

MAŁGORZATA PIECYK, MIROSŁAWA KLEPACKA, ELWIRA WOROBIEJ

**ZAWARTOŚĆ INHIBITORÓW TRYPSYNY, OLIGOSACHARYDÓW  
ORAZ FOSFORU FITYNOWEGO W PREPARATACH BIAŁKOWYCH  
OTRZYMANÝCH Z NASION FASOLI (PHASEOLUS VULGARIS)  
METODĄ KRYSZALIZACJI I IZOLACJI KLASYCZNEJ**

Streszczenie

W pracy porównywano zawartość oligosacharydów, kwasu fitynowego oraz inhibitora trypsyny w preparatach białkowych otrzymanych z nasion fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) dwoma metodami: izolacji klasycznej i krystalizacji w środowisku kwaśnym. Podczas izolacji klasycznej białka odzyskano z ekstraktów alkalicznych w punkcie najmniejszej rozpuszczalności jako postać amorficzną (PBA). W drugiej metodzie wykorzystano zdolność białek fasoli do tworzenia struktur krystalicznych w środowisku kwaśnym (PBK).

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie metody krystalizacji pozwoliło na otrzymanie preparatów o mniejszej zawartości inhibitora trypsyny oraz fosforu fitynowego w porównaniu z izolacją klasyczną. W otrzymanych preparatach w porównaniu z mąką fasolową zmniejszała się również zawartość oligosacharydów. Proces krystalizacji wpływał na zmniejszenie ilości galaktocukrów do takiego samego bądź niższego poziomu niż izolacja klasyczna. Zastosowana obróbka termiczna (100°C, t = 30 min) wpłynęła na zmniejszenie ilości kwasu fitynowego, natomiast zmiana zawartości galaktocukrów i inhibitora trypsyny zależała od odmiany nasion.

**Słowa kluczowe:** fasola, białka krystaliczne i amorficzne, inhibitor trypsyny, kwas fitynowy, galaktocukry

## Wprowadzenie

Izolacja białek jest procesem technologicznym, w wyniku którego otrzymuje się preparaty wysokobiałkowe. Najczęściej stosowana jest procedura otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [29]. 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 [1, 25]. Wśród białek nasion roślin strączkowych najłatwiej

---

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

krystalizuje faseolina (główna frakcja białek fasoli) przy zastosowaniu prostych technik krystalizacji. Jak wykazały wcześniejsze badania [24, 25], struktura białek ma decydujący wpływ na ich strawność i właściwości funkcjonalne. Białka krystaliczne charakteryzują się lepszą podatnością na trawienie, jednak mogą zawierać różnorodne związki (oligosacharydy, inhibitory proteaz, kwas fitynowy, lektyny), które mogą mieć interferujący wpływ na absorpcję i metabolizm składników odżywczych w organizmie człowieka.

Wśród oligosacharydów dominują galaktocukry (rafinoza, stachioza, werbaskoza i ajugoza) określane mianem cukrów z rodziny rafinozy. Ich zawartość w suchych nasionach fasoli wynosi 3–8% [21] i zależy od wielu czynników, takich jak: gatunek, odmiana, stopień dojrzałości nasion, warunki przechowywania i warunki klimatyczne [8]. Cukrom z rodziny rafinozy przypisuje się niekorzystne działanie fizjologiczne ze względu na nieprzyswajalność przez organizm ludzki i efekt gazotwórczy. Procesy technologiczne stosowane przy otrzymywaniu preparatów białkowych oraz modyfikacje (chemiczne, fizyczne) białka przyczyniają się do znacznego zmniejszenia zawartości oligosacharydów w końcowym produkcie [26].

Inhibitory proteaz stanowią niewielką część (około 2,5%) białek dojrzałych nasion fasoli. Badania wpływu różnych procesów na aktywność inhibitorów proteaz wykazały, że pod wpływem temperatury ulegają częściowej lub całkowitej inaktywacji, przy czym jej skuteczność jest uzależniona od wilgotności [7], typu obróbki termicznej [15] oraz czasu i wysokości temperatury [13]. Generalnie procesy prowadzące do otrzymywania koncentratów lub preparatów białkowych powodują obniżenie aktywności inhibitorów [2, 23], ale jeżeli nie są poddane dodatkowo obróbce termicznej mogą wykazywać niekorzystne działanie fizjologiczne na organizm człowieka [20]. Inhibitory proteaz mogą wykazywać działanie przeciwnowotworowe, ale w wysokim stężeniu i w stanie nieinaktywowanym mogą powodować choroby trzustki [5, 23].

Do związków fitynowych występujących w nasionach roślin strączkowych zalicza się kwas fitynowy o poprawnej nazwie – według nomenklatury IUPAC – 1, 2, 3, 4, 5, 6– heksa (diwodorofosforan) mezo-inozytolu ( $C_6N_{18}O_{24}P_6$ ) oraz jego sole – fityniany. Ogólnie nasiona fasoli zawierają 0,74–2,1% fitynianów. Niekorzystne działanie kwasu fitynowego wynika z tego, że ma prawie w całym zakresie pH ładunek ujemny i może dzięki temu łatwo tworzyć kompleksy z cząsteczkami o ładunku dodatnim, takimi jak białka lub z kationami metali [12]. Największe zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego obserwuje się w czasie kiełkowania nasion [16]. Podczas otrzymywania preparatów białkowych i koncentratów nie obserwowano zmniejszenia zawartości fitynianów [2, 10]. Ostatnie badania wskazują na pozytywną rolę fitynianów poprzez zmniejszenie ryzyka wystąpienia chorób nowotworowych [28].

