

Міністерство аграрної політики та продовольства України

Український інститут експертизи сортів рослин

## **Методичні рекомендації**

**з визначення типу крохмалю в насіннєвому матеріалі**

**зернових і круп'яних культур**

*(якісний метод)*

УДК 633.15

М-54

Методичні рекомендації з визначення типу крохмалю в насінневому матеріалі зернових і круп'яних культур (якісний метод) / Н. П. Костенко, С. М. Гринів, С. П. Лікар, М. М. Таганцова, А. П. Іваницька, Т. М. Хоменко, С. Г. Димитров, О. А. Руденко.

Методичні рекомендації з визначення типу крохмалю в насінневому матеріалі зернових і круп'яних культур (якісний метод).

У методичних рекомендаціях наведено швидкий, зручний і надійний метод якісного визначення безамілозного (амілопектинового) типу крохмалю в насінневому матеріалі зернових і круп'яних культур під час державної науково-технічної експертизи. Видання розраховане на спеціалістів з експертизи сортів рослин, співробітників наукових установ і вищих навчальних закладів, селекціонерів.

УДК 633.15

Український інститут експертизи сортів рослин, 2021

## ЗМІСТ

<b>ВСТУП</b>	4
1. Загальні відомості	5
2. Визначення типу крохмалю	6
2.1 Метод визначення	6
2.2 Матеріал	7
2.3 Реактиви	7
2.4. Обладнання	7
2.5 Приготування реактивів	7
2.6 Хід проведення досліду	8
Список використаних літературних джерел	11

## ВСТУП

У сучасних умовах ведення сільського господарства сорт є одним з важелів гарантії для товаровиробника сільськогосподарської продукції і сировини. Заключним етапом селекційного процесу створення сорту рослин можна вважати проведення державної науково-технічної експертизи. Об'єктивні результати, отримані в ході проведення польових та лабораторних досліджень, забезпечують подальше внесення сортів до Державного реєстру сортів рослин та Реєстру патентів України.

Для повного комплексного оцінювання сортів-кандидатів використовують уніфіковані дослідження. Сьогодення постійно впливає на розвиток селекційного процесу в напрямі створення сортів для виробництва натуральних продуктів здорового харчування. Інновацією в селекції сортів зернових та круп'яних культур є створення безамілозних сортів з генетично зміненим фракційним складом крохмалю. Крохмаль, який містить переважно амілопектин, краще перетравлюється у шлунково-кишковому тракті людини і тварин.

Використання сортів з підвищеним умістом амілози чи переважанням амілози або амілопектину є дуже вигідним, адже це дозволяє одержати крохмалі з різними технологічними характеристиками і харчовою цінністю, а також істотно зменшити витрати на хімічну, фізичну модифікацію крохмалю та його фракціонування. Оскільки амілоза та амілопектин мають різні споживчі властивості, за допомогою селекції намагаються створити сорти, у крохмалі яких переважає один з цих сополімерів.

Так само при проведенні кваліфікаційної експертизи сортів-кандидатів постійно виникає потреба у вивченні та впровадженні нових досліджень у тому чи тому напрямі використання сорту рослин.

Методичні рекомендації з визначення типу крохмалю в насіннєвому матеріалі зернових і круп'яних культур (якісний метод) (далі – Методичні рекомендації) розроблено для визначення безамілозного (амілопектинового) типу крохмалю сортів пшениці м'якої, ячменю звичайного, кукурудзи звичайної, рису посівного, проса

посівного та сорго звичайного (двокольорового) під час проведення кваліфікаційної експертизи.

У Методичних рекомендаціях викладено основи процесу визначення типу крохмалю, а саме, наведено порядок виконання роботи в лабораторних умовах щодо наявності звичайного, високоамілозного та безамілозного (амілопектинового) типів крохмалю.

