

Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва
Національна академія аграрних наук України

Леонов О. Ю., Усова З. В., Суворова К. Ю., Шелякіна Т. А.

**Вдосконалена методика
визначення вмісту каротиноїдних пігментів
у зерні та борошні пшениці м'якої
для селекційних досліджень**

Харків, 2020

УДК 633.3.112.123:631.524.6;631.527

Вдосконалена методика визначення вмісту каротиноїдних пігментів у зерні та борошні пшениці м'якої для селекційних досліджень. Леонов О. Ю., Усова З. В., Суворова К. Ю., Шелякіна Т. А. Харків. 2020. 15 с.

У науковому виданні висвітлено значення вітамінів, зокрема вітаміну А, у харчуванні людини. показано, що пшениця може бути джерелом не тільки калорій та білку у раціоні харчування людини, але і інших цінних нутрієнтів. Наведені існуючі на даний час методики та виділені проблемні боки їх застосування для умов селекційних досліджень. Проаналізовані можливі шляхи подолання проблемних ділянок. Запропоновані мікрометоди визначення вмісту каротиноїдних пігментів на різних етапах селекційного процесу. Видання розраховано на широкий круг читачів – співробітників наукових закладів, викладачів та студентів навчальних установ, спеціалістів харчової та переробної промисловості.

Рекомендовано до друку вченою радою Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва, НААН від 29.10.2020 р., протокол № 9

Рецензенти:

Задорожна О. А. – кандидат біологічних наук, провідний науковий співробітник лабораторії інтродукції та зберігання генетичних ресурсів рослин Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН.

Реліна Л. І. – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії генетики, біотехнології та якості Інституту рослинництва ім. В.Я. Юр'єва НААН.

© Леонов О. Ю., Усова З. В.,
Суворова К. Ю., Шелякіна Т. А. 2020

ЗМІСТ

Вступ.....	4
1 Поширені методи визначення вмісту каротиноїдів в зерні пшениці (стан вивчення питання).	5
2 Розробка способів визначення вмісту каротиноїдних пігментів пшениці м'якої в селекційних розсадниках.....	7
2.1 Для використання на перших етапах селекційного процесу	7
2.2. Для аналізу відібраних високопродуктивних рослин та у селекційному розсаднику	9
2.3. Для використання починаючи з контрольного розсадника	12
3. Пропозиції до впровадження в лабораторні дослідження вмісту каротиноїдів зразків селекційних розсадників	13
Перелік джерел посилання.....	14

ВСТУП

Однією з глобальних проблем людства є незбалансованість харчування, нестача вітамінів та мінеральних речовин (мікронутрієнтів). Проблема так званого прихованого голоду актуальна для населення як розвинених країн, так і країн, що розвиваються. Якісним і збалансованим харчуванням не забезпечене й населення України. Згідно з даними динамічних спостережень, понад 50 % населення нашої держави харчується неякісно. Україна загалом знаходиться в доволі тяжкому економічному й екологічному стані. Високі ціни на продукти тваринного походження, фрукти, овочі змушують багатьох людей відмовлятися від їх вживання й переходити на дешеві, менш біологічно активні продукти, насамперед зернові. Зернові продукти в більшості країн світу є основною часткою харчового раціону, вони становлять 60—80 % добової калорійності споживаної їжі, але не вирішують проблему «прихованого голоду» [1]. Основними дефіцитними мікронутрієнтами є залізо, цинк, йод, селен, вітаміни груп А, В, Е. Загальноприйняті заходи боротьби з нестачею життєво важливих елементів (виробництво харчових добавок, біопрепаратів, штучне збагачення продуктів харчування мікроелементами) проблему не вирішують. Очевидно, що кардинально змінити ситуацію може тільки підвищення природного вмісту необхідних мікроелементів у найважливіших продовольчих культурах, що входять у щоденний раціон людини. До того ж їх засвоюваність організмом людини ефективніша порівняно зі штучним збагаченням продуктів харчування [2, 3].

Окремою проблемою на фоні загального стану «прихованого голоду» стає дефіцит каротиноїдів — провітамінів А. Каротиноїди — велика група пігментів жовтого, оранжевого і червоного кольорів, які виконують низку дуже важливих функцій, і зокрема мають високу антиоксидантну активність та перетворюються в організмі людини на вітамін А [4].

