

Bestimmung des Gehaltes an Inulin und weiteren Ballaststoffen in (funktionellen) Fleischerzeugnissen

Determination of the content of inulin and other dietary fibres
in (functional) meat products

S. MÜNCH und G. EIGNER

Zusammenfassung

Funktionelle Lebensmittel haben eine beachtliche Bedeutung erlangt, auch entsprechende Ballaststoff-angereicherte Fleischerzeugnisse sind bereits am Markt zu finden. Die mittlerweile in Würsten eingesetzten löslichen und unlöslichen Ballaststoffe müssen natürlich analytisch erfasst werden können. Hierzu wurden die entsprechenden Methoden für die Matrix Fleisch adaptiert, die ursprünglich ausschließlich für pflanzliche Produkte entwickelt wurden. Insbesondere völlig unterschiedliche Gehalte an Fett, Protein und Ballaststoffen selbst führten zu deutlichen methodischen Korrekturen. Es wurde eine zuverlässige, kombinierte Methode sowohl zur quantitativen Bestimmung von Inulin als auch der weiteren Ballaststoffe in Fleischerzeugnissen in Anlehnung an die Methoden L 00.0094 bzw. L 00.0018 nach § 64 LFGB entwickelt, die ohne größeren apparativen Aufwand durchzuführen ist. Dazu wird Inulin vor der Bestimmung der weiteren Ballaststoffe extrahiert und nach enzymatischer Spaltung auch enzymatisch quantifiziert. Die weiteren Ballaststoffe werden gravimetrisch bestimmt. Mit dem verwendeten Enzymtestkit können neben Inulin auch gleichzeitig freie Glukose und Fruktose sowie Saccharose bestimmt werden.

Die vorgestellte Methode ist sowohl in Brüh-, in Koch- als auch in Rohwurst sehr gut anwendbar. Die jeweiligen gemittelten Wiederfindungen bei Ballaststoffgehalten bis zu 8 % liegen für Inulin als auch für die weiteren Ballaststoffe bei nahezu 100 %. Zudem waren nur geringe Abweichungen bei Mehrfachbestimmungen und Reproduzierbarkeit als auch eine hohe Empfindlichkeit festzustellen.

Summary

Functional foods have become quite important and particular meat products enriched with dietary fibres are already available on the market. Of course soluble and insoluble dietary fibres which are meanwhile used in sausage production have to be accessible to analytical investigations. For this, appropriate methods for meat matrix which were originally developed for plant products only, were adapted. Completely different contents in particular of fat, protein and dietary fibres led to significant methodic adaptations. A reliable combined method of quantitative determination of both inulin and other dietary fibres in meat products was developed according to methods L 00.0094 and L 00.0018 (§ 64 LFGB – German Food and Feed Code), respectively, which can be carried out with minimum equipment. For this purpose inulin is extracted prior to the determination of the other dietary fibres and quantified enzymatically after enzymatic cleavage. Further dietary fibres are determined gravimetrically. Besides inulin, the applied enzyme kit enables also the determination of free glucose and fructose as well as sucrose simultaneously.

The method presented is suitable to apply for scalded sausage, cooked sausage and raw sausage. The averaged recoveries for dietary fibre contents up to 8 % are almost 100 % for inulin and other dietary fibres. Besides, only small deviations were found for multiple determinations and reproducibility, as well as a high sensitivity.

Schlüsselwörter

Ballaststoffe – Inulin – (funktionelle) Fleischerzeugnisse

Key Words

dietary fibres – inulin – (functional) meat products

Einleitung

Funktionelle Lebensmittel (FL) haben in den Sektoren Süßwaren, Cerealien/Backwaren, Milchprodukte bzw. Getränke eine beachtliche Bedeutung erlangt. Der Sektor Fleisch- und Wurstwaren gilt dagegen im Hinblick auf FL in Europa als unterentwickelt, in Deutschland werden aber u. a. gute Möglichkeiten zum Einsatz von präbiotischen Wirkstoffen bei Fleischerzeugnissen gesehen (DANISCO 2004; FROST und SULLIVAN 2004; LANDER 2004). Mittlerweile sind auch zunehmend entsprechende Ballaststoff-angereicherte Würste am Markt zu finden. Dem Trend zu gesundheitsförderlichen Produkten bzw. Wellness-Erzeugnissen wird so Rechnung getragen.

Der Einsatz von Ballaststoffen in Fleischerzeugnissen kann verschiedene Gründe haben. Einerseits können sie als Fettersatz dienen, andererseits können die physiologischen Wirkungen im Vordergrund stehen, denn die zunehmende Verbreitung von Übergewicht und Fettsucht stellt ein enormes gesundheitliches Problem dar. Mehr als 20 % der Erwachsenen in Deutschland sind adipös (BMI > 30), Tendenz steigend. Adipositas ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Metabolisches Syndrom, Typ 2 Diabetes und bestimmte Krebserkrankungen (Kolonkarzinom). Mit dem Einsatz von Präbiotika (z. B. Inulin) bzw. unlöslichen Ballaststoffen (z. B. Weizenfasern) als Inhaltsstoffe mit gesundheitlichem Zusatznutzen in Fleischerzeugnissen sollen gezielt mit Adipositas zusammenhängende pathophysiologisch relevante Aspekte positiv beeinflusst werden. Durch die Verwendung von Inulin lassen sich beispielsweise deutlich kalorienreduzierte Fleischwaren ohne Beeinträchtigung des Genusswertes herstellen.

Unter Ballaststoffen versteht man für den Menschen selbst unverdauliche Substanzen. Grundsätzlich kann zwischen löslichen und unlöslichen Ballaststoffen unterschieden werden. Ein in Lebensmitteln häufig eingesetztes Beispiel für einen löslichen Ballaststoff ist Inulin. Dieses Fruktan ist ein Gemisch von linearen – geringfügig auch verzweigten – Polysacchariden mit

Kettenlängen bis zu 100 (vorwiegend 2 bis 60) β -2,1-glykosidisch verbundenen Fruktosemolekülen und meist einem endständigen Glukoserest (De LEENHEER *et al.* 1994). Inulin ist ein Reserveenergiespeicher vieler Pflanzen wie Zichorie, Topinambur oder Schwarzwurzel. Inulin kann im menschlichen Dünndarm nicht resorbiert werden, weil das abbauende Enzym Inulinase fehlt. Doch im Dickdarm kann es v. a. von erwünschten Darmbakterien (Bifidobakterien, Laktobazillen) u. a. zu kurzkettigen Fettsäuren und Milchsäure verstoffwechselt werden und übt so eine zusätzliche positive Wirkung aus (Präbiotikum). Zudem besitzt es eine Reihe weiterer gesundheitlich relevanter Eigenschaften wie positive Effekte auf den Lipid- und Glukosestoffwechsel (BEYLOT 2005, DELZENNE *et al.* 2005, FURRIE *et al.* 2005) oder Modulation des Immunsystems (WATZL *et al.* 2005b). Unlösliche Ballaststoffe werden generell im menschlichen Verdauungstrakt weder enzymatisch noch durch die Mikroflora fermentativ aufgeschlossen. Sie werden also unverändert wieder ausgeschieden. Durch ihre Fähigkeit, Wasser zu binden und zu quellen, regen sie die Verdauungstätigkeit an (Peristaltik) und besitzen so einen positiven Einfluss auf die (Darm)Gesundheit.

