

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA

**WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE PREPARATÓW BIAŁKOWYCH
OTRZYMANÝCH Z NASION FASOLI (*PHASEOLUS VULGARIS*)
METODĄ KRYSZALIZACJI I IZOLACJI KLASYCZNEJ**

Streszczenie

W pracy porównano właściwości funkcjonalne – rozpuszczalność białek w funkcji pH, powierzchnię hydrofobowość aromatyczną w pH 2,8 i 8,0 oraz indeks aktywności emulgowania (IAE) – preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli dwoma metodami: izolacji klasycznej i krystalizacji w środowisku kwaśnym. Podczas izolacji klasycznej białka odzyskiwano z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności, w postaci amorficznej (PBA). W drugiej metodzie wykorzystano właściwości białek fasoli do tworzenia struktur krystalicznych w środowisku kwaśnym (PBK). Otrzymane preparaty białek krystalicznych miały mniejszą powierzchnię hydrofobowość aromatyczną zarówno w pH 2,8, jak i 8,0; mniejszą zdolność absorpcji wody i niższy indeks aktywności emulgowania (IAE) w porównaniu z PBA. Duża hydrofobowość w środowisku kwaśnym zarówno białek krystalicznych, jak i amorficznych wskazuje, że mogą mieć one lepsze właściwości funkcjonalne w tym środowisku. Stwierdzono, że w trakcie podgrzewania preparatów w $t=100^{\circ}\text{C}$ przez 30 min, hydrofobowość, wodochłonność i IAE wzrosły bardziej w PBK niż w PBA. Preparaty białek krystalicznych miały gorsze właściwości funkcjonalne w porównaniu z amorficznymi, co wynikało z odmiennego składu i struktury tych białek.

Słowa kluczowe: fasola, białka krystaliczne (PBK), białka amorficzne (PBA), rozpuszczalność, hydrofobowość, wodochłonność, indeks aktywności emulgowania (IAE).

Wprowadzenie

Izolacja białek jest procesem technologicznym, w wyniku którego otrzymuje się preparaty wysokobiałkowe. Opracowano wiele technologii, dzięki którym uzyskano preparaty białkowe z obniżoną zawartością oligosacharydów i fitynianów [20].

W zależności od zastosowanej metody izolacji uzyskuje się białka o różnej strukturze, amorficznej lub krystalicznej i o różnych właściwościach funkcjonalnych [1, 21].

Dr M. Piecyk, prof. dr hab. M. Klepacka, Zakład Oceny Jakości Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Jakości Żywności, SGGW, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa

Powszechnie stosowana jest metoda otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [20]. Metodą tą otrzymuje się białka bezpostaciowe, tzw. amorficzne. Inną metodą stosowaną do otrzymywania preparatów białkowych jest krystalizacja w środowisku kwaśnym, pozwalająca na otrzymanie różnych form kryształów [2, 8, 17].

Wśród białek nasion roślin strączkowych najłatwiej krystalizuje faseolina (główna frakcja białek fasoli) przy zastosowaniu prostych technik krystalizacji. Glicynina, główna frakcja białek soi, nie krystalizuje ze względu na jej heterogeniczność oraz polimorfizm struktury pierwszorzędowej [22, 23].

O zastosowaniu preparatów białkowych jako dodatków do żywności, obok wartości odżywczej i jakości mikrobiologicznej, decydują również właściwości funkcjonalne. Parametry zastosowanego procesu technologicznego do otrzymywania preparatów białkowych, takie jak rodzaj ekstrahenta, kwasowość środowiska, temperatura czy siła jonowa mają wpływ na zmiany konformacyjne białka, a tym samym zmieniają jego właściwości funkcjonalne, np. DiLollo i wsp. [8] wykazali różnice w powierzchniowej hydrofobowości alifatycznej między białkami amorficznymi a krystalicznymi.

Zdolność emulgowania i właściwości pianotwórcze są rezultatem zachowania się białek na powierzchni faz tłuszcz–woda czy powietrze–woda. Interakcje białko–woda są uwarunkowane nie tylko obecnością aminokwasów polarnych, ale także ich dostępnością na powierzchni cząsteczki białka. Dlatego uważa się, że powierzchniowa hydrofobowość białek jest jedną z najlepszych metod ich charakterystyki i przewidywania ich rozpuszczalności oraz zachowania podczas tworzenia emulsji i pian [9].

