

УДК 581.192.7:633.853.52

ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЧЕСТВА СЕМЯН СОИ С ПОМОЩЬЮ ИК-СПЕКТРОМЕТРИИ

С.Г. Ефименко,

кандидат биологических наук

Л.А. Кучеренко,

кандидат технических наук

С.К. Ефименко,

кандидат биологических наук

Я.А. Нагалева,

младший научный сотрудник

ФГБНУ ВНИИМК

Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17

E-mail: efimenko-km@yandex.ru

Для цитирования: Ефименко С.Г., Кучеренко Л.А., Ефименко С.К., Нагалева Я.А. Оценка основных показателей качества семян сои с помощью ИК-спектроскопии // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2016. – Вып. 3 (167). – С. 33–38.

Ключевые слова: соя, семена, масличность, содержание белка и ТИА, ИК-спектроскопия, градуировочная модель.

Целью данной работы явилась разработка градуировочных моделей для ИК-анализатора MATRIX-I для оценки основных показателей сои в целых семенах, что очень важно для селекционеров, т.к. сохраняется особо ценный селекционный материал. Исследования проведены на семенах сои, выращенных отделом сои, лабораторией технологии возделывания сои, опытными станциями ВНИИМК и сторонними организациями в 2014–2015 гг. в лаборатории биохимии ВНИИМК. Определение белка, масла и ТИА проводили в соответствии с нормативными методами. Спектры регистрировались в соответствии с руководством на ПО OPUS в спектральном диапазоне 3500–12500 см⁻¹ с разрешением 16 см⁻¹ на ИК-анализаторе MATRIX-I фирмы Bruker Optics (Германия). На долю протеина, масла, влаги приходится более 70 % от всех веществ, и также существенное значение имеет активность ингибиторов трипсина (ТИА) как показателя безопасности, поэтому для сои они являются основными показателями качества семян. Для выполнения программы по градуировке ИК-анализатора по-

добрана партии из 206 образцов семян сои с максимально возможным диапазоном варьирования по содержанию протеина (32,2–46,6 %), масла (17,4–26,1 %) и ТИА (14,2–32,3 мг/г). Погрешность определения содержания протеина, масла и ТИА, полученная по градуировочным моделям с помощью ИК-спектроскопии, незначительно превышает стандартный метод. Разработаны градуировочные модели для определения содержания основных показателей качества семян в кювете диаметром 51 мм (навеска 20–30 г). Это позволяет оперативно проводить оценку селекционного материала с высокой скоростью – более 100 образцов за рабочую смену. Стало возможным анализировать семена сортообразцов селекционного питомника и индивидуально отобранных растений, сохраняя ценный селекционный материал. При отборе пробы на анализ необходимо тщательно перемешивать средний образец, а для старших питомников отбирать пробы в двух повторностях и усреднять результаты.

UDC 581.192.7:633.853.52

Evaluation of the general qualitative traits of soybean seeds using IR-spectrometry.

Efimenko E.G., candidate of biology

Kucherenko L.A., candidate of engineering

Efimenko S.K., candidate of biology

Nagalevskaya Ya.A., junior researcher

FGBNU VNIIMK

17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia

E-mail: efimenko-km@yandex.ru

Key words: soybean, seeds, oil content, protein and TIA content, IR-spectrometry, calibration model.

The purpose of this work is development of calibrating models for IR-analyzer MATRIX-I for evaluation of the general soybean traits in whole seeds because it is very important for breeders as it helps to save very valuable seeds for breeding works. Researches were conducted in the laboratory of biochemistry of VNIIMK. There were used seeds produced by the soybean department, the laboratory of soybean crop management, the experimental stations of VNIIMK and other organizations in 2014–2015. Protein, oil and TIA contents were determined in accordance to official regulations. Spectra were registered according to a manual for OPUS software in spectral range 3500–12500 cm⁻¹ with a resolution 16 cm⁻¹ on IR-analyzer MATRIX-I by Bruker Optics (Germany). Share of protein, oil and moisture is more than 70% of all substances, and activity of trypsin inhibitors as safety indicator has an important mean-

