



## Разработка оптимального метода получения изолированных белков гороха для использования в селекции на качество

© 2020. С. В. Бобков ✉, О. В. Уварова

ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур»,  
пос. Стрелецкий, Орловская область, Российская Федерация

В статье представлены результаты экспериментов по определению оптимальных параметров получения изолированных белков из зерна культурного и дикого гороха для использования в селекции на качество. В эксперименте использовали муку сортов гороха Софья и Родник, а также образца к-3370 дикого подвиды *Pisum sativum* L. ssp. *Elatius*. Изолированные белки получали на основе щелочной экстракции и изoeлектрической преципитации. Эксперименты проводили с использованием полного и дробного факторных планов с двумя уровнями факторов. Экстракцию и преципитацию белка проводили в два этапа, навеска муки составляла 100 г. Изучали влияние факторов (сорт, pH и время экстракции) на выход изолированного белка и эффективность экстракции, содержание сырого протеина и жира в белковых изолятах. Белковые изоляты характеризовались высоким (90,2-93,1 %) содержанием сырого протеина. Установлено, что рост pH выше 8 приводил к увеличению выхода изолята и уменьшению содержания сырого протеина. Полученные результаты указывают на возможность проведения эффективной щадящей экстракции белков гороха при пониженных значениях pH, что предотвращает образование токсичных химических веществ. Повышение pH способствовало увеличению содержания жира в белковом изоляте, особенно сильно и статистически значимо во второй экстракции. Вследствие этого, получение белковых изолятов для оценки генетических ресурсов гороха предложено проводить в результате одного цикла экстракции и осаживания. В экспериментах не выявлено существенных различий между культурным и диким горохом по технологическим показателям экстракции. Результаты исследований важны для оценки генетических ресурсов гороха по функциональным свойствам белковых изолятов.

**Ключевые слова:** генетические ресурсы, культурный и дикий горох, запасной белок, экстракция, преципитация, белковый изолят, сырой протеин, жир, эффективность экстракции

**Благодарности:** работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», по пункту 0636-2020-0008 "Мобилизация генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур для использования в селекционном процессе".

Авторы выражают искреннюю благодарность Е. В. Семёновой (ВИГРР им Н. И. Вавилова) за любезно предоставленный образец дикого гороха к-3370 из коллекции ВИР.

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

**Конфликт интересов:** авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

**Для цитирования:** Бобков С. В., Уварова О. В. Разработка оптимального метода получения изолированных белков гороха для использования в селекции на качество. *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. 2020;21(4):408-416. DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.4.408-416>

Поступила: 28.03.2020

Принята к публикации: 18.06.2020

Опубликована онлайн: 24.08.2020

## Development of optimal method of obtaining pea isolated proteins for use in breeding for quality

© 2020. Sergey V. Bobkov ✉, Olga V. Uvarova

Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, Streletskiy, Orel region,  
Russian Federation

The article provides the results of the experiments on determination of optimal parameters for obtaining isolated proteins from grains of cultivated and wild pea for use in breeding for quality. The flour of pea varieties Sophia, Rodnik and wild accession k-3370 (*Pisum sativum* L. ssp. *Elatius*) were used in the experiment. Isolated pea proteins were obtained based on alkaline extraction and isoelectric precipitation. The experiments were carried out with the use of complete and fractional factorial plans with two levels of factors. Extraction and precipitation of protein were conducted in two stages. One hundred grams of flour were used for extraction. Influence of factors (variety, pH, duration of extraction) on the yield of isolated protein, extraction efficiency, crude protein and fat content in protein isolates was studied. All isolates were characterized by high content of crude protein (90.2-93.1 %). It was determined that increase of pH higher than eight led to enhancement of protein yield and decrease of crude protein content. The results obtained raise the possibility of effective extraction at decreased level of pH that prevents the formation of toxic chemicals. Increase of pH promoted fat accumulation in protein isolate especially at the second stage of extraction. Thus, obtaining protein isolates for evaluation of pea genetic resources should be conducted during a single cycle of extraction and precipitation. The experiments have not revealed significant differences between cultivated and wild pea as to the technology of extraction. The results of the studies are important for evaluation of pea genetic resources according to functional properties of protein isolates.

**Keywords:** *genetic resources; cultivated and wild pea; storage protein; extraction; precipitation; protein isolate; crude protein; fat; efficiency of extraction*

**Acknowledgement:** the research was carried out under financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation within the state assignment to the Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops (item 0636-2020-0008 "Mobilization of genetic resources in grain legumes and groat crops for use in breeding").

