

## TOTAL DIETARY FIBER ASSAY KIT / GESAMT-BALLASTSTOFFBESTIMMUNGSKIT

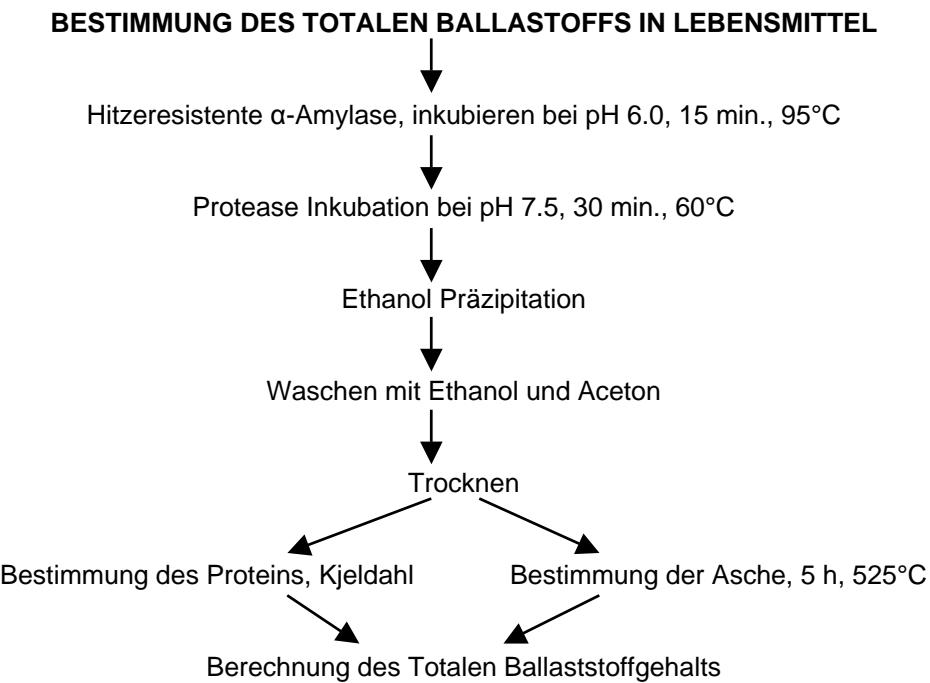
Produkt Nummern **TDF-100A** und **TDF-C10**

### Einleitung

Ballaststoffe sind eine Mischung von komplexen organischen Substanzen und waren ursprünglich definiert als Überbleibsel von Pflanzenzellen, die von den Enzymen des menschlichen Verdauungskanals nicht hydrolysiert wurden.<sup>1</sup> Man hat diese Definition modifiziert und erweitert um Hemicellulosen, Cellulosen, Ligninen, Pektinen, Pflanzenharz (Gummiverbindungen), sowie nicht verdauten Oligosacchariden und Wachse.<sup>2,3</sup> Diese erweiterte Definition anerkennt die Bedeutung der Ballaststoffe als chemische und physiologische Komponenten von Lebensmittel. Das Vorgehen bei der Bestimmung des totalen Ballaststoffs in Lebensmittel stützt sich auf die Methode publiziert in "Official Methods of Analysis" der "Association of Official Analytical Chemists" (AOAC).<sup>4</sup>

### Zusammenfassung des Verfahrens

Bestimmt wird der Gehalt von totalem Ballaststoff in Lebensmittel mittels kombinierten enzymatischen und gravimetrischen Methoden. Proben aus getrockneten lipidfreien Lebensmitteln werden gelatinisiert mit hitzeresistenter  $\alpha$ -Amylase und danach enzymatisch verdaut mit Protease und Amyloglucosidase um die vorhandenen Protein- und Stärkebestandteile in den Proben zu entfernen. Die löslichen Fasern werden dann gefällt mit Ethanol. Der Bodensatz wird filtriert und mit Ethanol und Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen wird der Rückstand gewogen. Für die eine Hälfte der Proben werden Proteinanalysen durchgeführt und die Proben der anderen Hälfte werden verascht. Das Gehalt an Gesamt-Ballaststoff ergibt sich aus dem Gewicht des Rückstands minus dem Gewicht der Proteine und der Asche.



### Vorhandene Reagenzien:

**TDF-100A** Kit - Kit zur Bestimmung von totalem Ballaststoff. Dieses Kit enthält genügend Reagenzien um 100 Bestimmungen durchzuführen.

