

STANDART TEST PROSEDÜRÜ:**NOTLAR:**

1. Kalibrasyon standartlarına yalnızca in vitro protein sindirilebilirliğini hesaplamak için bir kalibrasyon eğrisi oluşturulurken ihtiyaç duyulur. Önceden oluşturulmuş bir eğri kullanılabilir, ancak yalnızca bir kazein kontrol numunesi eğriye çapraz referans olarak test edilirse kullanılabilir.
2. PDCAAS prosedürüne uygulanan her numune grubu için ayrıca bir kör numune (yani tüm reaktiflerin eklendiği boş bir tüp) dahil edilmelidir.

A. NUMUNE ÇIKARMA:

1. Tahıl, bitki veya gıda ürününü 0,5 mm'lik bir elekten geçecek şekilde öğütün.
2. Yaklaşık 50 mL Beckman santrifüj tüpüne 500 mg öğütülmüş, kalibrasyon veya kazein kontrol örneği. Tüm numunenin tüpün dibine düştüğünden emin olmak için tüpe hafifçe vurun.
3. **Mide ve Bağırsak Sindirimi:**
 - a. 19 mL HCl (0,06 N) ekleyin ve tüpü kapatın. Vorteksle iyice karıştırın ve 37°C'de 300 rpm'de sallanan inkübatör setiyle sıcak havada 30 dakika inkübe edin.
 - b. Her numuneye 1 mL pepsin solüsyonu (şişe 1) ekleyin ve her tüpün kapağını kapatın. Vorteksle iyice karıştırın ve 37°C'de 300 rpm'de sıcak hava çalkalamalı inkübatör setinde 60 dakika inkübe edin.
 - c. Pepsin inkübasyonu tamamlandıktan sonra numuneleri çıkarın ve 2 mL 1,0 M Tris tamponu, pH 7,4 ekleyerek pH'ı 7,4'e ayarlayın. Tüpleri kapatın ve her numuneyi vorteksle iyice karıştırın.
 - d. Her numuneye 200 µL Tripsin/Chymotrypsin karışımı ekleyin, vorteksle iyice karıştırın ve 300 rpm'de inkübatör setini çalkalayarak sıcak havada 37°C'de 4 saat inkübe edin.
 - e. Tripsin/Kimotripsin inkübasyonunun sonunda numuneleri 10 dakika kaynar su banyosuna yerleştirin.
 - f. Tüm numuneleri kaynar su banyosundan çıkarın ve vorteks ile iyice karıştırın.
4. Numunelerin en az 20 dakika oda sıcaklığına soğumasını bekleyin ve her birinden 4 mL'yi 16 x 100 kültür tüpüne aktarın.
Not: Kalan numune gelecekteki analizler için dondurulabilir. -80°C'de saklayın.
5. 1 mL %40 TCA solüsyonu ekleyin, kapatın ve vorteksle iyice karıştırın. Numuneleri gece boyunca 4°C'de (en az 16 saat) inkübe edin.
Not: Analiz bu noktada yapılabilir.
6. Transfer yakl. 1,75 mL numune (çökeltiden kaçınarak) 2 mL'lik bir santrifüj tüpüne koyun ve oda sıcaklığında 15.000 x g'de 10 dakika santrifüjleyin.
7. Tüm numuneler için bir kültür tüpüne asetat tamponunda (50 mM, pH 5.5) 10 kat ve 20 kat dilüsyon yapın. Kör ve kontroller (A-F) sadece 10 kat seyreltme gerektirirken kazein 20 kat seyreltme gerektirir.
Not: Tüm numuneler, TCA konsantrasyonunu Aminlerin Kolorimetrik Tayinini (Bölüm C) etkilemeyecek bir seviyeye getirmek için minimum 10 kat seyreltme gerektirir.
8. Numune körleri, kalibrasyon numuneleri ve kazein kontrol numuneleri dahil olmak üzere numune çözeltilerinin tüm seyreltilmiş süpernatantları, Aminlerin Kolorimetrik Tayini için uygulanır (bkz. bölüm C).

B. L-GLYCINE KALİBRASYON STANDARTLARININ HAZIRLANMASI:

15 mL'lik kültür tüplerinde standart L-glisin standart solüsyonlarını Tablo 1'de açıklandığı gibi hazırlayın ve Aminlerin Kolorimetrik Tayini'nde numune olarak işleyin (bkz. bölüm C).

4°C'de 1 aya kadar stabildir.

Tablo 1. L-glycine kalibrasyon standartlarının hazırlanması.

L-Glycine Standards (mM)		Sodium Acetate (50 mM, pH 5.5)	L-Glycine standard
ST 11	1	9 mL	1 mL of 10 mM L-glycine
ST 10	0.75	9.25 mL	0.75 mL of 10 mM L-glycine
ST 9	0.5	9.5 mL	0.5 mL of 10 mM L-glycine
ST 8	0.25	9.75 mL	0.25 mL of 10 mM L-glycine
ST 7	0.1	9.9 mL	0.1 mL of 10 mM L-glycine
ST 6	0.075	9 mL	1 mL of STD 10
ST 5	0.05	9 mL	1 mL STD 9
ST 4	0.025	9 mL	1 mL STD 8
ST 3	0.01	9 mL	1 mL STD 7
ST 2	0.007	9 mL	1 mL STD 6
ST 1	0.005	9 mL	1 mL STD 5
ST 0	0	10 mL	0

C. AMİNLERİN KOLORİMETRİK TAYİNİ:**NOTLAR:**

Aminlerin Kolorimetrik Tayini için uygulanan her bir numune grubu için, aynı reaktif grubu kullanılarak eş zamanlı olarak bir L-glisin kalibrasyon eğrisi gerçekleştirilmelidir (bkz. bölüm B).

1. Mikroplakada (**Tablo 3**) önerilen formatı kullanarak **Tablo 2**'de gösterildiği gibi Aminlerin Renk Ölçümü Tayini için reaksiyonları ayarlayın.

Tablo 2. Aminlerin kolorimetrik tayini için ayarlanan reaksiyon

* Kullanmadan önce ninhidrinin oda sıcaklığına geldiğinden emin olun.

** Örneğin mikroplaka çalkalayıcı, mikroplaka okuyucuda çalkalama işlevi veya tekrarlanan aspirasyon (örn. 50-100 µL hacme ayarlanmış bir pipetör kullanarak) kullanarak.

*** Alternatif olarak mikroplaka, ısıtma özelliği olan bir plaka okuyucuda inkübe edilebilir. Bu durumda üzerini folyo ile kapatmaya gerek yoktur.

Wavelength:	570 nm	
Cuvette:	96-well (e.g. clear flat-bottomed, glass or plastic)	
Temperature:	70°C	
Final volume:	0.300 mL	
Sample solution:	0-1 mM of L-glycine (in a 0.100 mL sample volume)	
Pipette into wells	Sample	Standard
sample solution (incl. blank)	0.100 mL	-
standard solutions (glycine)	-	0.100 mL
ninhydrin reagent* (2%)	0.050 mL	0.050 mL
Place the lid on the plate and cover with foil and place on a pre-heated tray in a hot air incubator*** at 70°C for 35 min at 100 rpm. Remove the plate from the incubator. Keep covered with foil while allowing to cool for 10 min. Then add:		
reagent alcohol (50% v/v)	0.150 mL	0.150 mL
Mix** and read the absorbances of the solutions at 570 nm against the L-glycine standard (ST 0).		