

(a) Dirençli nişasta içermeyen tahıl ve gıda ürünlerinde nişasta tayini (Önerilen Prosedür; tüm inkübasyonlar pH 5.0'da).

Hızlı Toplam Nişasta (RTS) Yöntemi.

1. Tahıl, bitki veya gıda ürününü 0,5 mm'lik bir elekten geçecek şekilde öğütün.
2. Corning kültür tüplerine (16 x 120 mm) [C(q)] iki kopya halinde (biri kör numune olarak) ~ 100 mg test örneğini doğru bir şekilde tartın. Tam ağırlığı kaydedin. Numunenin tüpün dibine düşmesi için tüpe hafifçe vurun.
3. Her iki tüpe de Marka Şişe üstü dağıtıcı [C(m)] kullanarak 10 mL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(a)] ekleyin. Tüpleri bir vorteks karıştırıcı üzerinde 5 saniye kuvvetlice karıştırın.
4. Tüplerden birine (numune tüpü), 5 mL uçlu bir HandyStep® dağıtıcı [C(l)] kullanarak 0,1 mL seyreltilmemiş termostabil α -amilaz [A(1)] ekleyin. İkinci tüpe (numune körü) 0,1 mL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5,0) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(a)] ekleyin.
5. Tüpleri 3 saniye vorteksleyin [C(j)], tüpleri gevşek bir şekilde kapatın ve hemen kaynar su banyosuna aktarın ve zamanlayıcıyı başlatın. Yakl. 2 dakika, kapakları sıkın ve tüp içeriğini bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırın. 5 ve 10 dakika daha sonra, tüp içeriğini tekrar 5 saniye vorteksleyin ve tüpleri kaynar su banyosuna geri koyun. 15 dakika sonra (α -amilaz ilavesinden sonra), tüpleri kaynar su banyosundan çıkarın ve içerikleri bir vorteks karıştırıcıda 5 saniye kuvvetlice karıştırın. Tüpleri 50°C'deki bir su banyosuna yerleştirin ve 5 dakika boyunca sıcaklığa dengelenmelerini sağlayın.
6. Tüplerden birine (numune tüpü), 5 mL uçlu bir HandyStep® dağıtıcı kullanarak 0,1 mL seyreltilmemiş AMG [A(2)] (3.300 U/mL) ekleyin ve 3 saniye vorteksleyin. İkinci tüpe (kör numune) 0,1 mL sodyum asetat tamponu (100 mM pH 5,0) [B(a)] artı kalsiyum klorür (5 mM) ekleyin. Tüpleri daha fazla karıştırmadan 50°C'de 30 dakika inkübe edin.
7. Tüpleri su banyosundan çıkarın ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığına soğumalarına izin verin. Kapağın içindeki yoğuşan suyun tüpteki sıvı ile karışmasını sağlamak için tüpleri birkaç kez ters çevirin.
8. Her solüsyondan (numune ve numune körü) 2,0 mL'yi mikrofüj tüplerine [C(o)] aktarın ve tüpleri 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjleyin (Kalan 8,2 mL inkübasyon solüsyonunu saklayın ve aşağıdaki NOT'a bakın). Bir Gilson Pipetman dağıtıcı kullanarak, süpernatantlardan 1,0 mL'lik bir alikotu, 4 mL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5,0) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(a)] içeren 12 x 120 mm'lik tüplere doğru bir şekilde aktarın ve karıştırın içerikler.
9. 16 x 120 mm'lik cam test tüplerinin tabanlarına her numuneden 0,1 mL'lik iki kopyayı doğru bir şekilde aktarın. Ayrıca, 16 x 120 mm'lik bir cam test tüpüne tek bir 0,1 mL'lik örnek boşlukları aktarın.
10. 3,0 mL GOPOD reaktifi ekleyin ve solüsyonları 50°C'de 20 dakika inkübe edin ve 510 nm'de reaktif körüne karşı absorbansı ölçün.

Aynı anda inkübe edin:

Glikoz kontrolleri: 0,1 mL glikoz standart solüsyonu (1,0 mg/mL) artı 3,0 mL GOPOD reaktifi, dört kopya halinde.

Kör Reaktif: 0,1 mL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5,0) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(a)] ile 3,0 mL GOPOD reaktifi iki kopya halinde.

