

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ МАССЫ КЕДРОВОГО СТЛАНИКА И СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ, ПОЛУЧЕННОЙ ПУТЁМ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

Ларина Н.П., Носкова Н.Е.

Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

*The physical and chemical characteristics of embryonic masses, which were obtained through somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* and *P. pumila* are studied. The high protein percentage was detected in the mass. Thus, it is promising to use the masses as a protein-containing supplement.*

Соматический эмбриогенез в настоящее время является наиболее перспективным и наиболее широко распространенным способом микрклонального размножения хвойных. Результатом индукции соматического эмбриогенеза является получение эмбрионально-суспензорной массы, состоящей из глобулярных соматических зародышей и суспензоров, обеспечивающих поступление питательных веществ и регуляторов роста в развивающиеся зародыши из питательной среды. Эмбриональная масса обладает высокой продуктивностью, коэффициент размножения которой достигает 10^4 [17]. Размножение массы происходит за счет кливажа соматических зародышей и регенерации новых зародышей клетками суспензоров [20; 21; 18]. Интенсивный рост и развитие эмбриональной массы обеспечивает высокий уровень обменных процессов при участии ферментов. Эмбриональные ткани, как правило, богаты белком, витаминами и др. биологически активными веществами.

Сокращение источников питания и рост цен на продукты животного происхождения в современном мире определило необходимость дальнейших поисков дополнительных ресурсов. При этом жизненно важным становится поиск надёжных альтернативных источников белка. Среди них – соя, горох, пшеница, представители водорослей [11], микроорганизмов [10], грибов [15], насекомые [4], семена сырых овощей [1].

Кедровые орехи, семена сосны сибирской, издавна употребляли в пищу, получая жмых и используя его в качестве кедровой муки и/или кедрового молочка. Установлено, что ядра кедрового ореха богаты витаминами, минеральными веществами, и высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот, обладающих высокой физиологической и антиоксидантной активностью. А растительный белок «кедрового ореха», т.е., сосны сибирской, содержит в своем составе незаменимые аминокислоты, идеально сбалансирован и по составу близок к белкам ткани человека настолько, что усваивается организмом на 99 %. Недавними исследованиями установлено, что добавление в некоторые продукты питания продуктов переработки кедрового ореха, повышает их пищевую ценность [14].

Кедровый стланик относится к пятихвойным соснам, генетически близок сосне сибирской и образует с ее особями жизнеспособные гибриды в

естественных древостоях в районах пересечения ареалов [2]. Сосна обыкновенная – представитель подрода двухвойных сосен рода сосна. Оба вида, как и сосна сибирская, играют средообразующую роль в лесных экосистемах и имеют важное хозяйственное значение. Существует немного сведений о химическом составе семян (мегагаметофита) кедрового стланика и сосны обыкновенной [3]. Сведения же о физико-химическом составе зародышей сосны обыкновенной и кедрового стланика в литературе отсутствуют.

В лаборатории биотехнологии сельскохозяйственных и лесных культур ИАЭТ КрасГАУ в 2011-2012 гг. получены стабильные эмбриональные линии кедрового стланика [12] и сосны обыкновенной (неопубликованные данные) путем соматического эмбриогенеза.

Целью настоящего исследования явилось определение физико-химических характеристик эмбриональной массы кедрового стланика и сосны обыкновенной, полученной путём соматического эмбриогенеза с перспективой использования эмбриомассы в качестве источника кормовых и/или пищевых биодобавок.

Объектом исследования послужили три стабильно пролиферирующие эмбриональные линии: кедрового стланика (КСТНЧ10.24) и сосны обыкновенной (СОСБ92 и СОСБ911).

Наращивание биомассы проводилось на твердой питательной среде $\frac{1}{2}$ LV стандартного состава для пролиферации ЭСМ сосны обыкновенной [22] и сосны каменной [19] с собственными модификациями. Трансплантации на свежие среды проводились каждые две недели. Отбор образцов эмбриональной массы для исследования осуществлялся непосредственно, перед пересадкой на свежие среды.

Для определения количественного содержания белка в биомассе эмбриональных линий использовались физико-химические методы, определялись: влажность, сухое вещество, количественный состав белков и сахаров, минеральных веществ, жиров.

