chemicznej.
2. Wykorzystanie wielkocząsteczkowych polimerów w procesie otrzymywania preparatów białkowych z grochu powoduje zmiany składu chemicznego otrzymanych preparatów w porównaniu z metodą standardową.
3. Preparaty flokulowane z mąki po modyfikacji chemicznej białek charakteryzuje wyższa zawartość białka w porównaniu z preparatami flokulowanymi z mąki z pominięciem modyfikacji.

### Literatura

- [1] Abu-Tarboush H.M., Ahmed S.A.B.: Studies on karkade (*Hibiscus sabdariffa*): protease inhibitors, phytate, *in vitro* protein digestibility and gossypol content. Food Chem., 1996, **56** (1), 15-19.
- [2] Alamanou S., Doxastakis G.: Thermoreversible size selective swelling polymers as a means of purification and concentration of lupin seed proteins (*Lupinus albus ssp Graecus*) Food Hydrocolloids, 1995, **9** (2), 103-109.
- [3] Alamanou S., Doxastakis G.: Physico-chemical properties of lupin seed proteins (*Lupinus albus, ssp. Graecus*). Lebensm.Wiss.u.Technol., 1995, **28**, 641-643.
- [4] Baraniak B.: Studia nad optymalizacją procesu wyodrębniania frakcji białkowych chloroplastycznych i cytoplazmatycznych z zielonych części roślin uprawnych. Wyd. AR w Lublinie, ser. Rozprawy naukowe, 1994.

- [5] Baraniak B., Waleriańczyk E.: "Flocculation" Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, Academic Press, London 1993, **3**, 1913-1917.
- [6] Bejosano F.P., Corke H.: Properties of protein concentrates and hydrolysates from Amaranthus and Buckwheat. Industrial Crops and Products, 1999, **10**, 175-183.
- [7] Chiang W.D., Shih C.J., Chu Y.H.: Functional properties of soy protein hydrolysate produced from a continuous membrane reactor system. Food Chem., 1999, **65**, 189-194.
- [8] Cumming R.H., Robinson P.M., Martin G.E.: Flocculation of *Esch. coli* with cationic polymers: a model for the dose curve based on charge. Biseperation, 1996, **6** (1), 17-23.
- [9] Derlmin W., Prasertsan P., Doelle H.: Screening and characterization of bioflocculant produced by isolated *Klebsiella* sp. App. Microbiol. Biotechnol., 1999, **52** (5), 698-703.
- [10] El-Behhari M., Gehin G., Coulon J., Bonaly R.: Evidence for a lectin in *Kluyveromyces* sp. that is involved in co-flocculation with *Schizosaccharomyces pombe*. FEMS Microbiol. Lett., 2000, **184** (1), 41-46.
- [11] Fernández-Quintela A., Macarulla M.T., Del Barrio A.S., Martínez J.A.: Composition and functional properties of protein isolates obtained from commercial legumes grown in northern Spain. Plants Foods Human Nutr., 1997, **51**, 331-342.
- [12] Genovese M.I., Lajolo F.M.: Influence of naturally acid-soluble proteins from beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on *in vitro* digestibility determination. Food Chem., 1998, **62** (3), 315-323.
- [13] Hamerstrand G.E., Black L.T., Glover J.D.: Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. Cereal Chem., 1981, **58** (1), 42-45.
- [14] Haszczyńska J.: Preparaty do aglomeracji osadów w soku po saturacji I. Gazeta Cukrownicza, 1992, **11**, 213-214.
- [15] Klepacka M., Porzucek H., Kluczyńska M.: Effect of heat treatment on chemically modified proteins of legume seeds. Food Chem., 1997, **58** (3), 219-222.
- [16] Le Guen M.P., Huisman J., Guéguen J., Beelen G., Verstegen M.W.A.: Effects of a concentrate of pea antinutritional factors on pea protein digestibility in piglets. Livest. Prod. Sci., 1995, **44**, 157-167.
- [17] Mwasaru M.A., Muhammad K., Bakar J., Che Man Y.B. : 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., 1999, **67**, 435-443.
- [18] Mwasaru M.A., Muhammad K., Bakar J., Che Man Y.B.: Effects of isolation technique and conditions on the extractability, physicochemical and functional properties of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and cowpea (*Vigna unguiculata*) protein isolates. II. Functional properties. Food Chem., 1999, **67**, 445-452.
- [19] Nakata K., Harada N., Sumitomo K., Yoneda K.: Enhancement of plant stem growth by flocculation of the antibiotic-producing bacterium, *Pseudomonas fluorescens* S272, on the roots. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2000, **64** (3), 459-465.
- [20] Nam J.S., Kwon S.G., Lee S.O., Hwang J.S., Lee J.D., Yoon B.D., Lee T.H.: Bioflocculant produced by *Aspergillus* sp. JS-42. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1996, **60**, 325-327.
- [21] Prokpov V.A., Nekrasova L.S., Mudryi I.V.: The toxic and hygienic characteristics of new synthetic organic flocculants AES-5, AES-7 and AES-10. Likaska Sprava, 2000, **2**, 15-19.
- [22] Sánchez-Vioque R., Clemente A., Viogue J., Bautista J., Millán F.: Polar lipids of defatted chickpea (*Cicer arietinum* L.) flour and protein isolates. Food Chem., 1998, **63**, 357-361.
- [23] Sánchez-Vioque R., Clemente A., Viogue J., Bautista J., Millán F.: Protein isolates from chickpea (*Cicer arietinum* L.): chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chem., 1999, **64**, 237-243.

