

KINGA MYSZKA
BEATA KAMIŃSKA
ANNA FRAŚ
MAGDALENA PLOCH
DANUTA BOROS

Samodzielna Pracownia Oceny Jakości Produktów Roślinnych
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB w Radzikowie

Metoda Dumasa alternatywną metodą oznaczania białka w produktach roślinnych — badania porównawcze z metodą Kjeldahla

Dumas method as an alternative approach for determining protein contents of plant products — comparative study with Kjeldahl method

Wzrastające wymagania jakościowe dotyczące znajomości zawartości białka w różnych surowcach roślinnych jak również w żywności i paszach spowodowały szersze użycie metody Dumasa, która jest metodą nawet starszą niż powszechnie od lat stosowana metoda Kjeldahla. Celem badań było porównanie wyników zawartości białka w 138 próbkach ziarna trzech rodzajów zbóż, pszenicy, owsa i jęczmienia oraz 4 próbkach śruty rzepakowej i jednej sojowej, wyprodukowanych w warunkach polskich, uzyskanych tymi dwiema metodami standardowymi. Stwierdzono wysoką korelację między wynikami otrzymanymi metodą Dumasa i Kjeldahla, wynosząca 0,9983 dla całego materiału badawczego. Wyniki uzyskane metodą Dumasa były średnio o 0,46 jednostki procentowej wyższe, aniżeli te otrzymane metodą Kjeldahla, co stanowiło 2,4%, jednakże różnice pomiędzy metodami zależały od rodzaju badanego produktu roślinnego. Stwierdzone wysokie korelacje między wynikami otrzymanymi tymi dwiema metodami wskazują, iż metoda Dumasa z powodzeniem może być stosowana, jako metoda alternatywna do badania ziarna zbóż, śruty rzepakowej i sojowej, na zawartość białka.

Słowa kluczowe: azot ogólny, metoda Dumasa, metoda Kjeldahla, śruta rzepakowa, śruta sojowa, ziarno zbóż

Increased qualitative demand for the knowledge of protein contents in various plant products as well in foods and feeds has led to wider used of the Dumas method, which is even older technique than commonly employed Kjeldahl procedure. Aim of the study was to compare the results of protein contents of 138 samples of cereal grains, such as wheat, barley and oat and 5 samples of meals produced from rapeseed and soybean in Polish agricultural conditions, obtained by the Kjeldahl and Dumas methods. Very high correlation coefficient was obtained between protein contents analysed with the Dumas and Kjeldahl methods, equal to 0.9983 for the entire material tested. However, the results obtained by Dumas method were, on average, by 0.46 percentage units higher than those analysed with Kjeldahl procedure. The differences between methods applied depended on the materials to be

analysed. These results suggest that Dumas method can be successfully used as an alternative method for testing content of protein in cereal grains and rapeseed and soybean meals.

Key words: cereal grains, Dumas method, Kjeldahl method, rapeseed meal, soybean meal, total nitrogen

WSTĘP

Poziom białka ogółem jest ważnym kryterium jakościowym zarówno w przypadku ziarna zbóż jak i nasion rzepaku oraz roślin strączkowych niezależnie od sposobu ich wykorzystania. W pszenicach chlebowych zawartość tego składnika jest cechą elementarną jakości ziarna, gdyż z wyższą zawartością białka w ziarnie wiąże się bezpośrednio jego wyższa wartość wypiekowa (Gąsiorowski, 2004; Shewry, 2007). Wysoka zawartość białka jest też cechą pożądaną w ziarnie zbóż pastewnych, nasionach, śrutach rzepakowych i sojowych, przeznaczonych do sporządzania mieszanek paszowych (Rakowska, 1978; Leeson i in., 1987; Hanczakowski i in. 2001; Krotz i in., 2008). Dla ułożenia w pełni zbilansowanych dawek pokarmowych dla różnych grup zwierząt gospodarskich dokładna znajomość zawartości białka w poszczególnych składnikach paszy jest koniecznością (NŻD, 1996; Gizzi i Givens, 2004). Odmienne wymagania pod względem zawartości białka są stawiane ziarnu jęczmienia browarnego, które jako surowiec do produkcji słoðu wysokiej jakości powinno charakteryzować się zawartością tego składnika w ściśle określonym przedziale (Baca i Gołębiowski, 1997; Klockiewicz-Kamińska, 2005). Zawartość białka jest tak ważną cechą, że stała się wytyczną dla niektórych transakcji handlowych ziarna zbóż. Cena zakupu podlega podwyższeniu lub obniżeniu w zależności od faktycznej zawartości białka w ziarnie pszenicy zwyczajnej dostarczonej do magazynu/magazynów interwencyjnych. Minimalna zawartość białka w ziarnie tego gatunku zboża oferowanym do skupu interwencyjnego powinna wynosić 10,5 procent (strona internetowa Agencji Rynku Rolnego). Monitorowanie ilości białka musi, więc być wykonane z bardzo dużą dokładnością w celu prawidłowego ustalenia wartości użytkowej w/w produktów roślinnych.