Celem pracy było wyznaczenie właściwości funkcjonalnych: wodochłonności, zdolności emulgowania, rozpuszczalności i związanej z nimi powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej w preparatach białkowych otrzymanych w dwojaki sposób: metodą izolacji klasycznej tj. odzyskania białek z ekstraktów alkalicznych w punkcie ich najmniejszej rozpuszczalności oraz poprzez krystalizację w środowisku kwaśnym. Ponadto porównywano wpływ ciepła (temp. 100°C) na te właściwości.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) trzech odmian (Mela, Proсна, Wenta), które poddano obłuszczeniu, przemiałowi i przesianiu przez sita o średnicy oczek 0,15 mm.

Do badań użyto preparatów białek amorficznych (PBA), otrzymanych przez wytrącenie białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3) z ekstraktów wodnych mąki po doprowadzeniu pH do 9,0. Preparaty białek krystalicznych (PBK) otrzymywano przez ekstrahowanie białek z mąki kwasem cytrynowym i odzyskiwanie

ich z ekstraktów przez oziębienie w temp. 5°C w ciągu 18 godz. [1, 14]. Do ekstrakcji stosowano roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu 0,03 mol/l i wartości pH 5,5 [17].

W celu przeprowadzenia charakterystyki chemicznej w preparatach białkowych oznaczano zawartość popiołu, białka oraz suchej masy znormalizowanymi metodami według AOAC [4].

W celu zbadania wpływu ciepła na właściwości funkcjonalne badanych białek, uzyskane preparaty, po zamknięciu w fiolkach w atmosferze azotu, ogrzewano w łaźni wodnej w temp. 100°C przez 30 min, po czym natychmiast chłodzono. Do pomiaru zmian powierzchniowej hydrofobowości aromatycznej wskutek ogrzewania, 0,1% roztwory białek poddawano działaniu identycznych warunków.

Rozpuszczalność białek oznaczano przez doprowadzenie pH 0,1% wodnych roztworów preparatów białek amorficznych i krystalicznych do żądanej wartości, a następnie prowadzono ekstrakcję przez godzinę w wytrząsarce laboratoryjnej. Po odwirowaniu (10 min; 8000 x g) w otrzymanym ekstrakcie oznaczano zawartość białka rozpuszczalnego metodą Lowry'ego [14]. Badania prowadzono do osiągnięcia takiego pH (w środowisku alkalicznym i kwaśnym), w którym białka wykazywały rozpuszczalność powyżej 90%.

Wodochłonność oznaczano na podstawie ilości zaabsorbowanej wody dodanej w kilkunastokrotnym nadmiarze do preparatu białkowego [19].

Powierzchniową hydrofobowość aromatyczną białek oznaczano w mące, preparatach białek amorficznych i krystalicznych metodą fluorescencyjną z ANSA (kwas 8-anilino-1-naftaleno-sulfonowy) [10]. Do oznaczeń przygotowywano około 0,1% ekstrakty białek w 0,01 M buforze fosforanowym (pH 8,0) oraz w buforze McIlvaine'a (pH 2,8). Po 45 min od dodania ANSA (10 µl roztworu 0,1 M do 5 ml próbki) dokonywano pomiarów intensywności fluorescencji (FI) w spektrofлуorymetry Shimadzu RF-1501 przy długości fali wzbudzenia 390 nm i emisji 470 nm. Naturalną fluorescencję białek eliminowano przez pomiar FI prób ślepych bez dodatku ANSA. Powierzchnię hydrofobową wyrażano w jednostkach umownych jako stosunek intensywności fluorescencji będącej wynikiem połączenia ANSA z hydrofobowymi aminokwasami aromatycznymi do stężenia białka w roztworze oznaczonego metodą Kjeldahla [FI/% białka].

Indeks aktywności emulgowania (IAE) oznaczano metodą Pearce'a i Kinselli [16], przygotowując emulsje przez zhomogenizowanie (Ultra Turrax T 25 przy 20500 obr./min przez 30 s), 15 g oleju rzepakowego i 45 g wodnego roztworu preparatu zawierającego 0,5% białka. W otrzymanej emulsji mierzono zmętnienie poprzez pomiar absorbancji przy 500 nm rozcieńczonej emulsji w stosunku 1:100 0,1% SDS (sodowy siarczan dodecylu) oraz zawartość oleju metodą suszarkową.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, w której badano istotność różnic między średnimi wartościami w próbach stosując test Duncana ($p \leq 0,05$) oraz

określono korelację między hydrofobowością białek a IAE. Analizy te wykonano przy użyciu programu komputerowego Statgraphics Plus 2.1.

