

ANTONI LIPIEC

Akademia Rolnicza w Lublinie

PODSTAWOWE PROBLEMY W OCENIE ZAWARTOŚCI WŁÓKNA I JEGO FRAKCJI W PASZACH

W ostatnich latach zaznaczył się wyraźny wzrost zainteresowania problemem odpowiedniej ilości włókna w ramach normowanego żywienia. Badania w tym zakresie, a w szczególności nowe metody badawcze odnoszą się przede wszystkim do żywienia ludzi. Wieloletnie obserwacje prowadzone w Afryce wskazują między innymi, że wiele chorób cywilizacyjnych ma ścisły związek z zawartością składników włókna w pożywieniu [10, 12, 21]. Okazało się też, że dotychczasowe rozumienie „włókna”, sprowadzające się do oznaczania tzw. „włókna surowego” jest niewystarczające. W wielu krajach prowadzone są aktualnie intensywne badania zawartości składników włókna w pożywieniu i jego wpływu na mechanizmy fizjologiczne przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt [13, 17, 33].

Definicja i podział włókna

Z dużej liczby proponowanych określeń w angielskiej strefie językowej, jak np.: indigestible residue, plantix, non-nutritive residue, edible fibre, dietary fibre większość badaczy skłania się do określania tej grupy związków jako „dietary fibre” [9, 22, 23], czyli „włókno pożywienia”. Również w niemieckiej strefie językowej używa się podobnego określenia: „Nahrungsfasern” zastępując nim poprzednio używane „Ballaststoffe” — „składniki balastowe”. Wynika to stąd, jak twierdzi Schweizer [22], że w przeciwieństwie do określenia „składniki balastowe” w pojęciu „włókno pożywienia” nie ma wątpliwości, że chodzi tu o część pożywienia a nie kału. W tym kontekście określenie „włókno surowe” powinno się odnosić wyłącznie do klasycznej metody oznaczania, to jest do analizy weendeńskiej.

W piśmienictwie polskim brak jest natomiast zupełnie jednoznacznego określenia tej grupy związków. Używane w różnych pracach zamiennie określenia: składniki strukturalne, składniki balastowe, substancje szkieletowe lub też wzięte bezpośrednio z metody oznaczania np. włókno neutralno-detergentowe nie są w pełni porównywalne i wymagają każdorazowo wyjaśnienia o jaką grupę związków chodzi.

W krajach zachodnich większość biochemików, żywieniowców i chemików żywności przyjmuje za Trowellem i in. [31], że włókno pożywienia to — „wszystkie polisacharydy i lignina, które nie są hydrolizowane przez enzymy przewodu pokarmowego człowieka”.

Cummings [5] natomiast mówi wprost — „non-starch polysacharides and lignin” — uznając tym samym, że wszystkie związki wielocukrowe nie mające charakteru skrobiowego oraz ligninę należy uważać za włókno pożywienia.

Obydwie definicje są bardzo zbliżone i stanowią dzisiaj punkt wyjścia dla większości analitycznych metod oznaczania włókna pożywienia. Przyjmując, że te same składniki włókna występują zarówno w pokarmie roślinnym przeznaczonym dla ludzi oraz w paszach dla zwierząt można definicję włókna pożywienia odnieść w nie zmienionej postaci do żywienia zwierząt, pamiętając jednak, że składniki włókna są u niektórych, szczególnie u poligastycznych, zupełnie inaczej wykorzystywane niż u człowieka.

