ARBEIDSBESKRIVELSE

Institutt for husdyr og akvakultuvitenskap, UMB

Metodenavn:**Stivelse i Kornprodukter/gjødsel/vom-og tarminnhold + Stivelse m/ acetonbehandling** IHA-nr.:ARB1159

---

1. Innledning

I kornprodukter utgjør stivelse største delen av karbohydratene. Stivelse er bygd opp av maltose-enheter. Den tredimensjonale strukturen i stivelsen brytes ned til vannløslige kortere kjeder ved tilsettning av α-amylase. I neste trinn brukes amyloglukosidase-enzym til omdanning av de kortere kjedene, og resultatet blir glukose. Konsentrasjonen av glukose bestemmes til slutt som en fargereaksjon med spektrofotometer

Stivelse $\xrightarrow{\text{koking-amylase}}$ delvis nedbrutt stivelse $\xrightarrow{\text{amyloglugosidase}}$ glukose

2. Prinsipp

Prøven løses opp i en buffer som har pH rundt optimum for α-amylaseaktivitet, og som inneholder kalsium som er viktig for at enzymet skal virke. Ved koking av prøven med varmestabil α-amylase tilstede, vil den tredimensjonale strukturen stivelsen inngår i brytes ned, slik at stivelse blir tilgjengelig for α-amylase. Alfa.amylase spalter de lange stivelseskjedene til kortere kjeder, som vil løse seg i væskefasen. Deretter tilsettes en buffer som har pH rundt optimum for amyloglukosidase-aktivitet, og den tilsatte amyloglukosidasen spalter de kortere kjedene ned til glukose.Glukoseinnholdet bestemmes deretter kvantitativt på Cobas spektrofotometer ved hjelp av glukose hexokinase reagens.

3. Reagenser

A.

MOPS buffer (50 mM, pH 7,0)

11,55 g Natriumsalt av MOPS (art.nr. M 9381 fra Sigma) tilsettes 900 ml dest. vann i et begerglass med røremagnet. Under røringen justeres pH til 7,0 ved å tilsette 1 M (10 %) saltsyre. Det trengs ca 17 ml. Dertetter tilsettes 0,74 g kalsiumklorid dihydrat og 0,2 g natrium azid, og volumet justeres til 1 l i en volumetrisk flaske. Bufferen kan lagres ved romtemperatur.

B.
Natriumacetat buffer (200mM, pH 4,5)
11,8 ml iseddik (1,05 g/l) tilsettes i 900ml dest. vann i et begerglass med røremagnet. Under røring justeres pH til 4,5 ved å tilsette 1M (4 g/100ml) NaOH. Det trengs ca 60ml. Deretter tilsettes 0,2g natrium azid, og volumet justeres til 1 L i en volumetrisk flaske. Bufferen kan lagres ved romtemperatur. Natrium azid utskiller giftig gass ved lav pH. Derfor skal dette stoffet tilsettes etter pH-justering. Det kan også unnlates å bruke natrium azid, men da må bufferen lagres i kjøleskap.
C.
Varmestabil α-amylase (for eksempel art.nr. E-BLAAM fra Megazyme eller A 3306 fra Sigma). Dette enzymet lagres i kjøleskap. Før bruk fortynnes enzymet 30 ganger med MOPS-buffer. Det vil si at 1ml enzym fortynnes til 30ml ved å tilsette MOPS-buffer. Dette kan lagres i -20 °C fryser.
D.
Amyloglukosidase (for eksempel E-AMGDF fra Megazyme eller A 9913 fra Sigma) Dette enzymet lagres i kjøleskap. Enzymet brukes ufortynnet.
Enzymene bestilles fra Megazyme International Ireland Ltd.
Bray Business Park, Bray,Co.
Wicklow, Ireland
Tlf.353 1 286 1220
Fax. 353 1 286 1264
E-mail. Info@megazyme.com
E.
ABX Pentra Glukose HK CP A11A01667. Et kit er nok til 200 bestemmelser. Lagres i kjøleskap nr. 8 på lab 1. Holdbar i 2 mnd etter åpning ved 2-8°C.
ABX Pentra Calibrator A11A01652. Lagres i kjøleskap nr.8 på lab 1. Ferdig til bruk lagres i fryser nr. 2 på fryser-rom.
ABX Pentra N- kontroll A11A01653. Lagres samme sted som Ca
Dette bestilles fra Bergman Diagnostica as