Do tej pory metodą powszechnie używaną do bezpośredniego oznaczania białka w produktach roślinnych była wieloetapowa metoda Kjeldahla, używana od przeszło 120 lat (Kjeldahl, 1883), w której stosuje się agresywne substancje chemiczne, tj. stężony kwas siarkowy i stężoną zasadę sodową. Z tego względu metoda ta wymaga umiejętnego postępowania z pozostałościami w/w odczynników po analizie, aby zniwelować zagrożenie dla środowiska, a także zachowania dużej ostrożności w toku pracy przez osoby wykonujące samą analizę. W ostatnim czasie coraz częściej stosuje się zamiennie metodę równie starą (Dumas, 1831), lecz mniej rozpowszechnioną metodę Dumasa, całkowicie zautomatyzowaną, niewymagającą tak dużej, jak w przypadku metody Kjeldahla, ingerencji człowieka w analizę. Niewątpliwą zaletą metody Dumasa, poza znacznie krótszym czasem analizy, jest proekologiczne podejście do całego procesu oznaczania białka, a mianowicie wysokotemperaturowe spalanie próbki w układzie zamkniętym, z wykorzystaniem niegroźnych substancji redukujących, jak wolfram, miedź i jej tlenek oraz gazów, tlenu i dwutlenku węgla. Inną korzyścią stosowania tej metody jest brak potrzeby

składowania niebezpiecznych odpadów. Wraz z udoskonaleniem aparatury metoda Dumasa coraz częściej jest stosowana jako metoda alternatywna oznaczania białka w wielu laboratoriach na świecie (Williams i in., 1998; Watson i Galliher, 2001). Celem naszych badań było porównanie wyników zawartości białka w różnych materiałach roślinnych wyprodukowanych w warunkach polskich uzyskanych dwiema metodami standardowymi, metodą Kjeldahla i metodą Dumasa.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło ziarno 138 odmian i linii hodowlanych trzech gatunków zbóż: 38 pszenicy zwyczajnej (*Triticum vulgare* L.), 83 owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.), w tym 39 form oplewionych i 39 form obłuszczonych oraz 5 form nagich, 17 jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.). Dodatkowym materiałem analitycznym były cztery próbki śruty rzepakowej i jedna śruty sojowej. Wszystkie próbki materiału roślinnego zmielono na młynku laboratoryjnym Cyclotec wyposażonym w sita o średnicy oczek 0,5 mm.

W materiale badawczym oznaczono zawartość azotu w przeliczeniu na białko ogólne metodą Kjeldahla z wykorzystaniem aparatu Kjeltec Auto 1030 Analyser (Tecator, Szwecja) oraz metodą Dumasa na aparacie Rapid N Cube (Elementar, Niemcy).

