

Schnellabschätzung des Amylosegehaltes von Erbsen

GERHARD RÜHL

Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung

Einleitung und Problemstellung

Die Industrie ist im Zusammenhang mit der Suche nach alternativen Rohstoffquellen für die chemische Produktion und als Energieträger auch sehr an pflanzlicher Stärke interessiert. Besonderes Augenmerk wird dabei zur Zeit auf den Amyloseanteil der Stärkefraktion gerichtet. Denkt man nämlich an bestimmte Verarbeitungsbereiche der chemischen Industrie (elastische Kunststoffe, Folien, Filme; Beimengung von Stärke in der Papier- und Kunststoffindustrie, etc.), so ist trotz vieler hervorstechender Eigenschaften des Amylopektins die Amylose das technisch wertvollere Produkt.

Genotypen mit gesteigertem Amyloseanteil in der Stärke sind bisher nur beim Mais, der Erbse und der Gerste gefunden worden. Das bedeutet, daß die Erbse neben der Gerste die einzige in Mitteleuropa anbaufähige landwirtschaftliche Kulturart mit hohem Amylosegehalt darstellt. Unter dem Aspekt der Auflockerung der heute z.T. schon ökologisch bedenklichen Fruchtfolgesysteme muß die Körnererbse eindeutig präferiert werden. Ein nicht zu übersehender Vorteil eines Erbsenanbaus wäre darüber hinaus die Tatsache, daß durch die Symbiose der Erbsenwurzeln mit den N-fixierenden Knöllchenbakterien die Stickstoffdüngung entfallen kann und so die Produktionskosten gesenkt werden könnten.

Um ein bestehendes Erbsensortiment auf die jeweiligen Amylosegehalte der unterschiedlichen Genotypen zu prüfen, fehlte bisher ein geeignetes Schnelltestverfahren. Auch im Rahmen von Erbsenzuchtprogrammen auf bessere Eignung hinsichtlich einer industriellen Verwertung stellt das Problem der raschen Abschätzung des Amyloseanteils in der Stärkefraktion ein großes Hindernis dar.

1 Methodenüberblick

Zum Zwecke der Amylosegehaltsermittlung bisher am häufigsten eingesetzte Methoden sind:

- fraktionierte Fällung (Schoch 1942, 1943, 1945; McCready und Hassid 1943; Montgomery et al. 1961; Kuge und Takeo 1968; Ceh et al. 1985)

- Gelfiltration (Yamada und Taki 1981; Yeh et al. 1981; Craig und Stark 1984; Boyer und Liu 1985; Chinnaswamy und Bhattacharya 1986)

- Differential-Raster-Kalorimetrie, "DSC" (Kugimiya und Donovan 1981; Stute und Konieczny-Janda 1983; Sosulski et al. 1985)

- HPLC, Größenausschlußchromatographie (Hizukuri 1985; Klingler 1985; Kobayasha et al. 1985)

- enzymatische Entzweigung mittels Isoamylase, gefolgt von Gelpermeationschromatographie (Ikawa et al. 1978; Sargeant 1982; Hizukuri 1985)

- potentiometrische Ermittlung des Jodbindungsvermögens, "JBV" (Montgomery et al. 1961; Banks et al. 1971; Takeda et al. 1983; Moritz 1985)

- Ermittlung des Blauwertes (Williams et al. 1970; Wolf 1970; Juliano 1971; Sowbhagya und Bhattacharya 1979; Yeh et al. 1981; Gomez und Aguilera 1983; Morrison und Laignelet 1983; Takeda et al. 1983)

Alle genannten Verfahren mit Ausnahme der Blauwertermittlung bergen den großen Nachteil in sich, einer Isolierung der Stärke als probenvorbereitendem Schritt zu bedürfen, und kommen aus diesem Grunde als Schnellmethode nicht in Frage. Die fraktionierte Fällung sowie die chromatographischen Verfahren sind darüberhinaus sehr zeitaufwendig; die "DSC" erfordert hingegen eine außerordentlich kostenintensiven Grundausstattung.

Die fraktionierte Fällung der Stärkekomponenten Amylopektin und Amylose gestattet lediglich die Analyse von 3 Proben pro Woche. Tabelle 1 zeigt eine Gegenüberstellung der Resultate aus fraktionierter Fällung und der Ergebnisse des Blauwerteschnelltestes. Berechnungsgrundlage der geschätzten Amylosegehalte mittels dieses Schnellverfahrens ist die lineare Regression zwischen den resultierenden Blauwerten und den durch Fraktionierung erhaltenen Amylosedaten.