Wyniki i dyskusja

Analiza podstawowego składu chemicznego wykazała, że procesy izolacji przyczyniły się do uzyskania preparatów o wysokiej zawartości białka w stosunku do surowca wyjściowego (tab. 1). Preparaty białek krystalicznych otrzymane ze wszystkich badanych odmian charakteryzowały się wyższą zawartością białka (75–82%) w porównaniu z preparatami białek amorficznych (75–77%).

Tabela 1

Podstawowy skład chemiczny mąki i preparatów białkowych z nasion fasoli Mela, Prosna i Wenta.
Basic chemical composition of flours and protein preparations from bean (variety Mela, Prosna and Wenta).

Odmiana fasoli Variety	Rodzaj próbki Kind of sample	Zawartość wody [%] Water content [%]	Zawartość białka g/100g s.m. Protein content g/100g d.m.	Zawartość popiołu g/100g s.m. Ash content g/100g d.m.
Mela	Mąka	8,4 (± 0,005) ^a	21,9 (± 0,303)	4,29 (± 0,089)
	PBA	7,3 (± 0,012)	76,9 (± 0,424)	5,43 (± 0,069)
	PBK	7,0 (± 0,012)	82,4 (± 0,292)	5,68 (± 0,012)
Prosna	Mąka	8,0 (± 0,017)	18,5 (± 0,335)	4,19 (± 0,038)
	PBA	4,3 (± 0,005)	68,0 (± 0,391)	7,03 (± 0,027)
	PBK	4,3 (± 0,018)	74,9 (± 0,267)	3,99 (± 0,079)
Wenta	Mąka	9,4 (± 0,028)	25,0 (± 0,399)	5,43 (± 0,011)
	PBA	8,1 (± 0,022)	76,7 (± 0,197)	4,98 (± 0,033)
	PBK	1,6 (± 0,037)	81,5 (± 0,200)	4,17 (± 0,054)

a – Wartości średnie ± odchylenie standardowe;

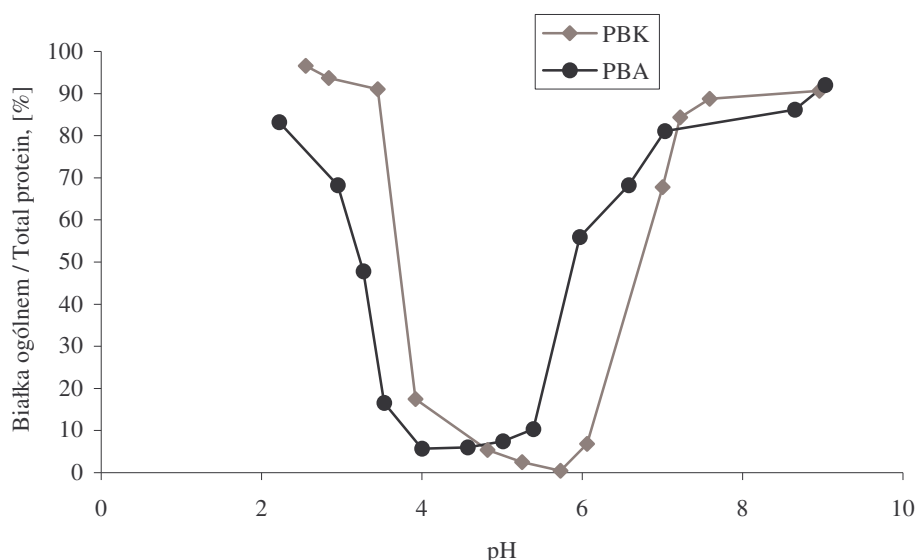
a – Mean values ± standard deviation.

Wyższą zawartość białka w preparatach białek krystalicznych niż amorficznych uzyskali Alli i Baker [1], która zależała od stężenia kwasu cytrynowego i jego pH, uzyskanych form krystalicznych oraz gatunku i odmiany badanych nasion, przy czym różnice międzyodmianowe były znacznie mniejsze.

Przykładowe profile rozpuszczalności białek amorficznych i krystalicznych w funkcji pH preparatów z fasoli odmiany Prosna* przedstawiono na rys. 1. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że białka krystaliczne

*W dalszym tekście, w celu uproszczenia analizy, preparaty z fasoli będą określane nazwą danej odmiany.

i amorficzne różniły się zakresem pH, w którym wykazywały niską rozpuszczalność. Najmniejszą rozpuszczalność białek krystalicznych (maksymalnie do 2,5%) stwierdzono w środowisku o pH między 5,0 a 5,5. Natomiast białka amorficzne wykazywały najmniejszą rozpuszczalność (maksymalnie do 7%) w pH 4,0–4,5. Obserwowane różnice zarówno w zakresie pH, w którym badane białka wykazują najmniejszą rozpuszczalność, jak i wielkości tej rozpuszczalności wynikają z odmiennej ich budowy. Białko krystaliczne zbudowane jest z globuliny 7S (78%), której pI wynosi 5,5 i 11S (11%), natomiast białko amorficzne zbudowane jest również z faseoliny i leguminy, ale ich udział jest mniejszy (64%), natomiast więcej jest frakcji o niskich masach cząsteczkowych [18].

