

KIT "TOTAL DIETARY FIBER"

Cat N° 32

Composition du Kit **#032** - Fibres Totales (Méthode AOAC)

R1	1 x 10 mL α -Amylase
R2	1 x 20 mL Protéase
R3	2 x 20 mL Amyloglucosidase

BULLETIN TECHNIQUE

Deux méthodes sont proposées dans le bulletin technique suivant.

Méthode 1:**Détermination des fibres alimentaires totales, des fibres alimentaires solubles, et des fibres alimentaires insolubles**

Cette procédure de détermination des fibres alimentaires est basée sur la méthode AOAC n° 991.43 et la méthode AACC n°32-07.

Méthode 2:**Détermination des fibres alimentaires totales**

Cette procédure de détermination des fibres alimentaires totales est basée sur la méthode AOAC n° 985.29.

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lotStore at 2-8°C
Conserver à 2-8°C

v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

METHODE 1: DETERMINATION DES FIBRES ALIMENTAIRES TOTALES, SOLUBLES ET INSOLUBLES

Introduction

Cette procédure de détermination des fibres alimentaires est basée sur la méthode AOAC n° 991.43 et la méthode AACC n°32-07.

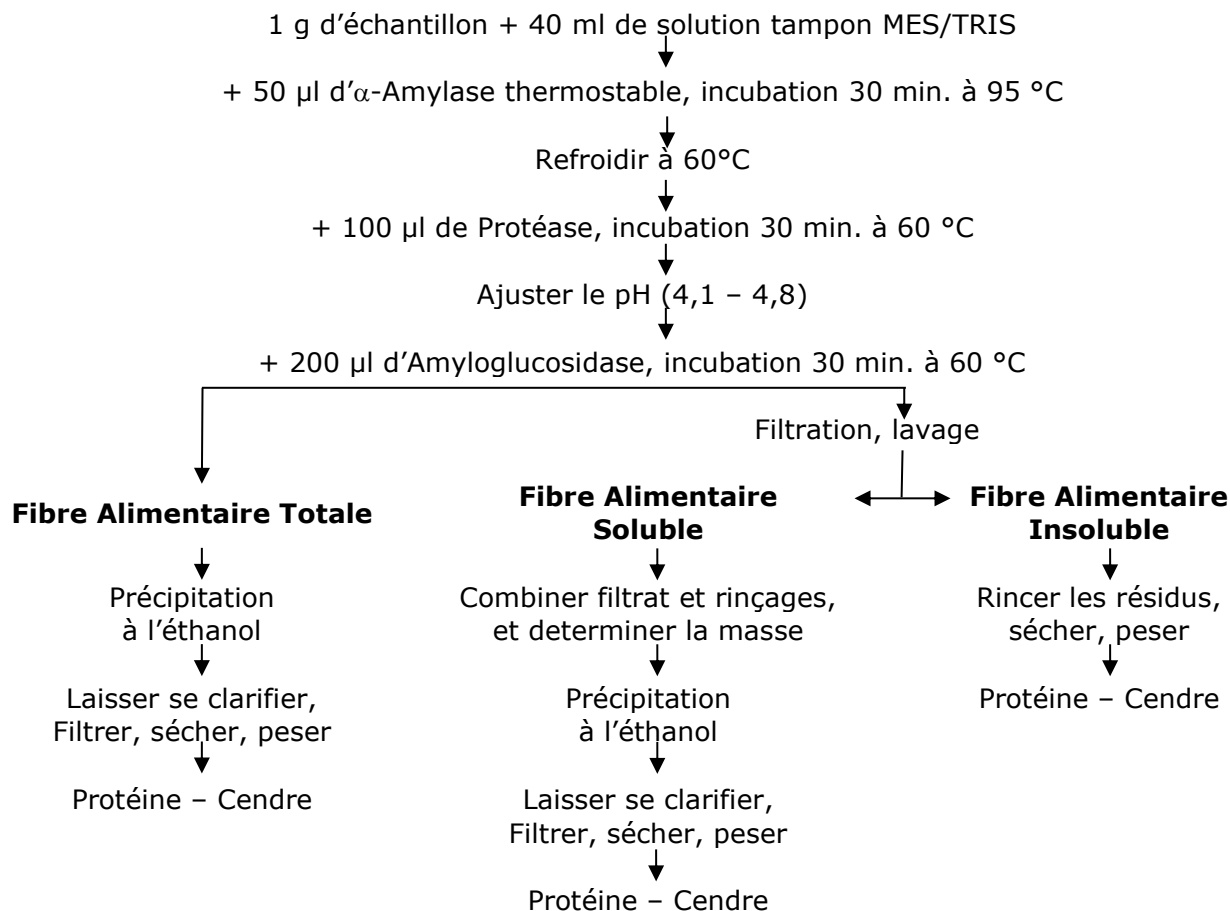
1 gramme d'échantillon alimentaire sec est soumis à une digestion enzymatique séquentielle par une α -amylase thermostable, une protéase et une amyloglucosidase.