Пшениця озима щорічно займає в Україні площу понад 6 млн. га, валовий збір зерна у 2019 році 28,2 млн. т [5], середньорічне споживання хліба складає 26 кілограмів на людину або приблизно 72 грами на день. Пересічні українці вживають 52% — це хліб пшеничний; на житній та хліб із пшеничного і житнього борошна припадає 33%; на вироби булочні, до яких насамперед належить батон і багет, припадає 24% від усього виробництва хліба, залишаються незмінними обсяги вживання кондитерських і макаронних виробів, 14 % вживаних круп — пшеничні [6]. Тож пшениця озима є найбільш вживаною харчовою культурою.

До складу каротиноїдів зерна пшениці входять ряд пігментів — ксантофіл, ефіри ксантофілу та каротин, який має біологічну активність, як провітамін А [7]. Кремний колір, характерний для доброго пшеничного борошна, жовтий та кремовий колір макаронів і різних круп пояснюється, головним чином, вмістом каротиноїдів [8]. В зерні пшениці вміст каротиноїдів має незначні природні коливання. У зерні пшениці залежно від генотипу може міститися до 4 мг / кг ка-

ротиноїдів, основним з них є лютеїн, вміст якого досягає 70–90 % каротиноїдів і залежить від генотипу і способу вирощування культури [9-11]. Кількість каротиноїдів у борошні та готових виробів варіює за роками і залежить від сортових особливостей [12]. У хлібопекарному борошні каротиноїдні пігменти знаходяться в невеликій кількості і вироби мають сірувато-білий колір.

Враховуючи високу харчову цінність каротиноїдів для організму людини та значну генетичну варіабельність між сортами і генотипами пшениці за їх вмістом у зерні, очевидні перспективи селекції сортів пшениці з поліпшеною харчовою цінністю зерна.

Поширені на даний час в Україні методики визначення вмісту каротиноїдів у борошнові не адаптовані для застосування в умовах селекційних програм через неможливість проведення аналізу на ранніх етапах селекції, починаючи з доборів у F_2 та селекційному і контрольному розсадниках у зв'язку з обмеженою кількістю матеріалу та великими витратами часу на один аналіз. Тому генотипи, які могли б слугувати джерелом високого вмісту каротиноїдів для подальшого використання, часто вибраковуються. Таким чином виникає необхідність розробки та впровадження в селекційні дослідження експрес методів для масової оцінки гібридного матеріалу за вмістом каротиноїдів на ранніх етапах селекції.

1. ПОШИРЕНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАРОТИНОЇДІВ В ЗЕРНІ ПШЕНИЦІ (стан вивчення питання).

Опубліковано безліч варіантів аналізу вмісту каротиноїдів в рослинному матеріалі. Більшість з них є модифікаціями методики Willstatter and Stall [13]. Вона заснована на екстракції каротиноїдів з рослинного матеріалу такими сполуками, як хлороформ, гексан, ацетон та іншими [14–16] з подальшим порівнянням світлопоглинаючих властивостей отриманого розчину у видимому діапазоні світлових хвиль із стандартним розчином каротину.

Еталонні методи для визначення загального вмісту каротиноїдів – стандартний метод 152 (ISS Method 152, 1990) Міжнародної асоціації науки і техніки про зерно (ISS) та міжнародний офіційний метод (AACC 14-50.01 (AACC International, 2013) [17, 18]. Процедури цих методів засновані на екстракції всіх пігментів в водонасиченому н-бутанолі з наступним спектрофотометричним кількісним визначенням оптичної щільності спиртового екстракту.

Також для визначення вмісту каротиноїдів використовуються хроматографічний метод. Метод вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) дозволяє одночасно провести ідентифікацію та визначити кількісний вміст окремих каротиноїдних сполук (ксантофіл, ефіри ксантофілу, каротин та ін.), його використовують в хімічній, фармакологічній, переробній та ін. промисловості і пов'язаних з ними дослідженнях Він є найточнішим методом ідентифікації багатьох кароти-

ноїдів, які присутні в біологічному матеріалі. Така точність необхідна, оскільки кожен каротин має свою активність провітаміну А, що визначає напрям його використання у лікуванні та профілактиці хвороб, пов'язаних з дефіцитом вітаміну А в організмі людини. ВЕРХ є особливо цінні при аналізі каротинів, які є чутливі до світла, тепла та кисню [19-21]. Разом з цим ВЕРХ-метод є дорогостоючим та трудомістким, тому не підходить для аналізу великої кількості зразків.