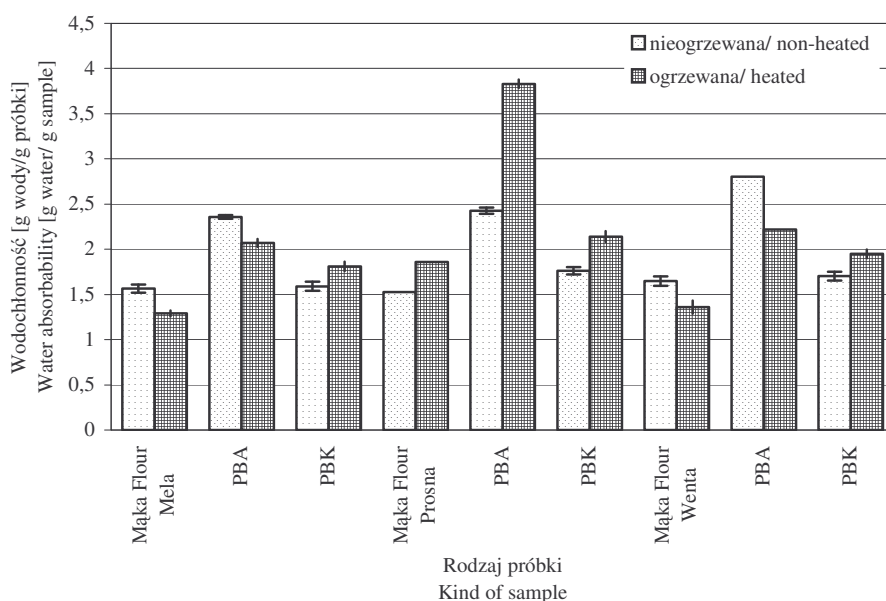


Rys.1. Rozpuszczalność białek amorficznych (PBA) i krystalicznych (PBK) z nasion fasoli odmiany Prosna w funkcji pH.

Fig. 1. The solubility of amorphous (PBA) and crystalline (PBK) proteins obtained from bean (the 'Prosna' variety) seeds as a function of pH.

Porównując rozpuszczalność białek amorficznych i krystalicznych poza odmiennym zakresem najmniejszej rozpuszczalności można również stwierdzić, że białka krystaliczne były bardziej rozpuszczalne w środowisku kwaśnym (pH= 3,0) niż amorficzne. Natomiast w środowisku alkalicznym (powyżej pH 8,0) rozpuszczalność białek krystalicznych i amorficznych była podobna. Ilość białek rozpuszczalnych uzyskana w tym zakresie pH nie odbiegała od danych podawanych przez innych autorów [5].

Izolacja białek przez ich wytrącenie z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności przyczyniała się do poprawy wodochłonności w porównaniu z mąką i wynosiła 2,4–3,0 g H₂O/ g s.m. próbki (rys. 2). Natomiast pozyskanie białek przez ich krystalizację z kwasowych ekstraktów nie wpłynęło na poprawę zdolności absorpcji wody w porównaniu z mąką (wyjątek Proсна). Wpływ ciepła na wodochłonność preparatów białek amorficznych zależał od odmiany nasion, z których zostały otrzymane. Ogrzewanie (w temp. 100°C) wpłynęło na poprawę wodochłonności tylko w preparacie białek amorficznych z odmiany Proсна (58%), natomiast w pozostałych preparatach z odmian Mela i Wenta następowało jej obniżenie, odpowiednio o 12 i 21% (różnice istotne statystycznie). Porównując wyniki wodochłonności białek krystalicznych nieogrzewanych i ogrzewanych stwierdzono, że ogrzewanie przyczyniło się do poprawy wodochłonności we wszystkich badanych odmianach.