11. Nişasta içeriğini hesaplayın (bkz. Bölüm F).

NOT: Bu ekstraksiyon protokolü için nihai Ekstraksiyon Hacmi (EV) = 10,2

(b) Dirençli nişasta içeren numunelerin toplam nişasta içeriğinin belirlenmesi (RTS-NaOH Prosedürü - Önerilen).

1. 100 mg test numunesini çift olarak doğru bir şekilde Corning kültür tüplerine (16 x 120 mm) [C(q)] tartın. Tam ağırlığı kaydedin. Numunenin tüplerin dibine düşmesi için tüplere hafifçe vurun.
2. 0,2 mL %80 v/v sulu etanol ekleyin ve numuneyi tamamen ıslatmak ve dağıtmak için tüpleri bir vorteks karıştırıcıda karıştırın (bu adım, yüksek nişasta içeriğine sahip numunelerin tamamen çözünmesine yardımcı olmak açısından çok önemlidir).
3. 25 mL uçlu bir HandyStep® dağıtıcı kullanarak 2 mL soğuk 1,7 M sodyum hidroksit solüsyonu [B(d)] ekleyin ve tüp içeriğini bir vorteks karıştırıcıda 15 saniye karıştırın. Tüpleri manyetik karıştırıcı üzerinde buzlu su banyosunda bir rafa yerleştirin ve 15 dakika karıştırın (Şekil 2, sayfa 18). Bu süre zarfında, tüpün içeriğini de aralıklı olarak 2-3 kez bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırın. Numune bulamacında topaklar olmadığından emin olun.
4. Bir Brand® Bottle-top dispenselette® [C(m)] kullanarak 8 mL sodyum asetat tamponu (600 mM, pH 3.8) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(c)] ekleyin. Tüpleri bir vorteks karıştırıcıda karıştırın. pH'ın ~ 5,0 olduğundan emin olun.
5. Tüplerden birine (numune tüpü) 5 mL uçlu bir HandyStep® dağıtıcı kullanarak hemen 0,1 mL seyreltilmemiş termostabil α -amilaz [A(1)] ekleyin. Ardından aynı tüpe 5 mL uçlu bir Handy Step® dağıtıcı kullanarak 0,1 mL AMG (3.300 U/mL) [A(2)] ekleyin. İkinci tüpe (numune körü), 0,2 mL sodyum asetat tamponu (100 mM, pH 5,0) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(a)] ekleyin. Her iki tüpü de kapatın ve içeriği 3 saniye vorteksleyin.
6. Tüpleri 50°C'de 30 dakika inkübe edin.
7. Tüpleri su banyosundan çıkarın ve oda sıcaklığına soğumalarına izin verin. Kapağın içindeki yoğuşan suyun tüpteki sıvı ile karışmasını sağlamak için tüpleri birkaç kez ters çevirin.
8. (a) prosedürünün 8. adımına geçin.

Çıkarma hacmi (EV) = 10.4 Seyreltme (D) = 1, 5 veya 11

(c) Dirençli nişasta, D-glukoz ve/veya maltodekstrinler içermeyen tahıl ve gıda ürünlerinde nişasta tayini (AOAC Official Method 996.11).

1. Tahıl, bitki veya gıda ürününü 0,5 mm'lik bir elekten geçecek şekilde öğütün.
2. Öğütülmüş numuneyi (~ 100 mg; doğru tartılmış) bir Corning kültür tüplerine (16 x 120 mm) [C(q)] ekleyin. Tüm numunenin tüpün dibine düştüğünden emin olmak için tüpe hafifçe vurun.
3. Örneği ıslatmak ve dağılmaya yardımcı olmak için 0,2 mL sulu etanol (%80 v/v) ekleyin. Tüpü bir vorteks karıştırıcıda karıştırın.
4. Hemen 3 mL termostabil α -amilaz [A(1)] (MOPS tamponunda (50 mM, pH 7.0) 30 kat seyreltilmiş) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(e)] ekleyin. Tüpü inkübe edin. 6 dakika kaynar su banyosu, 2, 4 ve 6 dakika sonra kuvvetlice vorteksleyin (tam homojenliği sağlamak için).
5. Tüpü 50°C'de bir banyoya yerleştirin; 4 mL sodyum asetat tamponu (200 mM, pH 4,5) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(b)] ve ardından AMG (0,1 mL, 3.300 U/mL) [A(2)] ekleyin. Tüpü bir vorteks karıştırıcıda karıştırın ve 50°C'de 30 dakika inkübe edin.
6. Tüpün tüm içeriğini 100 mL'lik ölçülü bir balona aktarın (yardımcı olması için huni ile birlikte). Tüp içeriğini iyice durulamak için bir yıkama şişesi kullanın. Sodyum asetat tamponu (200 mM, pH 4.5) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(b)] ile hacme ayarlayın ve içeriği iyice karıştırın.