Слід сказати, що у країнах колишнього СРСР досі використовуються методи, розроблені для поширених раніше приладів ФЕК, адаптовані у наш час для більш сучасних спектрофотометрів. Для аналізів використовують повністю достигле зерно. Відбирають середню пробу зерна (масою 200 г) кожного досліджуваного зразка. Зразок розмелюють на млині Бюлер, Брабендер, CD1 або іншої моделі. Маса наважки борошна для аналізу становить 8 г, екстракцію здійснюють 40 мл розчинника протягом 16 годин. Оптичну щільність отриманого екстракту встановлюють на спектрофотометрі з відповідною довжиною хвилі або шляхом колориметрирування на приладі ФЕК. Вміст каротиноїдів за β -каротином розраховують за калібрувальною прямою, обчислюють в мг на 1 кг зерна у перерахунку на абсолютно суху речовину [22, 23].

В Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН використовується для аналізу модифікована методика Циреля [23]. Наважку зерна 20 г розмелюють на лабораторному млині у борошно (попередньо зерно доводять до стандартної вологості 14 % шляхом зволоження). Отримане борошно перемішують за допомогою скляної палички. Наважку 4 г борошна висипають у скляну колбу з притертою пробкою. До наважки додається 20 мл ацетону. Екстракцію каротиноїдних пігментів проводять на протязі 16 годин при температурі 20⁰С. Отриманий екстракт фільтрують за допомогою паперового фільтру у витяжній шафі. Оптичну щільність отриманого ацетонового розчину каротину вимірюють на фотоелектроколориметрі ФЕК за довжиною хвилі 440±5 нм.. Одночасно вимірюють оптичну щільність стандартного розчину бихромата калія. Вміст каротиноїдів розраховують за формулою:

$$\chi = \frac{a \times 0,00416 \times 1000}{H}$$

де χ – вміст каротину в дослідженому зразку, мг;

a – еквівалентне значення вихідного розчину, яке визначається за графіком 0,00416 – вміст каротину в 1 мл стандартного розчину бихромату калію, мг;

1000 – перерахунок вмісту каротину в мг/г;

H – наважка зразка, г;

Наведені методи не можуть використовуватись в селекційних дослідженнях, насамперед на первинних етапах селекційного процесу, де кількість зразка для аналізу обмежується окремими зернами чи рослинами. А обсяг аналізова-

них зразків складає декілька тисяч, що при використанні стандартних методик займає велику кількість часу. Тож для підвищення ефективності доборів в селекції необхідно розробляти та впроваджувати експрес мікрометоди.

2. РОЗРОБКА СПОСОБІВ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ КАРОТИНОЇДНИХ ПІГМЕНТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ В СЕЛЕКЦІЙНИХ РОЗСАДНИКАХ

З метою забезпечення селекційних досліджень необхідними лабораторними оцінками в Інституті рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН співробітниками лабораторії селекції та фізіології пшениці сумісно із співробітниками лабораторії генетики, біотехнології та якості зерна в рамках виконання НДР за завданням 13.00.01.05.Ф «Ефективне використання джерел харчової цінності із застосуванням біохімічних методів та генетичних маркерів для створення високоадаптивних сортів пшениці м'якої озимої» (2016-2020 рр.) проведені порівняльні лабораторні дослідження та статистичне узагальнення отриманих даних, що дає можливість запропонувати наступні підходи до визначення вмісту каротиноїдних сполук у зразках пшениці озимої починаючи з розсадника доборів F₂.

2.1. Для використання на перших етапах селекційного процесу, коли обсяг наявного матеріалу не перевищує кількох десятків зерен, а кількість зразків сягає кількох сотень, або тисяч пропонується проводити оцінку за забарвленням ендосперму розплющеної зернівки. Для аналізу беруться відібрані колоси або рослини, обмолот проводиться на колосковій молотарці (типу МКС-1М або іншої моделі). При доборах рослин використовують 5 добре виповнених зерен, колосів – 3 зернини. Розплющення зерна проводиться плоскогубцями без насічок з наступним викладанням кожної зернини на заздалегідь розлінований лист білого паперу (рис. 1).