Celem pracy było określenie wpływu zastosowania metody krystalizacji do otrzymywania preparatów białkowych na zawartość inhibitorów trypsyny, oligosacharydów oraz fosforu fitynowego w porównaniu z izolacją klasyczną.

### **Materiał i metody badań**

Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) trzech odmian (Mela, Prosna, Wenta), które poddano obłuszczeniu i przemiałowi.

Do badań wykorzystywano preparaty białek amorficznych (PBA) otrzymane przez wytrącenie białek w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3) z alkalicznych ekstraktów mąki (pH 9,0). Preparaty białek krystalicznych (PBK) otrzymywano przez ekstrahowanie białek z mąki kwasem cytrynowym i odzyskiwanie ich z ekstraktów przez oziębianie w temp. 5°C w ciągu 18 h. Do ekstrakcji stosowano roztwór kwasu cytrynowego o stężeniu i wartości pH: 0,03 mol/L (pH 5,5) [24, 25].

W celu zbadania podwyższonej temperatury na zawartość związków biologicznie czynnych uzyskane preparaty po zamknięciu w fiolkach w atmosferze azotu ogrzewano w łaźni wodnej (100°C/30 min), po czym natychmiast chłodzono.

Zawartość inhibitora trypsyny (IT) oznaczano zmodyfikowaną metodą Hamerstranda [19]. Do oznaczeń wykorzystano syntetyczny substrat trypsyny – BAPA [p-nitro-anilid-benzoilo-DL-argininy], a ilość uwolnionej p-nitroaniliny oznaczano spektrofotometrycznie ( $\lambda = 410$  nm). Ilość IT wyliczano stosując współczynnik przeliczeniowy -1  $\mu\text{g}$  czystej trypsyny ma aktywność 0,019 jednostki absorbancji i podano w mg/1 g próbki w suchej masie oraz mg/1g białka.

Oligosacharydy rozdzielano przy użyciu HPLC [22]. Przeprowadzono podwójną ekstrakcję cukrów z badanych próbek (50% etanol, 1h,  $t = 86-90^\circ\text{C}$ ), a otrzymane ekstrakty cukrów klarowano 10% octanem ołowiu(II), którego nadmiar usuwano 5% kwasem szczawiowym. Rozdział przeprowadzono w kolumnie Lichrosorb-NH<sub>2</sub> (250 mm x 4 mm, średnica ziaren 7  $\mu\text{m}$ ) wraz z przedkolumną (50 mm x 4 mm, średnica ziaren 7  $\mu\text{m}$ ). Stosowano fazę ruchomą acetonitryl: woda (65:35) o przepływie 1  $\text{cm}^3/\text{min}$  oraz detektor RID. Na kolumnę nanoszono 20  $\mu\text{l}$  próbki po uprzednim przefiltrowaniu przez filtr nylonowy (0,45  $\mu\text{m}$ ). Do sporządzenia krzywej wzorcowej użyto wzorców: rafinozy (firmy LOBA, Austria), stachiozy (firmy Sigma), sacharozy (firmy Merck), werbaskozy (firmy Nestec, Szwajcaria).

Zawartość fosforu fitynowego oznaczano zmodyfikowaną metodą Thiese'a [30]. Z badanych próbek ekstrahowano fosfor fitynowy w 60% metanolu (5 min,  $t = 80^\circ\text{C}$ ), a następnie w 10% HCl (5 min,  $t = 20^\circ\text{C}$ ). Do oznaczeń użyto odczynnika WADE (0,027% FeCl<sub>2</sub>, 0,254% kwasulfosalicylowy), w którym mierzono absorbancję ( $\lambda = 510$  nm) kompleksu żelaza z kwasem salicylowym w obecności kwasu fitynowego i bez jego dodatku. Wyniki zawartości fosforu fitynowego podano w mg/g białka lub w g/100 g s.m. próbki. Do przeliczenia fosforu fitynowego na kwas fitynowy zastosowano współczynnik przeliczeniowy 3,55 [4].

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej przy użyciu programu komputerowego Statgraphics, Plus 2.1, w której badano istotność różnic między średnimi wartościami w próbach, stosując test Duncana ( $p \leq 0,05$ ).

### Wyniki i dyskusja

Uzyskane wyniki zawartości inhibitora trypsyny, oligosacharydów i kwasu fitynowego podawano w przeliczeniu na suchą masę próbki lub białka wykorzystując przeprowadzoną wcześniej charakterystykę chemiczną mąki fasolowej i preparatów [24].

Obecność inhibitora trypsyny (IT) stwierdzono we wszystkich badanych próbkach mąki i preparatów białkowych otrzymanych z trzech badanych odmian fasoli. Porównując uzyskane wyniki analizy (tab. 1) mąki trzech badanych odmian fasoli obserwowano znaczne różnice międzyodmianowe (istotne statystycznie) pod względem ilości IT (0,159–0,468 mg/1 g próbki). Podobne wyniki TIA w mące pochodzącej z nasion fasoli otrzymali Carbonaro i wsp. [9].