W metodzie Kjeldahla 1 g próbki zmielonego ziarna zbóż lub 0,5 g śruty rzepakowej bądź sojowej mineralizowano w kolbach destylacyjnych przez 1 godzinę w temperaturze 420°C stężonym kwasem siarkowym z dodatkiem katalizatorów celem przekształcenia całego azotu w jony amonowe i następnie związanie ich w siarczan amonu. Zmineralizowane próbki przeniesiono do aparatu destylacyjnego, następnie dodano 40% zasadę sodową celem wyparcia amoniaku z siarczanu amonu i przetransportowania go z parą wodną do odbieralnika zawierającego kwas borowy z domieszką indykatorów czułych na zmianę barwy pod wpływem amoniaku. Ilość amoniaku związanego w postaci boranu amonu zmiareczkowano standardowym roztworem kwasu solnego. Procedura powyższa jest zgodna z metodą standardową 925,10 wg AOAC (1995).

W metodzie Dumasa 250 mg próbki zmielonego materiału roślinnego spopielało w rurze spalania w temperaturze 960°C w obecności tlenu. W trakcie tego procesu azot zawarty w związkach organicznych zostaje przetworzony na tlenek azotu. Następnie po katalitycznym dopaleniu w temperaturze 800°C powodującym utlenianie oraz osuszeniu w P₂O₅, tlenek azotu jest redukowany do azotu cząsteczkowego na reduktorze (wolframem) i przenoszony za pomocą gazu nośnego, którym jest CO₂, do celi detektora przewodności cieplnej celem ilościowego oznaczenia. Po wprowadzeniu wartości naważki do komputera, za pomocą wzorów empirycznych przeliczono procentową zawartość azotu na zawartość białka. Oznaczenie azotu wg metody Dumas wykonano zgodnie z procedurą 990.03 wg AOAC (1995).

W obu metodach zastosowano ten sam współczynnik przeliczeniowy azotu na białko (%N × 6,25). Wszystkie wartości wyrażono w procentach suchej masy. Wyniki uzyskane obu metodami porównano obliczając współczynnik korelacji liniowej Pearsona.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badania porównawcze wykonano ogółem na 143 próbach ziarna trzech zbóż, pszenicy, owsa i jęczmienia oraz śruty rzepakowej i sojowej. Tak różnorodny materiał roślinny użyty do badań był bardzo zróżnicowany pod względem zawartości białka ogółem, średnio od 10,5 do 42% (tab. 1). Spośród zbóż najniższymi zawartościami białka charakteryzowało się ziarno pszenicy zwyczajnej, w zakresie od 9,4–12,2%, najwyższymi ziarno owsa nagiego i obłuszczonego, w zakresie od 14,3–18,9%. Materiałem analizowanym o najwyższej zawartości białka były śruty rzepakowe, u których poziom białka wynosił od 40 do 47,2%.

Tabela 1
Zawartość białka w ziarnie różnych gatunkach zbóż oraz w śrutach rzepakowych i sojowej oznaczona metodą Kjeldahla i Dumasa Protein contents of various cereal grains and rapeseed and soybean meals obtained by the Kjeldahl and Dumas methods

Ziarno/śruta Grain/meal	Liczba próbek No of samples (n)	Białko (%SM) Protein (%DM)		Różnica Difference K & D	Błąd metody Method error (%)		Stosunek Ratio K/D
		Kjeldahl	Dumas		Kjeldahl	Dumas	
Jęczmień jary Spring barley	17	12,94 (12,17–13,79)*	13,48 (12,62–14,14)*	0,54	0,33	0,75	0,960
Pszenica zwyczajna Common wheat	38	10,54 (9,39–12,15)	11,08 (9,84–12,67)	0,54	0,33	0,83	0,951
Owies oplewiony Hulled oat	39	12,84 (11,69–14,66)	13,03 (11,79–15,20)	0,19	0,70	0,86	0,985
Owies nagi i obłuszczonego Naked and hullless oats	44	16,24 (14,31–18,88)	16,80 (14,62–19,54)	0,56	0,64	0,66	0,967
Śruta rzepakowa i sojowa Rapeseed and soybean meals	5	41,95 (37,1–47,21)	42,43 (37,79–47,76)	0,48	0,28	0,21	0,989
Wartość średnia Mean value		14,30	14,76	0,46	0,52	0,76	0,968