Authors would like to acknowledge E. V. Semenova (N. I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources) for kindly provided wild accession of pea k-3370 from VIR collection.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

**Conflict of interest:** the authors declared no conflict of interest.

**For citations:** Bobkov S. V., Uvarova O. V. Development of optimal method of obtaining pea isolated proteins for use in breeding for quality. *Agrarnaya nauka Evro-Severo-Vostoka=Agricultural Science Euro-North-East*. 2020;21(4): 408-416. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.30766/2072-9081.2020.21.4.408-416>

Received: 28.03.2020

Accepted for publication: 18.06.2020

Published online: 24.08.2020

Зернобобовые культуры благодаря высокому содержанию ценного белка находят широкое применение в пищевой промышленности и кормопроизводстве. Запасные белки зернобобовых культур содержат много лизина, но, в отличие от злаков, мало серосодержащих аминокислот метионина и цистеина [1]. Среди бобовых культур белок гороха характеризуется наибольшим (7,0 %) содержанием лизина. Взаимодополняющие различия в аминокислотном составе у злаковых и бобовых культур являются основанием для экономически эффективного совместного использования продуктов переработки зерна этих культур.

В настоящее время технологическая, биохимическая и кулинарная оценка зерна селекционного материала гороха широко используется в селекционных программах. Глубокая переработка зерна, направленная на получение белковых изолятов, энзимрезистентного крахмала и клетчатки, предъявляет новые требования к оценке генетических ресурсов гороха. Использование изолированных белков гороха в пищевой промышленности в большей степени определяется их физико-химическими и функциональными свойствами [2, 3]. Важными функциональными свойствами изолированного белка являются растворимость, жиросдерживающая, эмульгирующая и пенообразующая способность [4]. Поэтому развитие новых методов оценки генетических ресурсов по качеству продуктов переработки является актуальным направлением исследований.

Повышенный интерес к генетическому разнообразию гороха, в том числе и его диким подвидам [5], можно сочетать с поиском и вовлечением в селекционный процесс новых аллелей, ответственных за высокое качество изолированных белков. Белки семян гороха, в основном, состоят из альбуминов (2S, 20-25 %) и глобулинов (7S, 11S, 55-65 %), фракция нерастворимых белков составляет

15-20 % [6]. Наиболее известными альбуминами являются PA1 (pea albumin 1, 11 кДа) и PA2 (pea albumin 2, 48-53 кДа), а также лектин, липоксигеназа, гликозидаза, ингибиторы амилаз и протеиназ. К глобулинам относятся легумин (11S), вицилин (7S) и конвицилин (7S). Запасные белки гороха (легумин, вицилин, конвицилин, PA1 и PA2) имеют различия в аминокислотном составе и, в зависимости от доли в совокупном белке, придают различные физико-химические свойства белковым изолятам [7]. Сорта гороха характеризуются широким диапазоном количественного отношения легумина к вицилину (0,2-1,5), что указывает на возможность ведения селекционной работы в направлении изменения соотношения указанных белков для создания сортов с улучшенным аминокислотным составом [8, 9]. Легумин и вицилин в качестве отдельных компонентов или в смеси формируют белковые гели хорошего качества, а конвицилин препятствует образованию гелей из белковых изолятов [8]. Вследствие этого белок, не содержащий конвицилина, является идеальным сырьём для пищевой промышленности. Ввиду отсутствия мутантов гороха, не содержащих конвицилин, использование в селекции гороха интрогрессивных аллелей изоформ конвицилина перспективно для создания сортов с высоким качеством изолированных белков [10].

Для проведения оценки генетических ресурсов гороха на качество белка необходимы исследования по оптимизации процесса получения белковых изолятов у представителей различных таксонов гороха. При этом важной характеристикой является эффективность экстракции изолированного белка, его чистота, отсутствие нежелательных химических модификаций, а также примеси крахмала и жира. Основные запасные белки гороха имеют одинаковую растворимость в щелочах [11], поэтому щелочную экстракцию с последующей изoeлектрической преципитацией

можно использовать для получения белковых изолятов у широкого набора генетических ресурсов гороха.

**Цель исследований** – определение оптимальных параметров получения белковых изолятов из зерна культурного и дикого гороха для использования в селекции на качество. В задачу исследования входило изучение влияния факторов «сорт», «рН раствора», «время экстракции» и «этап экстракции» на выход изолированного белка, содержание сырого протеина и жира в белковом изоляте.

**Материал и методы.** В эксперименте использовали муку сортов гороха Софья (2012) и Родник (2016) селекции ФГБНУ ФНЦ ЗБК, а также образца к-3370 дикого подвида *Pisum sativum* L. ssp. *elatius*, полученного из мировой коллекции ВИР.

