УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК
СЕЛЕКЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТИТУТ - НАЦІОНАЛЬНИЙ ЦЕНТР
НАСІННЄЗНАВСТВА ТА СОРТОВИВЧЕННЯ

ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ СОЇ

ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ЯКІСТЬ НАСІННЯ

Методичні рекомендації

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ

Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ СОЇ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ЯКІСТЬ НАСІННЯ

Методичні рекомендації

Одеса
Астропринт
2025

УДК 577.1
О-932

Автори:

О. О. Молодченкова, д. б. н., с. н. с.;
В. І. Січкар, д. б. н., професор;
Г. Д. Лаврова, к. б. н., с. н. с.;
Л. Я. Безкровна

Рецензенти:

П. С. Тихонов, к. б. н., доцент Одеського державного аграрного університету;
С. В. Коблай, к. с.-г. н., провідний науковий співробітник відділу селекції, генетики та насінництва бобових культур

Друкується за рішенням вченої ради Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення *(протокол № 10 від 03.10.2024 р.)*

О-932 **Оцінка** селекційного матеріалу сої за біохімічними показниками, що характеризують якість насіння : метод. реком. / Молодченкова О. О., Січкар В. І., Лаврова Г. Д., Безкровна Л. Я. ; СГІ — НЦНС. Одеса : Астропринт, 2025. 36 с.

Описано основні біохімічні критерії, що характеризують якість насіння сої.

Рекомендації містять інформацію щодо проведення біохімічних досліджень в насінні сої, які можна використовувати для масової оцінки селекційного матеріалу з метою добору генотипів сої продовольчого напряму.

Методичні рекомендації можуть бути використані в фізіолого-біохімічних, селекційних дослідженнях, селекції та насінництві сої.

УДК 577.1

© Селекційно-генетичний інститут —Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення (СГІ–НЦНС), 2025

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, одиниць, скорочень та термінів 4
1.Теоретичне обґрунтування досліджень 5
2. Визначення вмісту білка методом К'єльдаля 10
3. Визначення вмісту жиру в насінні 11
4. Визначення вмісту вуглеводів 12
5. Визначення вмісту флавоноїдів 14
6. Визначення активності інгібітора трипсину 15
7. Визначення активності ліпоксигенази 17
8. Визначення активності лектинів в насінні сої 18
9. Визначення вмісту білка методом Лоурі 19
10. Визначення вміст у 7S та 11S глобулінів сої 20
11. Визначення ефективності перетравлювання білка 21
12. Визначення вмісту фітинової кислоти 23
Опрацювання результатів 24
Література 32

Перелік умовних позначень, символів, одиниць,
скорочень та термінів

ІТ – інгібітор трипсину

ЛОГ – ліпоксигеназа

ПААГ – поліакриламідний гель

SDS - додецилсультат натрію

$\bar{x}$ – середнє арифметичне + стандартна похибка вибіркової середньої

CV– коефіцієнт варіації

1.ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зернобобові культури є основним джерелом рослинного білка в харчуванні людей і тварин та одним із біологічних факторів відновлення родючості грунтів, завдяки високій продуктивності симбіотичної фіксації азоту. Особливе місце серед цих культур займає соя. У неї рідкісне для рослин поєднання білковості й олійності з цінними вітамінами, зольними й біологічно активними сполуками, що й робить її стратегічною культурою XXI століття. Передові країни Європи, Азії та Америки, використовуючи нові технології виділення й очищення білків, виготовляють з сої різноманітні продукти харчування: ізольований та текстурований білок, соєвий соус та молоко, лецитин. В Україні також нарощується виробництво соєвих продуктів – молока, бринзи, сиру, пасти, йогуртів, кефіру тощо.

Білки сої за якістю близькі до тваринних, а за амінокислотним складом знаходяться на рівні ідеального білка (за виключенням умісту сірковмісних амінокислот). Проте соя містить і цілий ряд ферментів (уреаза, ліпоксигеназа) і велику кількість інгібітора трипсину, наявність яких негативно позначається на їхній харчовій і кормовій цінності, а також є основною причиною появи небажаних запахів і присмаків, руйнування цінних жирних кислот, пігментів та вітамінів [1,2].

Установлено, що найбільш перспективними білками для виробництва харчових продуктів із зернобобових культур є глобулінові фракції, які мають константу седиментації 7S і 11S, а їхній уміст і співвідношення у сумарному білку визначають його якість, оскільки вони неоднаково збалансовані за амінокислотним складом. Так, показано, що 11S білок сої (гліцинін) відіграє важливу роль в утворенні поперечних зв'язків із двохвалентними катіонами при формуванні сирних згустків, таких як тофу, бринза, а також за імітації сиру. 7S глобулінова фракція (β-конгліцинін) має термопластичні характеристики, які позитивно впливають на виробництво соєвого молока. Гліцинін був класифікований як легуміноподібний білок. 11S глобуліни складаються із окремих субодиниць, кожна із яких включає кислу та основну білкові молекули,

пов'язані між собою дисульфідними зв'яками [3]. Результати їхніх досліджень дають можливість припустити, що у субодиниць гліцинiну існує генетичний поліморфізм. Молекулярна маса кислих субодиниць знаходиться у межах 37-42 кДа, основних – 20 кДа. Різні комбінації ізомерів субодиниць лежать в основі поліморфізму даних білків [4]. β-Конгліцинін (7S глобулін), мабуть, локалізований у білкових тільцях. Частково досліджена структура β-конгліцинiну – основного із трьох відомих 7S глобулінів. Це – глікопротеїд, що складається із ізомерів з молекулярною масою від 140кДа до 175 кДа. Він утворюється із субодиниць трьох основних видів – α, α′ та β. Із десяти теоретично можливих множинних форм встановлено шість (β1- β6). Склад їх наступний: β1 – α′ β2, β2 – α β2, β3 – аа′, β4 – α2β, β5 – α2α′ та β6 – а3 [5]. Виділено дві мінорні субодиниці (γ та δ) та доказана мікрогетерогенність субодиниць, які є сумішшю чотирьох схожих компонентів від β1 до β4. Всі головні субодиниці 7S глобулінів (α, α′ та β) – кислі. Із найважливіших фізико-хімічних властивостей слід відмітити, що α, α′ субодиниці не містять цистеїну, а у β-субодиниці відсутній метіонін. Всі три субодиниці містять по 4-5 % вуглеводів [6]. Показано, що саме ці характеристики і визначають функціональні властивості глобулінів сої (7S та 11S білків), які й визначають якість харчових продуктів. Уміст 7S і 11S глобулінових білків у насінні сої, за літературними та нашими даними, коливається для 7S глобулінів в інтервалі від 18,8 до 28,8 %, для 11S глобулінів – від 30,8 до 39,9 % , при цьому співвідношення 11S/7S білків складає 0,7/1,8 [1, 7]. За літературними даними, саме високе співвідношення 11S/7S мав сорт Tohoku. Одночасно був створено сорт, у якого повністю відсутня 11S фракція. При цьому сумарний уміст білка у нього знаходився на рівні звичайних сортів. Показано, що не з кожного сорту сої можна отримати продукти харчування із заданими технологічними характеристиками. Вивчення глобулінів сої важливо для добору сортів сої лікувально-профілактичного спрямування. Так встановлено, що наявність-відсутність у компонентному складі 7S та 11S глобулінів сої певних субодиниць впливає як позитивно, так і негативно на здоров'я людини [8]. Так, багатьма дослідниками підтверджена участь різних субодиниць глобулінів

сої при лікуванні таких захворювань як рак шлунку, діабет. Вивчення добового впливу ізоляту 7S глобулінів, збагаченого α′-субодиницею, показало значне зниження холестерину та тригліцеридів у плазмі крові [9]. В той же час встановлено, що 3 основних білка 11S глобулінової фракції (28 кДа, α- та β-субодиниці) визивають алергійну реакцію у людини [10]. Як показано нами раніше при вивченні сортоспецифічності компонентного складу 7S і 11S глобулінових фракцій білків сої, вони відрізняються сортовим поліморфізмом, що дозволяє знайти підходи до спрямованого формування та покращення якості білків сої шляхом селекції.