W PBA i PBK obserwowano zmniejszenie (różnice statystycznie istotne) ilości IT (do 140 mg/ g próbki) w stosunku do mąki. Wyjątek stanowił PBA otrzymany z fasoli odmiany Wenta, który charakteryzował się nieznacznie większą zawartością IT w stosunku do mąki.

Ze względu na ograniczanie wartości odżywczej białek przez obecność inhibitorów proteaz uzyskane wyniki zawartości IT przeliczono na 1 g białka (tab. 1). Stwierdzono, że w stosunku do białka we wszystkich preparatach białkowych proces izolacji białka przyczynił się do zmniejszenia zawartości IT w porównaniu z mąką, w stopniu statystycznie istotnym. Największe zmniejszenie jego ilości uzyskano w obu preparatach białkowych otrzymanych z fasoli odmiany Prosna (o około 92%), natomiast najmniejsze w PBA otrzymanym z nasion fasoli odmiany Wenta (o 65%). W PBK otrzymanych z fasoli odmiany Mela i Wenta uzyskano większe zmniejszenie zawartości IT o 86 i 73% niż w PBA, gdzie zmniejszenie wynosiło odpowiednio 84 i 65%.

Zmniejszanie zawartości IT w preparatach białkowych znajduje potwierdzenie w literaturze [2, 15] i może być spowodowane wieloma czynnikami. Zawartość inhibitorów zależy od ich rozpuszczalności i stabilności w zastosowanych warunkach podczas odzyskiwania białek. Badania prowadzone przez Borowską i Kozłowską [6] w mące z soi wykazały, że w środowisku o pH 9,2, stosowanym do ekstrakcji białek amorficznych, rozpuszcza się około 55% inhibitora, natomiast w pH 5,5, stosowanym do ekstrakcji białek krystalicznych w niniejszej pracy – 70%. Podczas wytrącania białek w pH 4,2 w supernatancie pozostaje około 50% wyekstrahowanego inhibitora. Ponadto w środowisku kwaśnym jest on stabilny, natomiast w pH 8,0 i powyżej ulega inaktywacji [11], co spowodowane jest destrukcją cystyny, która działa ochronnie na inhibitor trypsyny [13].

Aktywność inhibitora trypsyny w mąkach oraz preparatach białek amorficznych i krystalicznych z fasoli odmiany Mela, Prosna i Wenta.

Activity of trypsin inhibitors in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

| Odmiana fasoli<br>Bean variety | Rodzaj próbki<br>Type of sample |                          | TI [mg/g s.m. próbki]<br>TI [mg/g d.m.] | TI [mg/g białka s.m]<br>TI [mg/g protein d.m]. |
|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------|---|--|
| Mela                           | Mąka<br>Flour                   | nieogrzewana/ non-heated | 0,301 <sup>j</sup> (± 0,006)            | 1,375  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,148 <sup>g</sup> (± 0,002)            | 0,677  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,172 <sup>i</sup> (± 0,001)            | 0,224  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,158 <sup>h</sup> (± 0,001)            | 0,205  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,157 <sup>h</sup> (± 0,001)            | 0,190  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,136 <sup>d</sup> (± 0,003)            | 0,165  |
| Prosna                         | Mąka<br>Flour                   | nieogrzewana/ non-heated | 0,468 <sup>k</sup> (± 0,014)            | 2,253  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,126 <sup>c</sup> (± 0,001)            | 0,684  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,143 <sup>ef</sup> (± 0,002)           | 0,21   |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,121 <sup>b</sup> (± 0,001)            | 0,179  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,140 <sup>de</sup> (± 0,001)           | 0,187  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,146 <sup>fg</sup> (± 0,001)           | 0,195  |
| Wenta                          | Mąka<br>Flour                   | nieogrzewana/ non-heated | 0,159 <sup>h</sup> (± 0,001)            | 0,636  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,114 <sup>a</sup> (± 0,001)            | 0,457  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,172 <sup>i</sup> (± 0,002)            | 0,224  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,149 <sup>g</sup> (± 0,002)            | 0,194  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana/ non-heated | 0,141 <sup>e</sup> (± 0,002)            | 0,173  |
|                                |                                 | ogrzewana/ heated        | 0,110 <sup>a</sup> (± 0,001)            | 0,135  |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

± odchylenie standardowe / standard deviation,

a-k grupy jednorodne wyznaczone testem Duncana ( $p \geq 0,95$ ) / homogeneous groups determined using a Duncan test ( $p \geq 0,95$ ).

Dlatego na zmniejszenie zawartości IT w PBA największy wpływ miało doprowadzenie przy ekstrakcji białek pH środowiska do 9,2, natomiast w przypadku otrzymywania PBK w przyjętych warunkach ekstrakcji wykazywał on wysoką rozpuszczalność, ale nie ulegał wytrąceniu podczas ochładzania ekstraktów białkowych. Niewielka aktywność może być spowodowana „zamykaniem” niskocząsteczkowych inhibitorów w kryształach białkowych wraz z cieczą macierzystą.

Działanie temperatury (100°C) powodowało znaczne obniżenie TIA (o 28-73%) w mąkach wszystkich badanych odmian fasoli (różnice statystycznie istotne).

