

Методические указания по оценке содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале

Ю.А. Хорошавин^{1, 2}, В.К. Хлесткин¹ 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

Статья посвящена разработке эффективной методики определения содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале. Поскольку картофельный крахмал – важное возобновляемое сырье для целого ряда отраслей промышленности, для селекции картофеля по составу и физико-химическим свойствам крахмала и его промышленного применения важно иметь способ, позволяющий быстро тестировать образцы картофельного крахмала на содержание полисахаридов. Разработанная методика включает в себя элементы ранее разрозненных методов растворения и спектрофотометрического определения амилозы в крахмале и имеет следующие преимущества: 1) образцы крахмала растворяются в органическом растворителе (в 0.5 % растворе бромид лития в диметилсульфоксиде ДМСО); 2) измерение абсорбции света производится на двух длинах волн – 550 и 510 нм; 3) методика адаптирована для применения на планшетном спектрофотометре. Это позволяет избежать гидролиза полисахаридов крахмала в процессе растворения, делает более точным спектрофотометрическое определение концентрации комплекса амилозы с йодом в растворе и открывает возможность использования этой методики для поточного тестирования образцов крахмала. Применяя предложенную процедуру растворения, удается также избежать образования сгустков желированного крахмала и получать растворы, содержащие амилозу и амилопектин в тех же пропорциях, что и в исходном крахмале. Разработанная методика опробована на образцах крахмала, выделенных из клубней картофеля сортов Лина, Великан, Голубизна, Фаворит отечественной селекции, и может быть использована как для прикладных работ по определению содержания и состава амилозы в образцах картофельного крахмала, так и в научных исследованиях для выявления ассоциаций «генотип–признак».

Ключевые слова: крахмал; амилоза; амилопектин; спектрофотометрия; фенотипирование.

A modified procedure for the evaluation of the amylose and amylopectin content in potato starch

Yu.A. Khoroshavin^{1, 2}, V.K. Khlestkin¹ 

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

The article is devoted to the development of a technique for determining the content of amylose and amylopectin, effective for potato starch. Since potato starch is an important renewable raw material for a number of industries, it is important to have a throughput approach that allows potato starch samples to be tested quickly for the content of its constituent polysaccharides for potato breeding for starch properties and for starch industrial application. The developed technique includes elements of previously disjointed procedures for dissolution and spectrophotometric determination of amylose in starch, and combines the following advantages: 1) starch samples dissolve in an organic solvent (0.5 % solution of lithium bromide in dimethyl sulfoxide (DMS)); 2) measurement of light absorption is performed at two wavelengths, 550 and 510 nm, and 3) the technique is adapted for use with a plate spectrophotometer. This procedure allows starch polysaccharides to avoid to avoid hydrolysis during dissolution, allows the precise spectrophotometric determination of the concentration of amylose complex with iodine in solution, and opens the possibility of using this technique for throughput phenotyping. Applying a certain dissolution procedure, it is also possible to avoid the formation of gelled starch clots in solutions for spectrophotometry, which is important for the preparation of solutions containing amylose and amylopectin in the same proportions as in the original starch. The technique was tested on starch isolated from potato tubers varieties Lina, Velikan, Golubizna, Favorit of domestic selection. The technique developed can be used for phenotyping starch of an extended set of potato varieties (determining the content and composition of amylose in potato starch samples) to identify “trait–genotype” associations.

Key words: starch; amylose; amylopectin; spectrophotometry; phenotyping.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Хорошавин Ю.А., Хлесткин В.К. Методические указания по оценке содержания амилозы и амилопектина в картофельном крахмале. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(7):820-824. DOI 10.18699/VJ18.432

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Khoroshavin Yu.A., Khlestkin V.K. A modified procedure for the evaluation of the amylose and amylopectin content in potato starch. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(7):820-824. DOI 10.18699/VJ18.432 (in Russian)

Цель настоящей работы – разработка методики, удобной для практического тестирования картофельного крахмала на содержание амилозы, для дальнейшей классификации по этому признаку селекционных сортов картофеля и создания генетических маркеров, связанных с этим признаком.

