

МОЛОДЧЕНКОВА О.О.<sup>✉</sup>, СІЧКАР В.І., КАРТУЗОВА Т.В., БЕЗКРОВНА Л.Я., ЛИХОТА О.Б., ЛАВРОВА Г.Д.

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення,  
Україна, 65036, м. Одеса, Овідіопольська дорога, 3, e-mail: olgamolod@ukr.net

<sup>✉</sup> olgamolod@ukr.net

## АНАЛІЗ БІЛКОВОГО КОМПЛЕКСУ ТА ВМІСТУ ІЗОФЛАВОНІВ НАСІННЯ СОЇ ТА НУТУ В ЗВ'ЯЗКУ З СЕЛЕКЦІЄЮ ПРОДОВОЛЬЧОГО НАПРЯМУ

Високі темпи виробництва зернобобових культур і велика питома вага їх у групі багатих білком рослин пояснюється, головним чином, особливостями хімічного складу цієї сировини. У зернобобових культур рідкісне для рослин поєднання високого вмісту білка й олійності з цінним набором вітамінів, зольних елементів і біологічно активних речовин. Білки зернобобових культур за якістю близькі до тваринних, а за амінокислотним складом – до ідеального білка (за винятком вмісту сірковмісних амінокислот). Встановлено, що найбільш перспективними білками зернобобових культур для виробництва харчових продуктів є глобулінові фракції, які мають константу седиментації 7S і 11S. Вміст цих фракцій та їх співвідношення у сумарному білку й визначають його якість та збалансованість за амінокислотним складом [1, 2]. Відомо, що вміст глобулінової фракції складає в насінні сої близько 78 %, а в насінні нуту близько 50 % від загальної кількості білка. Фракція 7S глобулінів сої (β-конгліцинін) має молекулярну масу 150–210 кДа і складає 37 % від вмісту розчинного білка. До її складу входять також ферменти ліпоксигенази, амілази, лектини. 11S фракція сої (гліцинін) має молекулярну масу 350 кДа і складає 31 % від суми розчинного білка. В насінні нуту глобуліни представлені 2 основними фракціями: легуміном (11S глобулін) та віциліном (7S глобулін). Особливістю білкового комплексу нуту, в порівнянні з іншими бобовими культурами, є наявність значної кількості глютелінів (близько 18 %). Молекулярна маса легуміна нуту складає 320–400 кДа. 7S і 11S глобулінові фракції мають четвертинну структуру, складаються з окремих субодиниць, кожна з яких має кислу і лужну білкові молекули, які пов'язані між собою дисульфідними зв'язками. Гліцинін сої складається з шести субодиниць, β-конгліцинін є глікопротеїном і складається з трьох субодиниць: α<sup>1</sup> – 76 кДа, α – 72 кДа, β –

52 кДа. Структура віциліна нуту подібна до віциліна гороху. За даними SDS електрофорезу, молекулярна маса компонентів віциліна гороху складає 50,35,33,19,15 та 13 кДа [3, 4]. Вивчення білкового комплексу насіння зернобобових культур дуже важливе для добору сортів продовольчого напрямку, особливо для приготування продуктів дитячого харчування, оскільки відомо, що деякі компоненти білків сої (4 субодиниці гліциніна (G1 (A<sub>1a</sub>B<sub>2</sub>), G2(A<sub>2</sub>B<sub>1a</sub>), G3(A<sub>1b</sub>B<sub>1b</sub>), G4(A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>)), α, α', β субодиниці β-конгліциніна) [5], нуту (2S альбумін, субодиниця віциліна (50 кДа), субодиниця легуміна (20 кДа) можуть викликати алергічну реакцію у людини [6].

Зернобобові культури містять значну кількість поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, які є природними антиоксидантами і мають широкий спектр біологічної активності. Інтерес учених різних спеціальностей, у тому числі селекціонерів, до флавоноїдів викликаний різноманітним біологічним та фармакологічним ефектом, які ці сполуки проявляють в організмі людини та тварин. На сьогодні визначений широкий спектр дії цих сполук в організмі людини: капіляроукріплюючий, спазмолітичний, антистресовий, протизапальний, антигрибковий, антибактеріальний, протівірусний, протівіразкове, анитоксичне, антиалергічне, антиатеросклеротичне, антиаритмічне, антигіпертензивний, імуномодулюючий, антиканцерогенний, нефропротекторний, естрогеноподібний, гепатопротекторний [7]. Встановлені властивості флавоноїдів відкривають широкі можливості їх використання в якості лікарських засобів, які не мають серйозних побічних ефектів, на відміну від синтетичних аналогів. Насіння сої містить два основних ізофлавонона – геністеїн та даїдзеїн, причому геністеїна у соєпродуктах більше, ніж даїдзеїна [8]. Насіння нуту містить даїдзеїн, геністеїн, гліцитейн, формонетін та біоханін [9].