- Her çözeltiden 2,0 mL'yi bir mikrofüj tüpüne [C(o)] aktarın ve tüpü 13.000 rpm'de 5 dakika santrifüjleyin.
 - 16 x 120 mm'lik cam test tüplerinin tabanlarına her bir numuneden 0,1 mL'lik iki kopyayı doğru bir şekilde aktarın.
 - 3,0 mL GOPOD reaktifi ekleyin ve solüsyonları 50°C'de 20 dakika inkübe edin ve reaktif körüne karşı 510 nm'de absorbansı ölçün.
 - Nişasta içeriğini hesaplayın (bkz. Bölüm F).
- Çıkarma hacmi (EV) = 100 Seyreltme (D) = 1

(d) Dirençli nişasta içeren ancak D-glukoz ve/veya maltodekstrin içermeyen numunelerin toplam nişasta içeriğinin belirlenmesi (DMSO Formatı - AOAC Official Method 996.11).

- Tahıl, bitki veya gıda ürününü 0,5 mm'lik bir elekten geçecek şekilde öğütün.
- Öğütülmüş numuneyi (~ 100 mg, doğru tartılmış) bir Corning kültür tüplerine (16 x 120 mm) [C(q)] ekleyin.
- Dispersiyona yardımcı olması için 0,2 mL sulu etanol (%80 v/v) ile ıslatın ve tüpü bir vorteks karıştırıcıda karıştırın.
- Hemen 2 mL dimetil sülfoksit (DMSO) ekleyin ve tüpü bir vorteks karıştırıcıda karıştırın. Tüpü kuvvetlice kaynayan bir su banyosuna yerleştirin ve 5 dakika sonra çıkarın.
- Her tüpe 3 mL termostabil α -amilaz [A(1)] (MOPS tamponunda (50 mM, pH 7.0) 30 kat seyreltilmiş) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(e)] ekleyin. kaynayan su banyosundan çıkartılır ve vorteks karıştırıcıda 20 saniye kuvvetlice karıştırılır Tüp 6 dakika kaynar su banyosunda inkübe edilir, 2, 4 ve 6 dakika sonra kuvvetlice vortekslenir (tam homojenliği sağlamak için).
- (c) prosedürünün 5. adımından devam edin.

Çıkarma hacmi (EV) = 100;
Seyreltme (D) = 1

(e) D-glikoz ve/veya maltodekstrin içeren numunelerde nişasta tayini için önerilen prosedür - D-glikoz ve maltodekstrinlerin alkolle yıkanarak çıkarılması.

[Not: maltodekstrinlerin sulu etanol içindeki çözünürlüğü kritik olarak maltodekstrinlerin DP aralığına, nihai etanol konsantrasyonuna ve çözeltinin sıcaklığına bağlıdır].

- Tahıl, bitki veya gıda ürününü 0,5 mm'lik bir elekten geçecek şekilde öğütün.
- Öğütülmüş numuneyi (~ 100 mg, doğru tartılmış) bir cam santrifüj tüpüne (16 x 100 mm; 14 mL kapasite) [C(p)] ekleyin.
- 5,0 mL sulu etanol (%80 v/v) ekleyin ve tüpü 80-85°C'de 5 dakika inkübe edin. İçeriği bir vorteks karıştırıcıda karıştırın ve 5 mL daha %80 v/v sulu etanol ekleyin.
- Tüpü tezgah santrifüjü [C(b)] üzerinde 3.250 rcf'de (~ 4.000 rpm) 10 dakika santrifüjleyin. Süpernatantı atın.
- Peleti 5 mL %80 v/v sulu etanol içinde yeniden süspansen edin ve bir vorteks karıştırıcı üzerinde karıştırın. 5 mL daha %80 v/v sulu etanol ekleyin ve ters çevirerek karıştırın. Adım 4'teki gibi santrifüjleyin ve süpernatantı dikkatlice dökün.