Успіх у вирішенні проблеми білка у рослинництві та тваринництві може бути досягнений не тільки за рахунок зростання виробництва високобілкових джерел, але й шляхом умілого використання білка. Останній із перелічених підходів може бути здійснений різними шляхами: покращенням балансу незамінних амінокислот, інактивацією токсичних та антипоживних білкових сполук; підвищенням перетравності білків. Перетравність білків включає в собі такі властивості білків, як їх здатність розщеплюватися протеолітичними ензимами шлунково-кишкового тракту людини та тварин. Зростання перетравності білків подібно додатковому їх виробництву, що в кінцевому рахунку, може забезпечити скорочення витрат зерна. Головна перевага зернобобових культур над іншими культурами – це наявність у насінні збалансованого за амінокислотним складом білка з високим рівнем його перетравлювання [11].

Насіння зернобобових культур містить значну кількість поліфенольних сполук, зокрема флавоноїдів, які є природними антиоксидантами і мають широкий спектр біологічної активності. Флавоноїди – велика група водорозчинних фенольних похідних червоного, жовтого, іншого кольору і безбарвних. Флавоноїди – глікозиди, основу структури їхніх агліконів складає флаван, що має два ароматичні кільця, які з'єднані C_3 залишком (C_6–C_3–C_6). Звичайно вони знаходяться у вакуолях, але можуть акумулюватися в клітинах епідермісу, можливо, захищаючи асимілюючу паренхіму від ультрафіолетових

променів. Окремі перебувають у хлоро- і хромопластах, забарвлюють квіти й інші тканини рослин. Забарвлення їстівних плодів визначається головним чином антоціанами, які утворюють комплекси з металами (Fe, Al, Mo й ін.) та білками, що впливає на колір [12]. Антоціанідини — це сполуки, які надають забарвлення рослинним тканинам від рожевого до чорно-фіолетового. Особливістю їхньої будови є те, що оксиген у пірановому кільці має вільну валентність. Завдяки вільному позитивному заряду антоціанідини в кислому середовищі показують властивості катехінів, утворюючи солі з кислотами. У лужному середовищі вони виступають у ролі аніонів та утворюють солі з основами. Залежно від pH середовища забарвлення антоціанідинів змінюється: у лужному середовищі вони мають синій колір, інтенсивність якого прямо пропорційна кількості гідроксильних груп у молекулі; у кислому — червоний, що стає інтенсивнішим за збільшення числа метоксильних груп. Найпоширенішими представниками антоціанідинів є пеларгонідин, дельфінідин, ціанідин, мальвідин, петунідин, пеонідин. Антоціанідини зазвичай зустрічаються у природі у вигляді 3-моно-, бі- та тріозидів, 3,5- та 3,7-диглікозидів[12]. Підвищений інтерес до вивчення генотипів з кольоровим насінням пов'язаний з антиоксидантними та антимікробними властивостями певних пігментів та їх безбарвних попередників, які вживаються з рослинною їжею. Флавоноїди залучені у багато важливих процесів, пов'язаних з проростанням, ростом, запиленням та розмноженням рослин. Однією із важливих їх функцій є захист рослин від впливу різноманітних несприятливих чинників середовища. У реалізації стреспротекторного ефекту лежать антиоксидантні властивості цих сполук. Будь який абіотичний стрес викликає гіперпродукцію пероксиду водню в хлоропластах, мітохондріях та пероксисомах рослинної клітини поряд з вивільненням указаними органелами пероксидази та каталази. Значна кількість пероксиду водню дифундує у вакуолі – основне місце локалізації флавоноїдів, які здатні ефективно його знешкоджувати та інші активні форми кисню [14]. Інтерес учених різних спеціальностей, в тому числі селекціонерів, до флавоноїдів викликаний різноманіттям біологічних та фармакологічних ефектів, які ці сполуки проявляють в організмі людей та

тварин. На сьогодні визначений широкий спектр дії цих сполук в організмі людини: капіляроукріплююче, спазмолітичне, антистресове, протизапальне, антигрибкове, антибактеріальне, противірусне, противиразкове, антитоксичне, антиалергічне, антиатеросклеротичне, антиаритмічне, антигіпертензивне, імуномодулююче, антиканцерогенне, нефропротекторне, естрогеноподібне, гепатопротекторне [15]. Установлені властивості флавоноїдів відкривають широкі можливості їх використання в якості лікарських засобів, які не мають серйозних побічних ефектів, на відміну від синтетичних аналогів. Їхню наявність визначають за кількістю поліфенольних сполук та флавоноїдів методом високоефективної рідинної хроматографії. Насіння сої містить два основних ізофлавони – геністеїн та даїдзеїн, причому першого із них у соєпродуктах більше [16].

Поживні властивості насіння бобових культур пов'язані з наявністю у ньому таких речовин, як інгібітори трипсину, лектини, ліпоксигеназа, які негативно впливають на його харчову та кормову цінність. Так, у результаті блокування інгібіторами трипсину активних центрів шлунково-кишкових ферментів погіршується перетравність білків харчових продуктів, що посилює дефіцит незамінних амінокислот і викликає гіпертрофію підшлункової залози. У насінні сої існує 2 інгібітори протеолітичних ферментів: інгібітор Кунітца (ІК), який інгібує тільки трипсин, і інгібітор Баумана-Бірка (ІББ), який інактивує трипсин, хімотрипсин, еластазу, катепсини і мікробні протеази. На відміну від інгібітора ІК, інгібітор ІББ термостабільний і залишається в соєвих продуктах (шрот, жмих) після їх знежирення [17]. Виявлено, що термічна обробка знижує активність інгібіторів протеаз в насінні до 86%, однак вона також впливає на харчову цінність, визиваючи зменшення умісту лізину, метіоніну та цистеїну [18]. Лектини – це білки зі специфічними біологічними властивостями, які здатн і зворотньо та вибірково зв'язувати вуглеводи, не визиваючи їх хімічного перетворення. Ці білки можуть викликати проблеми із травленням та сприяти запальним захворюванням, включаючи ревматоїдний артрит та діабет 1 типу, оскільки вони прикріплюються до клітин протягом

тривалого періоду часу та здатні викликати аутоімунну реакцію [19]. Ліпоксигеназа (КФ 1.13.11.12) – це залізовмісна диоксигеназа, яка каталізує гідропероксидацію лінолевої кислоти та інших поліненасичених жирних кисло т та їх складних ефірів, а також гліцеридів, що містять цис,цис-1,4-пентадієнові структури. Продукти, що утворюються під час ферментативної реакції, суттєво впливають на якість продуктів харчування. Похідні гідропероксидів і продукти їх розпаду можуть вступати в реакцію з білками, пептидами та амінокислотами, що може призвести до появи неприємних смакових властивостей і зниження харчової цінності продуктів. Дія ліпоксигенази генерує також вільні радикали, які можуть реагувати з хлорофілами, каротиноїдами, аскорбіновою кислотою, фенолами, а також α-токоферолом, руйнуючи їх [20].

У лабораторії біохімії рослин СГІ-НЦНС був проведений порівняльний аналіз кількісного та якісного складу білків сої. Методом електрофорезу в ПААГ вивчений компонентний склад білків, визначена наявність міжсортового поліморфізму глобулінів, особливості вмісту, співвідношення та компонентного складу 7S і 11S глобулінів у генотипів різного філогенетичного походження, гібридів F2-F8 сої та їх батьківських форм [21]. На основі проведених досліджень розроблено 2 способи виділення та ідентифікації глобулінів сої, на які отримано патенти на корисну модель [22, 23]. Крім того, харчові та кормові властивості насіння сої пов'язані з такими біохімічними показниками, як уміст та компонентний склад флавоноїдів, олії, вуглеводів та ін., з кількістю антипоживних речовин (інгібіторів трипсину, активністю ліпоксигенази, уреази), перетравністю білків насіння, методи визначення яких теж були відпрацьовані та апробовані співробітниками лабораторії [24-26]. Проведення таких комплексних досліджень насіння сої за біохімічними показниками дасть можливість селекціонеру доцільно та безпомилково підбирати вихідний матеріал з необхідним біохімічним складом насіння, прово дити добір сортів продовольчого, кормового та лікувально-профілактичного напрямів із заданими технологічними характеристиками, насіння яких можна використовувати в якості сировини для виготовлення продуктів харчування, кормів та БАД.

