

Dietary Fiber Assay Kit

【Introduction】

Dietary Fiber is defined in Japan as products determined by an enzymatic-gravimetric method of Prosky *et al.* (1992) (AOAC 985.29), which is universally applied, or products undecomposed by a series of enzymatic treatment with α -amylase, protease and amyloglucosidase such as polysaccharide and lignin are defined as Dietary Fiber in "Analytical Methods for Nutrition Labeling in Japan".

This is a kit to determine Dietary Fiber with a simplified Prosky method on the Enzyme treatment.

【Kit Contents】

| | |
|---|----------------|
| ① Thermostable α -Amylase Solution | 20 mL × 1 vial |
| ② Protease Solution | 20 mL × 1 vial |
| ③ Amyloglucosidase Solution | 20 mL × 1 vial |
| ④ Diatomaceous Earth | 100 g × 1 vial |

【Principle】

(1) Determination of total Dietary Fiber Contents

Digestible components in samples, such as starch and protein, are hydrolyzed with α -amylase, protease, and amyloglucosidase, precipitate undecomposed residual macromolecule by adding quadruple volume 95 % Ethanol, and then trapped with a glass filter crucible containing diatomaceous earth.

Total Dietary Fiber Contents are determined by deducting weight of protein and ash content from the dry weight of trapped residue on a glass filter crucible.

(2) Fractional Analysis of Soluble Dietary Fiber Contents and Insoluble Dietary Fiber Contents

Digestible components in samples, such as starch and protein, are hydrolyzed with α -amylase, protease, and amyloglucosidase, then filtrated with a glass filter crucible containing diatomaceous earth.

Insoluble Dietary Fiber Contents are determined by deducting weight of protein and ash content from the dry weight of trapped insoluble residue on a glass filter crucible.

Meanwhile, add a quadruple volume 95% Ethanol into the filtrate, precipitate undecomposed residual soluble macromolecule, and trap with a glass filter crucible containing diatomaceous earth. Soluble Dietary Fiber Contents are determined by deducting weight of protein and ash content from the dry weight of the trapped precipitated residue on a glass filter crucible.

Total Dietary Fiber Contents are defined as the sum of Insoluble Dietary Fiber Contents and Soluble Dietary Fiber Contents.

(3) Determination of Low-molecular Soluble Dietary Fiber

Specific Low-molecular Soluble Dietary Fibers, which are not precipitated even by addition of a quadruple volume of 95% Ethanol, are determined by high-performance liquid chromatography.

After digestible components such as starch and protein in samples are hydrolyzed with α -amylase, protease, and amyloglucosidase, the undecomposed residual macromolecule are precipitated by adding a quadruple volume of 95% Ethanol. Then filter it with a glass filter crucible containing diatomaceous earth.

Proteins, organic acids and inorganic salts in the filtrate are removed with ion-exchange resin, and then the solution is applied to high-performance liquid chromatography. Low-molecular Soluble Dietary Fiber Content is determined by the ratio of the peak area of the sample with that of glucose (internal standard) on the chromatogram.

Meanwhile, Insoluble and Soluble Macromolecular Dietary Fiber Content is determined by deducting weight of protein and ash content from the dry weight of the trapped precipitated residue on a glass filter crucible.

Total Dietary Fiber Contents is defined as sum of Low-molecular Soluble Dietary Fiber Contents and Insoluble and Soluble Macromolecular Dietary Fiber Contents.

【Features】

- Easy Operation and good working efficiency since this is an enzyme reagent kit with a simplified Prosky method on the enzyme treatment.

Assay Method

(1) Determination of Total Dietary Fiber Contents

【Materials required but not supplied】

〈Reagents〉

1. MES : Special Grade
2. TRIS : Special Grade
3. Sodium Chloride : Special Grade
4. Calcium Chloride Dihydrate : Special Grade
5. 95% (v/v) Ethanol : Special Grade
6. 78% (v/v) Ethanol : Mix 95% (v/v) Ethanol and water [4 : 1 (volume ratio)]
7. Acetone : Special Grade
8. Analytical reagents for Kjeldahl method : Concentrated sulfuric acid, hydrogen peroxide, Proteolysis-accelerator, sodium hydroxide, boric acid, Indicator, Sulfuric Acid Standard Solution, etc.

〈Appliance〉

1. 500 mL tall beaker, graduated
2. Analytical balance : measurable to the tenth of a milligram
3. Water bath
4. Thermostatic bath : Bath in which a 500 mL tall beaker can continuously be shaken while maintaining a temperature of 60°C

5. Glass filter crucible : Gooch type 2G (pore size 40-50 mm), about 4 cm filter diameter (2G2) is preferable. Wash thoroughly after purchase and heat at $525 \pm 5^\circ\text{C}$ for 1 hour.
6. Filtration equipment : such as a suction pump with a filtering flask (or multiple aspirator)
7. Adapter : for attachment of a glass filter crucible to a filtering flask
8. Electric furnace : adjustable to $525 \pm 5^\circ\text{C}$
9. Dry oven : adjustable to $105 \pm 5^\circ\text{C}$ and $130 \pm 5^\circ\text{C}$
10. Desiccator : with silica gel as a desiccant
11. pH meter
12. Kjeldahl apparatus : flask, heating apparatus, ammonia distillation apparatus, titrator, etc.