Исследование состояло из двух экспериментов. В эксперименте 1 изучали влияние факторов «сорт», «рН» и «время экстракции» на выход изолята, содержание сырого протеина и жира в изоляте белка культурного гороха при первой и второй экстракциях. Уровнями фактора «сорт» являлись сорта Софья и Родник, «рН» – 8 и 10, «время экстракции» – 1 и 2 часа. Для уменьшения числа опытов эксперимент 1 проведен согласно схеме дробного факторного плана  $2^{(3-1)}$ . Указанную схему опыта использовали для первой и второй экстракций.

В эксперименте 2 проводили изучение влияния факторов «сорт» и «этап экстракции» на выход белкового изолята и содержание в нем сырого протеина и жира. Уровнями фактора «сорт» являлись сорт Софья и образец дикого гороха *elatius* к-3370 из коллекции ВИР, а уровнями фактора «этап экстракции» – 1-ая и 2-ая экстракции. Эксперимент 2 проведен с полным комбинированием уровней факторов  $2^2$ . Экстракцию проводили при рН = 9,8, которая продолжалась в течение 1 часа.

Семена гороха освобождали от оболочек на шелушильно-шлифовальной установке ЛШЯ-1 (Россия). Обрушенные семена гороха размалывали на мельнице Туре: QC-124 (Венгрия). Изолированные белки из муки гороха получали методом щелочной экстракции и изoeлектрической преципитации [12, 13]. Экстракцию белка проводили в два этапа, на первом этапе к 100 граммам муки приливали 1 дм<sup>3</sup> дистиллированной воды (весовое отношение муки к воде 1:10), уровень рН устанавливали в результате добавления 2 н. раствора NaOH. Суспензию перемешивали на шейкере при комнатной температуре (25 °C).

После экстракции суспензию центрифугировали (4500 об/мин) в течение 15 минут. На втором этапе к осадку, полученному после первого центрифугирования, добавляли 500 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и 1 н. раствор NaOH.

На каждом этапе экстракции суспензию центрифугировали для осаждения изолята рН надосадочной жидкости, представляющую раствор белка, доводили до 4,5 (изоэлектрическая точка белка гороха) с помощью 2 н. раствора HCl [13]. Выпадающий в осадок белок центрифугировали при 4500 об/мин. Изолированные белки высушивали при температуре 50 °C в условиях активной вентиляции.

Эксперименты по экстракции белка проводили с использованием рН-метра рН-150МИ (Измерительная техника ИТ, Россия), аппарата универсального для встряхивания жидкостей в колбах и пробирках (Россия) и центрифуги PC-6УХЛ42 (Россия). Содержание сырого протеина в муке и изолированном белке определяли методом Къельдаля с использованием автоматической системы UDK 152 и дигестора с программируемым нагревом DK 6, а определение содержания жира проводили на экстракторе SER 148 компании Velp Scientifica (Италия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Выход белка оценивали по количеству изолята, экстрагированного из 100 г муки в пересчете на абсолютно сухое вещество. Содержание сырого протеина и жира оценили в % на абсолютно сухое вещество.

Статистическую обработку данных по влиянию факторов «сорт», «рН», «время экстракции» и «этап экстракции» на выход изолированного белка, содержание сырого протеина и жира в белковом изоляте проводили с использованием многофакторного дисперсионного анализа. Влияние фактора на признаки качества изолята белка оценивали в соответствии с эффектом от изменения его уровня. В эксперименте анализировали главные эффекты, но не оценивали взаимодействия факторов.

**Результаты и их обсуждение.** Белковые изоляты получали из муки зерна сортов гороха Софья, Родник и образца дикого подвида гороха *elatius* коллекции ВИР к-3370 (рис.). Экстракцию и осаждение белка проводили в два этапа. На первом этапе белки экстрагировали из дисперсии муки в водопроводной воде путем добавления 1 дм<sup>3</sup> воды к 100 г муки. На втором этапе белки экстрагировали из осадка муки, полученного в результате центрифугирования и последующего диспергирования в 500 см<sup>3</sup> водопроводной воды.



