

MAŁGORZATA PIECYK

FILTRACJA ŻELOWA BIAŁEK AMORFICZNYCH I KRYSZTALICZNYCH Z NASION FASOLI PRZY UŻYCIU HPLC

Streszczenie

W pracy porównywano udział frakcji białkowych w produktach pośrednich (ekstrakcie i supernatancie) oraz produkcie końcowym (wytrącony osad białek), które otrzymywano podczas uzyskiwania preparatów białek amorficznych i krystalicznych. Preparaty białek amorficznych otrzymano za pomocą alkalicznej ekstrakcji i wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym. Preparaty białek krystalicznych otrzymano przez wytrącenie kryształów (5°C, 18 h) z ekstraktów kwasowych. Białka amorficzne i krystaliczne zbudowane są z dwóch głównych frakcji odpowiadających faseolinie i leguminie. Ich udział wynosił odpowiednio 64% w preparacie amorficznym i 89% w preparacie krystalicznym. Frakcja o masie cząsteczkowej 101 kDa występująca w ekstraktach białkowych w dużych ilościach (25–33%) nie była odzyskiwana w preparatach.

Wstęp

Z nasion roślin strączkowych można otrzymać preparaty wysokobiałkowe. W zależności od użytej metody izolacji uzyskuje się białka o różnej strukturze: amorficznej lub krystalicznej, i o różnych właściwościach funkcjonalnych [1, 12].

Szeroko stosowana jest procedura otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [11]. Metoda ta daje białka bezpostaciowe tzw. amorficzne.

Inną metodą jest izolacja wykorzystująca zdolność tych białek do tworzenia kryształów w środowisku kwaśnym. Wśród nasion roślin strączkowych jedynie z nasion fasoli można otrzymać za pomocą prostych metod formy krystaliczne białek. Właściwość tę wykazuje faseolina, główna frakcja białek globulinowych fasoli. Glicynina, główne białko nasion soi nie tworzy kryształów. Trudność w otrzymaniu krystalicznych form białek nasion soi wynika z właściwości molekularnych, polimorfizmu

i pierwszorzędowej struktury białka [12]. Za pomocą genetycznej modyfikacji glicyniny soi otrzymano białka o strukturze krystalicznej [7].

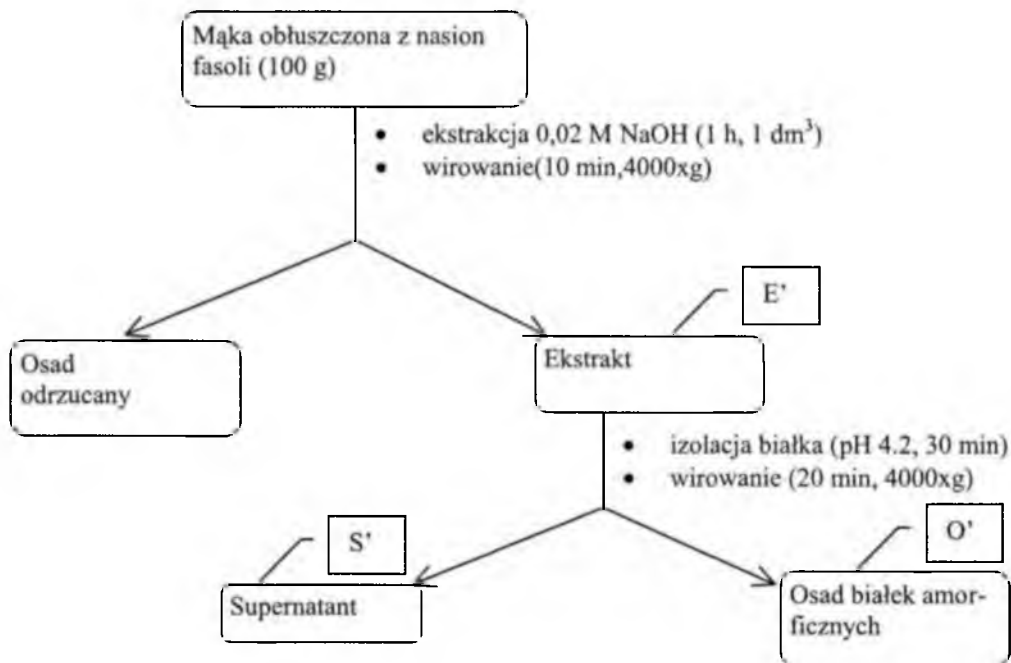
Wykazano, że białka krystaliczne i amorficzne różnią się ilością frakcji (rozdziały elektroforetyczne), strawnością, zawartością związków biologicznie czynnych oraz właściwościami funkcjonalnymi [6, 8, 9, 10].