Влажность в образцах эмбриональной массы определялась методом термогравиметрического высушивания [7]. Массовая доля сухих веществ (X_1) определялась по формуле:

$$X_1 = 100 - X\%, \text{ где } X - \text{влажность.}$$

Белок определялся по методу Лоури [23; 16]. Пробоподготовка навески проводилась 5% трихлоруксусной кислотой и 0,5н NaOH [16]. Подготовленная проба, содержащая белок, исследовалась фотометрически при $\lambda = 750\text{нм}$ с использованием реактива Фолина. Калибровочный график строился на казеине.

Растворимые сухие вещества (сахара) определялись рефрактометрическим методом [8] и [6].

Массовая доля золы проводилась методом озоления по [5].

Массовая доля жира исследовалась рефрактометрически по [9].

Анализ показал высокую обводненность эмбриональных масс исследуемых линий (таблица 1), что характерно и для половых зародышей хвойных на соответствующей стадии развития.

Установлено, что содержание белка и растворимых углеводов всех трех эмбриональных линий имело близкие значения (таблица 1). При этом следует отметить, что количество белка в биомассе сосны обыкновенной линии СОСБ12.911 несколько превосходило линию сосны СОСБ12.92 и кедрового стланика КСТНЧ10.24. В то же время, количество сахаров было одинаковым в эмбриональных линиях сосны обыкновенной и на 0,3% больше по сравнению с кедровым стлаником. Соотношение белков и углеводов в эмбриональной ткани варьировало от 0,6:1 до 1:1 (таблица 1). Доля жиров в сухом веществе эмбриональных масс составила близкие величины и варьировала в пределах 21-27 %.

По сравнению с литературными данными, количество белка в эмбриональной массе оказалось в 2 раза больше, чем в ядрах зрелых кедровых орехов, а жиров – в 2-3 раза меньше (таблица 1, 2). Углеводы в эмбриональной массе, в отличие от ядер зрелых кедровых орехов, представлены растворимыми сахарами.

Все вышеизложенное позволяет рассматривать эмбриональные массы сосны обыкновенной и кедрового стланика в качестве перспективного источника белоксодержащих биодобавок. С этой точки зрения, представляет интерес исследовать белки на аминокислотный состав, и, особенно, на содержание незаменимых аминокислот.

Таким образом, впервые проведенный анализ физико-химических характеристик эмбриональной массы кедрового стланика и сосны обыкновенной, полученной путём соматического эмбриогенеза показал высокое содержание белка, что позволяет рассматривать эмбриональные массы исследуемых линий, как перспективный источник белоксодержащих биодобавок.

Таблица 1 – Физико-химические характеристики эмбриональной массы кедрового стланика и сосны обыкновенной, полученной путём соматического эмбриогенеза.

Эмбриональная линия	Влажность, %	Массовая доля минеральных веществ, %	Белок, в % к сухому веществу	Растворимые сухие вещества (сахара) в % к сухому веществу	Жиры в % к сухому веществу
СОСБ12.911	93,7±1,00	0,136	36,2	35,5	26,3
СОСБ12.92	94,9±1,00	0,102	32,0	45,1	21,0
КСТНЧ10.24	96,4±1,00	0,065	27,5	45,6	24,9

Таблица 2 – Химический состав орехов сибирского кедра [13]

Показатели	Целые орехи (в % от веса)	В % на сухое вещество	
		ядро	скорлупа
Жиры	27.9	59.9	1.9
Белки	8.4	16.6	1.8

Крахмал	5.5	12.4	нет
Пентозаны	13.4	2.1	22.7
Клетчатка	39.0	2.2	69.1
Зола	1.5	2.3	0.9