Die eingesetzten Ballaststoffe müssen auch im Fleischerzeugnis analytisch erfasst werden können. Hierzu mussten die Methoden zur Bestimmung von löslichen und unlöslichen Ballaststoffen in der Matrix Fleisch etabliert werden, die ursprünglich ausschließlich für pflanzliche Produkte entwickelt wurden. Entscheidende generelle Unterschiede – und damit Schwierigkeiten in der Methodenanpassung – zwischen der gewöhnlichen pflanzlichen Matrix zur Bestimmung von Ballaststoffen und der Matrix Fleisch bestehen u. a. in völlig unterschiedlichen Gehalten an Fett, Protein und Ballaststoffen selbst. Das wirkt sich nicht unerheblich auf die Methoden aus, da Fett beispielsweise die Enzymaktivität stören kann (bei der Bestimmung von Inulin). Auch bei der Analyse der weiteren Ballaststoffe muss das Fett quantitativ abgetrennt werden, weil es sonst am Schluss mit den Analyten ausgewogen würde und somit zu falsch höheren Werten führen würde. Auch Protein stört die Analytik zur

Bestimmung der weiteren Ballaststoffe. Zudem sind naturgegeben umso mehr Probleme zu erwarten, je geringer ein gravimetrisch bestimmender Anteil ist. Schwierigkeiten traten u.a. dann auf, wenn Inulin und weitere Ballaststoffe gleichzeitig in einer Probe enthalten waren. Denn Inulin kann beispielsweise nicht quantitativ mit 95%igem Ethanol ausgefällt werden, wodurch es mittels der gravimetrischen Methoden zur Bestimmung der Gesamtballaststoffe bzw. der löslichen Ballaststoffe nicht vollständig erfasst wird (QUEMENER *et al.* 1994).

Es existiert eine HPLC-Methode ausschließlich zur Bestimmung von Inulin in Fleischerzeugnissen über Quantifizierung der enzymatisch freigesetzten Fruktose mittels Detektion der Refraktion (VENDRELL-PASCUAS *et al.* 2000). Auch andere HPLC-Methoden mit Anionenaustauscher und PAD-Detektion (pulsed amperometric detection) zur Bestimmung von Inulin in Lebensmitteln wie Joghurt, Marmelade und Schokolade nach enzymatischer Spaltung wurden beschrieben (QUEMENER *et al.* 1994; AOAC 997.08), wobei letztere Variante den Autoren zufolge der Refraktion überlegen sei. Zudem existiert eine Methode zur Bestimmung von Inulin, die mit enzymatischer Spaltung, Reduzierung zu Zuckeralkoholen und photometrischer Bestimmung mittels PAHBAH (p-Hydroxybenzoesäurehydrazid) bei 410 nm arbeitet (AOAC 999.03). Außerdem wurde eine enzymatisch-photometrische Bestimmungsmethode für Inulin (sowie Glukose, Fruktose und Saccharose) in verschiedenen Lebensmitteln wie Milchprodukten, Leberwurst, Schokolade oder Getränken publiziert (STEEGMANS *et al.* 2004).

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, eine zuverlässige kombinierte Methode sowohl zur quantitativen Bestimmung von Inulin als auch der weiteren Ballaststoffe in Fleischerzeugnissen zu entwickeln. Diese Methode sollte zudem ohne größeren apparativen Aufwand durchzuführen sein. Diese Vorgaben wurden erreicht, indem Inulin vor der Bestimmung der weiteren Ballaststoffe extrahiert und nach enzymatischer Spaltung auch enzymatisch quantifiziert wurde. Die weiteren Ballaststoffe

wurden gravimetrisch bestimmt. Diese Methode wurde in Anlehnung an die Methoden L 00.0094 bzw. L 00.0018 nach § 64 LFGB und besonders für Fleischerzeugnisse entwickelt. Mit dem verwendeten Enzymtestkit können neben Inulin auch gleichzeitig freie Glukose und Fruktose sowie Saccharose bestimmt werden.

Material und Methoden

Standards und Reagentien

Inulin (Orafti, Mannheim)
Weizenfaser WF 200 (Rettenmaier, Rosenberg)

Alle Reagenzien hatten – wenn nicht anders angegeben – p.a.-Qualität.

Hexan (Merck, Darmstadt)

Isopropanol (Merck, Darmstadt)

Eisessig (Merck, Darmstadt)

Essigsäure-Lösung: 12 ml Eisessig auf 1 l auffüllen

Natriumacetat x 3 H₂O (Merck, Darmstadt)

Natriumacetatlösung: 27,5 g auf 1000 ml auffüllen

Acetatpuffer, pH 4,5: 280 ml Essigsäure-Lösung und 220 ml Natriumacetatlösung auf 1000 ml auffüllen

Inulinase aus *Aspergillus niger*,

Best.-Nr. 57620 (Sigma, Taufkirchen)

Inulinase-Lösung: 50 mg plus 675 µl bidest. H₂O

Kaliumhexacyanoferrat(II) x 3 H₂O (Merck, Darmstadt)

Carrez-I-Lösung: 150 g Kaliumhexacyanoferrat x 3 H₂O auf 1 l auffüllen

Zinksulfat x 7 H₂O (Merck, Darmstadt)

Carrez-II-Lösung: 300 g Zinksulfat x 7 H₂O auf 1 l auffüllen

Natriumhydroxid (Merck, Darmstadt)

Natriumhydroxid-Lösung (1 M): 40 g auf 1 l auffüllen

Enzym-Testkit „Saccharose/D-Glukose/D-Fruktose“ (r-biopharm, Darmstadt)

MES (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat) (Merck, Darmstadt)

TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) (Merck, Darmstadt)

MES-TRIS-Puffer (0,05 mol/l; pH 8,3):

19,52 g MES und 12,2 g TRIS werden in ca. 1,2 l Wasser gelöst, mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,3 eingestellt und anschließend auf 2 l aufgefüllt

α-Amylase-Lösung A 3306 (Sigma, Taufkirchen)

Protease aus *Bacillus licheniformis* P 3910 (Sigma, Taufkirchen), Proteaselösung (täglich frisch!): 50 mg in 1 ml MES-TRIS-Pufferlösung

Salzsäure 37 % (Merck, Darmstadt)
Salzsäurelösung: 93,5 ml Salzsäure (37%ig) werden mit Wasser auf 1 l aufgefüllt

Amyloglucosidase-Lösung aus *Aspergillus niger* A 9913 (Sigma, Taufkirchen)

Ethanol, vergällt (Merck, Darmstadt)

Celite, säuregewaschen (Sigma, Taufkirchen)

Aceton (Merck, Darmstadt)

Fleischerzeugnisse

Alle verwendeten Würste (Brüh-, Koch- und Rohwürste) wurden im Haus hergestellt. Die entsprechenden Rezepturen können bei Bedarf beim Autor erfragt werden.