а / а



б / б



в / в

Рис. Получение изолированных белков с использованием двух этапов щелочной экстракции и изoeлектрической преципитации: а) сырые и б) высушенные белковые изоляты, полученные из муки сортов гороха Софья и Родник в первом эксперименте; в) сырые изоляты из муки сорта гороха Софья и дикого образца коллекции ВИР к-3370 (*P. sativum* L. ssp. *elatius*), полученные во втором эксперименте. На рисунке показаны время экстракции – 1 и 2 часа и этап экстракции – 1 и 2. Изолированные белки высушивали при pH = 4,5 (изoeлектрическая точка белков гороха) /

Fig. Obtaining isolated proteins after two stages of alkaline extraction and isoelectric precipitation: a) crude and б) dried protein isolates obtained from flour of pea varieties Sophia and Rodnik in the first experiment, в) crude isolates derived from the flour of variety Sophia and wild accession from VIR collection k-3370 (*P. sativum* L. ssp. *elatius*) in the second experiment. In the figure, time of extraction (1 and 2 hours) and stage of extraction (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>) are shown. Isolated proteins were dried at pH = 4.5 (isoelectric point of pea proteins)

В первом эксперименте во время первой экстракции из 100 г муки гороха сортов Софья и Родник получили 13,7-15,8 г абсолютно сухого белка с содержанием сырого протеина 90,2-93,1 % (табл. 1). В результате второй экстракции получили 1,04-1,58 г изолирован-

ного белка с содержанием 67,8-80,3 % сырого протеина. Эффективность экстракции, указывающая на долю суммарного белка, полученного в результате двух этапов экстрагирования и осаждения к его содержанию в зерне, варьировала в интервале 62,1-74,2 %.

*Таблица 1 – Белковые изоляты из муки гороха сортов Софья и Родник /*  
*Table 1 – Protein isolates from flour of pea varieties Sophia and Rodnik*

| Сорт /<br>Variety               | pH | Время экс-<br>тракции, ч<br>/ Extraction<br>time, h | Содержание сырого<br>протеина, % асв* / Crude<br>protein content, % DM* |                           | Масса экстра-<br>гированного<br>белка, г асв /<br>Mass of extracted<br>protein, g DM | Суммарная<br>масса белка,<br>г асв /<br>Sum mass of<br>protein, g DM | Эффектив-<br>ность экс-<br>тракции, % /<br>Efficiency of<br>extraction, % |
|---------------------------------|----|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
|                                 |    |                                                     | в семенах /<br>in seeds                                                 | в изоляте /<br>in isolate |                                                                                      |                                                                      |                                                                           |
| 1 экстракция / Fist extraction  |    |                                                     |                                                                         |                           |                                                                                      |                                                                      |                                                                           |
| Софья /<br>Sophia               | 8  | 2                                                   | 26,4                                                                    | 93,06                     | 13,7                                                                                 | 15,28                                                                | 64,3                                                                      |
| Софья /<br>Sophia               | 10 | 1                                                   |                                                                         | 90,23                     | 14,36                                                                                | 15,52                                                                | 65,3                                                                      |
| Родник /<br>Rodnik              | 8  | 1                                                   | 25,23                                                                   | 92,18                     | 12,54                                                                                | 14,11                                                                | 62,1                                                                      |
| Родник /<br>Rodnik              | 10 | 2                                                   |                                                                         | 90,83                     | 15,81                                                                                | 16,85                                                                | 74,2                                                                      |
| 2 экстракция / Second extration |    |                                                     |                                                                         |                           |                                                                                      |                                                                      |                                                                           |
| Софья /<br>Sophia               | 8  | 2                                                   | 26,4                                                                    | 80,27                     | 1,58                                                                                 | 15,28                                                                | 64,3                                                                      |
| Софья /<br>Sophia               | 10 | 1                                                   |                                                                         | 72,73                     | 1,16                                                                                 | 15,52                                                                | 65,3                                                                      |
| Родник /<br>Rodnik              | 8  | 1                                                   | 25,23                                                                   | 77,78                     | 1,57                                                                                 | 14,11                                                                | 62,1                                                                      |
| Родник /<br>Rodnik              | 10 | 2                                                   |                                                                         | 67,83                     | 1,04                                                                                 | 16,85                                                                | 74,2                                                                      |

\* асв – абсолютно сухое вещество / \* DM – dry matter

Во втором эксперименте белки экстрагировали из 100 муки сорта Софья и образца дикого подвида *elatius* к-3370 (табл. 2). После проведения первой и второй экстракций масса белка достигала 13,2-17,7 г и 2,3-3,1 г с содержанием сырого протеина 92,2-92,3 % и 81,6-84,8 % соответственно. Как у дикого, так

и культурного гороха в результате первой и второй экстракций выход белка составил 85 и 15 % соответственно. Суммарная масса белка и эффективность экстракции у дикого гороха была выше (20,8 г и 78,8 % соответственно), чем у культурного (15,5 г и 65,2 %).