W skład włókna pożywienia wchodzi substancje zawarte zarówno w ścianie komórki roślinnej jak też w jej wnętrzu. Rodzaje związków chemicznych zaliczanych obecnie do włókna pożywienia obrazuje tabela 1. W literaturze można się również spotkać z określeniem „dietary fibre complex [20, 23], do którego to kompleksu zalicza się m. in. białka i składniki mineralne związane ze ścianą komórkową. Natomiast do składników włókna wnętrza komórki zalicza się obok pektyn i śluzów także węglowodany występujące w glonach oraz zmodyfikowane celulozy i skrobie. Wyszczególnione w tabeli 1 związki nie wyczerpują oczywiście listy substancji, które mogą być zaliczone do składników włókna. Nie podano tu przykładowo kompleksów celulozowo- i hemicelulozowo-ligninowych. Kompleksy te często występujące w paszach roślinnych nie mogą być traktowane tylko jako chemiczne połączenia dwóch składników włókna, chociażby ze względu na ich odmienne właściwości i związane z tym przemiany w przewodzie pokarmowym przeżuwaczy czy też nawet w jelicie grubym człowieka lub zwierząt monogastycznych.

Przegląd metod analitycznych

Wszystkie metody służące do bezpośredniego oznaczania włókna pożywienia można podzielić na wagowe i rozdzielcze [22, 24, 30]. W metodach wagowych dąży się do oznaczenia składników włókna poprzez oddzielenie na drodze chemicznej lub enzymatycznej wszystkich innych składników pożywienia lub paszy. Metody rozdzielcze opierają się natomiast na specyficznych metodach chromatograficznych, kolorymetrycznych i grawime-

trycznych pozwalających na bezpośrednie oznaczenie pojedynczych składników włókna, jak np.: cukrów neutralnych, kwasów uronowych czy ligniny.

Oczywiście konieczne jest tutaj wcześniejsze przygotowanie czystych preparatów ściany komórkowej lub przynajmniej oddzielenie strawnych węglowodanów, jak cukier, skrobia i dekstryny.

Metody wagowe

Do tej kategorii zalicza się metodę oznaczania włókna surowego, metody detergentowe i szereg metod enzymatycznych [1, 3, 21, 32]. We wcześniejszych metodach dążono do oznaczania nierozpuszczalnej pozostałości po chemicznym lub enzymatycznym rozłożeniu białek i skrobi w odtłuszczonych próbach pasz. Między innymi szerokie zastosowanie znalazła metoda neutralno-detergentowa, która w różnych odmianach stosowana jest nadal w niektórych krajach, m.in.: w Stanach Zjednoczonych i w Szwajcarii jako oficjalna metoda oznaczania włókna [19, 21, 22]. Kiedy jednak, na podstawie szczegółowych badań stwierdzono, że wiele produktów pochodzenia roślinnego — w tym także zboża — zawierają spore ilości włókna rozpuszczalnego nawet w roztworze neutralnych detergentów, metody te straciły na znaczeniu.

Nowsze metody wagowe pozwalają na oznaczenie zarówno nierozpuszczalnej jak i rozpuszczalnej części włókna pożywienia [1, 19, 21, 24]. W większości są to metody enzymatyczne [3, 6, 10], chociaż nie brak jest również kombinowanych metod detergentowo-enzymatycznych. Różnią się one rodzajem stosowanych enzymów rozkładających białko i skrobię, czasem inkubacji oraz sposobami izolowania i oznaczania części rozpuszczalnej włókna.

Na podstawie dotychczasowych doświadczeń w metodach wagowych należy zwrócić szczególną uwagę na cztery problemy:

- całkowite określenie rozpuszczalnej części włókna
- całkowite rozłożenie skrobi
- „zanieczyszczenie” włókna białkiem
- „zanieczyszczenie” włókna popiołem.

