

URSZULA KRUPA, MARIA SORAL-ŚMIETANA

**WPLYW CZYNNIKÓW FIZYCZNYCH NA DOSTĘPNOŚĆ
ENZYMATYCZNĄ *IN VITRO* BIAŁEK NASION FASOLI
(*PHASEOLUS SP.*)**

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu czynników fizycznych zastosowanych podczas wodno-ciepłych procesów autoklawowania i mikrofalowania na zakres enzymatycznego trawienia *in vitro* białek wyodrębnionych z nasion dwóch polskich gatunków fasoli: fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) odm. Aura i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*) odm. Eureka.

Analiza strawności *in vitro* preparatów białkowych przeprowadzona w środowisku symulującym fizjologiczne warunki trawienia białek w dwunastnicy wykazała, że temperatura i ciśnienie zastosowane w procesie autoklawowania powodowały znaczącą poprawę strawności badanych białek nasion fasoli. Natomiast po procesie mikrofalowania, po 10 min proteolizy, strawność preparatów białkowych była mniejsza niż preparatów białek z nasion niepoddanych obróbce hydrotermicznej. Na podstawie obrazu separacji żelowej SDS-PAGE białek wyodrębnionych z nasion przed obróbką wodno-cieplną stwierdzono dominujący udział frakcji o masie ok. $49\text{--}45 \cdot 10^3$ Da, uznanej za faseolinę, charakteryzującej się znaczną stabilnością termiczną. Czynniki fizyczne w obydwu zastosowanych procesach powodowały zmiany zawartości frakcji białkowych, szczególnie widoczne w przypadku preparatu EA. Wyniki separacji SDS-PAGE uzupełniły analizę strawności *in vitro* i wykazały szczególny wpływ procesu autoklawowania nasion na wyizolowane z nich białka, widoczny na obrazie rozdziału.

Słowa kluczowe: nasiona fasoli, preparaty białkowe, procesy hydrotermiczne, strawność

Wprowadzenie

Wartość odżywcza białek jest determinowana przez ich strawność, skład aminokwasowy oraz biodostępność poszczególnych aminokwasów [9]. Nasiona roślin strączkowych są bogatym źródłem białka pokarmowego, którego zawartość jest 2-krotnie wyższa w porównaniu z nasionami zbóż [38]. Białka nasion fasoli cechuje wysoka zawartość Lys, dlatego jako składnik diety mogą być uznane za uzupełniające

Mgr inż. U. Krupa, prof. dr hab. M. Soral-Śmietana, Zakład Funkcjonalnych Właściwości Żywności,
Instytut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn,
e-mail: Urszula.Krupa@pan.olsztyn.pl

w stosunku do białek zbożowych. Pomimo licznych zalet, białka roślin strączkowych uznawane są za mniej wartościowe w porównaniu z białkami zwierzęcymi. Przyczyną ich obniżonej wartości odżywczej jest mniejsza wrażliwość na proteolizę *in vivo* w porównaniu z białkami zwierzęcymi, mała zawartość aminokwasów siarkowych (Met i Cys), zwarta struktura utrudniająca dostęp enzymom proteolitycznym oraz obecność niebiałkowych substancji (DF, taniny, fityniany) i/lub antyfizjologicznych białek (inhibitory proteaz, lektyny), których występowanie może w znacznym stopniu utrudniać ich trawienie [9].

Naukowcy są zgodni co do faktu, że antyodżywcze białka oraz substancje ograniczające hydrolizę (taniny, fityniany) mogą być dezaktywowane poprzez zastosowanie obróbki termicznej [5, 7], jednak stanowisko wobec wpływu czynników fizycznych na zmiany strukturalne białek, oddziałujące na zmiany ich strawności nie jest jednoznaczne.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu czynników fizycznych (temperatury, ciśnienia, mikrofal, środowiska nadmiaru wody) zastosowanych podczas obróbki wodno-ciepłej na dostępność enzymatyczną białek wyodrębnionych z nasion fasoli.

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były białka wyizolowane z nasion dwóch polskich gatunków fasoli: fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) odm. Aura i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus*) odm. Eureka. Nasiona obu odmian w środowisku nadmiaru wody (w stosunku 3:1 v/m) poddawano procesom autoklawowania (101 kPa/ 121°C/16 min) i mikrofalowania (650 W/30 min). Nasiona po procesach liofilizowano, a następnie rozdrabniano, uzyskując 100% frakcji o cząstkach $\leq 0,4$ mm. Do oznaczenia poszczególnych preparatów wprowadzono symbole literowe:

- AN, EN – preparaty białkowe z suchych, obłuszczonych nasion fasoli odmian Aura i Eureka,
- AA, EA – preparaty białkowe z całych, autoklawowanych nasion fasoli odmian Aura i Eureka,
- AM, EM – preparaty białkowe z całych, mikrofalowanych nasion fasoli odmian Aura i Eureka.