*Таблица 2 – Белковые изоляты из муки гороха дикого и культурного гороха /*  
*Table 2 – Protein isolates from flour of wild and cultivated pea*

| Сорт / Variety | Этап экстракции / Stage of extraction | Содержание сырого протеина, % асв* / Crude protein content, % DM* |                        | Масса экстрагированного белка, г асв (%) / Mass of extracted protein, g DM (%) | Суммарная масса белка, г асв / Sum mass of protein, g DM | Эффективность экстракции, % / Efficiency of extraction, % |
|----------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
|                |                                       | в семенах / in seeds                                              | в изоляте / in isolate |                                                                                |                                                          |                                                           |
| к-3370         | 1                                     | 29,36                                                             | 92,16                  | 17,71 (85,1 %)                                                                 | 20,82                                                    | 78,8                                                      |
|                | 2                                     |                                                                   | 84,75                  | 3,11 (14,9 %)                                                                  |                                                          |                                                           |
| Софья / Sophia | 1                                     | 26,4                                                              | 92,33                  | 13,21 (85,3 %)                                                                 | 15,50                                                    | 65,2                                                      |
|                | 2                                     |                                                                   | 81,60                  | 2,28 (14,7 %)                                                                  |                                                          |                                                           |

\* асв – абсолютно сухое вещество / \* DM – dry matter

Содержание сырого протеина в наших белковых изолятах соответствует данным литературных источников, а эффективность экстракции и последующего осаждения белков приближается к заявленной в научной литературе 80 % отметке только у образца дикого гороха к-3370 [3, 14, 15]. Относительно низкая эффективность получения белковых изолятов в наших экспериментах, по-видимому, обусловлена небольшими навесками муки и большими потерями изолированного белка в результате прилипания к стенкам химической посуды. Вполне возможно, что увеличение массы муки, направляемой на экстракцию, позволит повысить показатель эффективности экстракции. Исходя из анализа наших экспериментов можно предположить, что увеличение числа оборотов центрифуги может увеличить количество осажденного белка.

*Влияние факторов «сорт», «рН» и «время экстракции» на выход белкового изолята, содержание сырого протеина и жира*

в белковом изоляте гороха. В первом эксперименте проведены исследования влияния факторов «сорт», «рН» и «время экстракции» на выход белкового изолята, суммарный выход белка (после первой и второй экстракций), эффективность экстракции (доля экстрагированного и осажденного белка к его содержанию в муке), содержание сырого протеина и жира в изоляте белка при первой и второй экстракциях у культурного гороха. В эксперименте использовали сорта Софья и Родник, применяли два уровня рН – 8 и 10, экстракцию белка проводили в течение 1 и 2 часов.

Из трех исследованных факторов на выход белка статистически значимо влиял только фактор «рН» при первой экстракции (табл. 3). Увеличение рН на 2 единицы (с 8 до 10) приводило к существенному росту выхода изолята на 1,82 г (14,3 %) при первой и статистически не подтвержденному снижению на 0,44 г (30,2 %) при второй экстракции.

Таблица 3 – Статистически значимое влияние факторов «рН» и «сорт» на выход изолированных белков, содержание сырого протеина и жира в белковых изолятах /

Table 3 – Significant influence of factors «pH» and «variety» on the yield of isolated proteins, content of crude protein and fat in protein isolates

| Фактор /<br>Factor                                              | Уровень<br>фактора / Level<br>of factor | Первая экстракция / First extraction |            |         | Вторая экстракция / Second extraction |          |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|------------|---------|---------------------------------------|----------|---------|
|                                                                 |                                         | $\bar{X}$                            | $p$        | $R^2$   | $\bar{X}$                             | $p$      | $R^2$   |
| Выход изолята, г асв* / Isolate yield, g DM                     |                                         |                                      |            |         |                                       |          |         |
| pH                                                              | 8                                       | 13,12                                | 0,046892** | 0,99583 | 1,575                                 | 0,073387 | 0,98701 |
|                                                                 | 10                                      | 15,09                                |            |         | 1,1                                   |          |         |
| Содержание сырого протеина, % асв / Crude protein content, % DM |                                         |                                      |            |         |                                       |          |         |
| pH                                                              | 8                                       | 92,6                                 | 0,042581   | 0,99603 | 79,025                                | 0,087173 | 0,98414 |
|                                                                 | 10                                      | 90,5                                 |            |         | 70,280                                |          |         |
| Содержание жира в изоляте, % асв / Fat content, % DM            |                                         |                                      |            |         |                                       |          |         |
| Сорт /<br>Variety                                               | Софья / Sophia                          | 1,7725                               | 0,230157   | 0,91846 | 9,45                                  | 0,008966 | 0,99987 |
|                                                                 | Родник / Rodnik                         | 2,07                                 |            |         | 11,58                                 |          |         |
| pH                                                              | 8                                       | 1,805                                | 0,286900   | 0,91846 | 9,78                                  | 0,012990 | 0,99987 |
|                                                                 | 10                                      | 2,0375                               |            |         | 11,25                                 |          |         |

\* асв – абсолютно сухое вещество / DM – dry matter

\*\* жирным шрифтом выделены значимые эффекты факторов / significant effects of factors are highlighted in bold

Увеличение рН с 8 до 10 оказывало обратный эффект на содержание сырого протеина и приводило к его уменьшению на 2,1 % при первой экстракции и на 8,7 % при второй. На содержание сырого протеина в белковых изолятах фактор рН оказывал существенное влияние только при первой экстракции, хотя

и в данных по второй экстракции вероятность ошибочного отклонения нулевой гипотезы составила 0,087173, что достаточно близко к урону значимости  $\alpha = 0,05$ .

