

АНАЛІЗ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ТА ВМІСТУ ЗАГАЛЬНОГО АЗОТУ В ЛИСТКАХ ЕНДОСПЕРМАЛЬНИХ МУТАНТІВ КУКУРУДЗИ**Ткаченко М. Ф., Ковальов В.М.***Національний фармацевтичний університет*

Вступ. Сьогодні у світі за поширеністю вирощування генетично модифікована (ГМ) кукурудза стоїть на другому місці після сої. В Україні на ГМ кукурудзу приходить третина валового збору [1, 2, 3, 4].

Створення безвідходних процесів у виробництві є важливим питанням сучасності, тому вивчення аспектів утилізації надземної маси кукурудзи і отримання з неї біологічно активних речовин є актуальним.

Попереднє вивчення біологічно активних речовин листків ендоспермальних мутантів кукурудзи виявило наявність різних видів фармакологічної активності [5, 6].

Необхідним етапом подальшої роботи було більш детальне вивчення сировини, а саме, амінокислотного складу та вмісту загального азоту в листках ендоспермальних мутантів кукурудзи.

Матеріали та методи дослідження.

Об'єктом дослідження були листки ендоспермальних мутантів ГМ кукурудзи, носіїв генів sugary-1 (su-1), sugary-2 (su-2), amilosa extender (ae), waxu (wx) у порівнянні з кукурудзою звичайною зубовидною сорт Харківський 294. Сировину листки заготовляли на дослідній ділянці відділу генетики і селекції інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН в серпні у фазу молочно-воскової стиглості зернівок.

Для визначення азоту, що входить до складу білкових речовин, білки відокремлювали від інших азотовмісних сполук шляхом висаджування їх трихлороцтовою кислотою. Потім осад мінералізували сульфатною кислотою і визначали вміст загального азоту по методу К'ельдаля [7, 8, 9, 10].

Якісний та кількісний амінокислотний аналіз проводили на амінокислотному аналізаторі LKB 4151 «Альфа Плюс» (Швеція) у відділі біохімічних аналізів інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва УААН.

Аналіз амінокислотного складу включав повний гідроліз білка, що міститься у досліджуваній сировині і кількісне визначення амінокислот у гідролізаті [11, 12].

Висушену сировину подрібнювали і зважували на аналітичних вагах. Наважка дорівнювала 100 мг. Наважку поміщали в скляну ампулу з хлористоводневою кислотою, ампулу запаювали і нагрівали в термостаті протягом доби при t 110 °С. Таким чином забезпечувалась руйнація пептидних зв'язків між амінокислотами у полімерній структурі білка, тобто гідроліз. Після проходження гідролізу ампулу розкривали, видаляли кислоту шляхом випа-

ривування на водяній бані та розміщували пробу в ексікаторі з NAOH на 48 годин для остаточної нейтралізації. До проби додавали буферний розчин з рН 2,2 і фільтрували. Пробу вводили в капсулу і поміщали в магазин автоматичного вводу проб. Згідно програмі і даній команді проба потрапляла на колонку, яка була заповнена катіонообмінною смолою. Потім через колонку за допомогою насоса пропускали буферні розчини, які мали різні значення рН і різну йонну силу. При цьому проходило розділення амінокислот. Елюат, що виходив із колонки змішувався з нінгідрином. Отримана суміш потрапляла до високотемпературного реакційного змійовика, де проходила реакція між нінгідрином і амінокислотами з утворенням забарвлених сполук. Кількість забарвленої сполуки прямо пропорційна кількості амінокислоти в елюаті (колориметрія). Із змійовика суміш елюату з нінгідрином поступала до фотометра, де визначалась кількість забарвленої сполуки шляхом виміру кількості поглинаемого світла. Вихідний сигнал фотометра поступав на двоканальний пристрій, який реєструє концентрації амінокислот у вигляді піків. Час утримання піка характеризує кожну амінокислоту, а площа піка вказує на її кількість. Для порівняння результатів проводився аналіз стандартної суміші амінокислот [13, 14].

Результати дослідження та їх обговорення. Вивчення амінокислотного складу. Результати вивчення якісного і кількісного амінокислотного складу листків кукурудзи проведеного за допомогою амінокислотного аналізатора LKB 4151 «Альфа Плюс» представлені в таблиці 1. Хроматографічний аналіз і аналіз методом ВЕРХ виявили наявність 15 амінокислот, з них 7 замісних і 8 незамісних амінокислот. Замісні амінокислоти представлені аланіном, аспарагіновою кислотою, гистидином, глутаміновою кислотою, гліцином, серином та тирозином. Незамісні амінокислоти представлені аргініном, валіном, ізолейцином, лейцином, лізином, метіоніном, треоніном, фенілаланіном.