[Assay Method]

<Measurement setup>

[Glass filter crucible]

Add 1.0 g of Diatomaceous Earth into a glass filter crucible before use, and wash the Diatomaceous Earth carefully with water, 78 % Ethanol and 95 % Ethanol, in that order until the leakage of microparticles of diatomaceous earth is no longer observed, and obtain a homogeneous Diatomaceous Earth layer. Heat at 130°C for 1 hour and stand to cool in a desiccator. Determine the constant weight to the tenth of a milligram and store in a desiccator until use.

[Sample Preparation]

Low moisture food items such as grains, beans, nuts and seeds are ground evenly. Ground foods are then sifted through a 30-mesh (0.50 mm) sieve. The sifted part is used as the sample. However, if the food contains lipids at a concentration of 5 % or more in the foods such as soybean, nuts and seeds, defatting is conducted in advance.

High moisture food stuffs such as potatoes, vegetables, fungi are homogenized and freeze-dried (or dried overnight at 70°C). Then they are ground evenly and sifted through a 30-mesh (0.50 mm) sieve.

Food items with high sugar content such as fruits are homogenized and sifted through a 4-mesh (4.75 mm) sieve. In case the food has high acid, it affects the pH. You should do pH adjustment before the enzymatic treatment. In addition, loss in weight due to drying and defatting is determined.

[Buffer]

Preparation of 50 mmol/L MES-Tris Buffer, containing 10 mmol/L Na and 3 mmol/L Ca (pH 6.3, 24°C) :

- Preparation of 50 mmol/L MES solution : Weigh 9.76 g of MES (the final concentration : 50 mmol/L), 0.584 g of NaCl (the final concentration : 10 mmol/L) and 0.441 g Calcium Chloride Dihydrate (the final concentration : 3 mmol/L) and add them into a 1 L beaker, graduated. Then add deionized water to make the 1 L solution.
- Preparation of 50 mmol/L TRIS solution : Weigh 6.055 g of TRIS (the final concentration: 50 mmol/L), 0.584 g of

Sodium Chloride (the final concentration: 10 mmol/L) and 0.441 g of Calcium Chloride Dihydrate (the final concentration : 3 mmol/L) and add them into a 1 L beaker, graduated. Then add deionized water to make the 1 L solution.

- Preparation of 50 mmol/L MEW-TRIS Buffer : Mix the 50 mmol/L MES solution and 50 mmol/L TRIS solution and adjust the pH to 6.3 at 24°C . [MES solution : TRIS solution = 64 : 36 (v/v)]

<Assay>

1) Digestion with thermostable α -amylase

Accurately weigh 1 g of a sample to the tenth of a milligram. Take two samples (W1, W2) for one analysis. The weight difference between the two samples shall be within 20 mg. Use one sample to determine undigested protein and the other to determine ash content. Add a sample to 40 mL of 50 mmol/L MES-TRIS buffer (pH 6.3, 24°C) in a 500 mL tall beaker and disperse it. Check the pH to make sure it is 6.3 ± 0.1 (24°C). Add 0.2 mL of thermostable α -amylase and cover the tall beaker with aluminum foil. Let the mixture react in a boiling water bath for 30 min. while shaking it every 5 min.

2) Digestion with protease and amyloglucosidase

Add 10 mL of water while washing the wall of the tall beaker, cool to 60°C , and add simultaneously 0.2 mL of protease and 0.2 mL of amyloglucosidase. Let the mixture react in a thermostatic bath for 30 min. while continuous shaking.

3) Ethanol Precipitation

Add a quadruple volume of 95% Ethanol (preheated at 60°C) to the enzyme treated solution obtained, and allow to stand for 1 hour at room temperature to precipitate enzyme undigested macromolecule.

4) Filtration and Wash

Conduct a suction filtration of Ethanol Precipitation solution using a glass filter crucible, which has a homogeneous Diatomaceous Earth layer by washing with 78% Ethanol just before use, to obtain a residue. Under suction, rinse the residue in the tall beaker with 78% Ethanol (20 mL \times 3 times), 95% Ethanol (10 mL \times 2 times), and acetone (10 mL \times 2 times), and add the washings to the residue in the glass filter crucible.

5) Drying and Weighing

Dry the residue with the glass filter crucible at $105 \pm 3^\circ\text{C}$ overnight. Weigh the residue to a tenth of a milligram after allowing to cool in a desiccator. Residues for protein determination and that for ash determination are set at R1 and R2, respectively.

6) Protein Determination

Scrape the total amount of residues for protein determination together with Diatomaceous Earth and determine the nitrogen content in the residue by Kjeldahl protein determination. Multiply the obtained nitrogen content by 6.25 to obtain the protein content (P1).

7) Ash determination

Conduct incineration treatment of the residues for ash determination with the glass filter crucible at $525 \pm 5^\circ\text{C}$ for 5 hours, allow to cool in a desiccator, weigh to the tenth of a milligram and obtain the ash content (A1).

8) Blank Test

Perform the above-mentioned procedure without samples and obtain the blank values r1, r2, p1 and a1.