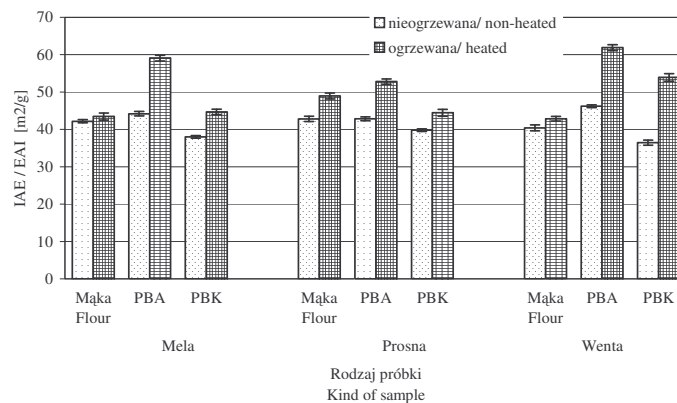


Rys. 2. Wodochłonność mąki i preparatów białek amorficznych i krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli odmiany Mela, Proсна i Wenta.

Fig. 2. The water absorbability of a flour and amorphous & crystalline protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Proсна, and Wenta varieties).

We wszystkich badanych próbkach białek nieogrzewanych i ogrzewanych oznaczono indeks aktywności emulgowania IAE (rys. 3). Białka amorficzne charakteryzowały się podobną lub nieco niższą wartością IAE w porównaniu z mąką. W wyniku krystalizacji otrzymano białka o niższej wartości IAE w porównaniu z mąką

i PBA (różnice statystycznie istotne). Otrzymane wartości IAE mąki i preparatów białkowych są podobne do wyników izolatów sojowych ($42\text{--}65\text{ m}^2/\text{g}$) i izolatów z grochu ($42\text{--}54\text{ m}^2/\text{g}$) [11, 24]. Poddanie działaniu ciepła (w temp. 100°C) powodowało istotne zwiększenie wskaźnika aktywności emulgowania we wszystkich badanych preparatach, który w przypadku mąki był niewielki. Uzyskane wyniki są podobne do prezentowanych przez innych autorów dotyczących poprawy właściwości emulgujących białek na skutek zmian denaturacyjnych [12, 24]. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki IAE preparatów białek fasoli wskazują na słabe właściwości emulgujące w środowisku obojętnym. Dlatego w dalszych badaniach określano powierzchnię hydrofobową aromatyczną białek badanych preparatów oraz mąki w pH, w których ustalono ich dużą rozpuszczalność tj. w pH 8,0 i 2,8.

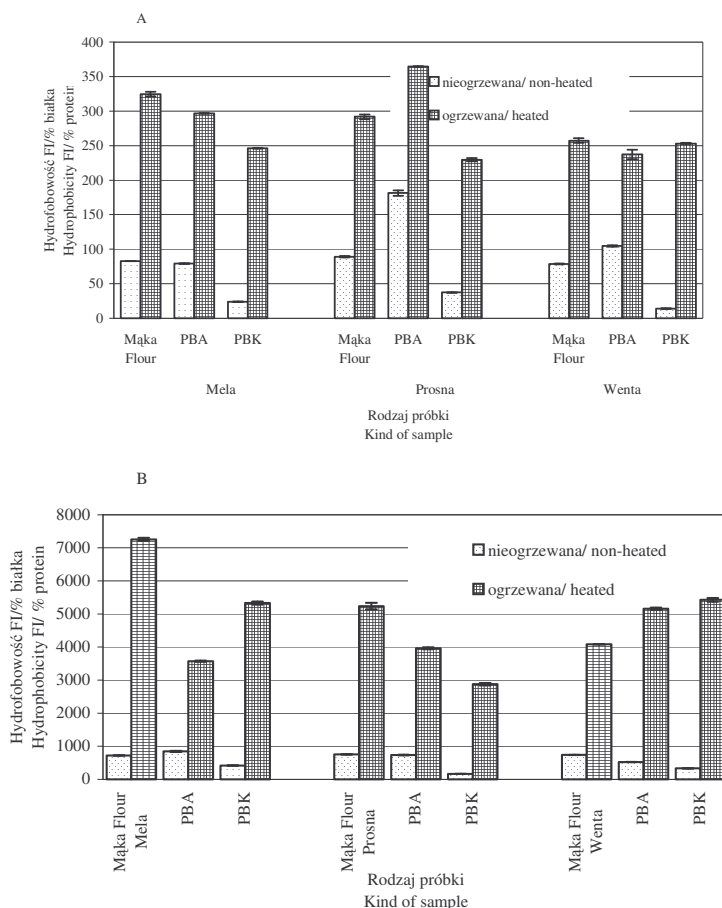


Rys. 3. Indeks aktywności emulgowania (IAE) mąki i preparatów białek amorficznych i krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli odmian Mela, Prosna i Wenta.

Fig. 3. The emulsifying activity index (EAI) of a flour and amorphous & crystalline protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties).

