

ELEONORA LAMPART-SZCZAPA, GRAŻYNA MOSSOR

## SKŁAD AMINOKWASOWY I FRAKCYJNY ŁUBINOWYCH PREPARATÓW BIAŁKOWYCH

### Streszczenie

Celem badań była charakterystyka składu białkowego nasion łubinu odmiany Topaz (*Lupinus luteus*). W grysie, mąkach i łubinowych preparatach białkowych oznaczano zawartość białka, jego skład aminokwasowy i frakcyjny oraz zawartość tłuszczu. Stwierdzono, że pod względem badanych parametrów, każda próba jest inna. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że procesy zastosowane do otrzymywania białka łubinowego powodują jego modyfikację

### Wstęp

W produkcji żywności coraz szersze i bardziej różnorodne zastosowanie znajdują roślinne preparaty białkowe [19]. Nowe technologie otrzymywania roślinnych preparatów białkowych pozwalają uzyskać nowe rodzaje i typy preparatów o różnej, programowanej jakości. Metoda zastosowana do produkcji białka winna zapewniać uzyskanie produktu bez smaku, zapachu oraz pozbawionego tak zwanych składników antyodżywczych. Zawartość białka, jego postać i cechy fizykochemiczne mają istotny wpływ na właściwości produktu końcowego.

Różnorodność białek (właściwości biologiczne i cechy funkcjonalne w żywności) wynika z ich struktury pierwszorzędowej oraz zdeterminowanej nią konformacji [21]. Pod wpływem czynników środowiska, na przykład w trakcie produkowania koncentratów i izolatów łubinowych, konformacja i struktura czwartorzędowa białka mogą ulegać zmianom. Zmiany te mają zwykle charakter denaturacji i wpływają na wartość odżywczą i funkcjonalność białka. Znajomość zależności właściwości białka od jego struktury i czynników środowiska obok wartości poznawczej stanowi cenne informacje, które mogą być wykorzystane przy produkcji żywności o programowanych właściwościach.

Koncentraty i izolaty białkowe najczęściej są uzyskiwane z soi, choć potencjalnie najbogatsze źródło białka roślinnego stanowią nasiona łubinu [22].

Badania nad strukturą, właściwościami molekularnymi i funkcjonalnością białek łubinu przeprowadzono w różnych laboratoriach [2, 4-18]. Na przykład według Oomaha i Bushuka [17] odtłuszczanie nasion *Lupinus albus* i *L. angustifolius* zmienia rozpuszczalność albumin i prolamin (obniża) oraz globulin (polepsza). Autorzy ci stwierdzili różnice również w składzie frakcyjnym albumin i globulin oraz w składzie aminokwasowym globulin. Gulewicz [8] wykazał, że podczas odgoryczania nasion łubinu etanolem następują zmiany składu frakcyjnego jego białka. W trakcie ekstrakcji białka łubinowego możliwa jest jego proteoliza [2, 4] oraz interakcje, z udziałem wiązań krzyżowych, pomiędzy białkami zapasowymi.

Najkorzystniejsze warunki uzyskiwania białka z polskiej, niskoalkaloidowej odmiany Topaz (*L. luteus*) próbowała określić Lampart-Szczapa [14]. Badała ona wpływ zastosowanych metod preparowania i plasteinowania białka na ilość i właściwości uzyskanych preparatów łubinowych [9-15]. W celu uzupełnienia tej charakterystyki w niniejszej pracy, badano skład aminokwasowy i frakcyjny białka tych preparatów.

## Material, metody

Surowiec stanowiły nasiona łubinu niskoalkaloidowej odmiany Topaz (*L. luteus*) Analizowano; grys łubinowy – **G**, mąkę łubinową nieodtłuszczoną – **Mn** i odtłuszczoną heksanem (4-krotna ekstrakcja, temp. 20°C) – **Mo** oraz cztery izolaty łubinowe (**An**, **Ao**, **C** i **E**).

Preparaty **An** i **Ao** izolowano odpowiednio, z mąki nieodtłuszczonej (**An**) i po jej odtłuszczeniu (**Ao**) zmodyfikowaną metodą wg Ruiz i Hove [18] w środowisku alkalicznym (pH 8,5) z wykorzystaniem wytrącania w punkcie izoelektrycznym, jak opisano wcześniej [14].

Preparat **C** uzyskano w wyniku dyspersji mąki nieodtłuszczonej w 0,5 M NaCl w pH obojętnym jak opisano wcześniej [14].