Izolowanie białek

Do wyodrębnienia białek zastosowano metodę Fana i Sosulskiego [13]. Preparaty białkowe ekstrahowano roztworem NaOH o pH 9,2. Wytrącano je z ekstraktu w punkcie najmniejszej rozpuszczalności (pH 4,3). Zawiesinę preparatów białkowych

dializowano przez 48 godz. w temp. 4°C w obecności wody destylowanej, a następnie liofilizowano.

Skład chemiczny badanego materiału określano, stosując standardowe metody analityczne i oznaczano: wilgotność [32], zawartość skrobi ogółem [3] z wcześniejszą ekstrakcją sacharydów w 70% metanolu, zawartość popiołu całkowitego [4, 31] oraz zawartość białka ogółem metodą Kjeldahla [4, 30].

Na podstawie przeprowadzonego rozdzielania elektroforetycznego na żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE [22] określano masy cząsteczkowe frakcji białkowych. Rozdział prowadzono w 12% żelu poliakrylamidowym przy stałym natężeniu prądu 25 mA/1,5 godz. Do określenia mas cząsteczkowych frakcji białek użyto następujących wzorców: $66 \cdot 10^3$ Da – albumina; $45 \cdot 10^3$ Da – owoalbumina; $36 \cdot 10^3$ Da – dehydrogenaza 3-fosfogliceroaldehydu; $29 \cdot 10^3$ Da – anhydraza węglowa; $24 \cdot 10^3$ Da – trypsynogen; $20,1 \cdot 10^3$ Da – inhibitor trypsyny; $14,2 \cdot 10^3$ Da – α -laktoalbumina; $6,5 \cdot 10^3$ Da – aprotynina. Zastosowane odczynniki pochodziły z firmy SIGMA.

Strawność *in vitro* wyodrębnionych białek oznaczano metodą wieloenzymatyczną Hsu i wsp. [16]. Stosowano następujące enzymy: trypsynę 16,600 jednostek/mg białka (SIGMA T-0303), chymotrypsynę 76 jednostek/mg białka (SIGMA C-4129) oraz peptydazę 0,102 jednostek/g białka (SIGMA P-7500). Roztwór białka (50 ml; 6,25 mg białka/ml) umieszczano w łaźni wodnej o temp. 37°C i mieszając, doprowadzano do pH 8. Dodawano 5 ml roztworu mieszaniny enzymatycznej (pH 8). Spadek pH obserwowano w ciągu 10-minutowej proteolizy preparatów białkowych. Strawność *in vitro* obliczano z równania [16]:

$$y = 201,464 - 18,103 \times A$$

y – strawność *in vitro*, [%],

A – pH próbki po 10 min.

Wyniki i dyskusja

Skład chemiczny nasion fasoli i preparatów białkowych

Skład chemiczny nasion fasoli analizowano w rozdrobnionym materiale przed obróbką wodno-cieplną w porównaniu z materiałem uzyskanym po hydrotermicznych procesach autoklawowania i mikrofalowania (tab. 1). Zawartość skrobi ogółem w nasionach dwóch badanych odmian fasoli Aura i Eureka przed procesami hydrotermicznymi była zbliżona i w całych nasionach wynosiła ponad 48% s.m. Porównując uzyskane wyniki z danymi tabelarycznymi [21], informującymi o zawartości skrobi w nasionach fasoli na poziomie 40,8% s.m., stwierdzono, że badane w tej pracy odmiany fasoli są bogatszym źródłem skrobi, co może być związane z długością okresów nawilżenia i nasłonecznienia podczas rozwoju i dojrzewania nasion. Zastosowane

procesy wodno-ciepne autoklawowania i mikrofalowania nie spowodowały znaczących zmian zawartości tego biopolimeru w nasionach badanych odmian fasoli. Jedynie w przypadku nasion odmiany Eureka poddanych procesowi mikrofalowania obserwowano spadek zawartości skrobi ogółem, co można uznać za skutek depolimeryzacji cząsteczki i/lub wytworzenia porcji dekstryn lub cukrów łatwo ekstrahujących się w postępowaniu metodycznym przed analizą skrobi.

Tabela 1

Skład chemiczny nasion fasoli.

Chemical composition of the bean seeds.