ing for soybean seeds. Thus, they are the main indicators of soybean seeds quality. To calibrate IR-analyzer a lot consisting of 206 samples of soybean seeds were used, the seeds had a maximally possible variation range on protein content – 32.2–46.6%, oil content – 17.4–26.1% and TIA content – 14.2–32.3 mg per g. An error of determination of protein, oil and TIA contents in calibrating models for IR-spectrometry increases insignificant the standard method. The calibrating models for determination of contents of the seeds general qualitative traits in cuvette with diameter 51 mm (subsample 20–30 g) were developed. This allows quickly and efficiently evaluating seeds for breeding – more than 100 samples per a working shift. It became possible to analyze seeds of varietal samples from a breeding nursery and individually selected plants saving valuable breeding seeds. When selecting a sample for analysis it is necessary to mix carefully a middle sample, and for senior nurseries – to select samples in two repetitions and average the results.

Введение. Соя, вследствие уникального химического состава семян, среди других сельскохозяйственных культур занимает исключительное положение по многообразию видов применения [1; 2]. Поэтому во ВНИИМК ведется селекция сои не только на увеличение урожайности, но и на качественные показатели семян, такие как содержание белка и масла, также контролируется степень активности ингибиторов трипсина (ТИА), как показателя безопасности [3].

Контроль качества семян сои в лаборатории биохимии ведется с помощью спектрального прибора Nir System 4500 с 1993 г. Благодаря довольно низкой погрешности разработанных калибровочных уравнений для ИК-анализатора по определению основных показателей, селекционерам удалось создать такие высокобелковые сорта сои, как Фора, Валента, Веста.

Однако пробоподготовка образцов занимала много времени. Необходимо было семена высушивать до определенного интервала значений по влажности, в котором прибор имел линейную зависимость между концентрацией компонента и

спектральными данными. Далее следовало предварительное измельчение на мельнице грубого помола, после чего образец измельчался в муку на мельнице с более тонкой тониной помола, затем тщательно перемешивался. После каждого образца нужно было тщательно чистить мельницу. Эта процедура была довольно трудоемкой и вредной для здоровья.

Для уменьшения затрат проведения селекционной работы на современном уровне, облегчения труда сотрудников и сокращения времени анализа в лаборатории биохимии получен спектральный прибор нового поколения MATRIX-I фирмы Bruker Optics (Германия), который освобождает от трудоемкой подготовки образцов к анализу. Определение показателей качества на этом приборе выполняется в измельченных семенах в соответствии с ГОСТ Р 53600-2009 (Семена масличные, жмыхи и шроты. Определение влаги, жира, протеина и клетчатки методом спектроскопии в ближней инфракрасной области) [4]. Целью данной работы явилась разработка градуировочных моделей для оценки основных показателей сои в целых семенах, что очень важно для селекционеров, т.к. сохраняется особо ценный селекционный материал.

Для разработки моделей и выполнения количественного анализа были проведены исследования, которые подразумевали решение следующих задач:

- подбор градуировочной партии образцов с максимально возможным диапазоном варьирования по содержанию белка, масла и ТИА;
- разработку градуировочной модели для определения белка, масла, влаги и ТИА в целых семенах сои;
- создание метода в программе рутинного анализа с одновременным определением белка, масла, влаги и ТИА;
- предварительную оценку разработанной градуировочной модели, ее уточнение, проверку на селекционном материале и оценку метрологического значения погрешностей.

Материалы и методы. Исследования проведены в лаборатории биохимии ВНИИМК на семенах сои, выращенных отделом сои, лабораторией технологии возделывания сои, опытными станциями ВНИИМК и сторонними организациями в 2014–2015 гг.

Определение белка, масла и ТИА проводили в соответствии с нормативными методами [4; 5; 6; 7]. Спектры образцов семян сои регистрировались в спектральном диапазоне 3500–12500 см⁻¹ с разрешением 16 см⁻¹, в соответствии с руководством на программное обеспечение (ПО) OPUS ИК-спектрометра МАТРИХ-I.

