ACTA AGROBOTANICA
Vol. XXXII, (1): 39-52, 1979

Ilościowe oznaczanie skrobi w reakcji z jodem

HENRYK MARCINIAK

Instytut Hodowli Roślin i Nasiennictwa Akademii Rolniczej we Wrocławiu

(Przyjęto: 19 IV 1978)

H. Marciniak *(Institute of Plant Breeding and Seed Production, Agricultural Academy, 50-205 Wrocław; Cybulskiego 34, Poland)* Acta Agrobotanica 32 (1):39-52, 1979.

Quantitative determination of starch in the reaction with iodine

A quantitative method of determination by photometric measurement in the iodine-starch complex is described. Determinations were made within 0-250 μg range of starch content in 1 ml of solution. Starch was treated with 0.01N J in 1% KJ and extinction was read at wavelength 610 nm in a 1 cm thick layer of solution, with a "Specol" photocolorimeter.
Statistical analysis of measurements showed a positive correlation between the starch amount and extinction.

WSTĘP

Szybkie i proste metody ilościowego oznaczania skrobi mają szczególne znaczenie w określaniu zawartości tego polisacharydu w ziarniakach zbóż przy pracach hodowlanych, gdyż umożliwiają w krótkim czasie ocenę materiału hodowlanego we wczesnych etapach selekcji. Metody te poprzez oznaczanie zawartości skrobi w ziarniakach umożliwiają określenie wzrostu aktywności amylaz, a tym samym stopnia porośnięcia badanego materiału.

Istnieje duża różnorodność metod ilościowego oznaczania tego wielocukru. Do najczęściej stosowanych należy zaliczyć metody polarymetryczne, oznaczania produktów hydrolizy, ilościowego preparowania skrobi z badanego materiału i oznaczania jej wagowo oraz metody fotometryczne oparte na pomiarze ekstynkcji barwnego kompleksu skrobi z antronem lub z jodem (Nowotny i in. 1969).

Zjawisko tworzenia barwnego kompleksu skrobi z jodem jest tak specyficzne, że stało się podstawą wielu metod ilościowego oznaczania tego polisacharydu. Pewną trudność pod tym względem sprawia różnica w powinowactwie do jodu amylozy i amylopektyny oraz wpływ stopnia zmodyfikowania skrobi przez hydrolizę, estryfikację i uszkodzenia me-

chaniczne ziarn skrobi na tworzenie się kompleksu jodowo-skrobiowego. Według danych bibliograficznych również obecność białek i kwasów tłuszczowych przeszkadza w tworzeniu się kompleksu jodu ze skrobią, a zretogradowana skrobia nie posiada w ogóle zdolności do tworzenia barwnego kompleksu (Badenhuisen 1959). Mimo wymienionych różnic w powstawaniu barwnego kompleksu, ta powszechnie znana reakcja znalazła zastosowanie w metodach jodometrycznych, w badaniach jakościowych nad zawartością skrobi w materiałach biologicznych, w metodach ilościowego oznaczania skrobi oraz w pomiarach stosunku amylozy do amylopektyny (Nowotny i in. 1969).

Metody fotometryczne pomiarów stężeń kompleksu jodowo-skrobiowego szczególnie nadają się do badań materiałów biologicznych o małej zawartości skrobi z tego względu, że są szybkie i proste w wykonaniu. Warunkiem przeprowadzenia tych pomiarów jest rozpuszczenie skrobi i odpowiednie jej rozcieńczenie, zadanie roztworem J w KJ o odpowiednim stężeniu oraz fotometryczny pomiar ekstynkcji barwnego kompleksu.

Wykorzystanie kompleksu jodowo-skrobiowego do oznaczania zawartości skrobi opisali w swych pracach Hadorn i Doevelaar (1960), Humphreys i Kelly (1961), Kerr (1952), Thaler (1967), a omówienie tych metod zostało wyczerpująco podane w pracy zbiorowej wydanej pod redakcją Nowotnego (1969).

Niektóre metody ilościowego oznaczania skrobi wymagają wstępnego usunięcia z badanego materiału białek, tłuszczy i cukrów redukujących. W wielu wypadkach również zaleca się stabilizację barwnego kompleksu.

Autorzy wyżej cytowanych prac sugerują, aby krzywą wzorcową przygotować na skrobi o tym samym pochodzeniu, jaka znajduje się w analizowanej próbie lub na skrobi wyekstrahowanej bezpośrednio z badanego materiału biologicznego.

W metodzie Wohlgemutha (1908) barwna reakcja skrobi z jodem znalazła zastosowanie w określaniu aktywności *alfa*-amylazy w płynach ustrojowych poprzez określenie takiego stężenia enzymu, przy którym — w określonych warunkach i czasie — następuje rozkład substraktu do produktów nie barwiących się jodem.