На содержание жира в белковом изоляте существенное влияние оказывали факторы «сорт» и «рН» и только при второй экстрак-

ции. Белковые изоляты сортов Софья и Родник, полученные в процессе 1-й экстракции, содержали 1,8 и 2,1 % жира, а изоляты, выделенные во 2-й экстракции – 9,5 и 11,6 % соответственно. Увеличение pH с 8 до 10 приводило к статистически значимому повышению содержания жира во второй экстракции с 9,8 до 11,3 %.

Из литературных источников известно, что растворимость белков и эффективность экстракции повышаются с ростом pH [13]. При этом следует обратить внимание на то, что при значениях pH выше 10 остатки цистеина и серина могут конвертироваться в дегидроаланин, который далее взаимодействует с остатками лизина, образуя нефротоксическое соединение лизиноаланин [16, 17]. Увеличение pH > 11 приводит к разбуханию крахмала и последующему засорению белковых изолятов крахмалом [11]. Достижение в нашем эксперименте баланса между увеличением выхода белкового изолята и уменьшением содержания в нем сырого протеина при увеличении pH с 8 до 10 указывает на возможность проведения эффективной экстракции белков гороха при пониженных значениях pH (меньше 10), что предотвращает образование токсичных химических веществ.

Таким образом, изучение влияния факторов «сорт», «pH» и «время экстракции» на выход белкового изолята, содержание сырого протеина и жира в изоляте при первой и второй экстракциях у культурного гороха позволило выявить ряд закономерностей. Показано,

что рост pH выше 8 приводит к статистически значимому увеличению выхода изолята при первой и снижению при второй экстракции, а также уменьшению содержания сырого протеина в обеих экстракциях. Повышение pH способствовало увеличению жира в белковом изоляте, особенно существенно и статистически значимо во второй экстракции. Содержание жира в белковых изолятах не зависело от его первоначального уровня в муке и, возможно, определялось генотипическими особенностями белкового комплекса гороха.

Рост интереса к диким подвидам гороха в качестве источника хозяйственно ценных признаков поднимает вопрос о их вовлечении в селекционный процесс. При этом особую актуальность приобретает изучение качества семян дикого гороха в плане глубокой переработки и получения белковых изолятов. Поэтому во втором эксперименте проведено сравнительное изучение сорта Софья и дикого образца коллекции ВИР к-3370 (*P. sativum* L. ssp. *elatius*). Семена сорта Софья и дикого образца к-3370 различались по массовой доле семенных оболочек и биохимическим параметрам. Они содержали 9,7 и 13,4 % оболочек, 26,40 и 29,36 % сырого протеина (табл. 2), 1,1 и 0,83 % жира соответственно.

Экстракцию и осаждение белка у культурного и дикого гороха проводили в течение 1 часа при pH = 9,8 (табл. 4). Изучали влияние факторов «сорт» и «этап экстракции» на выход изолята из 100 г муки, содержание в нем сырого протеина и жира.

Таблица 4 – Влияние генотипа и этапа экстракции-осаждения на выход изолята, содержание сырого протеина и жира в белковом изоляте (pH = 9,8; время экстракции – 1 час, осаждение белка при pH = 4,5), % /  
Table 4 – Influence of genotype and stage of extraction-precipitation on the yield of isolate, content of crude protein and fat in protein isolate (pH = 9.8; duration of extraction – 1 hour, precipitation at pH = 4.5), %