Литература

1. Васильева А.Г. Разработка новых растительных добавок из семян тыквы и их использование в технологии мясорастительных вареных колбас функционального назначения : диссертация ... кандидата технических наук : 05.18.01, 05.18.04 / Васильева Анастасия Георгиевна.- Краснодар, 2009.- 244 с.
2. Васильева Г.В., Горошкевич С.Н., Попов А.Г. Естественная гибридизация кедра сибирского и кедрового стланика в Северном Прибайкалье (Дельта Верхней Ангары): встречаемость гибридов и их плодоношение // Лесные экосистемы Северо-Восточной Азии и их динамика: материалы международной конференции 22-26 августа 2006, Владивосток, Дальнаука. 2006. с. 195-198
3. Выводцев Н. В., Джумаев М. А., Тагильцев Ю. Г., Колесникова Р. Д. Кедровый стланик: распространение, экология, использование / Технология и оборудование лесного хозяйства // ВЕСТНИК ТОГУ. 2011. № 1 (20). с.115-124.
4. Голомянов А.И. Альтернативные источники белка /Казначеевские чтения. Сборник докладов участников международной научно-практической конференции «Декларация прав культуры Д.С. Лихачёва и проблемы современного мегаполиса» / Под общей редакцией академика В.П. Казначеева.№3, – Новосибирск: ЗСО МСА, 2009 г. – с 217.
5. ГОСТ 25555.4-91 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения золы и щелочности общей и водорастворимой золы.
6. ГОСТ 27198-87 Виноград свежий. Методы определения массовой концентрации сахаров.
7. ГОСТ 28561-90 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сухих веществ и влаги.
8. ГОСТ 28562-90 Продукты переработки плодов и овощей. Рефрактометрический метод растворимых сухих веществ.
9. ГОСТ 8756.21-89 Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения жира.
- 10.Егоров Н.С., Самуилов В.Д. Биотехнология (в 8 кн.). Кн. 6. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. М.: Высш. шк., 1987. 145 с.
- 11.Макарова Е. И., Отурина И. П., Сидякин А. И. Прикладные аспекты применения микроводорослей – обитателей водных экосистем // Экосистемы, их оптимизация и охрана . 2009. Вып. 20. С. 120–133.
- 12.Носкова Н.Е., Сиренко А.С., Носкова М.А. Получение стабильных клеточных линий у кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pall.) Regel) путем

- соматического эмбриогенеза // Материалы международной заочной научной конференции «Проблемы современной аграрной науки» (15 октября 2011 г.) Красноярск. 2012. С. 64-66
13. Стыдов П.П., Свистелко, Д.А. Химический состав орехов сибирского кедра / Электроснабжение промышленных и сельскохозяйственных предприятий // Ползуновский альманах №1. 2004. С.43-45
 14. Субботина М. А. Научное обоснование и практическая реализация технологий молочных продуктов с использованием семян сосны кедровой сибирской // диссер. на соиск. доктора техн. наук. Кемерово, 2012.- 437 с.
 15. Уфимцева О.В, Миронов П.В.: Получение биомассы мицелия грибов вешенки обыкновенной и серно-желтого трутовика / Хвойные бореальной зоны., г.Красноярск, - 2009. - № 2. - С. 294-296.
 16. Филипцова Г. Г. Биохимия растений: метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самост. работы студентов / Г. Г. Филипцова, И. И. Смолич.– Мн.: БГУ, 2004.– 60 с.
 17. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. «Сельскохозяйственная биотехнология» — М.: «Высшая школа», 2003. — 469 с.
 18. Весвар MR, Nagmani R, Wann SR. 1990. Initiation of embryogenic cultures and somatic embryo development in loblolly pine (*Pinus taeda*). *Canadian Journal of Forest Research* 20: 810–817.
 19. Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M. and Bonga J.M. Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) Journal of Plant Biotechnology*. 2009.
 20. Gupta PK, Durzan DJ. 1986. Somatic polyembryogenesis from callus of mature sugar pine embryos. *Bio/Technology* 4: 643–645.
 21. Gupta PK, Durzan DJ. 1987. Biotechnology of somatic polyembryogenesis and plantlet regeneration in loblolly pine. *Bio/Technology* 5: 147–151.
 22. Lelu-Walter M.A., Pagues L.E. (2009) Simplified and improved somatic embryogenesis of hybrid. 23. larches (*Larix x eurolepis* and *Larix x marschlinsii*). *Perspectives for breeding*. *Ann. For. Sci.* 66. (1): 104.
 23. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. №1. P. 265-275.