Détermination des fibres alimentaires solubles et insolubles

Les fibres alimentaires insolubles (IDF) sont filtrées, et le résidu est alors lavé avec de l'eau chaude. La solution filtrée et les eaux de lavages sont combinées et précipitées avec 4 volumes d'éthanol à 95% afin de déterminer les fibres alimentaires solubles (SDF). Le précipité est ensuite filtré et séché. Pour calculer les teneurs en IDF et en SDF, les résidus issus des IDF et des SDF sont corrigés par rapport à leur contenu en protéine, leur teneur en cendre et un blanc.

Détermination des fibres alimentaires totales

Les SDF sont précipitées avec de l'éthanol, et le résidu est ensuite filtré, séché et pesé. La teneur en fibre alimentaire totale est corrigée en tenant compte des protéines et des cendres.



EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

Réactifs et Appareils

Réactifs fournis :

Kit "Total Dietary Fiber": Le kit contient :

1. α -Amylase, thermostable; 10 ml, solution prête à l'emploi.
2. Protéase; 20 ml, solution prête à l'emploi.
3. Amyloglucosidase; 2 x 20 ml, solution prête à l'emploi.

Réactifs requis mais non fournis;

1. Ethanol 95% v/v (95 ml d'éthanol absolu + 5 ml d'eau distillée)
2. Ethanol 78% v/v (78 ml d'éthanol absolu + 22 ml d'eau distillée)
3. Acétone
4. Solution tampon MES/TRIS – pH 8.2 à 24°C
Dissoudre 1,952 g de 2-(*N*-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) (Sigma, M 8250) et 1,42 g tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS) (Sigma, TI503) dans 0,17 L d'eau distillée. Ajuster le pH à 8,2 avec NaOH 6N. Ajuster le volume à 0,2 L avec de l'eau.
Il est important d'ajuster le pH du tampon à 8,3 à 20°C (ou 8,1 à 27-28°C). En effet le pH du tampon MES/TRIS change avec la température.
5. Acide Hydrochlorique, 0,561 N (Ajouter 93,5 ml de HCl 6N à 700 ml d'eau; compléter à 1 L)
6. Celite (disponible sur demande).

Appareils

1. Balance analytique avec une précision de 0,1 mg
2. Bêchers - 400 ml ou 600 ml
3. Creuset filtrant, porosité #2 (40-60 microns)
 - Laver les creusets. Les chauffer à 525°C toute une nuit, et laisser refroidir. Imbiber et rincer les creusets avec de l'eau et les laisser sécher à l'air
 - Ajouter 1 gramme de Celite dans chaque creuset et sécher à 130°C (1 heure ou plus). Laisser refroidir dans un dessiccateur et peser les creusets + Celite à 0,1 mg près
 - Enregistrer ce poids
 - Stocker dans le dessiccateur tant que les creusets ne sont pas utilisés
4. Source de vide ;
5. Flacon de filtration
6. Un four ventilé capable de fonctionner à 105 °C, ou un four sous vide réglé à 70 °C ;
7. Dessiccateur avec agent séchant ;
8. Four à moufle, réglable à 525°C ;
9. Bain d'eau bouillante, thermostatable à 60 °C avec un système d'agitation permettant d'agiter les flacons durant l'hydrolyse enzymatique ;
10. pH mètre – étalonné sur pH 4,0 et pH 7,0.

Préparation des échantillons

Si la teneur en lipide de l'échantillon est supérieure à 10%, éliminer les lipides avec de l'éther de pétrole. Enregistrer la perte de poids due à l'élimination des lipides, et faire la correction au calcul final. Avec des échantillons inconnus, éliminer les lipides de tous les échantillons.