6. (c) prosedürünün 4. adımına geçin.

Çıkarma hacmi (EV) = 100; Seyreltme (D) = 1

Alternatif olarak:

Numune dirençli nişasta içeriyorsa prosedür (d)'nin 4. adımına geçin.

Çıkarma hacmi (EV) = 100; Seyreltme (D) = 1

(f) Nişastanın çözünür veya askıda halde bulunduğu numunelerde nişasta tayini.

1. Numune içeriğini bir vorteks karıştırıcıda karıştırarak veya ters çevirerek iyice karıştırın. Gerekirse, homojen bir süspansiyon elde etmek için numuneyi ısıtın veya homojenleştirin.

2. Pozitif yer değiştirme dağıtıcısı kullanarak hemen iki Corning kültür tüpüne (16 x 120 mm) [C(q)] iki kopya halinde (numune ve numune körü) 5 mL'lik alikotları aktarın. Her bir tüpe, bir Marka Şişe üstü dağıtıcı [C(m)] kullanarak 5 mL sodyum asetat tamponu (200 mM, pH 4.5) artı kalsiyum klorür (5 mM) [B(b)] ekleyin. Tüpleri bir vorteks karıştırıcı üzerinde 5 saniye kuvvetlice karıştırın.

3. Numune ve kör numune için adım 4, sayfa 9'daki prosedür (a)'ya göre ilerleyin.

4. Nişasta içeriğini hesaplayın (sıvı numuneler için F bölümüne bakın).

Seyreltilmiş Numune Hacmi (DSV) = 10,2 mL Seyreltme (D) 1, 5 veya 11; Numune Hacmi (SV) = 5 mL

(g) Süspansiyon halinde dirençli nişasta içeren numunelerin nişasta içeriğinin belirlenmesi.

1. Numune içeriğini bir vorteks karıştırıcıda karıştırarak veya ters çevirerek iyice karıştırın. Gerekirse, homojen bir süspansiyon elde etmek için numuneyi ısıtın veya homojenleştirin.

2. Pozitif yer değiştirme dağıtıcısı kullanarak hemen iki Corning kültür tüpüne (16 x 120 mm) [C(q)] iki kopya halinde 2 mL alikot aktarın. 25 mL uçlu bir HandyStep® dağıtıcı kullanarak 2 mL soğuk 1,7 M sodyum hidroksit çözeltisi [B(d)] ekleyin ve tüp içeriğini bir vorteks karıştırıcıda 15 saniye karıştırın. Tüpü manyetik karıştırıcı üzerinde buzlu su banyosunda bir rafa yerleştirin ve 15 dakika karıştırın (Şekil 2, sayfa 18). Bu süre zarfında, tüpün içeriğini de aralıklı olarak 2-3 kez bir vorteks karıştırıcı üzerinde kuvvetlice karıştırın. Numune bulamacında topaklar olmadığından emin olun.

3. Numune ve kör numune için adım 4'teki prosedür (b)'ye göre ilerleyin.

Seyreltilmiş Numune Hacmi (DSV) = 12,2 mL Seyreltme (D) x 1, 5 veya 11; Numune Hacmi (SV) = 2 mL

(h) Enzim dirençli nişastanın belirlenmesi.

Dirençli nişasta, Megazyme tarafından sağlanan Dirençli Nişasta tahlil kiti (K-RSTAR) veya Hızlı Dirençli Nişasta tahlil kiti (K-RAPRS) kullanılarak doğru bir şekilde ölçülür. K-RSTAR veya K-RAPRS kullanılarak elde edilen sonuçlar, in vivo koşullar altında elde edilenleri yakından simüle eder.14 Dirençli Nişasta tahlil prosedürü (K-RSTAR), AOAC Resmi Yöntemi olmak için laboratuvarlar arası değerlendirmeye (37 laboratuvar, 16 numune) başarılı bir şekilde tabi tutulmuştur. 2002.0215 ve AACC Yöntemi 32-40.01.