Większość autorów wytrąca rozpuszczalną część włókna przy pomocy etanolu z wodnych, buforowanych roztworów [19, 24, 29, 30]. W wielu opracowaniach [1, 4, 15, 18] podkreśla się jednak, że niektóre wielocukry rozpuszczają się nawet w 80% roztworze etanolu. Jako rozwiązanie alternatywne proponuje Arrigoni i in. [1] dializę lub też Mauser i in. [14] ultrawierowanie. Ale również te czaso- i pracochłonne metody nie pozwa-

Podział składników włókna wg Schweizera [21]

Pochodzenie	Wyszczególnienie		Elementy składowe																																							
Ściana komórkowa (materiał podporowy)	węglowodany	celuloza	łańcuchy β -D-glikozydowe																																							
		hemicelulozy	<table border="0"> <tr> <td rowspan="2"> <table border="0"> <tr> <td>arabino- glukuro</td> <td rowspan="2">} ksylany</td> </tr> <tr> <td>galakto- gluko-</td> </tr> </table> </td> <td>manna- ny</td> </tr> <tr> <td>arabino-</td> <td>galaktany</td> </tr> </table>	<table border="0"> <tr> <td>arabino- glukuro</td> <td rowspan="2">} ksylany</td> </tr> <tr> <td>galakto- gluko-</td> </tr> </table>	arabino- glukuro	} ksylany	galakto- gluko-	manna- ny	arabino-	galaktany																																
		<table border="0"> <tr> <td>arabino- glukuro</td> <td rowspan="2">} ksylany</td> </tr> <tr> <td>galakto- gluko-</td> </tr> </table>	arabino- glukuro		} ksylany		galakto- gluko-	manna- ny																																		
	arabino- glukuro		} ksylany																																							
galakto- gluko-																																										
arabino-	galaktany																																									
składniki pektynowe (proto-pektyny)	<table border="0"> <tr> <td>galakturono- -ramnany</td> <td rowspan="2">}</td> </tr> <tr> <td>galakturono-ramnan</td> </tr> </table>	galakturono- -ramnany	}	galakturono-ramnan																																						
galakturono- -ramnany	}																																									
galakturono-ramnan																																										
	lignina		polimery fenylopropanu																																							
Zawartość komórki roślinnej i przetworzone środki spożywcze	substancje niecukrowe	substancje związane ze ścianą komórki	<table border="0"> <tr> <td rowspan="4"> <table border="0"> <tr> <td>krze- miany</td> <td rowspan="4">}</td> </tr> <tr> <td>białka</td> </tr> <tr> <td>kutyna</td> </tr> <tr> <td>woski</td> </tr> </table> </td> <td> <table border="0"> <tr> <td>kwasy krzemowy</td> </tr> <tr> <td>hydroksyprolina</td> </tr> <tr> <td>hydroksykwas</td> </tr> <tr> <td>estry kwasów tłuszczowych</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td rowspan="3">węglowodany</td> <td rowspan="3">pektyny wydzieliny roślinne i składniki śluzowe</td> <td> <table border="0"> <tr> <td>karubin</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>guaran</td> </tr> <tr> <td>guma arabska</td> </tr> </table> </td> <td> <table border="0"> <tr> <td>galakto-uroniany</td> </tr> <tr> <td>galaktany</td> </tr> <tr> <td>mannany</td> </tr> <tr> <td>ramnany</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>węglowodany glonów</td> <td>agar</td> <td> <table border="0"> <tr> <td>gluko-uroniany</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>galakto-siarczany</td> </tr> <tr> <td>anhydro-galaktany</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td></td> <td>zmodyfikowane celulozy, np.: CMC*</td> <td></td> <td>połączenia eterowe</td> </tr> <tr> <td></td> <td>zmodyfikowane skrobie</td> <td></td> <td>połączenia estrowe i eterowe</td> </tr> </table>	<table border="0"> <tr> <td>krze- miany</td> <td