У наших рекомендаціях викладені процедури визначення біохімічних показників, що беруть участь у формуванні якості насіння сої та визначають їх харчову, кормову та лікувально-профілактичну цінність.

2. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ БІЛКА МЕТОДОМ К'ЄЛЬДАЛЯ

Сутність методу полягає в мінералізації органічної речовини концентрованою сірчаною кислотою у присутності каталізатора з утворенням сульфату амонію, руйнуванні сульфату амонію гідроксидом натрію з виділенням аміаку, відгонки аміаку водяною парою в розчин борної кислоти з наступним титруванням соляною кислотою.

Хід визначення

Наважку рівноміно здрібненого матеріалу помістити в пробірку. Аналіз проводимо, як завжди, у двох-трьох повторностях. Величина наважки – 0,1 г. До наважки в пробірку додати одну таблетку каталізатора, яка містить 1,5 г K_2SO_4 та 0,0075 г Se (Kjeltabs Auto Tecator). Потім до вмісту пробірки прилити 3 мл концентрованої сірчаної кислоти. Штатив з пробірками помітити в попередньо прогрітий блок для спалення (температура – 410˚С, термін – 1 година). Необхідно звернути увагу, що для повної мінералізації органічних речовин після просвітлення розчину в пробірках їх потрібно витримати в блоці ще 20-30 хвилин. По закінченню спалення пробірки охолодити та приступити до відгонки аміаку на приладі "Kjeltec Auto 1030" (за інструкцією до нього).

Обрахунок результатів

1. Визначити полярність соляної кислоти

M=21,20 x m/1,401 x ml, де:

21,20 - % азоту в сульфаті амонію;

m – наважка для аналізу;

ml – кількість 0,1 М HCl для титрування.

2. Вирахувати калібрувальний коефіцієнт за формулою:

B(N x 6,25)= 14,01 x M x 6,25

Значення, отримані на приладі, відповідають процентному вмісту сирого протеїну в дослідному матеріалі.

Розрахунок зробити за формулою:

% білка=14,01 x M x 6,25 x ml x 100/n, де

ml – показники приладу;

n – наважка.

Результати визначення загального азоту треба доповнити обов'язковим визначенням відсотку вологи в дослідному матеріалі для вираження даних у % на абсолютну суху речовину.

3. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ЖИРУ В НАСІННІ

Визначення жиру в насінні проводять екстракційним методом з використанням паро-рідинного екстрактору. У цьому апараті екстракція проводиться пароподібною та рідинною фазами розчинника за температури кипіння, що значно прискорює процес виділення жиру [27].

Устаткування та реактиви

1. Паро-рідинний екстрактор
2. Сушильна шафа
3. Аналітичні ваги
4. Фільтрувальний папір
5. Хлороформ, х.ч.

Хід визначення жиру.

Насіння сої в кількості 5-6 г насипають в металеві пронумеровані бюкси та, не закриваючи кришками, поміщають в сушильну шафу. Витримують 6-7 годин за температури 105°С (± 2°С). Після висушування бюкси накривають кришками та поміщають в ексикатор під свіжопрокаленим $CaCl_2$. Після того як насіння досягне кімнатної температури (через 0,5-1 годину), його розмелюють у млині (на протязі 1 хвилини) та швидко заповнюють паперовий пакет, який має розміри 5 х 5см та середню масу 0,5-0,6 г. Звичайно в один пакет поміщають 0,8-1,3 г подрібненого насіння. На аналітичних вагах

визначають точну масу пакету з насінням ($м_1$). Після зважування пакети поміщають в екстракційну камеру екстрактора та після її заповнення завантажують в апарат, заливають 5-6 л хлороформу, закривають внутрішнім холодильником, що приєднаний до водопровідної мережі, та включають в електричну мережу через автоматичне реле, яке відключає екстрактор за зниження тиску води у водопровідній мережі. Екстрагування проводять на протязі не менше 12 годин.

Після відключення екстрактора залишають його на 1-1,5 годин для охолодження. При цьому подачу води в нього не припиняють. Виймають холодильник, камеру зі зразками піднімають наверх та, не виймаючи повністю із екстрактора, дають можливість позбутися хлороформу. Після цього пакети розміщують у витяжній шафі для випаровування основної маси хлороформу, а потім висушують у витяжній шафі 6 годин за 105°С. Після висушування їх поміщають в екстрактор над $CaCl_2$ та зважують на аналітичних вагах ($м_2$).

Вміст жиру розраховують за наступною формулою:

$Ж= [(м_1 – р_1) – (м_2 - р_2)] \times 100/ м_1 – р_1$, де

Ж - % жиру;

$м_1$ – вага зразка з пакетом до екстракції, в г;

$м_2$ - вага зразка з пакетом після екстракції, в г;

$р_1$ – вага 1 пакету до сушки, в г;

$р_2$ - вага 1 пакету після сушки, в г;

Звичайно розраховують шляхом множення ваги 1 пакета до сушки на коефіцієнт 0,95, який визначають дослідним шляхом.

4. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ВУГЛЕВОДІВ [28]

Сутність методу полягає в гідролізі розчинних вуглеводів 0,5 н розчином сірчаної кислоти, дегідратації гідролізату, фарбуванні розчинів антроновим реактивом та фотометричному визначенні оптичної щільності розчинів.

Устаткування та реактиви

1. Спектрофотометр
2. Аналітичні ваги
3. Центрифуга
4. Водяна баня
5. Антроновий реактив: 160 мг антрона розчиняють в 100 мл сірчаної кислоти, яку готують із 100 мл дистильованої води та 600 мл концентрованої сірчаної кислоти
6. Стандартний розчин глюкози: 10 мг безводної глюкози розчиняють в 200 мл дистильованої води (для консервації додають 0,2 мл хлороформу)
7. 0,2% розчин Na_2SO_4
8. 0,5 н розчин H_2SO_4
9. Спирт-ректифікат

Хід визначення

У пробірку беруть наважку 20 мг борошна, додають 2 мл 0,5 н сірчаної кислоти. Нагрівають на киплячій водяній бані 30 хвилин. Уміст пробірки перенести в колбу на 50 мл. Розчин довести до мітки водою. 5 мл фільтрату перенести в колбу на 50 мл, довести об'єм до мітки. 0,5 мл дослідного розчину залити 2,5 мл антронового реактиву, нагріти на киплячій водяній бані, а потім охолодити. Через 30 хвилин вимірюють екстинцію на спектрофотометрі за 630 нм по відношенню до контролю (0,5 мл води + 2,5 м антронового реактиву). Вимірювати екстинцію стандартного розчину глюкози (0,5 мл розчину глюкози + 2,5 мл антронового реактиву).

Уміст вуглеводів обчислюють за формулою:

X= 50 x 0,91 x Ex x 50 x50 x100/Est x н x 5 x1000, де

50 – концентрація глюкози в стандартному розчині 50 мкг/мл;

100 – перераху нок на %;

Est – екстинція стандартного розчину;

H – наважка в мг;

0,91 – поправка на вологу;

100 – перерахунок мкг в мг.

5. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ФЛАВОНОЇДІВ [29]

Метод засновується на реакції комплексоутворення флавоноїдів з хлоридом алюмінію.