Methoden

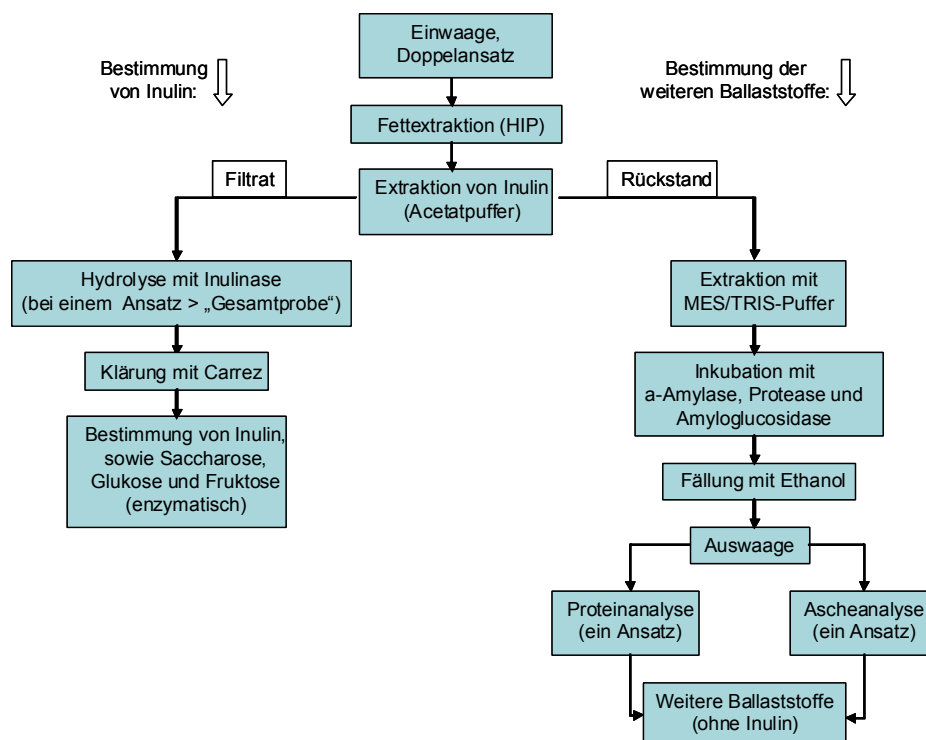


Abb. 1: Schema der Methode zur Bestimmung von Inulin und weiterer Ballaststoffe (außer Inulin) in Fleischerzeugnissen, in Abwandlung der Methoden L 00.0094 und L 00.0018 nach § 64 LFGB

Probenvorbereitung – sowohl zur Bestimmung von Inulin als auch der weiteren Ballaststoffe. Je ca. 10 g der im Grindomix GM 200 (Fa. Retsch, Haan) homogenisierten Probe werden doppelt auf zwei Stellen nach dem Komma genau übereinstimmend in zwei 150-ml-Bühlergläser (Fa. Bühler, Tübingen) eingewogen. Die Doppelbestimmung ist zwingend durchzuführen, weil zur Erfassung der weiteren Ballaststoffe je eine Analyse zur Bestimmung von Protein- bzw. Ascheanteilen benötigt wird, die bei der Ethanolbehandlung mit den weiteren Ballaststoffen ausgefällt werden. Auch bei der Bestimmung von Inulin sind zwei Ansätze notwendig, weil

nur bei einem Ansatz Inulinase zugegeben wird (Gesamtprobe), beim anderen dagegen nicht (Probe).

Zu den Proben in den Bühlergläsern werden je 40 ml Hexan/Isopropanol (3/2, v/v) gegeben und das Fett wird am Bühlergerät (Fa. Bühler, Tübingen) ca. 1 min bei ungefähr 3000 U/min extrahiert. Das Lösungsmittelgemisch wird über eine G3-Filternutsche mit Absaugvorrichtung (Vakuumpvorstoß, Absaugflasche) dekantiert. Der Vorgang wird zur erschöpfenden Extraktion noch zweimal wiederholt. Beim letzten Mal wird die Probe quantitativ in die Filternutsche überführt, einmal mit obi-

gem Lösungsmittelgemisch nachgewaschen und durch Vakuumanlegen trocken gesaugt. Die vereinigten Lösungsmittelgemische werden jeweils verworfen. Die trockene, fettfreie Probe (aus der Filternutsche) wird quantitativ in einen 100-ml-Schliffenmeyerkolben überführt und 50 ml Acetatpuffer (pH 4,5) zugegeben. Die Probe wird zur besseren Verteilung 15 min ins Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Fa. Bandelin, Berlin) gegeben. Das Inulin wird eine Stunde bei 80 °C im Schüttelwasserbad 1083 (Fa. GFL, Burgwedel) extrahiert. Nach kurzem Abkühlen wird die Probe über eine G3-Filternutsche mit Absaugvorrichtung (Vakuumvorstoß, Absaugflasche) in einen 300-ml-Erlenmeyerkolben unter leichtem Vakuum abfiltriert. Zur quantitativen Bestimmung wird die Probe mit weiteren ca. 50 ml Acetatpuffer unter mehrfachem Nachwaschen aus dem Schliffenmeyerkolben vollständig in die G3-Filternutsche überführt. Die gesammelten Filtrate werden dann zur Bestimmung von Inulin, der Rückstand zur Bestimmung der weiteren Ballaststoffe eingesetzt.

Bestimmung von Inulin. Zu einem der beiden Ansätze der Doppelbestimmung wird 100 µl Inulinaselösung in das Filtrat im 300-ml-Erlenmeyerkolben gegeben (Ge-

samtprobe). Der zweite Ansatz erhält keine Inulinaselösung (Probe). Beide Ansätze werden zwei Stunden unter Rühren mittels für Wasserbad geeignetem Vielfachmagnetrührer Telesystem Variomag RM (Fa. Thermo Electron, Oberhausen) bei 60 °C im Wasserbad – Edelstahlwanne mit Einhängethermostat Thermomix 1460 (Fa. Lauda, Lauda-Königshofen) – inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Jede Analyse erhält dann je 2 ml Carrez-I- und Carrez-II-Lösung und wird danach mit 1 M Natronlauge auf dem Vielfachmagnetrührer Variomag Multipoint 15 (Fa. Thermo Electron, Oberhausen) mittels pH-Meter Portamess (Fa. Knick, Berlin) neutralisiert. Die Ansätze werden jeweils in einen 200-ml-Messkolben übergespült, Wasser zur Marke aufgefüllt, gut vermischt und anschließend über einen Faltenfilter mit 150 mm Durchmesser (Fa. Macherey-Nagel, Düren) abfiltriert. Aus dem klaren Filtrat erfolgt die Zuckerbestimmung photometrisch (Glukose, Fruktose, Saccharose) über Enzymtestkit (r-biopharm, Darmstadt) mittels Spektralphotometer DU 7400 (Fa. Beckmann, Krefeld) bei 340 nm. Die Leerküvette wird dazu zuerst gegen Luft abgeglichen. Die Berechnung der genannten Saccharide bzw. von Inulin ist in Tabelle 1 beschrieben.