Natomiast w preparatach białkowych wpływ temperatury był mniejszy - obserwowano jedynie niewielkie zmniejszenie zawartości IT, z wyjątkiem PBK z odmiany Prosna, w którym stwierdzono nieznaczny jego wzrost. Temperatura powoduje częściową inaktywację inhibitorów proteaz [3, 9, 13, 14]. Stopień inaktywacji zależy od typów inhibitorów występujących w badanych próbkach. Większe zmniejszenie zawartości IT pod wpływem temperatury w mące niż preparatach można tłumaczyć jego interakcjami ze związkami występującymi w mące, które prowadzą do jego inaktywacji [14].

W mąkach i preparatach białkowych przeprowadzono oznaczenia zawartości oligosacharydów metodą HPLC. W wyniku rozdzieleń zidentyfikowano sacharozę oraz cukry z rodziny rafinozy tj. stachiozę, rafinozę oraz werbaskozę. Ponieważ w mące stwierdzono śladowe ilości werbaskozy i nie obserwowano jej obecności w preparatach białkowych, w tabelach nie uwzględniano tego cukru. Ogólna zawartość oligosacharydów w mące trzech badanych odmian fasoli kształtowała się na zbliżonym poziomie i wynosiła 4,8% w mące z odmiany Prosna, 5,6% z odmiany Wenta i 5,8% z odmiany Mela (tab. 2).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dominującymi oligosacharydami w nasionach fasoli były sacharoza i stachioza, natomiast rafinoza występowała w znacznie mniejszych ilościach. Zawartość sacharozy w mące była na zbliżonym poziomie i wynosiła od 2,3% (Wenta) do 3,0% (Mela). Różnice zawartości stachiozy między odmianami fasoli były większe i jej ilość wahała się w granicach 2,1% (Prosna) do 3,1% (Wenta). Duże różnice stwierdzono w zawartości rafinozy (0,11–0,32%). Ogólnie zawartość galaktocukrów była mniejsza od ilości sacharozy w mące otrzymanej z nasion fasoli odmiany Mela i Prosna, natomiast w Wencie zależność ta była odwrotna.

Otrzymane wyniki potwierdziły wcześniejsze prace, że dominującym galaktocukrem w nasionach fasoli była stachioza, której zawartość zależała od odmiany nasion i wahała się w granicach 1,8–3,4%. Rafinoza występowała w znacznie mniejszych ilościach 0,09–0,65%. Zawartość sacharozy wahała się w granicach 1,4–2,9% [8]. Znacznie mniejszą zawartością oligosacharydów charakteryzowały się PBA (0,42–2,4%) i PBK (0,62–1,6%). Porównując zawartość sacharozy w PBA i PBK stwierdzono, że tylko w przypadku preparatów otrzymanych z fasoli odmiany Prosna różnice były statystycznie istotne. Zmniejszenie zawartości sacharozy w preparatach białkowych z fasoli odmian Mela i Wenta wynosiło około 90%, natomiast w PBA i PBK z odmiany Prosna odpowiednio 52 i 77%.

Tabela 2

Zawartość oligosacharydów [g/100 g sm.] w mąkach i preparatach białkowych z nasion fasoli Mela, Prosna i Wenta.

Content of oligosaccharides [g/100 g d. m.] in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