Celem pracy było zbadanie wpływu zastosowania dwóch różnych metod do otrzymywania preparatów białkowych z nasion fasoli, na udział poszczególnych frakcji w produkcie końcowym oraz w produktach pośrednich uzyskiwanych podczas procesu technologicznego.

Material i metody badań

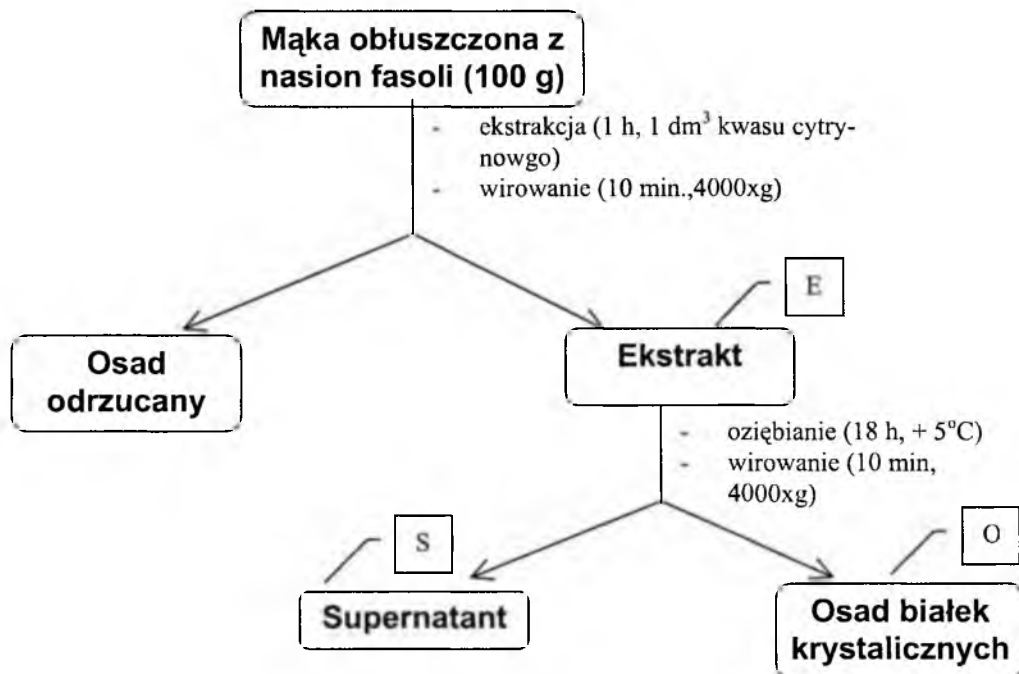
Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) trzech odmian (Mela, Proсна, Wenta), które poddano obłuszczeniu i przemiałowi. Z mąki otrzymywano:

- preparaty białek amorficznych – przez ekstrakcję alkaliczną i wytrącenie w pH 4,2 (rys. 1),
- preparaty białek krystalicznych – przez ekstrakcję w kwasie cytrynowym (0,03 M, pH 5,5) i krystalizację przez 18 godzin w 5°C (rys. 2).



Rys. 1. Otrzymywanie białek amorficznych.

Fig. 1. Procedure for obtention of amorphous protein preparation.



Rys. 2. Otrzymywanie białek krystalicznych.