© МОЛОДЧЕНКОВА О.О., СІЧКАР В.І., КАРТУЗОВА Т.В., БЕЗКРОВНА Л.Я., ЛИХОТА О.Б., ЛАВРОВА Г.Д.

Виходячи з вищевикладеного, метою наших досліджень було вивчити особливості білкового комплексу, вмісту ізофлавононів у насінні сої та нуту генотипів української та закордонної селекції для розробки критеріїв добору генотипів сої та нуту продовольчого напрямку.

### Матеріали і методи

Дослідження проводилися на 105 генотипах сої (*Glycine max* L.) різного генетичного походження та з різною забарвленістю насіння української та закордонної селекції, в тому числі п'яти гібридних комбінаціях F<sub>2</sub>–F<sub>4</sub>, які відрізнялися за вмістом білка: Аметист х Ольса, Куйбишевська х Аполлон, Паркер х Устя, Вілана х Степовичка, Вілана х Юр'ївка х Изумрудна та їх батьківських формах (Аметист, Ольса, Куйбишевська, Аполлон, Паркер, Устя, Вілана, Степовичка та Юр'ївка х Изумрудна); гібридних ліній рослин F<sub>5</sub> сої (насіння F<sub>6</sub>): Медея х ВИР 5048, [mS<sub>1</sub>T х Токуо х K4937] х Kiszelniska, Хей-нун х (K-12 х Чорнобура), Дельта х Валюта та їх батьківських формах (Медея, ВИР 5048, g[mS<sub>1</sub>T х Токуо х K4937], Kiszelniska, Хей-нун, K-12 х Чорнобура, Дельта, Валюта); гібридних ліній рослин F<sub>7</sub> сої (насіння F<sub>8</sub>): Медея х ВИР 5048, g[mS<sub>1</sub>T х Токуо х K4937] х Kiszelniska, Хей-нун х (K-12 х Чорнобура), Дельта х Валюта, Вілана х [Юр'ївка х Изумрудна], Орел х Київська та їх батьківських формах (Медея, ВИР 5048, g[mS<sub>1</sub>T х Токуо х K4937], Kiszelniska, Хей-нун, [K-12 х Чорнобура], Вілана, [Юр'ївка х Изумрудна], Дельта, Валюта, Орел, Київська 98), генотипах сої з визначеним станом генів гліциніна та β-конгліциніна: Williams 82 (дикий тип, α'-субодиниці β-конгліциніна та G4-субодиниці гліциніна), Laiwadou (позитивний контроль G4-субодиниці гліциніна), Harovinton (повний комплект субодиниць гліциніна і β-конгліциніна), Enrei (A<sub>4</sub> нуль-алель → відсутність G4-субодиниці), Kebugi (мутантний тип α'-субодиниці β-конгліциніна), Raiden (алель Ggy1 → присутність α'-субодиниці β-конгліциніна; рецесивний алель gy4 → відсутність G4-субодиниці (A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub>), P1 468904, P1468906 (алель Gy4-a, субодиниця гліциніна A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> (дикий тип)), P1 468906, P1 468918 (*Glycine soja*) (алель Gy4-b, субодиниця гліциніна A<sub>5</sub>A<sub>4</sub>B<sub>3</sub> (варіант)); 10 сортах нута (*Cicer arietinum* L.) (Антеї, Пегас, Пам'ять, Розанна, Буджак, Тріумф, Одісей, Скарб, Пегас, Аргумент, Адмірал), насіння яких були надані відділом селекції, генетики та

насінництва бобових культур СГІ-НЦНС та National Plant Germplasm System.