| Odmiana fasoli<br>Bean variety | Rodzaj próbki<br>Type of sample |                           | Sacharoza<br>Sucrose                        | Galaktocukry<br>Galacto-saccharides |                                 | Ogółem galakto –<br>cukry<br>Total galacto-<br>saccharides | Oligosacharydy ogółem<br>Total oligosaccharides |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------|--|---|
|                                |                                 |                           |   | Rafinoza<br>Raffinose               | Stachioza<br>Stachyose          |  |   |
| Mela                           | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 2,97 <sup>g</sup><br>(± 0,048) <sup>2</sup> | 0,32 <sup>gh</sup><br>(± 0,018)     | 2,46 <sup>f</sup><br>(± 0,170)  | 2,78   | 5,75  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 2,32 <sup>e</sup><br>(± 0,039)              | 0,27 <sup>cf</sup><br>(± 0,002)     | 2,43 <sup>f</sup><br>(± 0,079)  | 2,70   | 5,02  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 0,24 <sup>a</sup><br>(± 0,046)              | 0,02 <sup>a</sup><br>(± 0,001)      | 0,16 <sup>a</sup><br>(± 0,028)  | 0,18   | 0,42  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,28 <sup>ab</sup><br>(± 0,011)             | 0,05 <sup>ab</sup><br>(± 0,011)     | 0,28 <sup>ab</sup><br>(± 0,016) | 0,33   | 0,61  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,31 <sup>ab</sup><br>(± 0,028)             | 0,06 <sup>ab</sup><br>(± 0,004)     | 0,25 <sup>ab</sup><br>(± 0,040) | 0,31   | 0,62  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,31 <sup>ab</sup><br>(± 0,036)             | 0,09 <sup>bc</sup><br>(± 0,011)     | 0,22 <sup>ab</sup><br>(± 0,035) | 0,31   | 0,62  |
| Prosna                         | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 2,56 <sup>f</sup><br>(± 0,038)              | 0,11 <sup>c</sup><br>(± 0,048)      | 2,08 <sup>e</sup><br>(± 0,181)  | 2,19   | 4,75  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 3,68 <sup>h</sup><br>(± 0,219)              | 0,37 <sup>i</sup><br>(± 0,048)      | 3,40 <sup>h</sup><br>(± 0,407)  | 3,77   | 7,45  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 1,23 <sup>d</sup><br>(± 0,044)              | 0,18 <sup>d</sup><br>(± 0,048)      | 1,00 <sup>d</sup><br>(± 0,067)  | 1,18   | 2,41  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 1,28 <sup>d</sup><br>(± 0,040)              | 0,22 <sup>de</sup><br>(± 0,048)     | 1,06 <sup>d</sup><br>(± 0,085)  | 1,28   | 2,56  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,58 <sup>c</sup><br>(± 0,038)              | 0,39 <sup>i</sup><br>(± 0,048)      | 0,60 <sup>c</sup><br>(± 0,075)  | 0,99   | 1,57  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,64 <sup>c</sup><br>(± 0,050)              | 0,27 <sup>cf</sup><br>(± 0,048)     | 0,40 <sup>b</sup><br>(± 0,057)  | 0,67   | 1,31  |
| Wenta                          | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 2,31 <sup>e</sup><br>(± 0,029)              | 0,22 <sup>de</sup><br>(± 0,013)     | 3,09 <sup>g</sup><br>(± 0,129)  | 3,31   | 5,62  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 2,93 <sup>g</sup><br>(± 0,135)              | 0,56 <sup>k</sup><br>(± 0,026)      | 4,08 <sup>i</sup><br>(± 0,233)  | 4,63   | 7,56  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 0,28 <sup>ab</sup><br>(± 0,004)             | 0,18 <sup>d</sup><br>(± 0,024)      | 0,68 <sup>c</sup><br>(± 0,029)  | 0,86   | 1,14  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,37 <sup>b</sup><br>(± 0,022)              | 0,29 <sup>fg</sup><br>(± 0,035)     | 0,71 <sup>c</sup><br>(± 0,042)  | 1,00   | 1,37  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,21 <sup>a</sup><br>(± 0,005)              | 0,35 <sup>hi</sup><br>(± 0,040)     | 0,26 <sup>ab</sup><br>(± 0,031) | 0,61   | 0,82  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,23 <sup>a</sup><br>(± 0,047)              | 0,49 <sup>j</sup><br>(± 0,034)      | 0,37 <sup>ab</sup><br>(± 0,050) | 0,86   | 1,09  |

Objaśnienia: Explanatory notes:

± odchylenie standardowe / standard deviation,

a-k te same litery w kolumnie oznaczają brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy wartościami średnimi ( $p \geq 0.95$ ) / the same letters in column show no statistically significant differences among mean values ( $p \geq 0.95$ ).

Różnice zawartości poszczególnych galaktocukrów pomiędzy preparatami białkowymi otrzymanymi z fasoli odmiany Mela były statystycznie nieistotne, a stopień zmniejszenia zawartości galaktocukrów wynosił około 90% w stosunku do mąki. Natomiast w preparatach z fasoli odmian Prosna i Wenta sposób izolacji miał

istotny wpływ na zawartość galaktocukrów. W obu odmianach stwierdzono większe zmniejszenie ich całkowitej zawartości w PBK.

Zmniejszenie zawartości oligosacharydów w preparatach białkowych związane jest z procesem technologicznym. Ekstrakcja białek powoduje, że duża część sacharydów przechodzi do ekstraktów białkowych, a część zostaje usunięta. Wytrącanie białka powoduje, że większość oligosacharydów pozostaje w supernatancie [17].

Analizując udział poszczególnych galaktocukrów stwierdzono, że w preparatach białkowych z fasoli odmian Prosna i Wenta zmniejszyła się ilość stachiozy, przy czym obniżenie jej ilości było większe w PBK (o 80 i 88%) niż w PBA (o 52 i 78%). Porównując zawartość rafinozy stwierdzono, że kierunek zmian uzależniony był od odmiany fasoli. W preparatach z Meli zmniejszyła się jej zawartość, natomiast zaobserwowano wzrost zawartości tego cukru w odniesieniu do mąki w obu preparatach z fasoli odmiany Prosna oraz PBK z fasoli odmiany Wenta. Zwiększenie zawartości rafinozy w preparatach białkowych może być spowodowane zmianami w strukturze białka zachodzącymi podczas izolacji, które powodują uwolnienie sacharydu z cząsteczek białka, w wyniku czego zwiększa się jego ilość w ekstrakcie.