Tabelle 1:

Sorte	Amylosegehalt nach fraktionierter Fällung	Amylosegehalt geschätzt nach dem BW-Schnelltest
Sprinter	83	81
Wunder von Kelvedon	71	60
Überreich	42	39
Bondi	38	37
Strengs Weihenstephaner	41	44
Stehgolt	38	41

Nach dieser Methodenvorselektion bleibt nur die Blauwertmethode als einzige ausreichend schnelle Methode übrig. Aus den oben zitierten Blauwertbestimmungen wurden erste Vorarbeiten für ein einfach auszuführendes und rasches Verfahren für die Ermittlung des Amylosegehaltes in Erbsen entwickelt. Der derzeitige praktizierte Analysenablauf ist wie folgt:

2 Verfahrensablauf des Blauwertschnelltests

2.1 Probenvorbereitung und Messung

a. Stärkebestimmung (modifiziert nach Ewers 1915):

Da Erbsen nennenswerte Gehalte an Zuckerstoffen beinhalten, muß vor einer polarimetrischen Stärkebestimmung eine Extraktion dieser Inhaltsstoffe vollzogen werden, um keine Meßwertverfälschung zu erzielen.

- 10 g trockenes, gemahlene Probenmaterial in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml 80 %igem Ethanol versetzen und 10 min bei 90° C die Mono- und Disaccharide extrahieren
- Lösung filtrieren und den Filtrerrückstand mit 100 ml heißem 80 %igem Ethanol waschen
- Filter mit Rückstand bei 70°C im Trockenschrank trocknen
- Filtrerrückstand zurückwiegen und anschließend mittels eines Mörsers zerkleinern
- 2,5 g in einen 100 ml Meßkolben einwiegen, mit 50 ml 1,124 %iger HCl versetzen und im siedenden Wasserbad 20 min lang erhitzen
- nach dem Abkühlen die Proben mit 10 ml 4 %iger Wolframatophosphorsäure versetzen, mit A. dest. ad 100 ml auffüllen und filtrieren
- Drehwinkel des Filtrates am Polarimeter ermitteln

- Berechnung:

$$\begin{aligned} \text{Meßwertkorrektur: } \alpha_k &= \alpha \times \frac{\text{Rückwaage nach Zuckerextrakt.}}{\text{Einwaage (= 10 g)}} \\ \alpha &= \alpha_k \times \frac{10}{\text{Rückwaage}} \\ \text{Stärkegehalt: [S]} &= \frac{100 \times \alpha_k \times 100 \times 0,851}{(\alpha)_D \times 1 \times 2,5} \\ &= \alpha_k \times \frac{4000 \times 0,851}{(\alpha)_D} \\ &= 18,5 \times \alpha_k \end{aligned}$$

dabei bedeuten:

- α = abgelesener Drehwinkel am Polarimeter
- $(\alpha)_D$ = spezifische Drehung der Stärke (für Erbsen : 184,0)
- 1 = Länge des Polarisationsrohres in Dezimeter
- 0,851 = Umrechnungsfaktor von der Quecksilber- zur Natriumlampe im Polarimeter
- 2,5 = Einwaage in Gramm

b. Amylosegehaltsbestimmung:

- Mahlen der Proben (Ultrazentrifugalmühle, 0,8 mm Sieb)
- Mahlgut in Aluminiumschalen 2 Tage zur Wassergehaltsangleichung in einem klimatisierten Raum offen stehenlassen
- 90 bis 110 mg Mehl in einen 100 ml Meßkolben geben und 1 ml Ethanol (96,4 %) sowie 10 ml 1N Natronlauge zufügen
- 10 min im kochenden Wasserbad dispergieren, sorgfältig schütteln und mit A. bidest. ad 100 ml auffüllen
- 5 ml der Lösung in einen weiteren 100 ml Meßkolben abpipettieren und ca. 50 ml A. bidest. sowie 1 ml 1N Essigsäure zugeben
- 2 ml Jodlösung (0,2 % Jod in 2%iger wässriger Kaliumjodidlösung) zusetzen und mit A. bidest. ad 100 ml auffüllen
- nach ca. 20 min die Absorption dieser Lösung simultan bei 597,5 sowie 620 nm gegen einen Blindwert (2 ml Jodreagenz mit A. bidest. ad 100 ml aufgefüllt) messen.