rowspan="4">}</td> </tr> <tr> <td>białka</td> </tr> <tr> <td>kutyna</td> </tr> <tr> <td>woski</td> </tr> </table>	krze- miany	}	białka	kutyna	woski	<table border="0"> <tr> <td>kwasy krzemowy</td> </tr> <tr> <td>hydroksyprolina</td> </tr> <tr> <td>hydroksykwas</td> </tr> <tr> <td>estry kwasów tłuszczowych</td> </tr> </table>	kwasy krzemowy	hydroksyprolina	hydroksykwas	estry kwasów tłuszczowych	węglowodany	pektyny wydzieliny roślinne i składniki śluzowe	<table border="0"> <tr> <td>karubin</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>guaran</td> </tr> <tr> <td>guma arabska</td> </tr> </table>	karubin	}	guaran	guma arabska	<table border="0"> <tr> <td>galakto-uroniany</td> </tr> <tr> <td>galaktany</td> </tr> <tr> <td>mannany</td> </tr> <tr> <td>ramnany</td> </tr> </table>	galakto-uroniany	galaktany	mannany	ramnany		węglowodany glonów	agar	<table border="0"> <tr> <td>gluko-uroniany</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>galakto-siarczany</td> </tr> <tr> <td>anhydro-galaktany</td> </tr> </table>	gluko-uroniany	}	galakto-siarczany	anhydro-galaktany		zmodyfikowane celulozy, np.: CMC*		połączenia eterowe		zmodyfikowane skrobie		połączenia estrowe i eterowe
			<table border="0"> <tr> <td>krze- miany</td> <td rowspan="4">}</td> </tr> <tr> <td>białka</td> </tr> <tr> <td>kutyna</td> </tr> <tr> <td>woski</td> </tr> </table>		krze- miany		}	białka	kutyna	woski	<table border="0"> <tr> <td>kwasy krzemowy</td> </tr> <tr> <td>hydroksyprolina</td> </tr> <tr> <td>hydroksykwas</td> </tr> <tr> <td>estry kwasów tłuszczowych</td> </tr> </table>	kwasy krzemowy	hydroksyprolina	hydroksykwas			estry kwasów tłuszczowych																									
	krze- miany	}																																								
	białka																																									
	kutyna																																									
woski																																										
kwasy krzemowy																																										
hydroksyprolina																																										
hydroksykwas																																										
estry kwasów tłuszczowych																																										
węglowodany	pektyny wydzieliny roślinne i składniki śluzowe	<table border="0"> <tr> <td>karubin</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>guaran</td> </tr> <tr> <td>guma arabska</td> </tr> </table>	karubin	}	guaran	guma arabska	<table border="0"> <tr> <td>galakto-uroniany</td> </tr> <tr> <td>galaktany</td> </tr> <tr> <td>mannany</td> </tr> <tr> <td>ramnany</td> </tr> </table>	galakto-uroniany	galaktany	mannany	ramnany																															
		karubin	}																																							
		guaran																																								
guma arabska																																										
galakto-uroniany																																										
galaktany																																										
mannany																																										
ramnany																																										
	węglowodany glonów	agar	<table border="0"> <tr> <td>gluko-uroniany</td> <td rowspan="3">}</td> </tr> <tr> <td>galakto-siarczany</td> </tr> <tr> <td>anhydro-galaktany</td> </tr> </table>	gluko-uroniany	}	galakto-siarczany	anhydro-galaktany																																			
gluko-uroniany	}																																									
galakto-siarczany																																										
anhydro-galaktany																																										
	zmodyfikowane celulozy, np.: CMC*		połączenia eterowe																																							
	zmodyfikowane skrobie		połączenia estrowe i eterowe																																							