〈Calculation〉

Calculate Total Dietary Fiber Content using the following formula :

$$\text{Total Dietary Fiber Content (g/100 g)} \\ = \frac{(R1 + R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - B}{(W1 + W2)/2} \times 100 \\ B(g) = (r1 + r2)/2 \times \{1 - (p1/r1 + a1/r2)\}$$

In the case of dried samples, it is converted to Dietary Fiber Content before drying using the following formula :

$$\text{Dietary Fiber Content before drying (g/100 g)} \\ = \text{Total Dietary Fiber Content} \times (1 - D/100) \\ D : \text{Loss on drying (\%)}$$

In the case of defatted sample, it is converted to Dietary Fiber Content before defatting using the following formula :

$$\text{Dietary Fiber Content before defatting (g/100 g)} \\ = \text{Total Dietary Fiber Content} \times (1 - F/100) \\ F : \text{Loss on defatting (\%)}$$

(2) Fractional Analysis of Soluble Dietary Fiber Contents and Insoluble Dietary Fiber Contents

[Materials required but not supplied]

〈Reagents〉 Same as the above-mentioned (1)
〈Appliance〉 Same as the above-mentioned (1)

[Assay Method]

〈Measurement setup〉

[Glass filter crucible] : Same as the above-mentioned (1)
[Sample Preparation] : Same as the above-mentioned (1)
[Buffer] : Same as the above-mentioned (1)

〈Assay〉

- 1) Digestion by thermostable α -amylase :
Same as the above-mentioned (1)
- 2) Digestion by protease and amyloglucosidase :
Same as the above-mentioned (1)
- 3) Filtration of soluble fraction and insoluble fraction
Conduct a suction filtration of the enzyme treated solution obtained using a glass filter crucible, which has a homogeneous Diatomaceous Earth layer by washing with 78 % Ethanol just before use, and divide into residue and filtrate. Rinse the residue in the tall beaker with about 10 mL of water, and add the washings to the residue in the glass filter crucible. Combine the washings and

the filtrate. The filtrate is the fraction containing Soluble Dietary Fiber, and the residue is the fraction containing Insoluble Dietary Fiber.

4) Ethanol Precipitation, Filtration and Wash of fraction contains soluble dietary fiber

Add the quadruple volume of 95% Ethanol (preheated at 60°C) in the filtrate obtained at the procedure of 3) and leave it for 1 hour at room temperature to precipitate enzyme undigested macromolecule. Conduct a suction filtration of Ethanol Precipitation solution using a glass filter crucible, which has a homogeneous Diatomaceous Earth layer by washing with 78% Ethanol just before use, to obtain a residue. Under suction, add 78% Ethanol (20 mL \times 3 times), 95% Ethanol (10 mL \times 2 times), and acetone (10 mL \times 2 times) successively to the residue in the glass filter crucible.

5) Filtration and Wash of fraction contains insoluble dietary fiber

Under suction, add 95% Ethanol (10 mL \times 2 times), and acetone (10 mL \times 2 times) successively to the residue in the glass filter crucible obtained in procedure 3).

6) Drying and Weighing

Dry the residue with the glass filter crucible at $105 \pm 3^\circ\text{C}$ overnight. Weigh the residue to a tenth of a milligrams with an analytical balance after allowing to cool in a desiccator.

R1 : Residue for protein determination containing Soluble Dietary Fiber fraction
R2 : Residue for ash determination
R3 : Residue for protein determination containing Insoluble Dietary Fiber fraction
R4 : Residue for ash determination

7) Protein Determination

R1 and R3, which are residues for protein determination, are scraped with Diatomaceous Earth, and then nitrogen content in the residue is determined with Kjeldahl method. Multiplying the obtained nitrogen content by 6.25 gives protein contents P1 and P2, respectively.

8) Ash Determination

Conduct incineration treatment of the residues for ash determination (R2 and R4) with the glass filter crucible at $525 \pm 5^\circ\text{C}$ for 5 hours, allow to cool in a desiccator, weigh to the tenth of a milligram and obtain ash contents A1 and A2, respectively.

9) Blank Test

Perform the above-mentioned procedure without samples and obtain the blank values r1, r2, r3, r4, p1, p2, a1 and a2.

〈Calculation〉

Calculate Soluble Dietary Fiber, Insoluble Dietary Fiber, and Total Dietary Fiber Content are using the following formulas :

Soluble Dietary Fiber Content (g/100 g)

$$= \frac{(R1 + R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - Bs}{(W1 + W2)/2} \times 100$$

$$Bs(g) = (r1 + r2)/2 \times \{1 - (p1/r1 + a1/r2)\}$$

Insoluble Dietary Fiber Content (g/100 g)

$$= \frac{(R3 + R4)/2 \times \{1 - (P2/R3 + A2/R4)\} - Bi}{(W1 + W2)/2} \times 100$$

$$Bi(g) = (r3 + r4)/2 \times \{1 - (p2/r3 + a2/r4)\}$$

In the case of dried samples, it is converted to Dietary Fiber Content before drying using the following formula :

$$\begin{aligned} &\text{Dietary Fiber Content before dried (g/100 g)} \\ &= \text{Soluble or Insoluble Dietary Fiber Content} \times \\ &\quad (1 - D/100) \\ &\quad D : \text{Loss on drying (\%)} \end{aligned}$$

In the case of defatted sample, it is converted to Dietary Fiber Content before defatting using the following formula :

$$\begin{aligned} &\text{Dietary Fiber Content before defatted (g/100 g)} \\ &= \text{Soluble or Insoluble Dietary Fiber Content} \times \\ &\quad (1 - F/100) \\ &\quad F : \text{Loss on defatting (\%)} \end{aligned}$$

Total Dietary Fiber Content (g/100 g)

$$= \text{Soluble Dietary Fiber Content} + \text{Insoluble Dietary Fiber Content}$$

(3) Determination of Low-molecular Soluble Dietary Fiber such as indigestible dextrin, polydextrose**[Materials required but not supplied]**

〈Reagents〉 Required reagents besides (1)

9. LabAssay™ Glucose (Wako Catalog No. 638-50971 (500 tests))

〈Appliance〉 Required appliances besides (1)

13. rotary evaporator

14. membrane-filter : 0.45 μm

15. high-performance liquid chromatography (HPLC) : degasifier, pump, differential refractive index detector, etc.