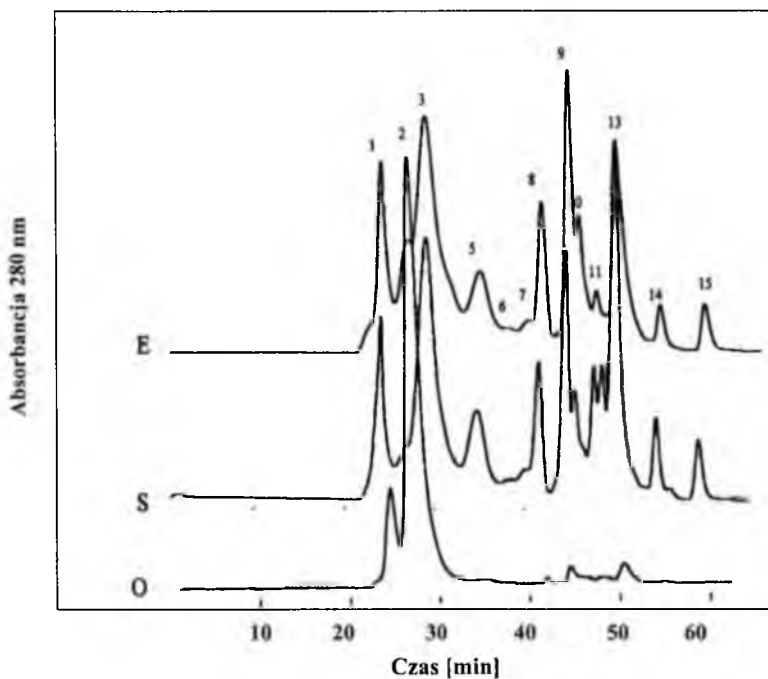
Fig. 2. Procedure for obtention of crystalline protein preparation.

Białka rozdzielano metodą HPLC na kolumnie TSK G2000SW LKB (0,75 x 60 cm). Detekcję prowadzono przy 280 nm (detektor UV SPD-6A Shimadzu). Stosowano fazę ruchomą bufor fosforanowy (0,1 M pH 7,0) i NaCl (0,5M) o przepływie 0,5 ml/min. Do integracji pików wykorzystano inegrator C-R6A Shimadzu. Do kalibracji kolumny użyto jako wzorców mas cząsteczkowych (firmy Pierce): cytochromu (12,5 kDa), chymotrypsynogenu (25 kDa), albuminy jaja (45 kDa), albuminy wołowej (67 kDa), katalazy (158 kDa), ferrytyny (240 kDa) i Blue Dekstranu (2000 kDa). W celu zidentyfikowania globuliny 7S przeprowadzono rozdział oczyszczonej faseoliny [4] otrzymanej z nasion fasoli odmiany Wenta w INRA w Nantes we Francji.

Próbki do analizy przygotowywano według schematu przedstawionego na rys. 3. i 4. Ekstrakt (E i E') i supernatant (S i S') po przesączeniu przez filtr Supelco o średnicy porów 40 μm, nanoszono na kolumnę. Natomiast osad (O i O') rozpuszczano w buforze fosforanowym (0,1M, pH 7,0) i po przesączeniu nanoszono na kolumnę 20 μl próbki.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 3. i 4. przedstawiono chromatogramy filtracji żelowej próbek ekstraktu, supernatantu i osadu, które otrzymywano podczas alkalicznej i kwasowej izolacji białka z fasoli odmiany Mela. Kalibracja kolumny wykazała, że nie można wyznaczyć mas cząsteczkowych pików 1 i 2. Na podstawie rozdziału oczyszczonej faseoliny pik 2. zidentyfikowano jako globulinę 7S (150–180 kDa). Natomiast pik 1. zidentyfikowano jako globulinę 11 S (310–400 kDa) na podstawie danych literaturowych [3, 5] i biorąc po uwagę udział procentowy tej frakcji białkowej. Masy cząsteczkowe pozostałych frakcji białkowych obliczano z krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie czasów retencji wzorców [2].