* CMC — karboksymetyloceluloza

lają na całkowite oznaczenie wszystkich rozpuszczalnych wielocukrów włókna. Jak podają jednak autorzy tych opracowań ilości te w stosunku do całkowitej zawartości włókna są niewielkie i można je praktycznie pominąć.

Do znacznie większych strat rozpuszczalnej części włókna może natomiast dochodzić z całkiem innych względów. Przy rozdzieleniu próby na rozpuszczalne i nierozpuszczalne części składowe przed dokonaniem proteolizy — pomijając dodatkowy nakład pracy — istnieje niebezpieczeństwo, że część włókna która dopiero podczas proteolizy staje się rozpuszczalna, może zostać stracona podczas procesu filtrowania. I tak w przypadku roślin motylkowatych straty na tej drodze mogą dochodzić do 20% całkowitej zawartości włókna [24, 29]. Skrobia, która nie została całkowicie usunięta z próby jest następnie oznaczana razem ze składnikami włókna i w przeciwieństwie do białek oraz popiołu można ją oddzielić dopiero po zastosowaniu bardzo dużego nakładu pracy. W tym względzie wykorzystanie przez Theandera i Amana [29, 30] do rozkładu skrobi termostabilnej α -amylazy (Termamyl 60L) znacznie ten proces uprościło. Enzym ten rozkłada również kompleksy lipidowo-amylozowe, zatem frakcja rezystentna może być w całości zaliczona do włókna.

Żadna z publikowanych metod wagowo-enzymatycznych nie pozwala na całkowite usunięcie białka z próby [21, 22]. Białko tzw. resztkowe, pozostające w nierozpuszczalnej części włókna zaliczane jest z fizjologicznego punktu widzenia do kompleksu włókna pożywienia (dietary-fibre-complex) [20], natomiast białko występujące w rozpuszczalnej części należy uznać za artefakt, a końcowy wynik musi być poddany korekcie.

Podczas izolowania rozpuszczalnej części włókna etanolem ulegają jednocześnie wymyciu elementy mineralne [23], natomiast podczas dializy popiół pozostaje w składzie części rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej włókna. Konieczne jest zatem wprowadzenie poprawki co nie zawsze jest możliwe, ze względu na często śladowe ilości materiału — przede wszystkim w części rozpuszczalnej — w zależności od rodzaju materiału badawczego. Toteż, przy zastosowaniu dializy określa się często zawartość popiołu tylko w części nierozpuszczalnej włókna pożywienia.

Metody rozdzielcze

Od pewnego czasu stosowane są do oceny zawartości poszczególnych frakcji włókna metody rozdzielcze [15, 64, 65, 83, 84]. Wykorzystuje się je przede wszystkim w celach preparatywnych i w związku z tym, w zależności od tkanki roślinnej ulegają szeregowi modyfikacji. Nie można ich więc traktować jako metod ogólnego zastosowania do oznaczeń włókna.

Wskazują na to także wyniki badań porównawczych, w których badano między innymi zawartość włókna całkowitego obliczonego na podstawie sumy wyników z oznaczeń poszczególnych frakcji włókna metodami rozdzielczymi i metodami wagowymi [19, 26, 32].

Jako punkt wyjścia do większości najbardziej znanych i najczęściej dzisiaj stosowanych metod rozdzielczych przyjmuje się metodę Southgate'a [28]. W fazie początkowej usuwane są z próby cukier, lipidy poprzez ekstrakcję 85% metanolem i eterem etylowym. Następnie jest rozkładana skrobia poprzez inkubację próby z β -amylazą, a powstałą glukozę ekstrahuje się 80% etanolem. Po rozdzieleniu frakcji stałej i rozpuszczonej na drodze filtrowania, dalszy rozdział kompleksu włókna i pozostającego jeszcze w obu częściach próby białka dokonywany jest metodami chromatograficznymi lub kolorymetrycznymi w zależności od rodzaju składnika, który ma być oznaczony.

Zastosowanie do oznaczeń metod chromatograficznych, a w szczególności w ostatnich latach chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej (HPLC) [26] pozwala obecnie na dokładniejsze i przede wszystkim szybkie ustalenie różnic składu włókna w zależności od rodzaju pożywienia lub paszy. Ułatwia także poznawanie procesów jakim podlegają składniki włókna w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Metody rozdzielcze umożliwiają również oznaczenie włókna całkowitego zawartego w materiale roślinnym, jako sumy poszczególnych komponentów. Przy tego rodzaju postępowaniu należy jednak zwrócić szczególną uwagę na trzy zasadnicze elementy postępowania analitycznego, tj.:

- hydrolizę kwaśną
- oznaczanie kwasów uronowych
- oznaczanie ligniny.

gdyż mogą one w zasadniczy sposób wpłynąć na końcowy wynik oznaczeń.