- [24] Soetrisno U.S.S., Holmes Z.A.: Protein yields and characteristics from acid and salt coagulations of yellow pea (*Pisum sativum* L. Miranda) flour extractions. J. Agric. Food Chem., 1992, **40**, 970-974.
- [25] Tolman G.H.: Effect of hot aqueous ethanol treatment on anti-nutritional factors, protein denaturation and functional properties in raw pea protein isolate. Anim. Feed Sci. Technol., 1995, **56**, 159-168.
- [26] Trubetskoy V.S., Loomis A., Hagstrom J.E., Budker V.G., Wolff J.A.: Layer-by-layer deposition of oppositely charged polyelectrolytes on the surface of condensed DNA particles. Nuc. Acids Res., 1999, **27** (15), 3090-3095.
- [27] Tsoka S., Cinawskij O.C., Thomas O.R., Titchener-Hooker N.J., Hoare M.: Selective flocculation and precipitation for the improvement of virus-like particle recovery from yeast homogenate. Biotechnol. Prog., 2000, **16** (4), 661-667.
- [28] Yokoi H., Yoshida T., Mori S., Hirose J., Hyashi S., Takasaki Y.: Bio-polymer flocculant produced by an *Enterobacter* sp. Biotechnol. Lett., 1997, **19** (6), 569-573.

#### THE CONTENT OF TOTAL PROTEIN, TRYPSIN INHIBITOR, AND STACHYOSE IN PROTEIN PREPARATIONS COAGULATED FROM PEA FLOUR BY VARIOUS METHODS

##### S u m m a r y

In the study, there were compared contents of various components (protein, fatty acids, stachyose level, and activity of trypsin inhibitor) in preparations precipitated from several different varieties of pea (Koral, Poa, Ramir, and Piast) at an iso-electric point of proteins. The usefulness of two polyelectrolytes (a cationic 'Magnafloc M-22S' and an anionic 'Superfloc A-150') for obtaining protein preparations from a 'Piast' pea variety was also tested. Additionally, the preparations were precipitated from flour the proteins of which were chemically modified using with an acetic and succinic anhydride.

The study showed that the content of individual components in the preparations investigated highly depended on the pea variety. The preparations precipitated using polyelectrolytes contained higher amounts of fatty acids if compared with the preparation obtained using an acid. When high-molecular polyelectrolytes were applied, the protein content was significantly higher in preparations after the chemical modification than in preparations flocculated without prior chemical modification.

**Key words:** pea, protein preparations, methods of coagulation, protein, trypsin inhibitor, stachyose ☒