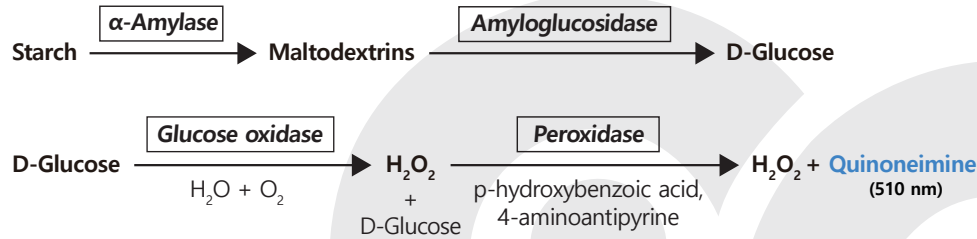


PicoSens™ Total Starch Assay Kit (Colorimetric)

(BM-STR-100, 100 Tests, Store at 4°C)

실험 원리



BIOMAX PicoSens™ Total Starch Assay Kit는 α -Amylase가 Starch를 Gelatinization시켜 Maltodextrins를 생성하고 이는 Amyloglucosidase로 인해 D-Glucose로 분해됩니다. 분해된 D-Glucose는 Glucose oxidase / Peroxidase(GOPOD) Reagent를 통해 흡광도 510 nm에서 측정하여 Sample 내의 Starch의 양을 측정할 수 있습니다.

제품의 구성 및 보관 조건

Components	Size	Storage
α -Amylase	10 ml	4 °C
Amyloglucosidase (AMG)	10 ml	
20X GOPOD Reagent Buffer	50 ml	
GOPOD Reagent Enzymes (Lyophilized)	1 Bottle	
D-Glucose Standard Solution	5 ml	
Starch (Lyophilized)	1 Bottle	

* 개봉하지 않은 제품은 빛을 차단한 상태에서 4°C 보관 시 약 6개월간 안정적입니다.

검사 필요 장비 및 소모품

- ▶ Incubator / Water bath (50 and 100 °C)
- ▶ UV spectrophotometer (510 nm)
- ▶ Cuvette
- ▶ 80 % Ethanol
- ▶ 50 mM MOPS buffer pH 7.0 add 5 mM Calcium chloride [이하 MOPS buffer (미제공)]
- ▶ 200 mM Sodium acetate buffer pH 4.5 add 5 mM Calcium chloride [이하 SA buffer (미제공)]
- ▶ D.W.
- ▶ Microtube
- ▶ 100 ml Flask
- ▶ 15 ml Conical Tube

실험 전 준비사항 및 보관방법

- ▶ **1X GOPOD Reagent buffer** : 20X GOPOD Reagent Buffer 50 ml과 D.W. 950 ml을 혼합하여 준비합니다. (Total volume 1 L)
 - ▶ **GOPOD Reagent Enzymes** : 1X GOPOD Reagent buffer 20ml 을 넣어 완전히 녹인 뒤, 다시 1X GOPOD Reagent buffer에 옮겨 완전히 섞어줍니다. (Total volume 1 L)
 - ▶ **MOPS buffer**
 - 1) D.W. 900 ml에 MOPS 11.55 g을 녹입니다.
 - 2) HCl 또는 NaOH를 이용해 pH 7.0로 적정합니다.
 - 3) Calcium chloride dihydrate 0.74 g과 Sodium azide 0.2 g을 넣습니다.
 - 4) D.W.를 이용해 Total volume 1 L를 맞춥니다.
 - ▶ **Sodium acetate buffer (SA buffer)**
 - 1) D.W. 1600 ml에 Acetic acid 11.6 ml을 섞습니다.
 - 2) HCl 또는 NaOH를 이용해 pH 4.5로 적정합니다.
 - 3) Calcium chloride dihydrate 0.74 g을 넣습니다.
 - 4) D.W.를 이용해 Total volume 1 L를 적정합니다.
 - ▶ **α -Amylase mixture** : α -Amylase를 MOPS buffer를 이용해 30배 희석합니다. EX) α -Amylase 0.1 ml + MOPS buffer 2.9 ml (1 Test 당 3 ml 사용)
- * 실험 직전에 희석하여 사용합니다.
- * 총 소요량보다 약 10 % 많은 Mixture를 준비합니다.