Результаты и обсуждение. В процессе формирования партии образцов для построения модели определения протеина в семенах сои было отобрано 206 образцов с максимально возможным диапазоном варьирования содержания белка – от 32,2 до 46,6 %, что позволило получить устойчивую модель. Построение модели было начато с регистрации градуировочных спектров. Спектры каждого образца регистрировались в трех повторностях с пересыпанием в кювете диаметром 51 мм (навеска 20–30 г). В результате получено 618 спектров, используя которые, методом векторной нормализации была построена градуировочная модель по определению содержания протеина в семенах сои (ГСП) (рис. 1).

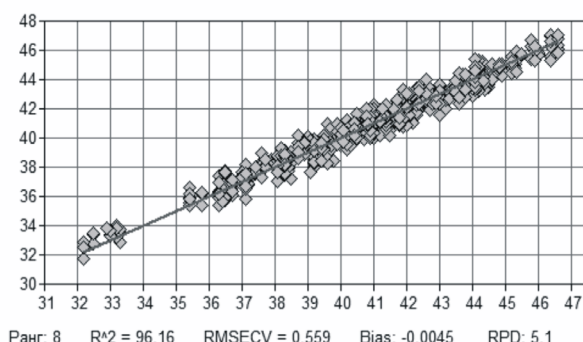


Рисунок 1 – График предсказанных значений содержания белка (ось Y) по сравнению с истинными значениями содержания белка (ось X) модели ГСП

Данная модель имела коэффициент детерминации $R^2 = 96,5$ %. Ошибка предсказания составила 0,536, что говорит о ее удовлетворительном качестве. Качество модели также определяется и количеством необходимых факторов для поиска множественной корреляции между концентрацией компонента и спектральными данными. Эти факторы определяются рангами. Чем меньше ранг, тем лучше модель. Полученная модель имеет восемь рангов, что является хорошим показателем качества градуировки.

Для проверки применимости градуировочной модели ГСП была проанализирована проверочная партия семян в том же диапазоне по содержанию белка, что и при разработке модели (табл. 1).

Таблица 1

Проверка градуировочной модели ГСП для определения протеина в семенах сои

г. Краснодар, ВНИИМК, 2016 г.

Образец	Содержание протеина, %		Разница, %	
	химический анализ	по ГСП	абсолютная	относительная
208	39,4	39,1	-0,3	0,76
209	40,4	40,6	+0,2	0,49
211	41,4	41,6	+0,2	0,48
89	37,4	37,5	+0,1	0,27
213	42,6	43,4	+0,8	1,86
86	37,1	37,0	-0,1	0,27
214	43,5	43,3	-0,2	0,46
85	37,1	38,0	+0,9	2,38
215	44,2	44,7	+0,5	1,12
218	43,0	43,1	+0,1	0,23
224	42,9	42,6	-0,3	0,70
225	40,8	41,3	+0,5	1,22
227	46,6	46,8	+0,2	0,43
229	44,6	44,6	±0,0	0,00
Диапазон	37,1–46,6	37,0–46,8	0,0–0,9	0,00–2,38
Среднее	41,5	41,7	0,31	1,52

Различия между спектральными показателями и химическими анализами в абсолютных единицах в среднем составили 0,31 %, а в относительных единицах – 1,52 %.

Полученная модель по определению содержания белка в целых семенах позволяет оценивать селекционный материал с точностью в среднем около 0,3 % с

максимальной ошибкой в единичных определениях до 1 % в абсолютных единицах.

Для создания градуировочной модели определения масла в семенах сои нами была подобрана партия семян в количестве 72 образцов, которые были проанализированы с использованием ЯМР-анализатора АМВ 1006М на содержание масла по гостированной методике [5]. Масличность семян различных образцов сои варьировала от 17,4 до 26,1 %.

Спектры каждого образца регистрировались прибором MATRIX-I в трех повторностях с пересыпанием в кювете диаметром 51 мм, в результате чего было получено 216 спектров.

На основании этих данных с помощью метода первой производной совместно с методом MSC (мультипликативная коррекция рассеивания) была разработана предварительная градуировочная модель определения масла в семенах сои (далее ГСМ) (рис. 2).