2.2 Berechnung des Blauwertes und Umrechnung in % Amylose

Für eine Vergleichbarkeit der Meßergebnisse ist eine Kompensation des unterschiedlichen Stärkegehaltes der einzelnen Proben erforderlich. Im Falle der Erbse werden zunächst die Zucker mit 80%igem Ethanol extrahiert und anschließend der Stärkegehalt polarimetrisch mittels einer modifizierten Prozedur nach Ewers (1915) ermittelt (s.o.: Stärkebestimmung).

Als Berechnungsformel ergibt sich:

$$\begin{aligned} \text{BW}_{620 \text{ nm}} &= \text{Abs}_{620 \text{ nm}} \times K_{EW} \times \frac{100}{[S]} \\ \text{BW}_{597,5 \text{ nm}} &= \text{Abs}_{597,5 \text{ nm}} \times K_{EW} \times \frac{100}{[S]} \\ \text{BW} &= \text{Blauwert} \\ \text{Abs} &= \text{Absorption} \quad 0.100 \\ K_{EW} &= \text{Korrekturwert der Einwaage} = \frac{0.100}{EW} \\ [S] &= \text{Stärkegehalt in \%} \end{aligned}$$

Das bedeutet, die Meßwerte werden zunächst um einen Korrekturwert K_{EW} der Einwaage bereinigt ($0.100/EW$, da Einwaagen von 0.090 bis 0.110 g zugelassen werden, um die Einwaagezeit zu verkürzen) und anschließend dem unterschiedlichen Stärkegehalt Rechnung getragen ($100/[S]$).

Es resultiert:

$$\begin{aligned} \text{BW}_{620 \text{ nm}} &= 10 \times \frac{\text{Abs}_{620 \text{ nm}}}{EW \times [S]} \\ \text{und} \\ \text{BW}_{597,5 \text{ nm}} &= 10 \times \frac{\text{Abs}_{597,5 \text{ nm}}}{EW \times [S]} \end{aligned}$$

Unter den Bedingungen am Institut (Probenfeuchte nach Wassergehaltsangleichung !) arbeiten wir derzeit mit folgenden Umrechnungsfaktoren, die auf der linearen Regression zwischen den Blauwerten und dem Amylosegehalt (fraktionierte Fällung, s.Tab. 1) der oben genannten 6 Proben basieren:

$$\text{Amylosegehalt}_1 [\%] = 75.13 \times \text{BW}_{620 \text{ nm}}$$

$$\text{Amylosegehalt}_2 [\%] = 70.25 \times \text{BW}_{597.5 \text{ nm}}$$

Der endgültige Amylosegehalt ergibt sich aus dem arithmetischen Mittel von Amylosegehalt $_1$ und $_2$:

$$\text{Amylosegehalt} [\%] = 0.5 \times (\text{Am-geh.}_1 + \text{Am-geh.}_2)$$

2.3 Berechnungsbeispiel

Das Berechnungsschema des Amylosegehaltes einer Erbsenprobe soll anhand eines Beispiels einmal demonstriert werden. Der Stärkegehalt der Probe sei 40,8 %, die $\text{Abs}_{620 \text{ nm}}$ betrage 0,3248 und die $\text{Abs}_{597,5 \text{ nm}}$ ergebe 0,3506 bei einer Einwaage von 0,098 g.

Das bedeutet:

$$\begin{aligned} \text{Abs}_{620 \text{ nm}} &= 0,3248 \\ \text{Abs}_{597,5 \text{ nm}} &= 0,3506 \\ [\text{S}] &= 40,8 \% \\ \text{Einwaage} &= 0,098 \text{ g} \end{aligned}$$

Es resultiert:

$$\text{BW}_{620 \text{ nm}} = 10 \times \frac{\text{Abs}_{620 \text{ nm}}}{\text{EW} \times [\text{S}]} = 10 \times \frac{0,3248}{0,098 \times 40,8} = 0,8123$$

$$\text{BW}_{597,5 \text{ nm}} = 10 \times \frac{\text{Abs}_{597,5 \text{ nm}}}{\text{EW} \times [\text{S}]} = 10 \times \frac{0,3506}{0,098 \times 40,8} = 0,8769$$

$$\begin{aligned} \text{Amylosegehalt}_1 &= 75,13 \times \text{BW}_{620 \text{ nm}} \\ &= 75,13 \times 0,8123 \\ &= 61,0 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Amylosegehalt}_2 &= 70,25 \times \text{BW}_{597,5 \text{ nm}} \\ &= 70,25 \times 0,8769 \\ &= 61,6 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Amylosegehalt} &= 0,5 \times (\text{Amylosegehalt}_1 + \text{Amylosegehalt}_2) \\ &= 0,5 \times (61,0 + 61,6) = 61,3 \% \end{aligned}$$

Es errechnet sich also ein Amylosegehalt von 61 %.

