

# НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЫРОГО ПРОТЕИНА

**М. ФИЛИППОВ**, канд. биол. наук, **Т. ТУЖИКОВА**, ООО «Провими»

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СЫРОГО ПРОТЕИНА — САМЫЙ МАССОВЫЙ ВИД ХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В КОМБИКОРМОВОЙ ОТРАСЛИ. ДЛЯ МНОГИХ НАШИХ КОЛЛЕГ ЭТЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ ЯВЛЯЕТСЯ РЕШАЮЩИМ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЦЕНЫ СЫРЬЯ И ЕГО КОЛИЧЕСТВА В РЕЦЕПТЕ КОМБИКОРМА ИЛИ БВМК. ОДНАКО СЛЕДУЕТ ПОМНЯТЬ, ЧТО СЫРОЙ ПРОТЕИН ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ — РАСЧЕТНЫЙ ПОКАЗАТЕЛЬ И НЕДОСТАТОЧНО ИНФОРМАТИВЕН ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ ПО КОРМЛЕНИЮ.

Протеин (белок) — это органическое соединение, в состав которого входит азот. Все белки, независимо от структуры, свойств и функций, построены из одних и тех же аминокислот, в состав которых входит азот. Однако белки отличаются друг от друга по количественному соотношению аминокислот, которое зависит от биологического объекта. Это определяет содержание азота в белке, имеющему характерные для каждого объекта значения. Так, белок животных тканей содержит 16% азота, зерновых — 17,54%, кукурузы — 16,77% и т.д. Для многих биологических объектов рассчитаны индивидуальные коэффициенты пересчета массовой доли азота в белок.

**Коэффициенты пересчета массовой доли азота в белок (протеин) для различных биологических объектов**

Пшеница, рис	5,83
Ячмень, овес, рожь	5,70
Отруби	6,25
Кукуруза	5,95
Молочная сыворотка	6,38
Соя	5,41
Белок животных тканей	6,25

БВМК, для пересчета общего азота в протеин производители комбикормов всегда используют коэффициент 6,25. При этом индивидуальные коэффициенты для каждого вида сырья не учитываются — чтобы не было разнотечений и путаницы между поставщиками сырья, производителями и потребителями комбикормов.

В качестве аналитических методов для определения общего азота с последующим пересчетом в сырой протеин обычно применяют три метода: классический — Къельдаля, фотометрический и более современный — метод Дюма (Dumas).

Несмотря на то что фотометрический метод внесен в ГОСТ на определение общего азота/сырого протеина, по ряду причин он не совсем подходит для наших объектов, особенно для готовой продукции из-за сложности ее состава. Основное преимущество метода Дюма — это быстрота анализа. При его проведении практически отсутствует пробоподготовка (только размол), а на одно измерение требуется всего несколько минут в отличие от метода Къельдаля (затрачивается 1,5–2 ч). Метод Дюма не

требует токсичных химических веществ или катализаторов, однако при его применении в лабораторию необходимо регулярно закупать кислород и гелий особой чистоты, что проблематично для предприятий, расположенных в отдалении от больших городов. Кроме того, небольшой размер пробы затрудняет получение репрезентативного образца, что может привести к искажению результатов анализа. Метод не является арбитражным, и в случае возникновения претензий или разногласий между поставщиком и потребителем для повторных исследований используют все-таки метод Къельдаля. Но основной недостаток, из-за которого метод Дюма мало распространен в России, — высокая стоимость самого оборудования и его планового профилактического обслуживания.

В зарубежной литературе последние десять лет широко обсуждается вопрос о сходимости результатов, полученных методами Дюма и Къельдаля. В частности, по данным международной программы AAFCO (Ассоциация американских официальных контролеров кормов) выявлена следующая тенденция: результаты, полученные методом Дюма, всегда выше результатов, полученных методом Къельдаля, как минимум на 2–3% отн., что, например, для рыбной муки с содержанием 65% сырого протеина завышение составит 1,3–1,9% абс.