Skład chemiczny Chemical composition	'AURA'			'EUREKA'		
	Całe nasiona Whole seeds	Nasiona autoklawowane Autoclaved seeds	Nasiona mikrofalowane Microwaved seeds	Całe nasiona Whole seeds	Nasiona autoklawowane Autoclaved seeds	Nasiona mikrofalowane Microwaved seeds
Wilgotność Moisture [%]	10,83 ± 0,22	-	-	12,67 ± 0,09	-	-
Zawartość skrobi ogółem Total starch content [% s.m./% d.m.]	48,47 ± 1,86	45,55 ± 1,44	46,60 ± 2,72	48,10 ± 2,13	48,21 ± 0,75	39,41 ± 2,61
Zawartość białka ogółem Content of total proteins [% s.m./% d.m.]	28,11 ± 0,35	26,19 ± 0,66	26,50 ± 1,59	22,01 ± 2,07	22,11 ± 1,41	23,39 ± 0,36
Zawartość popiołu Ash content [% s.m./% d.m.]	3,84 ± 0,02	3,76 ± 0,02	3,53 ± 0,11	3,91 ± 0,03	3,20 ± 0,10	3,67 ± 0,06

Analiza zawartości białka ogółem wskazuje na znaczące różnice pomiędzy badanymi odmianami fasoli. Nasiona odmiany Eureka charakteryzowały się mniejszą o ok. 6% zawartością białka (tab. 1). Uzyskane wyniki, w odniesieniu do wcześniejszych dotyczących tych samych odmian fasoli, potwierdzają, że zawartość białka jest cechą gatunkową oraz sugerują jej zależność od wielkości i budowy morfologicznej nasion [20]. Znaczący wpływ na skład chemiczny nasion fasoli, poza właściwościami fizjologicznymi, mają warunki glebowo-klimatyczne w okresie wegetacji [1]. Zawartość białka w nasionach odm. Aura pochodzących ze zbiorów 2003 r. była znacznie większa niż uzyskano w poprzednim sezonie wegetacyjnym [20]. Pozwala to przypuszczać, że obok odmiany, ważnym czynnikiem decydującym o składnikach

chemicznych mających strukturę polimeru są warunki klimatyczne. Zastosowane w doświadczeniu dwa procesy obróbki wodno-ciepłej nasion spowodowały zmiany zawartości białka ogółem, wskazując na zróżnicowaną tendencję w obu odmianach.

Średnia zawartość związków mineralnych w nasionach analizowanych odmian fasoli wynosiła ok. 4% s.m. (tab.1) i była zbliżona do danych literaturowych (3,0–3,9% s.m.) dotyczących nasion fasoli [18, 20, 21, 36]. Na skutek zastosowanych zabiegów wodno-ciepłych zaobserwowano nieznaczną tendencję zmniejszania ilości związków mineralnych ogółem, analizowanych jako zawartość popiołu.

Ze względu na wysoką zawartość białka w preparatach wyodrębnionych z suchych nasion fasoli odmian Aura – 98,99% s.m. i Eureka – 99,56% s.m., można je nazwać izolatami. Podobnie Pilosof i wsp. [29] oraz Sathe i Salunkhe [35], stosując metodę wytrącania w punkcie najmniejszej rozpuszczalności, uzyskali preparaty białkowe o wysokiej zawartości białka 81,1–91%. Zastosowane procesy hydrotermiczne wpływały na ogólną zawartość białka w całych nasionach (tab. 1), spowodowały również zmiany w strukturze liścieni, skutkiem czego były zmiany w strukturze matrycy białkowej nasion utrudniające izolacje. Preparaty białkowe uzyskane z nasion obu odmian fasoli poddanych autoklawowaniu zawierały odpowiednio 60,38 (AA) i 56,60% s.m. (EA) białka ogółem. Proces mikrofalowania spowodował zmniejszenie zawartości białka ogółem, zarówno w przypadku odm. Aura (ok. 25%), jak i odm. Eureka (ok. 40%) (tab. 1).

Strawność in vitro preparatów białek fasoli

Strawności preparatów białkowych, wyizolowanych z obłuszczonych, suchych (AN, EN) oraz nieobłuszczonych lecz poddanych procesom autoklawowania (AA i EA) i mikrofalowania (AM i EM) nasion obu odmian fasoli po 10 min hydrolizy przedstawiono w tab. 2. Strawność *in vitro* oznaczano stosując metodę wieloenzymatyczną, w której wykorzystano mieszaninę trzech enzymów o aktywności proteolitycznej: trypsynę, chymotrypsynę oraz peptydazę.