Für den Vergleich verschiedener Genotypen im Rahmen eines Erbsenzuchtprogrammes sind die Blauwerte bereits ausreichend. Die Umrechnung in %Amylose wird derzeit anhand von Eichproben praktiziert, die mittels fraktionierter Fällung auf ihren Amylosegehalt untersucht worden sind. Da dieses Verfahren lediglich die Analyse von 3 Proben pro Woche gestattet, konnten leider nur insgesamt 6 Erbsensorten auf ihren Amyloseanteil hin getestet werden (s. Tabelle 1).

Fünf der sechs Werte zeigen eine ausreichend gute Übereinstimmung mit den Resultaten der fraktionierten Fällung, der Wert für die Markerbse "Wunder von Kelvedon" weist jedoch eine deutliche Abweichung auf.

Zur weiteren Absicherung des Blauwertschnelltests wurde ein stichprobenhafter Vergleich der Werte mit denen aus po-

tentiometrischer JBV-Ermittlung vorgenommen. Diese freundlicherweise vom Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität Braunschweig vorgenommenen Analysen ergaben eine gute Übereinstimmung der Werte mit den Schnelltestdaten; dabei lieferten die JBV-Werte stets um 4 - 7 % höhere Amylosegehalte als der Blauwertschnelltest.

Eine statistische Absicherung dieser Korrelation ist aufgrund der geringen Anzahl exakt analysierter Proben nicht möglich. Somit sind wir sehr an Erbsenproben mit bekanntem Amyloseanteil in der Stärke interessiert die zu einer besser abgesicherten Umrechnung der Blauwertschätzdaten in %Amylose herangezogen werden können.

Zur Absicherung der Ergebnisse wird stets eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Eine Entfettung der Proben erwies sich bereits in Vorversuchen als nicht erforderlich.

Diese Art der Amylosegehaltsabschätzung erlaubt selbst mit einer Laborgrundausrüstung die Analyse von ca. 30 - 40 Proben pro Tag. Die Analysengenauigkeit reicht für eine Selektion im Rahmen eines Züchtungsprogrammes aus.

Zusammenfassung

Aufgrund des hohen Interesses der Industrie an amylosereichen Erbsenformen besteht derzeit eine große Nachfrage nach einem Verfahren zur schnellen Abschätzung des Amyloseanteils in der Erbsenstärke. Vor dem Hintergrund der z.Z. am häufigsten angewandten Bestimmungsmethoden wird ein Verfahrensablauf skizziert, der eine rasche Abschätzung des Amylosegehaltes in Erbsen im Rahmen eines Züchtungsprogrammes gestattet.

Der Maizena Gesellschaft sei an dieser Stelle für die Durchführung der Amylosegehaltsbestimmungen mittels fraktionierter Fällung gedankt.

Rapid estimation of amylose content in peas

In consequence of the great interest of the industry in "high amylo"- Pisum genotypes exists a remarkable demand for a procedure, that allows the rapid estimation of the amylose portion in pea starch. Considering the most frequently applied determination methods at time, a procedure is demonstrated, that can be used for a rapid estimation of the amylose content of peas in the framework of a breeding programme.

Literatur

Banks, W.; Greenwood, C.T. und Khan, K.M.: The interaction of linear amylose oligomeres with iodine. - Carbohydrate Research 17, (1971), S. 19 - 24.

Boyer, C.D. und Liu, K.-C.: The interaction of endosperm genotype and genetic background. Part I. Differences in chromatographic profiles of starches from nonmutant and mutant endosperms. - Starch/Stärke 37, (1985), S. 73 - 79.

Ceh, M.; Stropnik, C. und Leskovař, S.: Stufenweise Elutionsanalyse der Fraktionen von thermisch dispergierter Amylose-, Kartoffel- und Wachsmaisstärke. - Starch/Stärke 37, (1985), S. 415 - 421.