Устаткування та реактиви

1. Спектрофотометр
2. Аналітичні ваги
3. 70%-й етанол
4. 2%-й розчин хлориду алюмінію у 95%-му етиловому спирті: 2 г хлориду алюмінію розчинити у 50 мл 95% етилового спирту у мірній колбі ємністю 100 мл, об'єм розчину довести тим же розчинником до позначки та перемішати
5. Розчин рутину. 0,005 г рутину, попередньо висушеного за температури 130-135^{O}C протягом 3 год, розчинити у 85 мл 85% етилового спирту у мірній колбі ємністю 100 мл за нагрівання на водяній бані, охолодити, кількісно перенести у мірну колбу ємністю 100 мл, довести об`єм розчину спиртом до позначки.

Хід аналізу

Флавоноїди екстрагувати 70 % етанолом за співвідношення наважки та екстрагенту 1:10. Екстракцію проводити на протязі 60 хвилин на водяній бані за 80ºС. У мірну колбу ємністю 25 мл перенести 1 мл екстракту, 1 мл розчину хлориду алюмінію у 95% спирті етиловому і довести об'єм розчину 95% спиртом етиловим до позначки. Через 40 хв виміряти оптичну густину розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 420 нм. Для порівняння використати розчин, який складається з 1 мл екстракту, 1 краплі оцтової кислоти розведеної і доведений 95% етиловим спиртом до позначки у мірній колбі ємністю 25 мл. Паралельно виміряти абсорбцію розчину зразка рутину, який готують аналогічно розчину, що досліджується.

Уміст суми флавоноїдів у перерахунку на рутин і абсолютно суху речовину у відсотках (Х) обчислювати за формулою:

X=A x mo x 100 x 100 x 100/ Ao x m x 100 (100-W)

де A – абсорбція розчину, що досліджувався, нм

A_0 – абсорбція розчинурутину, нм

m – маса сировини, г

m_0 – маса рутину, г

W – втрата у масі при висушуванні сировини, %.

6. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ІНГІБІТОРУ ТРИПСИНУ [30]

Казеїновий метод визначення інгібітора трипсину заснований на гальмуванні гідролізу казеїну кристалічним трипсином.

Устаткування та реактиви

1.Ультратермостат

2. Центрифуга

3. Фотоелектроколориметр, спектрофотометр

4. Субстрат – 2%-ний розчин казеїну на 0,1М фосфатному буфері рН 7,6

5.Розчин трипсину з концентрацією 0,2мг/мл

6. 10%-ний розчин трихлороцтової кислоти (ТХО).

7. Реактив А (0,1 н розчин NaOH в 2%-ному розчині вуглекислого натрію)

8. Реактив Фоліна [23]. Для визначення використовують реактив, розведений водою в 2 рази.

Хід визначення

До 50 мг борошна сої додати 1 мл 0,1 н HCl та перемішувати на протязі 40 хвилин, відцентрифугувати за 10000g. Надосадову рідину використовують для визначення активності інгібітору трипсину.

У пробірці змішати рівні об’єми (0,3-0,5 мл) розчину трипсину і досліджуваного зразка. Витримати 10 хвилин за кімнатної температури, відібрати 0,2 мл суміші, перенести її центрифужну пробірку. В цю пробірку додати 0,4 мл розчину казеїну, перемішати 5 сек та помістити у водяний

ультратермостат за 30˚С точно на 30 хвилин. Зупинити реакцію, додаючи 0,6 мл 10% ТХУ, акуратно перемішати та відцентрифугувати за 3000 g впродовж 15 хвилин. Відібрати 0,2 мл надосадової рідини, додати 2 мл реактиву А та 0,2 мл реактиву Фоліна, розведеного водою в 2 рази. Через 30 хвилин виміряти екстинкцію на фотоелектроколориметрі, спектрофотометрі за довжини хвилі 750 нм по відношенню до контролю на реактиви (0,2 мл 5%ТХО + 2 мл реактиву А + 0,2 мл реактиву Фоліна в розведенні 1:2).

Одночасно поставити пробу для визначення активності трипсину. Для цього в пробірці змішати рівні об’єми трипсину та того розчинника, на якому готували розчин трипсину. Витримати 10 хвилин за кімнатної температури, відібрати 0,2 мл суміші і далі поступити так, як описано вище для суміші трипсину з інгібітором.

Крім того, поставити 2 контролі за нульовим часом. У контролі $К_1$ до 0,2 мл суміші трипсину з інгібітором додати 0,6 мл 10% ТХО, потім 0,4 мл розчину казеїну. Відцентрифугувати, відібрати 0,2 мл надосадової рідини та провести реакцію з реактивом Фоліна. У контролі К2 до 0,2 мл трипсину з розчинником для інгібітору додати 0,6 мл 10% ТХО, потім 0,4 мл розчину казеїну та далі обробити як $К_1$.

Уміст інгібітору трипсину розраховують за наступною формулою:

$IT= 200 \times (E_т – E_{оп} – Ек_2 + Ек_1) \times n / Ет - Ек_2$, де

ІТ – уміст інгібітору трипсину в одиницях на 1 мл, одна одиниця інгібітору відповідає 1 мкг кристалічного трипсину

200 – концентрація трипсину в мкг/мл

Ет – екстинкція проби з трипсином

$E_{оп}$ – екстинкція проби зі сумішшю трипсин+інгібітор

$Ек_1$ – екстинкція контролю у нульовий час зі сумішшю трипсин+інгібітор

$Ек_2$ – екстинкція контролю у нульовий час зі сумішшю трипсин+розчинник

n – розведення розчину інгібітору.

7. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛІПОКСИГЕНАЗИ [31]

Активність ліпоксигенази визначається спектрофотометричним методом у реакції зв'язаного окиснення β-каротину за присутності лінолевої кислоти за довжини хвилі 440 нм.

Устаткування та реактиви

1. Спектрофотометр
2. Центрифуга
3. Аналітичні ваги
4. Субстрат – суміш жирних кислот, виділених із ядер волоських горіхів (уміст лінолевої кислоти у суміші повинен бути не менше 60,0% від суми жирних кислот) або розчин лінолевої кислоти (94,2 мг лінолевої кислоти розчинити в 12 мл 1М NaOH і довести дистильованою водою до 100 мл)
5. Розчин β-каротину: 40 мг β-каротину розчинити в 150 мл суміші етанол:ацетон (1:1)
6. Реактив А (0,1 н розчин NaOH у 2%-ному розчині вуглекислого натрію)
7. Реактив В (500 мг $CuSO_4$ + 1 г лимоннокислого натрію та довести до 100 мл водою
8. Реактив Фоліна [22]. Для визначення використовують реактив, розведений водою в 2 рази.
9. 1 М NaOH
10. 0,2 М фосфатний буфер, pH 6,0.

Хід визначення

До 250 мг борошна сої додати 25 мл 0,0 5 М фосфатного буфера з pH 6,0 та перемішувати на протязі 1 хвилини, відцентругувати за 10000 g. Надосадову рідину використати для визначення активності ліпоксигенази (екстракт).

У дослідній пробі змішати 4 мл фосфатного буфера, pH 6,0; 0,2 мл розчину β-каротину, 0,2 мл. субстрату та додати 0,5 мл екстракту. Через 1 хвилину реакцію зупинити додаванням до реакційної суміші 1 мл 1MNaOH. У

отриманій реакційній суміші виміряти оптичну щільність на спектрофотометрі за довжини хвилі 440нм.

У контрольній пробі змішати 4 мл фосфатного буфера, pH 6,0; 1мл 1MNaOH, 0,2 мл розчину β-каротину, 0,2 мл субстрату, 0,5 мл екстракту та одразу виміряти оптичну щільність суміші за довжини хвилі 440 нм.

В якості контролю на реактиви використати розчин, що містить 4,5 мл фосфатного буфера, pH 6,0; 0,2 мл розчину β-каротину, 0,2 мл субстрату.

Активність ліпоксигенази виражати в одиницях вимірювання оптичної щільності за 440 нм на 1 мг білка в хвилину (ΔE/мг = $E_{оп}$ – $Ек_2$/мг білка).

8. ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ЛЕКТИНІВ У НАСІННІ СОЇ

Устаткування та реактиви

1. Центрифуга
2. Холодильник лабораторний
3. Водяна баня +37 ˚С
4. Термостат
5. Пластикові планшетки з U-образними лунками
6. 0,2 М HCl
7. Трипсин кристалічний

Лектини із знежиреного борошна насіння сої екстрагувати дистильованою водою, яка підкислена 0,2 М HCl до pH 4,4-5,5, у співідношенні 1:8(1 г наважки борошна + 8 мл H_2O) протягом 4 годин за 37˚С, а потім 20 годин за 4 ˚С. Екстракт відцентригувати за 10000g впродовж 15 хвилин. Осад відкинути, а надосадову рідину використати для визначення активності лектинів за гемаглютинацією еритроцитів у крові білих щурів [32].

Отримання суспензії еритроцитів

Кров одного щура внести до 200 мл 0,2 М NaCl, струшувати і центрифугувати 10 хвилин за 1000 об/хв, НОР злити, процедуру повторювати тричі, до повного осадження еритроцитів. Потім відмиті еритроцити обробити трипсином в концентрації 1,5 мг/мл протягом 1 години за 37°С у термостаті. По

закінченні часу еритроцити тричі промити 0,2 М NaCl з подальшим центрифугуванням за 1000 об/хв протягом 10 хвилин.

Визначення активності лектинів

Реакцію гемаглютинації здійснювати за кімнатної температури, використовуючи 4% суспензію еритроцитів (0,4 мл еритроцитів, що осіли, довести до 10 мл 0,2 М NaCl). Перед мікротитруванням досліджуваний розчин заздалегідь розвести у 2,4,8,16,32 і т.д. рази залежно від очікуваної лектинової активності в досліджуваному зразку.

Мікротитрування проводять таким чином: у лунки планшеток вносять по 20 мкл кожного розведення досліджуваного зразка, потім додають 20 мкл 4% суспензії еритроцитів. Результати гемаглютинації реєструють через 2 години після початку мікротитрування. Лектинову активність розраховують за формулою, як величину, зворотну мінімальній концентрації білка, за якої відбувається аглютинація еритроцитів. У початковому екстракті досліджуваного зразка визначити білок методом Лоурі:

$$АЛ=1/X\ (мг/мл)^{-1},\ де$$

$X= \Delta E_{білка} \cdot n \cdot 1000/m$

n – розведення досліджуваного зразка

m – розведення екстракту за мікротитрування

В екстракті провести вимірювання вмісту білка по Лоурі.

9. ВИЗНАЧЕННЯ БІЛКА МЕТОДОМ ЛОУРІ [33]

Реактиви

1. Реактив А: 2% (маса:об'єм) розчин Na_2CO_3 в 0,1М NaOH
2. Реактив Б: 0,5% $CuSO_4$ у 1% розчині лимоннокислого натрію ($(CH_2OOH)_2C(OH)COONa$)
3. Реактив В: 1 мл реактиву Б довести реактивом А до 50 мл (готують в день визначення)
4. Реактив Фоліна: 100г вольфрамокислого натрію ($NaWO_4 \cdot 2H_2O$) та 25 г молібденокислого натрію ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) розчиняють в 700 мл дистильованої

води, потім додають 50 мл 85% ортофосфорної кислоти (H_3PO_4) та 100 мл концентрованої соляної кислоти (HCl). Нагрівають в колбі ємністю 1,5 л із зворотним холодильником протягом 10 годин. Охолоджують, додають 150 г сульфату літію, 50 мл води і поступово, краплями, додають бром. Залишок брому відігнати нагріванням колби без холодильника. Після охолоджування об'єм довести до 1л і фільтрувати. Розчин має бути золотисто-жовтого кольору без зеленого відтінку. Для визначення білка використовують реактив, розведений водою в 2 рази. Калібрувальну криву для реактиву Фоліна будували за методом Крилової.

Хід визначення

У пробірки піпеткою вносять 0,2 мл досліджуваного розчину білка, доливають 2 мл реактиву В, перемішують і через 10 хвилин додають 0,2 мл реактиву Фоліна. Витримують 30 хвилин та вимірюють оптичну щільність при 750 нм на спектрофотометрі проти проби холостого досліду (0,2 мл екстракту, 2 мл реактиву В, 0,2 мл реактиву Фоліна). Білок розраховують по формулі:

$$C=\Delta E \cdot n \cdot m/K,\ (мг/г)$$

ΔЕ – екстинція

n – екстракт

m– разведення

k – коефіцієнт перерахунку за реактивом Фоліна.

10. ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ 7S ТА 11S ГЛОБУЛІНІВ [23]

Устаткування

1. Аналітичні ваги
2) pH-метр
3) Центрифуга з охолодженням
4. Термостат
5. Ліофілізатор
6. Холодильна камера
7. Прилад для визначення вмісту білка/азоту

8. Прилад для проведення електрофорезу білків.

Реактиви

1. 5% K_2SO_4 при pH 7,8
2. Реактиви для визначення білка методом К'єльдаля
3. Реактиви для проведення електрофорезу білків в ПААГ з SDS за методом Лєммлі [34]

Глобуліни сої екстрагувати із вихідного незнежиреного борошна 0,2 М трис-HCl буфером, який містить 0,1 М β-меркаптоетанолу, що необхідно для повного виділення, враховуючи четвертинну структуру білків, які виділяються. Співвідношення наважка: екстрагент повинно дорівнювати 1:10. Тривалість екстракції 1 година за кімнатної температури (20°С). Потім отриманий екстракт відцентрифугувати 10 хвилин за 10 тис. g. Надосадову рідину (НОР I) охолодити до температури +4°С, довести pH середовища до 6,5 та залишити на 20 годин у холодильній камері за температури +4° С. Через 20 годин НОР II відокремити центрифугуванням на протязі 10 хвилин при 10 тис. об/хв. за 4°С, а осад, який містить 11S глобуліни, висушити. У НОР II довести pH до 5,5, відцентрифугувати та відокремити 2S глобуліни, які за даного pH випадають в осад, а із НОР III після доведення pH супернатанту до 4,8 та центрифугування на протязі 10 хв. за 10 тис. g у осаді осаджуються 7S глобуліни, які потім ліофільно висушити. У виділених білків визначають їх вихід, уміст білка методом К'єльдаля та компонентний склад методом електрофорезу в 15% ПААГ або методом Лемлі, що містить 1% SDS [34].

11. ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ПЕРЕТРАВЛЮВАННЯ БІЛКА [35]

В основі методу лежить процес, моделюючий природне перетравлювання білків у шлунково-кишковому тракті людей або тварин. При відтворенні його в пробірці (*in vitro*) використовують чисті препарати протеолітичних ензимів, виділених із травних залоз тварин. Про цей процес судять за спадом кількості вихідного білка.

Устаткування

1. pH-метр
2. Ваги аналітичні
3. Ультрацентрифуга
4. Плита для спалювання зразків в пробірках
5. Прилад для визначення білка (Kjeltec Auto або ін.).

Реактиви

1. 0,1%-ний розчин панкреатину в 0,05 М фосфатному буфері pH 7,0
2. Фосфатний буфер 0,05 М pH 7,0.

Хід визначення

Наважки 100 мг рівномірно розмеленого матеріалу, зваженого на аналітичних вагах, внести в пакетики із фільтрувального паперу. Їх помістити в стакан або колбу з розчином 0,1% панкреатину в 0,05 М фосфатному буфері та інкубувати в термостаті за температури 37˚С протягом 20 годин. Для консервації додати толуол. Розчин панкреатину взяти із розрахунку 10 мл на один пакет. Через 20 годин пакети промити дистильованою водою, підсушити, помістити в пробірки та за допомогою дозатора додати каталізатор в кількості 140 мг та 2 мл сірчаної кислоти. Пробірки помістити в блок для спалювання зразків на 2-2,5 години. Для повної мінералізації органічних речовин після просвітлення розчину пробірки необхідно витримати у блоках ще 20-30 хвилин. Після охолодження зразки розвести в 100 раз дистильованою водою, що не містить NH_3. Контролем є наважка 50 мг досліджуваного борошна, яке не інкубували в ферментному розчині. Аналіз кожного зразка провести в 2-3 кратній повторностях. Нерозщеплений та нерозчинний білок визначити на приладі для визначення білка/азоту методом К'єльдаля.