Метод Къельдаля, внесенный в ГОСТ как арбитражный, по-прежнему наиболее популярный у нас и используется для определения общего азота/сырого протеина в подавляющем большинстве ПТЛ комбикормовых предприятий и аналитических лабораторий.

## ПРИНЦИП МЕТОДА КЪЕЛЬДАЛЯ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО АЗОТА

В зависимости от финансовых возможностей предприятия и наличия специального оборудования метод Къельдаля применяют в ручном, полуавтоматическом и автоматическом режимах. Принцип метода остается одним и тем же, но при автоматизации в два-три раза возрастает производительность труда оператора, при этом уменьшается влияние человеческого фактора на конечный результат. Кроме того, снижаются в два раза энергозатраты и в три-четыре раза — количество вредных выбросов в окружающую среду.

Определение общего азота по методу Къельдаля проводится в три основных этапа: *минерализация* (разложение

ние) образца; нейтрализация кислоты концентрированной щелочью с последующей перегонкой (дистилляцией) водяным паром; титрование перегнанного дистиллята раствором кислоты или щелочи известной концентрации (титрантом).

Минерализацию (разложение) образца проводят при температуре 400–440°C в концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора. Азот (N) из образца в виде аммиака связывается с серной кислотой с образованием сульфата аммония ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Минерализат охлаждают, а затем разбавляют водой и нейтрализуют концентрированной натриевой щелочью, в результате чего образуется гидроокись аммония  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + 2\text{NaOH} \Rightarrow 2\text{NH}_4\text{OH} + \text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Это нестойкое соединение, которое распадается на аммиак и воду при нагревании. В нашем случае — при обработке обычным водяным паром.

Дальше наступает этап перегонки (дистилляции) паром. Аммиак вместе с паром попадает в приемную колбу, где аммиак связывается со специальным раствором — ресивером. Таковым может служить серная кислота, редко — соляная, но чаще используют раствор борной кислоты, особенно в полуавтоматических и автоматических системах.

Затем дистиллят (ресивер со связанным аммиаком) титруют. Прямое титрование (кислотой) проводят, если в качестве ресивера применялась борная кислота, если же ресивером служили другие кислоты, то проводят обратное титрование (щелочью). По количеству реагента, который был истрачен на титрование связанного аммиака, определяют содержание общего азота. Это значение умножают на 6,25 и получают массовую долю сырого протеина.

**Причины расхождения результатов испытаний в разных лабораториях.** Существует несколько основных причин (факторов), по которым результаты по одним и тем же образцам корма или сырья, исследованным в разных лабораториях по методу Кельдаля, показывают различное содержание сырого протеина. Это: гомогенность образца, масса навески, объем кислоты для минерализации, соотношение катализатор / кислота, тип катализатора, время и температура минерализации, оборудование для перегонки и титрования. Все эти факторы влияют на достоверность исследований.

**Гомогенность образца.** Этот фактор особенно критичен для образцов с высоким содержанием протеина, таких как рыбная, мясная/мясокостная и перьевая мука. После размола в каждой единице объема такого продукта все его составляющие (кости, мышечная ткань, а для мясокостной муки из птицы — дополнительно перо и содержимое кишечника) должны содержаться в тех же пропорциях, что и в самом образце. Если в пробу, предназначенную для определения сырого протеина, попадет больше костей, результат будет занижен, если больше пера и/или мышечной ткани — завышен. В обоих случаях он будет недостоверен.

Подобную картину можно наблюдать и при анализе образцов с низким содержанием протеина, но с высоким содержанием пленок/лузги (оболочки, шелухи) — ячменя и овса. Если в пробу попадет больше пленок (при размоле они обычно «всплывают» наверх), результат будет занижен. Аналогичная ситуация может сложиться и с рассыпной го-

товой продукцией, особенно при ее расслоении при транспортировке. В связи с этим размалывать навеску образца необходимо так, чтобы размер частиц по возможности не превышал 1 мм, хотя это и проблематично для мясной и мясокостной муки, особенно с высоким содержанием жира.

