



Zakład Przechowalnictwa i Przetwórstwa
Owoców i Warzyw

Metodyka

OZNACZANIA BŁONNIKA ROZPUSZCZALNEGO I NIEROZPUSZCZALNEGO W OWOCACH JAGODY KAMCZACKIEJ

Autorzy:

mgr inż. Wioletta Popińska-Gil

mgr Elżbieta Gędek

dr inż. Dorota Kruczyńska

Opracowanie przygotowane w ramach **zadania 1.4**

„Nowe gatunki dla poszerzenia i zróżnicowania produkcji roślin ogrodniczych, w tym żywności funkcjonalnej”

Programu Wieloletniego:

„Działania na rzecz poprawy konkurencyjności i innowacyjności sektora ogrodniczego z uwzględnieniem jakości i bezpieczeństwa żywności oraz ochrony środowiska naturalnego”
finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Skierniewice 2018

Spis treści:

1. Wstęp	2
2. Cel zadania	2
3. Opis metodyki oznaczania błonnika w jagodzie kamczackiej	3
3.1 Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy	3
3.2 Przygotowanie tygla Schotta	3
3.3 Wykonanie pomiaru	3
a) Inkubacja z enzymami	3
b) Oznaczanie frakcji nierozpuszczalnej błonnika pokarmowego (IDF) metodą AOAC 991.42	4
c) Oznaczanie całkowitego błonnika pokarmowego (TDF) metodą AOAC 985.29	4
d) Pomiar wagowy osadów	5
4. Walidacja metody oznaczania błonnika	6
5. Wnioski	6
6. Literatura	7

1. Wstęp

Coraz większa świadomość konsumentów sprawia, że coraz chętniej sięgają oni po rzadko spotykane w Polsce gatunki owoców, które często są bardzo bogatym źródłem bioaktywnych składników, między innymi błonnika. Błonnik pokarmowy jest mieszką złożonych związków organicznych. Wstępnie określono go jako pozostałość komórek roślinnych odpornych na hydrolizę z udziałem ludzkich enzymów trawiennych (Trowell H., Lancet 1974, WHO 2003). Z czasem definicja uległa zmianie obejmując hemicelulozy, celulozy, ligniny, pektyny, gumy, woski i oligosacharydy nie ulegające trawieniu (Trowell H, 1976, Van Soest P.J. 1973). Błonnik jest ważnym składnikiem w diecie człowieka, dlatego też bardzo ważne jest, aby w codziennej diecie znalazło się dużo owoców bogatych w błonnik. Niniejsza procedura określa całkowitą zawartość błonnika pokarmowego i oparta jest na metodzie enzymatyczno – wagowej (AOAC 985.29) z podziałem na frakcję nierozpuszczalną – IDF (AOAC 991.42) i rozpuszczalną – SDF.

2. Cel zadania

Celem zadania było opracowanie i walidacja sposobu oznaczania zawartości błonnika całkowitego metodą enzymatyczno-wagową z podziałem na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną w owocach jagody kamczackiej.

3. Opis metodyki oznaczania błonnika w jagodzie kamczackiej

3.1 Przygotowanie próbki – ekstrakcja analitu z matrycy

W celu otrzymania jednorodnej próbki analitycznej, owoce jagody kamczackiej zostały rozdrobnione w stanie zamrożonym w malakserze.

5 g rozdrobnionych owoców odważyć na wadze analitycznej. Umieścić kolbę inkubacyjną, wytarować i odważyć od 2,5-5,0 g próbki. Różnica mas dwóch powtórzeń powinna być mniejsza niż 10%.

Przyporządkowanie próbki zapisać wg wzoru:

Nr. lab. próbki	Masa tygla z celitem	Masa tygla z celitem + próbka po wysuszeniu	Masa próbki wziętej do analizy	Masa tygla z celitem + popiół	Masa popiołu	Białko	TDF lub IDF lub SDF	Data podpis
x^{tygiel}_{kolba}								

gdzie: x -nr. lab. próbki, $tygiel$ -nr. Tygla, $kolba$ -nr. kolby

3.2 Przygotowanie tygli Schotta

Naważyć ok. 0,5 g celitu do tygla (nie mniej niż 0,5 g). Umieścić tygla na czarnych kołnierzach w aparacie Foss FibertecTM 1023. Następnie przemyć tygiel wodą i odsączyć pod próżnią. Tygla z ułożonym celitem wyprażyć w piecu muflowym przez noc w 525 °C. Studzić i przechowywać w eksykatorze. Tygla przygotowywać najpóźniej na dzień przed analizą próbek. Wyprażone tygla po analizach umyć wodą destylowaną, zalać kwasem solnym na noc (zlewki 400 ml pod wyciągiem). Przepłukać wodą i wysuszyć na powietrzu.