Na podstawie wyników uzyskanych w środowisku o pH 8,0 (rys. 4A) stwierdzono, że białka krystaliczne miały znacznie niższą hydrofobowość niż białka mąki czy białka amorficzne. W białkach krystalicznych powierzchnia hydrofobowa była niższa około 3–7 razy niż w białkach amorficznych. Wyniki uzyskane w pH 2,8 (rys. 4B) wskazywały na znacznie wyższą hydrofobowość powierzchnię wszystkich badanych białek w porównaniu z wynikami otrzymanymi w pH 8,0. Otrzymane wyniki świadczą o znacznie większych zmianach w strukturze białek w środowisku kwaśnym. Porównując hydrofobowość badanych białek krystalicznych z białkami mąki i białkami amorficznymi stwierdzono podobne zależności jak w pH 8,0. Białka krystaliczne charakteryzowały się niższą hydrofobowością, 1,5–4,5 razy mniejszą niż białka amorficzne.

Ogrzewanie białek (w temp. 100°C) wpłynęło na znaczny wzrost ich hydrofobowości w stosunku do prób niepoddanych działaniu ciepła zarówno w pH 2,8, jak i 8,0. Jednak większe zmiany w strukturze badanych białek pod wpływem obróbki termicznej obserwowano w środowisku kwaśnym.



Rys. 4. Hydrofobowość w pH 8,0 (A) i pH 2,8 (B) białek mąki i preparatów amorficznych i krystalicznych nieogrzewanych i ogrzewanych, otrzymanych z nasion fasoli odmian Mela, Prosna i Wentka.

Fig. 4. The protein hydrophobicity of flour proteins and preparations of amorphous & crystalline proteins, non heated and heated, obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wentka varieties), at pH equaling 8.0 (A) and 2.8 (B).

W tym środowisku, pod wpływem ciepła, szczególnie duże zmiany zachodziły w białkach krystalicznych, w których powierzchniowa hydrofobowość w pH 8,0 zwiększała się od 6 razy (Prosna) do 17 razy (Wentka), natomiast w środowisku o pH 2,8

zaobserwowano wzrost od 13 (Mela) do 18 razy (Prosna). W białkach amorficznych oddziaływanie ciepła wywołało zmianę ekspozycji aminokwasów hydrofobowych na powierzchni cząsteczki, ale w mniejszym stopniu niż w białkach krystalicznym. W białkach amorficznych preparatów Prosna i Wenta (pH 8,0) obserwowano około dwukrotne zwiększenie się hydrofobowości pod wpływem ciepła, natomiast w białku z Meli było ono około czterokrotne. Natomiast w pH 2,8 wzrost ten był znacznie większy i również zależał od odmiany fasoli. W białku amorficznym z Meli i Prosny hydrofobowość zwiększyła się po ogrzaniu odpowiednio 4 i 5 razy natomiast z Wenty 9-krotnie. Otrzymane wyniki wskazały na większą ekspozycję aminokwasów aromatycznych w wyniku rozwinięcia łańcucha polipeptydowego w środowisku kwaśnym.

Kato i wsp. [13] oraz Voutsinas i wsp. [24] podają, że powierzchniowa hydrofobowość białek skorelowana jest z właściwościami emulgującymi. Ponieważ w zakresie pH 7,0–10,0 nie zmienia się znacząco ekspozycja aminokwasów hydrofobowych na powierzchni globulin 7S i 11S, dlatego sprawdzono czy istnieje zależność między IAE a hydrofobowością białek w pH = 8,0 niepoddanych działaniu ciepła. Analiza regresji potwierdziła istnienie zależności ($IAE = 38,137 + 0,04298 \cdot FI/\%$ białka) o współczynniku korelacji $r = 0,70$ (poziom istotności $p = 0,034$). Uzyskano dobrą korelację, ale dotyczy ona tylko hydrofobowości aromatycznej, ponieważ badania nie obejmowały oznaczeń hydrofobowości spowodowanej obecnością aminokwasów alifatycznych. Jednak w badaniach hydrofobowości alifatycznej, prowadzonych przez DiLollo i wsp. [8], wykazano, że białka krystaliczne mają mniejszą powierzchnię hydrofobową niż białka amorficzne. Ponadto oznaczenia hydrofobowości prowadzono tylko na białkach rozpuszczalnych, a w badaniach właściwości emulgujących izolatów białkowych oraz frakcji białek rozpuszczalnych dowiedziono, że lepsze właściwości emulgujące mają frakcje rozpuszczalne [7]. Badając, czy występuje korelacja między hydrofobowością a IAE, nie uwzględniano próbek poddanych działaniu ciepła ze względu na różne warunki obróbki termicznej (na sucho i w roztworze).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań wskazują, że zastosowana metoda izolacji miała istotny wpływ na właściwości funkcjonalne badanych białek. Warunki procesu technologicznego, takie jak pH czy rodzaj ekstrahenta, mogą wpływać na zmiany w białku. Izolowanie białek powoduje, że zachodzą w nim oddziaływania typu jonowego, prowadzące do nieodwracalnych zmian w ładunku cząsteczki białka [3], co może mieć wpływ na jego rozpuszczalność. Ponadto izolacja białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności może powodować częściowe rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych, dzięki czemu zwiększa się ekspozycja aminokwasów na powierzchni białka. Wzrost ekspozycji aminokwasów polarnych (cystyny i treoniny) wpływa na poprawę wodochłonności, natomiast niepolarnych na poprawę zdolności