1.  $\alpha$ -Amylase, hitzeresistent; Produkt Nr. A3306
2. Protease; Produkt Nr. P3910
3. Amyloglucosidase; Produkt Nr. A9913
4. Celite<sup>TM</sup>, säuregewaschen; Produkt Nr. C8656

**TDF-C10** Kit - Zur Bestimmung des Gesamt-Ballaststoffes, Kontroll-Kit  
 Jede Flasche enthält genügend Material für ca.10 Bestimmungen.

1. Arabinogalactan; Produkt Nr. A9788
2. Casein; Produkt Nr. C7906
3.  $\beta$ -Glucan; Produkt Nr. G7391
4. Pektin; Produkt Nr. P7536
5. Stärke, Mais; Produkt Nr. S2388
6. Stärke, Weizen; Produkt Nr. S1514

**Erforderliche Reagenzien (Nicht im Kit vorhanden):**

1. Petrolether; Produkt Nr. 18,451-9
2. Ethanol, ACS Reagenz; Produkt Nr. 45,984-4
3. Aceton, ACS Reagenz; Produkt Nr. 32,011-0
4. Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei; Produkt Nr. S0876
5. Natriumdihydrogenphosphat, wasserfrei; Produkt Nr. S0751
6. Natriumhydroxid, 1.0 N Produkt Nr. 930-65
7. Salzsäure, 1.0 M HCl; Produkt Nr. 920-1

**Geräte**

1. Fritten-Tiegel Porosität #2 (grob 40-60 Mikronen)
2. Vakuum-Quelle. Eine Vakuumpumpe oder Aspirator mit inline Doppelvakuumflasche ausgerüstet um Kontaminationen bei Wasserrücklauf zu vermeiden.
3. Heissluftofen einstellbar auf 105°C oder ein Vakuumofen eingestellt auf 70°C.
4. Exsikkator
5. Muffelofen
6. Wasserbad 100°C
7. Wasserbad (konstante Temperatur), regulierbar auf 60°C, mit entweder Multistation Schüttler oder Multistation Magnetrührer, um während der enzymatischen Hydrolyse die Reaktionsflaschen zu rühren oder schütteln.
8. Bechergläser – 400 ml oder 600 ml Hochformat
9. Analysenwaage ( $d = 0.1$  mg)
10. pH-Meter – geeicht auf pH 4.0 und pH 7.0.

**Vorbereitungen**Tiegel

Gefässse gründlich waschen. Während 1h heizen bei 525°C dann kühlen. Einweichen in Wasser, dann spülen mit Wasser und schliesslich lufttrocknen. 0.5 g Celite in jeden Tiegel geben, dann trocknen bei 130°C bis zur Gewichtskonstanz (mindestens 1h). Abkühlen lassen im Exikator, abwägen auf 0.1 mg. Eintragen als <Celite + Tiegel Gewicht> oder  $W_1$ . Im Exikator aufbewahren bis zum Gebrauch.

Probe

Falls der Lipidgehalt der Probe grösser ist als 10% mit Petrolether entfetten.<sup>4</sup> Der beim Entfetten auftretende Gewichtverlust eintragen und die entsprechende Korrektur machen für den endgültigen prozentualen Anteil von Ballaststoff. Lipidextraktion bei allen unbekannten Proben ausführen.

Nötigenfalls jede Probe homogenisieren und über Nacht trocknen im Luftofen bei 105°C (70°C im Vakuumofen). Kühlen lassen im Exikator und trockenmahlen bis 0.3 – 0.5 mm mesh. Falls keine entsprechenden Geräte zur Verfügung steht, dann genügt das Mahlen mit dem Mörser. Falls die Probe nicht erhitzt werden darf, dann vor dem Mahlen tiefkühlen. Die Trockenprobe im Exikator lagern bis zur Ausführung der Analyse.

Reagenzien

Für die Herstellung von Lösungen wird destilliertes oder deionisiertes Wasser gebraucht.