Hydroliza kwaśna, przeprowadzana w różnym czasie i za pomocą różnych — w zależności od metody — roztworów kwasu siarkowego, pozwala wprawdzie na pełny rozdział wielocukrów i monocukrów, ale jednocześnie następuje rewersja i częściowa degradacja elementów składowych cukru. Dlatego też wyniki mogą być niekiedy dyskusyjne [2, 16, 27, 32]. W celu uniknięcia ewentualnych błędów zaleca się równoległe do oznaczanej próby przeprowadzenie takiego samego postępowania analitycznego z mieszaninami standardowymi, celem uzyskania odpowiednich współczynników korekcyjnych. Niektórzy badacze są zdania, że problem ten można będzie w przyszłości rozwiązać przez zastąpienie kwasu siarkowego odpowiednią kombinacją hydrolaz [22].

Kwasy uronowe są składnikami takich związków jak hemicelulozy, gumy, śluzu roślinne oraz pektyny. Większość autorów wykorzystuje do

oznaczania tych kwasów jedną z licznych modyfikacji reakcji karbazolowej [6, 21]. Konieczne jest jednak przeprowadzenie dodatkowych obliczeń ze względu na interferencję cukrów neutralnych.

Grawimetryczne oznaczanie ligniny po hydrolizie kwaśnej stwarza zdaniem wielu autorów największą trudność w metodach rozdzielczych [2, 18, 22]. Dzieje się tak wskutek śladowych ilości materiału do oznaczeń oraz ze względu na występujące jeszcze w próbce białko. Z powyższych względów proponuje się w literaturze [6, 7, 26] odrębne oznaczanie ligniny, np. metodą Goeringa i Van Soesta [8]. Z powyższego opisu stosowanych aktualnie metod oceny zawartości włókna i jego frakcji w pożywieniu i paszach pochodzenia roślinnego wynika jednoznacznie, że jak dotąd nie została opracowana metoda uniwersalna, w pełni adekwatna do podanej na początku niniejszego rozdziału definicji „włókna pożywienia”. Cel ten zostanie prawdopodobnie w przyszłości osiągnięty, jednak do tego czasu należy liczyć się z błędami wynikającymi niejako w sposób obiektywny ze specyfiki zastosowanej metody oznaczeń. W tym względzie niezwykle istotny jest dobór metody w zależności od ostatecznego celu badań.

Do oznaczania włókna całkowitego w pożywieniu i w paszach dla zwierząt, zaleca się przede wszystkim metody wagowe jako znacznie dokładniejsze i prostsze do przeprowadzenia. Wśród nich najczęściej stosowane są metoda Van Soesta [8, 32] i metoda enzymatyczna opracowana przez Prosky i in. [19]. Ta ostatnia została uznana w 1984 roku przez AOAC (Association of Official Analytical Chemists) za metodę oficjalną oznaczania włókna pożywienia [19]. Zbliżoną metodę do metody Prosky'ego opracowali Arrigoni i in. [1]. W odróżnieniu od metody Prosky'ego umożliwia ona rozdział włókna na frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną.

Metody rozdzielcze mają obecnie największe zastosowanie w badaniach nad składem włókna w pokarmach roślinnych przeznaczonych bezpośrednio dla ludzi [12, 14]. Natomiast w nauce żywienia zwierząt metody te nie mają jak dotąd większego praktycznego znaczenia. Należy jednak sądzić, że wraz z postępem badań nad składem chemicznym włókna pasz oraz wykorzystaniem jego frakcji do oceny wartości energetycznej pasz dla zwierząt metody rozdzielcze znajdą tu szerokie zastosowanie. Odnosi się to w szczególności do oznaczania kompleksów węglowodanowo-ligninowych w paszach, oraz podatności tychże na rozkład enzymatyczny w przewodzie pokarmowym. Produktami rozpadu części węglowodanowej tego kompleksu są cukry neutralne, które można oznaczać przy zastosowaniu chromatografii gazowej lub cieczowej. W połączeniu z grawimetrycznym oznaczaniem pozostałej po rozkładzie enzymatycznym lub hydrolizie kwaśnej ligniny, metody te stają się niezwykle pomocne w zakresie oceny stopnia wykorzystania energetycznego kompleksu węglowodanowo-ligninowego w paszach dla zwierząt.