| Фактор /<br>Factor                       | Уровень фактора /<br>Level of factor | Выход изолята, г /<br>Isolate yield, g |          |                | Содержание, % / Content, %         |          |                |            |          |                |
|------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|----------|----------------|------------------------------------|----------|----------------|------------|----------|----------------|
|                                          |                                      |                                        |          |                | сырого протеина /<br>crude protein |          |                | жира / fat |          |                |
|                                          |                                      | $\bar{X}$                              | p        | R <sup>2</sup> | $\bar{X}$                          | p        | R <sup>2</sup> | $\bar{X}$  | p        | R <sup>2</sup> |
| Сорт (образец) /<br>Variety (accession)  | Софья /<br>Sophia                    | 7,74861                                | 0,384408 | 0,98057        | 86,965                             | 0,534324 | 0,96841        | 3,740      | 0,377661 | 0,96368        |
|                                          | к-3370                               | 10,40961                               |          |                | 88,455                             |          |                | 2,420      |          |                |
| Этап экстракции /<br>Stage of extraction | 1                                    | 15,46066                               | 0,090929 | 0,98057        | 92,245                             | 0,028936 | 0,94297        | 0,885      | 0,059908 | 0,88377        |
|                                          | 2                                    | 2,69756                                |          |                | 83,175                             |          |                | 5,275      |          |                |

В целом, при проведении эксперимента не выявлено существенных различий между культурным и диким горохом по технологическим показателям экстракции. Существенное влияние на содержание сырого протеина оказывал фактор «этап экстракции». При первой экстракции как выход изолята, так и содержание в нем сырого протеина было выше, чем при второй. Содержание жира в изолятах второй экстракции было в 6 раз выше в сравнении с первой, но в данном эксперименте этот факт не получил статистического подтверждения, хотя вычисленная вероятность ( $p = 0,059908$ ) была достаточно близка к принятому уровню значимости ( $\alpha = 0,05$ ).

**Заключение.** Проведено изучение параметров получения изолированных белков гороха для использования в селекции на качество. Полученные в наших экспериментах изолированные белки характеризовались высоким (90,2-93,1 %) содержанием сырого протеина. Изучено влияние факторов «сорт», «рН» и «время экстракции» на выход белкового изолята, содержание сырого протеина и жира в изо-

ляте белка у культурного и дикого гороха при первой и второй экстракциях. Установлено, что рост рН выше 8 приводил к увеличению выхода изолята при первой и его снижению при второй экстракции, а также уменьшению содержания сырого протеина в обеих экстракциях. Полученные результаты указывают на возможность проведения эффективной щадящей экстракции белков гороха при пониженных значениях рН, что предотвращает образование токсичных химических веществ. В проведенных экспериментах повышение рН способствовало увеличению жира в белковом изоляте, особенно сильно и статистически значимо во второй экстракции. Вследствие этого, получение белковых изолятов для оценки генетических ресурсов гороха следует проводить в результате одного цикла экстракции и осаждения. В эксперименте не выявлено существенных различий между культурным и диким горохом по технологическим показателям экстракции, что дает основание для использования разрабатываемого метода в оценке широкого разнообразия селекционного материала.

### References

1. Signor C. L., Aime D., Bordat A., Belgazi M., Labas V., Couzy O., Young T. B., Prosperi J.-M., Leprince O., Tompson R. D., Buitink J., Burstin J., Gallardo K. Genome-wide association studies with proteomics data reveal genes important for synthesis, transport and packaging of globulins in legume seeds. *New Phytologist*. 2017;214(4):1597-1613. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14500>
2. Adebisi A. P., Aluko R. E. Functional properties of protein fractions obtained from commercial yellow field pea (*Pisum sativum* L.) seed protein isolate. *Food Chemistry*. 2011;128(4):902-908. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.116>
3. Karaca A. C., Low N., Nickerson M. Emulsifying properties of chickpea, faba bean, lentil and pea proteins produced by isoelectric precipitation and salt extraction. *Food Research International*. 2011;44(9):2742-2750. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.012>
4. Lam A. C. Y., Karaca A. C., Tyler R. T., Nickerson M. T. Pea protein isolates: structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*. 2018;34(2):126-147. DOI: <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1242135>
5. Smýkal P., Hradilová I., Trněný O., Brus J., Rathore A., Bariotakis M., Das R. R., Bhattacharyya D., Richards C., Coyne C. J., Pirintsos S. Genomic diversity and macroecology of the crop wild relatives of domesticated pea. *Sci Rep*. 2017;7(1):17384. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17623-4>
6. Gabriel I., Quillien L., Cassecuelle F., Marget P., Juin H., Lessire M., Seve B., Duc G., Burstin J. Variation in seed protein digestion of different pea (*Pisum sativum* L.) genotypes by cecectomized broiler chickens: 2. Relation between in vivo protein digestibility and pea seed characteristics, and identification of resistant pea polypeptides. *Livestock Science*. 2008;113(2-3):262-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.04.005>
7. Casey R., Short M. N. Variation in the amino acid composition of legumin from *Pisum*. *Phytochemistry*. 1981;20(1):21-23. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)85210-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)85210-7)
8. Tzitzikas E. N., Vincken J. P., Groot J., Gruppen H., Visser R. G. Genetic variation in pea seed composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(2):425-433. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0519008>
9. Burstin J., Gallardo K., Mir R. R., Varshney R. K., Duc G. Improving protein content and nutrition quality. In *Biology and Breeding of Food Legumes*, Pratap A. and Kumar J. (eds.), Wallingford, CT: CAB International, 2011. 314-328. DOI: <https://doi.org/10.1079/9781845937669.0314>