W próbkach mąki poddanych działaniu temperatury stwierdzono istotne zmiany zawartości oligosacharydów, przy czym kierunek zmian uzależniony był od odmiany nasion. W mące z fasoli odmiany Mela stwierdzono zmniejszenie zawartości oligosacharydów o 12%, natomiast w próbkach z pozostałych odmian obserwowano wzrost ich ilości o 34–57%. Porównując zawartość poszczególnych oligosacharydów w preparatach białkowych nieogrzewanych i poddanych działaniu temperatury nie stwierdzono istotnych różnic w ich ilości w PBA i PBK z fasoli odmiany Mela oraz PBA z fasoli odmiany Prosna. W sposób statystycznie istotny zmniejszyła się ilość rafinozy i stachiozy w PBK z fasoli odmiany Prosna po ogrzaniu. Natomiast w preparatach otrzymanych z fasoli odmiany Wenta zaobserwowano po ogrzaniu istotny, 33–63-procentowy wzrost zawartości rafinozy. Otrzymane wyniki nie są zgodne z danymi literaturowymi, według których w nasionach poddanych gotowaniu następuje zmniejszenie zawartości galaktocukrów [3]. Różnice są prawdopodobnie spowodowane zastosowanymi warunkami obróbki cieplnej. We wszystkich pracach poddawano badane nasiona ogrzewaniu w roztworze. Dlatego zmniejszenie zawartości galaktocukrów było spowodowane głównie wymyciem ich z nasion. Cukry te zaliczają się do związków termostabilnych i podczas obróbki cieplnej obserwowano tylko niewielki wzrost zawartości produktów ich rozkładu. W niniejszej pracy mąka i preparaty białkowe ogrzewane były w postaci suchej w zamkniętych fiolkach. Dlatego wzrost zawartości oligosacharydów może być spowodowany zmianami zachodzącymi w białkach pod wpływem temperatury. Częściowe rozfałdowanie łańcuchów polipeptydowych może powodować uwalnianie cząsteczek sacharydów zamkniętych wewnątrz molekuł białkowych.



W mąkach i preparatach białkowych przeprowadzono oznaczenia zawartości fosforu fitynowego, który przeliczano na kwas fitynowy i podano w g/100 g s.m. próbki w tab. 3. W mąkach zawartość kwasu fitynowego wahała się w granicach od 1,6 % (odmiana Mela) do 2,0% (odmiana Wenta). Natomiast w PBA obserwowano wzrost zawartości kwasu fitynowego w stosunku do mąki o 41% w fasoli odmiany Mela, o 35% w fasoli odmiany Prosna i o 16% w fasoli odmiany Wenta. Odwrotną zależność obserwowano w PBK, gdzie zawartość kwasu fitynowego zmniejszyła się w stosunku do mąki o 38–62%. Wzrost ilości kwasu fitynowego stwierdzili w izolatach i koncentratkach białkowych otrzymanych z nasion bobu i grochu Carnovale i wsp. [10] oraz z soi Anderson i Wolf [2]. Uzyskana zróżnicowana zawartość kwasu fitynowego w preparatach białkowych może wynikać z zastosowanych warunków ekstrakcji białek, a zwłaszcza pH ekstrahenta. Badania rozpuszczalności kwasu fitynowego mąki bobu przeprowadzone przez Carnovale i wsp. [10] wykazały, że w środowisku o pH 8 rozpuszcza się około 90% kwasu fitynowego, a w środowisku o pH 4,5 w supernatancie pozostaje tylko 30% kwasu fitynowego. Natomiast w roztworze o pH 5,5, stosowanym do ekstrakcji białek krystalicznych, kwas fitynowy wykazuje mniejszą rozpuszczalność wynoszącą około 60%. Podobne wyniki rozpuszczalności kwasu fitynowego z soi uzyskały Borowska i Kozłowska [6].

Ali i Baker [1] badali wpływ pH roztworu kwasu cytrynowego stosowanego do ekstrakcji białek na zawartość kwasu fitynowego. Autorzy podają, że najmniejszą ilość kwasu fitynowego uzyskano w białkach ekstrahowanych kwasem cytrynowym o pH 5,5, natomiast obniżanie pH powodowało wzrost ilości kwasu fitynowego w końcowym produkcie. Związane jest to z dysocjacją kompleksu białko-fityna, która występuje w największym stopniu w środowisku o pH 5,5 i uwolniony kwas fitynowy pozostaje w supernatancie. Ponadto zastosowane warunki ekstrakcji (pH, temperatura) mogą przyczyniać się do częściowej degradacji fitynianów [18]. Ponieważ kwas fitynowy może tworzyć kompleksy z białkiem, przez co ogranicza jego wartość odżywczą, zawartość fosforu fitynowego przeliczono na 100 g białka w suchej masie. Porównując uzyskane wyniki (tab. 3) stwierdzono, że we wszystkich preparatach następowało zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego w porównaniu z mąką. Jednak największe zmniejszenie (82–88%) zawartości fosforu fitynowego obserwowano w PBK otrzymanych z fasoli wszystkich badanych odmian, podczas gdy w PBA zmniejszenie wynosiło 60–62%. Potwierdza to fakt, że zastosowanie kwasu cytrynowego o pH 5,5 do ekstrakcji białek powoduje dysocjację kompleksu białko – fityna i przyczynia się do zmniejszenia ilości kwasu fitynowego w preparatach białek krystalicznych.

Tabela 3

Zawartość fosforu fitynowego i kwasu fitynowego w mące i preparatach białkowych otrzymanych z fasoli odmiany Mela, Prosna i Wenta.