У лабораторних дослідженнях використовували стандартні з нормативами для України та адаптовані методи біохімічного аналізу. Визначення білка проводили методом К'ельдаля на KJLtec Auto-1030. Виділення та ідентифікацію запасних білків сої та нуту проводили методами, розробленими та удосконаленими в лабораторії [10]. Електрофорез білків проводили в 15 % ПААГ, який містив 1 % SDS, з використанням системи фірми Нем-Нoff. В якості маркерів молекулярної маси використовували таку білкову суміш: 109 кДа – колагеназа, 97 кДа – фосфорілаза В, 67 кДа – бичачий сироватковий альбумін, 45 кДа – альбумін яєчний, 30 кДа – карбонангідраза, 20,1 кДа – інгібітор трипсину, 14,4 кДа – α-лактальбумін. Вміст субодиниць альбумінів, глютелінів, 7S та 11S глобулінів визначався за допомогою програм аналізу зображень "ImageJ" та "AnaIS". Вміст сумарних ізофлавононів визначали спектрофотометричним методом [11]. Активність інгібітора трипсину визначали за зменшенням швидкості гідролізу казеїну ензимом у присутності інгібітора [12]. Активність ліпоксигенази визначали спектрофотометричним методом у реакції зв'язаного окиснення β-каротину в присутності лінолевої кислоти при довжині хвилі 440 нм [13]. Статистична обробка результатів досліджень проводилася за допомогою пакету програм «Аналіз даних електронних таблиць Microsoft Excel».

### Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень було виявлено, що взяті у вивчення генотипи зернобобових культур значно відрізнялися як за вмістом сумарного білка, так і за вмістом та компонентним складом запасних білків, перш за все 7S та 11S глобулінових фракцій. Досліджені генотипи сої та нуту значно відрізнялися також за вмістом ряду антипоживних сполук (інгібітора трипсину, лектинів, активності уреаз, ліпоксигенази), які негативно впливають на харчову і кормову цінність насіння та є основною причиною появи небажаних запахів та присмаків, руйнування цінних жирних кислот, пігментів та вітамінів. У лабораторії біохімії рослин було розроблено та рекомендовано для наукових установ, які займаються селекцією зернобобових культур продовольчого напрямку, два експрес-методи виділення та ідентифікації 7S та

11S глобулінових фракцій насіння сої та нуту, метод виділення та ідентифікації альбумінів, глобулінів, глутелінів нуту, які дозволяють швидко вести оцінку селекційного матеріалу за цими показниками.

Із використанням розроблених методів було виявлено, що сорти сої вітчизняної селекції в основній масі характеризуються високим вмістом 7S глобулінів, термопластичні властивості яких здійснюють позитивну дію під час виробництва соєвого молока. Однак є й сорти з однаковим вмістом 7S та 11S глобулінів, які можна використовувати як для виготовлення молока, так і для виробництва сиру типу «тофу» і бринзи. Технологічні випробування показали, що сорти сої з високим вмістом 7S глобулінів забезпечують найвищий вихід молока з достатньо підвищеним вмістом сухих речовин. За виходом бринзи кращі показники були у сортів сої з підвищеним вмістом 11S глобулінової фракції. Враховуючи вищевикладене, можна зробити висновок, що не з кожного сорту сої можна отримати продукти із бажаними технологічними параметрами, високої якості та високим виходом продукції. Подальші дослідження дозволили встановити міжсортний поліморфізм за компонентним складом 7S та 11S глобулінів насіння сої, визначити особливості вмісту, співвідношення та компонентного складу 7S і 11S глобулінових білків у генотипів різного філогенетичного походження, гібридів  $F_2$ – $F_8$  сої та їх батьківських форм. У ранніх гібридних популяцій ( $F_2$ – $F_4$ ) простежувався чіткий взаємозв'язок між вмістом сумарного білка та вмістом 7S глобулінової фракції. В старших поколіннях ( $F_6$ – $F_8$ ) ця закономірність зберігалася не у всіх гібридних комбінацій, які вивчалися. Виявлено, що між вмістом 11S білків та вмістом білка в насінні кореляційний взаємозв'язок відсутній. Проведений аналіз вивчення взаємозв'язку між вмістом та співвідношенням 7S і 11S глобулінів і вмістом білка в насінні сої гібридів  $F_2$ – $F_8$  та їх батьківських форм показав, що умови вирощування здійснюють значний внесок у ступінь вираженості цих показників, внаслідок чого програма індивідуального добору генотипів при селекції сої продовольчого напрямку повинна бути диференційована за роками.