У листках всіх форм кукурудзи у кількісному відношенні переважали серед замісних амінокислот – глютамінова кислота, серед незамісних амінокислот – лейцин.

Найменша кількість серед замісних амінокислот була типовою для гистидину, серед незамісних амінокислот – для ізолейцину для всіх вивчених форм кукурудзи.

Таблиця 1. Якісний і кількісний амінокислотний склад листків кукурудзи

Амінокислота	Формула амінокислоти	Генетична форма кукурудзи / Вміст амінокислот, %				
		su-1	su-2	ae	wx	X-294
1	2	3	4	5	6	7
замінні амінокислоти						
Аланін	C ₄ H ₈ O ₂ N	8,55	8,16	8,38	8,77	9,86
Аспарагінова кислота	C ₄ H ₈ O ₂ N	7,72	6,36	7,18	6,81	6,99
Гістидин	C ₆ H ₉ O ₂ N	2,01	1,90	1,72	1,82	1,59
Глутамінова кислота	C ₅ H ₉ O ₂ N	27,89	27,48	29,83	28,51	28,09
Гліцин	C ₂ H ₅ O ₂ N	4,35	4,30	4,62	4,72	4,62
Серин	C ₃ H ₄ O ₂ N	5,21	4,51	6,05	5,62	5,88
Тирозин	C ₉ H ₁₁ O ₃ N	3,35	3,64	4,19	3,46	3,25
незамінні амінокислоти						
Аргінін	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	6,04	6,03	4,92	5,36	4,81
Валін	C ₅ H ₁₁ O ₂ N	6,83	7,28	5,73	6,96	6,16
Ізолейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	2,83	1,92	1,93	2,02	1,91
Лейцин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	9,38	12,32	9,35	9,49	10,68
Лізин	C ₆ H ₁₃ O ₂ N	3,71	4,99	3,92	3,89	3,98
Метіонін	C ₅ H ₁₁ O ₂ NS	3,32	2,12	2,65	3,78	3,55
Треонін	C ₄ H ₉ O ₂ N	3,78	3,33	3,93	3,84	3,79
Фенілаланін	C ₉ H ₁₁ O ₂ N	5,04	5,57	5,56	5,00	4,80

Накопичення замінних амінокислот в листках всіх вивчених форм кукурудзи представлено у ряді залежності: глутамінова кислота > аланін > аспарагінова кислота > серин > гліцин > тирозин > гістидин.

Накопичення незамінних амінокислот представлено у ряді залежності: для sugary-1 – лейцин > валін > аргінін > фенілаланін > треонін > лізин > метіонін > ізолейцин; для sugary-2 – лейцин > валін > аргінін > фенілаланін >

лізин > треонін > метіонін > ізолейцин; для amilosa extender – лейцин > валін > фенілаланін > аргінін > треонін > лізин > метіонін > ізолейцин; для wx та для кукурудзи звичайної зубовидної сорт Харківський 294 – лейцин > валін > аргінін > фенілаланін > лізин > треонін > метіонін > ізолейцин.

Результати досліджень вмісту загального азоту листків кукурудзи наведені в таблиці 2.

Таблиця 2. Вміст загального азоту в листках кукурудзи

Генетична форма кукурудзи	Вміст загального азоту, %
sugary-1	13,74 ± 0,36
sugary-2	12,85 ± 0,27
amilosa extender	13,81 ± 0,24
wx	11,92 ± 0,18
к.з. зубовидна X-294	10,73 ± 0,21

Визначення свідчить про незначні коливання вмісту загального азоту в листках ендоспермальних мутантів. Максимум вмісту загального азоту спостерігався у носіїв гену amilosa extender і sugary-1, мінімум – у кукурудзи звичайної зубовидної X-294. Найбільший вміст загального азоту, який спостерігався у ендоспермального мутанта amilosa extender, перевищував цей показник у кукурудзи звичайної зубовидної X-294 лише на 3 %.

Висновки: 1. Проведено аналіз амінокис-

лот листків ендоспермальних мутантів кукурудзи. Ідентифіковано 15 амінокислот, домінуючими виявились серед замінних амінокислот глутамінова кислота, серед незамінних амінокислот – лейцин. У найменшій кількості накопичується серед замінних амінокислот гістидин, серед незамінних амінокислот – ізолейцин для всіх вивчених форм кукурудзи.

2. Визначено вміст загального азоту, який складав близько 12 % для листків всіх вивчених форм кукурудзи.