Как известно, крахмал представляет собой гранулы, формирующиеся в пластидах клеток растений и служащие в основном для запасаания и получения энергии. Согласно принятой в наше время кластерной модели (Wang et al., 1998), гранулы крахмала организованы в виде чередующихся кристаллических и аморфных слоев, образованных двумя типами полимерных молекул – амилозы и амилопектина. И амилоза, и амилопектин представляют собой полисахариды, мономерами которых являются фрагменты α -глюкозы. При этом амилоза – преимущественно линейный полимер с небольшим количеством коротких ответвлений, в котором фрагменты α -глюкозы соединены между собой (1→4) гликозидными связями, он имеет молекулярную массу 10^5 – 10^6 а. е. м. Амилопектин – разветвленная молекула, в которой фрагменты α -глюкозы соединены как (1→4), так и (1→6) гликозидными связями, имеет молекулярную массу 10^7 – 10^9 а. е. м.

Содержание амилозы в природном картофельном крахмале составляет, как правило, 20–30 %. Ранее работы по получению линий картофеля с измененным содержанием амилозы проводились традиционной селекцией и спонтанным мутагенезом (Schwall et al., 2000), но значимых результатов, по-видимому, добиться не удалось. Однако существуют генетически измененные линии картофеля, продуцирующие крахмал, содержащий преимущественно или амилозу, или амилопектин (Хлесткин и др., 2017).

Известно (van der Leij et al., 1991), что содержание амилозы в крахмале – моногенный признак, который контролируется геном *GBSSI*, кодирующим соответствующий белок закрепленной на грануле крахмалосинтазы (granule-bound starch synthase). Действительно, антисенс-нокаут по этому гену приводит к так называемым восковым (waxy) линиям картофеля, содержащим практически исключительно амилопектин (98–100 %) (Visser et al., 1991). Крахмал из такого картофеля обладает улучшенными гелеобразующими свойствами (скорость образования, прозрачность и вязкость геля) и может быть востребован в пищевой, бумажной и клеевой промышленности. Логично, что в Европе впервые был официально зарегистрирован генно-модифицированный картофель именно с модификацией по гену *GBSS* (Ryffel, 2010; Wandelt, 2014). Недавно такой картофель, дающий безамилозный крахмал, был получен методом CRISPR (Andersson et al., 2017).

Значительно сложнее получить линии с низким содержанием амилопектина. Содержание амилопектина определяется генами ветвления полисахаридов крахмала, кодирующих соответствующие белки (starch branching enzyme, SBE), и их как минимум два – *SBEI* и *SBEII*. Причем нокаут по одному из них не приводит к значительному сокращению содержания амилопектина из-за компенсаторного эффекта, когда другой ген берет на себя функцию нокаутированного гена. И только нокаут по обоим генам позволил получить линии картофеля с

крахмалом, содержащим в среднем менее 40 % амилопектина (Andersson et al., 2006). Такой высокоамилозный крахмал может обладать значительной резистентностью и низким гликемическим индексом, что дает возможность использовать его в диетическом питании (повышенная резистентность высокоамилозного крахмала на примере рисового крахмала показана в исследовании (Srikaeo, Sangkhiaw, 2014)). Представляет также определенный интерес использование такого крахмала в технических целях (Jobling, 2004).

Методические подходы, применяемые для измерения содержания амилозы и амилопектина в крахмале

Из-за значительного различия молекулярных свойств амилозы и амилопектина физико-химические свойства крахмала в зависимости от содержания этих полисахаридов сильно варьируют (Jobling, 2004). Существует несколько подходов к определению этого признака, сравнение которых приведено в работе (Zhu et al., 2008). На практике чаще используются два из них. Первый базируется на высокоэффективной жидкостной хроматографии, методе, требующем специальной подготовки и оборудования (Kobayashi et al., 1985). Поскольку амилопектин – разветвленный полимер с большим молекулярным весом, нужны также специальные колонки, дорогостоящие полисахаридные стандарты, детектор, подходящий для идентификации полисахаридов. Количественное растворение образцов крахмала в растворителях, подходящих для хроматографии, не всегда возможно без разрушения полисахаридов. Все это делает метод неточным, дорогостоящим и недоступным для многих лабораторий.

Второй подход основан на спектрофотометрическом определении концентрации комплекса амилозы с йодом в растворе. Известно, что и амилоза, и амилопектин способны к образованию комплексов с йодом (Davis et al., 1994). Для амилозы этот комплекс представляет собой супрамолекулярное соединение включения с йодом, имеющее широкую полосу поглощения с максимумом при $\lambda_{\max} = 620$ нм. В случае амилопектина комплекс имеет другую природу (не соединение включения) со значительно менее интенсивной красно-коричневой окраской. Было показано, что точность определения амилозы значительно повышалась при использовании разницы в поглощении света при $\lambda_{\max} = 620$ нм и при $\lambda_{\min} = 510$ нм – длине волны, соответствующей локальному минимуму поглощения (Zhu et al., 2008). Таким образом, большинство спектрофотометрических методик определения амилозы основано на измерении поглощения света ее комплексом с йодом на одной или двух длинах волн, поскольку этот метод наиболее экономичен и прост в исполнении.