Tab. 1: Pipettierschema der enzymatischen Bestimmung von Inulin, sowie Saccharose, Glukose und Fruktose

Ansatz	1	2	3	4	5
analysiertes Saccharid	Saccharose-		D-Glukose- D-Fruktose-		
Probentyp	Blindwert	Probe	Blindwert	Probe	Gesamtprobe
Lösung 1 Probelösung *	0,200 ml -	0,200 ml 0,200 ml	- -	- 0,200 ml	- 0,200 ml *
mischen, ca. 15 min (20 °C) stehenlassen - Zugabe von					
Lösung 2 bidest. Wasser	1,000 ml 1,800 ml	1,000 ml 1,600 ml	1,000 ml 2,000 ml	1,000 ml 1,800 ml	1,000 ml 1,800 ml
mischen, nach ca. 3 min messen - E ₁ ; Zugabe von					
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
mischen, alle 2 min. messen bis Stillstand (ca.16 min) - E ₂					
Suspension 4	-	-	0,020 ml	0,020 ml	0,020 ml
mischen, alle 2 min. messen bis Stillstand (ca.16 min) - E ₃					

* Probelösung: in Ansatz 5 wird die mit Inulinase behandelte Probe eingesetzt;
 Lösungen 1 bis 4: entstammen dem Enzym-Testkit „Saccharose/D-Glukose/D-Fruktose“ (r-biopharm, Darmstadt)

Berechnungsschemata für die Gehalte an Inulin, sowie Saccharose, Glukose und Fruktose:

Die Berechnungsformel für die Bestimmung der Konzentration einer Substanz in verdünnter Lösung durch Absorptionsmessungen basiert auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 1).

Gehalt an freier Fruktose:

Bei den Ansätzen 3 und 4 (Tab. 1) werden die Extinktionsdifferenzen ($E_3 - E_2$) berechnet. Dann wird die Extinktionsdifferenz des Blindwertes (Ansatz 3) von der der Probe (Ansatz 4) abgezogen, man erhält $\Delta E_{D-Fruktose (frei)}$. Daraus ergibt sich für D-Fruktose Formel 2 beziehungsweise Formel 3.

Gehalt an freier Glukose:

Bei den Ansätzen 3 und 4 (Tab. 1) werden die Extinktionsdifferenzen ($E_2 - E_1$) berechnet. Dann wird die Extinktionsdifferenz des Blindwertes (Ansatz 3) von der der Probe (Ansatz 4) abgezogen, man erhält $\Delta E_{D-Glukose (frei)}$. Daraus ergibt sich für D-Glukose Formel 4 beziehungsweise Formel 5.

Gehalt an Saccharose:

Bei den Ansätzen 1 und 2 (Tab. 1) werden die Extinktionsdifferenzen ($E_2 - E_1$) berechnet. Dann wird die Extinktionsdifferenz des Blindwertes (Ansatz 1) von der der Probe (Ansatz 2) abgezogen, man erhält $\Delta E_{Gesamt-D-Glukose}$. Von $\Delta E_{Gesamt-D-Glukose}$ wird daraufhin $\Delta E_{D-Glukose (frei)}$ (s. o.) subtrahiert, es ergibt sich $\Delta E_{Saccharose}$. Daraus ergibt sich für Saccharose Formel 6 beziehungsweise Formel 7.

Aus der Saccharosekonzentration kann die aus Saccharose stammende Fruktosekonzentration nach Formel 8 berechnet werden.

Gehalt an Inulin:

Bei den Ansätzen 3 und 5 (Tab. 1) werden die Extinktionsdifferenzen ($E_3 - E_2$) berechnet. Dann wird die Extinktionsdifferenz des Blindwertes (Ansatz 3) von der der Gesamtprobe (Ansatz 5) abgezogen, man erhält $\Delta E_{Gesamt-D-Fruktose}$. Daraus ergibt sich für Gesamt-D-Fruktose Formel 9.

Der Gehalt an Fruktose aus Inulin ergibt sich aus Formel 10. Daraus resultiert der

Gehalt an Inulin in g pro 100 g Probe nach Formel 11.

Bestimmung der weiteren Ballaststoffe. Die Rückstände aus den G3-Filternutschen werden je in 600-ml-Bechergläser überführt und mit 40 ml MES/TRIS-Puffer (pH 8,3) versetzt (mit Uhrglasschalen abdecken). Die Probelösung ist sodann unter leichtem Rühren mittels Vielfachmagnetrührer Multipoint 15 und pH-Meter Portamess mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung auf pH 8,3 einzustellen. Anschließend wird 50 μ l hitzestabile α -Amylase-Lösung zugeetzt, eine Stunde bei 95 °C bis 100 °C im Schüttelwasserbad (s. oben) inkubiert und danach auf unter 60 °C abgekühlt. Während der weiteren enzymatischen Reaktionen sind die Proben ständig am Rühren zu halten (s. oben). Daraufhin wird 100 μ l Protease-Lösung zugegeben, vier Stunden bei 60 °C im Wasserbad mit Rührsystem (s. oben) inkubiert und anschließend der pH-Wert bei 60 °C mit Salzsäurelösung auf 4,0 bis 4,7 eingestellt. Nach Zugabe von 300 μ l Amyloglucosidase-Suspension wird eine Stunde bei 60 °C im Wasserbad mit Rührsystem (s. oben) inkubiert. Im Anschluss wird durch Zugabe des vierfachen Volumens an Ethanol (95%ig, auf 60 °C temperiert) gefällt (ca. 220 ml) und mindestens eine Stunde stehengelassen. Der Niederschlag wird dann über einen mit ca. 1 g Celite versetzten, getrockneten und gewogenen 50ml-Filtertiegel (Porosität 2, \varnothing 4,0 cm) abfiltriert. Dazu wird er mit kleinen Portionen an 78%igem Ethanol und unter Verwendung eines Gummiwischers quantitativ in den Filtertiegel überführt, zweimal mit je ca. 10 ml 95%igem Ethanol sowie zweimal mit je ca. 10 ml Aceton nachgewaschen, anschließend bei 105 °C über Nacht getrocknet und ausgewogen. Von den beiden bis hierher gleich behandelten Ansätzen einer Probe wird der eine im Anschluss zur Proteinbestimmung, der andere zur Aschebestimmung herangezogen, damit diese eventuell mit ausgefallten und -gewogenen Substanzen von den weiteren Ballaststoffen differenziert werden können.