Heinkel (Kłyszejko-Stefanowicz 1972) w metodzie oznaczania aktywności *alfa*-amylazy wykorzystał możliwości określania stężenia skrobi poprzez pomiar natężenia barwy kompleksu jodowo-skrobiowego. Pomiary stężenia skrobi w tej metodzie dokonywane są w granicach od 2 do 10 mg przy wykorzystaniu absorpcji fali świetlnej o długości 560 nm.

Metoda Hadorna i Doevelaar (1960) przystosowana jest do oznaczania kompleksów jodowo-skrobiowych w próbkach zawierających 10 do 60 mg skrobi rozpuszczonej na gorąco w 40% $CaCl_2$ w pH 6, przy wykorzystaniu fali świetlnej o długości 575 nm.

Celem niniejszej pracy było opracowanie szybkiej i wygodnej mikrometody ilościowego oznaczania skrobi w obecności mono- i oligosacharydów oraz przy określaniu aktywności *alfa*- i *beta*-amylaz.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto odczynniki chemiczne produkcji „Polskie Odczynniki Chemiczne" Gliwice w klasie czystości cz.d.a., skrobię rozpuszczalną produkcji TPH POCH — Gliwice, seria 51374. Roztwór skrobi przygotowywano w ten sposób, że naważkę polisacharydu rozpuszczano na gorąco w wodzie.

Pomiaru ekstynkcji kompleksu jodowo-skrobiowego dokonywano przy użyciu fotokolorymetru „Specol" produkcji Carl Zeiss-Jena, przy wykorzystaniu absorpcji fali o długości 610 nm w warstwie płynu o grubości 1 cm. Skrobię barwiono roztworem 0,01N J w 1% KJ.

Hydrolizę skrobi przez amylazy prowadzono w 30°C w 0,25 M buforze fosforanowym o pH 6,8. Reakcję enzymatyczną przerywano przez wstawienie badanej próby do wrzącej łaźni wodnej na okres 5 min. Ubytek skrobi spowodowany hydrolizą enzymatyczną oznaczano poprzez pomiar jej stężenia po okresie inkubacji według opisanej w tej pracy metody. Do hydrolizy skrobi użyto enzymy wypreparowane według metody własnej (Marciniak — praca w druku) z podkiełkowanych nasion jęczmienia jarego, odmiany 'Aramir', uzyskanych z materiałów hodowlanych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Zakład Doświadczalny w Bąkowie — ze zbioru 1975 r.

Dla wyników eksperymentalnych, uzyskanych przy odczytach ekstynkcji, przeprowadzono analizy statystyczne, stosując metodę analiz serii niezależnych dla oceny istotności różnic występujących przy pomiarach w obecności substancji, których wpływ na wielkość ekstynkcji przebadano w tej pracy. Obliczono również standardowe odchylenie od średniej (S) oraz współczynnik zmienności (V) dla zbiorów pomiarów. Ponadto obliczono współczynnik korelacji i regresji zależności ekstynkcji od zawartości skrobi w próbie, mierzonej w obecności różnych, użytych w tej pracy substancji oraz wartości prostych regresji dla tych zależności.

Przebieg analizy

Do probówek odmierzono po 1 ml roztworu zawierającego od 0 do 250 μg skrobi. Następnie dodawano po 2 ml wody lub wodnego roztworu różnych substancji, w obecności których dokonywano pomiaru stężenia polisacharydu. Zestaw użytych roztworów różnych substancji oraz ich

końcowe stężenie w próbie podano w tabeli 1. Do tak przygotowanej próby dodawano 1 ml 0,01N J w 1% KJ, uzyskując końcową objętość wynoszącą 4 ml.

Krzywa kalibracyjna

Do probówek odmierzano po 1 ml roztworu zawierającego 25, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250 μg skrobi, dodawano po 2 ml wody lub wodnego roztworu substancji, wobec której dokonywano pomiary oraz po 1 ml J w KJ.

Reakcję skrobi z jodem przeprowadzano w środowisku kwaśnym, obojętnym lub słabo alkalicznym (do pH 11,5), w temperaturze pokojowej, a ekstynkcję odczytywano po 15-30 min od chwili zadania prób roztworem J w KJ wobec ślepej odczynnikowej. Ślepa odczynnikowa zawierała 1 ml H_2O, 2 ml odpowiedniego roztworu substancji, wobec której dokonywano pomiaru stężeń skrobi oraz 1 ml J w KJ. W dokonywaniu pomiarów stężenia skrobi przeszkadza obecność kolidyny, zasad dających wyższe pH roztworu od pH 11,5 oraz substancji wiążących wolny jod lub dających z nim barwne związki.