**Масса навески.** Оптимальной навеской при определении азота по методу Кельдаля является навеска продукта, содержащего от 10 до 100 мг азота. Например, в рыбной муке согласно сопроводительным документам поставщика содержится 65% сырого протеина. Это значит, что в 1 г рыбной муки должно содержаться 650 мг сырого протеина или 104 мг общего азота (при делении на коэффициент 6,25). Таким образом, нам подходит навеска рыбной муки в диапазоне от 0,1 г (10,4 мг азота) до 0,96 г (99,8 мг азота). При этом следует помнить, что очень маленькая навеска не будет репрезентативной, что снижает достоверность результатов, особенно для образцов с низкой гомогенностью. В то же время при взятии очень большой навески, хотя и репрезентативной, увеличиваются продолжительность ее сжигания, а возможно даже неполное сжигание, объем используемого титранта и время титрования. Таким образом, для данного образца рыбной муки с ожидаемым содержанием сырого протеина на уровне 65% оптимальной можно считать навеску 0,6–0,8 г.

Желательно заранее определить для каждого вида сырья и готовой продукции размер оптимальной навески и довести эту информацию до лаборанта, производящего взвешивание, а также поместить таблицу с рекомендуемыми навесками непосредственно у весов. Для жмыхов, шротов, дрожжей, полноожирной сои, БВМК мы обычно берем навеску 0,7–0,9 г; для зерновых, молочной сыворотки, премиксов — 1,0–1,2 г; для кровяной муки — 0,3–0,4 г; для комбикормов — 0,8–1,0 г.

**Объем кислоты для минерализации.** При применении метода Кельдаля в классическом (ручном) варианте требуемый объем концентрированной серной кислоты для минерализации навески составляет 25 мл, в полуавтоматическом или автоматическом (на специальном оборудовании) — 12 мл. (Принцип расчета этой цифры обычно указывают в руководствах для пользователей, прилагаемых к оборудованию для определения сырого протеина.) Следует помнить, что при определении протеина по методу Барнштейна, когда помимо образца минерализации подвергается и бумажный фильтр, а также по методу Кельдаля, когда образец находится в жидком виде (растворимый протеин, индекс дисперсности протеина (PDI), переваримый протеин и т.д.), необходимо добавить еще 3 мл концентрированной серной кислоты. При недостаточном объеме кислоты разложение образца будет неполным, а результат исследования — неверным (часто заниженным).

**Соотношение катализатор / кислота** носит принципиальный характер и влияет на скорость и полноту минерализации образца. Чистая концентрированная серная кислота кипит при температуре 338°C, а разложение образца начинается при 373°C. Для того чтобы повысить температуру кипения кислоты до необходимого уровня (иначе она частично испарится до начала процесса минерализации), добавляют катализаторы — соли различных металлов. В зависимости от вида катализатора соотно-

шение кислота/катализатор колеблется в диапазоне от 1,4 до 2,0. Для стандартного смешанного катализатора, содержащего сульфаты калия и меди, мы берем 7,8 г катализатора на 12 мл кислоты. Многие пользуются стандартными каталитическими «таблетками» промышленного производства, в которых катализатор уже дозирован. Это удобно — не надо взвешивать катализатор перед началом анализа. При этом требуется четко выполнять условия методики: если в ней указано, что нужно использовать две «таблетки» на один образец, то не стоит экономить и класть одну. Такая «экономия» может выйти боком. По нашему опыту, при уменьшении катализатора вдвое время, необходимое для минерализации, вместо одного часа составляло 7–8 часов, что приводило к потере азота из образца и, следовательно, искажало конечный результат. К тому же расход электроэнергии возрастал так же — в 7–8 раз.

*Вид катализатора.* При определении азота методом Къельдаля чаще применяют так называемые медные, селеновые и ртутные катализаторы. Наиболее эффективным признан катализатор на основе оксида ртути ( $HgO$ ), так как по сравнению с другими катализаторами в его присутствии разложение всех видов образцов происходит в 1,5–2 раза быстрее. Однако с экологической точки зрения от ртутного катализатора отказываются в пищевой и комбикормовой промышленности по всему миру. Селеновый и медный катализаторы по своей эффективности приблизительно одинаковы. По литературным данным, использование селенового катализатора при температуре выше  $390^{\circ}\text{C}$  и длительном времени разложения часто приводит к потерям азота, кроме того, он считается наиболее «капризным» и «непредсказуемым» катализатором по сравнению с другими.