1. 78% Ethanol  
In einen 1 L Messkolben werden 207 ml Wasser gegeben. Bis zur Marke auffüllen mit Ethanol 95%. Mischen und Volumen kontrollieren, gegebenenfalls Ethanol dazugeben. Mischen.
2. Phosphat Puffer, 0.08M, pH 6.0  
1.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Produkt Nr. S0876) und 8.4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, wasserfrei (Produkt Nr. S0751) werden in ca. 700ml Wasser gelöst. Die Lösung wird auf einen Liter mit Wasser verdünnt. pH kontrollieren und einstellen, nötigenfalls mit NaOH oder H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Lagern bei Zimmertemperatur in einem fest verschlossenen Behälter.
3. Natriumhydroxid Lösung, 0.275 N  
In einen 1L Messkolben werden 275 ml NaOH 1.0 N gegeben (Produkt Nr. 930-65) und die Lösung bis auf einen Liter mit Wasser verdünnt. Lagern bei Zimmertemperatur in einem fest verschlossenen Behälter.

4. Salzsäure Lösung, 0.325 M  
325 ml HCL 1.0 M (Produkt Nr. 920-1) werden in einem 1L Messkolben auf einen Liter mit Wasser verdünnt. Lagern bei Zimmertemperatur in einem fest verschlossenen Behälter.

### **Methode**

Leerwerte lässt man mitlaufen während der ganzen Methode, um mögliche Beiträge aus Rückständen von Reagenzien zu messen. Die Proben und Leerwerte, die für Ballaststoff getestet werden, sollte man mindestens vierfach laufen lassen, um doppelte Werte zu erhalten für Proteine und Asche was eine verbesserte Genauigkeit ergibt.

1. Vier 1-gram Proben von jedem Testmaterial werden in Hochformat-Bechergläser ausgewogen. Die Probegegewichte dürfen sich höchstens um 20 mg unterscheiden. Die Gewichte bis zu 0.1 mg messen und eintragen.
2. Zu jedem Becherglas 50 ml Phosphat Puffer pH 6.0 zugeben.
3. Zu jedem Becherglas 0.10ml  $\alpha$ -Amylase zugeben (Produkt Nr. A3306) und gut mischen.
4. Die Bechergläser mit Alufolie zudecken und in ein kochendes Wasserbad stellen. Bechergläser alle 5 Minuten leicht schwenken. Nach dem die Innentemperatur der Bechergläser 95°C erreicht haben, während 15 Minuten inkubieren.
5. Die Lösungen auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
6. Mit der Zugabe von 10 ml NaOH 0.275 N zu jedem Becher, den pH-Wert der Lösungen auf 7.5 +/- 0.2 einstellen. pH kontrollieren und nötigenfalls anpassen mit NaOH oder HCl.
7. Kurz vor Gebrauch, eine 50 mg/ml Proteaselösung in Phosphat Puffer herstellen (Produkt Nr. P3910). In jedem Becherglas 0.1ml (5 mg Protease) pipettieren.
8. Die Bechergläser mit Alufolie zudecken und in das 60°C Wasserbad stellen. Nach dem die Innentemperatur der Bechergläser 60°C erreicht hat, 30 Minuten unter ständigem Rühren oder Schütteln inkubieren.
9. Lösungen auf Zimmertemperatur abkühlen lassen.
10. Mit der Zugabe von 10 ml HCl 0.325 M zu jedem Becher, den pH-Wert der Lösungen zwischen 4.0 und 4.6 einstellen. pH kontrollieren und nötigenfalls mit HCl oder NaOH anpassen.
11. Zu jedem Becherglas 0.1 ml Amyloglucosidase geben (Produkt Nr. A9913)
12. Die Bechergläser mit Alufolie zudecken und in das 60°C Wasserbad stellen. Nach dem die Innentemperatur der Bechergläser 60°C erreicht hat, 30 Minuten unter ständigem Rühren oder Schütteln inkubieren.
13. Zu jedem Becherglas 4 Volumen Ethanol 95% geben.
14. Die Lösungen über Nacht bei Zimmertemperatur stehen lassen, um eine vollkommene Fällung zu ermöglichen.
15. **Filtration**  
In jedem Tiegel die Celiteschicht neu verteilen und mit Ethanol 78% anfeuchten. Leicht ansaugen um das Celite als gleichmässige Masse auf die Fritte zu ziehen. Das leichte Vakuum beibehalten und das Präzipitat und die Suspension quantitativ von jedem Becher zu den entsprechenden Tiegeln überführen. Den Rückstand waschen, dreimal mit je 20 ml Ethanol 78%, zweimal mit je 10 ml Ethanol 95% und dann zweimal mit je 10 ml Aceton.  
Bei einigen Proben kann sich ein Gummiharz bilden, und damit die Flüssigkeit einschliessen. Die Oberflächenhaut kann mittels eines Spatels durchgebrochen werden um die Filtrationsgeschwindigkeit zu verbessern. Unbedingt den Spatel spülen um klebendes Material zu entfernen und in den Tiegel zurück zu geben. Der Zeitaufwand für die Filtration und das Waschen kann von 0.1 bis 6 h per Tiegel dauern, aber durchschnittlich 0.5 h per Tiegel.
16. Die Tiegel mit Rückstand über Nacht in einem Luftofen bei 105°C oder 70°C Vakuumofen trocknen.
17. Die Tiegel kühlen lassen im Exikator, abwägen bis 0.1 mg und das Gewicht als <Rückstand + Celite + Tiegelgewicht> oder  $W_2$  eintragen.
18. Proteinanalyse durchführen mittels Kjeldahl Stickstoff Analyse nach Spezifikationen der AOAC Methode<sup>5</sup>. 6.25 wird als Faktor verwendet um den Ammoniak der Bestimmung in Protein umzurechnen, ausser wo der Stickstoff-Gehalt der Proteinprobe bekannt ist.