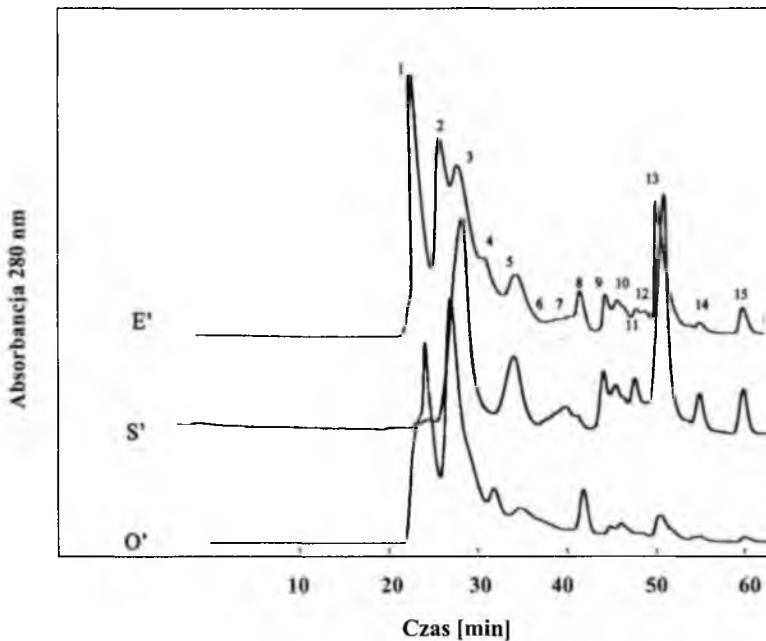
Rys. 3. Chromatogram filtracji żelowej białek ekstraktu (E), supernatantu (S) i osadu (O) otrzymywanych podczas krystalizacji białek z fasoli odmiany Mela.

Fig. 3. Chromatograms of gel filtration of extracts (E), supernatants (S), and protein precipitates (O) obtained by acid extraction from beans var. Mela.

Na podstawie uzyskanych wyników udziałów procentowych rozdzielonych frakcji (tab. 1) zaobserwowano, że alkaliczny ekstrakt białek zawierał trzy dominujące frakcje – 7S i 11S i frakcję o masie cząsteczkowej 101 kDa, które stanowiły około 50–60% wszystkich białek. W ekstrakcie białek krystalicznych dominowała frakcja o ma-

się cząsteczkowej 101 kDa, która stanowiła około 25%. Frakcje 7 S i 11S występowały w mniejszych ilościach (18%).

Supernatant otrzymany po wytrąceniu białek w punkcie izoelektrycznym zawierał trzy dominujące frakcje 101; 32,5 i 10,3 kDa, które stanowiły około 60% wszystkich białek. Te same frakcje obecne były w supernatantach otrzymanych po wytrąceniu kryształów białek z roztworów kwasu cytrynowego, ale w mniejszych ilościach (około 48%).



Rys. 4. Chromatogram filtracji żelowej białek ekstraktu (E'), supernatantu (S') i osadu (O') otrzymanych podczas izolacji alkalicznej białek z fasoli odmiany Mela.

Fig. 4. Chromatograms of gel filtration of extracts (E'), supernatants (S'), and protein precipitates (O') obtained by alkaline extraction from beans var. Mela.

W białkach amorficznych dominowała frakcja 7 S, która stanowiła około 40-50% wszystkich białek. W mniejszej ilości obecna była frakcja 11S (ok. 14%). Porównując białka amorficzne z ekstraktem zaobserwowano zwiększenie się udziału frakcji niskocząsteczkowych (w zakresie 11,5–21,5 kDa) z 14% do 35% w białku amorficznym oraz brak frakcji o masie cząsteczkowej 101 kDa.

W białkach krystalicznych dominowała również frakcja o masie cząsteczkowej 7S, ale jej udział był większy niż w białkach amorficznych i stanowił 78%. Frakcja 11S stanowiła 11%. W porównaniu z białkami amorficznymi mniej było frakcji niskocząsteczkowych (około 10%).

Tabela 1

Udział frakcji białkowych (jako procent całkowitej ilości białka rozdzielanego) w ekstrakcie, supernatancie i osadzie otrzymanych z fasoli odmiany Mela.

Proportion of each fraction (As percent of total protein fractionated) in extracts, precipitates and supernatants obtained from beans var. Mela.