Наиболее доступен, надежен и безопасен в работе медный катализатор, представляющий собой смесь 7 г сернокислого калия и 0,8 г сернокислой меди. Его в основном и используют в нашей отрасли при проведении исследований методом Къельдаля.

В двух независимых лабораториях мы провели эксперимент по сравнительной оценке эффективности медного и селенового катализаторов на полуавтоматическом оборудовании с использованием нескольких стандартных образцов. Результаты эксперимента в обеих лабораториях были практически идентичны друг другу. Для всех образцов с селеновым катализатором результаты были достоверно выше, чем с медным, а это противоречит литературным данным.

Таким образом, применение лабораториями разных катализаторов может служить причиной расхождения результатов при определении сырого протеина.

*Время и температура минерализации.* При использовании медного катализатора время, необходимое для полной минерализации (разложения) при температуре  $420^{\circ}\text{C}$ , обычно составляет 50–60 мин для всех видов сырья и готовой продукции при условии правильного выбора размера навесок.

Процесс минерализации условно разделим на два этапа: на первом этапе, когда минералат становится прозрачным, восстановление азота составляет 95–100% (в зависимости от вида образца); на втором — восстанавливается оставшийся азот. При недостаточных времени и темпе-

ратуре минерализации результаты исследования могут быть занижены из-за неполного восстановления азота. Поэтому после осветления раствора процесс минерализации следует продолжить еще как минимум 10–15 мин. Однако если сильно превысить необходимые для разложения образца время (в 1,5–2 раза) и температуру (более  $440^{\circ}\text{C}$ ), возможны потери азота уже от излишнего испарения кислоты, особенно при большой мощности вытяжной системы. Также возможны потери в самом начале процесса разложения из-за повышенного пенообразования, когда образец остается на стенках колбы или даже выплескивается из нее, а также активного испарения при излишне мощной работе вытяжной системы. Пенообразование характерно для образцов с повышенным содержанием жира, а также для жидких образцов. Для гашения пены используют октанол.

Все перечисленное выше может привести к искажению результатов, обычно — к занижению.

*Перегонка (дистилляция) и титрование.* При работе ручным, или классическим методом Къельдаля возможен ряд типичных ошибок. Например, при неправильной сборке перегонного устройства концентрированную щелочь для нейтрализации минерализата иногда приливают не в собранную перегонную систему, а в отдельную колбу для перегонки, которую только потом присоединяют к системе. В этом случае в колбе происходит термическая реакция (взаимодействие концентрированной кислоты и щелочи), при которой часть азота испаряется. Кроме того, часто трубка холодильника перегонной системы не погружена в ресивер (как это указано в ГОСТ), то есть висит над горлышком приемной колбы. Поэтому пар с аммиаком не «пробулькивает» через ресивер, а просто капает в приемную колбу. Потери азота в этом случае неизбежны (испарение аммиака в окружающую среду) и могут достигать 10% от его общего содержания в образце. При использовании автоматического и полуавтоматического метода на специальном оборудовании данной проблемы не существует, так как в подобных системах возможность этих ошибок уже учтена и исключена априори.

Очень важно внимательно относиться к концентрации (титру) кислот или щелочей, которыми оттитровывается дистиллят. (Это касается как ручного, так и автоматического вариантов определения методом Къельдаля.) Хотелось бы обратить внимание на то, что если раствор для титрования будет приготовлен даже из государственного стандарт-титра с действующим сроком годности, его необходимо обязательно перепроверять, так как не всегда он соответствует заявленной концентрации. Особенно это относится к случаю, когда в качестве титрующего раствора применяют щелочь (при обратном титровании, когда ресивером служит серная или соляная кислота). Стандарт-титры щелочей и приготовленные из них титрующие растворы хранятся хуже, чем растворы кислот. При использовании в качестве титрующего раствора серной или соляной кислоты (прямое титрование, когда ресивером служит борная кислота) эти проблемы не так велики, однако титры растворов все равно необходимо перепроверять не реже одного раза в месяц.