## 1. Загальні відомості

Полісахарид крохмаль є основним джерелом вуглеводів у харчуванні людини та годівлі сільськогосподарських тварин. Це основна запасна речовина зерна пшениці м'якої, ячменю звичайного, кукурудзи звичайної, рису посівного, проса посівного та сорго звичайного (двокольорового). Природній крохмаль складається з двох фракцій: лінійної амілози ( $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-глюкан) та розгалуженого амілопектину ( $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4; 1 $\rightarrow$ 6)-глюкан). У середньому крохмаль зернових і круп'яних культур містить 15–25% амілози та 75–86% амілопектину.

На сьогодні ведеться селекція зі створення сортів із різним співвідношенням амілози й амілопектину в складі крохмалю. Одним із напрямів селекції є створення сортів з безамілозним (амілопектиновим) типом крохмалю *waxy* зернових і круп'яних культур. Такі сорти отримують через наявність мутації гену *waxy*, який порушує структуру та функцію ферменту біосинтезу амілози. Безамілозний тип крохмалю складається виключно на 99% із амілопектину. Однак сорти можуть містити 1–5% амілози.

Зерно восковидних сортів сільськогосподарських культур відрізняється матовою, гладкою поверхнею, непрозорим ендоспермом, який за консистенцією нагадує твердий віск. Усередині має борошністу структуру. М'якоть має клейку консистенцію. Тому безамілозний тип крохмалю має високу дієтичну харчову цінність, низькі температури клейстеризації та утворення гелю (драглів), стійкий до механічних впливів за умов розморожування та заморожування, а зерно використовують в харчовій, фармацевтичній промисловості, для виробництва технічного біоетанолу.

Наступним перспективним напрямом у селекції є створення сортів із високим вмістом амілози, зокрема у кукурудзи звичайної, пшениці м'якої, які отримують за наявності мутантного гена, що контролює високий вміст амілози. Вміст амілози в зерні становить 35% і більше, порівняно з оптимальним її вмістом – 25%. Продукти харчування, виготовлені з високоамілозних сортів, мають високу стійкість до впливу перетравних ферментів і є джерелом дієтичних волокон.

Тип крохмалю за вмістом амілози й амілопектину в його складі визначають декількома методами:

1) спектрофотометричним методом за визначенням вмісту амілози (міжнародний стандарт ISO 6647-1-2007\*Рис. Визначення вмісту амілози. Частина 1. Контрольний метод, ідентичний стандарту ОСТ ISO 6647-1-2015). Оптичну щільність розчину йод-амілози вимірюють на спектрофотометрі за довжиною хвилі 720 нм. Масову частку амілози у відсотках на суху речовину вираховують за калібрувальним графіком стандартних розчинів-порівняння із відомою концентрацією амілози картоплі.

Аналогічно вимірюють оптичну щільність йод-крохмального комплексу при довжині хвилі спектрофотометру 640–650 нм. Уміст амілопектину визначають за різницею вмісту крохмалю та амілози.

2) методом ПЛР-аналізу із використанням мікросателітних алель-специфічних маркерів. Цей метод використовують для ідентифікації та маркування генетичної однорідності інбредних ліній, гібридів восковидної кукурудзи та інших культур.

3) визначення типу крохмалю за допомогою якісної реакції крохмалю з 1% водним розчином йоду  $KJ-J_2$ .

## **2. Визначення типу крохмалю**

*2.1 Метод визначення.* Визначення типу крохмалю якісним методом у насінневому матеріалі пшениці м'якої, ячменю звичайного, кукурудзи звичайної, рису посівного, проса посівного та сорго звичайного (двокольорового) ґрунтується на кольоровій реакції крохмалю з 1% водним розчином йоду  $KJ-J_2$ .

Співвідношення амілози й амілопектину в складі крохмалю зерна фіксують за забарвленням зернівки.

*2.2. Матеріал.* В усіх сортах пшениці м'якої, ячменю звичайного, кукурудзи звичайної, рису посівного, проса посівного та сорго звичайного (двокольорового) першого року дослідження здійснюють перевірку за типом крохмалю до закладання дослідів у польових умовах.

Для визначення амілопектинового типу крохмалю відбирають зразок насінневого матеріалу вагою 25 г із загального насінневого зразка, який надає заявник для проведення експертизи першого року дослідження.