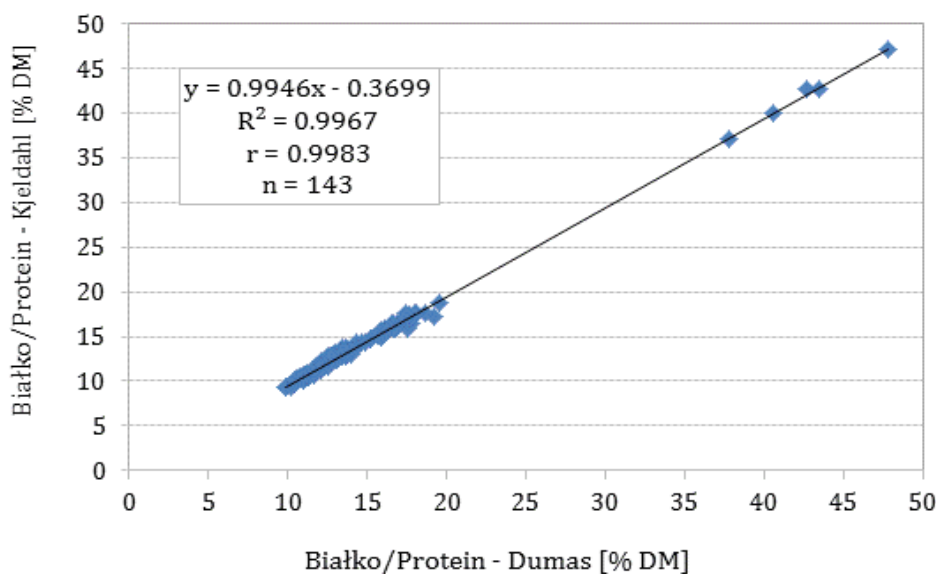
* W nawiasach podano zakres zmienności zawartości białka w badanych produktach roślinnych

* In brackets the range of protein contents in plant materials analysed is given

Wyniki zawartości białka uzyskane metodą Dumasa były średnio o 2,4 % wyższe niż te otrzymane metodą Kjeldahla, a rozbieżność w ilości tego składnika między metodami wynosiła 0,46 jednostki procentowej. Różnice w ilości białka pomiędzy metodami zależały również od rodzaju badanego produktu roślinnego. W przypadku ziarna pszenicy różnica w zawartości białka na korzyść metody Dumas wyniosła średnio 5,1% (0,54 jedn. procent.), jęczmienia 4,2% (0,54 jedn. procent.), owsa nagiego i obłuszczonego 3,4% (0,56 jedn. procent.). Natomiast w przypadku owsa oplewionego oraz śrut rzepakowych i sojowej różnica pomiędzy metodami była bardzo niewielka i wynosiła odpowiednio 1,5% oraz 1,1% (0,19 oraz 0,48 jedn. procent.). Wyniki przez nas uzyskane są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, przy czym różnica w ilości oznaczonego przez nich białka, ściślej azotu, tymi dwiema metodami była tym większa im więcej nieamonowych form azotu znajdowało się w materiale badawczym (Daun i DeClercq, 1994;

Simonne i in., 1997; Wiles i in., 1998; Williams i in., 1998; Watson i Galliher, 2001; Marco i in., 2002; Jung i in., 2003; Meller i in., 2007). W obu metodach składnikiem bezpośrednio oznaczanym jest azot i dopiero w ilości tego składnika wyliczany jest poziom białka ogółem. Do białka ogólnego zaliczane są wszystkie składniki zawierające azot, włączając składniki azotowe niebiałkowe. Różnica w zawartości białka w analizowanych produktach uzyskana między tymi dwiema metodami może być głównie związana ze stopniem odzyskania całkowitej ilości azotu w badanej próbce. W metodzie Kjeldahla mierzony jest ilościowo azot wchodzący w skład związków amonowych oraz azotowych związków organicznych, które łatwo dają się w trakcie mineralizacji próbki przekształcić w związki amonowe. Inne formy azotu występujące w materiałach roślinnych, jak azot w postaci wolnej, czy azotanów, azotanów oraz nitryli są bardziej efektywnie oznaczane w metodzie Dumasa (Williams i in., 1998; Möller, 2009).

Obie metody charakteryzują się podobnym błędem oznaczania, który wynosi średnio 0,56%, przy czym nieco większą dokładność analizy azotu wykazano w przypadku metody Kjeldahla (błąd poniżej 0,5), w porównaniu z metodą Dumasa (błąd poniżej 0,7%) (tab. 1). Być może jest to związane z 4-krotnie lub 2-krotnie niższą naważką próbki braną do analizy azotu w przypadku ziarna zbóż i śrut rzepakowych oraz sojowych w metodzie Dumasa, co jednocześnie wskazuje na konieczność bardzo dobrej homogenności próbek po zmieleniu jak również bardzo dokładnego ich naważenia.



Rys. 1. Zależność między zawartością białka (% SM) uzyskaną metodami Dumasa i Kjeldahla
Fig. 1. Relationship between protein contents (% DM) obtained by the Dumas and Kjeldahl methods

Porównując wyniki uzyskane metodą Dumasa i metodą Kjeldahla, stwierdzono wysoką zależność między nimi. Współczynnik korelacji liniowej Pearsona dla wartości

uzyskanych tymi dwiema metodami wynosił $r = 0,9983$ (rys. 1). Równie wysokie współczynniki korelacji ($r = 0,999$) uzyskali Watson i Galliher (2001) oraz Beljkaš i in. (2010) analizując ziarna różnych zbóż jak również śrutę sojową. Tak wysoka korelacja między wynikami otrzymanymi tymi dwiema metodami wskazuje, iż metoda Dumasa może być z powodzeniem stosowana, jako metoda alternatywna do badania ziarna zbóż i śruty rzepakowej i sojowej na zawartość białka. Wyliczone równanie regresji ($y = 0,9946x - 0,3699$, gdzie x — wartość dla białka oznaczona metodą Dumasa) umożliwi przeliczenie zawartości białka oznaczonego metodą Dumasa na wartości jakie można by uzyskać stosując metodę Kjeldahla (rys. 1). Równanie regresji może być wykorzystane do ekstrapolacji wyników w przypadku np. klasyfikowania nowych odmian jęczmienia browarnego w klasach jakości ustalonych dla zawartości białka oznaczonego metodą Kjeldahla.

Główną zaletą stosowania metody Dumasa w porównaniu z metodą Kjeldahla jest znacznie większa szybkość analizy i bezpieczne wykonanie całej procedury oznaczania azotu. Te same korzyści stosowania metody Dumasa były podnoszone przez innych autorów testujących tę alternatywną metodę oznaczania ilościowego azotu w ziarnie zbóż i produktach spożywczych (Williams i in. 1988; Watson i Galliher, 2001; Saint-Denis i Goupy, 2004; Beljkaš i in., 2010).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Wysoka korelacja między wynikami otrzymanymi dwiema metodami wskazuje na zasadność stosowania metody Dumasa jako metody alternatywnej do rutynowego oznaczania białka w różnych materiałach roślinnych, takich jak ziarna zbóż czy nasiona rzepaku i soi oraz śruty z nich otrzymane.
2. Z uwagi na wyższe wartości białka uzyskiwane metodą Dumasa koniecznym wydaje się opracowanie nowych norm dla poszczególnych klas jakości, w szczególności dla pszenicy zwyczajnej oraz dla jęczmienia jarego, dla których zawartość białka decyduje o ich wartości wypiekowej czy browarnej.

LITERATURA

- Agencja Rynku Rolnego. <http://www.arr.gov.pl>.
- AOAC. 1995. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 16th ed. AOAC, Arlington, method 990.03 (Dumas).
- AOAC. 1995. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 16th ed. AOAC, Arlington, method 925.10 (Kjeldahl).
- Baca E., Gołębiewski T. 1997. Nowe spojrzenie na wskaźniki warunkujące wartość technologiczną jęczmienia i słodu browarnego. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.* 10: 18 — 22.
- Beljkaš B., Matić J., Milovanović I., Jovanov P., Mišan A., Šarić L. 2010. Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accred. Qual. Assur.* 15: 555 — 561.
- Dumas, J. B. A. 1831. *Procedes de l'analyse organique*, *Ann. Chim. Phys.* 247: 198 — 213.
- Daun J.K., DeClercq D.R.. 1994. Comparison of combustion and Kjeldahl methods for determination of nitrogen in oilseeds. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 71 (10): 1069 — 1072.
- Gąsiorowski H. (red.). 2004. *Pszenica. Chemia i Technologia*. PWRiL, Poznań.

- Gizzi G., Givens D. I. 2004. Variability in feed composition and its impact on animal production. In: Assessing quality and safety of animal feeds. FAO Animal production and health, nr 160: 39 — 54.
- Hanczakowski P. 2001. Rośliny jako źródła białka. Podrozdział „Składniki pokarmowe i antyodżywcze występujące w roślinach” autor.: Hanczakowski, Koreleski i Wolski. Monografia wydana przez Instytut Zootechniki, Kraków — Balice: 11 — 19.
- Jung S., Rickert D. A., Deak N. A., Aldin E. D., Recknor J., Johnson L. A., Murphy P. A. 2003. Comparison of Kjeldahl and Dumas methods for determining protein contents of soybean products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80 (12): 1169 — 1173.
- Kjeldahl J. Z. 1883. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. *Analytical Chemistry* 22: 366 — 382.
- Klockiewicz-Kamińska E. 2005. Metody oceny wartości browarnej i klasyfikacja jakościowa odmian jęczmienia. COBORU Słupia Wielka.
- Krotz L., Cicerci E., Giuzzi G. 2008. Protein determination in cereals and seeds. *Food Quality* 15 (4): 37–39.
- Leeson S., Atteh J. O., Summers J. D. 1987. The replacement value of canola meal for soybean meal in poultry diets. *Can J. Anim. Sci.* 65: 151 — 158.
- Marco A., Rubio R., Compano R., Casals I. 2002. Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. *Talanta* 57 (5): 1019 — 1026.
- Meller E. L., Bimbo A. P., Barlow S. M., Sheridan B. 2007. Repeatability and reproducibility of determination of the nitrogen content of fishmeal by the combustion (Dumas) method and comparison with the Kjeldahl method: Interlaboratory study. *J. AOAC International* 90 (1): 6 — 21.
- Möller J. 2009. Kjeldahl — still going strong. In: *Focus* 33: 14 — 16.
- Normy żywienia drobiu. 1996. Praca zbiorowa pod red. S. Smulikowskiej. Wyd. IFŻZ im. J. Kielanowskiego PAN, Jabłona.
- Rakowska M. 1978. Propozycje standaryzacji metod analitycznych i biologicznych do oceny materiału roślinnego w pracach nad selekcją nowych odmian roślin uprawnych o podwyższonej zawartości i jakości białka. *Biul. IHAR* 133: 97 — 114.
- Saint-Denis T., Goupy J. 2004. Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method. *Analytica Chimica Acta* 515(1): 191 — 198.
- Simonne AH, Simonne EH, Eitenmiller RR, Mills HA, Cresman III CP. 1997. Could the Dumas method replace the Kjeldahl digestion for nitrogen and crude protein determinations in foods? *J. Sci. Food Agric.* 73:39–45.
- Shewry P. R., 2007. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* 46: 239–250.
- Watson M. E., Galliher T. L. 2001. Comparison of Dumas and Kjeldahl methods with automatic analyser on agricultural samples under routine rapid analysis conditions. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 32: 2007 — 2019.
- Wiles P. G., Gray I. K., Kissling R. C. 1998. Routine analysis of proteins by Kjeldahl and Dumas methods: review and interlaboratory study using dairy products. *J. AOAC International*, 81: 620 — 632.
- Williams P., Sobering D., Antoniszyn J. 1998. Protein testing methods. In: Fowler D.B., Geddes W.E., Johnston A.M, Preston K.R. (eds.) *Wheat protein production and marketing. Proc. of the Wheat Protein Symposium.* 9–10 March 1998. Univ. Extension Press. Univ. of Saskatchewan, Saskatoon, Canada: 37 — 47.