

TEST PROSEDÜRÜ :**(a) Dirençsiz nişastanın hidrolizi ve çözünmesi.**

- i. 100 + 5 mg numuneyi doğrudan her bir vidalı kapaklı tüpe (Corning® kültür tüpü; 16 x 125 mm) doğru bir şekilde tartın ve numunenin dibe düşmesini sağlamak için tüpe hafifçe vurun.

NOTLAR:

Kıyılmış konserve fasulye veya gıda ürünü gibi ıslak numuneler için numune boyutu yakl. 0,5 g (doğru tartılmıştır).
Bu tür malzemelerde nem içeriği genellikle %60-80'dir.

- ii. Her tüpe AMG (3 U/mL) (Çözüm 2) içeren 4,0 mL pankreatik α -amilaz (10 mg/mL) ekleyin.
- iii. Tüplerin kapaklarını sıkıca kapatın, bir vorteks karıştırıcıda karıştırın ve hareket yönünde hizalanmış olarak çalkalayıcı bir su banyosuna yatay olarak takın (bkz. Şekil 2 ve 3, sayfa 11 ve 12).
- iv. Tüpleri 37°C'de sürekli çalkalayarak (200 vuruş/dk) tam olarak 16 saat inkübe edin (Not: doğrusal hareket için, su banyosunda 100 ayarı 200 vuruş/dk'ya eşittir; 100 ileri ve 100 geri).
- v. Tüpleri su banyosundan çıkarın ve fazla yüzey suyunu kağıt havluyla alın. Tüp kapaklarını çıkarın ve içindekileri 4,0 mL etanol (%99 v/v) veya IMS (%99 v/v) ile bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırarak işleyin.
- vi. Tüpleri 1.500 g'de (yaklaşık 3.000 rpm) 10 dakika (kapaksız) santrifüjleyin.
- vii. Süpernatantları dikkatlice boşaltın ve peletleri 2 mL %50 etanol veya %50 IMS içinde bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırarak yeniden süspansiyon edin. 6 mL daha %50 IMS ekleyin, tüpleri karıştırın ve tekrar 1500 g'de 10 dakika santrifüjleyin.
- viii. Süpernatantları boşaltın ve bu süspansiyon ve santrifüjleme adımını bir kez daha tekrarlayın.
- ix. Süpernatantları dikkatlice boşaltın ve fazla sıvıyı boşaltmak için tüpleri emici kağıt üzerinde ters çevirin.

(b) Dirençli Nişasta Ölçümü.

- i. Her tüpe bir manyetik karıştırıcı çubuğu (5 x 15 mm) ve 2 mL 2 M KOH ekleyin ve bir manyetik karıştırıcı üzerinde bir buz/su banyosunda yaklaşık 20 dakika karıştırarak peletleri yeniden süspansiyon edin (ve RS'yi çözün)

NOTLAR:

1. Nişastanın emülsifiye olmasına neden olabileceğinden vorteks karıştırıcıda karıştırmayın.
2. KOH çözeltisi eklenirken tüp içeriğinin kuvvetlice karıştırıldığından emin olun. Bu, daha sonra çözülmesi zor olacak bir nişasta malzemesi yığınının oluşmasını önleyecektir.

- ii. Manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırarak her bir tüpe 8 mL 1,2 M sodyum asetat tamponu (pH 3,8) ekleyin. Hemen 0,1 mL AMG (çözelti 1; 3.300 U/mL) ekleyin, iyice karıştırın ve tüpleri 50°C'deki su banyosuna yerleştirin.
- iii. Bir vorteks karıştırıcı üzerinde aralıklı karıştırma ile 30 dakika boyunca tüpleri inkübe edin.
- iv. > %10 RS içeren numuneler için; tüpün içeriğini kantitatif olarak 100 mL'lik ölçülü bir balona aktarın (bir suyla yıkama şişesi kullanarak). Suyla yıkama şişesiyle tüpteki çözeltiyi yıkarken karıştırma çubuğunu tüpte tutmak için harici bir miknatıs kullanın. Damıtılmış su ile 100 mL'ye ayarlayın ve iyice karıştırın. 10 dakika boyunca 1.500 g'de çözeltinin bir kısmını santrifüjleyin.
- v. < %10 RS içeren numuneler için; tüpleri 1500 g'de 10 dakika boyunca doğrudan santrifüjleyin (seyreltme yok). Bu tür numuneler için tüpteki son hacim yakl. 10,3 mL (ancak, bu hacim özellikle ıslak numuneler analiz edildiğinde değişir ve hesaplamalarda hacim için uygun pay verilmelidir).
- vi. Cam test tüplerine (16 x 100 mm) seyreltilmiş (adım iv) veya seyreltilmemiş (v) süpernatantlardan 0,1 mL alikotları (çift kopya halinde) aktarın, 3,0 mL GOPOD reaktifi (çözelti 4) ekleyin ve 50°C'de 20 dakika inkübe edin.
- vii. Reaktif körüne karşı 510 nm'de her çözeltinin absorbansını ölçün.

0,1 mL 100 mM sodyum asetat tamponu (pH 4,5) ve 3,0 mL GOPOD reaktifini karıştırarak reaktif **boş solüsyonları hazırlayın**. 0,1 mL D-glikoz (1 mg/mL) ve 3,0 mL GOPOD reaktifini karıştırarak **D-glikoz standartlarını (dört kopya halinde) hazırlayın**.

(c) Dirençsiz (Çözünür) Nişasta Ölçümü.

- i. İlk inkübasyonun [(a)vii] santrifüjlenmesinde elde edilen süpernatant solüsyonlarını sonraki iki %50 etanol yıkamasından [(a)viii ve (a)ix] elde edilen süpernatantlarla birleştirin ve hacmi 100 mL ile 100 mL'ye ayarlayın hacimsel bir şişe içinde sodyum asetat tamponu (pH 4,5). İyice karıştırın.
- ii. 50°C'de 20 dakika boyunca 100 mM sodyum maleat tamponunda (pH 6,0) 10 µL seyreltik AMG çözeltisi (300 U/mL) ile bu çözeltinin 0,1 mL'lik kısımlarını (iki kez) inkübe edin. 3,0 mL GOPOD reaktifi (Çözelti 4) ekleyin ve tüpleri 50°C'de 20 dakika daha inkübe edin.
- iii. Bir reaktif körüne karşı 510 nm'de absorbansı ölçün.
- iv. Dirençsiz (çözünür) nişasta içeriğini hesaplayın.

Toplam nişasta içeriği, dirençli nişasta ve dirençli olmayan (çözünür) nişastanın toplamıdır.



Şekil 1. Numunelerin 2 M KOH ile işlenmesi ve RS'nin çözünmesi için bir manyetik karıştırıcı üzerinde buz-su banyosunun düzenlenmesi.