Preparat **E** otrzymano z grysu, który zmieszano z wodą w stosunku 1:10 (w/o), doprowadzono do pH 8,5 przy użyciu 0,1 N NaOH i wytrząsano w ciągu 1 godz. w temp. pokojowej (20°C). Po sedymentacji supernatant poddano ultrafiltracji, cząstki mniejsze od 30 kDa odrzucano. Do osadu dodano wody w stosunku 1:5 (w/o) doprowadzono do pH 8,5 po czym wytrząsano i poddano ultrafiltracji jak wyżej. Połączone ultrafiltraty doprowadzono do pH 7,0 przy użyciu 0,1 N HCl, zagęszczono do 20% s.m. i suszono rozpyłowo (temp. wlot. 120°C, wylot. 80°C).

W preparatach łubinowych oznaczano zawartość białka [ $N_{Kjel} \cdot 6,25$ ] % s.m.] oraz tłuszczu metodą Soxhleta.

Skład aminokwasowy analizowano w automatycznym analizatorze firmy Beckman po uprzedniej standardowej hydrolizie białek (6 N HCl, 110°C, 24 godz.). Aminokwasy siarkowe oznaczano po wstępnym utlenieniu prób kwasem nadmanganowym (wg zmodyfikowanej metody Moore'a 1963).

Skład frakcyjny oznaczano metodą elektroforezy PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) według Davis [1] bez i z dodatkiem SDS (sodium dodecyl sulfate) metodą według Shapiro [20]. Próby przygotowywano inkubując przez 30 min. w temp. 37°C z dodatkiem 4% SDS, 0,2% 2-merkaptetanolu i 4M mocznika. Do wybarwienia rozdzielonych frakcji białkowych stosowano 1% *Commasie Brilliantblue*.

## Wyniki i dyskusja

We wcześniejszych badaniach nad preparatami białkowymi z łubinu odmiany Topaz stwierdzono, że zastosowane do ich otrzymywania warunki technologiczne są przyczyną różnic tak w ilości uzyskiwanego białka jak i w jego jakości [9, 10, 14, 15].

Jak wynika z danych zestawionych w tabeli 1, badane próby różniły się zawartością białka i tłuszczu. Ilość białka w preparatach łubinowych była o ok. 80% wyższa niż w surowcach, z których je otrzymywano, to jest w grysie (**G**) i mąkach (**Mn** i **Mo**). Zawartość tłuszczu w preparatach wahała się w granicach 1,8-3,1 % i zależała od tego czy surowiec łubinowy był odtłuszczony przed ekstrakcją białka czy też nie.

Tabela 1

Zawartość białka i tłuszczu w łubinowych preparatach białkowych

Próba	Białko (N <sub>Kjel.</sub> ·6.25) %	Tłuszcz %
G	46,10	5,40
M.n.	47,20	5,70
M.o.	50,70	1,90
An.	79,40	3,1
Ao.	82,40	1,90
C	83,90	2,90
E	76,70	2,80

Oceniane próby stanowią preparaty łubinowe o różnym stopniu przetworzenia. Teoretycznie najbardziej zbliżony do natywnego powinien być skład białkowy grysu (**G**), który otrzymywano poddając nasiona łubinu tylko częściowemu rozdrabnianiu. Mąkę (**Mo**) odtłuszczano heksanem, który jako hydrofobowy rozpuszczalnik organiczny, w odróżnieniu od mieszającego się z wodą etanolu, nie powinien powodować zmian w składzie białkowym. W celu uzyskania izolatów białkowych białko preparo-

wano w środowisku o pH słabo alkalicznym (**An**, **Ao** i **E**) lub wykorzystując rozpuszczalność białka w roztworze NaCl, w pH obojętnym (**C**). Preparaty **An**, **Ao** i **C** suszono liofilizacyjnie, a ten sposób usuwania wody jest traktowany jako najkorzystniejszy dla zachowania natywnej struktury białka.

Należy jednak pamiętać, że niezbędne w tej metodzie, niskie temperatury również sprzycają mogą zmianom konformacji białka. Preparat **E** suszony był rozpyłowo to znaczy z zastosowaniem, powodujących denaturację białka, wysokich temperatur.

We wcześniejszych badaniach stwierdzono, że wymienione wyżej preparaty różnią się strawnością białka, jego ultrastrukturą, charakterystycznymi przemianami termodynamicznymi i właściwościami funkcjonalnymi [10, 14, 15]. Ponieważ, właściwości białka wynikają z jego sekwencji aminokwasowej i konformacji, spodziewano się, że wyniki analizy składu aminokwasowego i frakcyjnego białka łubinowego, stanowiąc będą cenne informacje.