Визначення проводиться при доброму освітленні (денне світло без прямих сонячних променів або штучне освітлення з використанням ламп нейтрального світла). Бальна оцінка проводиться відповідно до таблиці 1 з використанням зразків-еталонів.

2.2. Для аналізу відібраних високопродуктивних рослин та у селекційному розсаднику (доступна для аналізу вага зразка близько 1 г) пропонується використовувати аналітичні методи визначення вмісту каротиноїдів. За основу було взято метод Циреля [23]. Для виділення каротиноїдних пігментів зернівка подрібнюється: наважка близька до 1 г – у фарфоровій ступці з додаванням невеликої кількості битого скла, понад 2 г – на лабораторному млині (ЛЗМ, ЛЗМК, ЛМТ-2, «Пірует» або інша марка). Отриманий шрот переноситься у скляну колбу з притертою кришкою. До наважки пропорційно вазі додається розчинник (табл. 2).



Рис.1. Забарвлення ендосперму окремої розплющеної зернівки зразків пшениці м'якої
Примітка: зразок № 1 – забарвлення 2 бали, № 2 - 5 балів, № 3 – 7 балів

Таблиця 1. Балова оцінка інтенсивності забарвлення ендосперму розплющеної зернівки та еталонні зразки пшениці м'якої

Забарвлення ендосперму	Оцінка (бал)	Вміст каротиноїдів в борошні, мг/100 г	Еталонний зразок	
			пшениця озима	пшениця яра
Білий	1	<1,00	ВИОЛА UA0108505	РАННЯ 93 UA0101068
Білий з жовтуватим відтінком	2	1,01–2,00	LIA 5899-16 UA0108350	ХАРКІВСЬКА 18 UA0101498
Кремовий	3	2,01–3,00	НУРЕКЕ UA0108509	НЕЗАБУДКА UA0108231
Блідо-жовтий	4	3,01–4,00	ЖУРАВКА ОДЕСЬКА UA0107679	ЛАСКА UA0111093
Жовтуватий	5	4,01–5,00	MV LEPENY UA0108297	ЕЛЕГІЯ МИРОНІВСЬКА UA0104378
Жовтий	6	5,01–6,00	L 139 - 03 UA0108260	КИНЕЛЬСКАЯ 2010 UA0111029
Лимонно-жовтий	7	6,01–7,00	BONA DEA UA0108447	ЛЮТЕСЦЕНС 516 UA0111059
Яскраво жовтий	8	7,01–8,00	L 224-5 UA0123330	ВОЛГОУРАЛЬСЬКА UA0105401
Бурштиновий	9	>8,00	L 243-18 UA0123332	КИНЕЛЬСКАЯ 61 UA0111057

Таблиця. 2. Об'єм розчинника залежно від наважки проби

Наважка шроту, г	розчинник, мл
4	25
1	6,25
0,8	5

У дослідженнях використані такі розчинники: ацетон (використовується у методиках, поширених на пострадянському просторі), етиловий спирт (використовується як замітник ацетону, після посилення контролю за обігом останнього як прекурору, оскільки не всі установи мають можливість отримати ліцен-

зію на відповідний вид діяльності), н-бутиловий спирт (використовується у міжнародній науковій практиці для екстрагування каротиноїдних пигментів). Для перевірки відповідності отриманих з використанням різних розчинників даних було підібрано 6 зразків з раніше визначеним (за методиками 22 чи 23) середнім, вище-середнім та високим вмістом каротиноїдів у борошні. Після розмелювання цільного зерна, замість борошна до аналізу був узятий шрот. Екстрагування каротиноїдів ацетоном, етанолом та н-бутанолом дало схожі результати як за довжини хвилі спектрофотометра 435 нм (міжнародні методики), так і за довжини хвилі 450 нм (гранична для приладу ФЕК), але за довжини хвилі 450 нм оптична цільність розчину виявилася більшою (табл. 3).

Таблиця. 3. Вміст каротиноїдів у шроті пшениці м'якої, визначений за використання різних органічних розчинників

Розчинник	Вміст каротиноїдів мкг/100 г, довжина хвилі 435 нм	Вміст каротиноїдів мкг/100 г, довжина хвилі 450 нм
ацетон	4,74	6,00
етиловий спирт	4,56	5,45
н-бутиловий спирт	4,67	5,76

Зменшення об'єму розчинника з 25-40 мл до 4-5 мл при проведенні тих самих операцій збільшує відносні втрати розчинника на випаровування, через що показники оптичної щільності розчину зростають. Так, вміст каротиноїдів на тому ж наборі зразків при вазі проби 0,64 г та об'ємові розчинника ацетону 4 мл зріс до 6,04 мкг/ 100 г на хвилі 435 нм та до 7,39 мкг/ 100 г при 450 нм, чого не спостерігалось при використанні н-бутанолу з більшим коефіцієнтом летючості (табл. 4) [25].