Tabela 1 —

Zależność ekstynkcji od zawartości skrobi

Relationship between extinction and starch content

Zawartość skrobi Starch content μg	610 nm 1 cm											
	Środowisko — Medium											
	H_2O			0,9% NaCl			0,25 M bufor fosforanowy o pH 6,8 0.25 M phosphate buffer at pH 6.8			0,005 M NaOH		
—	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V
25	0,085	0,0000	0,00	0,085	0,0010	1,18	0,085	0,0046	5,36	0,083	0,0029	3,52
50	0,171	0,0063	3,68	0,162	0,0069	4,27	0,172	0,0100	5,82	0,171	0,0048	2,80
75	0,254	0,0048	1,89	0,260	0,0041	1,57	0,255	0,0120	4,71	0,258	0,0087	3,36
100	0,354	0,0143	4,05	0,360	0,0041	1,13	0,358	0,0087	2,42	0,355	0,0092	2,57
125	0,441	0,0193	4,38	0,446	0,0095	2,12	0,445	0,0197	4,45	0,439	0,0132	3,00
150	0,533	0,0087	1,63	0,540	0,0040	0,75	0,533	0,0096	1,80	0,540	0,0022	0,41
175	0,620	0,0082	1,32	0,630	0,0142	2,25	0,630	0,0186	2,95	0,630	0,0216	3,43
200	0,710	0,0163	2,30	0,720	0,0183	2,54	0,720	0,0183	2,54	0,720	0,0216	3,00
225	0,803	0,0056	1,19	0,810	0,0141	1,75	0,815	0,0191	2,35	0,810	0,0240	2,96
250	0,900	0,0141	1,57	0,900	0,0082	0,91	0,900	0,0182	2,03	0,910	0,0216	2,37

$\bar{X}$ — średnia arytmetyczna (arithmetic mean).
S — standardowe odchylenie (standard deviation).
V — współczynnik zmienności (coefficient of variation).

WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono wyniki pomiarów ekstynkcji kompleksu jodowo-skrobiowego przy różnym stężeniu skrobi w próbie. W kolumnach podano dane dotyczące wzrastającego stężenia skrobi w 1 ml badanego roztworu oraz ekstynkcji barwnego kompleksu mierzonej w obecności zastosowanych w tej pracy substancji. Dla każdej z tych substancji podano wartości średnich arytmetycznych pomiarów ekstynkcji ($\bar{X}$), standardowe odchylenie od średniej (S) i współczynnik zmienności (V) wyrażony w procentach średniej arytmetycznej.

Wartości średniej arytmetycznej pomiarów ekstynkcji, dokonywanych w obecności wszystkich przebadanych w tej pracy substancji, poza żelatyną, przyjmują wartości od około 0,085 dla 25 μg do około 0,91 dla 250 μg skrobi, natomiast w obecności żelatyny wynoszą dla 25 μg tego polisacharydu również 0,085, a dla 250 μg — 0,943. Zwiększenie stężenia skrobi w próbie o 25 μg/ml powoduje wzrost wartości ekstynkcji średnio o 0,090, a w obecności żelatyny średnio o 0,094.

Standardowe odchylenia ekstynkcji od średniej są niskie i jego wartości dla prób mierzonych w środowisku wodnym wynoszą od 0 do 0,0193, w obecności chlorku sodu — od 0,0010 do 0,0183, w buforze fosforano-

Table 1

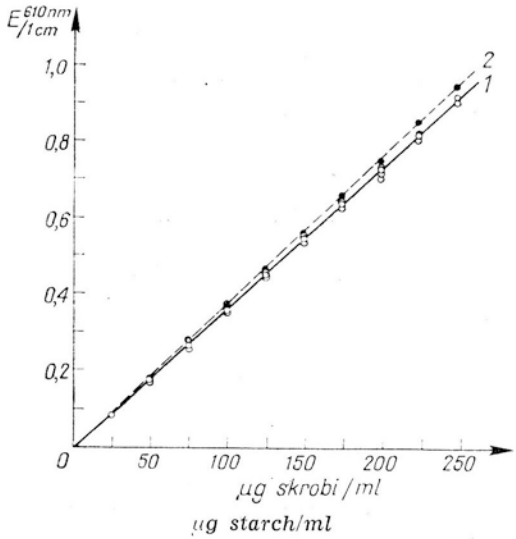
w próbie mierzonej w obecności różnych substancji
determined in sample in presence of various substances