Content of phytate phosphorus and phytic acid in flour and protein preparations obtained from bean seeds (the Mela, Prosna, and Wenta varieties of bean).

| Odmiana fasoli<br>Bean variety | Rodzaj próbki<br>Type of sample |                           | Fosfor fitynowy<br>[g/100 g s.m.]<br>Phytate-P<br>[g/100g d.m.] | Fosfor fitynowy<br>[g/100 g białka s.m.]<br>Phytate-P<br>[g/100 g protein d.m.] | Kwas fitynowy<br>[g/100 g s.m.]<br>Phytic acid<br>[g/ 100 g d.m.] |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|---|---|
| Mela                           | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 0,464 (±0,007)  | 2,116   | 1,645 <sup>i</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,437 (±0,010)  | 1,996   | 1,551 <sup>h</sup>  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 0,651 (±0,008)  | 0,846   | 2,310 <sup>o</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,594 (±0,006)  | 0,773   | 2,110 <sup>m</sup>  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,284 (±0,006)  | 0,344   | 1,008 <sup>e</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,262 (±0,006)  | 0,318   | 0,932 <sup>d</sup>  |
| Prosna                         | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 0,500 (±0,005)  | 2,702   | 1,775 <sup>j</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,410 (±0,005)  | 2,214   | 1,454 <sup>g</sup>  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 0,697 (±0,004)  | 0,999   | 2,412 <sup>r</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,621 (±0,011)  | 0,913   | 2,205 <sup>n</sup>  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,358 (±0,009)  | 0,478   | 1,270 <sup>f</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,246 (±0,006)  | 0,328   | 0,873 <sup>c</sup>  |
| Wenta                          | mąka<br>flour                   | nieogrzewana / non-heated | 0,567 (±0,006)  | 2,275   | 2,019 <sup>l</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,534 (±0,005)  | 2,138   | 1,898 <sup>k</sup>  |
|                                | PBA                             | nieogrzewana / non-heated | 0,660 (±0,006)  | 0,86  | 2,342 <sup>p</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,567 (±0,005)  | 0,74  | 2,012 <sup>l</sup>  |
|                                | PBK                             | nieogrzewana / non-heated | 0,215 (±0,010)  | 0,264   | 0,762 <sup>b</sup>  |
|                                |                                 | ogrzewana / heated        | 0,160 (±0,008)  | 0,196   | 0,568 <sup>a</sup>  |

Objaśnienia: / Explanatory notes:

± odchylenie standardowe / standard deviation;

a-k grupy jednorodne wyznaczone testem Duncana ( $p \geq 0,95$ ) / homogeneous groups determined using a Duncan test ( $p \geq 0,95$ ).

Działanie wysokiej temperatury powodowało zmniejszenie zawartości kwasu fitynowego we wszystkich badanych próbkach (różnice statystycznie istotne). Największe zmniejszenie zawartości kwasu fitynowego w mąkach pod wpływem temperatury obserwowano w mące otrzymanej z fasoli odmiany Prosna (18%). W PBA zmniejszenie było niższe (11–16%) w porównaniu z próbkami nie poddanymi działaniu wysokiej temperatury. W PBK największe zmniejszenie zawartości, o 22%, uzyskano z fasoli odmiany Prosna, natomiast w przypadku odmian fasoli Mela i Wenta wynosiło odpowiednio 5 i 9%. Niewielkie zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego pod wpływem ogrzewania w nasionach obserwowali Barampama i Simard [3] oraz znacznie większe podczas ogrzewania w temp. powyżej 120°C – Rehman i Shah [27].

Jednak wzrost temperatury powoduje tylko częściową degradację fitynianów ze względu na trwałość wiązań estrowych między inozytolem a kwasem fosforowym.

### Wnioski

1. Zastosowanie procesu krystalizacji do otrzymywania preparatów białkowych wpłynęło na większe zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego, aktywności TI niż w PBA oraz znaczne zmniejszenie zawartości galaktocukrów w porównaniu z mąką, do poziomu takiego samego bądź niższego niż w PBA.
2. Pod wpływem obróbki termicznej preparatów białek krystalicznych stwierdzono zmniejszenie zawartości fosforu fitynowego, natomiast zmiany ilości inhibitora tripsyny i galaktocukrów zależały od odmiany nasion.

### Literatura

- [1] 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.
- [2] Anderson R.L., Wolf W.J.: Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. J. Nutr., 1995, **125**, 581S-588S.
- [3] Barampama Z., Simard R.E.: Oligosaccharides, anti-nutritional factors, and protein digestibility of dry beans as affected by processing. J. Food Sci., 1994, **59**, (4), 833-838.
- [4] Beal L., Metha T.: Zinc and phytate distribution in peas. Influence of heat treatment, germination, pH, substrate, and phosphorus on pea phytate and phytase. J. Food Sci., 1985, **50**, 96-100 i 115.
- [5] Birk Y.: Protein Proteinase Inhibitors in Food. Proceeding of the International Conference Euro Food Tox IV, 1994, Olsztyn, pp. 202-213.
- [6] Borowska J., Kozłowska H.: Isolates from faba bean and soybean with lowered content of phytic acid and activity of the trypsin inhibitors. Die Nahrung, 1986, **30**, 11-18.
- [7] Buera M.P., Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B.: Kinetics of trypsin inhibitory activity loss in heated flour from bean, *Phaseolus Vulgaris* J. Food Sci., 1984, **49**, 124-126, 136.
- [8] Burbano C., Muzquiz M., Ayet G., Cuadrado C., Pedrosa M. M.: Evaluation of anti-nutritional factors of selected varieties of *Phaseolus vulgaris*. J. Sci. Food Agric., 1999, **79**, 1468-1472.
- [9] Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusztai A.: Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: anti-nutritional compounds or storage proteins? J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 742-749.
- [10] Carnovale E., Lugaro E., Lombardi-Boccia G.: Phytic acid in faba bean and pea: effect on protein availability. Cereal Chem., 1988, **65**, (2), 114-117.
- [11] Chan K.C., de Lumen B.O.: Properties of trypsin inhibitor from winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seed isolated by affinity chromatography. J. Agric. Food Chem., 1982, **30**, 42-46.
- [12] Cheryan M.: Phytic acid interaction in food system. CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1980, **13**, 297-335.
- [13] Dhurandhar N.V., Chang K.C.: Effect of cooking on firmness, trypsin inhibitors, lectins and cystine/cysteine content of navy and Red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 1990, **55**, 470-474.
- [14] DiPietro Ch. M., Liener I. E.: Heat inactivation of the Kunitz and Boman-Birk soybean protease inhibitors. J. Agric. Food Chem., 1989, **37**, 39-44.
- [15] DiPietro Ch.M., Liener I.E.: Soybean Protease Inhibitors in Foods. J. Food Sci., 1989, **54**, 606-609.