Таблиця. 4. Коефіцієнт летючості органічних розчинників

Розчинник	хімічна форма	коефіцієнт летючості, од.
ацетон	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	2,1
етиловий спирт	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OH}$	8,3
н-бутиловий спирт	$\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$	33,0

Тому для визначення вмісту каротиноїдів у зразках з обмеженими 0,6-2,0 г обсягами зерна був обраний розчинник н-бутанол. Мінімальна наважка зерна для аналізу має бути 0,64 г з додаванням 4 мл бутанолу, оскільки з такого об'єму після центрифугування можна отримати достатню для стандартної 10 мм кювети кількість елюенту, а при відсутності центрифуги – 1,00 г на 6,25 мл

для подальшого фільтрування. розтирання у фарфоровій ступці за присутності невеликої кількості битого скла, змив та перенесення у пробірку типу "еппендорф".

Каротиноїди сприйнятливі до дії світла, тепла, повітря та інших чинників, їх вилучення та аналіз можуть призводити до деградації, структурній перебудові, формування стереоізомерів та зміни інших фізико-хімічних показників [26]. Тому для вилучення каротиноїдів необхідно використовувати швидкі та щадні методи.

Звичайна екстракція має певні обмеження з точки зору часу, енергії та потреб у розчиннику. Екстракція за допомогою ультразвуку може вилучати біоактивні компоненти за дуже короткий час, при низькій температурі, з меншою потребою в енергії та розчиннику. Ультразвук як нетермічна технологія екстракції краща для збереження функціональності біоактивних сполук [27]. Для прискорення екстракції каротиноїдних пігментів використовувалась ультразвукова ванна UM-4 фірми Unitra (Польща) (об'єм ванни 4 дм³, частота 25 кГц, потужність – 40 Вт), інкубація складала 15 хвилин при кімнатній температурі 18-20°C. Для отримання прозорого розчину зразок з наважки 0,64 г центрифугували на центрифугі ЦЛР за 8 тис. обертів/хв. протягом 10 хв. з відносною центробіжною силою 1800 g, а з наважки 1,00 г фільтрували через паперовий фільтр. Отриманий екстракт переносили у кювету спектофотометра ULAB або іншої марки. Вимірювання проводили за довжини хвилі 450 нм проти холостої проби. Вміст каротиноїдів розраховували за формулою регресії, отриманої при побудові калібрувального графіку.

Калібрувальний графік будували за допомогою стандартних розчинів.

Приготування стандартного розчину:

720 мг біхромату калію розчиняли у дистильованій воді в мірній колбі місткістю 1л і доводять об'єм до позначки; Об'ємна одиниця цього розчину за забарвленням відповідає 2.08 мкг β-каротину в 1 см³ [24].

Побудова калібрувального графіка:

Готували серію стандартних забарвлених розчинів. Для цього в ряд мірних колб додавали: 20; 40; 60; 80; 100 мл свіжоприготовленого робочого розчину біхромату калію і доводили об'єм розчинів до 100 мл дистильованою водою. Отримані розчини за забарвленням відповідають масовій концентрації 0,832; 1,664; 2,496; 3,328; 4,160 мкг каротину в 1 см³.

Вимірювали оптичну густину кожного розчину на спектрофотометрі ULAB, в кюветах з відстанню між робочими гранями 10 мм за довжини хвилі 450 нм [24]. Грунтуючись на отриманих даних, будували за допомогою програми Statistica або іншого доступного програмного забезпечення калібрувальний графік та визначали формулу регресії (приклад наведено на рис. 2).