$E_{1\,cm}^{610\,nm}$														
Środowisko — Medium														
0,025 M HCl			1,25% TCA			0,45 M SSA			6,25% mocznik 6.25% urea			50 μg żelatyny w 1 ml 50 μg gelatine in 1 ml		
$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V	$\bar{X}$	S	V
0,085	0,0041	4,82	0,085	0,0021	2,42	0,084	0,0025	2,99	0,085	0,0010	1,18	0,085	0,0041	4,82
0,159	0,0095	5,98	0,169	0,0030	1,77	0,175	0,0042	2,41	0,173	0,0073	4,18	0,180	0,0035	1,92
0,260	0,0091	3,51	0,259	0,0063	2,43	0,264	0,0048	1,81	0,267	0,0079	2,96	0,273	0,0096	3,51
0,356	0,0111	3,11	0,355	0,0082	2,30	0,355	0,0041	1,15	0,358	0,0092	2,58	0,369	0,0075	2,03
0,452	0,0182	4,04	0,440	0,0082	1,87	0,440	0,0082	1,86	0,440	0,0104	2,36	0,461	0,0118	2,56
0,551	0,0103	1,87	0,534	0,0085	1,59	0,535	0,0058	1,08	0,541	0,0114	2,11	0,556	0,0111	1,99
0,641	0,0131	2,05	0,634	0,0180	2,84	0,630	0,0082	1,30	0,630	0,0115	1,83	0,655	0,0173	2,64
0,725	0,0129	1,78	0,700	0,0082	1,17	0,715	0,0129	1,58	0,720	0,0082	1,13	0,751	0,0202	2,68
0,815	0,0100	1,23	0,800	0,0163	2,04	0,810	0,0141	1,75	0,810	0,0216	2,67	0,845	0,0191	2,27
0,905	0,0100	1,11	0,903	0,0096	1,06	0,910	0,0082	0,90	0,905	0,0129	1,43	0,943	0,0096	1,02

TCA — kwas trójchlorooctowy (trichloroacetic acid).
SSA — kwas sulfosalicylowy (sulphosalicylic acid).

wym o pH 6,8 — od 0,0046 do 0,0197, w 0,005 M wodorotlenku sodu — od 0,0029 do 0,0240, w 0,025 M kwasie solnym — od 0,0041 do 0,0182, w 1,25% kwasie trójchlorooctowym — od 0,0021 do 0,0180, w 0,45 M kwasie sulfosalicylowym — od 0,0025 do 0,0141, w roztworze 6,26% mocznika — od 0,0010 do 0,0216, a w obecności żelatyny o stężeniu 50 μg/ml — od 0,0035 do 0,0202. Uzyskane współczynniki zmienności V również mają niskie wartości i najwyższa spośród nich nie osiąga 6%. Dla pomiarów w środowisku wodnym wartość tego miernika waha się w granicach 0,0-4,38%, chlorku sodu — 0,75-4,25%, buforu fosforanowego — 1,80-5,82%, wodorotlenku sodu — 0,41-3,52%, kwasu solnego — 1,11-5,98%, kwasu trójchlorooctowego — 1,06-2,84%, kwasu sulfosalaicylowego — 0,90-2,99%, mocznika — 1,13-4,18% i żelatyny — 1,02-4,82%.

Wykres na rysunku 1 ilustruje graficznie zależność ekstynkcji barwnego kompleksu od stężenia skrobi. Wykreślony został na podstawie średnich wartości pomiarów. Przy wykreślaniu prostej *1*, gdy średnie pomiarów w obecności różnych substancji miały jednakową wartość, fakt ten zaznaczono jednym punktem na wykresie, natomiast gdy różniły się między sobą wielkością, to w odpowiednich położeniach zaznaczono tyle



Rys. 1. Zależność wielkości ekstynkcji kompleksu jodowo-skrobiowego od stężenia skrobi w próbie

1 — odczyty ekstynkcji w roztworze wodnym i w obecności 0,9% NaCl, 0,25 M buforu fosforanowego o pH 6,8, 0,005 M NaOH, 0,025 M HCl, 1,25% kwasu trójchlorooctowego, 0,45 M kwasu sulfosalicylowego i 6,25% mocznika; *2* — odczyty ekstynkcji w obecności 50 μg/ml żelatyny

Fig. 1. Relationship between amount of extinction of iodine-starch complex and starch concentration in sample

1 — readings of extinction aqueous solution and in presence of 0.9% NaCl, 0.25 M phosphate buffer at pH 6.8, 0.005 M NaOH, 0.025 M HCl, 1,25% trichloroacetic acid, 0.45 M sulphosalicylic acid and 6.25% urea; *2* — readings of extinction in presence of 50 μg/ml gelatin

punktów, ile było różnic między średnimi. Prosta 2 ilustruje pomiary ekstynkcji kompleksu jodowo-skrobiowego dokonane w obecności żelatyny.

