

**ARBEIDSBESKRIVELSE**  
**Institutt for husdyr og akvakultivitenenskap, 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 tilsetning av  $\alpha$ -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 koking-amylase delvis nedbrutt stivelse amyloglukosidase glukose

### 2. Prinsipp

Prøven løses opp i en buffer som har pH rundt optimum for  $\alpha$ -amylaseaktivitet, og som inneholder kalsium som er viktig for at enzymet skal virke. Ved koking av prøven med varmestabil  $\alpha$ -amylase tilstede, vil den tredimensjonale strukturen stivelsen inngår i brytes ned, slik at stivelse blir tilgjengelig for  $\alpha$ -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.

IHF/NLH						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Anna Haug	Gjelder fra 1999	Revisjon 30.01.02	Erstatter 1999	Dokumentnavn: Arb.Stivelse i Kornprodukterg jødselvom-og tarminnhold.DO C	Side 1-4

**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  $\alpha$ -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

IHF/NLH						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Anna Haug	Gjelder fra 1999	Revisjon 30.01.02	Erstatter 1999	Dokumentnavn: Arb.Stivelse i Kornprodukterg jødselfom-og tarminnhold.DO C	Side 2-4

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 fô`rprodukter tas det paralleller, 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 supernatanten 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 supernatanten over på TT-rør. Prøvene skal deretter analyseres på Cobas for glukose. Se Arb.1162.

Resultatene beregnes etter formelen

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

IHF/NLH						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Anna Haug	Gjelder fra 1999	Revisjon 30.01.02	Erstatter 1999	Dokumentnavn: Arb.Stivelse i Kornprodukterg jødselfvom-og tarminnhold.DO C	Side 3-4

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 %

IHF/NLH						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Anna Haug	Gjelder fra 1999	Revisjon 30.01.02	Erstatter 1999	Dokumentnavn: Arb.Stivelse i Kornprodukterg jødselfom-og tarminnhold.DO C	Side 4-4