3.3 Wykonanie pomiaru

a) Inkubacja z enzymami

- Uruchomić łaźnię wodną i ustawić na temperaturę 95-100 °C według instrukcji producenta.
- Przygotować bufor fosforanowy 0,08 mol/l o pH 6,0 (jeżeli nie zrobiono tego w poprzednich dniach).
- Uruchomić pH-metr według instrukcji producenta.
- Nagrząć łaźnię wodną do temp. ok. 60-65 °C
- Do każdej kolby dodać 50 ml buforu fosforanowego oraz 0,1 ml α -amylazy, po czym zabezpieczyć kolby kwadratami z folii aluminiowej. Ogrzewać w łaźni wodnej w temp. 95-100 °C przez 30 minut. Po 30 minutowej inkubacji kolby wyjąć z łaźni.

- Doprowadzić roztwór buforu fosforanowego do $\text{pH} = 7,5 \pm 0,2$ poprzez dodanie ok. 10 ml 0,275 mol/l wodorotlenku sodu.
- Po ustaleniu odpowiedniego pH dodać 0,1 ml proteazy, kolby zabezpieczyć starymi lub nowymi kwadracikami folii aluminiowej i ogrzewać w łaźni wodnej z ciągłym wytrząsaniem w temp. 60 °C przez 30 minut.
- Mieszaninę reakcyjną schłodzić i doprowadzić do $\text{pH} = 4,0-4,6$ poprzez dodanie ok. 10 ml 0,325 mol/l kwasu solnego.
- Po ustaleniu pH do kolb dodać 0,2 ml amyloglukozydazy, zabezpieczyć folią aluminiową i ogrzewać w łaźni wodnej w 60 °C z ciągłym wytrząsaniem przez 30 minut.

b) Oznaczanie frakcji nierozpuszczalnej błonnika pokarmowego (IDF) metodą AOAC 991.42

- Po upływie czasu inkubacji z amyloglukozydazą wyjąć kolby z łaźni wodnej i ostudzić.
- Przesączyć roztwór przez tygłe z celitem następującymi roztworami:
 - 2 x 10 ml woda
 - 2 x 210 ml 95% etanol
 - 2 x 10 ml aceton
- Tygłe z osadami suszyć przez min. 5 h w suszarce ustawionej na 105 °C.

c) Oznaczanie całkowitego błonnika pokarmowego (TDF) metodą AOAC 985.29

- Przed inkubacją próbek z amyloglukozydazą włączyć łaźnię wodną (używaną do inkubacji z amylazą) i ustawić na temp. 95 °C. Po włożeniu próbek do inkubacji z amyloglukozydazą, do 1l lub/i 2l kolby erlenmeyera wlać $x \cdot 280$ ml etanolu 95-97% gdzie x-liczba kolb inkubowanych.
Kolbę należy zabezpieczyć kwadratem z folii aluminiowej i umieścić w niej termometr cieczowy. Etanol podgrzać w łaźni wodnej do temp. 60 °C.
- Po inkubacji z ostatnim enzymem do każdej kolby dodać 280 ml podgrzanego wcześniej etanolu i pozostawić pod przykryciem z folii aluminiowej na 60 minut.
- Zważyć i przypisać tygłe do kolb, przemyć na 5 minut przed sączeniem.
- Po upływie 60 minut z kolb zdjąć folię i umieścić w tyglach z celitem i przemyć 78% etanolem. Następnie przemyć ścianki 95-97% etanolem i tygłe po przesączeniu acetonem. Tygłe suszyć w suszarce przez 5 h w temp. 105 °C.

d) Pomiar wagowy osadów

Tygle z osadem (TDF lub IDF) po wysuszeniu w suszarce należy ostudzić w ekzykatorze przez ok. 1 h. Następnie tygle zwarzyć i masę wpisać w ustaloną rubrykę w zeszycie.

W jednej z prób oznaczyć popiół (piec mufłowy, temp. 525 °C, 6 h) a w drugiej białko (TruSpec CNS). Tygle po wyprażeniu w piecu mufłowym studzić w ekzykatorze i zwarzyć. Masę tygla z popiołem oraz masę popiołu zanotować.

Tygle zużyte do analizy białka wyprażyć w piecu mufłowym (osad można przenieść do ceramicznych tygli lub moździerzy, a tygle dołączyć do tych na popiół).