16. analytical column: gel filtration or ligand exchange column

17. ion-exchange column: one-to-one mixture of OH and H form resin, or equivalent product

[Assay Method]

〈Measurement setup〉

[Glass filter crucible] : Same as the above-mentioned (1)

[Sample preparation] : Same as the above-mentioned (1)

[Buffer] : Same as the above-mentioned (1)

〈Assay〉

1) Digestion by thermostable α-amylase :

Same as the above-mentioned (1)

2) Digestion by protease and amyloglucosidase :

Same as the above-mentioned (1)

3) Ethanol Precipitation :

Same as the above-mentioned (1)

4) Filtration and Wash

Conduct a suction filtration of Ethanol Precipitation solution using a glass filter crucible, which has a homogeneous Diatomaceous Earth layer by washing with 78% Ethanol just before use, to obtain residue and filtrate. Under suction, rinse the residue in the tall beaker with 78% Ethanol (20 mL×3 times), 95% Ethanol (10 mL×2 times), and acetone (10 mL×2 times), and add the washings successively to the residue in the glass filter crucible. Combine the washings until 95% Ethanol and the filtrate. The filtrate is concentrated and ethanol in the filtrate is removed with a rotary evaporator to adjust the volume of the solution to 100 mL. The solution is the fraction of Low-molecular Soluble Dietary Fiber.

5) Drying and Weighing : Same as the above-mentioned (1)

6) Protein Determination :

Same as the above-mentioned (1)

7) Ash determination : Same as the above-mentioned (1)

8) Blank Test : Same as the above-mentioned (1)

9) Removal of protein, organic acids and inorganic salts from the fraction of Low-molecular Soluble Dietary Fiber Elute 50 mL of the fraction of Low-molecular Soluble Dietary Fiber obtained in procedure 4) with 50 mL of ion exchange resin packed column (glass tube, I.D. 20 mm×300 mm) at SV1.0 (flow rate : 50 mL/hr). Elute with distilled water and obtain 200 mL of eluate.

10) High-Performance Liquid Chromatography

The eluate obtained in procedure 9) is concentrated with a rotary evaporator. The obtained solution is adjusted to an appropriate concentration with distilled water (ex. to Brix 5), filtered with a membrane-filter, which pore diameter is 0.45 μm and applied to HPLC.

11) Glucose Determination^{Note)}

Determine the glucose content in the eluate obtained in procedure 9) using LabAssay™ Glucose (Wako Catalog No. 638-50971 (500 tests)).

〈Calculation〉

Calculate the Low-molecular Soluble Dietary Fiber, Insoluble and soluble Macromolecular Dietary Fiber Content, and Total Dietary Fiber Content using the following formulas :

Low-molecular Soluble Dietary Fiber Content (g/100 g)

$$= \frac{\text{Peak area of Dietary Fiber}}{\text{Peak area of Glucose}} \times \text{Glucose content in eluent (g)} \times \frac{100}{(W1 + W2)/2} \dots (I)$$

Insoluble and Soluble Macromolecular Dietary Fiber Content (g/100 g)

$$= \frac{(R1 + R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - B}{(W1 + W2)/2} \times 100 \dots (II)$$

$$B(g) = (r1 + r2)/2 \times \{1 - (p1/r1 + a1/r2)\}$$

Total Dietary Fiber Content (g/100 g)

= Low-molecular Soluble Dietary Fiber Content
+ Insoluble and Soluble Macromolecular Dietary Fiber Content (III)

In case of dried samples, in formulas (I)-(III), they are converted to Dietary Fiber Content before drying using the following formula :

$$\text{Dietary Fiber Content in a sample before dried (g/100 g)} \\ = \text{Dietary Fiber Content} \times (1 - D/100)$$

D : Loss on drying (%)

In case of defatted samples, in formulas (I)-(III), they are converted to Dietary Fiber Content before defatting using the following formula :

$$\text{Dietary Fiber Content in a sample before defatted} \\ (\text{g/100 g}) = \text{Dietary Fiber Content} \times (1 - F/100)$$

F : Loss on Defatting (%)

Note : In another approach, a known weight of internal standard substance can be added to the eluate obtained in procedure 9), and the Dietary Fiber Content can be calculated from the correlation between the peak area of the eluate and that of the internal standard substance on the chromatogram. Use a substance other than glycerin as an internal standard substance, because glycerin is contained in the enzyme reagent.

[Acknowledge]

This kit shows measured values of the same degree as the conventional Prosky's method in various foods. Please note the measured value may be low in foods which resistant starch is added.

[Storage Condition]

Keep at 2 ~ 10°C in a dark place.

[Package Size]

100 tests

[Measurement Outline]

1. Sample dissolved in MES/Tris buffer
↓
2. Digestion with thermostable α -amylase
↓
3. Digestion protease and amyloglucosidase
↓ for 30 min. at pH 6.3 and 60°C
4. Ethanol Precipitation
↓ Leave 1 hour.
5. Filtration
↓

6. Wash with ethanol and acetone
↓

7. Dry overnight
↓

8. Kjeldahl Protein Determination and Ash Determination
↓

9. Total Dietary Fiber Determination

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : + 81-6-6203-3741
Facsimile : + 81-6-6201-5964
<http://www.wako-chem.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation

1600 Bellwood Road
Richmond, VA 23237
U.S.A.
Telephone : + 1-804-271-7677
Facsimile : + 1-804-271-7791
<http://www.wakousa.com>