Соя – одна із найбільш вивчених у генетичному плані сільськогосподарська культура. Бразильські дослідники виявили, що генетичні відмінності за вмістом та компонентним складом субодиноць 7S та 11S глобулінових фракцій

соєвого білка, свідчать про можливість ведення добору не тільки за вмістом конкретних білкових фракцій, але й їхніх субодиноць. Показано, що компонентний склад 7S і 11S глобулінів сої контролюється складною генетичною системою з різною дією та взаємодією генів [14]. Аналіз отриманих нами результатів виявив, що генотипи сої різного філогенетичного походження характеризуються поліморфізмом за вмістом у компонентному складі 7S та 11S глобулінів таких субодиноць, як  $\alpha$ ,  $\alpha^1$ ,  $\beta$  та компонентів  $A_3$ ,  $A_5$ ,  $A$  і  $B$ , які впливають на здоров'я людини як негативно, так і позитивно, що потрібно враховувати при селекції сої на якість.

У результаті проведених нами досліджень були також встановлені сортові відмінності за вмістом білка, вмістом, співвідношенням та компонентним складом 7S та 11S глобулінів насіння нуту (вміст білка – 13,3–17,3 %; співвідношення 11S/7S глобулінів – від 1,35 до 2,56). Показано, що сорти нуту характеризуються неоднаковим вмістом у електрофоретичних спектрах альбумінів, глобулінів, 7S та 11S глобулінів компонентів, які за молекулярною масою подібні до 2S альбуміну,  $\alpha$ -,  $\beta$ -субодиноць легуміна та субодиноць віциліна та можуть викликати алергійну реакцію в організмі людини.

Важливий компонент насіння сої – поліфенольні сполуки, які є природними антиоксидантами з широким спектром біологічної активності. В лабораторії біохімії рослин був відпрацьований метод визначення загального вмісту ізофлавонів у насінні сої та нуту, встановлені значні відмінності за вмістом ізофлавонів у сортів нуту (від 110,0 до 201,0 мкг/г), сої (від 35,5 до 399,6 мкг/г) та у генотипів сої, що відрізняються за забарвленням насіння (від 71,9 до 2724,0 мкг/г). Максимальний вміст ізофлавонів був встановлений у генотипів K-4937 з червоно-коричневим забарвленням насіння (2724 мкг/г), K-4937xКобра (2053 мкг/г), [mS<sub>1</sub>TonicaхTokya]xNoir2 (1855 мкг/г), з темно-червоно-коричневим забарвленням насіння і K-4937xКобра (1721 мкг/г) та Кобра x[K-532xЧонобура] (1747 мкг/г) з чорним кольором насіння. Наявність значної варіабельності за вмістом ізофлавонів дає підставу вважати, що цей показник можна використовувати при доборі генотипів сої та нуту продовольчого та лікувально-профілактичного напрямку.

## Висновки

Вивчення білкового комплексу та вмісту ізофлавонів насіння генотипів сої та нуту української та закордонної селекції показало, що досліджені генотипи значно відрізнялися за вмістом сумарного білка, ізофлавонів, ліпоксигенази, інгібітора трипсину, вмістом і компонентним складом запасних білків, 7S і 11S глобулінових фракцій білка. Аналіз залежності між кількістю сумарного білка та вмістом і співвідношенням 7S та 11S глобулінових фракцій у білку виявив, що умови середовища вносять значний вклад у ступінь вираженості цих кількісних показників, внаслідок чого програма добору генотипів зернобобових культур повинна диференціюватися за роками. Сорти сої та нуту різного філогенетичного походження характе-

ризувалися неоднаковим вмістом у компонентному складі альбумінів, 7S та 11S глобулінів A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, A і B компонентів гліциніна, α, α', β субодиниць β-конгліциніна, 2S альбуміна, субодиниці віциліна з молекулярною масою 50 кДа, субодиниці легуміна з молекулярною масою 20 кДа, які впливають на здоров'я людини, що необхідно враховувати при веденні селекції зернобобових культур продовольчого напрямку. Наявність значної варіабельності за вивченими біохімічними показниками, які визначають харчову цінність насіння сої та нуту, дає підставу вважати, що наведені результати можуть зацікавити селекціонерів, які створюють сорти зернобобових культур продовольчого та лікувально-профілактичного напрямку.