Homogénéiser chaque échantillon si nécessaire, et sécher toute la nuit dans un four ventilé à 105°C (à 70°C pour un four sous vide). Laisser refroidir dans un dessiccateur et tamiser l'échantillon sec avec une maille de 0,3-0,5 millimètres. Si le matériel n'est pas disponible, broyer l'échantillon avec un mortier. Si l'échantillon ne peut pas être chauffé, lyophiliser l'échantillon avant de la tamiser. Stocker les échantillons secs dans un dessiccateur, tant que les analyses ne sont pas faites.

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

Procédure de détermination

A. Digestion enzymatique

Faire des blancs en même temps que les échantillons afin de mesurer l'influence des réactifs sur les résidus. Les blancs et les échantillons sont à faire en quatre fois, ainsi, pour une meilleure précision, deux mesures de protéine et deux mesures de cendre peuvent être réalisées.

1. Peser 1 gramme d'échantillon à analyser dans des béchers de 400 ml. Enregistrer ces pesées à 0,1 mg près.
2. Ajouter 40 ml de tampon MES/TRIS pH 8,2 dans chaque bécher. Homogénéiser.
3. Ajouter **0,050 ml d' α -Amylase** dans chaque bécher et mélanger.
Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau bouillante. Dès que la température des échantillons a atteint 95 °C, incuber 30 minutes sous agitation continue.
4. Laisser les solutions revenir à température ambiante.
5. Pipetter **0,100 ml de solution de Protease** dans chaque bécher.
Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau à 60°C. Dès que la température des échantillons a atteint 60°C, incuber 30 minutes sous agitation continue.
6. Ajuster le pH entre 4,0 et 4,7 en ajoutant 5 ml de HCl 0,561 N dans chaque bécher. Vérifier le pH et ajuster si nécessaire avec NaOH 5% ou HCl 5%.
7. Ajouter **0,200 ml d' Amyloglucosidase** dans chaque bécher.
Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau à 60°C. Dès que la température des échantillons a atteint 60°C, incuber 30 minutes sous agitation continue.

B. Détermination des fibres alimentaires solubles et insoluble

8. Préparer les creusets :
Tarer sur les creusets contenant la Celite. Ajouter environ 3 ml d'eau pour mouiller et arranger le lit de Celite dans les creusets. Appliquer une aspiration douce pour permettre à la Celite de se remettre en place.
9. Après la digestion enzymatique (étape 7), filtrer le liquide dans le flacon de filtration au travers les creusets.
10. Laver le résidu avec 2 × 10 ml d'eau préchauffée à 70°C. Utiliser l'eau pour rincer le bécher avant de laver le résidu dans les creusets. Garder le filtrat et les eaux de lavage pour la détermination des SDF. Transférer les solutions dans un bécher de 600 ml (voir étape 11 pour la procédure SDF)

a) Détermination des Fibres Alimentaires Insolubles

11. Laver le résidu avec 2 × 10 ml d'éthanol 95% et 2 × 10 ml d'acétone.
12. Sécher les creusets contenant les résidus toute la nuit à 105°C.
13. Laisser refroidir 1 heure les creusets dans un dessiccateur.
Peser les creusets contenant les résidus de fibres alimentaires et la Celite. Pour obtenir la masse du résidu, soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)
14. Détermination de la teneur en protéine et en cendre :

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

Un creuset de chacun des types de fibres est utilisé pour analyser les protéines, le second creuset pour l'analyse des cendres.

- Utiliser la méthode Kjeldahl pour mesurer les protéines. Pour toutes les mesures, appliquer le facteur 6,25 pour calculer une teneur de protéine en gramme.
- Pour l'analyse des cendres, incinérer le second creuset à 525°C pendant 5 heures. Laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 1 heure et peser. Pour obtenir la quantité de cendre, il faut soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)

b) Détermination des Fibres Alimentaires Solubles

Après avoir suivi les étapes 1 à 10 de la méthode :