Розрахунок:

Ефективність перетравлювання білків в % розраховують за наступною формулою:

$П= 2N_1- N_2/2N_1 \times 100$, де

П – перетравлювання білків, %

N_1 – вміст азоту у контрольному зразку (пакет без інкубації в ферментному розчині)

N_2 – вміст азоту у дослідному зразку (пакет після інкубації в ферментному розчині)

ОПРАЦЮВАННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

За допомогою запропонованих методів була проведена оцінка генотипів сої, нуту, гороху на біохімічну якість насіння. Дослідження біохімічних показників, пов'язаних з якістю насіння (вмісту білка, жиру, флавоноїдів, активності ліпоксигенази, інгібітору трипсину, лектинів, жирнокислотного складу ліпідів), умісту основних фракцій білкового комплексу в насінні сортів і константних селекційних ліній сої показало наявність достовірних відмінностей за вивченими показниками у досліджених генотипів бобових культур (Табл. 1-9). За допомогою електрофоретичного та денситометричного аналізів виявлені генетичні відмінності за інтенсивністю смуг, наявністю-відсутністю деяких компонентів у електрофоретичних спектрах 7S та 11 S глобулінів, які впливають на харчову цінність насіння сої (рис. 1-4). Наявність значної варіабельності за біохімічними показниками, які визначають харчову цінність насіння зернобобових культур, дає підставу вважати, що наведені результати можуть зацікавити селекціонерів, які створюють сорти сої продовольчого напряму. За використання досліджених біохімічних критеріїв оцінки можна вже на ранніх етапах селекції проводити добір генотипів сої продовольчого, кормового та лікувально-профілактичного напрямів.

Для аналізу, в залежності від методу, потрібно 50 мг-10 г дослідного матеріалу для 4-кратної повторності досліджуваного зразка. Перевагою розроблених методів є експресність, висока відтворюваність, що дозволяє проводити оцінку селекційного матеріалу в короткі строки та на ранніх етапах селекційного процесу.

Таблиця 1. Варіабельність хімічного складу насіння сортів сої колекційного розсадника, за роками

Сорт	Білок, %	Жир, %	ЛОГ, ум.од./ мг.білка/хв	ІТ, г/кг	Білок, %	Жир, %	ЛОГ, ум.од./ мг.білка/хв	ІТ, г/кг	Білок, %	Жир, %	ЛОГ, ум.од./ мг.білка/хв	ІТ, г/кг
	2012				2013				2014			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Аркадія од.	38,9	20,0	0,347	34,0	41,6	19,3	0,420	41,6	41,9	20,6	0,460	48,7
Медея	40,4	20,3	0,174	36,5	37,7	21,0	0,637	27,1	43,1	18,7	0,705	40,9
Устя	39,5	22,3	0,180	41,4	39,4	22,2	0,394	39,2	41,9	20,6	0,728	48,7
Аметист	37,7	21,1	0,345	30,8	40,1	20,4	0,228	32,4	42,4	19,1	0,933	35,0
Юг-30	41,5	18,8	0,309	35,2	37,7	21,0	0,639	27,1	42,4	20,5	0,643	37,8
Київська 98	41,9	20,4	0,170	43,4	41,0	20,2	0,316	47,4	44,7	18,7	0,818	53,7
Альтаїр	40,3	19,9	0,410	35,5	41,8	19,7	0,446	42,0	42,7	20,8	0,823	31,9
Валюта	38,8	20,8	0,377	32,2	40,5	20,8	0,672	38,5	42,7	20,7	0,329	34,5
Одеська 150	43,3	19,8	0,290	36,6	43,5	19,1	0,969	38,1	41,2	18,8	0,948	29,4
Ятрань	41,3	20,2	0,456	28,7	41,0	19,5	0,850	31,7	39,6	21,3	0,831	31,9
Берегиня	40,4	19,6	0,448	30,5	41,4	19,6	0,654	33,8	41,1	21,0	0,779	42,1
Знахідка	41,8	20,0	0,440	29,7	41,2	19,7	0,677	34,7	40,6	22,3	0,608	32,6
Олена	41,5	18,8	0,309	35,2	38,6	19,9	0,701	38,0	-	-	-	-
Л-2(Орел)	41,9	20,5	0,180	32,3	39,0	20.1	0,494	35,9	41,7	19,6	0,822	36,8
Орія	41,4	20,5	0,279	30,1	40,1	19,5	0,947	38,7	-	-	-	-
Фенікс	42,2	20,2	0,494	31,6	42,5	19,8	0,574	40,6	41,2	20,0	0,670	38,8
Подільська 416	42,8	20,2	0,328	31,4	40,5	20,5	0,842	38,8	42,9	19,2	0,650	41,8
Оксана	43,8	19,3	0,211	37,5	42,5	18,7	0,628	38,8	-	-	-	-
Мельпомена	43,5	19,9	0,282	33,2	42,2	20,3	0,731	38,4	39,7	21,8	0,630	35,5
Ельдорадо	41,3	19,7	0,229	27,3	42,6	19,0	0,371	38,5	39,7	21,8	0,726	35,5
Симфонія	41,7	20,2	0,386	32,4	41,9	20,7	0,327	35,5	42,4	19,8	0,898	33,0
Ювілейна	40,2	20,0	0,439	30,0	41,7	19,0	0,654	33,8	41,4	21,2	0,841	30,2
Антонівка	43,7	19,8	0,343	32,3	43,4	20,6	0,899	40,6	-	-	-	-
Руса	43,0	20,4	0,338	37,0	40,6	20,1	0,520	43,1	42,0	19,7	1,000	36,4
Ізумрудна	40,2	21,3	0,247	35,4	41,2	20,2	0,794	36,2	42,2	19,2	0,740	36,1

Продовження таблиці 1

Сяйво	40,4	20,6	0,277	35,7	40,1	20,4	0,919	39,8	39,4	20,0	0,741	34,5
Горлиця	40,4	21,9	0,328	38,3	40,6	21,6	0,532	30,8	43,0	19,8	0,680	41,7
Стратегія	41,6	20,7	0,180	34,7	38,6	20,7	0,629	42,7	41,0	20,3	0,711	32,5
Донька	39,4	21,6	0,372	28,6	41,0	20,2	0,565	39,5	40,8	18,1	1,07	29,4
Золотиста	40,1	22,8	0,310	33,0	36,1	23,0	0,535	29,4	44,0	20,4	0,694	39,2
Ворскла	39,1	23,2	0,380	30,6	36,6	24,1	0,497	35,4	42,1	19,6	0,658	39,1
Данко	39,8	20,6	0,324	42,6	38,6	20,7	0,629	42,7	42,7	20,5	0,968	32,0
Корсак	38,4	21,8	0,409	29,7	39,0	22,0	0,757	35,0	41,0	22,3	0,690	32,7
Романтика	41,6	20,7	0,180	34,7	38,1	20,9	0,363	42,7	44,2	18,4	0,711	39,1
Агат	37,0	21,4	0,301	39,4	38,8	21,7	0,435	40,4	41,7	20,6	0,832	47,7
Прима	39,9	20,8	0,324	42,6	40,6	20,4	0,605	38,7	42,4	20,5	0,811	32,1
min	37,0	18,8	0,170	27,3	36,1	18,7	0,228	27,1	39,4	18,1	0,329	29,4
max	43,8	23,2	0,494	43,4	43,5	24,1	0,969	47,4	44,7	22,3	1,070	53,7
Середнє	40,8	20,5	0,317	34,0	40,3	20,5	0,606	37,4	41,8	20,2	0,755	37,2
s_x	0,26	0,16	0,014	0,66	0,30	0,19	0,031	0,76	0,23	0,19	0,026	1,06