За необхідності можливе визначення типу крохмалю в зразках зібраного врожаю з дослідних ділянок за проведення державної науково-технічної експертизи. Для уникнення перезапилення перехреснозапильного сорту (кукурудза звичайна, сорго звичайне (двокольорове)) з амілопектиновим типом крохмалю, обов'язкове дотримання просторової ізоляції, не менше 200 м, від сортів із звичайним типом крохмалю.

Велику увагу необхідно приділяти інформації, наведеній заявником у документах заявки щодо особливостей умов вирощування, типу крохмалю, тощо.

*2.3 Реактиви.* Калію гідроксид, «хч» або «ч.д.а»

Калію йодистий, «хч» або «ч.д.а»

Йод, «хч» або «ч.д.а»

Вода дистильована.

*2.4 Обладнання.* Ваги лабораторні, електронні 3-го класу точності

Лабораторний млинок (або ступка)

Чашки Петрі

Папір глянцева

Піпетка

Скальпель

Посуд лабораторний

Колби мірні місткістю 100 мл, 1000 мл.

**2.5 Приготування реактивів.** 1. 1Н розчин КОН. 56,11 г КОН розчиняють у невеликій кількості дистильованої води і доводять об'єм розчину водою до 1 л.

2. Розчин йоду в йодистому калії  $KJ-J_2$  готують змішуванням 0,5 г йоду і 1 г йодистого калію, які переміщують в мірну колбу на 100 мл і доводять дистильованою водою до мітки.

**2.6 Хід проведення дослідів.** Із зразка насінневого матеріалу відбирають 25 г. Для визначення типу крохмалю зразок розмелюють на млинку чи подрібнюють ступкою або розрізають насініну навпіл. На лабораторних вагах зважують 1 г подрібненого / розмеленого зразка та вміщують у чашки Петрі. На пробу наносять 5–6 крапель 1Н розчину КОН для проходження процесу клейстеризації і залишають за кімнатної температури впродовж 15–30 хвилин. Після закінчення цього терміну до проби додають 1–2 краплі 1% водного розчину йоду в йодистому калії  $KJ-J_2$  і встановлюють тип крохмалю. Встановлення типу крохмалю в розрізаній насініні є аналогічним.

Звичайний тип крохмалю на прикладі насінневого матеріалу виду кукурудзи звичайної (*Zea mays* L.) утворює комплекс йод–амілоза–амілопектин темно-синього забарвлення в подрібненому, розмеленому та розрізаному вигляді (рис. 1–3).



**Рис. 1.** Звичайний тип крохмалю на подрібненому зерні кукурудзи звичайної



**Рис. 2.** Звичайний тип крохмалю на розмеленому зерні кукурудзи звичайної





**Рис. 3.** Звичайний тип крохмалю на розрізаному зерні кукурудзи звичайної

Безамілозний (амілопектиновий) тип крохмалю (*waxy*) на прикладі насіннєвого матеріалу підвиду кукурудзи восковидної (*Zea mays* var. *ceratina* L.) утворює комплекс йод–амілопектин червоно-бурого забарвлення, що зображений на рисунках 4–6.



**Рис. 4.** Безамілозний тип крохмалю на подрібненому зерні кукурудзи восковидної



**Рис. 5.** Безамілозний тип крохмалю на розмеленому зерні кукурудзи восковидної



**Рис. 6.** Безамілозний тип крохмалю на розрізаному зерні кукурудзи восковидної

Описаний метод характеризується простотою, низькою вартістю та високою відтворюваністю. Тому він може бути застосований для тестування зразків зернових і круп'яних культур під час кваліфікаційної експертизи сортів рослин в Україні, в селекції для добору рослин із зміненим перерозподілом амілози та амілопектину, а також у насінництві.