W obu wyżej podanych wypadkach wielkości ekstynkcji są wprost proporcjonalne do stężenia polisacharydu w próbie i w zakresie stężeń 0-250 μg pomiary układają się na linii prostej pod określonym kątem nachylenia do osi *X*, niezależnie od obecności przebadanych w tej pracy substancji. W wypadku obecności żelatyny odczyty ekstynkcji mają nieco wyższą wartość.

Tabela 2 — Table 2

Analiza wariancji pomiarów ekstynkcji dla prób zawierających 250 μg skrobi w 1 ml roztworu

Analysis of variance of extinction readings for samples containing 250 μg of starch in 1 ml solution

Rodzaje zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	S^2	$F_{emp.}$	F a=0,01
2. Obiektowa Treatments	8	0,000719	4,085	3,26
3. Nieścisłości Error	27	0,000176	—	—
1. Całkowita Total	35	—	—	—

S^2 — wariancja (mean square).

Analizę wariancji dla pomiarów ekstynkcji przeprowadzono oddzielnie dla każdego stężenia skrobi, porównując ze sobą wyniki uzyskane w obecności wszystkich przebadanych substancji. Ponieważ analiza wariancji wykazała brak istotnego zróżnicowania dla pomiarów w próbach zawierających od 25 do 225 μg skrobi w 1 ml roztworu, a stwierdzono istotne różnice przy stężeniu wynoszącym 250 μg/ml, to przedstawiono jedynie dla tego stężenia analizę wariancji i porównanie z przedziałem ufności średnich wartości ekstynkcji. Przedział ufności obliczono przy wykorzystaniu testu Duncana dla a=0,01. Analizę wariancji ilustruje tabela 2, a porównanie średnich wartości ekstynkcji z przedziałem ufności tabela 3.

Porównanie średnich wartości ekstynkcji, mierzonych we wszystkich stosowanych w pracy roztworach, a zawierających 250 μg skrobi w 1 ml, wykazało, że istotnie najwyższą wartość posiada średnia dla pomiarów wykonanych w próbach zawierających 50 μg żelatyny w 1 ml roztworu.

Pozostałe średnie nie różnią się między sobą istotnie i utworzyły grupę jednorodną.

Ścisłość doświadczenia dla pomiarów ekstynkcji obliczono również oddzielnie dla każdego, stosowanego w pracy stężenia skrobi. Wszystkie uzyskane wartości ścisłości doświadczenia zamykają się w granicach od 3,25% do 8,82% i świadczą, że otrzymane wyniki eksperymentalne są wiarogodne. Najwyższą wartość (8,82%) parametr ten osiąga przy zawartości skrobi wynoszącej 50 μg/ml, a najmniejszą (3,25%) przy stężeniu 250 μg/ml.

Tabela 3 — Table 3

Porównanie średnich wartości dla prób zawierających 250 μg skrobi w 1 ml roztworu

Comparison of mean values for samples containing 250 μg of starch in 1 ml solution

Środowisko — Medium	Ekstynkcja Extinction $\bar{X}$
50 μg żelatyny w 1 ml roztworu 50 μg gelatine in 1 ml sample	0,9425
0,45 M kwas sulfosalicylowy 0.45 m sulphosalicylic acid	0,9100
0,005 M NaOH	0,9100
6,25% mocznik 6.25% urea	0,9050
0,025 M HCl	0,9050
1,25% kwas trójchlorooctowy 1.25% trichloroacetic acid	0,9025
0,25 M bufor fosforanowy o pH 6,8 0.25 M phosphate buffer at pH 6.8	0,9000
0,9% NaCl	0,9000
H_2O	0,9000

W tabeli 4 zestawiono współczynniki korelacji i regresji zależności ekstynkcji od stężenia skrobi w próbie. Współczynnik korelacji dla pomiarów dokonanych we wszystkich wariantach doświadczalnych posiada bardzo wysokie wartości, są one bliskie jedności.

Współczynnik regresji obliczony dla pomiarów przeprowadzonych w obecności żelatyny wynosi 0,00381 i wykazuje, że zwiększenie stężenia skrobi o 10μg/ml powoduje wzrost ekstynkcji o 0,038. W pozostałych natomiast wypadkach współczynnik ten waha się w granicach od 0,00362 do 0,00370, informując, że przyrost ilości skrobi o 10 μg/ml spowoduje wzrost ekstynkcji o 0,036 do 0,037.