ЛІТЕРАТУРА:

- Діденко С. Біохімічна характеристика підвищеного різноманіття кукурудзи / С. Діденко, В. Попов // Актуальні проблеми ботаніки та екології : матеріали конф. молодих вчених-ботаніків України. – Ніжин, 2001. – С. 84 - 85.
- Yearbook of production. Vol. 45 / Food and Agricultural Organization of the United Nations. – Rome : FAO, 2001. – 265 p.
- WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants / World Health Organisation. – Geneva, 2003. – 80 p.
- Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.) / E. O. Cuevas-Rodríguez, N. M. Verdugo-Montoya, P. I. Angulo-

Bejarano et al.; Swiss Society of Food Science and Technology. – Oxford : Elsevier, 2005. – 23 p.

5. Вивчення флавоноїдного складу листків кукурудзи su-1 / **М.Ф. Ткаченко, В.М. Ковальов, А.Г. Кононенко, Л.М. Малоштан** // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупика. – К., 2009. – Вип. 18, кн. 3. – С. 497 - 502.

6. Вивчення гепатопротекторної активності екстракту листків кукурудзи в умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту / **А.Г. Кононенко, Л.М. Малоштан, М.Ф. Ткаченко, В.М. Ковальов** // Запорозький медичинський журнал. – 2009. – Т. 11, № 5. – С. 115 – 117.

7. Государственная фармакопея СССР. Вып. 1. Общие методы анализ. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1987. – 336 с.

8. Методы биохимического исследования растений / **под ред. А. И. Ермакова**. – 3-е изд., перераб. и доп. –Л. : Агропромиздат, Ленинградское отд-ние, 1987. – 430 с.

9. Quality control methods for medicinal plant materials. – Geneva : World Health Organization, 1998. – 115 p.

10. Quality protein maize (*Zea mays* L.) tempeh flour through solid state fermentation process / **Е. О.**

Cuevas-Rodríguez, J. Milán-Carrillo, R. Mora-Escobedo et al.; Swiss Society of Food Science and Technology. – Oxford : Elsevier Science, 2003. – 38 p.

11. Девени Т. Аминокислоты, пептиды и белки / Т. Девени, Я. Гергей; пер с англ. **под ред. Р. С. Незмина**. – М. : Мир, 1975. – 366 с.

12. **Е.О. Cuevas-Rodríguez, N.M. Verdugo-Montoya, P.I. Angulo-Bejarano et al.** Nutritional properties of tempeh flour from quality protein maize (*Zea mays* L.) / Е.О. Cuevas-Rodríguez, N.M. Verdugo-Montoya, P.I. Angulo-Bejarano et al. – Swiss Society of Food Science and Technology Published by Elsevier Ltd. 2005. – 94 p.

13. **Бахтина С. М.** Исследование аминокислотного состава полиэкстракта из травы остролодочника остролистного / С. М. Бахтина, Е. Н. Саканян // Актуальные проблемы создания новых лекарственных средств : тез. докл. всерос. науч. конф., 21 - 23 нояб. – СПб., 1996. – С. 39 - 40.

14. **Сорочан О. О.** Вільні амінокислоти злаків на перших фазах пророщування під впливом деяких факторів : автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. біол. наук : 03.00.04 / О. О. Сорочан. – Чернівці, 2001. – 16 с.

Ткаченко М. Ф., Ковальов В.М. Аналіз амінокислотного складу та вмісту загального азоту в листках ендоспермальних мутантів кукурудзи // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 3. – С. 156-158.

Визначено вміст загального азоту та ідентифіковано 15 амінокислот в листках ендоспермальних мутантів кукурудзи sugary-1, sugary-2, amilosa extender, waxy. Домінуючими амінокислотами виявились глутамінова кислота і лейцин для всіх вивчених форм кукурудзи.

Ключові слова: кукурудза, листки, мутація, амінокислоти, азот.

Ткаченко М. Ф., Ковалев В.Н. Анализ аминокислотного состава и содержания общего азота в листьях эндоспермальных мутантов кукурузы // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 3. – С. 156-158.

Определено содержание общего азота и идентифицировано 15 аминокислот в листьях эндоспермальных мутантов кукурузы sugary-1, sugary-2, amilosa extender, waxy. Доминирующими аминокислотами оказались глутаминовая кислота и лейцин для всех изученных форм кукурузы.

Ключевые слова: кукуруза, листья, мутация, аминокислоты, азот.

Tkachenko M. F., Kovalyov V.M. Analysis of amino acid composition and content of nitrogen in leaves of endospermal mutants of corn // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 3. – С. 156-158.

Content of general nitrogen was determined and the 15 amino acid were identified in the leaves of endospermal mutants of the corn sugary-1, sugary-2, amilosa extender, waxy. It was established the dominant amino acid in all studied forms of corn leaves: glutaminic acid and leucine.

Key words: corn, leaves, mutation, amino acid, nitrogen.

Надійшла 18.02.2011 р.
Рецензент: проф. С.М.Смірнов