Nr frakcji Fraction no.	Masa cząsteczkowa MW kDa	Białka krystaliczne Crystalline protein			Białka amorficzne Amorphous protein		
		Ekstrakt Extract	Supernatant	Osad Precipitate	Ekstrakt Extract	Supernatant	Osad Precipitate
1		10	7,5	12	21	0,5	14
2		8	nw*	77	18	1,5	41
3	101	27,5	29,5	nw	26,5**	34	nw
4	54	nw	nw	nw		nw	nw
5	32,5	8,5	8,5	0,5	8,5	12	5
6	21	1	1	nw	2	nw	7
7	18	2	2	nw	1	5,5	nw
8	16,2	7	6	nw	2,5		5,5
9	13,6	14,5	9	3,5	2	4,5	17
10	12,3		5		3	5,5	
11	11,5	3	4	1	1	5	nw
12	11		3,5		1,5	nw	4,5
13	10,3	14,5	18,5	5	10,5	24,5	5
14	8,7	2	3	nw	1	3,5	1
15	7,6	2	2,5	1	1,5	3,5	nw

* nie wykryto / non detected

** piki nierozdzielone / non-separated peaks.

Wnioski

1. Białka krystaliczne w 89 % zbudowane są z frakcji 7S i 11S.
2. Białka amorficzne zbudowane są również z faseoliny i leguminy, ale ich udział jest mniejszy (64%), więcej jest frakcji o niskich masach cząsteczkowych.
3. Frakcja o masie cząsteczkowej 101 kDa występująca w dużej ilości w ekstrakcie białek krystalicznych (około 25-30%) nie jest obecna w preparacie białkowym.

LITERATURA

- [1] Alli I., Baker B.E.: Constitution of Leguminous Seeds: The Microscopic Structure of Proteins Isolated from *Phaseolus* Beans, *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 1980, 1316.
- [2] Andrews P.: Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem. J.*, **99**, 1964, 222.

- [3] Carbonaro M., Capelloni M., Nicoli S., Lucarini M., Carnovale E.: Solubility - Digestibility Relationship of Legume Proteins, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3387.
- [4] Chang K.C., Satterlee L.D.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*), *J. Food Sci.*, **46**, 1981, 1368.
- [5] Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D.: Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry*, **15**, 1976, 3.
- [6] DiLollo A., Alli I., Biliarderis C., Barthakur N.: Thermal and Surface Active Properties of Citric Acid-Extracted and Alkali-Extracted Proteins from *Phaseolus* Beans, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 24.
- [7] Gidamis A.B., Mikami B., Katsube T., Utsumi S., Kito M.: Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Soybean Proglycinins Modified by Protein Engineering, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1994, 703.
- [8] Li Z., Alli I., Kermasha S.: Tryptic Hydrolysis (in Vitro) of Crystalline and Noncrystalline Proteins from *Phaseolus* beans, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1989, 643.
- [9] Piecyk M., Mitek A.: Wpływ procesu krystalizacji białek z nasion fasoli na zawartość niektórych związków biologicznie czynnych. Materiały XXX Sesji KTChZ PAN, Kraków 1999.
- [10] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: In vitro digestibility of crystalline proteins from beans (*Phaseolus vulgaris*), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **2**, 2000, 29.
- [11] Sosulski F. W., McCurdy A.R.: Functionality of flours, protein fractions and isolates from Field peas and Faba bean, *J. Food Sci.*, **52**, 1987, 1010.
- [12] 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.*, **41**, 1993, 687.

FRACTIONATION BY GEL FILTRATION HPLC OF CRYSTALLINE AND AMORPHOUS PROTEINS FROM *PHASEOLUS* BEANS

S u m m a r y

The fractions of crystalline and amorphous protein preparations from *Phaseolus* beans were compared. The crystalline proteins were obtained by precipitating the crystals (5°C, 18 h) from acid extracts. The amorphous forms were obtained by isoelectric precipitation of proteins from alkaline extracts. Protein precipitates, supernatants and extracts were fractionated by gel filtration HPLC. Crystalline and amorphous proteins contained two main fractions corresponding to phaseolin and legumin. These fractions represented approximately 64% (amorphous forms) and 89% (crystalline forms) of the total proteins fractionated. The fraction (average MW = 101 kDa) was present in protein extracts in large amount (20–33%) was not recovered in precipitates proteins. ☒