19. Der Rückstand in den Tiegeln von zwei Proben und zwei Leerwerten werden verascht während 5h bei 525°C. Nachher in einem Exikator kühlen lassen, abwägen bis 0.1 mg und das Gewicht als <Asche + Celite + Tiegel Gewicht> oder  $W_3$  eintragen.

### Prüfen der Enzymwirksamkeit

Die Enzym-Komponenten des *TDF-100A* Kit kann man mittels den unten in der Tabelle aufgelisteten Referenzproben kontrollieren. Vollständige Enzymaktivität und das Fehlen von unerwünschten verunreinigenden Aktivitäten werden angezeigt durch das Erhalten der zu erwartende Wiedergewinnung des Ballaststoffs für jede Referenzprobe. Es empfiehlt sich Casein (Produkt Nr. C7906) und /oder Mais Stärke (Produkt Nr. S2388) in jeder Bestimmung als interne Kontrolle mit einzuschliessen. Um festzustellen, dass kein Abbau oder Verunreinigung der Enzyme erfolgte, sollte man alle sechs Monate, nach Gebrauch der Enzyme des Kits, die ganze Bestimmung bei allen aufgelisteten Testproben durchführen.

Referenzprobe	Sigma Produkt Nr.	Aktivität	Gewicht der Probe	Erwartete Wiedergewinnung % Ballaststoff
Arabinogalactan	A9788	Hemicellulase *	0.1 g	95 - 100
Casein	C7906	Protease **	0.3 g	0 - 2
β-Glucan	G7391	β-Glucanase *	0.1 g	95 – 100
Pektin	P7536	Pectinase *	0.1 g	95 – 100
Stärke, Mais	S2388	Amylase ** Amyloglucosidase**	1.0 g	0 - 2
Stärke, Weizen	S1514	Amylase ** Amyloglucosidase**	1.0 g	0 - 1

\* Diese Aktivität darf bei den Proben nicht vorhanden sein.

\*\* Diese Aktivität muss bei den Proben vorhanden sein.

### Berechnung

$$\text{Gewicht des Rückstandes} = W_2 - W_1 \quad \text{Gewicht der Asche} = W_3 - W_1$$

$$L = R_{\text{Leerwert}} - P_{\text{Leerwert}} - A_{\text{Leerwert}}$$

$$\% TDF = (R_{\text{Probe}} - P_{\text{Probe}} - A_{\text{Probe}} - L/\text{PrG}) \times 100$$

Wobei  $TDF$  = Total Ballaststoff im Lebensmittel  
 $R$  = durchschnittliches Rückstandsgewicht (mg)  
 $P$  = durchschnittliches Proteingewicht (mg)  
 $A$  = durchschnittliches Aschegewicht (mg)  
 $\text{PrG}$  = durchschnittliches Probegewicht (mg)

## Referenzen

1. Trowell, H., Lancet, **1**, 504 (1974).
2. Trowell, H., et.al., Lancet, **1**, 967 (1976).
3. Van Soest, P.J. and McQueen, R.W., Proc. Nutr. Soc., **32**, 123-130 (1973).
4. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.07, Method 985.29 (1997).
5. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume I, Section, 12.1.07, Method 960.52 (1997).

CELITE® : eingetragene Warenmarke der Celite Corporation