Das Berechnungsschema für den Gehalt an weiteren Ballaststoffen ergibt sich aus Formel 12.

$$(1) \quad c_{\text{Substanz}} [\text{g/l}] = \frac{M \cdot V_1 \cdot F}{d \cdot \epsilon \cdot V_2 \cdot 1000} \cdot \Delta E;$$

dabei sind:

$c_{\text{Substanz}} [\text{g/l}]$: Konzentration der Substanz in g/l Probelösung

M: Molekulargewicht des zu bestimmenden Saccharids [g/mol]

V_1 : Gesamtvolumen der Messlösung in der Küvette [ml]

F: Verdünnungsfaktor der Probelösung – falls eine Verdünnung abweichend zur Methodenbeschreibung vorgenommen wurde, sonst ist $F = 1$

d: Schichtdicke der Küvette [cm]

ϵ : Extinktionskoeffizient von NADPH

– bei 340 nm = 6,3 [l * mmol⁻¹ * cm⁻¹]

– bei Hg 366 nm = 3,5 [l * mmol⁻¹ * cm⁻¹]

– bei Hg 334 nm = 6,18 [l * mmol⁻¹ * cm⁻¹]

V_2 : eingesetztes Volumen an Probelösung [ml]

ΔE : Extinktionsdifferenz des zu bestimmenden Saccharids

$$(2) \quad c_{\text{D-Fruktose (frei)}} [\text{g/l}] = \frac{180,16 \cdot 3,040 \cdot F}{1,00 \cdot \epsilon \cdot 0,200 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{\text{D-Fruktose (frei)}} = \frac{2,738 \cdot F}{\epsilon} \cdot \Delta E_{\text{D-Fruktose (frei)}};$$

dabei ist:

$c_{\text{D-Fruktose (frei)}} [\text{g/l}]$: Konzentration an freier D-Fruktose in g je l Probelösung

$$(3) \quad \text{Gehalt}_{\text{D-Fruktose (frei)}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{c_{\text{D-Fruktose (frei)}} [\text{g/l}] \cdot 100}{m};$$

dabei sind:

Gehalt_{D-Fruktose (frei)} [g/100 g]: Gehalt an freier D-Fruktose in g je 100 g Probe

m: Probeneinwaage in g

$$(4) \quad c_{\text{D-Glukose (frei)}} [\text{g/l}] = \frac{180,16 \cdot 3,020 \cdot F}{1,00 \cdot \epsilon \cdot 0,200 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{\text{D-Glukose (frei)}} = \frac{2,720 \cdot F}{\epsilon} \cdot \Delta E_{\text{D-Glukose (frei)}};$$

dabei ist:

$c_{\text{D-Glukose (frei)}} [\text{g/l}]$: Konzentration an freier D-Glukose in g je l Probelösung

$$(5) \quad \text{Gehalt}_{\text{D-Glukose (frei)}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{c_{\text{D-Glukose (frei)}} [\text{g/l}] \cdot 100}{m};$$

dabei sind:

Gehalt_{D-Glukose (frei)} [g/100 g]: Gehalt an freier D-Glukose in g je 100 g Probe

m: Probeneinwaage in g

$$(6) \quad c_{\text{Saccharose}} [\text{g/l}] = \frac{342,3 \cdot 3,020 \cdot F}{1,00 \cdot \epsilon \cdot 0,200 \cdot 1000} \cdot \Delta E_{\text{Saccharose}} = \frac{5,169 \cdot F}{\epsilon} \cdot \Delta E_{\text{Saccharose}};$$

dabei ist:

$c_{\text{Saccharose}} [\text{g/l}]$: Konzentration an Saccharose in g je l Probelösung

$$(7) \text{ Gehalt}_{\text{Saccharose}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{c_{\text{Saccharose}} [\text{g}/\text{l}] * 100}{m};$$

dabei sind:

Gehalt_{Saccharose} [g/100 g]: Gehalt an Saccharose in g je 100 g Probe
 m: Probeneinwaage in g

$$(8) c_{\text{D-Fruktose aus Saccharose}} [\text{g}/\text{l}] = c_{\text{Saccharose}} [\text{g}/\text{l}] * \frac{180,16}{342,3} = c_{\text{Saccharose}} [\text{g}/\text{l}] * 0,526$$

$$(9) c_{\text{Gesamt-D-Fruktose}} [\text{g}/\text{l}] = \frac{180,16 * 3,040 * F}{1,00 * \epsilon * 0,200 * 1000} * \Delta E_{\text{Gesamt-D-Fruktose}} = \frac{2,738 * F}{\epsilon} * \Delta E_{\text{Gesamt-D-Fruktose}}$$

$$(10) c_{\text{D-Fruktose aus Inulin}} [\text{g}/\text{l}] = c_{\text{Gesamt-D-Fruktose}} [\text{g}/\text{l}] - c_{\text{D-Fruktose aus Saccharose}} [\text{g}/\text{l}] - c_{\text{D-Fruktose (frei)}} [\text{g}/\text{l}]$$

$$(11) \text{ Gehalt}_{\text{Inulin}} [\text{g}/100 \text{ g}] = c_{\text{D-Fruktose aus Inulin}} [\text{g}/\text{l}] * \frac{EF * 100}{m};$$

dabei sind:

$c_{\text{D-Fruktose aus Inulin}}$ [g/l]: Konzentration an aus Inulin stammender Fruktose in g/l Probelösung
 Gehalt_{Inulin} [g/100 g]: Gehalt an Inulin in g je 100 g Probe
 EF: empirischer Faktor zur Umrechnung von Fruktose auf Inulin (unter der Annahme, dass Inulin nicht zu 100 % aus Fruktose, sondern zu geringen Anteilen auch aus Glukose besteht); hier EF = 1,00
 m: Probeneinwaage in g

$$(12) \text{ Gehalt}_{\text{Weitere Ballaststoffe}} [\text{g}/100 \text{ g}] = \frac{\frac{m_{N1} + m_{N2}}{2} - m_P - m_A - m_B}{\frac{m_1 + m_2}{2}} * 100;$$

dabei sind:

Gehalt_{Weitere Ballaststoffe} [g/100 g]: Gehalt an weiteren Ballaststoffen (Gesamtballaststoffe ohne Inulin) in g je 100 g Probe

m_{N1} : Masse des Niederschlags aus Ansatz 1 [mg]

m_{N2} : Masse des Niederschlags aus Ansatz 2 [mg]

m_P : Masse des in einem Niederschlag enthaltenen Proteins [mg]

m_A : Masse der in einem Niederschlag enthaltenen Asche [mg]

m_B : Masse aus der Bestimmung des Blindwerts [mg], wobei:

$$m_B = \frac{m_{N1 \text{ Blind}} + m_{N2 \text{ Blind}}}{2} - m_{P \text{ Blind}} - m_{A \text{ Blind}}$$

m_1 : Probeneinwaage 1 [mg]

m_2 : Probeneinwaage 1 [mg]

