

1. Boşluklar

Her tahlilde, reaktiflerden kalıntıya herhangi bir katkıyı ölçmek için örneklerle birlikte iki kör çalıştırın.

2. Örnekler

a) Çift 1.000±0.005 g numuneyi 400 mL'lik uzun biçimli beherlere doğru şekilde tartın.

b) Her behere 40 mL MES-TRIS karışım tampon çözeltisi (pH 8.2) ekleyin. Her behere manyetik karıştırma çubuğu ekleyin.

Numune çözelti içinde tamamen dağılına kadar manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırın (bu, numuneyi enzimler için erişilemez hale getirecek olan topak oluşumunu önler).

3. Isıya dayanıklı α -amilaz ile inkübasyon

a) Düşük hızda karıştırarak 50 μ L ısıya dayanıklı α -amilaz solüsyonu ekleyin.

b) Her beheri alüminyum folyo karelerle kaplayın.

c) Kapalı numuneleri 98-100°C'deki çalkalamalı su banyosuna yerleştirin ve sürekli çalkalayarak 30 dakika inkübe edin.

Tüm beherler sıcak su banyosuna girdikten sonra zamanlamayı başlatın.

4. Havalı

a) Tüm numune kaplarını sıcak su banyosundan çıkarın ve 60°C'ye soğutun.

b) Folyo kapakları çıkarın.

c) Gerekirse, beherin etrafındaki halkaları ve beherin altındaki jelleri spatula ile kazıyın.

d) Beher ve spatulanın yan duvarını pipetör kullanarak 10 mL distile su ile çalkalayın.

e) Su banyosundaki sıcak suyun bir kısmını boşaltıp soğuk su ekleyerek su banyosunun sıcaklığını 60°C'ye ayarlayın.

5. Proteaz ile kuluçka

a) Her numuneye 100 μ L proteaz solüsyonu ekleyin.

b) Alüminyum folyo ile tekrar kapatın.

c) 30 dakika sürekli çalkalayarak 60±1°C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edin. Su banyosunun sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında zamanlamayı başlatın. 6. pH kontrolü a. Numune kaplarını çalkalamalı su banyosundan çıkarın. b. Kapakları çıkarın. c. Karıştırırken numuneye 5 mL 0,561 N HCl solüsyonu dağıtın.

d) 4,1-4,8 olması gereken pH'ı kontrol edin. Gerekirse ilave %5 NaOH solüsyonu veya %5 HCl solüsyonu ile pH'ı ayarlayın

7. Amiloglukosidaz ile inkübasyon

a) Manyetik karıştırıcıda karıştırarak 200 μ L amiloglukosidaz solüsyonu ekleyin.

b) Alüminyum kapağı değiştirin.

c) Sürekli çalkalama ile 30 dakika boyunca 60°C'de çalkalamalı su banyosunda inkübe edin. Su banyosunun sıcaklığı 60°C'ye ulaştığında zamanlamayı başlatın.

A. ÇÖZÜNMEYEN DİYET LİFİ**8. Filtreleme kurulumu**

a) Celite içeren krozenin darasını 0,1 mg'a yakın olacak şekilde alın.

b) Celite yatağını ıslatın ve yakl. 3 mL distile su.

c) Celite'i sırlı cam üzerine düz bir mat olarak çekmek için potaya emme uygulayın.

9. Aşama 7'deki enzim karışımını potadan bir süzme şişesine süzün.

10. Kalıntıyı önceden 70°C'ye ısıtılmış 10 mL damıtılmış suyla iki kez yıkayın. Potadaki kalıntıları yıkamadan önce beheri durulamak için su kullanın. SDF tayini için süzüntü ve su yıkamalarını saklayın. Çözeltiyi önceden darası alınmış 600 mL'lik uzun biçimli bir behere aktarın (SDF tayini için, SDF prosedürünün 11. Adımına gidin).

11. Kalıntıyı iki kez 10 mL ile yıkayın: a. %95 EtOH b. aseton 7
12. Tortu içeren potayı gece boyunca 103°C'lik etüvde kurutun.
13. Potayı desikatörde yakl. 1 saat Diyet lifi kalıntısı ve Celite içeren krozeyi 0,1 mg hassasiyetle tartın. Tortu ağırlığını elde etmek için, dara ağırlığını, yani kurutulmuş pota ve Celite ağırlığını çıkarın.
14. Protein ve kül tayini. Her lif türünden bir kalıntı, protein için analiz edilir ve kopyanın ikinci kalıntısı, kül için analiz edilir.
 - a) a.Kjeldahl yöntemini kullanarak kalıntı üzerinde protein analizi yapın. Protein gramını hesaplamak için tüm durumlar için 6,25 faktörünü kullanın.
 - b) b.Kül analizi için, ikinci tortuyu 5 saat 525°C'de yakın. Desikatörde soğutun ve 0,1 mg hassasiyetle tartın. Kül içeriğini belirlemek için pota ve Celite ağırlığını çıkarın (bkz. Not 3, sayfa 10).

B. ÇÖZÜNÜR DİYET LİFİ

- 1-10. IDF yönteminin 1-10. Adımlarını izleyin.
11. IDF prosedürünün 10. Adımındaki darası önceden alınmış beherde filtrat ve suyla yıkama birleşik solüsyonunu tartın.
12. SDF yağı a. 60°C'ye önceden ısıtılmış 4 hacim %95 EtOH ekleyin. IDF prosedüründen (adım 10) filtre şişesini durulamak için EtOH'nin bir kısmını kullanın. Alternatif olarak, filtrat ve suyla yıkama birleşik solüsyonunun ağırlığını 80 g'a ayarlayın ve 320 mL önceden ısıtılmış (60°C) %95 EtOH ekleyin. b. 60 dakika oda sıcaklığında çökeltinin oluşmasına izin verin.
13. Filtreleme kurulumu a. Celite içeren krozenin darasını 0,1 mg'a yakın olacak şekilde alın. b. Yıkama şişesinden 15 mL %78 EtOH kullanarak potadaki Celite yatağını ıslatın ve yeniden dağıtın. c. Celite'i sırlı camın üzerine düz bir mat olarak çekmek için potaya emme uygulayın.
14. Filtreleme a. SDF Adım 12'den çöken enzim özünü potadan filtreleyin. b. %78 EtOH içeren bir yıkama şişesi ve kauçuk bir spatula kullanarak kalan tüm parçacıkları kantitatif olarak potaya aktarın.
15. Yıkama Bir vakum kullanarak, art arda aşağıdaki iki 15 mL'lik kısımlarla yıkayın: (bkz. Not 4, sayfa 10). a. %78 EtOH b. %95 EtOH c. aseton
16. Tortu içeren potayı gece boyunca 103°C'lik etüvde kurutun. 8
17. IDF yönteminin 13. ve 14. Adımlarıyla devam edin.

C. TOPLAM DİYET LİFİ

- 1-7. Adım 1-7'yi izleyin.
8. Diyet lifinin EtOH ile çökeltilmesi.
 - a) a. Her numuneye, 60°C'ye önceden ısıtılmış 225 mL %95 EtOH ekleyin. Isıtmadan sonra hacmi ölçün. EtOH hacminin numune hacmine oranı 4:1 olmalıdır. %95 EtOH yanlışlıkla 65°C'ye ısıtırsa genişletilmiş alkol hacmi ayarı için 228 mL ekleyin.
 - b) b. Tüm numuneleri büyük alüminyum folyo tabakalarıyla kaplayın.
 - c) c. Çökeltinin oda sıcaklığında 60 dakika oluşmasına izin verin.
9. SDF prosedürünün 13-17. Adımları ile devam edin.