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH

Fuggerstrasse 12
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-3111-100
<http://www.wako-chemicals.de>

Code No. 291-59701 (100回用)

食物繊維測定キット Dietary Fiber Assay Kit

【はじめに】

本品は、プロスキー法における酵素処理部分を簡略化した改良法で使用する酵素試薬のセットです。従来よりも簡単な操作で食物繊維を測定できます。

【内 容】

- | | |
|--------------------------|------|
| 1. 熱安定 α -アミラーゼ溶液 | 20mL |
| 2. プロテアーゼ溶液 | 20mL |
| 3. アミログルコシダーゼ溶液 | 20mL |
| 4. 酸洗浄けいそう土 | 100g |

【特 長】

プロスキー法における酵素処理部分を簡略化しているため、操作が簡単で操作性に優れている。

【原 理】

(1) 食物繊維の総量測定

試料中の消化性成分（澱粉およびたん白質）を熱安定 α -アミラーゼ溶液、プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液により分解させた後、4倍量の95%エタノールを加えて未分解で残存する高分子を沈殿させ、酸洗浄けいそう土を含むろ過型ガラスフィルターを用いて捕集する。捕集した沈殿残渣の乾燥重量から含有するたん白質および灰分の重量を差し引いて、総食物繊維量を求める。

(2) 水溶性食物繊維量と不溶性食物繊維量の分別測定

試料中の消化性成分（澱粉およびたん白質）を熱安定 α -アミラーゼ溶液、プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液により分解させた後、4倍量の95%エタノールを含むろ過型ガラスフィルターを用いてろ過する。ろ過型ガラスフィルター上に捕集された不溶性残渣の乾燥重量から含有するたん白質および灰分の重量を差し引いて、不溶性食物繊維量を求める。

一方、ろ液に4倍量の95%エタノールを加えて未分解で残存する水溶性高分子を沈殿させ、酸洗浄けいそう土を含むろ過型ガラスフィルターを用いて捕集する。捕集した沈殿残渣の乾燥重量から含有するたん白質および灰分の重量を差し引いて、水溶性食物繊維量を求める。

また、不溶性食物繊維量と水溶性食物繊維量を合計したものを総食物繊維量とする。

(3) 低分子水溶性食物繊維の測定

4倍量の95%エタノール添加で沈殿しない特定の低分子水溶性食物繊維については高速液体クロマトグラフで測定する。

試料中の消化性成分（澱粉およびたん白質）を熱安定 α -アミラーゼ溶液、プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液により分解させた後、4倍量の95%エタノールを加えて未分解で残存する高分子を沈殿させ、酸洗浄けいそう土を含むろ過型ガラスフィルターを用いてろ過する。

ろ液についてイオン交換樹脂を用いて含有するたん白質、有

機酸および無機塩を除去した後、高速液体クロマトグラフに供し、クロマトグラム上における特定のピーク面積をグルコース（内部標準物質）のピーク面積と比率計算することにより低分子水溶性食物繊維量を求める。

一方、ろ過型ガラスフィルター上に捕集された沈殿残渣の乾燥重量から含有するたん白質および灰分の重量を差し引いて、不溶性および高分子水溶性食物繊維量を求める。

また、低分子水溶性食物繊維量と不溶性および高分子水溶性食物繊維量を合計したものを総食物繊維量とする。

【操 作 法】

(1) 食物繊維の総量を測定する場合

〔キット以外に必要なもの〕

〈試 薬〉

- MES：同仁（和光コード No. 341-01622, 25g）
- TRIS：試薬特級（和光コード No. 203-06272, 25g）
- 塩化ナトリウム：試薬特級（和光コード No. 191-01665, 500g）
- 塩化カルシウム（2水塩）：試薬特級（和光コード No. 031-25031, 100g）
- 95%（v/v）エタノール：試薬特級（和光コード No. 051-00476, 500mL）
- 78%（v/v）エタノール：95%（v/v）エタノールと水を容量比4：1で混合する。
- アセトン：試薬特級（和光コード No. 016-00346, 500mL）
- ケルダール分析用試薬：濃硫酸、過酸化水素、分解促進剤、水酸化ナトリウム、ホウ酸、指示薬、および硫酸標準溶液など

〈器 具〉

- トルビーカー：500mL 容
- 化学天秤：0.1mg まで秤量可能なもの。
- 沸騰浴
- 恒温水槽：60℃に維持しつつ、500mL 容トルビーカーを連続振盪可能なもの。
- ろ過型ガラスフィルター：グーチ型2G（細孔径40～50 μ m）、フィルター直径約4cmのもの（2G2）がよい。購入後よく洗浄し、525℃ \pm 5℃で1時間加熱しておく。
- ろ過装置：吸引ポンプおよび吸引瓶（あるいは多連式吸引装置）など。
- アダプター：ろ過型ガラスフィルターを吸引瓶などに装着するためのもの。
- 電気炉：525 \pm 5℃に調節可能なもの。
- 乾燥器：105℃ \pm 5℃および130 \pm 5℃に調節可能なもの。
- デシケーター：乾燥剤としてシリカゲルを入れておく。
- pHメーター
- ケルダール分析装置：分解瓶、分解用加熱装置、アンモニア蒸留装置および滴定装置など。

〔使用方法〕

〈測定準備〉

〔ろ過型ガラスフィルター〕

使用前に酸洗浄けいそう土1.0gを入れ、けいそう土の微粒子の漏れが認められなくなるまで水、78%エタノール、95%エタノールで順次あまりかき乱さずに洗浄し、均一なけいそう土層を形成させる。次いで、130℃で1時間加熱後、デシ