11. Peser la solution filtrée et les eaux de lavage dans un bécher pré-taré. (étape 10)
12. Précipitation des Fibres Alimentaires Solubles (SDF) :
 - Ajouter 4 volumes d'éthanol 95% chauffé à 60°C. Utiliser une partie de l'éthanol pour rincer le flacon de filtration utilisé dans l'étape 10 de la procédure.
 - Laisser se former le précipité à température ambiante pendant 60 minutes.
13. Dispositif de filtration :
 - Tarer les creusets contenant la Celite
 - Mouiller et redistribuer le lit de Celite dans chaque creuset avec 15 ml d'éthanol à 78%.
 - Appliquer une aspiration douce pour permettre à la Celite de se remettre en place sur le fritté.
14. Filtration :
 - Filtrer les SDF précipitées à l'éthanol (étape 12) au travers des creusets
 - Utiliser une bouteille de lavage avec EtOH 78% et une spatule de caoutchouc, afin de transvaser quantitativement tous les particules restantes dans les creusets
15. Lavage : Sous vide, laver les résidus avec 2 × 15 ml de, successivement et dans l'ordre : éthanol 78%, éthanol 95% et acétone.
16. Sécher les creusets contenant les résidus toute la nuit à 105°C
17. Laisser refroidir 1 heure les creusets dans un dessiccateur.
Peser les creusets contenant les résidus de fibres alimentaires et la Celite. Pour obtenir la masse du résidu, il faut soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)
18. Détermination de la teneur en protéine et en cendre :
Un creuset de chacun des types de fibres est utilisé pour analyser les protéines, le second creuset pour l'analyse des cendres.
 - Utiliser la méthode Kjeldahl pour mesurer les protéines. Pour toutes les mesures, appliquer le facteur 6,25 pour calculer une teneur de protéine en gramme.
 - Pour l'analyse des cendres, incinérer le second creuset à 525°C pendant 5 heures. Laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 1 heure et peser. Pour obtenir la quantité de cendre, soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)

C. Détermination des fibres alimentaires totales

Après la digestion enzymatique (étapes 1 à 7) :

8. Précipitation des fibres alimentaires avec de l'éthanol :
 - Ajouter à chaque échantillon 225 ml d'éthanol 95% préchauffé à 60°C. Vérifier le volume de l'éthanol chauffé et ajuster si nécessaire avant de le verser. Le rapport de volume doit être 4 vol. d'éthanol pour 1 vol. d'échantillon.
 - Couvrir les échantillons avec des feuilles d'aluminium.
 - Laisser le précipité se former à température ambiante pendant 60 minutes.

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

9. Dispositif de filtration :
- Tarer les creusets contenant la Celite
 - Mouiller et redistribuer le lit de Celite dans chaque creuset avec 15 ml d'éthanol à 78%.
 - Appliquer une aspiration douce pour permettre à la Celite de se remettre en place sur le fritté.
10. Filtration :
- Filtrer la solution précipitée à l'éthanol (étape 8) au travers des creusets
 - Utiliser une bouteille de lavage avec EtOH 78% et une spatule de caoutchouc, afin de transvaser quantitativement tous les particules restantes dans les creusets
11. Lavage : Sous vide, laver les résidus avec 2 × 15 ml de, successivement et dans l'ordre : éthanol 78%, éthanol 95% et acétone.
12. Sécher les creusets contenant les résidus toute la nuit à 105°C
13. Laisser refroidir 1 heure les creusets dans un dessiccateur.
Peser les creusets contenant les résidus de fibres alimentaires et la Celite. Pour obtenir la masse du résidu, il faut soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)
14. Détermination de la teneur en protéine et en cendre :
- Un creuset de chacun des types de fibres est utilisé pour analyser les protéines, le second creuset pour l'analyse des cendres.
- Utiliser la méthode Kjeldahl pour mesurer les protéines. Pour toutes les mesures, appliquer le facteur 6,25 pour calculer une teneur de protéine en gramme.
 - Pour l'analyse des cendres, incinérer le second creuset à 525°C pendant 5 heures. Laisser refroidir dans un dessiccateur pendant 1 heure et peser. Pour obtenir la quantité de cendre, il faut soustraire le poids de la tare (c'est-à-dire le poids des creusets secs et de la Celite)

D. Calculs

$\% \text{ de fibres alimentaires} = [((R_{\text{ECHANTILLON}} - P_{\text{ECHANTILLON}} - A_{\text{ECHANTILLON}}) - B) / S] \times 100$

Avec :

- R = Poids moyen des résidus
- P = Poids moyen des protéines
- A = Poids moyen des cendres
- S = Poids moyen des échantillons
- et B = Blanc:

$$B = R_{\text{BLANC}} - P_{\text{BLANC}} - A_{\text{BLANC}}$$

Références

1. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 75: 395-416 (1992).
2. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 71: 1017-1023 (1988).
3. J.Assoc.Off.Anal.Chem. 75: 360-367 (1992).