Основные сложности пробоподготовки при спектрофотометрическом методе определения содержания амилозы в крахмале

Главным различием между спектрофотометрическими методиками, а также ключевой сложностью при использовании этого метода анализа является пробоподготовка, в частности приготовление раствора картофельного крахмала. Картофельный крахмал, в отличие от зернового,

имеет лишь следовые примеси жиров и белков. Однако высокий молекулярный вес и плотная сложная компоновка гранул крахмала значительно усложняют процесс его количественного растворения для получения истинного раствора без нарушения структуры входящих в него полисахаридов.

Исторически методики измерения соотношения амилозы и амилопектина были основаны на растворении крахмала в водных, щелочных (McCready, Hassid, 1943) или кислотных (Hovenkamp-Hermelink et al., 1988) средах. Нами были предприняты попытки использовать методику растворения крахмала в горячей щелочи (Zhu et al., 2008), согласно которой крахмал растворяют в 1 М NaOH при 80 °С. После разбавления водой, нейтрализации и окрашивания йодом измеряли оптическую плотность образца. При этом не удалось получить удовлетворительной воспроизводимости результатов, что связано, по-видимому, с частичным разрушением полисахаридов. На аналогичные проблемы с гидролизом крахмала в щелочных условиях указывают и другие работы (Wu et al., 2014). Растворение крахмала в чистой воде при высокой температуре (выше 90 °С) привело к существенно завышенным данным по концентрации амилозы в растворе и крахмале (более 60 % амилозы в пересчете на состав крахмала). Это могло произойти либо из-за неполного растворения крахмала, набухшие прозрачные сгустки которого во многих случаях хорошо были видны на стенках, либо из-за деградации крахмала с образованием из амилопектина линейных олигосахаридов, которые также способны давать окрашенные соединения с йодом, как и амилозные цепи.

В органических малополярных и не образующих сильных водородных связей растворителях (углеводороды, сложные и простые эфиры, ацетон, спирты) крахмал практически не растворяется. Рассматривая органические растворители в качестве среды для спектрофотометрического определения комплекса амилозы с йодом, необходимо принимать во внимание как растворение крахмала и неорганических йодидов, так и саму возможность образования супрамолекулярного комплекса. В литературе имеются данные о растворении крахмала с использованием таких растворителей, как имидазол (Zdanowicz et al., 2016), диметилсульфоксид (ДМСО) (Kurtzman et al., 1973) и диметилацетамид (Striegel, Timpa, 1995).

Нам удалось на основе различных процедур разработать и адаптировать методику, позволяющую растворить картофельный крахмал без разрушения полисахаридных цепей, произвести его окрашивание и измерения в водной среде, а также вычислить содержание амилозы, определяя оптическую плотность образца на двух длинах волн. Методика может применяться как со стандартными спектрофотометрическими кюветами с длиной оптического пути 10 мм, так и в поточном варианте с помощью планшетного спектрофотометра.

Построение калибровочной прямой

Для получения калибровочной прямой использовали амилозу, выделенную нами из картофельного крахмала по методике (Mua, Jackson, 1998).

Амилозу растворили в 0.5 % растворе LiBr в ДМСО, разбавили полученные растворы водой для получения

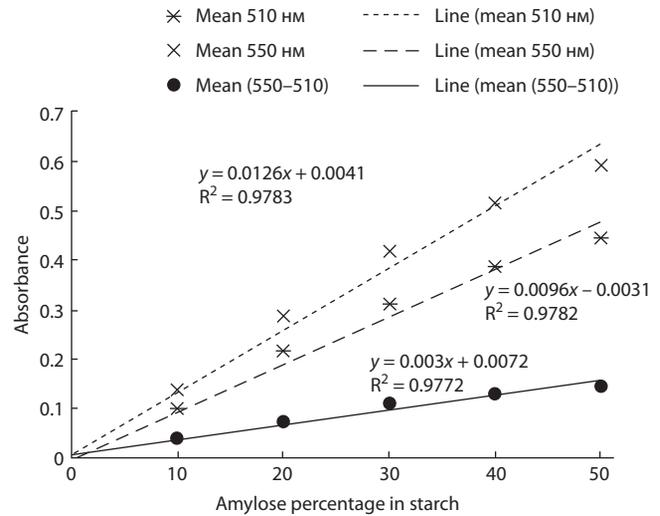


Fig. 1. Calibration curve (solid) based on the difference between light absorption at 550 and 510 nm. Approximation curves for light absorption values at 550 and 510 nm are shown separately.