LITERATURA

1. Arrigoni E.: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 178, 195, 1984.
2. Asp N.G., Johansson C.G.: Rev. Clin. Nutr. 54A, 735, 1984.
3. Asp N.G. i in.: J. Agric. Food Chem., 31, 476, 1983.
4. Brillouet J.M. i in.: J. Agric. Food Chem., 30, 488, 1982.
5. Cummings J.: Br. Med. Bull., 37, 65, 1981.
6. Englyst H.: Determination of carbohydrate and its composition in plant materials. In: The analysis of dietary fiber in food. (James W.P.T., Theander O.), Marcel Dekker Inc., New York, 71, 1981.
7. Englyst H., Wiggings H.S., Cummings J.H.: Analyst, 107, 307, 1982.
8. Goering H.K., Van Soest P.J.: Forage fiber analysis. USDA Agricultural Handbook, Nr 397, 1970.
9. Hellendorn E.W.: Am. J. Clin. Nutr., 34, 1437, 1981.
10. Hellendorn E.W., Noordhoff M.G., Slagman J.: J. Sci. Fd. Agric., 26, 1461, 1975.
11. Hudson G.J., Bailey B.S.: Food Chem., 5, 201, 1980.
12. Johansson C.G., Siljeström M., Asp N.G.: Z. Lebensm. Unters. Forsch., 179, 24, 1984.
13. Lebziën P.: Übers. Tierernährg., 8, 151, 1980.
14. Mauser F., Suckow P., Kulikowski W.: Getreide, Mehl, Brot, 37, 380, 1983.
15. Mertens D.R.: Fed. Proc. 36, 187, 1977.
16. Neeser J.R., Schweizer T.F.: Anal. Biochem., 142, 58, 1984.
17. Neilson M.J., Richards G.N.: J. Sci. Fd. Agric., 29, 513, 1978.
18. Neukom H., Markwderl H.U., Schibli P.: Lebensm. Wiss. Technol., 10, 346, 1977.
19. Prosky L. i in.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 67, 1044, 1984.
20. Saunders R., Betschart A.A.: Am. J. Clin. Nutr., 33, 960, 1980.
21. Schweizer T.F.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg., 71, 25, 1980.
22. Schweizer T.F.: Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 75, 469, 1984.
23. Schweizer T.F., Frohlich W., Del Vedovo S., Besson R.: Cereal Chem., 61, 116, 1984.
24. Schweizer T.F., Wursch P.: J. Sci. Fd. Agric., 30, 613, 1979.
25. Selvendran R.R., Du Pont M.S.: Cereal Chem., 57, 278, 1980.
26. Slavin J.L., Marlett J.A.: J. Agric. Fd. Chem., 31, 467, 1983.
27. Smith L.W., Goering H.K., Gordon C.H.: J. Dairy Sci., 55, 1140, 1972.
28. Southage D.A.T.: Proc. Nutr. Soc., 32, 131, 1973.
29. Theander O., Aman P.: Swedish J. Agric. Res., 9, 99, 1979.
30. Theander O., Aman P.: J. Sci. Fd. Agric., 33, 340, 1982.
31. Trowell H. i in.: Lancet, 1, 967, 1976.
32. Van Soest P.J.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 46, 829, 1963.
33. Waldo D.R., Jorgensen N.A.: J. Dairy Sci., 64, 1207, 1981.