Ergebnisse und Diskussion

Ursprünglich traten bei der Bestimmung der Gesamtballaststoffe in Fleischerzeugnissen u.a. dann Schwierigkeiten auf, wenn Inulin und weitere Ballaststoffe gleichzeitig in einer Wurstprobe enthalten waren. Das lag daran, dass Inulin ein inhomogenes Gemisch aus unterschiedlich langen Ketten von hauptsächlich 2 bis 60 Fruktoseeinheiten darstellt. Von diesem Gemisch wurde beim Ausfällen mit 95%igem Ethanol nur ein Teil erfasst (Tab. 2). Die Moleküle mit geringerem Molekulargewicht blieben in Lösung. Ähnliche Beobachtungen machte auch QUEMENER *et al.* (1994). Inulin und damit die Gesamtballaststoffe konnten also in Anlehnung an die Methode L 00.0018 nach § 64 LFGB allein nicht vollständig erfasst werden. Ziel war es deshalb, Inulin bei der Bestimmung der weiteren Ballaststoffe quantitativ abzutrennen (und dann separat enzymatisch zu quantifizieren), damit man durch dessen teilweise Erfassung nicht falsche Werte erhält.

Dass der Fettgehalt von Fleischerzeugnissen einen erheblichen Einfluss auf die Analyseergebnisse der (weiteren) Bal-

laststoffe hat, zeigt Tabelle 3. Das Fett ist vor den Enzymzugaben zwingend quantitativ abzutrennen, um überhöhte Analysenwerte zu vermeiden. Eine nachträgliche Korrektur nach dem Ausfällen – wie bei Protein bzw. Asche – ist bei Fett nicht vorgesehen und bei vollständiger Fettextraktion offensichtlich auch nicht nötig.

Die Wiederfindung von Inulin in Rohwurst bei einem Sollwert von etwa 3,2 % lag im Durchschnitt bei ca. 96 %, wobei die Werte bei der Analyse gleichartiger Proben nur sehr geringfügig variierten (Tab. 4). Die gleichzeitige Anwesenheit weiterer Ballaststoffe (Weizenfaser) in der Probe störte die Bestimmung von Inulin nicht. Auch mit Kochwurst ergaben sich hohe Wiederfindungsraten von im Durchschnitt ca. 97 % bei Sollwerten von 2,8 und 5,6 %.

Ein ähnliches Bild lieferten die Ergebnisse der Wiederfindung von Inulin in Brühwurst. Die Sollwerte variierten deutlich von ca. 0,5 über 0,9, 1,8, 2,8, 5,6, 7,7 bis 8 %. Die Wiederfindung lag stets über 90 %, maximal (bei sehr niedrigen Sollwerten von 0,5 %) bei 110 %. Im Mittel über alle Werte bei Brühwurst (Tab. 4) lag die Wiederfindung bei 100,1 %.

Tab. 2: Einfluss des Inulins auf das Analyseergebnis bei der Bestimmung der Gesamtballaststoffe in Brühwurst – ohne vorherige Inulinabtrennung (n = 1)

	Sollwert Inulin [%]	Sollwert Weizenfaser [%]	Gesamtballaststoffgehalt [%]	Wiederfindung [%]
Charge A	2,82	2,90	4,54	156,7
Charge B	5,66	–	4,32	–

Tab. 3: Einfluss der Fettextraktion auf die Wiederfindung bei der Bestimmung von (weiteren) Ballaststoffen in Brühwurst/Lyoner mit Weizenfaser und Brokkoli (n = 1)

	Fettextraktion [Anzahl]	Sollwert [%]	Ballaststoffgehalt [%]	Wiederfindung [%]
Charge A	0	2,90	10,28	354,3
Charge A	1	2,90	3,13	107,8
Charge A	3	2,90	2,84	98,0

Tab. 4: Wiederfindung von Inulin in verschiedenen Wurstarten und jeweils unterschiedlichen Chargen (manche Chargen enthalten zusätzlich Weizenfaser)

Probe	Charge	Sollwert [%]	Inulingehalt [%]	Wiederfindung [%]
Rohwurst (alle Chargen enthalten zusätzlich Weizenfaser)	1	3,20	3,05	95,4
	2	3,27	3,09	94,6
	3	3,26	3,16	97,0
Brühwurst/Gelbwurst (Charge 4 und 5 enthält zusätzlich Weizenfaser)	1	–	–	–
	2	2,79	2,65	95,0
	3	2,79	2,67	95,7
	4	2,79	2,70	96,8
	5	2,79	2,82	101,1
	6	5,58	5,61	100,5
	7	5,58	5,62	100,7
Kochwurst/Leberwurst (Charge 3 enthält zusätzlich Weizenfaser)	1	–	–	–
	2	2,78	2,77	99,6
	3	2,78	2,52	90,6
	4	5,56	5,60	100,7
Brühwurst/Lyoner (alle Chargen enthalten zusätzlich Weizenfaser)	1	0,494	0,47	95,1
	2	0,513	0,56	109,2
	3	0,464	0,51	110,0
	4	0,903	0,91	100,7
	5	0,899	0,93	103,5
	6	0,919	0,93	101,2
	7	1,751	1,74	99,4
	8	1,744	1,71	98,1
	9	1,794	1,89	105,4
	10a	7,686	7,46	97,1
	10b	7,686	7,07	92,0
	11a	8,049	7,42	92,2
11b	8,049	8,23	102,3	
12	8,021	8,57	106,8	

Bei verschiedenen Wiederfindungsversuchen von weiteren Ballaststoffen (ohne Inulin)/Weizenfaser in Brühwürsten bzw. Kochwurst lagen die Werte im Minimalfall bei knapp 90 % (88,2 bzw. 89,2 %), der Maximalwert bei 112,6 %. Der Durchschnitt über alle Werte lag bei 96,7 %. Die Standardabweichung einer Dreifachbestimmung war mit einem Wert von ca. 0,7 gering (Chargen A1, A2, A3 in Tab. 5). Hier ist besonders zu berücksichtigen, dass sich der gravimetrisch zu bestimmende Ballaststoffanteil absolut gesehen – trotz 10 g Einwaage – nur im mg-Bereich bewegt. Die Wiederfindungsraten waren selbst bei für eine gravimetrische Methode niedrigen Sollwerten von ca. 0,5 % nicht niedriger als bei höheren Sollwerten von bis zu ca. 8 %. Es hat sich zudem gezeigt, dass verschiedene Wurstarten (Brüh- oder

Kochwurst) gleichermaßen gut einsetzbar sind.