Chinnasamy, R. und Bhattacharya, K.R.: Characteristics of gelchromatographic fractions of starch in relation to

- rice and expanded rice-product qualities. *Starch/Stärke* 38, (1986), S. 51 - 57.
- Gomez, M.H. und Aguilera, J.M.: Changes in the starch fraction during extrusion-cooking of corn. - *J. Food Sci.* 48, (1983), S. 378 - 381.
- Hizukuri, S.: Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. - *Carbohydrate Research* 141, (1985), S. 295 - 306.
- Ikawa, Y.; Glover, D.V.; Sugimoto und Fuwa: Amylose percentage and distribution of unit chain-length of maize starches having a specific genetic background. - *Carbohydrate Research* 61, (1978), S. 211 - 216.
- Juliano, B.O.: A simplified assay for milled-rice amylose. - *Cereal Sci. Today* 16, (1971), S. 334 - 340.
- Klingler, R.W.: Probleme der gelchromatographischen Molekulargewichtsbestimmung von Stärkemolekülen. - *Starch/Stärke* 37, (1985), S. 111 - 115.
- Kobayasha, S.; Schwartz, S.J.; und Lineback, D.R.: Rapid analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography. - *J. of Chromatography* 319, (1985), S. 205 - 214.
- Kuge, T. und Takeo, K.: Complexes of starchy materials with organic compounds. Part I. Affinity observed by gas chromatography. - *Agr. Biol. Chem.* 32, (1968), S. 753 - 758.
- Kugimiya, M. und Donovan, J.W.: Calorimetric determination of the amylose content of starches based on formation and melting of the amylose-lysolecithin complex. - *J. Food Sci.* 46, (1981), S. 765 - 770.
- McCready, R.M. und Hassid, W.J.: The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. - *J. Amer. Chem. Soc.* 65, (1943), S. 1154 - 1157.
- Montgomery, E.M.; Sexson, K.R. und Senti, F.R.: High-amylose corn starch fractions. - *Stärke* 13, (1961), S. 215 - 222.
- Moritz, K.: Zur thermostabilen Bindung von Aromastoffen an Stärke. Dissertation, Inst. f. Lebensmittelchemie, TU Braunschweig, (1985).
- Morrison, W.R. und Laignelet, B.: An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amylose in cereal and other starches. - *J. Cereal Sci.* 1, (1983), S. 9 - 20.
- Sargeant, J.G.: Determination of amylose:amylopectin ratios of starches. - *Starch/Stärke* 34, (1982), S. 89 - 92.
- Schoch, T.J.: Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. - *J. Amer. Chem. Soc.* 64, (1942), S. 2957 - 2961.
- Schoch, T.J.: Fractionation of starch by selective precipitation with butanol. *J. Amer. Chem. Soc.* 65, (1943), S. 1380.
- Schoch, T.J.: The fractionation of starch. - *Adv. in Carbohydrate Chemistry* 1, (1945), S. 247-277.
- Sosulski, F.W.; Hoover, R.; Tyler, R.T.; Murray, E.D. und Arntfield, S.D.: Differential scanning calorimetry of air-classified starch and protein fractions from eight legume species. - *Starch/Stärke* 37, (1985), S. 257 - 262.
- Sowbhagya, C.M. und Bhattacharya, K.R.: Simplified determination of amylose in milled rice. - *Starch/Stärke* 31, (1979), S. 159 - 163.
- Stute, R. und Konieczny-Janda, G.: DSC- Untersuchungen an Stärken. Teil II. Untersuchungen an Stärke-Lipid-Komplexen. - *Starch/Stärke* 35, (1983), S. 340 - 347.
- Takeda, C.; Takeda, Y. und Hizukuri, S.: Physico-chemical properties of lily starch. - *Cereal Chem.* 60, (1983), S. 212 - 216.
- Williams, P.C.; Kuzina, F.D. und Hlynka, I.: A rapid colorimetric procedure for estimating the amylose content of starches and flours. - *Cereal Chem.* 47, (1970), S. 411 - 420.
- Wolf, M.J.: Amylose determination in DMSO extracts of maize. - *Cereal Chem.* 47, (1970), S. 437 - 446.
- Yamada, T. und Taki, M.: Fractionation of maize starch by gel-chromatography. - *Stärke* 28, (1976), S. 374 - 377.
- Yeh, J. Y.; Garwood, D.L. und Shannon, J.C.: Characterization of starch from maize endosperm mutants. - *Starch/Stärke* 33, (1981), S. 222 - 230.
- Verfasser: Rühl, Gerhard, Dr. rer. nat., Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft Braunschweig-Völkenrode (FAL), Leiter: Prof. Dr. Manfred Dambroth.