ケーター中で放冷する。恒量を 0.1mg まで求め、使用するまでデシケーター中で保管する。

[試料]

穀類、豆類、種実類などの水分が少ない食品は、そのまま均一に粉碎し 0.50mm 目 (30 メッシュ) の篩を通して調製する。ただし、大豆や種実類などで脂質が 5% 以上含まれる場合は予め脱脂処理を行う。

いも類、野菜、キノコ類などの水分が多い食品は、ホモジナイザーで処理した後、凍結乾燥 (あるいは 70℃ で一晚乾燥) してからさらに均一に粉碎し 0.50mm 目 (30 メッシュ) の篩を通して調製する。ただし、果物などの糖分の多い食品は、乾燥しにくいいため、ホモジナイザーで処理した後、そのまま 4.75mm 目 (4 メッシュ) の篩を通して調製する。また、酸度が高く pH に影響を与える場合などは、酵素処理時において pH 調整を行う。

なお、乾燥および脱脂による減量割合を求めておく。

[緩衝液]

50mmol/L MES-TRIS 緩衝液 (10mmol/L Na, 3mmol/L Ca 含) (pH6.3, 24℃) の調製: MES 9.76g (最終 50mmol/L)、塩化ナトリウム 0.584g (最終 10mmol/L) および塩化カルシウム (2 水塩) 0.441g (最終 3mmol/L) を 1L ビーカーに量り採り、純水を加えて溶解し全量を 1L とする。一方、TRIS 6.055g (最終 50mmol/L)、塩化ナトリウム 0.584g (最終 10mmol/L) および塩化カルシウム (2 水塩) 0.441g (最終 3mmol/L) を 1L ビーカーに量り採り、純水を加えて溶解し全量を 1L とする。これら 50mmol/L MES 溶液および 50mmol/L TRIS 溶液を混ぜ合わせ pH6.3 (24℃) に調整する。[MES 溶液: TRIS 溶液 = 約 64:36 の混合]

<測定>

1) 熱安定 α-アミラーゼ溶液による消化

試料 1g を 0.1mg まで精密に量る。1 回の分析について試料は 2 点 (W1, W2) を秤取する。両者の差は 20mg 以内とする。1 点は未消化タンパク質量の測定用に、もう 1 点は灰分量の測定用に用いる。試料を 50mmol/L MES-TRIS 緩衝液 (pH6.3, 24℃) 40mL を含む 500mL トールビーカー中に加えて分散させる。pH が 6.3 ± 0.1 (24℃) であることを確認する。さらに、熱安定 α-アミラーゼ溶液試薬を 0.2mL 加え、トールビーカー上部をアルミホイルで覆う。その後、沸騰浴中にて 5 分毎に振り混ぜながら 30 分間反応させる。

2) プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液による消化

トールビーカーの壁面を洗いこみながら水 10mL を加え、60℃ に冷却後、プロテアーゼ溶液 0.2mL およびアミログルコシダーゼ溶液 0.2mL を同時に加える。そして、60℃ の恒温水槽中にて連続的に振盪させながら 30 分間反応させる。

3) エタノール沈殿

得られた酵素処理液に 4 倍量の 95% エタノール (予め 60℃ に加温しておく) を加え、室温で 1 時間静置して酵素未消化高分子を沈殿させる。

4) ろ過・洗浄

ろつぼ型ガラスフィルター (使用直前に 78% エタノール

を用いて均一なけいそう土層にしておく) を用いてエタノール沈殿液を吸引ろ過し残渣を得る。引き続き吸引しつつ、78% エタノール (20mL × 3 回)、95% エタノール (10mL × 2 回) およびアセトン (10mL × 2 回) を用いてトールビーカー中の残留物を洗い込みながら、ろつぼ型ガラスフィルター中の残渣上に順次加える。

5) 乾燥・秤量

残渣をろつぼ型ガラスフィルターごと 105℃ ± 3℃ で一夜乾燥し、デシケーター中で放冷した後に 0.1mg まで秤量する。ここで、タンパク質測定用残渣を R1、灰分測定用残渣を R2 とする。

6) タンパク質定量

タンパク質測定用残渣の全量をけいそう土とともにかけ取り、ケルダール法にて残渣中の窒素含量を測定する。得られた窒素含量に係数 6.25 を乗じてタンパク質量 P1 とする。

7) 灰分定量

灰分測定用残渣をろつぼ型ガラスフィルターごと 525℃ ± 5℃ で 5 時間灰化処理し、デシケーター中で放冷した後に 0.1mg まで秤量し、灰分量 A1 を求める。

8) 空試験

別途、試料を含まない系で、上記と同様に操作し、試薬ブランク r1、r2、p1、および a1 を得る。

<計算>

以下の式により総食物繊維の含量を算出する。

$$\text{総食物繊維含量 (g/100g)} = \frac{(R1+R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - B}{(W1+W2)/2} \times 100$$

ただし、ここで B(g) = (r1+r2)/2 × {1 - (p1/r1+a1/r2)}

また、乾燥処理をした試料については、以下の式により乾燥前試料に換算する。

$$\text{乾燥前試料中の食物繊維含量 (g/100g)}$$

$$= \text{総食物繊維含量} \times (1 - D/100)$$

ただし、ここで D は乾燥減量 (%)

また、脱脂処理をした試料については、以下の式により脱脂前試料に換算する。

$$\text{脱脂前試料中の食物繊維含量 (g/100g)}$$

$$= \text{総食物繊維含量} \times (1 - F/100)$$

ただし、ここで F は脱脂減量 (%)