Próbę ślepa oraz zestaw kontrolny do pomiarów należy wykonać jednokrotnie przy otworzeniu nowego zestawu enzymów do oznaczania błonnika pokarmowego (termin ważności wynosi 6 miesięcy od otworzenia). Otrzymane wyniki porównać z zawartościami:

- butelka 1 – β -Glucan TDF 95-100% (naważka 0,1 g)
- butelka 2 – Amyloza TDF 29-30% (naważka 1 g)
- butelka 3 – Skrobia TDF 0-1% (naważka 1 g)
- butelka 4 – Kazeina TDF 0-2 % (naważka 0,3 g)
- butelka 5 – Pektyna TDF 86-87% (naważka 0,1 g)
- butelka 6 – Galaktan TDF 83-84% (naważka 0,1 g)

Jeżeli otrzymane wyniki są prawidłowe enzymy można stosować.

Zawartość błonnika w ślepej próbie oblicza się ze wzoru (1):

$$0 = v_0 - b_0 - p_0 \quad (1)$$

gdzie:

v_0 – średnia masa osadu z 2 ślepych prób

b_0 – masa białka ślepej próby

p_0 – masa popiołu ślepej próby

Zawartość błonnika w próbce badanej oblicza się ze wzoru (2):

$$X_p = \frac{v - b - p - 0}{M} * 100 \quad (2)$$

gdzie:

X_p – TDF lub IDF w %

v – masa próbki

b – masa białka

p – masa popiołu

M – średnia masa próbki wziętej do analizy

0 – ślepa próba

Zawartość frakcji rozpuszczalnej błonnika pokarmowego (SDF) oblicza się ze wzoru (3) i wyraża w %:

$$SDF[\%] = TDF - IDF \quad (3)$$

Wynik końcowy badania

Wynik został obliczony według wzoru (4) i wyrażony w %:

$$X_b = \frac{X_p \cdot PSM}{100} \quad (4)$$

gdzie:

X_b – końcowy wynik badania

X_p – wynik w [%psm]

PSM – % powietrznie suchej masy materiału roślinnego oznaczony

100 – współczynnik przeliczeniowy

4. Walidacja metody oznaczania błonnika

Wyznaczono następujące parametry walidacji:

Precyzja aparatury: 10-krotne przygotowanie tej samej próbki i wyznaczenie względnego odchylenia standardowego (RSD).

Precyzja metody: Precyzja obliczona dla wyników pochodzących z tego samego laboratorium nosi nazwę powtarzalności r wykonane dwie próby równoległe. Analiza jednego dnia (intra-day), próby równoległe, analiza przez 3 kolejne dni w takich samych warunkach (inter-day); parametr wyrażony jako RSD.

Powtarzalność: precyzja wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych, wyliczona w oparciu o RSD (wzór 5).

$$u = RSD/\text{pierwiastek}(n) \quad (5)$$

Tabela 1. Charakterystyka metody uwzględniając frakcje rozpuszczalne i nierozpuszczalne dla jagody kamczackiej

	TDF	IDF	SDF
Zawartość [%]	1,81	1,01	0,79
precyzja aparatury [RSD %]	0,15	0,20	0,19
precyzja metody intra-day [RSD %]	1,67	0,85	0,82
precyzja metody inter-day [RSD %]	0,13	0,04	0,14
powtarzalność [u]	0,05	0,06	0,06

5. Wnioski

Opracowana metodyka jest przydatna do oznaczania zawartości błonnika całkowitego (TDF) z podziałem na frakcję rozpuszczalną (SDF) i nierozpuszczalną (IDF) w owocach jagody kamczackiej.

Zakres metody:

Błonnik całkowity 0,00 – 100,00 %

Frakcja rozpuszczalna 0,00 – 100,00 %

Frakcja nierozpuszczalna 0,00 – 100,00 %

Metoda charakteryzuje się wysoką precyzją zarówno aparatury jak i metody, RSD w przedziale 0,15-1,67%.

6. Literatura

BN-86-8130-02: 1987 Koncentraty spożywcze - Oznaczanie zawartości błonnika pokarmowego.

Bienkiewicz M., Bator E., Bronkowska M., 2015. Błonnik pokarmowy i jego znaczenie w profilaktyce zdrowotnej. *Probl. Hig. Epidemiol*, 96(1): 57-63.

Trowell H., Southgate D.A., Wolever T.M., Leeds A.R., Gassull M.A., Jenkins D.J. Letter: Dietary fibre redefined. *Lancet*. 1976 May 1;1(7966): 967–967.

Van Soest P. J., and McQueen R.W., The chemistry and estimation of fibre. 1973. *Proc Nutr. Soc.*, 32, 123-130.

Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.07, Method 985.29 1997

Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume I, Section 12.1.07, Method 960.52 1997

Trujillo E., Davis C. Nutrigenomics, proteomics, metabolomics and the practice of dietetics. *JADA* 2006, 106 (3): 403-413.

World Health Organization: Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Geneva, 2003.