The dispersion according to separate data on light absorption for 550 and 510 nm is higher than on the data on the difference between these values, in agreement with Zhu et al. (2008).

раствора с концентрацией около 0.15 мг/мл. Далее в лунках планшеты помещали аликвоты приготовленного раствора объемом от 0 до 100 мкл и доводили водой объем раствора в каждой лунке до 100 мкл. После этого смесью цитратного буфера (0.1 н, pH 6) с раствором йода (2 г KI и 0.2 г I₂ на 100 мл воды) доводили объем раствора в лунках до 300 мкл. При этом происходит интенсивное окрашивание раствора, цвет которого в дневном свете визуальное определяется как голубой. Измерение поглощения света в планшетном спектрофотометре проводили на двух длинах волн – при 510 и 550 нм, согласно (Zhu et al., 2008) вычисляли разницу и полученные данные использовали для построения калибровочной прямой и получения уравнения зависимости разницы поглощения на двух длинах волн от содержания амилозы в образце (рис. 1). Всего получили две повторности по числу навесок амилозы и три повторности по числу измерений.

Методика измерения содержания амилозы и амилопектина

Для проведения измерения содержания амилозы в картофельном крахмале приготовили раствор навески картофельного крахмала (примерно 5 мг) в 0.5 % растворе бромид лития в ДМСО путем длительного встряхивания при нагревании до 80 °С на термошейкере для достижения полного растворения крахмала. Как оказалось, критически важно обеспечить равномерное распределение набухшего в нагретом растворителе крахмала по всему объему раствора с самого начала процесса растворения. Визуальное отсутствие осадка в пробирке не обязательно означает его полное растворение, крахмал может находиться в растворе в виде крупных прозрачных агломератов. Поэтому в течение первых 30 мин нагревания раствор интенсивно встряхивали вручную примерно один раз в 10 мин. Далее

раствор крахмала в ДМСО разбавляли водой в 25 раз до получения раствора, содержащего примерно 0.15 мг/мл крахмала. Определение разности оптических плотностей полученного образца при 550 и 510 нм дало возможность вычислить содержание амилозы в образце с помощью калибровочной прямой. Эксперименты проводились в трех технических повторностях с расчетом стандартного отклонения (рис. 2).

Протокол измерения и расчета содержания амилозы в крахмале

1. Поместить в полипропиленовые пробирки типа Eppendorf на 1.7 мл 5 мг крахмала (по три повторности для каждого образца крахмала).
2. Добавить 1.3 мл 0.5 % раствора LiBr в ДМСО.
3. Поставить пробирки в термошейкер (400 об./мин, 80 °С, 20 ч). Первые 30 мин один раз в 10 мин дополнительно встряхивать пробирки вручную с переворачиванием для предотвращения образования комков набухшего крахмала на дне.
4. Приготовить раствор йода (2 г KI и 0.2 г I₂ на 100 мл раствора). Этот раствор стабилен и может храниться в темном месте в течение нескольких недель.
5. 200 мкл раствора йода разбавить до 10 мл цитратным буфером (0.1 М, pH = 6). Этот раствор менее стабилен (годен один-два часа), его нужно использовать свежеприготовленным непосредственно перед анализом.
6. По 200 мкл каждого из полученных на шаге 3 растворов крахмала разбавить при перемешивании и нагревании до 50 °С дистиллированной водой до суммарного объема 5 мл. Нагревание и перемешивание предотвращают выпадение амилозы в твердом виде при смешивании водного и неводного растворов.
7. По 100 мкл полученных на шаге 6 растворов поместить в лунки 96-луночного планшета для проведения спектрофотометрических измерений.
8. По 200 мкл полученных на шаге 5 растворов йода в буфере добавить в лунки планшета, доведя таким образом суммарный объем жидкости в каждой лунке до 300 мкл. При этом происходит окрашивание растворов в голубой цвет (при дневном освещении).
9. В три свободные лунки добавить по 300 мкл цитратного буфера (0.1 М, pH = 6) в качестве растворов сравнения.
10. Планшет установить в спектрофотометр и инкубировать при встряхивании в течение 30 мин.
11. Измерить значение абсорбции света при 510 и 550 нм в каждой заполненной лунке, автоматически учитывая растворы сравнения (см. шаг 9). Каждое измерение выполнить в трех технических повторностях.
12. Данные экспортировать в программу для обработки (в нашем случае Excel). Провести усреднение по повторностям, найти разницу значений абсорбции света $Abs_{550} - Abs_{510}$.
13. Полученные данные подставить в уравнение калибровочной кривой и найти содержание амилозы в образце.
14. Содержание амилопектина в крахмале определяется как 100 % минус содержание амилозы (в %).