## Література

1. Клименко В.Г. Белки семян бобовых растений. – Кишинев, Штица, 1978. – 248 с.
2. Guo S.T., Meng Y., Zhang X.M., Zhang X.L., Qi J., Qiu L.J., Chang R.Z. Analysis of protein subunit composition of Chinese soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars and screening cultivars lacking some subunits // Acta Agronomica. – 2006. – P. 1130–1134.
3. Casey R., Domoney C., Smith A.M. Pear: genetics, molecular biology and biotechnology // In: R. Casey & D.R. Davies, Biotechnology in agricultural series. – Wallingford, Oxon, UK: CAB International, 1993. – P. 121–164.
4. Rao J.A.V., Qadri A., Koundal K.R. Purification and immunochemical characterization of vicilin storage protein of chickpea (*Cicer arietinum* L.) // International Journal of Biological Technology. – 2011. – V. 2 (3). – P. 21–28.
5. Yaklich R.W. β-Conglycinin and glycinin in high protein soybean // G. Agric. Food. Chem. – 2000. – V. 49. – P. 729–735.
6. Dadon S.B.E., Pascual C.Y., Eshel D., Teper-Bammler P., Ibanez M.D.P., Reifen R. Vicilin and the basic of legumin are putative chickpea allergens // Food chemistry. – 2013. – V. 138. – P. 13–18.
7. Барабой В.А. Изофлавоны сои: биологическая активность и применение // Биотехнология. – 2009. – Т. 2, № 3. – С. 44–54.
8. Hasanah Y., Nisa T.C., Armidin H., Hanum H. Isoflavone content of soybean [*Glycine max*(L.) Merr.] cultivars with different nitrogen sources and growing season under dry land conditions // Journal of Agriculture and Environmental Development. – 2015. – V. 109 (1). – P. 5–17.
9. Megias C., Cotes-Giraldo I., Alaiz M., Vioque J., Giron-Calle J. Isoflavone in chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrates // Journal of functional foods. – 2016. – V. 21. – P. 186–192.
10. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкач В.І., Цісельська Л.Й., Сагайдак Т.В. Патент на корисну модель № 42181. Спосіб добору сої. 25.06.2009 р.
11. Васюкова А.Н. Изучение содержания суммы флавоноидов в семенах и проростках сои // Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс. – 2013. – № 4. – С. 9–13.
12. Левицкий А.П. Методы определения ингибиторов трипсина. Биохимические методы исследования селекционного материала. – Одесса: ВСГИ, 1979. – Т. 15. – С. 68–72.
13. Будницкая Е.В. Исследование активности липоксигеназы кормовых трав методом окисления каротина // Биохимия. – 1955. – Т. 20, Вып. 5. – С. 615–621.
14. Carrão-Panizzi M.C., Kwanyuen P., Erhan S.Z., Lopes I.O.N. Genetic variation and environmental effects on beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars // Pesquisa Agropecuária Brasileira. – 2008. – V. 43, № 9. – P. 725–729.

**MOLODCHENKOVA O.O., SICHKAR V.I., KARTUZOVA T.V., BEZKROVNAYA L.Y., LYKHOTA E.B., LAVROVA G.D.**

*Plant Breeding & Genetic Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya doroga, 3, e-mail: olgamolod@ukr.net*

## ANALYSIS OF PROTEIN COMPLEX AND ISOFLAVONES CONTENT OF THE SOYBEAN AND CHICKPEA SEED IN THE CONNECTION OF FOOD DIRECTION BREEDING

**Aim.** The goal of research was to study the features of protein complex and isoflavones content in the soybean and chickpea seed for development the characteristics of legume selection of food direction. **Methods.** 7S and 11S globulins were separated by method, which was developed in the Laboratory of Plant Biochemistry (Patent # 42181). Protein content was determined by Kjeldahl method. Isoflavones content were determined by spectrophotometric method.

**Results.** The features of protein complex and isoflavones content in the soybean and chickpea seed of genotypes of Ukrainian and foreign plant breeding were researched. It was shown that the studied genotypes of soybean, chickpea differ widely in the content of total protein, 7S and 11S globulins and isoflavones. The polymorphism between varieties on the electrophoresis spectrums of component composition of 7S and 11S globulins of soybean was established. The features of 7S and 11S globulins content, its ratio and component composition of genotypes of different phylogenesis origin, F3–F8 hybrids of soybean and their paternal forms were identified. It was established that soybean and chickpea genotypes of different phylogenesis origin were characterized by different content in the component composition of storage proteins of  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$  subunits of  $\beta$ -conglycinin, A<sub>3</sub>, A<sub>5</sub>, A, B components of glycinin, 2S albumin, vicilin subunit (50 kDa), legumin subunit (20 kDa). These subunits and components have negative and positive influence on the man health. **Conclusions.** The got results open fundamentally new approach of estimation of legumes on a quality of seed and can be used for authentication of legume varieties of the food direction.

**Keywords:** Legume, 11S globulin, 7S globulin, isoflavones.