CELITE est une marque déposée de World Minerals, Inc.

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C  8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C



v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

Appareils

1. Creuset filtrant, porosité #2 (40-60 microns) ;
2. Source de vide ;
3. Un four ventilé capable de fonctionner à 105 °C, ou un four sous vide réglé à 70 °C ;
4. Dessiccateur ;
5. Four à moufle ;
6. Bain d'eau bouillante ;
7. Bain thermostaté réglable à 60 °C avec un système d'agitation permettant d'agiter les flacons durant l'hydrolyse enzymatique ;
8. Béchers - 400 ml ou 600 ml ;
9. Balance analytique avec une précision de 0,1 mg ;
10. pH mètre – étalonné sur pH 4,0 et pH 7,0.

Instructions

Creusets filtrants

Laver les creusets. Chauffer une heure à 525°C et refroidir. Imbiber et rincer les creusets avec de l'eau. Laisser sécher à l'air.

Ajouter 0,5 grammes de Celite dans chaque creuset et sécher à 130°C (une heure ou plus). Laisser refroidir dans un dessiccateur, et peser les creusets à 0,1 mg près.

Enregistrer cette pesée : « **Poids Celite + Creuset** » → **W1**

Stocker dans le dessiccateur tant que vous n'utilisez pas les creusets.

Réactifs

Utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour préparer les solutions.

1. Ethanol 78%

Mettre 207 ml d'eau dans un flacon de 1 litre. Compléter le volume avec de l'éthanol à 95%. Agiter et contrôler le volume.

2. Tampon Phosphate, 0,08 M, pH 6,0

Dissoudre 1,4 g de Na₂HPO₄ et 8,4 g de NaH₂PO₄ dans environ 700 ml d'eau. Compléter à 1 litre avec de l'eau. Vérifier le pH et ajuster si nécessaire avec soit NaOH ou H₃PO₄. Conserver dans un flacon fermé à température ambiante.

3. Solution d'Hydroxyde de Sodium, 0,275 N

Prendre 275 ml d'une solution de NaOH à 1,0 N et compléter à 1 litre avec de l'eau. Stocker dans un flacon fermé à température ambiante.

4. Solution d'Acide Hydrochlorique, 0,325 N

Prendre 275 ml d'une solution HCl à 1,0 N et compléter à 1 litre avec de l'eau. Stocker dans un flacon fermé à température ambiante.

Echantillons

Si la teneur en lipide de l'échantillon est supérieure à 10%, éliminer les lipides avec de l'éther de pétrole. Enregistrer la perte de poids due à l'élimination des lipides, et faire la correction au calcul final. Avec des échantillons inconnus, éliminer les lipides de tous les échantillons.

Homogénéiser chaque échantillon si nécessaire, et sécher toute la nuit dans un four ventilé à 105°C (à 70°C pour un four sous vide). Laisser refroidir dans un dessiccateur et tamiser l'échantillon sec avec une maille de 0,3-0,5 millimètres. Si le matériel n'est pas disponible, broyer l'échantillon avec un mortier. Si l'échantillon ne peut pas être chauffé, lyophiliser l'échantillon avant de la tamiser. Stocker les échantillons secs dans un dessiccateur, tant que les analyses ne sont pas faites.

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

Détermination

Faire des blancs en même temps que les échantillons afin de mesurer l'influence du résidu sur les réactifs. Les blancs et les échantillons sont à faire en quatre fois, ainsi, pour une meilleure précision, deux mesures de protéine et deux mesures de cendre peuvent être réalisées.