Діаграма калібровки за біхроматом калію, ULAB, 450 нм

Рівняння регресії

Вміст каротиноїдів, мкг/100 г = $0,3842 + 22,5919 \cdot \text{ULAB450}$

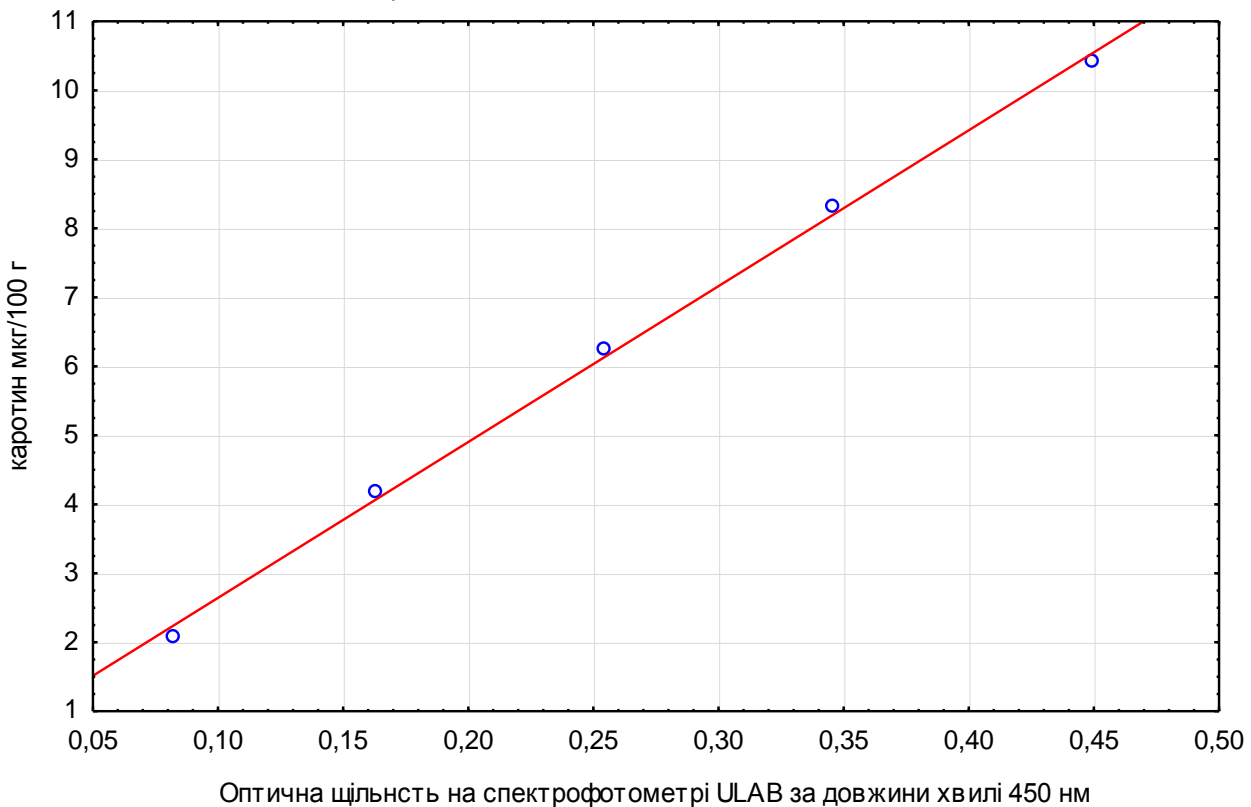


Рисунок 2. Приклад побудови калібрувальної прямої та розрахунку формули лінійної регресії для спектрофотометра ULAB

2.3. Для використання починаючи з контрольного розсадника, коли обсяг матеріалу дозволяє використати 100 г та більше зерна пропонується брати на аналіз борошно, отримане на лабораторних млинах (Бюлер, Брабендер, CD1) при просіві через сита (металоткане № 067, борошняне шовкове сито № 38, капронове № 49). Наважку 4 г борошна висипають у скляну колбу з притертою пробкою. До наважки додається 20 мл ацетону. Час проведення екстракції каротиноїдів зменшується з 16 годин до 15 хв. за рахунок використання ультразвукової ванни типу UM-4 фірми Unitra (Польща) (температура кімнатна, тобто 18-22°C, об'єм ванни 4 дм³, частота 25 кГц, потужність – 40 Вт) або іншої моделі, це значно скоротить час проведення аналізу та збільшить їх обсяги, в результаті підвищується ефективність оцінок селекційного матеріалу на етапі контрольного розсадника. Використання ультразвукової ванни забезпечує повноту екстрагування каротиноїдних пігментів зерна (табл. 5)