Strawność preparatów białkowych uzyskanych z suchych nasion fasoli przed obróbką wodno-cieplną wynosiła 80,54% (AN) i 81,36% (EN). Uzyskane wyniki są porównywalne ze strawnością białek amorficznych wyizolowanych z nasion polskich odmian fasoli niepoddawanych obróbce termicznej [27]. Jednak według licznych autorów strawność *in vitro* białek nasion fasoli jest niewielka i waha się w przedziale 62–72% [6, 14]. Alonso i wsp. [2] oraz Deshpande i wsp. [11] podają, że obłuszczenie nasion fasoli ma wpływ na strawność *in vitro* wyizolowanych z nich białek, a różnice w strawności pomiędzy białkami wyizolowanymi z nasion obłuszczonych i całych, wynoszą ok. 5%. Okrywa nasienna fasoli stanowi ok. 10% masy nasion [37].

Kwasy fenolowe oraz inhibitory trypsyny, chymotrypsyny i α -amylazy są głównie zlokalizowane w liścieniach [24], natomiast taniny i polifenole znajdują się w okrywie

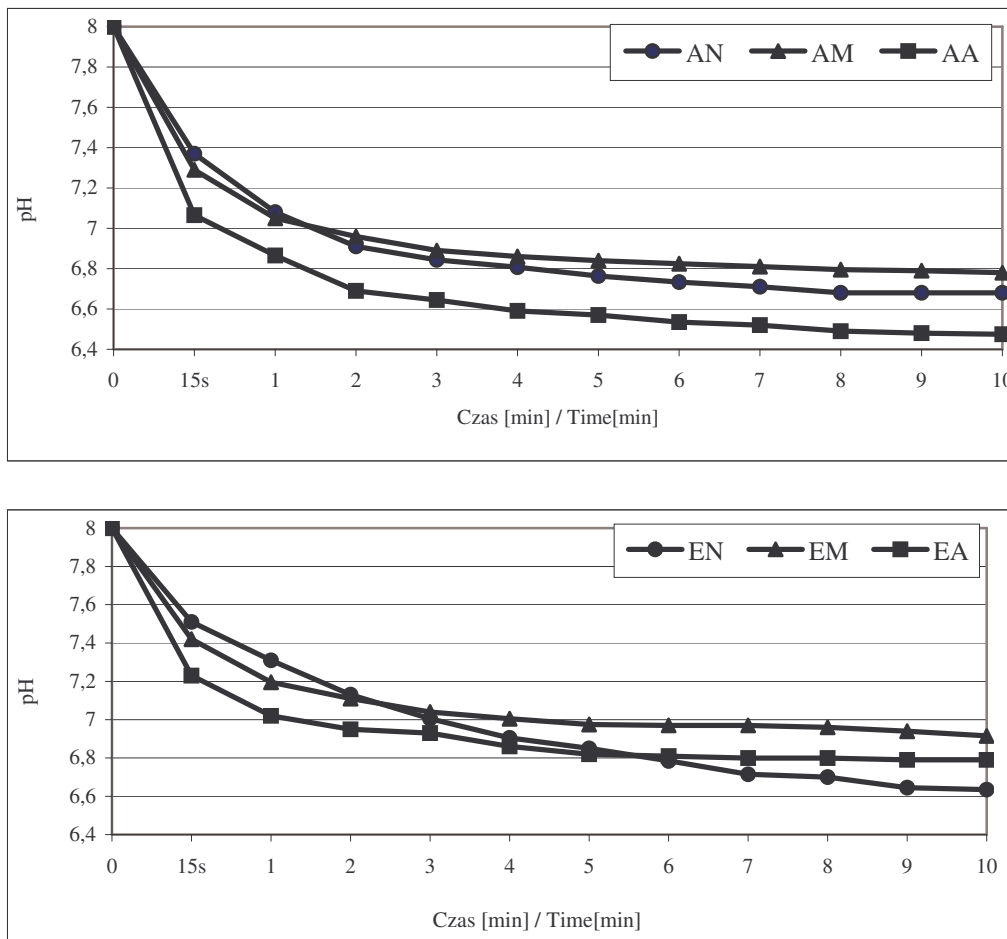
nasiennej [8]. Związki te wchodząc w reakcje z białkami tworzą kompleksy, skutkiem czego jest obniżona rozpuszczalność oraz mniejsza wrażliwość powstałych kompleksów na działanie enzymów proteolitycznych [34]. Usunięcie łupiny nasiennej może zatem spowodować pozorne zmniejszenie zawartości tych antyodżywczych substancji, przypadających na jednostkę masy materiału powodując wzrost strawności białek.

Tabela 2

Strawność preparatów białkowych *in vitro*.
The *in vitro* digestibility of protein preparations.