## Список використаних літературних джерел

1. Боме Н. А., Тетянников Н. В., Вайсфельд Л. и др. Содержание крахмала и амилозы в зерне мутантных популяций ячменя. *Химия растительного сырья*. 2020. № 4. С. 243–250.
2. Вакула С. И., Орловская О. А., Хотылева Л. В., Кильчевский А. В. SSR-локусы, потенциально ассоциированные с высоким содержанием амилопектина в эндосперме зерна кукурузы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2018. № 22(6). С. 640–647 doi 10.18699/VJ18.405.
3. Закирова А. Ш., Ягофаров Д. Ш., Канарский А. В., Сидоров Ю. Д. Применение фотоколориметрического метода для количественного определения амилозы в крахмале. *Вестник Казанского технологического университета*. 2011. Т.14, №10. С. 195–197. [https://cyberleninka.ru > article > primeneniye-fotokolori](https://cyberleninka.ru/article/primeneniye-fotokolori).
4. Козаченко М. Р., Наумов О. Г., Васько Н. І. та ін. Генетичні закономірності селекції зі створення вперше в Україні сорту ячменю ваксі Шедевр. *Фактори експериментальної еволюції організмів*. 2019. № 24. С. 104–108.
5. Левченко О. С. Поліморфізм wx генів у колекційних зразків тритикале озимого. *Агробіологія*. 2020. № 1. С. 80–87.
6. Моргун В. В., Рибалка О. І. Стратегія генетичного поліпшення зернових злаків з метою забезпечення продовольчої безпеки, лікувально-профілактичного харчування та потреб переробної промисловості. *Вісник НАН України*. 2017. № 3. С. 54–64.
7. Рибалка О., Поліщук С., Моргун Б. Нові напрями в селекції зернових культур на якість зерна. *Вісник аграрної науки*. 2018. № 96(11). С. 120–133.
8. Рибалка О. І., Червоніс М. В., Моргун Б. В. та ін. Генетичні та селекційні критерії створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна. *Физиология и биохимия культурных растений*. 2013. Т. 45. № 1. С. 3–19.
9. ISO 6647 Rice — Determination of amylose content — Part 1: Reference method. URL: [https://www.sis.se > api > document > preview](https://www.sis.se/api/document/preview).

10. Rysbekova, A. B., Dusibaeva, E. N., Zhirnova, I. A., Esenbekova, G. T., Seytkhozhaev, A. I., Zhakenova, A. Y. Биохимический скрининг отечественной и мировой коллекции проса на содержание амилозы в зерне. *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. 2018. 76(3). С. 97–106.

10. Test Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability of Maize (*Zea mays* L.) (TG /02/7, UPOV). Geneva. 2009-04-01. p. 29. URL: [www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg002.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg002.pdf).

11. Test Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability of Rize (*Oryza sativa* L.) (TG /16/8, UPOV). Geneva. 2004-03-31. p. 33. URL: [www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg016.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg016.pdf).

12. Test Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability of Common Millet (*Panicum miliaceum* L.) (TG /248/1, UPOV). Geneva. 2007-03-28. – p. 24. URL: [www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg248.pdf](http://www.upov.int/edocs/tgdocs/en/tg248.pdf).

## **Методичні рекомендації з визначення типу крохмалю в насіннєвому матеріалі зернових і круп'яних культур (якісний метод)**

Методичні рекомендації розглянуто, схвалено та рекомендовано до видання Вченою радою Українського інституту експертизи сортів рослин, протокол № 8 від 29 червня 2021 року.

Методичні рекомендації підготували: Н. П. Костенко, канд. с.-г. наук, С. М. Гринів, канд. с.-г. наук, с. н. с., С. П. Лікар, М. М. Таганцова, А. П. Іваницька, Т. М. Хоменко, канд. с.-г. наук, С. Г. Дмитров, канд. с.-г. наук., О. А. Руденко, Український інституту експертизи сортів рослин, 2021.

Оригінальні світлини: Таганцова М. М., Мажуга К. М.

Рецензенти: Білинська О. В. – канд. біол. наук, завідувачка лабораторії генетики, біотехнології та якості Інституту рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН України  
Носаківський В. А. – канд. с.-г. наук, доцент кафедри технології зберігання, переробки та стандартизації продукції рослинництва ім. проф. Б. В. Лесика НУБіП України