10. Bobkov S. V., Selikhova T. N. *Poluchenie mezhhvidovykh gibridov gorokha dlya ispol'zovaniya v markernoy seleksii na vysokoe kachestvo belka*. [Obtaining pea interspecific hybrids for use in marker assistant selection on high protein quality]. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury* = Legumes and Groat Crops. 2019;(3(31)):15-22. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.24411/2309-348X-2019-11108>
11. Hoang H. D. Evaluation of pea protein and modified pea protein as egg replacers (Doctoral dissertation). North Dakota State University: Fargo, ND, 2012.
12. Bobkov S. V., Uvarova O. V. *Perspektiva ispol'zovaniya gorokha dlya proizvodstva izolyatov zapasnykh belkov*. [Peas use perspectives for production of storage proteins isolates]. *Zemledelie*. 2012;(8):47-48. (In Russ.).
13. Shand P. J., Ya H., Pietrasik Z., Wanasundara P. K. J. P. D. Physicochemical and textural properties of heat-induced pea protein isolate gels. *Food Chemistry*. 2007;102(4):1119-1130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.060>
14. Khrulev A. A., Beschetnikova N. A., Fedotov I. A. *Tendentsii razvitiya i ekonomicheskie aspekty proizvodstva gorokhovogo proteina*. [Development Tendencies and Economic Aspects of the Pea Protein Production]. *Pishchevaya promyshlennost'*. 2016;(4):24-29. (In Russ.). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tendentsii-razvitiya-i-ekonomicheskie-aspekty-proizvodstva-gorokhovogo-proteina/viewer>
15. Kudryashov V. L. *Importozameshchayushchaya tekhnologiya proizvodstva pishchevykh kontsentrata i izolyata belka, krakhmala i kletchatki iz gorokha s primeneniem baromembrannykh protsessov*. [Import-substituting technology for the production of food concentrate and isolate of protein, starch and fiber from peas using baromembrane processes]. *Pishchevaya industriya*. 2019;(1(39)):46-50. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.24411/9999-008A-2019-10003>
16. Otterburn M. S. Protein Crosslinking. In: Protein Quality and the Effects of Processing. Phillips R.D. and Finley J. W. (eds.), Marcel Dekker, New York, 1989.
17. Fabian C., Ju Y. H. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011;51(9):816-827. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2010.482678>

#### **Сведения об авторах**

✉ **Бобков Сергей Васильевич**, кандидат с.-х. наук, зав. лабораторией физиологии и биохимии растений, ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», ул. Молодежная, д. 10, корп. 1, пос. Стрелецкий, Орловский район, Орловская область, Российская Федерация, 302502, e-mail: [office@vniizbk.orel.ru](mailto:office@vniizbk.orel.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8146-0791>, e-mail: [svbobkov@gmail.com](mailto:svbobkov@gmail.com)

**Уварова Ольга Васильевна**, инженер-исследователь лаборатории физиологии и биохимии растений, ФГБНУ «Федеральный научный центр зернобобовых и крупяных культур», ул. Молодежная, д. 10, корп. 1, пос. Стрелецкий, Орловский район, Орловская область, Российская Федерация, 302502, e-mail: [office@vniizbk.orel.ru](mailto:office@vniizbk.orel.ru), e-mail: [olgauvarova528@gmail.com](mailto:olgauvarova528@gmail.com)

#### **Information about the authors**

✉ **Sergey V. Bobkov**, PhD in Agricultural science, head of the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, 10, building 1, Molodezhnaya street, Streletsky, Orlovskiy district, Orel region, Russian Federation, 302502, e-mail: [office@vniizbk.orel.ru](mailto:office@vniizbk.orel.ru), ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8146-0791>, e-mail: [svbobkov@gmail.com](mailto:svbobkov@gmail.com),

**Olga V. Uvarova**, engineer-researcher, the Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, Federal Scientific Center of Legumes and Groat Crops, 10, building 1, Molodezhnaya street, Streletsky, Orlovskiy district, Orel region, Russian Federation, 302502, e-mail: [office@vniizbk.orel.ru](mailto:office@vniizbk.orel.ru), e-mail: [olgauvarova528@gmail.com](mailto:olgauvarova528@gmail.com)

✉ – Для контактов / Corresponding author