Odmiana Variety	Preparaty białkowe Protein preparations	Strawność <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> digestibility [%]
AURA	AN	80,54±1,66
	AA	84,25±0,38
	AM	78,81±0,13
EUREKA	EN	81,36±1,43
	EA	85,87±0,38
	EM	76,28±0,89

Zastosowane procesy wodno-ciepne, którym poddano całe nasiona obu odmian fasoli, odmiennie wpłynęły na zmiany strawności preparatów białkowych. W porównaniu z preparatami białek przed procesami (AN i EN), strawność preparatów uzyskanych z nasion poddanych autoklawowaniu była większa i wynosiła 84,25 (AA) i 85,87% (EA). Klepacka i wsp. [19], analizując strawność białek nasion roślin strączkowych, stwierdzili poprawę strawności białek fasoli pod wpływ wysokiego ciśnienia i temperatury. Wynika to prawdopodobnie z wpływu zastosowanych czynników fizycznych na strukturę faseoliny, głównej frakcji białkowej nasion fasoli, której łańcuch polipeptydowy mógł ulec częściowemu rozfałdowaniu, eksponując wiązania Lys-Arg podatne na działanie trypsyny [12, 26]. Z drugiej zaś strony poprawa strawności preparatów białkowych może być wywołana częściową redukcją tanin, polifenoli, kw. fenolowych, towarzyszących białkom nasion fasoli [2, 7] bądź termiczną eliminacją inhibitorów proteaz, czynników hamujących proteolizę [5, 39]. Również Habiba [15] stwierdził dodatni wpływ procesu autoklawowania na strawność białek grochu. Działaniu enzymów proteolitycznych w niniejszych badaniach towarzyszyło obniżanie wartości pH, obserwowane ze znacznie większą intensywnością szczególnie wyraźnie w preparatach białek autoklawowanych AA i EA (rys. 1).



Rys. 1. Zmiany pH preparatów białkowych podczas 10-minutowej proteolizy.

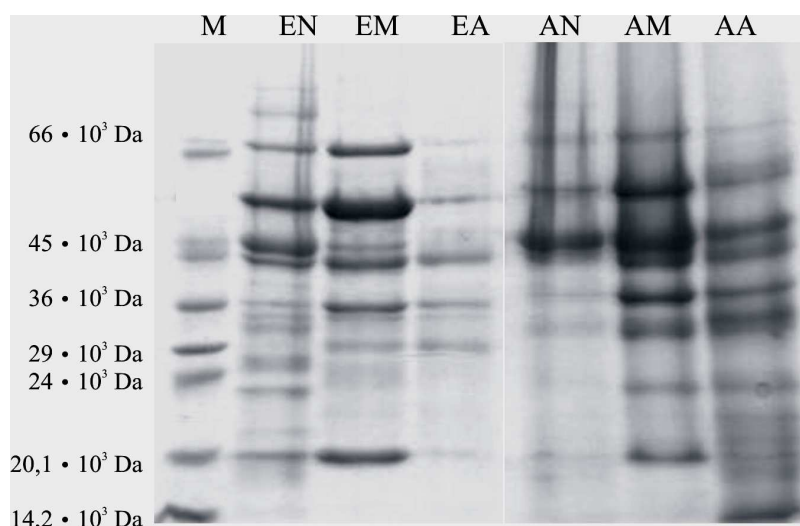
Fig. 1. Changes in the pH value of protein preparations during a 10 minute proteolysis process.

W wyniku procesu mikrofalowania, któremu poddano nasiona obu odmian fasoli, wyodrębnione z nich białka poddane 10-minutowej proteolizie cechowały się mniejszą strawnością w porównaniu z białkami uzyskanymi z nasion przed obróbką wodno-ciepłą (AN i EN). Ogrzewanie białek fasoli w środowisku wodnym może spowodować częściowe rozfałdowanie łańcucha ich trzeciorzędowej struktury, a następnie wywołać szybką agregację, tworząc strukturę kłębką, utrudniającą dostęp enzymom proteolitycznym [10]. Do podobnych wniosków doszli Lanfer-Marquez i Lajolo [23], analizując wpływ mikrofalowania na strawność białek. Badacze ci stwierdzili, że w wyniku tego procesu może wystąpić zmniejszenie strawności na skutek tworzenia się wiązań sieciujących białka. Można też sugerować, że w wyniku

promieniowania mikrofalowego efekt denaturujący i/lub kompleksujący struktury białek jest silny i uniemożliwia dostęp do wiązań Lys-Arg, specyficznych dla aktywności hydrolitycznej trypsyny [12].

Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE preparatów białek

Rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE białek wyizolowanych z suchych nasion fasoli odmian Aura i Eureka (AN i EN) oraz po procesie autoklawowania (AA, EA) i mikrofalowania (AM i EM) przedstawiono na rys. 2. W białkach wyodrębnionych z nasion dwóch badanych odmian fasoli stwierdzono obecność frakcji wielkocząsteczkowych o masie w zakresie $75-65 \cdot 10^3$ Da. Wskutek zastosowanych jednostkowych procesów hydrotermicznych frakcje te uległy znacznej degradacji i fragmentacji, a migrując w polu elektrycznym spowodowały widoczne zwiększenie ilości frakcji $59 \cdot 10^3$ Da, obserwowane szczególnie w preparatach białek z nasion poddanych mikrofalowaniu EM i AM (rys. 3).



Rys. 2. Elektroforetyczny rozdział białek wyodrębnionych z nasion fasoli odm. Aura i Eureka przed obróbką hydrotermiczną (AN, EN) oraz po procesie autoklawowania (AA, EA) i mikrofalowania (AM, EM); M-wzorzec.

Fig. 2. SDS-PAGE electrophoresis of protein preparations isolated from two native bean seeds varieties Aura and Eureka (AN, EN) and from bean seeds after they had been autoclaved (AA, EA) and cooked in a microwave (AM, EM); M-markers.

Analizując obraz rozdziału elektroforetycznego SDS-PAGE preparatów białek z nasion suchych, niepoddanych obróbce hydrotermicznej (AN i EN), stwierdzono znaczący udział frakcji o masie ok. $49 \cdot 10^3-45 \cdot 10^3$ Da. Na podstawie danych literaturowych [28, 33] frakcję tę uznano za faseolinę, główną frakcję białek

zapasowych dojrzałych nasion fasoli. W alkalicznym pH faseolina (glikoproteid II; G1) jest trimeryczną cząsteczką, zbudowaną z trzech podjednostek (α , β , γ), o masach cząsteczkowych, odpowiednio $53 \cdot 10^3$ – $51 \cdot 10^3$, $48 \cdot 10^3$ – $47 \cdot 10^3$ i $46 \cdot 10^3$ – $43 \cdot 10^3$ Da [12]. Deshpande i Damodaran [12] wskazali, że faseolina charakteryzuje się znaczną stabilnością termiczną. Zastosowane w tych badaniach procesy autoklawowania i mikrofalowania spowodowały niewielkie zmiany zawartości tej frakcji (EM, AM i AA). Jedynie w preparacie EA uzyskanym z autoklawowanych nasion odmiany Eureka odnotowano zmniejszenie udziału tej frakcji, wywołane prawdopodobnie wpływem wysokiej temperatury i ciśnienia. Obecna w znacznych ilościach, w analizowanych przez Piecyk nasionach fasoli, frakcja $38 \cdot 10^3$ Da [28] uznawana za glikoproteid I (G2) [17, 25, 28], w preparatach białek uzyskanych w tym doświadczeniu z obu analizowanych odmian fasoli niepoddanych procesom hydrotermicznym, występowała jedynie w niewielkiej ilości. Obserwowano natomiast wzrost zawartości tej frakcji pod wpływem zastosowanych czynników fizycznych w procesach wodno-cieplnych, szczególnie widoczny w preparatach autoklawowanych (EA i AA). Na elektroforegramie białek z nasion badanych odmian fasoli poddanych mikrofalowaniu obserwowano obecność niskocząsteczkowej frakcji ok. $21 \cdot 10^3$ Da, odpowiadającej masie molekularnej inhibitora trypsyny. Informacje literaturowe wskazują, że produkty degradacji faseoliny, powstające w wyniku ekspozycji na działanie trypsyny, migrując na żelu osiągają obszar odpowiadający produktom degradacji faseoliny o masie ok. $28 \cdot 10^3$ – $22 \cdot 10^3$ Da [12]. Widoczna na elektroforegramie znaczna degradacja, fragmentacja oraz częściowy zanik niektórych frakcji białek prowadzi do wniosku, że oba procesy, a zwłaszcza wysoka temperatura i ciśnienie zastosowane podczas autoklawowania, wywołują widoczne zmiany profilu białek nasion fasoli odmian Aura i Eureka potwierdzone obrazem rozdziału elektroforetycznego.