Tabela 2

Skład aminokwasowy białka łubinu (g/100g białka)

Amino-kwas	G	Mn	Mo	An	Ao	C	E
Asp	8,88	9,33	9,27	9,57	9,73	9,28	8,77
Tre	3,15	3,09	3,03	2,77	2,69	2,56	2,78
Ser	4,56	4,49	4,42	4,58	4,58	4,56	4,48
Glu	24,21	25,34	25,75	26,06	26,64	26,17	27,60
Pro	4,85	5,33	5,38	6,12	5,60	5,80	4,84
1/2 Cys	2,53	1,91	1,97	1,89	1,87	2,50	3,47
Met	0,74	0,59	0,58	0,80	0,71	0,60	0,64
Gli	3,41	3,71	3,68	3,41	3,40	3,25	3,11
Ala	3,05	2,79	2,80	2,55	2,37	2,33	2,70
Wal	3,23	3,04	3,01	3,13	2,96	2,91	2,62
Ile	3,33	3,21	3,21	3,59	3,47	3,21	2,62
Leu	7,64	7,47	7,39	7,63	7,67	7,36	7,67
Tyr	2,90	3,22	3,23	3,25	3,30	2,84	2,66
Fen	3,57	3,77	3,65	3,78	3,75	3,60	3,26
His	3,01	2,64	2,71	2,48	2,53	2,38	2,81
Liz	4,82	4,59	4,52	4,11	4,01	3,95	4,20
Arg	11,18	10,59	10,53	9,46	9,87	9,87	10,64
Cs index	48,9	43,9	44,7	47,2	44,8	43,6	39,7
	wal	met+cys	met+cys	met+cys	wal	wal	wal
E <sub>AA</sub> index	67,5	67,0	66,8	66,6	65,4	65,2	69,9

Skład aminokwasowy każdej z badanych prób białka łubinowego był inny (tab. 2). Zmieniał się on nawet w efekcie tak prostych zabiegów technologicznych jak rozdrabnianie i odtłuszczanie, potwierdzając spostrzeżenia cytowanych wyżej autorów [17]. Oceniając wartość odżywczą białka łubinu odmiany Topaz, na podstawie współczynnika  $E_{AA}$  widzimy, że w warunkach zastosowanych technologii pogarsza się jego jakość. Z punktu widzenia przydatności spożywczej bardzo istotne są zmiany zawartości aminokwasów egzogennych, w tym metioniny i cystyny. Aminokwasy siarkowe są dla białka łubinu jak i dla większości roślin strączkowych aminokwasami ograniczającymi [22].

Rozdrabnianie i warunki uzyskania preparatów spowodowały obniżenie zawartości aminokwasów siarkowych w **Mn**, **Mo**, **An** i **Ao**. Natomiast preparowanie białka z nieodtłuszczonej mąki łubinowej i z grysu, spowodowało wzrost ilości sumy Met + Cys, nawet o ok. 30% w przypadku preparatu **E**, który podobnie jak preparaty **An** i **Ao**, izolowano w warunkach pH alkalicznego. Wiadomo, że wpływ środowiska zasadowego i wysokiej temperatury może manifestować się denaturacją, hydrolizą amidów i części wiązań peptydowych, modyfikacją niektórych wrażliwych reszt aminokwasowych i sieciowania z niejednakowym efektem w różnych białkach [3, 21].

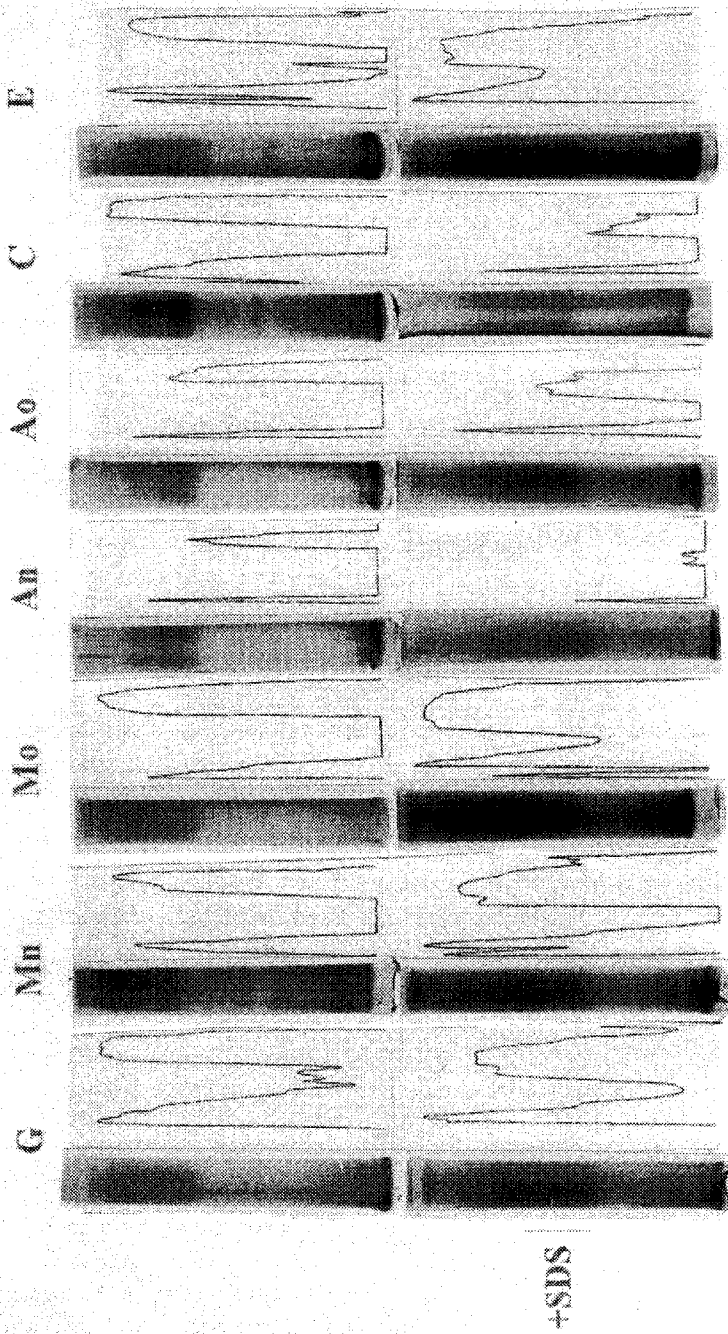
Przyjmuje się, że wszystkie białka łubinowe są oligomerami [2, 4-7]. Różnice w składzie frakcji białkowych preparatów, wyodrębnionych w różny sposób z nasion odmiany Topaz, zostały udokumentowane na elektroforegramach (rys. 1), z których wynika, że białko każdej próby charakteryzowało się innym profilem białkowym.

Największą ilość pasm białkowych stwierdzono w grysie łubinowym (**G**). Białka tej próby, w mniejszym stopniu niż inne, narażone były na działanie czynników zewnętrznych, tak więc ich stan winien być najmniej zmieniony. Różnice w układzie białkowym grysu (**G**) i mąk (**Mn** i **Mo**) mogą być spowodowane działaniem sił mechanicznych w czasie rozdrabniania nasion. W wyniku uszkodzenia komórek i znajdujących się w nich struktur, w tym sferosomów, uwolnione enzymy mogły zmodyfikować białko.

Elektroforegramy mąki nieodtłuszczonej (**Mn**) i odtłuszczonej (**Mo**) są do siebie bardzo podobne, co z kolei nie potwierdza spostrzeżeń z innych badań [17] na temat wpływu odtłuszczania na układ frakcyjny białka łubinu.

W standardowych warunkach elektroforezy w naszych badaniach, taką samą ilość frakcji wykazywała próba **An** jak i **Ao** i preparaty te w odróżnieniu od mąk, nie były zagregowane. Zbliżony skład aminokwasowy i frakcyjny prób **Mo** i **Ao** sugeruje, że gdy surowcem jest mąka odtłuszczona, ma miejsce tylko niewielka modyfikacja układu białkowego.

Podjmując niniejsze badania sądzono, że wyniki zastosowanych metod analitycznych; zwłaszcza elektroforezy, stanowiąc cenne uzupełnienie dotychczasowych



Rys. 1. Elektroforegramy białka preparatów łubinowych.

eksperymentów, pozwolą wnioskować o wpływie zastosowanych warunków technologicznych podczas przetwarzania łubinu, na skład białkowy prób. Zaskakujące i trudne do wyjaśnienia są wyniki odpowiadające preparatom C i E. Ich profil białkowy jest niemal identyczny choć różnią się składem aminokwasowym. Porównując elektroforegramy łubinowych surowców (G i Mn) i preparatów (C i E) widzimy, że wbrew przypuszczeniom, parametry „łagodnej” metody C (pH obojętne, roztwór NaCl, liofilizacja) sprzyjają modyfikacji badanych właściwości białka łubinowego w podobnym stopniu jak i warunki metody E (pH alkaliczne, ultrafiltracja, suszenie rozpyłowe).

Dla zobiektywizowania wniosków wynikających z badań nad łubinem, których kontynuacją jest niniejsza praca, preparaty białkowe uzyskiwano różnymi metodami z tej samej odmiany Topaz [14]. Wyniki omawianych badań wskazują na dużą labilność składu białkowego łubinu. Uzyskane rezultaty pozwalają wnioskować, że jest on bardzo wrażliwy i może ulegać modyfikacji zarówno w wyniku „łagodnego” rozdrabniania jak i na skutek „drastycznego” działania wysokich temperatur. Stwierdzone różnice w składzie aminokwasowym i frakcyjnym badanych prób uzasadniają odmienne właściwości białka nasion łubinu odmiany Topaz, co potwierdzają inne badania [9, 10, 14, 15]. Jednakże, uzyskane dotąd wyniki nie pozwalają na formułowanie jednoznacznych wniosków.

W łubinie stwierdzono cztery główne rodzaje białek: albuminy (2–13%), globuliny (53–85%), gluteliny (10–35%) i frakcję nierozpuszczalną w NaOH (2–3%) [6, 8, 17]. Każde z tych białek ma inny skład aminokwasowy a więc i inne właściwości. Jest prawdopodobne, że ze względu na różny sposób otrzymywania każdego z badanych preparatów łubinowych odmiany Topaz, udział w nich poszczególnych rodzajów białek nie jest taki sam, co obok wpływu warunków uprawy, byłoby przyczyną stwierdzonych zmian składu aminokwasowego i frakcyjnego. Dla uzyskania brakujących informacji niezbędna jest dalsza charakterystyka zidentyfikowanych frakcji białkowych oraz badania z uwzględnieniem interakcji pomiędzy białkiem i innymi składnikami preparatów łubinowych.

## **Podsumowanie**

Stwierdzone różnice w składzie aminokwasów i frakcji białkowych otrzymanych preparatów białka łubinu wskazują, że zastosowane metody preparowania powodują modyfikacje białek. Uzyskane wyniki pogłębiają i uzupełniają charakterystykę właściwości białka łubinowego, jednak relacje pomiędzy wpływem warunków procesów technologicznych a jakością białka łubinowego wymagają dalszych badań.

## LITERATURA

- [1] Davis B.J.: Disc gel electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, 121, 321, 404
- [2] Blagrove R.J., Gillespie J.M.: Comparative studies on the proteins from seeds of *Lupinus angustifolius* L.. *Aust. J. Plant Physiol.*, 5, 1978, 651-63.
- [3] Batey I.L., Gras P.W.: Preparation of salt-free protein products from acid or alkali-treated proteins. *Food chemistry*, 12, 1983, 265-273
- [4] Casero P., Duranti M., Cerletti P.: Heterogeneity of subunit composition in lupin globulins. Comparison of proteins from a number of seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 34, 1983, 1113-1116.
- [5] Cerletti P., Duranti M., Bonomi F.: Molecular properties of applied relevance of storage proteins of lupin seed. In: *Natural products chemistry*. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam, 1985, 613-628.
- [6] Duranti M., Cerletti P.: Aminoacid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 5, 1979, 977-978
- [7] Duranti M.: The structure of lupine seed proteins. *Nahrung*, 3-4, 1986, 221-227.
- [8] Gulewicz K.: Badania nad kompleksowym wykorzystaniem białka i innych składników nasion łubinu gorzkiego. PAN Z.Ch. B. Poznań 1988, 129.
- [9] Lampart-Szczapa E.: Własności funkcjonalne preparatów białkowych uzyskanych z nasion łubinu żółtego niskoalkaloidowej odmiany Topaz. *Roczniki AR Poznań*, CCXLVIII, 1993a, 71-76.
- [10] Lampart-Szczapa E.: Ultrastructure of lupin proteins. In: *Advances in lupin research I.S.A., I.L.A. Portugal*, 1993b, 204-206.
- [11] Lampart-Szczapa E.: Dwustopniowe plasteinowanie białka. *Roczniki AR Poznań*, CCLXX. *Technol. Żyw.*, 19, cz. 1, 1995, 17-25.
- [12] Lampart-Szczapa E., Czaczyk K.: Oligosacharydy polskich odmian łubinu. *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 4, 1995, 9-12.
- [13] Lampart-Szczapa E., Nogala-Kałucka M., Gogolewski M., Zawirska-Wojtasiak R.: Charakterystyka frakcji lipidowej wybranych odmian łubinu. *Roczniki A. R. Poznań*, CCLXX *Tech. Żyw.*, 19, cz. I, 1995, 9-15.
- [14] Lampart-Szczapa E.: Preparation of protein from lupin seeds. *Nahrung*, 40, 2, 1996, 20-24
- [15] Lampart-Szczapa E., Jankowski T., Czernek M.: Termiczna analiza preparatów białkowych łubinu. W: *Łubin: kierunki badań i perspektywy użytkowe*. PTL, IChB PAN, ODR-Marszew 1996, 306-313.
- [16] Lampart-Szczapa E., Obuchowski W., Czaczyk K., Wąsowicz E., Kiryluk J.: Lupin oligosaccharides - functional food components. Looking toward the 21st Century - Abstract book - VIII Int. Lupin Conf. May 1996, Asilomar Conference Center, Pacific Grove, California USA 1996.
- [17] Oomah B.D., Bushuk W.: Characterization of lupine proteins. *J. Food Sci.*, 48, 1983, 38-41.
- [18] Ruiz L.P., Hove E.L.: Conditions affecting production of a protein isolate from lupin seed kernels. *J. Sci. Food Agric.*, 27, 1976, 667-674.
- [19] Rutkowski A., Kozłowska H.: Preparaty żywnościowe z białka roślinnego, WN-T 1981, 370.
- [20] Shapiro A.L., Vinnela E., Maził J.V.(Jr.): Molecular weight estimation of polipeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res Comm.*, 28, 1967, 815-820.
- [21] Sikorski Z.E.: Białka - budowa i właściwości. W: *Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności*. WN-T Warszawa 1994, 245-283.
- [22] Świącicki W., Świącicki W.K.: Rośliny strączkowe źródłem białka paszowego, PWRL Warszawa 1981, 144.



**AMINOACID AND PROTEIN COMPOSITION OF LUPIN SEED PREPARATIONS****S u m m a r y**

The protein contents, aminoacid composition as well as fat contents in groat, flour, and protein preparations obtained from seeds of lupin (*Lupinus luteus*) variety Topaz were determined. It was found that, the methods of seed processing influence the investigated characteristics. ❧

---

**Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego  
Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu**

organizuje konferencję naukową pt.:

**SUROWCE UZUPEŁNIAJĄCE I MATERIAŁY POMOCNICZE  
STOSOWANE W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI**

Konferencja odbędzie się w dniach 9–10 października 1997 r. w ramach obchodów 50-lecia Akademii Ekonomicznej.

W programie konferencji przewiduje się 12 referatów wybitnych specjalistów krajowych i zagranicznych.

Dnia 9. października odbędzie się impreza towarzysząca nt.: „Sensoryczna ocena produktów żywnościowych”. Następnie odbędzie się kokosz oceny sensorycznej żywności w skomputeryzowanym laboratorium analizy sensorycznej.

Oплата konferencyjna wynosi 150 zł.

Nr konta: Akademia Ekonomiczna, 53-345 Wrocław, ul. Komandorska 118/120 – BPH SA I O/Wrocław 10601679-84-27000-400101 z zaznaczeniem „Dodatki”.

Zgłoszenie uczestnictwa należy kierować do sekretariatu konferencji do dnia 30 czerwca br.

**Adres sekretariatu:**

**dr inż. B. Masłowski**

**53-345 Wrocław, ul. Komandorska 118/120**

**AE – Katedra Technologii Żywności Pochodzenia Zwierzęcego**

**tel. (071) 680-266, e-mail: maslowsk@alpha.ok.ae.wroc.pl,**

**Internet: <http://www.ae.wroc.pl/~maslowsk/ktzpz>**

Osobom, które przyślą zgłoszenie i opłatę wyślemy komunikat nr 2, z dokładnym programem konferencji oraz potwierdzenie rezerwacji zakwaterowania i wyżywienia.

Przewodniczącą Komitetu Organizacyjnego jest *prof. dr hab. Teresa Skrabka-Błotnicka*.