Die Reproduzierbarkeit der Inulinbestimmung wurde durch mehrfache Analyse der gleichen Probe Lyoner an verschiedenen Tagen ermittelt (Tab. 6). Die Wiederfindung streute zwischen 91,4 und 103,9 %, der Mittelwert betrug 97,1 %. Die zugehörige Standardabweichung errechnete sich zu 4,51. Die Inulinbestimmung bei undotierten Wurstproben (Blindwert) brachte stets Ergebnisse zwischen 0 und 0,02 %.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung weiterer Ballaststoffe (ohne Inulin), hier Weizenfaser, wurde durch mehrfache Analyse der gleichen Probe Brühwurst an verschiedenen Tagen ermittelt (Tab. 7). Diese Lyoner wurde insgesamt fünfmal

Tab. 5: Wiederfindung weiterer Ballaststoffe (ohne Inulin) / Weizenfaser in verschiedenen Wurstarten und jeweils unterschiedlichen Chargen (manche Chargen enthalten zusätzlich Inulin)

Probe	Charge	Sollwert [%]	Ballaststoffgehalt [%]	Wiederfindung [%]
Brühwurst/Lyoner	A1	2,90	2,75	94,8
	A2	2,90	2,70	93,1
	A3	2,90	2,73	94,1
Brühwurst/ Gelbwurst (Charge D enthält zusätzlich Inulin)	A	–	0,17	–
	B	2,79	2,63	94,3
	C	2,79	2,53	90,7
	D	2,79	2,89	103,6
	E	5,58	5,33	95,5
	F	5,58	5,37	96,2
Kochwurst/ Leberwurst (Charge C enthält zusätzlich Inulin)	A	–	–	–
	B	2,84	2,67	94,0
	C	2,84	2,76	97,2
	D	5,68	5,01	88,2
Brühwurst/Lyoner (alle Chargen enthalten zusätzlich Inulin)	A	–	–	–
	B	–	0,18	–
	C	–	0,22	–
	D	0,556	0,54	96,6
	E	0,473	0,50	106,5
	F	0,554	0,53	95,7
	G	0,920	0,89	96,2
	H	1,264	1,22	96,9
	I	1,088	0,97	89,2
	J	3,909	3,84	98,2
	K	1,777	2,00	112,6
	L	1,783	1,78	99,9
	M	7,809	7,67	98,2
	N	7,836	7,57	96,6
O	7,731	7,44	96,2	

Tab. 6: Reproduzierbarkeit der Inulinbestimmung durch Analyse der gleichen Probe Lyoner an verschiedenen Tagen

Datum der Analyse	Sollwert [%]	Inulingehalt [%]	Wiederfindung [%]
12.8.2009	2,55	2,50	98,0
12.8.2009	2,55	2,65	103,9
13.8.2009	2,55	2,37	92,9
18.8.2009	2,55	2,33	91,4
25.8.2009	2,55	2,53	99,2

Tab. 7: Reproduzierbarkeit der Bestimmung weiterer Ballaststoffe (ohne Inulin)/Weizenfaser durch Analyse der gleichen Probe Lyoner an verschiedenen Tagen

Datum der Analyse	Sollwert [%]	Ballaststoffgehalt [%]	Wiederfindung [%]
12.8.2009	5,16	4,48	86,8
12.8.2009	5,16	4,50	87,3
13.8.2009	5,16	4,53	87,8
18.8.2009	5,16	4,44	86,1
25.8.2009	5,16	4,44	86,1

separat aufgearbeitet, die Wiederfindung bewegte sich lediglich zwischen 86,1 und 87,8 %, der Mittelwert lag bei 86,8 %. Die zugehörige Standardabweichung betrug 0,67 und lag damit sehr niedrig. Die relativ niedrigen Wiederfindungsraten – gegenüber den in den vorherigen Tabellen gezeigten Werten – deuten auf einen Wägefehler bei der Dotierung der Probe hin, denn die Wiederfindung liegt stabil fast exakt 10 % niedriger als die aus Tabelle 5 errechnete mit 96,7 %. Die Bestimmung der weiteren Ballaststoffe (ohne Inulin) bei undotierten Wurstproben (Blindwert) führte stets zu Gehalten zwischen 0,001 und 0,016 %.

Bei der enzymatischen Methode zur Bestimmung von Inulin (bzw. weiteren Zuckern) wurde in Tabelle 4 im Minimalfall mit einem Sollwert an Inulin von ca. 0,5 % gearbeitet. Geringere Gehalte an Inulin im Fleischerzeugnis wurden analytisch nicht geprüft. Sie dürften aber – bei gleicher Einwaage – kein Problem darstellen, da das zur Analyse eingesetzte Volumen an Probelösung ohne weiteres verzehnfacht werden kann (s. Tab. 1), von anderen zu höheren Konzentrationen führenden Aufarbeitungen ganz abgesehen.

Die angewandte gravimetrische Methode hat die Eigenheit, je eine der Doppelbestimmungen zur Korrektur unterschiedlicher Substanzklassen (Proteine bzw. Asche) nach dem Ausfällen zu verwenden. Sollten die beiden Ansätze nicht jeweils exakt gleiche Anteile an Protein und Asche enthalten – was zu erwarten ist – führt das natürlich zu grundsätzlichen Ungenauigkeiten. Letztere sind aber offensichtlich nur unbedeutend, wie Tabelle 5 zeigt. Dennoch könnten damit gewisse Ausreißer erklärt werden.

Die hier vorgestellte Methode zur gleichzeitigen Erfassung von Inulin und weiteren Ballaststoffen in Fleischerzeugnissen erfuhr gegenüber den zu Grunde liegenden amtlichen Methoden L 00.0094 bzw. L 00.0018 nach § 64 LFGB eine Reihe an wesentlichen Veränderungen. Zunächst ist die deutlich erhöhte Einwaage von ca. 10 g zu nennen, was in etwa der zehnfachen Menge entspricht. Die erschöpfende Fettextraktion mit HIP wurde neu

eingeführt. Inulin wird zur quantitativen Erfassung eine Stunde und damit doppelt so lange extrahiert. An dieser Stelle erfolgt die Kombination der Methoden L 00.0094 und L 00.0018 nach § 64 LFGB. Die Inkubationszeit der Inulinase wurde auf zwei Stunden und damit die vierfache Zeit verlängert. Die Proben werden mit α -Amylase eine Stunde, also doppelt so lange inkubiert, mit Protease wird achtmal so lange inkubiert, jetzt vier Stunden. Und schließlich wird auch mit Amyloglucosidase doppelt so lange, nämlich eine Stunde inkubiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die vorgestellte Methode sowohl in Brüh-, in Koch- als auch in Rohwurst anwendbar ist. Die Inulinbestimmung ist eine einfache und schnell auszuführende Methode, die neben einem Photometer keine weiteren speziellen Geräte benötigt. Die vorgestellte Methode ist für die Routinebestimmung der Gehalte an Inulin und weiteren Ballaststoffen in Fleischerzeugnissen gut geeignet. Sie zeigt jeweils eine sehr gute Wiederfindung von im Mittel nahezu 100 %, geringe Abweichungen bei Mehrfachbestimmungen und Reproduzierbarkeit sowie hohe Empfindlichkeit.