Tabela 4 — Table 4

Zestawienie współczynników korelacji i regresji zależności ekstynkcji od zawartości skrobi w próbie, mierzonej w obecności różnych substancji

Correlation coefficients and regression coefficients of extinction on starch content measured in the presence of various substances

Środowisko — Medium	r	ay/x
H_2O	0,9993	0,00362
0,9% NaCl	0,9993	0,00366
0,25 M bufor fosforanowy o pH 6,8 0.25 M phosphate buffer at pH 6.8	0,9987	0,00365
0,005 M NaOH	0,9983	0,00367
0,025 M HCl	0,9990	0,00370
1,25% kwas trójchlorooctowy 1.25% trichloroacetic acid	0,9992	0,00365
0,45 M kwas sulfosalicylowy 0.45 M sulphosalicylic acid	0,9995	0,00364
6,25% mocznik 6.25% urea	0,9993	0,00364
50 µg żelatyny w 1 ml próby 50 µg gelatine in 1 ml sample	0,9992	0,00381

r — współczynnik korelacji (correlation coefficient).
ay/x — współczynnik regresji (regression coefficient).

Obliczone wartości prostej regresji ekstynkcji dla każdego układu doświadczalnego zestawiono w tabeli 5. Przy zawartości 25 µg skrobi w 1 ml roztworu — w obecności mocznika i żelatyny — są one bliskie lub równe 0,083, natomiast w pozostałych wypadkach wahają się w granicach 0,078-0,082. Natomiast gdy stężenie skrobi w próbie wynosi 250 µg/ml wielkość tego miernika statystycznego w obecności żelatyny jest najwyższa (0,94) i różni się od wartości uzyskanych w obecności innych substancji, gdzie wartości te wahają się od 0,894 do 0,911.

Ponieważ analiza wariancji wykazała istotną różnicę jedynie między średnią pomiarów ekstynkcji uzyskiwanej w obecności żelatyny przy stężeniu skrobi 250 µg/ml a pomiarami w obecności pozostałych użytych substancji przy tej samej zawartości skrobi, wykreślono tylko prostą regresji dla pomiarów przeprowadzonych w roztworze wodnym i w obecności żelatyny (rys. 2).

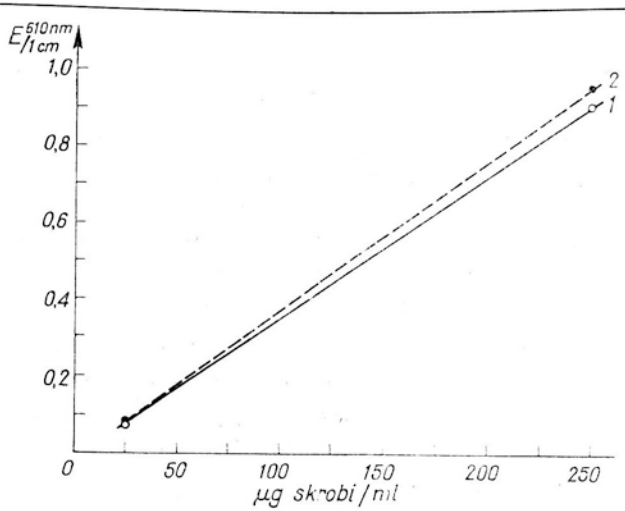
Wykres na rysunku 3 ilustruje przebieg hydrolizy skrobi przez amylazę mierzony ubytkiem substratu w próbie. Pomiar stężenia substratu przeprowadzono opisaną w tej pracy metodą bez pozbywania się produktów reakcji enzymatycznej. Przedstawione wyniki wykazują dużą czułość metody na zmiany stężenia skrobi.

Tabela 5 — Table 5

Zestawienie danych prostych regresji zależności ekstynkcji od stężenia skrobi w próbie, mierzonej w obecności różnych substancji

Extreme values from regression lines representing extinction on starch concentration. Extinction was measured in the presence of various substances

Środowisko — Medium	x / y	25 µg skrobi w 1 ml 25 µg starch in 1 ml	250 µg skrobi w 1 ml 250 µg starch in 1 ml
H_2O	y_1	0,0783	0,8937
0,9% NaCl	y_2	0,0800	0,9023
0,25 M bufor fosforanowy o pH 6,8 0.25 M phosphate buffer at pH 6.8	y_3	0,0800	0,9020
0,005 M NaOH	y_4	0,0782	0,9048
0,025 M HCl	y_5	0,0789	0,9110
1,25% kwas trójchlorooctowy 1.25% trichloroacetic acid	y_6	0,0798	0,9004
0,45 M kwas sulfosalicylowy 0.45 M sulphosalicylic acid	y_7	0,0817	0,9007
6,25% mocznik 6.25% urea	y_8	0,0829	0,9027
50 µg żelatyny w 1 ml próby 50 µg gelatine in 1 ml sample	y_9	0,0830	0,9405



