

食品中总的、不溶性及可溶性膳食纤维的酶-重量测定法

当前,膳食纤维在预防慢性病中有着广泛的作用,膳食纤维与人体健康关系的研究日益受到重视。现已知道可溶性膳食纤维的作用主要为调节血脂、血糖及调节益生菌丛。而不溶性膳食纤维主要的作用为肠道通便。目前市场上富含膳食纤维的食物、食品添加剂和保健食品越来越多,原有膳食纤维的检测方法已不适应当前需要。古老的方法只能测定粗纤维[1],该方法所测数值与总纤维含量有较大差异,两者之间也没有一定的换算系数。现有的洗涤剂法只能测定不溶性膳食纤维[2],但不能测定可溶性膳食纤维,尤其是可溶性膳食纤维已明确具有保健功能,并成为保健功能食品中的功效成分,这就给膳食纤维成分更加细致的分类测定提出了要求。目前膳食纤维的测定方法可分为两大类:重量法和化学法。重量法较简单[3],主要测定总膳食纤维、可溶性膳食纤维和不可溶性膳食纤维。化学法则可定量地测定其中每一种中性糖和总的酸性糖(糖醛酸),还可单独测定木质素[4],但化学法受仪器设备制约,因而不适用于常规的膳食纤维分析。酶-重量法于20世纪80年代在国外首先发展起来,现已成为AOAC认可的分析方法,已被美国、日本、瑞典及北欧许多国家广泛采用。

1 材料和方法

1.1 原理:

分别用热稳定的 α -淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶进行酶解消化样品以去除蛋白质和淀粉。总膳食纤维(TDF)的测定是先酶解,然后用乙醇沉淀,将过滤的TDF残渣用乙醇和丙酮冲洗,干燥后称重。不溶性和可溶性膳食纤维(IDF和SDF)是在样品酶解后即刻将IDF过滤,过滤后的残渣用热水冲洗,经干燥后称重。SDF是将上述滤出液用4倍量的95%乙醇沉淀,然后将滤渣干燥、称重。TDF、IDF和SDF的量通过蛋白质和灰分含量进行校正。

1.2 仪器:

意大利VELP公司CSF6&GDE型膳食纤维测定仪;

天平:精确至 $\pm 0.1\text{mg}$;

马福炉:温度控制在 (525 ± 5) ;

干燥箱:温度控制在 (105 ± 3) 和 (130 ± 3) 。

1.3 试剂:

全部操作均使用蒸馏水;

85%和78%的乙醇溶液;

丙酮:分析纯;

热稳定 α -淀粉酶溶液:CatNoA3306, Sigma;

蛋白酶:CatNoP3910, Sigma,当天用MESTRIS缓冲液配制50mg/ml的酶溶液;

淀粉葡萄糖苷酶溶液:CatNoAMGA9913, Sigma;

硅藻土:酸洗(Celite545AW, NoC8656, Sigma);

铬酸洗涤液;

MES-TRIS缓冲液:0.05mol/L,温度在24℃时pH值为8。

1.4 测定方法

1.4.1 样品制备

1.4.1.1 固体样品 如果样品粒度 $>0.5\text{mm}$,研磨后过0.3~0.5mm(40~60目)筛。

1.4.1.2 高脂肪样品 如果脂肪含量 $>10\%$,用石油醚去脂。每克样品用25ml,每次提取后静置片刻,再小心倾斜烧杯,慢慢将石油醚倒出,共洗3次。

1.4.1.3 高碳水化合物样品 如果样品干重含糖 $>50\%$,每克样品每次用85%乙醇10ml去除糖份,共洗3次,轻轻倒出,然后在40℃烘箱中不时翻搅干燥过夜,经研磨

后过 05mm 筛。

1.4.2 酶解处理：

准确称取双份 1000g 左右样品(M1 和 M2)，置于高筒烧杯中。分别加入 40mlMES-TRIS 缓冲液，在磁力搅拌器上搅拌直到样品完全分散。热稳定的淀粉酶酶解处理：加 100 μ l 热稳定的淀粉酶溶液,低速搅拌。并在 80 水浴中反应 30min。移出后冷却至 60 。用刮勺将烧杯边缘的网状物以及烧杯底部的胶状物刮离,以使样品能够完全酶解。并用蒸馏水冲洗烧杯壁和刮勺。

蛋白酶酶解处理：在每个烧杯中分别加入 100 μ l 蛋白酶溶液。用铝箔覆盖,在 60 持续振摇反应 30min。

pH 值测定:30min 后，搅拌并加入 5ml0.561mol/LHCl，然后保持在 60 ，用 1mol/LNaOH 溶液或 1mol/LHCl 溶液调至最终 pH 为 4.0~4.7。

淀粉葡糖苷酶酶解处理：搅拌同时加 100 μ l 淀粉葡糖苷酶溶液。用铝箔覆盖，在 60 持续振摇反应 30min,温度应恒定在 60 。

1.4.3 总膳食纤维的测定 在每份样品中加入预热至 60 的 95%乙醇 225ml,乙醇与样品的体积比为 4 : 1。室温下沉淀 1h。用 15ml78%乙醇将硅藻土湿润和重新分布在预先称重的坩埚中。用适度的抽力把硅藻土吸到坩埚底板上。

酶解过滤，用 78%乙醇和刮勺转移所有内容物微粒到坩埚中。抽真空，分别用 15ml 的 78%乙醇、95%乙醇和丙酮冲洗残渣各 2 次，将坩埚内的残渣抽干后在 105 烘干过夜。将坩埚置干燥器中冷却至室温后称重，精确称至 0.1mg。减去坩埚和硅藻土的干重，计算残渣重。

1.4.4 蛋白质和灰分的测定 取平行的样品中的一份用 GB-96052 方法测定蛋白质。用平行样的第二份分析灰分在 525 灼烧 5h 后,在干燥器中冷却,精确称至 0.1mg,减去坩埚和硅藻土的重量,即为灰分重量。

1.4.5 不溶性膳食纤维测定 称适量样品按 142 进行酶解,过滤前用 5ml 水湿润硅藻土和重新分布在预先处理好的坩埚上,保持抽气状态使坩埚中的硅藻土成均匀的一层。将样品过滤并冲洗烧杯,用 10ml70 水洗残渣 2 次,然后再过滤并用水洗,滤液保留于高筒烧杯,用以测定可溶性膳食纤维。用抽滤装置,分别以 15ml78%乙醇、95%乙醇和丙酮各冲洗残渣 2 次。按 144 方法用双份样品测定蛋白质和灰分。

1.4.6 可溶性膳食纤维测定 估计不溶性膳食纤维过滤后的滤液的容积,加约 4 倍量已预热至 60 的 95%乙醇,或者将滤液和冲洗残渣的蒸馏水的混合液调至 80ml,再加入预热至 60 的 95%乙醇 320ml。室温下沉淀 1h。下面按 142 方法测定总膳食纤维的方法抽滤及称重。

1.4.7 计算(TDF、IDF、SDF 均用同一公式计算)

膳食纤维(DF,g/100g)测定： $DF = \frac{[(R1+R2)2] - P - A}{(M1+M2)2} \times 100$

式中：R1 和 R2=双份样品残留物重量(mg)；

P 和 A 分别为蛋白质和灰分重量(mg)；

M1 和 M2=样品重量(mg)。

2 结果

2.1 精密度

选取 2 个有代表性的样品,采用同样方法分别测定 6 次和一次测定 6 个平行样测定批间精密度。