emulgowania. Drugim czynnikiem wpływającym na właściwości funkcjonalne białek jest ich budowa. Rozdziały elektroforetyczne i filtracja żelowa wykazały, że białka krystaliczne zbudowane są głównie z globuliny 7S, natomiast w białku amorficznym udział globuliny 7S jest mniejszy [18].

Alli i wsp. [9] stwierdzili, że białka globulinowe (zarówno 7S, jak i 11S) nasion roślin strączkowych charakteryzują się niską powierzchnią hydrofobową. Jednak globulina 7S ma mniejszą powierzchnię hydrofobowość niż 11S, co związane jest z jej kompaktową strukturą [6]. Ponadto struktura globulin 7S i 11S zależy od pH środowiska. W zakresie pH 7,0–10 nie ulegają one znacznym zmianom i nie obserwuje się zmian ich powierzchniowej hydrofobowości. Natomiast w środowisku kwaśnym (zwłaszcza w pH 2,4) białka te ulegają dysocjacji do podjednostek czemu towarzyszy rozwinięcie łańcuchów polipeptydowych. Wynikiem tych zmian jest wzrost powierzchniowej hydrofobowości białek. Jednak większa ekspozycja aminokwasów hydrofobowych na powierzchni cząsteczki w pH 2,4 występuje w globulinie 11S niż 7S. Związane jest to z jej dysocjacją do sześciu podjednostek, podczas gdy globulina 7S dysocjuje do trzech podjednostek. Otrzymane w tej pracy różnice między białkami amorficznymi i krystalicznymi wskazują, że na powierzchnię hydrofobową miała wpływ obecność frakcji leguminopodobnej (11S) w białkach amorficznych.

Uzyskane wyniki w przypadku próbek PBK poddanych działaniu ciepła (temp. 100°C) świadczą o zmianach zachodzących w białkach, które prowadzą do zwiększenia ekspozycji aminokwasów polarnych i niepolarnych (wzrost hydrofobowości aromatycznej) na powierzchni cząsteczki białka, w wyniku czego wzrasta wodochłonność i zdolność emulgowania.

Wnioski

1. Preparaty białkowe z nasion fasoli, otrzymane w procesie krystalizacji, wykazują niższą powierzchnię hydrofobowość aromatyczną, słabszą zdolność emulgowania oraz mniejszą zdolność absorpcji wody w porównaniu z preparatami uzyskanymi w wyniku izolacji klasycznej.
2. Wyższa hydrofobowość w środowisku kwaśnym niż alkalicznym białek krystalicznych i amorficznych wskazuje, że mogą mieć lepsze właściwości funkcjonalne w tym środowisku.
3. Obróbka termiczna w większym stopniu wpłynęła na poprawę właściwości funkcjonalnych białek krystalicznych w porównaniu z preparatami otrzymanymi metodą izolacji klasycznej.