4. Anbefalt utstyr

10 ml reagensrør med skrukork som tåler koking og sentrifugering
TT-rør m/kork
Pipetter og pipettespisser 1-5ml
Multipipette til 0,1,0,2 og 4ml
Sentrifuge
Vekt med 0,1mg nøyaktighet
Worlmixer

Termostatstyrt vannbad
Kokevannbad eller kokeplate og kjele
Spektrofotometer, Cobas Mira S

5. Spesielle merknader

Til analysen trenger man 100mg ± 5mg prøve. Malingsgrad:0,5mm. Ved analyse av fo`rprodukter tas det paraleller, ellers ikke.

For kornprodukter er det normalt ikke nødvendig å ekstrahere frie sukkere, da konsentrasjonen av glukose er meget lav.(0,1-0,5%)
Sukkerekstraksjon:
Hvis prøvene inneholder over 4 % sukker må prøvene ekstraheres med 80 % etanol. 10ml etanol tilsettes og prøvene varmes opp til 80 °C i 5 min. Prøvene sentrifugeres og etanolen suges/pipeteres av. Deretter løses prøven opp igjen i 10ml etanol 80 % og sentrifugeres og etanolen suges/pipeteres av.
Acetonbehandling:
Fett ekstraheres med aceton hvis innholdet overstiger 8 %. Vei inn 100-120mg prøve. Tilsett 7ml aceton og mix godt.la det stå i ca 5 min. og mix igjen. Står nye 5 min. og mixes. Sentrifuger i 10min. v/3000rpm. Pipeter av supernantanten i et oppsamlingsbeger og gjenta prosedyren en gang til.(7ml aceton, 3*mix, 5min.)Prøvene må stå natten over i avtrekksskap og dampe av resten av acetonet. La også oppsamlingsbegeret stå i avtrekket til acetonet er dampet av.

6. Arbeidsbeskrivelse

1. Start oppvarmingen av vannbad og kokekar.
2. Vei opp 100mg prøve (± 5mg) i et 10ml glassrør m/skrukork. Noter nøyaktig prøvevekt. En kontrollprøve av korn skal tas med i parallell på hvert stativ. Den står i skapet over av vekta på labben i 1 etg. Kontrollen er merket byggkontroll. Prøvene må være malt på 0,5mm.
3. Tilsett 0,2ml 80 % etanol til hvert rør. Det er for å øke oppløsningen i vannfasen.
4. Tilsett deretter 3 ml α-amylase i MOPS buffer(100ul amylase og 2,9ml MOPS buffer) og mix godt. Deretter inkuberes reagensrørene i stativet i Kokevannbadet (100 °C) i 6 min., med mixing etter 2 og 4 min.
5. Tilsett 4ml natriumacetat buffer og 0,1ml amyloglukosidase. Rørene mixes godt og settes i vannbad ved 50 °C i 30min.
6. Sentrifuger prøvene i 10min. ved 3000rpm, og pipeter noen ml av supernantanten over på TT-rør. Prøvene skal deretter analyseres på Cobas for glukose. Se Arb.1162.

Resultatene beregnes etter formelen

$$\% \text{ stivelse} = {}_{\text{abs}}\frac{\text{.prøve} * 180 * 0{,}0073 * 162 * 100}{\text{mg prøve} * 180}$$

der abs. prøve =glukose avlest på spektrofotometer (mmol/l)
180 = molvekt glukose (mg/mmol)
0,0073= fortynningsfaktor (buffer+enzym)
162/180= glukosefaktor (omregning fra glukose-enhet til stivelse)
mg prøve= innveid prøve
100 = beregningen i %