Калибровочная прямая получена по этому же протоколу с использованием навески амилозы вместо навески крах-

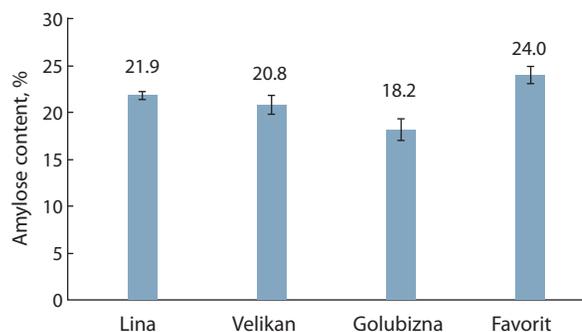


Fig. 2. Amylose contents in samples from four potato varieties bred in Russia.

мала. На шаге 7 использовать аликвоты по 0, 20, 40, 60, 80, 100 мкл раствора амилозы, доведенные водой до 100 мкл.

Необходимые материалы и оборудование

1. Вода дистиллированная и набор аналитической посуды для биохимического анализа крахмала.
2. УФ-спектрофотометр любой модели, способный измерять оптическую плотность образца при 550 и 510 нм. В исследовании использовали планшетный спектрофотометр Epoch2 с 96-луночными планшетами Costar с плоским дном. Методика опробована также на кюветном спектрофотометре BioRad с кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 10 мм.
3. Образец амилозы был получен в секторе химической биологии растений ИЦиГ СО РАН, согласно методике из (Mua, Jackson, 1998). Методика получения крахмала из картофеля – по (Chung et al., 2014).

Закключение

Содержание амилозы в крахмале разных сортов и гибридов картофеля различно и может быть исследовано методом УФ-спектроскопии на двух длинах волн. На достоверность результатов значительное влияние оказывают пробоподготовка и учет поглощения света на двух длинах волн, в связи с чем была разработана методика, комбинирующая: 1) определенную процедуру растворения в органическом растворителе, 2) измерение абсорбции света на двух длинах волн и 3) возможность использования для поточного скрининга на планшетном спектрофотометре. Показано, что содержание амилозы в крахмале картофеля сортов Лина, Великан, Голубизна, Фаворит варьирует от 18.2 до 24 %.

Применение такой методики для большого числа образцов даст возможность оценивать содержание амилозы как признак для поиска ассоциированных с ним локусов и ДНК-маркеров и использования последних в современных наукоемких методах селекции (Khlestkin et al., 2018).

Acknowledgement

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 17-29-08006. The authors are grateful to the Shared Access Center «Collection of Crop Genotypes for Basic Research in Plant Genetics and the Development

of Genetic Technologies for Marker-Assisted and Genomic Selection» (GenAgro).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Список литературы / References