Примітка: ЛОГ – ліпоксигеназа, ІТ – інгібітор трипсину

Таблиця 2. Характеристика сортів сої за вмістом та співвідношенням 11S та 7S глобулінів

Сорт	% глобулінової фракції	% від суми глобулінової фракції			Співвідношення 11S/7S глобулінів
		11S	7S	Сума 2S + 15S	
Альтаїр	69,8	31	36	33	0,86
Аркадія одеська	67,1	26	36,2	37,8	0,72
Хаджибей	69,6	34,7	34,2	31,1	1,1
Донька	69,4	33,1	36,5	30,5	0,91
Одеська 150	67,7	37,9	32,6	29,4	1,03
Успіх	68,9	28,9	35,9	35,2	0,80
Берегиня	67,9	33,0	34,0	32,7	0,97
Vinton 81	69,6	35,0	36,5	28,6	0,96
Orient Pearl Brand	76,6	34,8	35,9	29,3	0,98
Ювілейна	66,8	33,3	36,2	30,4	0,92
Знахідка	69,2	28,7	37,1	36,2	0,77
Валюта	68,7	35,3	35,3	29,4	1,00
Ізумрудна	67,9	37,0	32,5	30,5	1,13
Медея	73,6	35,4	34,2	37,7	1,03
Пальміра	63,3	24,9	37,9	37,2	0,66
ML-04	67,0	34,4	32,0	33,6	1,08

Таблиця 3.Загальний уміст флавоноїдів у насінні сої, мкг/г

Сорт	Вміст флавоноідів
Устя	45,0 ±0,7
Л-2 (Орел)	35,5 ± 1,2
Аметист	67,0 ± 0,9
Київська 98	43,0 ± 1,3
Васильківська	54,0 ± 0,7
Медея	61,0 ±1,1
Юг-30	52,0 ± 0,8
Селекта	45,4± 0,7
Романтика	104,0 ± 2,1
Ворскла	55,0 ±0,9
Золотиста	52,7 ± 1,4
Вільшанка	62,3 ± 0,5
Ізумрудна	57,7 ± 0,8
Діана	69,2 ± 0,6
Стратегія	103,3 ± 2,1
Фарватер	150,4 ± 1,4
Спрінт	67,2 ±0,3
Агат	54,2±0,8
Аріадна	52,4±1,2
Прима	62,5 ±0,7
Данко	58,0±0,5
Сяйво	56,1± 3,2
Астер	63,1± 1,3
Валюта	67,8± 1,4
Антарес	45,2± 0,8
Альтаїр	62,1± 0,5
Ювілейна	73,7± 1,4
Берегиня	84,8± 0,9
Протеїнка	66,1±0,3
Феміда	50,9±0,6
Фенікс	50,0±0,5
Знахідка	55,9±0,7
33-Л-1-13 (Черн.)	54,4± 0,8
34-Л-2-13 (Черн.)	49,2±0,3
35-Л-3-13 (Черн.)	60,80,6
Л-4-13 (Черн.)	48,3±0,4
Л-6-13 (Черн.)	45,6±0,7
Чернівецька 9	38,2±0,3
Білявка	38,3±0,4
Олив	39,2±0,6
Мельпомена	62,6±0,9
Донька	102,6± 2,1
Ятрань	121,9± 1,1
Здобуток	130,8± 3,1
Руса	106,1± 0,8

Артеміда	128,5± 1,4
Оріана	209,6± 3,2
Золотиста	98,3± 0,8
Кивін	84,6± 0,7
Хуторянка	154,6± 2,2
Княжна	86,4± 1,2
Омега Вінницька	92,6± 0,6
Монада	133,9± 2,4
Вежа	113,4± 1,2
Винні	233,9± 2,2
Смолянка	399,6± 3,5
Анатоліївка	106,2± 1,3
Оксана	229,3± 2,2
Тріада	148,7± 0,8
Діадема Поділля	141,6± 1,3
Кент	121,5± 1,4
Падуа	189,7± 1,5
Ментор	176,9± 2,2
Ліссабон	119,3± 0,9
Хорол	70,3± 0,8
Мерлин	72,1± 0,6
Терек	80,1± 1,2
Либідь	72,3± 0,8
Кардіф	67,4± 0,7
Кубань	68,9± 0,9
Танаїс	86,0± 1,2
Алігатер	77,1± 0,7
Кордоба	71,6± 0,9
Max	**399,6**
Min	**35,5**
$\bar{x}$	**88,8±1,09**
CV,%	**3%**
$НІР_{05}$	**2,9**

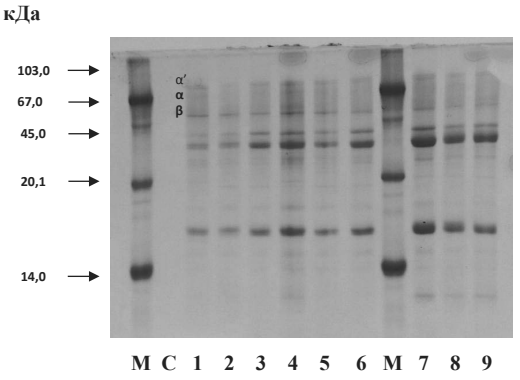

Рис. 1. Електрофорез в 15 % ПААГ, pH 8,3 7S глобулінів насіння генотипів сої з відомим станом генів β-конгліциніну:

M – маркери молекулярної маси; 1– Williams 82, 2 – Keburi, 3 – Enrei, 4 – Harovinton, 5 – Raiden, 6 – Lai wa dou, 7 – PI 468904, 8 – PI 468918, 9 – PI 488916

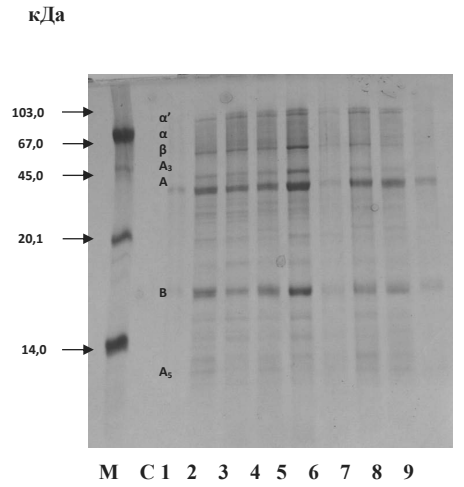

Рис. 2. Електрофорез в 15 % ПААГ, pH 8,3 11S глобулінів насіння генотипів сої з відомим станом генів гліциніну:

M – маркери молекулярної маси; C – субодиниці гліциніна (A - кисла; B – лужна);

1 – Williams 82, 2 – Keburi, 3 – Enrei, 4 – Harovinton, 5 – Raiden, 6 – Lai wa dou, 7 – PI 468904, 8 – PI 468918, 9 – PI 488916

ЛІТЕРАТУРА

1. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкар В.І., Цисельська Л.Й. Біохімічні особливості білкового комплексу насіння соі та використання його у виробництві. Селекція і насінництво. 2005. Т. 90. С. 162-175.

2. Золотарев С.В., Кобозев И.В., Кобозева Т.В. Оценка качества семян разных сортов сои с целью их рационального использования. Вестник АГАУ. 2012. Т. 87. № 1. С. 8–12.

3. Yaklich R. W. β-Congicinin and glicinin in high-protein soybean. I. Agric. Food.Chem. 2000. Vol. 49 . P.729 –735.

4. Carrao-Panizzi M.C., Kwanyuen P., Erhan S.Z., Lopes I.O.N. Genetic variation and environmental effects on the beta-conglycinin and glycinin content in Brazilian soybean cultivars. Pesq. agropec. bras. 2008. Vol. 43 (9). P. 1105-1119.

5. Guo S.T., Guo S.T., Meng Y., Zhang X.M. et al. Analysis of protein subunit composition of Chinise soybean [*Glycine max (L.) Merrill*] cultivars and screening cultivars lacking some subunits. Acta Agronomica. 2009. P.1130.