Literatura

- [1] Alli I., Baker B.E.: Constitution of leguminous seeds: the microscopic structure of proteins isolated from *Phaseolus* beans. *J. Sci. Food Agric.*, 1980, **31**, 1316-1322.
- [2] Alli I., Baker B.E.: Constitution of leguminous seeds. a note on protein- phytic acid interactions during isolation of acid-soluble protein from *Phaseolus* beans. *J. Sci. Food Agric.*, 1981, **32**, 588-592.
- [3] Alli I., Gibbs B.F., Okoniewska M.K., Konishi Y., Dumas F.: Identification and characterization of phaseolin polypeptides in a crystalline protein isolated from White Kidney Beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 1830-1834.
- [4] AOAC 1990: Official Methods of Analysis. 15th edition, Virginia USA.
- [5] Carbonaro M., Cappelloni M., Nicoli S., Lucarini M., Carnovale E.: Solubility- digestibility relationship of legume proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 3387-3394.
- [6] Chang K.C., Satterlee L.D.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 1981, **46**, 1368-1373.
- [7] Dagorn-Scaviner C., Gueguen J., Lefebvre J.: Emulsifying properties of pea globulins as related to their adsorptions behaviors, *J. Food Sci.*, 1987, **52**, 335-341.
- [8] DiLollo A., Alli I., Biliardieris C., Barthakur N.: Thermal and surface active properties of citric acid-extracted and alkali- extracted proteins from *Phaseolus* beans. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 24-29.
- [9] Gueguen J.: Relation between conformation and surface hydrophobicity of pea (*Pisum sativum* L.) globulins. *J. Agric. Food Chem.*, 1989, **37**, 1236-1241.
- [10] Hayakawa S., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity and net charge to the solubility of milk and soy proteins. *J. Food Sci.*, 1985, **50**, 486-491.
- [11] Jackman L.R., Yada R.Y.: Functional properties of whey- pea protein composite blends in model system. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 1287-1292.
- [12] Kato A., Osako Y., Matsudomi N., Kobayashi K.: Changes in the emulsifying and foaming properties of proteins during heat denaturation. *Agric. Biol. Chem.*, 1983, **47**, 33-37.
- [13] Kato A., Tsutsui N., Matsudomi N., Kobayashi K., Nakai S.: Effects of partial denaturation on surface properties of ovalbumin and lysozyme. *Agric. Biol. Chem.*, 1981, **45**, 2755-2760.
- [14] Lowry O.H., Rosenbrough W.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, **193**, 265-275.
- [15] Musakhanian J., Alli I.: Crystalline nature of acid extracted proteins from *Phaseolus* beans. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1990, **23**, 47-52.
- [16] Pearce K. N., Kinsella J. E.: Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **26**, 716-723.
- [17] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: Digestibility of crystalline proteins from *Phaseolus* beans. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9/50**, 29-33.
- [18] Piecyk M.: Filtracja żelowa białek amorficznych i krystalicznych z nasion fasoli przy użyciu HPLC. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2000, **3 (24)**, 48-54.
- [19] Rutkowski A., Kozłowska H.: Preparaty żywnościowe z białka roślinnego, WNT. Warszawa 1981.
- [20] Sosulski F. W., McCurdy A. R.: Functionality of flours, protein fractions and isolates from Field peas and Faba bean. *J. Food Sci.*, 1987, **52**, 1010-1014.
- [21] Utsumi S., Gidamis A.B., Kanamori J., Kang I.-J., Kito M.: Effects of deletion of disulfide bonds by protein engineering on the conformation and functional properties of soybean proglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, 1993, **41**, 687-691.
- [22] Utsumi S., Khono M., Mori T.: An alternate cDNA encoding glycinin A_{1a} B_x subunit. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, **35**, 210-214.
- [23] Utsumi S., Kim Ch-S., Kohano M., Kito M.: Polymorphism and expression of cDNAs encoding glycinin subunits. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, **51**, 3267-3273.

- [24] Voutsinas L.P., Cheung E., Nakai S.: Relationships of hydrophobicity to emulsifying properties of heat denatured proteins. *J. Food Sci.*, 1983, **48**, 26-32.

**FUNCTIONAL PROPERTIES OF THE BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) SEED
PREPARATIONS OBTAINED USING THE CRYSTALLIZATION AND CLASSICAL
ISOLATION METHODS**

S u m m a r y

In this paper, there were compared some functional properties of the protein preparations obtained from bean seeds using two methods: a classical isolation and crystallization under the acidic conditions. The compared functional properties were: the protein solubility as a function of pH, the surface aromatic hydrophobicity at pH 2.8 and 8.0, and the emulsifying activity index (EAI). During the classical isolation process, the proteins were recovered from an alkaline extract at a minimum solubility pH, and their form was amorphous (PBA). While using the second method, the ability of bean proteins to create crystalline structures under the acidic conditions (PBK) was utilized. The crystalline proteins obtained had a lower surface aromatic hydrophobicity at both pH values: 2.8 and 8.0, a lower water absorbability and EAI comparing to PBA. The high hydrophobicity of the crystalline and amorphous proteins under the acidic conditions implies that they might have better functional properties in this environment. It was stated that while heating the preparations at 100°C for 30 minutes, their hydrophobicity, water absorbability, and EAI values rose higher in PBK than in PBA. Crystalline proteins preparations had worse functional properties if compared to the amorphous ones, and this fact results from their different composition and structure.

Key words: bean, amorphous and crystalline proteins, solubility, hydrophobicity, water absorbability, EAI ☒