Как видим, к расхождению результатов при определе-

нии сырого протеина по методу Къельдаля могут привести: использование различных систем для перегонки и типов титрования, а также ошибки (вольные или невольные) в концентрациях титрующих растворов.

#### Проверка воспроизводимости метода Къельдаля.

Чтобы удостовериться в правильности исследования, необходимо выполнить процедуру проверки. Наиболее простой является проверка воспроизводимости для системы перегонки (дистилляции) при условии, что концентрация титрующих растворов уже проверена. Для этого применяют сульфат аммония с чистотой более 99,5% в количестве ~ 0,150 г (взвешивают с точностью до десяти тысячной доли грамма). Перегонку проводят в стандартных условиях, причем на место колбы с минерализатором образца ставят колбу с навеской сульфата аммония (без предварительной минерализации).

Содержание азота рассчитывают следующим образом:

$$\text{Содержание азота, \%} = \frac{\left( \frac{\text{Количество титранта (мл)}}{\text{навеска образца (г)}} \cdot \frac{\text{Количество контроля (мл)}}{\text{навеска образца (г)}} \right) \cdot \text{Нормальность титранта}}{21,09}.$$

Для оценки воспроизводимости используют следующую формулу:

$$\text{Воспроизводимость, \%} = \frac{\text{Содержание азота, \%}}{21,09}.$$

При получении значения воспроизводимости в пределах 99–101% считают, что система перегонки и титрующие растворы подготовлены правильно.

Чтобы оценить правильность выполнения метода в целом, нужно провести все три этапа исследования (минерализация, перегонка, титрование) для образцов с известным содержанием азота или протеина. Это могут быть образцы очищенных аминокислот (в глицине азота содержится 18,66%, в триптофане — 13,72%) или образцы с известным содержанием азота и/или протеина, участвующие в межлабораторных сличительных испытаниях (в рамках программ «кольцевых тестов»), которые рассылаются, например, AAFCO ([www.aafco.org](http://www.aafco.org)) или BIPERA ([www.bipera.org](http://www.bipera.org)).

#### Сырой или аминокислотный протеин?

Для моносырья растительного происхождения с низким содержанием протеина (пшеница, ячмень, кукуруза, горох, овес, тритикале) метод Къельдаля при правильном его применении вполне информативен и достаточен при расчете рецептов. С небольшим допуском можно ориентироваться на него и при определении сырого протеина в жмыяхах, шротах, дрожжах и полножирной сое. Хотя уже были случаи добавления в эти продукты минеральных азотосодержащих соединений для повышения уровня сырого протеина, следовательно, и цены.

Но когда вопрос заходит о высокопroteиновых компонентах, таких как рыбная, мясная, мясокостная, перьевая и кровяная мука, кукурузный и пшеничный глютен, пшеничный и рисовый протеин, соевые изоляты и концентраты, то здесь метод Къельдаля уже недостаточно информативен. Для таких дорогостоящих видов сырья высок риск фальсификации более дешевыми компонентами с высоким содержанием азота, например мочевиной (карбамидом), меламином, солями аммония и/или селитрами. Эти манипуляции приносят фальсификаторам большие прибыли, а производителям и потребителям кормов — большие проблемы. Конечно, случаи отравления такими фальсификатами маловероятны из-за небольшого процента их ввода в комбикорм, однако снижение продуктивности животных и птицы — вполне реально. И ведь по содержанию сырого протеина такое сырье будет соответствовать всем сопроводительным документам поставщика, и претензии к нему предъявить будет невозможно. Но аминокислот в фальсификатах будет намного меньше, чем должно быть в подлинном продукте. Производимые нами корма предназначены не для клубеньковых бактерий, которые могут потреблять чистый азот. Наша отрасль занимается кормлением животных и птицы, которым нужны аминокислоты для синтеза собственного белка, а не общий азот. Поэтому при оценке белковой составляющей сырья пора ориентироваться на показатель «сумма аминокислот», или «аминокислотный протеин», а не на «сырой протеин». ■