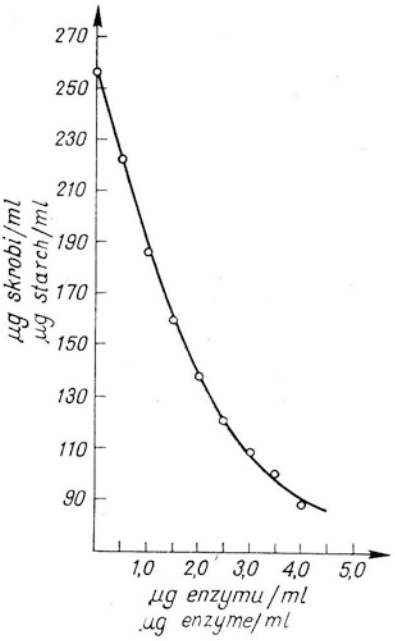
µg starch/ml

Rys. 2. Proste regresji pomiarów kompleksu jodowo-skrobiowego

1 — Pomiary ekstynkcji dokonywane w środowisku wodnym; 2 — pomiary ekstynkcji dokonywane w obecności 50 µg żelatyny

Fig. 2. Regression lines representing the measurements of iodine-starch complex

1 — Extinction measurements made in aqueous solution; 2 — extinction measurements made in the presence of 50 µg gelatine



Rys. 3. Pomiar ubytku skrobi hydrolizowanej przez amylazy poprzez oznaczenia fotometryczne kompleksu jodowo-skrobiowego

1 ml inkubatu zawierał 256 µg substratu oraz 0,5 do 4 µg enzymu. Czas inkubacji 15 min. Ekstynkcję barwnego kompleksu odczytywano przy 610 nm w warstwie płynu o grubości 1 cm. Pozostałe warunki inkubacji podano przy opisie metod.

Fig. 3. Decrease in starch after hydrolysis with amylases. Determinations were made by photometric measurement of iodine-starch complex

1 ml of incubate contained 256 µg substrate and from 0.5 to 4 µg enzyme. Incubation time was 15 min. Extinction was read at 610 nm in 1 cm thick layer of solution. Other incubating conditions were given in description of methods.

DYSKUSJA

Wiele szeroko stosowanych metod ilościowego oznaczania skrobi wymaga uprzedniego usunięcia z badanej próby substancji przeszkadzających w pomiarach lub mających istotny wpływ na wynik pomiaru. Powoduje to wzrost pracochłonności i czasu wykonania analiz oraz wymaga stosunkowo dużej ilości badanego materiału.

Metody polarymetryczne oparte na pomiarze skręcalności właściwej polisacharydów mają tą niedogodność, że skręcalność ta w dużej mierze uzależniona jest od stopnia zmian zachodzących w cząsteczce skrobi podczas jej ekstrakcji, od rodzaju użytego rozpuszczalnika oraz od warunków rozpuszczania skrobi (Nowotny i in. 1969). Jest to przyczyną trudności w ustalaniu warunków, pozwalających na uzyskiwanie tej samej wartości skręcania płaszczyzny światła dla skrobi ekstrahowanej w różnych warunkach i pochodzącej z różnego materiału. Obecność mono- i oligosa-

charydów, aminokwasów, białek i tłuszczy stanowi dodatkową przeszkodę w ilościowym oznaczaniu tego polisacharydu.

Metody oznaczania skrobi oparte na określaniu zawartości glukozy uzyskiwanej poprzez hydrolizę skrobi, między innymi metoda antronowa (Bjornesjo 1955) i fenolowa (Dubois i in. 1956), wymagają bardzo skrupulatnego wstępnego oczyszczenia badanej próby od substancji towarzyszących, a szczególnie usunięcia mono- i oligosacharydów oraz dekstryn, gdyż ich obecność powoduje zawyżanie wyników pomiarów.

Opracowana mikrometoda oznaczania rozpuszczonej skrobi, dająca możliwość bezpośrednich pomiarów w wyciągach do roztworów powszechnie stosowanych substancji w pracach biochemicznych, może stać się dogodnym narzędziem w tych badaniach, w których szybkość uzyskania danych jest podstawowym warunkiem ich przydatności. Uzyskiwane wyniki w tej metodzie odpowiadają rzeczywistej zawartości skrobi w próbie, a pomiary przeprowadzone w roztworach przebadanych substancji, przy tym samym poziomie skrobi, są takie same lub, jak w przypadku obecności żelatyny, różnią się nieznacznie. Świadczą o tym przeprowadzone analizy statystyczne uzyskanych w tej pracy wyników. Przy jednakowym poziomie skrobi brak istotnego zróżnicowania między średnimi pomiarów ekstynkcji, niewielkie wartości standardowego odchylenia i współczynnika zmienności, wysoka wartość współczynnika korelacji oraz małe różnice między poszczególnymi współczynnikami regresji dowodzą, że uzyskane dane eksperymentalne są wiarogodne. Dodatkową zaletą tej metody jest jej mała czasochłonność i prosty przebieg analizy oraz to, że oznaczenia można wykonywać na małych próbach. Prostota i mała czasochłonność pozwala na jej zastosowanie do oznaczeń aktywności amylaz poprzez pomiar ubytku substratu bez konieczności pozbywania się produktów hydrolizy skrobi.