Wnioski

1. Badane gatunki nasion fasoli są zasobnym źródłem białka, a zastosowane procesy obróbki wodno-cieplnej (autoklawowanie i mikrofalowanie) powodują zmiany jego zawartości o zróżnicowanej tendencji w obu odmianach. Zastosowana metoda wyodrębniania białek pozwala uzyskać z suchych nasion fasoli preparaty o stężeniu izolatów, a po procesach hydrotermicznych odpowiadające koncentratom białkowym.
2. Spośród zastosowanych jednostkowych zabiegów wodno-cieplnych proces autoklawowania pozytywnie wpływa na strawność preparatów białkowych *in vitro*, w odróżnieniu od oddziaływania promieniowania mikrofalowego. Czynniki fizyczne (wysoka temperatura i ciśnienie), którym poddano całe nasiona obu

- odmian fasoli, powodują zmiany w strukturze liścieni, a skutkiem jest ułatwiony dostęp enzymów hydrolitycznych do białek.
3. Porównując elektroforegramy białek wyizolowanych z nasion, przed i po zabiegach hydrotermicznych, stwierdzono znaczący wpływ zastosowanej obróbki na obraz separacji żelowej białek. Odnotowano fragmentację oraz degradację niektórych frakcji białkowych, a obraz SDS-PAGE wspiera wyniki analizy strawności *in vitro* oraz potwierdza dodatni wpływ procesu autoklawowania nasion na poprawę strawności białek nasion fasoli.

Literatura

- [1] Acosta G.: Effect of sowing date on the growth and seed yield of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in highland environments. Field-Crops-Research, 1996, **49**, 1-10.
- [2] Alonso R., Aguirre A., Marzo F.: Effects of extrusion and traditional processing methods on antinutrients and *in vitro* digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. Food Chem., 2000, **68**, 159-165.
- [3] AOAC. 1975. Official Methods of Analysis. 12th ed., Washington, USA.
- [4] AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed., Arlington, Virginia.
- [5] Armour J.C., Perera R.L.C., Buchan W.C., Grant G.: Protease inhibitors and lectins in soya beans and effects of aqueous heat treatment. J. Sci. Food Agric., 1998, **78**, 225-231.
- [6] Barampama Z., Simard R.E.: Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. Food Chem., 1993, **47**, 2, 159-167.
- [7] Bishnoi S., Khetarpaul N., Yadav R.K.: Effect of domestic processing and cooking methods on phytic acid and polyphenol content of pea cultivars (*Pisum sativum*). Plant Foods Hum. Nutr., 1994, **45**, 381-388.
- [8] Bressani R., Elias L.G., The nutritional role of polyphenols in beans. In J.H. Hulse, Polyphenols in cereals and legumes. Canada, IDRC, 1980.
- [9] Carbonaro M., Grant G., Cappelloni M., Pusztai A.: Perspectives into factors limiting *in vivo* digestion of legume proteins: antinutritional compounds or storage proteins? J. Agric. Food Chem., 2000, **48**, 742-749.
- [10] Chang K. C., Satterlee L.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 1981, **46**, 1368-1373.
- [11] Deshpande S.S., Sathe S.K., Salunkhe D.K., Comforth D.P.: Effects of dehulling on phytic acid, polyphenols and enzyme inhibitors of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). J. Food Sci., 1982, **47**, 1846-1850.
- [12] Deshpande S.S., Damodaran S.: Heat-induced conformational changes in phaseolin and its relation to proteolysis. Bioch. Biophys. Acta, 1989, **998**, 179-188.
- [13] Fan T. Y., Sosulski F.W.: Dispersibility and isolation of proteins from legume flours. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 1974, **7**, 4, 256-260.
- [14] Guzman-Maldonado S.H., Acosta-Gallegos J., Paredes-Lopez O.: Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J. Sci. Food Agric., 2000, **80**, 1874-1881.
- [15] Habiba R.A.: Changes in anti-nutrients, protein solubility, digestibility and hcl-extractibility of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. Food Chem., 2001, **77**, 187-192.