- Хлесткин В.К., Пельтек С.Е., Колчанов Н.А. Гены-мишени для получения сортов картофеля (*Solanum tuberosum* L.) с заданными свойствами крахмала. С.-х. биология. 2017;52(1):25-36. [Khlestkin V.K., Peltek S.E., Kolchanov N.A. Target genes for development of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars with desired starch properties. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology. 2017;52(1):25-36. DOI 10.15389/agrobiology.2017.1.25rus. (in Russian)]
- Andersson M., Melander M., Pojmark P., Larsson H., Bulow L., Hofvander P. Targeted gene suppression by RNA interference: An efficient method for production of high-amylose potato lines. J. Biotechnol. 2006;123:137-148. DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.11.001.
- Andersson M., Turesson H., Nicolai A., Falt A.-S., Samuelsson M., Hofvander P. Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. Plant Cell Rep. 2017;36:117-128. DOI 10.1007/s00299-016-2062-3.
- Chung H.-J., Li X.-Q., Kalinga D., Lim S.-T., Yada R., Liu Q. Physicochemical properties of dry matter and isolated starch from potatoes grown in different locations in Canada. Food Res. Int. 2014;57:89-94. DOI 10.1016/j.foodres.2014.01.034.
- Davis H., Skrzypek W., Khan A. Iodine binding by amylopectin and stability of the amylopectin-iodine complex. J. Polymer. Sci. Polymer. Chem. 1994;32(12):2267-2274. DOI 10.1002/pola.1994.080321208.
- Hovenkamp-Hermelink J., de Vries J., Adamse P., Jacobsen E., Witholt B., Feenstra W. Rapid estimation of the amylose/amylopectin ratio in small amounts of tuber and leaf tissue of the potato. Potato Res. 1988;31:241-246.
- Jobling S. Improving starch for food and industrial applications. Curr. Opin. Plant Biol. 2004;7:210-218. DOI 10.1016/j.pbi.2003.12.001.
- Khlestkin V., Peltek S., Kolchanov N. Review of direct chemical and biochemical transformations of starch. Carbohydr. Polym. 2018; 181:460-476. DOI 10.1016/j.carbpol.2017.10.035.
- Kobayashi S., Schwartz S.J., Lineback D.R. Rapid analysis of starch, amylose and amylopectin by high-performance size-exclusion chromatography. J. Chromatogr. 1985;319(2):205-214. DOI 10.1016/S0021-9673(01)90555-2.
- Kurtzman R., Jones F., Bailey G. Dissolution of starches in dimethylsulfoxide and variations in starches of several species, varieties, and maturities. Cereal Chem. 1973;50:312-321.
- McCready R., Hassid W. The separation and quantitative estimation of amylose and amylopectin in potato starch. J. Am. Chem. Soc. 1943; 65(6):1154-1157. DOI 10.1021/ja01246a038.
- Mua J., Jackson D. Retrogradation and gel textural attributes of corn starch amylose and amylopectin fractions. J. Cereal Sci. 1998;27: 157-166. DOI 10.1006/jcrs.1997.0161.
- Ryffel G.U. Making the most of GM potatoes. Nat. Biotechnol. 2010; 28(4):318. DOI 10.1038/nbt0410-318.
- Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J., Jeffcoat R., Tayal A., Shi Y.C., Gidley M.J., Jobling S.A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. Nat. Biotechnol. 2000;18(5): 551-554. DOI 10.1038/75427.
- Srikeno K., Sangkhaw J. Effects of amylose and resistant starch on glycaemic index of rice noodles. LWT – Food Sci. Technol. 2014; 59(2):1129-1135. DOI 10.1016/j.lwt.2014.06.012.
- Striegel A., Timpa J. Molecular characterization of polysaccharides dissolved in Me2Nac-lcl by gel-permeation chromatography. Carbohydr. Res. 1995;267(2):271-290.
- van der Leij F., Visser R., Ponstein A., Jacobsen E., Feenstra W. Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the *amf* allele. Mol. Gen. Genet. 1991;228(1-2):240-248.
- Visser R., Somhorst I., Kuipers G., Ruys N., Feenstra W., Jacobsen E. Inhibition of the expression of the gene for granule-bound starch synthase in potato by antisense constructs. Mol. Gen. Genet. 1991; 225:289-296.
- Wandelt C. Quality traits: Altered starch composition in potato (BASF Plant Science Company GmbH, Meeting on “Genetic basis of unintended effects in modified plants”, 14–15 January 2014, Canada). Ottawa, 2014. Available <http://hesiglobal.org/hesi/wp-content/uploads/sites/11/2015/12/Quality-traits-altered-starch-composition-in-potato.pdf>.
- Wang T.L., Bogracheva T.Ya., Hedley C.L. Starch: as simple as A, B, C? J. Exp. Bot. 1998;49(320):481-502. DOI 10.1093/jxb/49.320.481.
- Wu A., Li E., Gilbert R. Exploring extraction/dissolution procedures for analysis of starch chain-length distributions. Carbohydr. Polym. 2014;114:36-42.
- Zdanowicz M., Spychaj T., Maka H. Imidazole-based deep eutectic solvents for starch dissolution and plasticization. Carbohydr. Polym. 2016;140:416-423. DOI 10.1016/j.carbpol.2015.12.036.
- Zhu T., Jackson D., Wehling R., Geera B. Comparison of amylose determination methods and the development of a dual wavelength iodine binding technique. Cereal Chem. 2008;85(1):51-58. DOI 10.1094/CCHEM-85-1-0051.