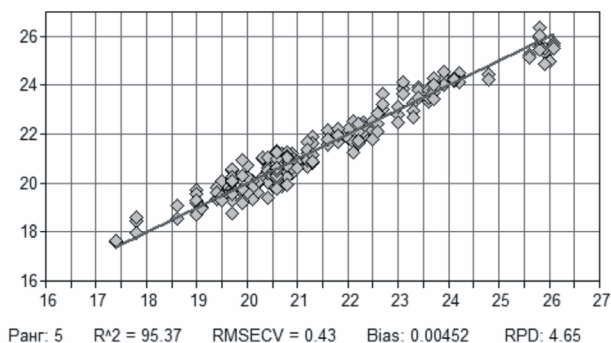


Рисунок 2 – График предсказанных значений содержания масла (Y) по сравнению с истинными значениями содержания масла (X) градуировочной модели ГСМ

Данная модель была выбрана из 10 лучших градуировочных моделей, т.к. имела пять рангов с ошибкой предсказания 0,43. Теоретически максимальная ошибка предсказания единичного измерения не должна превысить 1,2 % ($0,43 \times 2,8=1,2$). Коэффициент детерминации полученной зависимости составил 95,37 %. Качественные показатели полученной модели

ГСМ оценили на проверочной партии образцов сои, представленных в таблице 2.

Таблица 2

Проверка градуировочной модели ГСМ для определения содержания масла в семенах сои

г. Краснодар, ВНИИМК, 2016 г.

Образец	Содержание масла, %		Разница, %	
	ЯМР анализ	по ГСМ	абсолютная	относительная
1	17,0	16,7	-0,3	1,84
2	17,7	18,0	-0,3	1,68
3	18,6	18,6	±0,0	0,00
4	18,4	19,0	-0,6	3,21
5	20,7	19,7	-1,0	4,93
6	19,0	20,2	-1,2	6,12
7	20,6	20,6	±0,0	0,00
8	21,4	21,0	+0,6	2,83
9	21,3	21,5	+0,2	0,93
10	21,8	22,1	+0,3	1,37
Диапазон	17,0–21,8	16,7–22,1	-1,2–0,6	0,00–6,12
Среднее	19,6	19,7	0,45	2,35

Полученные результаты предсказаний показали, что только образец № 6 достиг крайнего значения погрешности в 1,2 %, а в среднем абсолютная погрешность не превысила 0,5 %. При оценке масличности сои в целых семенах полученная градуировочная модель ГСМ показала, что большая часть образцов имеет погрешность определения не более 0,3 %.

Существенное значение для семян сои в качестве показателя безопасности имеет активность ингибиторов трипсина (ТИА), поэтому принято решение по разработке градуировочной модели по определению ТИА в семенах сои. Была подобрана партия образцов семян в количестве 197 штук с вариабельностью признака от 14,2 до 32,3 мг/г.

Всего был зарегистрирован 591 спектр. Этого количества было достаточно для применения метода построения модели, сущность которого состоит в том, чтобы разделив спектры на калибровочный (50 % от общего количества) и тестовый (или проверочный) набор спектров, провести внешнюю проверку калибровочной модели. Калибровочная модель строилась на основании калибровочного набора, а про-

верялась независимым тестовым набором образцов.

На основании информации этих спектров с помощью методов первой производной и векторной нормализации разработана градуировочная модель по определению активности ингибиторов трипсина в семенах сои (ГСТИА) (рис. 3).

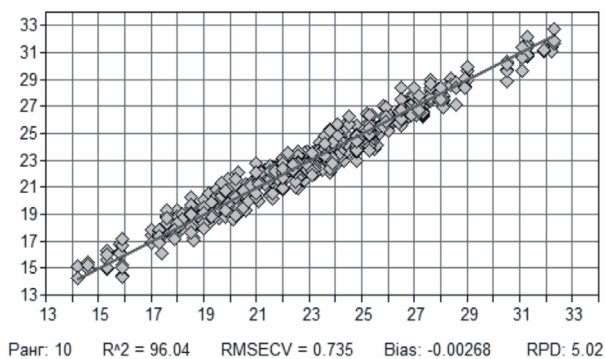


Рисунок 3 – График предсказанных значений содержания ТИА (Y) по сравнению с истинными значениями содержания ТИА (X) градуировочной модели ГСТИА

Полученная модель по определению ТИА в семенах сои имела удовлетворительные результаты по своим качественным показателям: достаточно невысокое количество рангов – 10, ошибка предсказания – 0,735, а коэффициент детерминации был несколько выше, чем у предыдущей модели (96,04 %). Теоретически максимальная ошибка предсказания единичного измерения не должна превысить 2,0 % ($0,735 \times 2,8 = 2,06$).