Die Berechnung von Inulin erfolgt ausschließlich auf Basis der durch Inulinase freigesetzten Fruktose, auf die Einbeziehung von Glukose zur Inulinkalkulation wurde aufgrund möglicher Störungen verzichtet. Beispielsweise könnten die verwendeten Enzyme auch bei evtl. vorhandenen weiteren Glukosequellen (wie Maltose) eine gewisse Aktivität entfalten und dadurch Glukose freisetzen, zudem enthält nicht jedes Inulinmolekül Glukose (De LEENHEER *et al.* 1994).

Literatur

AOAC 997.08 (1997): Fructans in Food Products – Ion Exchange Chromatographic Method. Official Methods of Analysis of AOAC International 16. ed., 4. rev., 45, 74-78

AOAC 999.03 (1999): Measurement of Total Fructan in Foods – Enzymatic/Spectrophotometric Method. Official Methods of Analysis of AOAC International 16. ed., 4. rev., 44, 45-47

- Abrams, S.A., Griffin, I.J., Hawthorne, K.M., Liang, L., Gunn, S.K., Darlington, G., Ellis, K.J. (2005): A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *Am J Clin Nutr* 82, 471-476
- Beylot, M. (2005): Effects of inulin-type fructans on lipid metabolism in man and in animal models. *Brit J Nutr* 93, 163-168
- Bundesverband der Deutschen Fleischwarenindustrie (BVDF) e.V. (2004): Geschäftsbericht 2003/2004
- CMA Centrale Marketing-Gesellschaft der deutschen Agrarwirtschaft mbH (2002): Marktanalyse Functional Food - ein Regionalvergleich
- Danisco (2004): Pflanzliche Ballaststoffe in Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft* 84, 36
- De Leenheer, L., Hoebregs, H. (1994): Progress in the Elucidation of the Composition of Chicory Inulin. *Starch/Stärke* 46, 5, 193-196
- Delzenne, N.M., Cani, P.D., Daubioul, C., Neyrinck, A.M. (2005): Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Brit J Nutr* 93, 157-161
- EU-Verordnungsvorschlag über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel 2003/1054/COD vom 7.6.2005
- Finley, J.W. (2005): Proposed criteria for assessing the efficacy of cancer reduction by plant foods enriched in carotenoids, glucosinolates, polyphenols and selenocompounds. *Ann Bot* 95, 1075-1096
- Frost und Sullivan (2004): Functional Food: Der Europamarkt für Präbiotika wächst. *Fleischwirtschaft* 84, 35
- Furrie E., Macfarlane, S., Kennedy, A., Cummings, J.H., Walsh, S.V., O'Neil, D.A., Macfarlane, G.T. (2005): Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 54, 242-249
- Gibson, G., Wang, X. (1993): Effects of in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. *J Appl Bacteriol*
- Guardiola, F., Codony, R., Addis, P.B., Rafeecas, M., Boatella, J. (1996): Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxic* 34, 193-211
- Hooper, L., Summerbell, C.D., Higgins, J.P., Thompson, F.L., Capps, N.E., Smith, G.D., Riemersma, R.A., Ebrahim, S. (2001): Dietary fat intake and prevention of cardiovascular disease: systematic review. *BMJ* 322 (7289), 757-763
- Kew, S., Banerjee, T., Minihane, A.M., Finnegan, Y.E., Williams, C.M., Calder, P.C. (2003): Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25 – 72 y. *Am J Clin Nutr* 77 (5), 1278-1286
- Kühl (2005): Vortrag anlässlich des 4. FEI-Kooperationsforums „Functional Food“, Bonn
- Lander, S. (2004): Hochfunktionelle Weizenfasern. Unlösliche Ballaststoffe und ihr Zusatznutzen beim Einsatz in Fleischwaren. *Fleischwirtschaft* 84, 45-47
- Leifert, W.R., Jahangiri, A., McMurchie, E.J. (1999): Antiarrhythmic fatty acids and antioxidants in animal and cell studies. *J Nutr Biochem* 10 (5), 252-267
- Marwick, C. (1996): Trials reveal no benefit, possible harm of beta carotene and vitamin A for lung cancer prevention. *J Amer Med Assoc* 275, 422-423
- Osada, K., Kodama, T., Cui, L., Yamada, K., Sugano, M. (1993): Levels and formation of oxidized cholesterol in processed marine foods. *J Agric Food Chem* 41, 1893-1898
- Paniangvait, P., King, A.J., Jones, A.D., German, B.G. (1995): Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J Food Sci* 60, 1159-1174
- Quemener, B., Thibault, J-F., Coussement, P. (1994): Determination of Inulin and Oligofructose in Food Products, and Integration in the AOAC Method for Measurement of Total Dietary Fibre. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.* 27, 125-132
- Quemener, B., Thibault, J-F., Coussement, P. (1994): Integration of inulin determination in the AOAC method for measurement of total dietary fibre. *Int J Biol Macromol* 21, 175-178
- Scholz-Ahrens, K.E., Schaafsma, G., van den Heuvel, E.G.H.M., Schrezenmeir, J. (2001): Effects of prebiotics on mineral metabolism. *Am J Clin Nutr* 73, 459-464
- Scholz-Ahrens, K.E., Schrezenmeir, J. (2002a): Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism. *Brit J Nutr* 87, 179-186

Scholz-Ahrens, K.E., Acil, Y., Schrezenmeir, J. (2002b): Effect of oligofructose or dietary calcium on repeated calcium and phosphorus balances, bone mineralization and trabecular structure in ovariectomized rats. *Brit J Nutr* 88 365-377

Stegmans, M., Iliens, S., Hoebregs, H. (2004): Enzymatic, Spectrophotometric Determination of Glucose, Fructose, Sucrose, and Inulin/Oligofructose in Foods. *J AOAC Int* 87, 5, 1200-1207

Vendrell-Pascuas, S., Castellote-Bargallo, A.I., Lopez-Sabater, M.C. (2000): Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J Chromatogr A* 881 (1-2), 591-597

Wallace, F.A., Miles, E.A., Calder, P.C. (2003): Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil in mononuclear cell function in healthy human subjects. *Brit J Nutr* 89 (5), 679-689

Watzl, B. (2005a): Glukosinolate. *Schweiz Zschr Ernährungsmedizin* 3, 34-37

Watzl, B., Girrbach, S., Roller, M. (2005b): Inulin, oligofructose and immunomodulation. *Brit J Nutr* 93, 49-55

Weickert, M.O., Pfeiffer, A.F.H. (2005): Ballaststoffe und Prävention des Typ-2-Diabetes. *Ernährung und Medizin* 20, 185-189

Wijendran, V., Hayes, K.C. (2004): Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Annu Rev Nutr* 24, 507-615