Wyżej omówione cechy tej metody świadczą o jej dogodności przy badaniach materiałów hodowlanych zbóż.

STRESZCZENIE I WNIOSKI

Opracowano mikrometodę oznaczania skrobi poprzez fotometryczny pomiar stężenia kompleksu jodowo-skrobiowego w próbie. Skrobię oznaczano w granicach 0-250 μg/ml, a barwiono ją 0,01N J w 1% KJ. Reakcję przeprowadzano w temperaturze pokojowej przez 15-30 min od chwili zadania J w KJ. Odczytu ekstynkcji dokonywano wobec ślepej odczynnikowej przy długości fali świetlnej 610 nm w warstwie płynu o grubości 1 cm, przy użyciu fotokolorymetru „Specol". Oznaczeń dokonywano w środowisku kwaśnym, obojętnym i słabo alkalicznym (do pH 11,5), w obecności przebadanych w tej pracy substancji nie wiążących wolnego jodu i nie dających z nim barwnych reakcji.

Przeprowadzone pomiary i analiza statystyczna wyników wykazują, że wielkość ekstynkcji barwnego kompleksu jest wprost proporcjonalna do zawartości skrobi w próbie i — niezależnie od obecności w roztworze użytych substancji — dla tych samych stężeń skrobi odczyty ekstynkcji układają się na jednakowym poziomie. Obecność żelatyny w analizowanych próbach powoduje nieznaczne podwyższenie wyników pomiarów.

W metodzie tej nie mogą być używane roztwory kolidyny, substancji wiążących wolny jod lub dających z nim barwne związki oraz zasad podnoszących zasadowość roztworu powyżej pH 11,5.

Ze względu na prostotę i szybkość wykonania analiz metoda ta jest dogodna do badań nad aktywnością amylaz oraz materiałów hodowlanych zbóż.

SUMMARY

A starch determination micromethod based on photometric measurement of the concentration of iodine starch complex has been developed. Starch was stained with 0.01N J in 1% KJ and determined within the 0-250 μg range. The reaction was carried out at room temperature for 15 min, after treating the sample with J in KJ. Readings of extinction were made against the control at wavelength 610 nm in a 1 cm thick layer of solution with a "Specol" photocolorimeter. Determinations were made in acidic, neural and slightly alkaline solutions in the presence of various substances which do not bind free iodine or give colour reactions with it.

Statistical analysis of measurements showed that the degree of extinction of the colour complex was directly proportional to the starch content in the sample, and extinction readings were at the same level for the same starch concentrations irrespective of the substances present in the solution. The presence of gelatine in the samples slightly increased the readings.

Solution of collidine, a substances binding free iodine or giving coloured compounds, and alkalis increasing the solution pH over 11.5 cannot be used in is method.

Because of its simplicity the method is suitable for studies on amylase activities in breeding materials of cereals.

LITERATURA

Badenhuisen N. P., 1959. Chemistry and biology of the starch granule. Handbuch der protoplazmafforschung. II. Springer Verlag. Wien.

Bjornesjo K. B., 1955. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7: 141.

Ćwiczenia z biochemii, 1972. Praca zbiorowa pod redakcją L. Kłyszejko-Stefanowicz, PWN, Warszawa.

Dubois M., Gieles K. A., Hamilton J. K., Reters P. A., Smith F., 1956. Anal. Chem. 28: 350.

Hadorn H., Doevlaar F., 1960. Mitteilungen aus den Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene.

Humphreys R. F., Kelly J., 1961. Analytica Chimica Acta (Amsterdam) 24: 66-70.

Kerr W. R., 1952. Chimija i technołogia krochmała. Piszczepromizdat — Moskwa.

Marciniak H., Zastosowanie acetonu do preparacji alfa i beta amylaz z ziarniaków jęczmienia jarego (w druku).

Skrobia, 1969. Praca zbiorowa pod redakcją F. Nowotnego, str. 251-301, WNT, Warszawa.

Thaler H., 1967. Nachweis and Bistimmung der Polysacharide, Handbuch der Lebensmittelchemie. II. 2: 437-465. Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York.

Wohlgemuth J., 1908. Biochem. Z. 9:1 (wg W. Mejbaum-Katzenellenbogen i I. Mochnackiej, 1966. Kurs praktyczny z biochemii, PWN, Warszawa).