Для сравнительной оценки селекционного материала очень важен пересчет исследуемых показателей на абсолютно сухую массу семян. Поэтому была разработана градуировочная модель по определению содержания влаги в семенах сои (ГСВ).

После завершения работ по созданию методов определения белка, масла и ТИА с помощью ИК-спектроскопии был разработан метод под названием «Соя» в программе OPUS LAB для рутинного анализа по одновременному определению этих показателей. Характеристика моделей, входящих в его состав, приведена в таблице 3.

Таблица 3

Характеристика градуировочных моделей по определению белка, масла, ТИА и влаги в семенах сои

г. Краснодар, ВНИИМК, 2016 г.

Компонент	Ранг	R ² , %	RMSECV**	Пред-обработка	Спектральный диапазон, см ⁻¹	Количество калибровочных спектров
ГСП	8	96,49	0,536	Векторная нормализация	9002,5–5407,7	618
ГСМ	5	95,37	0,430	Первая производная + MSC***	9064,3–6395,1	216
ГСТИА	10	96,04	0,735	Первая производная + векторная нормализация	9095,1–5446,3	591
ГСВ	7	96,83	0,186	Векторная нормализация		216

R²* – коэффициент детерминации; RMSECV** – среднеквадратичная погрешность предсказания при перекрестной проверке; MSC*** – мультипликативная коррекция рассеивания

Большую роль в объективной оценке средней пробы семян играет её размер по массе из-за матрикальной разнокачественности. Для оценки матрикальной разнокачественности в пределах отдельного растения по ярусам из трех растений сорта Славия семена были разделены на три части. Первая часть семян сформирована из бобов нижнего яруса растения, вторая часть – из среднего, а третья – из верхнего яруса. Результаты анализа по содержанию основных показателей семян сои по ярусам растения представлены в таблице 4.

Таблица 4

Содержание масла, протеина и ТИА в семенах сои, отобранных по ярусам растения сорта Славия

г. Краснодар, ВНИИМК, 2015 г.

Ярус растения	Содержание компонентов			
	масла, %	протеина, %	ТИА, мг/г	влаги, %
Верхний	20,4	43,0	17,9	6,9
Средний	21,6	41,1	21,2	7,0
Нижний	22,7	37,8	25,1	6,7

Анализ данных показывает, что наблюдаются значительные различия по всем основным показателям качества семян сои. Поэтому при отборе пробы на анализ необходимо тщательно перемешивать и усреднять образец, а для старших питомников отбирать пробы в двух повторностях и усреднять результаты.

Для оценки надежности созданной градуировочной модели провели анализ семян сои урожая 2015 г. на полученной модели с известными значениями белка, масла и ТИА (табл. 5).

Результаты анализа показали, что различия между тестовыми и спектральными определениями по модели «Соя» не превысили теоретически максимальную ошибку предсказания единичного измерения: по содержанию белка – 1,6 %, масла – 1,2 % и ТИА – 2,05 мг/г.

Таблица 5

Сравнительный анализ тестовых и спектральных данных по содержанию белка, масла и ТИА в семенах сои

г. Краснодар, ВНИИМК, 2016 г.