실험 과정 AOAC 996.11 Protocol (AOAC)

* 15 mL Conical tube를 Sample의 개수보다 2 개 더 준비합니다. (For Starch control, Sample blank tube)

* Triplicate 이상을 권장합니다.

- ① 곡물, 식물 또는 식품을 분쇄하여 0.5 mm 스크린을 통과시킵니다.
- ② 앞서 준비한 15 mL Conical tube에 다음과 같이 첨가합니다.
 - Sample tube : Sample 100 mg + 80% Ethanol 0.2 mL + α-Amylase mixture 3 mL
 - Sample blank tube : Sample 100 mg + 80% Ethanol 0.2 mL + MOPS buffer 3 mL
 - Starch control : Starch 100 mg + 80% Ethanol 0.2 mL + α-Amylase mixture 3 mL
- ③ 6 min간 100 °C Water bath에서 Boiling 하며 (뚜껑 살짝 열어 두기) 2 min 간격으로 Vortexing 합니다.
- ④ 각각의 Tube를 50 °C Incubator에서 5 min 간 온도를 안정화시켜줍니다.
- ⑤ 실험을 진행중인 각각의 Tube에 다음과 같이 첨가합니다.
 - Sample tube : SA buffer 4 mL + AMG 0.1 mL
 - Sample blank tube : SA buffer 4.1 mL
 - Starch control : SA buffer 4 mL + AMG 0.1 mL
- ⑥ 50 °C Incubator에서 30 min 간 Incubation 합니다.
- ⑦ 3종류의 Tube에 있는 내용물들을 각각의 100 mL Flask에 모두 옮긴 후 SA buffer를 이용해 Total volume 100 mL로 맞춥니다.
- ⑧ 새로운 Microtube에 각각 1.5 mL씩 옮겨 담은 뒤(Sample, Sample blank, Starch control tube), 13000 rpm, 5 min 간 Centrifugation 합니다.
- ⑨ 새로운 Conical tube을 다음과 같이 준비합니다.
 - * **GOPOD reagent를 마지막 한번에 분주합니다.**
 - Sample tube : ⑧번 시료 0.1 mL + GOPOD reagent 3 mL
 - Sample blank tube : ⑧번 시료 0.1 mL + GOPOD reagent 3 mL
 - Starch control : ⑧번 시료 0.1 mL + GOPOD reagent 3 mL
 - Glucose standard tube : Glucose standard solution 0.1 mL + GOPOD reagent 3 mL
 - Reagent blank tube (0 값) : SA buffer 0.1 mL + GOPOD reagent 3 mL
- ⑩ 50 °C Incubator에서 20 min 간 Incubation합니다.
- ⑪ ⑩에서 반응시킨 각각 5 종류의 Tube에 있는 내용물을 각각 Cuvette에 1 mL씩 옮긴 후, Reagent blank tube 값을 0값으로 잡아 UV spectrophotomete로 흡광도 510 nm에서 측정합니다.

결과 분석

* 실험을 Triplicate 이상으로 진행한 경우, 평균값을 구해 계산하세요.

$$1) \text{ Starch, \%} = \Delta A \times F \times \frac{EV}{0.1(mL)} \times D \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180}$$

$$= \Delta A \times F \times EV \times \frac{D}{W} \times 0.9$$

ΔA : Sample tube OD 값

F : 흡광도 값을 μg의 Glucose로 변환하는 계수 = 100 μg / Glucose standard OD 값

EV : Sample extraction volume = 100 (mL)

0.1: 분석된 Sample의 Volume (mL)

D : Sample solution의 추가 희석 = 1

1/1000 : μg에서 mg으로 변환

100 / W : 100 mg Sample로 변환

W : Sample 무게 (mg)

162/180 : 결정된 Free glucose에서 Starch에서 발생하는 것과 같은 Anhydroglucose로 변환하는 계수

2) Starch, % w/w (dry wt. basis):

$$= \text{Starch \% w/w (as is)} \times \frac{100}{100\text{-moisture content (\% w/w)}}$$

Starch % w/w (as is) : 1)식에서 구한 값

Moisture content(% w/w) : [(Fresh weight – dry weight) / fresh weight] x 100

* 안전한 사용을 위해 유해물질 정보는 MSDS를 참조하십시오.