(2) 水溶性食物繊維量と不溶性食物繊維量を分別測定する場合

[キット以外に必要なもの]

<試薬> (1) に同じ

<器具> (1) に同じ

[使用方法]

<測定準備>

[ろつぼ型ガラスフィルター] (1) に同じ

[試料] (1) に同じ

[緩衝液] (1) に同じ

<測定>

1) 熱安定 α-アミラーゼ溶液による消化

(1) に同じ

- 2) プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液による消化
(1)に同じ
- 3) ろ過（水溶性画分と不溶性画分の分別）
得られた酵素処理液をろつぼ型ガラスフィルター（使用直前に78%エタノールを用いて均一な酸洗浄けいそう土層にしておく）を用いて吸引ろ過し、残渣およびろ液に分ける。さらにトールビーカー中の残留物を水約10mLで洗い込みながら、ろつぼ型ガラスフィルター中の残渣上に加える。洗液はろ液に合わせる。ろ液が水溶性食物繊維を含む画分となり、残渣が不溶性食物繊維を含む画分となる。
- 4) 水溶性食物繊維を含む画分のエタノール沈殿・ろ過・洗浄
3)で得られたろ液に4倍量の95%エタノール（予め60℃に加熱しておく）を加え、室温で1時間静置して酵素未消化高分子を沈殿させる。ろつぼ型ガラスフィルター（使用直前に78%エタノールを用いて均一な酸洗浄けいそう土層にしておく）を用いてエタノール沈殿液を吸引ろ過し残渣を得る。引き続き吸引しつつ、78%エタノール（20mL×3回）、95%エタノール（10mL×2回）、およびアセトン（10mL×2回）をろつぼ型ガラスフィルター中の残渣上に順次加える。
- 5) 不溶性食物繊維を含む画分のろ過・洗浄
95%エタノール（10mL×2回）およびアセトン（10mL×2回）を用い、3)で得られたろつぼ型ガラスフィルター中の残渣上に吸引しつつ順次加える。
- 6) 乾燥・秤量
残渣をろつぼ型ガラスフィルターごと105℃±3℃で一晩乾燥し、デシケーター中で放冷した後に0.1mgまで秤量する。ここで、水溶性食物繊維を含む画分のタンパク質測定用残渣をR1、灰分測定用残渣をR2とし、不溶性食物繊維を含む画分のタンパク質測定用残渣をR3、灰分測定用残渣をR4とする。
- 7) タンパク質量
タンパク質測定用残渣R1およびR3の全量をけいそう土とともにかけ取り、ケルダール法にて残渣中の窒素含量を測定する。得られた窒素含量に係数6.25を乗じてそれぞれタンパク質量P1およびP2とする。
- 8) 灰分定量
灰分測定用残渣R2およびR4をろつぼ型ガラスフィルターごと525℃±5℃で5時間灰化処理し、デシケーター中で放冷した後に0.1mgまで秤量し、それぞれ灰分量A1およびA2を求める。
- 9) 空試験
別途、試料を含まない系で、上記と同様に操作し、試薬ブランクr1、r2、r3、r4、p1、p2、a1、およびa2を得る。

〈計算〉

以下の式により水溶性食物繊維、不溶性食物繊維、および総食物繊維の含量を算出する。

$$\text{水溶性食物繊維含量 (g/100g)} = \frac{(R1+R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - Bs}{(W1+W2)/2} \times 100$$

ただし、ここでBs(g) = (r1+r2)/2 × {1 - (p1/r1 + a1/r2)}

$$\text{不溶性食物繊維含量 (g/100g)} = \frac{(R3+R4)/2 \times \{1 - (P2/R3 + A2/R4)\} - Bi}{(W1+W2)/2} \times 100$$

ただし、ここでBi(g) = ((r3+r4)/2 × {1 - (p2/r3 + a2/r4)})

また、乾燥処理をした試料については、以下の式により乾燥前試料に換算する。

$$\begin{aligned} \text{乾燥前試料中の食物繊維含量 (g/100g)} \\ = \text{水} \cdot \text{不溶性食物繊維含量} \times (1 - D/100) \end{aligned}$$

ただし、ここでDは乾燥減量(%)

また、脱脂処理をした試料については、以下の式により脱脂前試料に換算する。

$$\begin{aligned} \text{脱脂前試料中の食物繊維含量 (g/100g)} \\ = \text{水} \cdot \text{不溶性食物繊維含量} \times (1 - F/100) \end{aligned}$$

ただし、ここでFは脱脂減量(%)

$$\begin{aligned} \text{総食物繊維含量 (g/100g)} \\ = \text{水溶性食物繊維含量} + \text{不溶性食物繊維含量} \end{aligned}$$

(3) 低分子水溶性食物繊維（難消化性デキストリン、ポリデキストロースなど）が用いられている場合

〔キット以外に必要なもの〕

〈試薬〉(1)に加えて以下のもの。

9. ラボアッセイTM グルコース
(和光コード No. 638-50971, 500 回用)

〈器具〉(1)に加えて以下のもの。

13. ロータリーエバポレーター
14. メンブレンフィルター：0.45 μm
15. 高速液体クロマトグラフィー：脱気装置、ポンプ、および示差屈折率検出器など。
16. 分析カラム：ゲルろ過系、または配位子交換系
17. イオン交換カラム：OH型およびH型の2つの樹脂を1:1に混合したもの、または相当品。