- [16] Hsu H.W., Vavak D. L., Saterlee L. D., Miller G. A.: A Mulitenzyme technique for estimating protein digestibility. *J. Food Sci.*, 1977, **42**, 1269-1273.
- [17] Ishino K., Ortega M.L.D.: Functionation and characterization of major reserve proteins from seeds of *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.*, 1975, **23**, 529-533.
- [18] Jasińska Z., Kotecki A.: Rośliny strączkowe. PWN. Warszawa 1990.
- [19] Klepacka M., Porzucek H., Piecyk, M., Sałański P.: Effects of high pressure on solubility and digestibility of legume proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 1997, **6/47**, **2**, 41-49.
- [20] Krupa U., Soral-Śmietana M.: Nasiona fasoli – źródłem odżywczych i nieodżywczych makroskładników. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2003, **2 (35) Supl.**, 99-108.
- [21] Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele wartości odżywczej produktów spożywczych. IŻŻ, Warszawa 1998, s. 367-368.
- [22] Laemmli U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. 4. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- [23] Lanfer-Marqez U.S.L., Lajolo F.M.: *In Vivo* Digestibility of Beans (*Phaseolus vulgaris*) Proteins: the role of endogenous protein. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1211-1215.
- [24] Lott J.N.A., Buttrose M.K.: Globoild in protein bodies of legume seeds cotyledons. *Austral. J. Plant Physiol.*, 1978, **5**, 89-95.
- [25] McLester R.C., Hall T.C., Sun S.M., Bliss A.: Comparison of globulin proteins from *Phaseolus vulgaris* with those from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, 1973, **2**, 85-90.
- [26] Nielsen S.S.: Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases. A review. *Cereal Chem.*, 1988, **65**, 435-442.
- [27] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: *In vitro* digestibility of crystalline proteins from beans (*Phaseolus vulgaris*). *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2000, **9/50**, **2**, 29-33.
- [28] Piecyk M.: Właściwości strukturalne i funkcjonalne białek krystalicznych otrzymanych z nasion fasoli (*Phaseolus vulgaris*). Praca doktorska. Wyd. SGGW. Warszawa 2001.
- [29] Pilosof A.M.R., Bartholomai G.B., Chirife J., Bouquet R.: Effect of heat treatment on sorption isotherms and solubility of flour and protein isolated from bean (*Phaseolus vulgaris*). *J. Food Sci.*, 1982, **47**, 1288-1290.
- [30] PN- EN ISO 3188: 1994. Skrobia i produkty pochodne. Oznaczanie zawartości azotu metoda Kjeldahla. Metoda miareczkowa.
- [31] PN- EN ISO 3593: 1994. Skrobia. Oznaczanie popiołu.
- [32] PN- EN ISO 1666: 1999. Skrobia. Oznaczanie wilgotności. Metoda suszarkowa.
- [33] Pusztai A., Steward J.C.: Molecular size, subunit structure and microheterogeneity of glycoprotein ii from the seeds of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1980, **623**, 418-428.
- [34] Reddy N.R., Pierson M.D., Sathe S.K., Salunkhe D.K.: Dry beans tannins: a review of nutritional implications. *J. Americ. Oil Chem. Soc.*, 1985, **62**, 541-549.
- [35] Sathe S.K., Salunkhe D.K.: Studies on trypsin and chemotrypsin inhibitory activities, hemagglutinating activity and sugar in the great northern beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Food Sci.*, 1981, **46**, 1910-1913.
- [36] Sikorki Z., Drozdowski B., Samotus B., Pałasiński M.: *Chemia żywności*. PWN. Warszawa 1988.
- [37] Soral-Śmietana M., Krupa U., Markiewicz K.: White bean varieties – a source of elements, dietary fibre and resistant starch. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2002, **11/52**, SI 1, 17-24.
- [38] Szyrmer J.: Rośliny strączkowe źródłem białka roślinnego. *Nowe Rolnictwo*, 1986, **35**, 1/2: 5-7.
- [39] Vijayakumari K., Siddhuraju P., Janardhanan K.: Effect of various water or hydrothermal treatments on certain antinutritional compounds in the seeds of the tribal pulse (*Dolichos lablab* var. *vulgaris* L.). *Plant Foods Hum. Nutr.* 1995, **48**, 17-29.

**THE IMPACT OF PHYSICAL FACTORS ON THE *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF PROTEINS
FROM BEAN SEEDS (*PHASEOLUS SP.*)**

S u m m a r y

The objective of this paper was to determine the impact of physical factors on the digestibility of proteins isolated from two Polish bean seed species: *Phaseolus vulgaris* var. Aura and *Phaseolus coccineus* var. Eureka. The two physical factors were applied during the two hydrothermal treatment processes: autoclaving and microwave cooking. The analysis of the *in vitro* digestibility of protein preparations, carried out in an environment simulating physiological conditions of proteins digestion in duodenum, showed that temperature and pressure applied during the autoclave cooking significantly improved the digestibility of protein preparations. Contrary to the microwave treatment, after a 10 minute proteolysis completed, the digestibility of protein preparations was lower than the digestibility of protein preparations from bean seeds that had not been thermally treated. On the basis of the SDS-PAGE electrophoresis separation of proteins isolated from native bean seeds prior to the hydro-thermal treatment, it was stated that a fraction showing a mass from 49 to 45 x 10³ kDa was predominant; this fraction was identified as a phaseolin which was characterised by a significant thermal stability. In the two processes applied, the physical factors caused changes in the content of protein fractions, in particular in the EA protein preparation. Results of the SDS-PAGE protein separation made the analysis of the *in vitro* digestibility more complete; they proved that the autoclaving process of bean seeds specifically affected proteins isolated from them; this impact was clearly visible on the presentation of the SDS-PAGE separation.

Key words: bean seeds, protein preparations, hydrothermal treatment, digestibility ☒