- [16] Frias J., Zieliński H., Piskuła M.K., Kozłowska H., Vidal-Valverde C.: Inositol phosphate content and trypsin inhibitor in ready-to-eat cruciferous sprouts. *Food Chem.* 2005, **93**, 331-336
- [17] Gueguen J., Quemener B., Valdebouze P.: Elimination des facteurs antinutritionnels de la fève ( *Vicia faba* L.) et du pois ( *Pisum sativum* L.) au cours de la préparation des isolats protéiques. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 1980, **14**, 72-77.
- [18] Gustafsson E.-L., Sandberg A.-S.: Phytate reduction in brown beans ( *Phaseolus vulgaris*, L.). *J. Food Sci.*, 1995, **60**, 149-152, 156.
- [19] Hamerstrand G.E., Black L.T., Glover J.D.: Trypsin inhibitors in soy products, modification of the standard analytical procedure. *Cereal Chemistry*, 1981, **58** (1), 42-45.
- [20] Jacórzyński B.: Czynniki antyżywniowe występujące w nasionach roślin strączkowych. *Przem. Spoż.*, 1988, **42**, 251-254.
- [21] Jacórzyński B.: Galaktocukry nasion roślin strączkowych i możliwości ich eliminacji. *Przem. Spoż.* 1988, **42**, 323-325.
- [22] Kosson R.: Oznaczanie cukrów typu rafinozy w nasionach roślin strączkowych metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej - HPLC. *Roczn. PZH*, 1992, **43**, 179-185.
- [23] Liener I.E.: Possible adverse effects of soybean anti-carcinogens. *J. Nutr.*, 1995, **125**, 744S-750S.
- [24] Piecyk M., Klepacka M.: Właściwości funkcjonalne preparatów białkowych otrzymanych z nasion fasoli ( *Phaseolus vulgaris*). *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **4** (41), 54-65.
- [25] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: Digestibility of crystalline proteins from *Phaseolus* beans. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9/50**, 29-33.
- [26] Porzucek H., Duszkiwicz-Reinhard W., Piecyk M., Klepacka M., Gniewosz M.: Changes of flatulence-causing sugars in legume protein samples by high hydrostatic pressure. *Electr. J. Pol. Agr. Univ., Food Sci. Tech.*, 2002, **5** (2).
- [27] Rehman Z., Shah W. H.: Thermal heat processing effects on anti-nutrients, protein and starch digestibility of food legumes. *Food Chem.*, 2005, **91**, 327-331.
- [28] Shing B., Bhat T.K., Shing B.: Potential therapeutic applications of some anti-nutritional plant secondary metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 5579-5597.
- [29] 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.
- [30] These W.: Determination of the phytic acid esters in seeds of rapeseed and selection of genotypes with reduced concentrations of these compounds. *Fat. Sci. Technol.*, 1991, **93**, 49-52.

**THE CONTENT OF TRYPSIN INHIBITORS, OLIGOSACCHARIDES, AND PHYTIC ACID  
IN THE BEAN SEED ( *PHASEOLUS VULGARIS* ) PREPARATIONS OBTAINED BY  
CRYSTALLIZATION AND CLASSICAL ISOLATION**

**S u m m a r y**

In this paper, the comparison was made between the content of oligosaccharides, phytic acid, and trypsin inhibitors contained in protein preparations manufactured from bean seeds with the use of two

methods: classical isolation and crystallization under acidic conditions. During the classical isolation process, proteins were reclaimed from alkaline extracts at a minimum solubility; they had an amorphous form (PBA). The second method consisted in the utilization of the ability of bean proteins to create crystalline structures at acidic conditions (PBK).

The investigations performed showed that when the crystallization method was applied, it was possible to obtain preparations of lower contents of phytic acid and inhibitors compared to the classical isolation process. In the preparations obtained, the content of oligosaccharides was also decreased compared to the bean flour. The crystallization process caused a decrease in the content of galactosaccharides and their content was either at levels similar or lower than the respective levels of their content obtained using the classical isolation method. A thermal processing applied (100°C, t = 30 min) produced a decrease in the content of phytic acid, whereas the change in the contents of oligosaccharides and trypsin inhibitors depended upon the variety of seeds used.

**Key words:** bean, amorphous and crystalline proteins, phytic acid, oligosaccharides, trypsin inhibitor ☒