〔使用方法〕

〈測定準備〉

〔ろつぼ型ガラスフィルター〕(1)に同じ

〔試料〕(1)に同じ

〔緩衝液〕(1)に同じ

〈測定〉

- 1) 熱安定α-アミラーゼ溶液による消化
(1)に同じ
- 2) プロテアーゼ溶液およびアミログルコシダーゼ溶液による消化
(1)に同じ
- 3) エタノール沈殿
(1)に同じ
- 4) ろ過・洗浄

ろつぼ型ガラスフィルター（使用直前に78%エタノールを用いて均一な酸洗浄けいそう土層にしておく）を用いてエタノール沈殿液を吸引ろ過し、残渣およびろ液を得る。引き続き吸引しつつ、78%エタノール（20mL×3回）、95%エタノール（10mL×2回）、およびアセトン（10mL×2回）を用いてトールビーカー中の残留物を洗い込みながら、ろつぼ型ガラスフィルター中の残渣上に

順次加える。95%エタノール洗浄までの洗液をろ液に合わせる。ろ液はロータリーエバポレーターで濃縮し、エタノールを除去して100mLに定容し、低分子水溶性食物繊維を含む画分とする。

- 5) 乾燥・秤量
(1) に同じ
- 6) タンパク質定量
(1) に同じ
- 7) 灰分定量
(1) に同じ
- 8) 空試験
(1) に同じ
- 9) 低分子水溶性食物繊維を含む画分のタンパク質、有機酸、無機塩類の除去
イオン交換樹脂 50mL を充填したカラム (ガラス管、φ 20mm × 300mm) に SV1.0 (通液速度 50mL/hr) で 4) で得られた低分子水溶性食物繊維を含む画分 50mL を通液する。さらに蒸留水で押し出し溶出液 200mL とする。
- 10) 高速液体クロマトグラフィー
9) で得られた溶出液をロータリーエバポレーターを用いて濃縮し、蒸留水で適当な濃度 (例えば Brix 5 程度) に調整して孔径 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、高速液体クロマトグラフィーに供する。
- 11) グルコース含量測定^{注1)}
9) で得られた溶出液中のグルコース含量を、ラボアッセイTM グルコースを用いて測定する。

〈計算〉

以下の式により低分子水溶性食物繊維、不溶性および水溶性高分子食物繊維含量、および総食物繊維の含量を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{低分子水溶性食物繊維含量 (g/100g)} \\ &= \frac{\text{食物繊維のピーク面積}}{\text{グルコースのピーク面積}} \times \text{溶出液中のグルコース含量 (g)} \\ & \times \frac{100}{(W1 + W2)/2} \dots (I) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{不溶性および水溶性高分子食物繊維含量 (g/100g)} \\ &= \frac{(R1 + R2)/2 \times \{1 - (P1/R1 + A1/R2)\} - B}{(W1 + W2)/2} \times 100 \dots (II) \end{aligned}$$

ただし、ここで B(g) = (r1 + r2)/2 × {1 - (p1/r1 + a1/r2)}

$$\begin{aligned} & \text{総食物繊維含量 (g/100g)} \\ &= \text{低分子水溶性食物繊維含量} + \text{不溶性および水溶性高分子食物繊維含量} \dots (III) \end{aligned}$$

また、乾燥処理をした試料については、(I) ~ (III) において以下の式により乾燥前試料に換算する。

$$\begin{aligned} & \text{乾燥前試料中の食物繊維含量 (g/100g)} \\ &= \text{食物繊維含量} \times (1 - D/100) \end{aligned}$$

ただし、ここで D は乾燥減量 (%)

また、脱脂処理をした試料については、(I) ~ (III) において以下の式により脱脂前試料に換算する。

$$\begin{aligned} & \text{脱脂前試料中の食物繊維含量 (g/100g)} \\ &= \text{食物繊維含量} \times (1 - F/100) \end{aligned}$$

ただし、ここで F は脱脂減量 (%)

注1) グルコース含量を測定する以外に、9) で得られた溶出液に適当な既知重量の内標準物質を添加しておきクロマトグラム上のピーク面積との相関関係から食物繊維含量を算出する方法もある。ただし、酵素試薬中にグリセリンを含むため、内標準物質にはグリセリン以外のものを使用する。

【注意事項】

本キットは従来のプロスキー法と同程度の測定値が出ることをさまざまな食品で確認しております。しかし例外としてレジスタントスターチを添加した食品においては測定値が低めに出る可能性がございます。

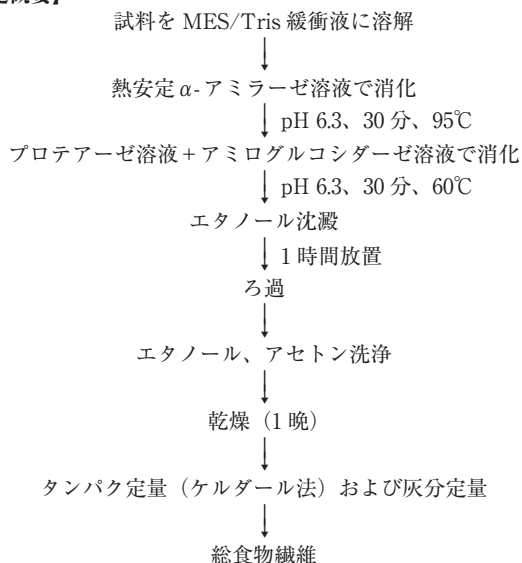
【貯 法】

2 ~ 10℃・遮光保存

【包 装】

100 回用

【測定概要】



製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社

大阪府中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741