№ образца	Компонент	Тестовый анализ	Спектральный анализ «Соя»	Разница, ±
1458	Белок, %	47,4	48,2	+ 0,8
	Масло, %	16,5	16,7	+ 0,2
	ТИА, мг/г	14,0	12,5	- 1,5
1450	Белок, %	46,6	47,5	+ 0,9
	Масло, %	18,2	18,0	- 0,2
	ТИА, мг/г	16,5	14,9	- 1,6
1414	Белок, %	43,8	45,2	+ 1,4
	Масло, %	19,0	18,6	- 0,4
	ТИА, мг/г	19,3	18,7	- 0,6
1410	Белок, %	44,9	46,3	+ 1,4
	Масло, %	20,6	19,7	- 0,9
	ТИА, мг/г	19,5	18,3	- 1,2
1439	Белок, %	43,5	44,6	+ 1,1
	Масло, %	19,5	20,2	+ 0,7
	ТИА, мг/г	21,3	20,0	- 1,3
1433	Белок, %	44,3	45,5	+ 1,2
	Масло, %	22,3	21,5	- 0,8
	ТИА, мг/г	21,2	19,6	- 1,6

Выводы. Таким образом, разработан метод в программе OPUS LAB для рутинного анализа по одновременному определению в целых семенах сои содержания масла, протеина, влаги и ТИА. Это позволяет оперативно проводить предварительную оценку селекционного материала с высокой скоростью – более 100 образцов за рабочую смену. Стало возможным анализировать семена

сортообразцов селекционного питомника и индивидуально отобранных растений, сохраняя ценный селекционный материал.

Список литературы

1. Баранов В.Ф., Клюка В.И., Кочегура А.В. Роль сои в решении белковой проблемы // Сб. научных трудов: Повышение продуктивности сои. – Краснодар, 2000. – С. 6–11.
2. Петибская В.С., Баранов В.Ф., Кочегура А.В., Зеленцов С.В. Соя: качество, использование, производство. – М.: Агронимические науки, 2001. – 64 с.
3. Петибская В.С. Соя: химический состав и использование. – Майкоп: ОАО «Полиграф-ЮГ», 2012. – 431 с.
4. ГОСТ Р 53600-2009. Семена масличные, жмыхи и шроты. Определение влаги, жира, протеина и клетчатки методом спектроскопии в ближней инфракрасной области. – М.: Стандартинформ, 2010. – С. 1–6.
5. ГОСТ 13496.4-93 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания азота и сырого протеина. – М.: Стандартинформ, 2001. – 17 с.
6. ГОСТ 8.597-2010. Семена масличных культур и продукты их переработки. Методика выполнения измерений масличности и влажности методом импульсного ядерного магнитного резонанса. – М.: Стандартинформ, 2011. – 10 с.
7. Петибская В.С. Казеиновый метод определения ингибиторов трипсина // В кн.: Соя: химический состав и использование. – Майкоп: ОАО «Полиграф-ЮГ», 2012. – С. 321–326.

References

1. Baranov V.F., Klyuka V.I., Kochegura A.V. Rol' soi v reshenii belkovoy problemy // Sb. nauchnykh trudov: Povyshenie produktivnosti soi. – Krasnodar, 2000. – S. 6–11.
2. Petibskaya V.S., Baranov V.F., Kochegura A.V., Zelentsov S.V. Soya: kachestvo, ispol'zovanie, proizvodstvo. – M.: Agronomicheskie nauki, 2001. – 64 s.
3. Petibskaya V.S. Soya: khimicheskiy sostav i ispol'zovanie. – Maykop: OAO «Poligraf-YuG», 2012. – 431 s.
4. GOST R 53600-2009. Semena maslichnye, zhmykhi i shroty. Opredelenie vlagi, zhira, proteina i kletchatki metodom spektroskopii v blizhney infrakrasnoy oblasti. – M.: Standartinform, 2010. – S. 1–6.
5. GOST 13496.4-93 Korma, kombikorma, kombikormovoe syr'e. Metody opredeleniya sodержaniya azota i syrogo proteina. – M.: Standartinform, 2001. – 17 s.
6. GOST 8.597-2010. Semena maslichnykh kul'tur i produkty ikh pererabotki. Metodika vypolneniya izmereniy maslichnosti i vlazhnosti metodom impul'snogo yadernogo magnitnogo rezonansa. – M.: Standartinform, 2011. – 10 s.
7. Petibskaya V.S. Kazeinovyuy metod opredeleniya ingibitorov tripsina // V kn.: Soya: khimicheskiy sostav i ispol'zovanie. – Maykop: OAO «Poligraf-YuG», 2012. – S. 321–326.