6. Zhang S. , Du H. , Ma Y. , Li H. , Kan G. , Yu D. Linkage and association study discovered loci and candidate genes for glycinin and β-conglycinin in soybean (*Glycine max* L. Merr.). Theoretical and Applied Genetics. 2021. Vol. 134. P. 1201–1215.

7. Boehm J. J. , Nguyen V. , Tashiro R. , Anderson D. , Shi C. , Wu X. , Woodrow L. , Yu K. , Cui Y. , Li Z. Genetic mapping and validation of the loci controlling 7S α' and 11S A-type storage protein subunits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. Theor Appl Genet . 2018. Vol. 131. P. 659–671.

8. Dadon S.B.E., Pascual C.Y., Eshel D., Teper-Bamnolker P., Ibanez M.D.P., Reifen Ram Vicilin and the basic of legumin are putative chickpea allergens. Food chemistry. 2013. Vol. 138. P. 13-18.

9. Takahashi M., Hajika M., Matsunaga R. et al. Breeding soybean variety lackyng β-conglicinin by introduction of *Scg* gene from wild soybean. In International soybean processing and utilization conference 3. Tsukuba proceedings. Tsukuba. The Japanese Society for food and science and technology. 2000. P. 45-46.

10. Hayashi M., Harada K., Fujiwara T., Kitamura K. Characterization of a 7S globulin-deficient mutant of soybean (*Glycine max (L.) Merrill*). Mol.Gen.Genet. 1998. Vol. 258. P. 208-214.

11. Пелевина А.И. Зернобобовые культуры – решение проблемы белка. Международный журнал социальных и гуманитарных наук. 2017. Т. 1. №3. С. 44-50.

12. Ren Z., Yin X., Liu L., Zhang L., Shen W., Fang Z., Yu Q., Qin L., Chen L., Jia R., Wang X., Liu B. Flavonoid localization in soybean seeds: Comparative analysis of wild (Glycine soja) and cultivated (Glycine max) varieties. Food Chemistry. 2024. Vol. 456. P. 139883.

13. Lee J.H., Kang N.S., Shin S.-O., Shin S.-H., Lim S.-G., Suh D.-Y., Baek I.-Y., Park K.-Y., Ha T.-J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (Glycine max L.) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. Food Chemistry. 2009. Vol. 112. Issue 1. P. 226-231.

14. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов. Физиология и биохимия культ. растений. 2013. Т. 45. № 2. С. 100-111.

15. Ullah A., Munir S., Badshah S.L., Khan N., Ghani L., Poulson B.G., Emwas A.-H., Jaremko M. Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. Molecules. 2020. Vol. 25(22). P. 5243.

16. Gasiński A., Mikulski D., Kłosowski G., Kawa-Rygielska J. Influence of malting procedure on the isoflavonoid content of soybeans. Scientific Reports. 2024. Vol. 14. P. 7184.

17. Bulatova K., Mazkirat S., Didorenko S., Babissekova D., Kudaibergenov M., Alchinbayeva P., Khalbayeva S., Shavrukov Y. Trypsin inhibitor assessment with biochemical and molecular markers in a soybean germplasm collection and hybrid populations for seed quality improvement. Agronomy. 2019. Vol. 9(2). P. 76.

18. Carvalho A.W., Gomes D.I.G. Natal, Silva C., Hercia M. Heat-treatment reduces anti-nutritional phytochemicals and maintains protein quality in genetically improved hulled soybean flour. Food Science and Technology (Campinas).2013. Vol. 33(2). P.310-315.

19. Petroski W. , Minich D. M. Is there such a thing as “Anti-Nutrients”? A narrative review of perceived problematic plant compounds. *Nutrients*. 2020. Vol. 12. N. 10. P. 2929.

20. JiangY. , Li L., He F., ZhaoW. Highly effective inactivation of anti- nutritional factors (lipoxygenase, urease and trypsin inhibitor) in soybean by radio frequency treatment. International Journal of Food Science & Technology. 2020. Vol. 56(1). Doi:10.1111/ijfs.14605

21. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкар В.І., Картузова Т.В., Левицький Ю.А., Безкровна Л.Я. Біохімічна характеристика генотипів зернобобових культур Півдня України в зв’язку з селекцією на якість насіння. Збірник наукових праць СГІ. 2015. Вип. 26 (66). С. 107-124.

22. Адамовська В. Г., Молодченкова О. О., Січкар В. І., Цісельська Л. Й.,Сагайдак Т. В. Патент на корисну модель № 42181. Спосіб добору сої. 25.06.2009 р. Бюл. №1.

23. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Картузова Т.В., Січкар В.І., Лаврова Г.Д. Патент на корисну модель № 107671, Україна. Спосіб добору генотипів сої продовольчого напряму /заявник та власник патенту Селекційно-генетичний інститут; заявл. 24.06.2016.

24. Адамовська В.Г., Молодченкова О.О., Січкар В.І., Сагайдак Т.В., Лаврова Г.Д., Хорсун Г.Д. Міжсортовий поліморфізм компонентного складу глобулінів та альбумінів насіння сої в зв’язку з якістю білка. Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. 2011. Вип.18(58). С. 89–92.

25. Адамовская В.Г., Молодченкова О.О., Сичкарь В.И., Картузова Т.В., Безкровная Л.Я., Лаврова Г.Д. Анализ взаимосвязи содержания белка, соотношения и содержания 7S и 11S глобулинов в семенах сои гибридных линий F6-F8 в связи с селекцией на качество белка. Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. 2016. Т.14. № 2. С. 163-167.

26. Молодченкова О.О., Адамовська В.Г., Січкар В.І., Картузова Т.В., Безкровна Л.Я., Лихота О.Б., Лаврова Г.Д. Біохімічні критерії насіння сої для добору сортів продовольчого напряму. Селекція і насінництво.2016. Вып. 110. С. 150 – 161.

27. Левицкий А.П. Экстракционный метод определения жира в растительном сырье с использованием экстракторов нового типа. Сборник научных трудов ВСГИ Биохимические методы исследования селекционного материала. Одесса.ВСГИ,1979. Т. 15. С. 78-84.

28. Blazka P. Bestummung de Kohlen hydrate und lipide. Linmologica. 1966. Vol. 4. № 2. P.403-418.

29. Васюкова А. Н. Изучение содержания суммы флавоноидов в семенах и проростках сои. Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс. 2013. №4. С. 9-13.

30. Левицкий А.П. Методы определения ингибиторов трипсина.Сборник научных трудов “Биохимические методы исследования селекционного материала”. Одесса: ВСГИ,1979. Т. 15. С. 68-72.

31. Будницкая Е.В. Исследование активности липоксигеназы кормовых трав методом окислениякаротина. Биохимия. 1955. Т. 20. Вып. 5. С. 615-621.

32. Луцик М.Ф., Панасюк Е.Н, Луцик А.Д. Лектины. Львов: Вища школа, 1981. 150 с.

33. Lowry O.H., Rozebrough N.I., Farr F.L., Rondall R.T. Protein measurement with Folin reagent. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265-275.

34. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.

35. Левицкий А.П., Похиленко Л.Й. Биохимический метод определения переваримости зерновых белков. Методические рекомендации. Одесса, 1985. 18 с.

Науково-виробниче видання

Селекційно-генетичний інститут —
Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення

ОЦІНКА СЕЛЕКЦІЙНОГО МАТЕРІАЛУ СОЇ ЗА БІОХІМІЧНИМИ ПОКАЗНИКАМИ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ЯКІСТЬ НАСІННЯ

Методичні рекомендації

Автори:
Молодченкова О. О.,
Січкар В. І.,
Лаврова Г. Д.,
Безкровна Л. Я.

Надруковано в авторській редакції
з готового оригінал-макета

Формат 60x84/16. Ум. друк. арк. 2,09.
Тираж 40 прим. Зам. № 96.

Видавництво і друкарня «Астропринт»
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21
Тел.: (0482) 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855
e-mail: astro_print@ukr.net; www.astroprint.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.