1. Peser quatre fois 1 gramme d'échantillon à analyser dans des béchers. Les pesées ne doivent pas être différentes de 20 mg. Enregistrer ces pesées à 0,1 mg près.
2. Ajouter 50 ml de tampon phosphate pH 6,0 dans chaque bécher. Homogénéiser.
3. Ajouter **0,050 ml d' α -Amylase** dans chaque bécher et mélanger.
4. Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau bouillante. Mélanger doucement les béchers à 5 minutes d'intervalle. Incuber 15 minutes dès que la température des échantillons a atteint 95 °C.
5. Laisser les solutions revenir à température ambiante.
6. Ajuster le pH à $7,5 \pm 0,2$ en ajoutant 10 ml de NaOH 0,275 N dans chaque bécher. Vérifier le pH et ajuster si nécessaire.
7. Pipetter **0,100 ml de solution de Protease** dans chaque bécher.
8. Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau à 60°C. Sous agitation continue, incuber 30 minutes dès que la température des échantillons a atteint 60°C.
9. Laisser les solutions revenir à température ambiante.
10. Ajuster le pH entre 4,0 et 4,6 en ajoutant 10 ml de HCl 0,325 N dans chaque bécher. Vérifier le pH et ajuster si nécessaire.
11. Ajouter **0,200 ml d' Amyloglucosidase** dans chaque bécher.
12. Couvrir chaque bécher avec du papier aluminium et les placer dans un bain d'eau à 60°C. Sous agitation continue, incuber 30 minutes dès que la température des échantillons a atteint 60°C.
13. Ajouter 280 ml d'éthanol à 95% dans chaque becher.
14. Laisser la solution à température ambiante pour permettre une précipitation complète (temps variable en fonction de la matrice).
15. Filtration:
Mouiller et redistribuer le lit de Celite dans chaque creuset avec de l'éthanol à 78%. Appliquer une aspiration douce pour permettre à la Celite de se remettre en place. Maintenir cette aspiration et transférer le précipité et la suspension de chaque bécher dans le creuset respectif.
Laver le résidu avec trois fractions de 20 ml d'éthanol 78%, deux fractions de 10 ml d'éthanol 95% et deux fractions de 10 ml d'acétone
Une sorte de gomme peut se former avec certains échantillons. Casser le film à la surface avec une spatule pour favoriser la filtration. Faire attention de bien rincer la spatule dans le creuset.
Le temps de filtration/lavage peut varier de quelques minutes à 6 heures par creuset, la moyenne étant de 30 minutes par creuset.
16. Sécher les creusets contenant les résidus toute la nuit à 105°C dans un four ventilé (ou à 70°C dans un four sous vide).

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C
8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C


v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

17. Refroidir tous les creusets dans un dessiccateur, et peser à 0,1 mg près.
Enregistrer cette pesée: "**Poids Résidus + Celite + Creuset**" → **W2**.
18. Pour deux échantillons et deux blancs, effectuer l'analyse des protéines par la méthode Kjeldahl d'analyse de l'azote, comme indiqué dans la procédure AOAC². Utiliser un facteur de 6,25 (conversion de l'ammoniac déterminé en protéine), sauf si la teneur en azote dans les protéines est connue.
19. Chauffer le résidu des creusets de deux échantillons et de deux blancs pendant 5 heures à 525°C.
Laisser refroidir dans un dessiccateur, peser à 0,1 mg près.
Enregistrer cette pesée: "**Poids Cendre + Celite + Creuset**" → **W3**.

Calculs

Poids des résidus = $W2 - W1$

Poids des cendres = $W3 - W1$

BLANC : $B = R_{\text{BLANK}} - P_{\text{BLANK}} - A_{\text{BLANK}}$

$\% \text{ TDF} = [(R_{\text{SAMPLE}} - P_{\text{SAMPLE}} - A_{\text{SAMPLE}}) - B] / SW] \times 100$
--

Avec : TDF = Fibre alimentaire totale

R = Moyenne des poids des résidus (mg)

P = Moyenne des poids des protéines (mg)

A = Moyenne des poids des cendre (mg)

SW = Moyenne des poids des échantillons (mg)

Référence

1. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume II, Section 45.4.07, Method 985.29 (1997).
2. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th Edition, Volume I, Section 12.1.07, Method 960.52 (1997).

CELITE est une marque déposée de World Minerals, Inc

EXP

use before
Date d'expiration

REF

catalogue number
N° dans le catalogue

LOT

Lot
N° de lot

2°C  8°C

Store at 2-8°C
Conserver à 2-8°C



v32-24111

Biosentec
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne