

Nr. 122.

18. des. 1980.

Hraðvirk aðferð til magnákvörðunar á próteini.

Kristján Kristinsson,efnaverkerfræðingur.ÚRDRÁTTUR.

Kjel-Foss Automatic er hraðvirkt tæki til próteinmælinga, byggt á hinni hefðbundnu Kjeldahl aðferð. Hver greining tekur aðeins rúmlega 12 mínútur og afköstin eru 20 sýni á klukkustund. Niðurstöður birtast sem % köfnunarefni eða % prótein.

Sundrun sýnis, eiming og títrun fylgja hinni hefðbundnu Kjeldahl aðferð. Notkun annarra hvata, herra hitastig og að aðferðin er sjálfvirk, gerir það hinsvegar kleift að stytta greiningartímann um nokkrar klukkustundir.

Í Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hafa verið gerðar samanburðarmælingar á loðnumjöli með þessu nýja tæki og hinni hefðbundnu Kjeldahl aðferð og eru niðurstöður á þá leið að Kjel-Foss Automatic gefur að meðaltali 0.8% hærri niðurstöður en Kjeldahl aðferðin.

Kjel-Foss Automatic er viðurkennd af AOAC sem sjálfvirk Kjeldahl aðferð, en hefur ekki enn verið tekin upp í sölusamningum hjá íslenskum mjölframleiðendum. Það er þó aðeins tímaspursmál hvenær aðferðin verður viðurkennd í sölusamningum og má búast við slíkri viðurkenningu fljótlega á næsta ári.

EFNISYFIRLIT:

Bls.

I. INNGANGUR.....	2
II. LÝSING Á KFA	3
III SAMANBURÐUR : KFA OG KJELDAHL	5
Mynd I. Skýringarmynd sem sýnir „hringekju“ og Kjeldahl flöskur	4
Tafla 1. Samanburðarmælingar með KFA og Kjeldahl	6-7

I. INNGANGUR.

Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hefur nýlega fengið til umráða tæki, sem gerir það kleift að mæla prótein, t.d. í fiskmjöli, á mun skemmri tíma en áður var hægt með Kjeldahl aðferðinni, en tækið vinnur eftir þeirri aðferð. Tæki þetta er, að því best er vitað, hið eina sinnar tegundar hér á landi. Það er í eigu Síldarverksmiðja ríkisins, en rekstur þess í höndun Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins.

Tækið sem nefnist Kjeld-Foss Automatic (s.sk. KFA) er alsjálfvirkt og byggir sem fyrr segir á hinni hefðbundnu Kjeldahl aðferð. Þetta skilur hana frá ýmsum öðrum hraðvirkum aðferðum til próteinmælinga, s.s. mælingu með innrauðu ljósi. Eftirtaldir liðir eru í greiningarferlinum: sundrun sýnis, kæling, þynning með vatni, gufueiming og títrun á ammóníaki. Tækið mælir raunverulega köfnunarefni, bundið sem ammóníak, sem síðan er umreiknað í prótein út frá hlutfalli köfnunarefnis í próteinum. Þetta hlutfall er mismunandi eftir fæðutegundum, 1/6.37 í mjólk og mjólkurafurðum (15.7% köfnunarefni), 1/6.25 í kjöti, fiski og flestum kornvörum (16.0% köfn. efni) og 1/5.7 í hveiti (17.5% köfn. efni). Tölvueining tækisins umreiknað jafnóðum köfnunarefni í prótein, allt eftir því hvaða tegund sýnis er verið að mæla. Einnig er hægt að ráða hvort útskrift er í % prótein eða % köfnunarefni .

Hefðbundin Kjeldahl greining skiptist í þrjá hluta:

1. Sundrun: Sýni er soðið í fullsterkri brennisteinssýru. Þetta brýtur sýnið niður og köfnunarefnið fer í lausn sem ammóníumjón.
2. Eiming: Eftir kælingu og þynningu með vatni er lausn gerð basísk með natriúmhydroxíði. Við það er köfnunarefnið bundið sem ammóníak. Ammóníakið er eimað yfir í títrunarglas.
3. Títrun: Ammóníakið er títrað með brennisteinssýru og myndast þá ammóníumsúlfat og vatn. Magn brennisteinssýru, sem títrað er með, er í réttu hlutfalli við magn ammóníaks sem fyrir er. Þar sem allt köfnunarefnið er á formi ammóníaks, þá er hægt að umreikna það yfir í magn próteins á þann hátt sem getið var um hér að framan.

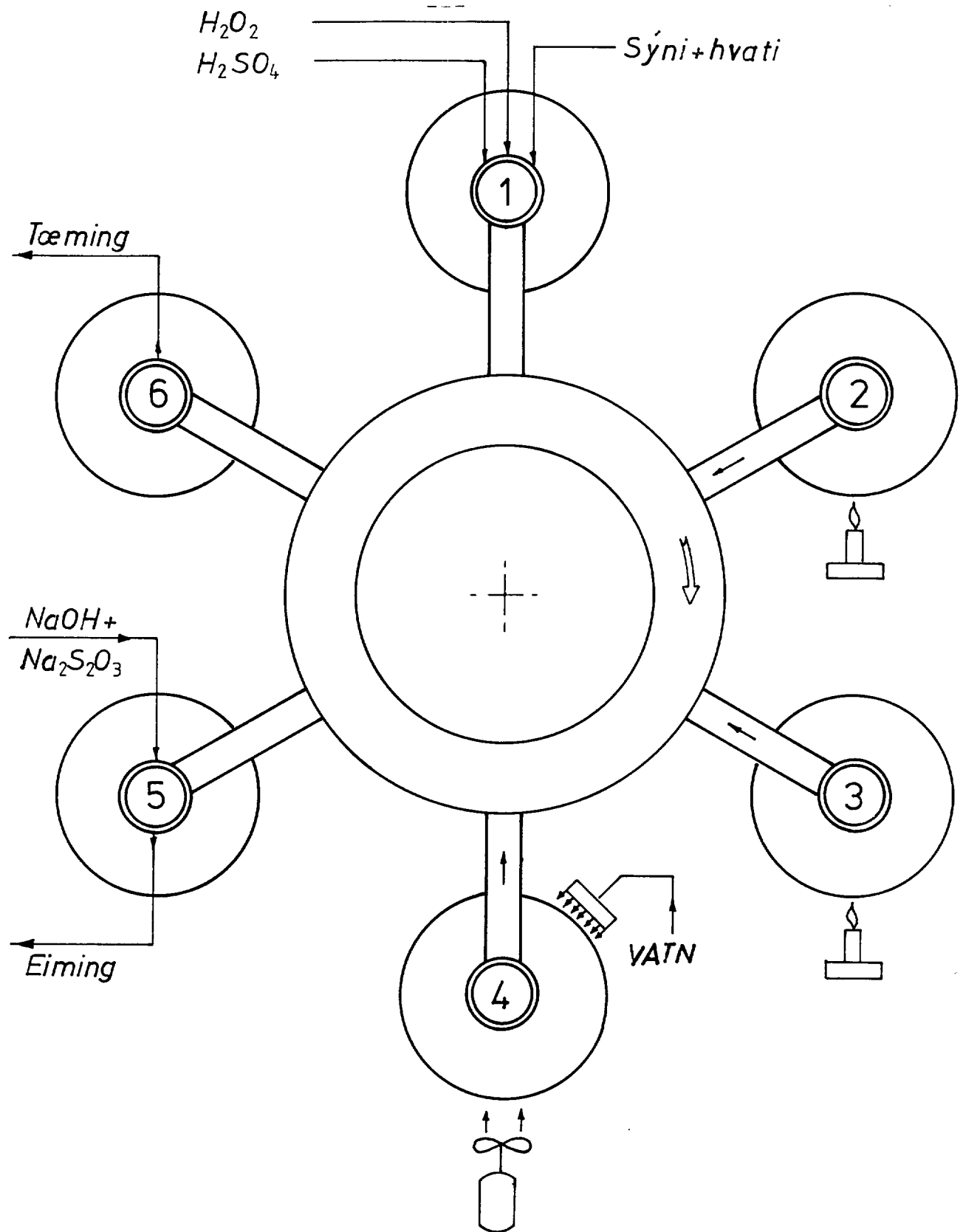
Allir þessir þættir eru sameiginlegir með Kjeldahl og KFA. Munurinn er sá, að í KFA er allur ferillinn sjálfvirkur, sýnið er sett í tækið og niðurstöður koma eftir rúmlega 12 mínútur.

LÝSING Á KFA.

Tækinu er skipt í margar einingar, þar sem hinar ýmsu aðgerðir fara fram. Eins og fram kemur af mynd 1 þá eru í tækinu 6 Kjeldahl flöskur, fastar við s.k. „hringekju“, sem snýst á þriggja mínútna fresti, og færast þá flöskurnar til um 60°. Í stöðu, merktri 1, er sýni, hvati og brennisteinssýra sett í og er það eina aðgerðin sem stjórnandi tækisins gerir, tækið sér um afganginn. Í stöðu 2 og 3 er sýni brotið niður með hitun og í stöðu 4 er lausnin kæld og vatni bætt í til þynningar. Í stöðu 5 er lausnin gerð basísk og ammóníak eimað yfir í títrunareiningu tækisins, þar sem títrun fer fram. Þegar flaska færast úr stöðu 5 yfir í 6 þá er títrun lokið og tölvueining tækisins gefur niðurstöðu á ljósaborði eða prentara. Í stöðu 6 er svo flaskan tæmd. Það líða því aðeins rúmlega 12 mínútur frá því að sýni er sett í tækið þar til niðurstöður eru ljósar.

Að framansögðu ættu höfuðkostir þessa tækis að vera ljósir, þ.e. mikil afköst og hraðvirkni, því hægt er að efnagreina 20 sýni á klukkustund og hver greining tekur aðeins rúmlega 12 mínútur. Það er auk þess mjög nákvæmt þar sem minni hætta er á mælingaskekkju í KFA en venjulegri Kjeldahl greiningu, það gerir sjálfvirknin. Hins vegar er nauðsynlegt að stilla tækið nákvæmlega, a.m.k. einu sinni á dag, til að tryggja að niðurstöður séu réttar. Það er gert með því að mæla efni með þekktu köfnunar-efnismagni.

Helsti ókostur við þessa aðferð er magn sýnisins, því ef um fast sýni með yfir 45% próteini er að ræða, þá eru aðeins vigtuð út um 500mg af sýninu, sem er í það minnsta að okkar dómi. Það þýðir að mölun og blöndun fastra sýna verður að vera mjög góð, ef samræmi á að vera gott milli einstakra mælinga. Þá er af tækinu all nokkur hávaði og mikill hiti, sem stafar frá gasbrennurunum. Loftræsting þarf því að vera mjög góð, þar sem tækið er staðsett.



MYND 1

Skýringarmynd sem sýnir „hringekju“ og Kjeldahl flöskur.
 Staðsetning 1 : Sýni, hvati, brennisteinssýra og peroxíð setti í tóma Kjeldahl flösku. Staðsetning 2 : Hitun með gasloga.
Staðsetn. 3 : Hitun með gasloga. Staðsetn. 4 : Kæling með blæstri og þynning lausnar með vatni. Staðsetn. 5 : Natriumhydroxíði og natriumpíósúlfati bætt í og ammóníak eimað yfir í títurarbikar.
Staðsetn. 6 : Flaska tænd.

SAMANBURÐUR: KFA OG KJELDAHL.

Niðurstaða úr venjulegri Kjeldahl mælingu og KFA á að vera sú sama, enda um sömu aðferð að ræða í báðum tilvikum. Það hefur samt komið í ljós, að ef um mikið próteinmagn er að ræða, t.d. loðnumjöl (> 60% prótein), eða ef bygging efnis er þannig að mjög erfitt er að brjóta það niður t.d. níkóteinsýra (arómatísk), þá gefur KFA heldur hærri niðurstöður en Kjeldahl. Ástæðan er talin sú að sundrun sýna í KFA sé fullkomnari, hún gerist á mun skemmri tíma, við herra hitastig og minni hætta sé á töpum í efninu vegna þess að ferillinn er sjálfvirkur. Af þessum ástæðum hafa fiskmjölsframleiðendur mikinn áhuga á að fá þessa aðferð viðurkennda í sölusamningum og er verið að vinna að því um þessar mundir. Aðferðin er þegar viðurkennd sem sjálfvirk Kjeldahl aðferð innan Assoc. of Official Anal. Chemists (AOAC) í Bandaríkjunum (AOAC methods nr. 7.021, 7.022, 7.023 and 7.024, p. 127, 1980).

Í Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins hafa verið gerðar samanburðarmælingar með Kjeldahl og KFA (sjá töflu 1.). Efnagreind voru 80 sýni af loðnumjöli og niðurstöður bornar saman. Meðaltalsmunur milli Kjeldahl og KFA reyndist vera 0.8% prótein, þ.e. KFA gaf 0.8% hærri niðurstöður en Kjeldahl að meðaltali. Meðalstaðalfrávik í KFA reyndist vera 0.2% prótein, en staðalfrávik í Kjeldahl er ekki þekkt. Samkvæmt úttekt sem gerð var fyrir Alþjóðasamband fiskmjölsframleiðenda (IAFFM), þá reyndist KFA gefa að meðaltali 0.4% hærri niðurstöður en Kjeldahl, en bornar voru saman niðurstöður frá 15 rannsóknastofum.

Nú þegar er farið að mæla vaktasýni af loðnumjöli í KFA, en í framtíðinni er ætlunin að tækið verði notað til mælinga á útflutningssýnum, þ.e. þegar aðferðin verður viðurkennd í sölusamningum.

Tafla 1. Samanburðarmælingar á KFA og Kjeldahl.

<u>Nr.</u>	<u>Kjeldahl</u> <u>[% prótein]</u>	<u>KFA</u> <u>[% prótein]</u>	<u>Mismunur</u> <u>[% prótein]</u>	<u>Fjöldi KFA</u> <u>mæligilda</u>	<u>Staðalfrávik í KFA,</u> <u>sD [% prótein]</u>
1	69.8	70.5	+ 0.7	4	0.2
2	70.0	70.2	+ 0.2	5	0.2
3	68.1	68.7	+ 0.6	4	0.3
4	70.3	70.7	+ 0.4	4	0.2
5	70.0	70.4	+ 0.4	4	0.2
6	68.4	69.2	+ 0.8	4	0.3
7	69.0	69.4	+ 0.4	3	0.2
8	71.7	73.0	+ 1.3	4	0.2
9	68.0	69.2	+ 1.2	4	0.3
10	68.8	70.2	+ 0.4	4	0.2
11	69.4	70.8	+ 1.4	4	0.1
12	68.4	69.6	+ 1.2	4	0.3
13	69.7	71.0	+ 1.3	4	0.1
14	65.6	66.5	+ 0.9	4	0.2
15	68.5	69.1	+ 0.7	5	0.2
16	67.0	67.2	+ 0.2	4	0.3
17	66.5	66.7	+ 0.2	4	0.1
18	71.9	72.7	+ 0.8	4	0.3
19	65.4	66.4	+ 1.0	4	0.2
20	69.3	70.8	+ 1.5	4	0.4
21	69.2	70.5	+ 1.3	4	0.3
22	69.0	70.1	+ 1.1	4	0.1
23	70.0	71.0	+ 1.0	4	0.2
24	69.3	70.4	+ 1.1	4	0.2
25	68.0	69.2	+ 1.2	4	0.1
26	68.3	69.0	+ 0.7	4	0.1
27	70.0	70.4	+ 0.4	4	0.2
28	69.0	70.2	+ 1.2	4	0.2
29	66.9	68.2	+ 1.3	4	0.2
30	66.8	67.1	+ 0.3	3	0.2
31	67.5	68.9	+ 1.4	3	0.3
32	69.5	70.6	+ 1.1	4	0.2
33	71.0	71.6	+ 0.6	3	0.1
34	67.2	67.3	+ 0.1	4	0.3
35	67.0	66.9	÷ 0.1	4	0.2
36	63.1	64.1	+ 1.0	6	0.6
37	67.6	69.4	+ 1.8	4	0.2
38	67.7	69.0	+ 1.3	4	0.2
39	68.6	70.2	+ 2.6	4	0.2
40	68.7	70.2	+ 1.5	4	0.2
41	68.5	69.5	+ 1.0	4	0.1
42	67.6	68.5	+ 0.9	4	0.1
43	68.4	69.1	+ 0.7	3	0.1
44	68.2	68.7	+ 0.5	4	0.2
45	68.5	68.8	+ 0.3	4	0.3
46	68.3	68.9	+ 0.6	3	0.1
47	70.0	70.6	+ 0.6	4	0.1
48	71.2	72.1	+ 0.9	4	0.1
49	69.0	69.1	+ 0.1	4	0.2

<u>Nr.</u>	<u>Kjeldahl [% prótein]</u>	<u>KFA [% prótein]</u>	<u>Mismunur [% prótein]</u>	<u>Fjöldi KFA mæligilda</u>	<u>Staðalfrávik í KFA, sD [% prótein]</u>
50	67.9	68.4	+ 0.5	4	0.2
51	67.4	68.0	+ 0.6	4	0.2
52	67.6	68.4	+ 0.8	4	0.2
53	68.9	69.5	+ 0.6	4	0.3
54	68.3	69.7	+ 1.4	4	0.3
55	65.0	65.7	+ 0.7	4	0.2
56	65.0	64.9	÷ 0.1	4	0.2
57	63.5	64.0	+ 0.5	4	0.3
58	72.1	73.3	+ 1.2	4	0.2
59	70.0	71.4	+ 1.4	6	0.2
60	68.6	69.7	+ 1.1	8	0.4
61	69.0	69.5	+ 0.5	3	0.2
62	69.1	69.5	+ 0.4	3	0.3
63	68.1	68.9	+ 0.8	3	0.1
64	68.1	68.9	+ 0.8	3	0.4
65	67.0	67.7	+ 0.7	3	0.4
66	69.3	70.1	+ 0.8	2	0.3
67	68.7	69.8	+ 1.1	3	0.3
68	68.6	69.3	+ 0.7	3	0.2
69	68.8	69.5	+ 0.7	4	0.4
70	70.7	71.1	+ 0.4	4	0.1
71	66.9	67.6	+ 0.7	4	0.1
72	70.4	70.4	0	4	0.3
73	68.7	69.4	+ 0.7	3	0.1
74	71.1	71.2	+ 0.1	4	0.3
75	68.0	68.9	+ 0.9	4	0.1
76	69.5	69.6	+ 0.1	4	0.1
77	69.3	69.3	0	6	0.4
78	68.5	68.7	+ 0.2	4	0.2
79	68.4	69.2	+ 0.8	4	0.2
80	68.4	69.4	+ 1.0	4	0.2