

# ARBEIDSBESKRIVELSE

## Fakultetet for Biovitenskap, NMBU

**Metodenavn: Stivelse**  
BIOVIT-nr.:1159

### 1. Innledning

Denne metoden er beregnet på å analysere stivelse i kornprodukter/gjødsel/vom- og tarminnhold, m/ mer. I kornprodukter utgjør stivelse størstedelen av karbohydratene. Stivelse er et polysakkarid som består av et høyt antall glukoseenheter som er bundet sammen med  $\alpha$ -glukosidbindinger.

Prøven løses opp i en buffer som har pH rundt optimum for  $\alpha$ -amylase-aktivitet, og 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. Dermed blir stivelse tilgjengelig for  $\alpha$ -amylase som 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. Konsentrasjonen av glukose bestemmes til slutt spektrofotometrisk som en fargereaksjon (se «**Arb 1013 glukose**» for detaljer).

### 2. Reagenser

- MOPS buffer (Sodium Salt)
- Natriumacetat buffer
- Kalsiumklorid
- Varmestabil  $\alpha$ -amylase
- Amyloglukosidase
- Radox Glucose assay (GLUC-HK GL8319)
- Clinical Chemistry Calibrator Level 2 CAL2350
- Clinical Chemistry Calibrator Level 3 CAL2351
- Quality control (Assayed Chemistry Premium Plus Level 2, Cat No-HN1530)
- Quality control (Assayed Chemistry Premium Plus Level 3, Cat No-HE1532)
- Aceton (til fett ekstraksjon, fett > 8 %)
- 80 % etanol (til sukkerekstraksjon, sukker > 4 %)

#### **MOPS buffer (50 mM, pH 7,0):**

11,55 g Natriumsalt av MOPS (Sodium Salt) tilsettes 900 mL dest. vann i et begerglass med røremagnet. Under røringen justeres pH til 7,0 med 1 M (10 %) saltsyre. ca 17 mL. Deretter tilsettes 0,74 g kalsiumklorid og volumet justeres til 1 L i en volumetrisk flaske. Bufferen lagres i kjøleskap.

#### **Natriumacetat buffer (200mM, pH 4,5)**

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 07.02.17	Revisjon 03.2021	Erstatter 02.2020	Dokumentnavn Arb 1159 stivelse.docx	Side 1-4

11,8 mL iseddik (1,05 g/l) tilsettes i 900 mL dest. vann i et begerglass med røremagnet. Under røring justeres pH til 4,5 med 1M (4 g/100 mL) NaOH. ca 60 mL. Volumet justeres til 1 L i en volumetrisk flaske. Bufferen lagres i kjøleskap.

### 3. Risikovurdering

Iseddik: Brannfarlig og sterkt etsende

NaOH: Sterkt etsende. Bruk hansker og vernebriller

HCl: Etsende og irriterer luftveiene

R1 og R2 i kittet inneholder mindre enn 0,1 % natrium azide.

Bruk hansker ved håndtering av kokende vann. Hvis forbrenning, skyll godt under rennende kaldt vann.

### 4. Anbefalt utstyr

- 10 mL reagensrør med skrukork som tåler koking og sentrifugering
- TT-rør m/kork
- Pipetter og pipettespisser 1-5 mL
- Multi-pipette til 0,1, 0,2 og 4mL
- Sentrifuge, swing-out.
- Vekt med 0,1 mg nøyaktighet
- Vortex-mixer
- Termostatstyrt vannbad, 50° C
- Kokevannbad eller kokeplate og kjele
- RX Daytona+ instrument

### 5. Prøvemateriale

Til analysen trenger man 100 mg ± 5mg prøve. Malingsgrad: 0,5mm.

Skal prøven aceton- eller etanol-behandles trengs 120 mg ± 5 mg prøve.

### 6. Spesielle merknader

#### Acetonbehandling

Hvis prøvene inneholder over 8 % fett, må de ekstraheres med aceton for å fjerne fett i prøven, før nedbryting til glukose. Se punkt 4a i arbeidsbeskrivelsen.

#### Sukkerekstraksjon

Hvis prøvene inneholder over 4 % sukker må de ekstraheres med 80 % etanol for å fjerne fritt sukker, før nedbryting til glukose. Se punkt 4b i arbeidsbeskrivelse

For kornprodukter er det normalt ikke nødvendig å ekstrahere fritt sukker, da konsentrasjonen av glukose er meget lav. (0,1-0,5%)

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 07.02.17	Revisjon 03.2021	Erstatter 02.2020	Dokumentnavn Arb 1159 stivelse.docx	Side 2-4

## 7. Arbeidsbeskrivelse

- 1) Start oppvarmingen av vannbad og kokekar.
- 2) Vei opp 100 mg prøve ( $\pm 5$ mg) i et 10 mL glassrør m/skrukork
  - **120mg hvis prøvene skal aceton- eller etanol-behandles!!**
- 3) Noter nøyaktig prøvevekt.
- 4a) Aceton ekstraksjon: (gjelder kun for prøver med over 8 % fett)

*Tilsett 7 mL aceton og mix godt, la det stå i ca 5 min. og mix igjen. La stå i 5 min. og sentrifuger i 10min. v/3000 rpm. Pipetter av supernatanten i et oppsamlingsbeger og gjenta prosedyren en gang til. (7 mL aceton, 3x mix, stå i 5 min, sentrifuger) Prøvene må stå natten over i avtrekkskap for å dampe av aceton.*
- 4b) Sukkerekstrasjon: (gjelder kun for prøver med over 4 % sukker)

*10 mL 80 % etanol tilsettes, prøven mikses og varmes opp til 80 °C i 5 min. Prøven sentrifugeres og etanolen suges av med vannstrålepumpe/pipetteres av. Deretter re-løses de i 10 mL 80 % etanol og prøvene varmes opp til 80 °C i 5 min. Prøvene sentrifugeres og etanolen suges/pipetteres av.*
- 5) To kontrollprøver skal tas med i hver analyserunde. Står i skapet over vekta på lab i 1 etg. Kontrollen er merket *Kyllingfôrkontroll*. (0,5 mm)
- 6) Tilsett 0,2 mL 80 % etanol til hvert rør. Dette for å øke oppløsningen i vannfasen.
- 7) Tilsett 3 mL  $\alpha$ -amylase i MOPS buffer (100 $\mu$ l amylase og 2,9 mL MOPS buffer) til hver prøve, og mix godt.
- 8) Inkuber prøvene i kokevannbadet i 6 min, med miksing etter 2 og 4 min.
- 9) Tilsett 4 mL natriumacetat buffer og 0,1 mL amyloglukosidase til hver prøve.
- 10) Rørene mikses godt og settes i vannbad ved 50 °C i 30 min.
- 11) Sentrifuger prøvene i 10 min. ved 3000 rpm
- 12) Pipetter noen mL av supernatanten over i TT-rør, for lagring av reserveprøve.
- 13) Prøvene analyseres på RX Daytona+ helautomatisk analysator.
  - Se egen manual for bruk av instrumentet

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 07.02.17	Revisjon 03.2021	Erstatter 02.2020	Dokumentnavn Arb 1159 stivelse.docx	Side 3-4

## 8. Utregning

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

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 %

BIOVIT/NMBU						ARB
Utarbeidet Birger Svihus Inger Joh. Jørgensen	Godkjent Hanne Kolsrud Hustoft	Gjelder fra 07.02.17	Revisjon 03.2021	Erstatter 02.2020	Dokumentnavn Arb 1159 stivelse.docx	Side 4-4