

Kritische Beurteilung der Proteinbestimmung nach der Methode von Kjeldahl aufgrund der Aminosäureanalyse = A critical appreciation of the protein determination by Kjeldahl's method based on the amino acid analysis

Autor(en): **Lebet, Vincent / Schneider, Hanna / Arrigoni, Eva**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **85 (1994)**

Heft 1

PDF erstellt am: **21.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982746>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Vincent Lebet, Hanna Schneider, Eva Arrigoni und Renato Amadò, Institut für Lebensmittelwissenschaft, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

Kritische Beurteilung der Proteinbestimmung nach der Methode von Kjeldahl aufgrund der Aminosäureanalyse

A Critical Appreciation of the Protein Determination by Kjeldahl's Method based on the Amino Acid Analysis

Key words: Protein determination, Kjeldahl, Amino acid analysis, Ion-exchange chromatography, Nitrogen determination

Einleitung

In der Lebensmittelanalytik wird der Proteingehalt in der Regel indirekt durch die Bestimmung des Stickstoffes nach der 1883 von *Kjeldahl* veröffentlichten Methode (1) berechnet. Dieses Vorgehen stützt sich auf die Tatsache, dass Proteine einen relativ konstanten Stickstoffgehalt aufweisen. Mit einem durchschnittlichen Stickstoffgehalt von 16% wird ein Umrechnungsfaktor von 6,25 (= 100/16) erhalten. 1926 beschrieb *Jones* (2) eine Methode zur Berechnung der Umrechnungsfaktoren für Weizen aufgrund des gewichteten Stickstoffgehaltes der wichtigsten Proteine des Produktes. 1931 publizierte er hierzu eine ausführliche Studie (3), in welcher er den Stickstoffgehalt der Hauptproteine von 70 vorwiegend pflanzlichen Produkten auflistete, und schlug angepasste Umrechnungsfaktoren für einzelne Produktgruppen vor, die heute noch weitgehend verwendet werden. Die Eignung dieser Werte für die Abschätzung des Proteingehaltes aus dem Gesamtstickstoff darf in Frage gestellt werden, weil

1. nur einzelne Proteine in die Berechnung einbezogen wurden (4, 5),
2. die Isolierungsmethode dieser «Hauptproteine» und damit ihre Reinheit sicher in Betracht gezogen werden müssen (5),
3. der Nichtproteinstickstoff (NPN) nicht berücksichtigt wurde (3, 5),
4. die Kriterien für die Auswahl der Hauptproteine nicht klar definiert wurden.

Weil der prozentuale Stickstoffanteil eines Proteins direkt von seiner Aminosäurezusammensetzung abhängt, werden für einzelne Lebensmittelgruppen an-

Tabelle 1. Empfohlene Umrechnungsfaktoren vom Gesamtstickstoff zu Rohprotein gemäss Schweizerischem Lebensmittelbuch, Kapitel 22/4.2 (6)

Lebensmittel	Umrechnungsfaktor (F_{LMB})
Ölsamen, Schalenfrüchte (Walnüsse, Haselnüsse)	5,30
Getreide und Getreideprodukte	5,70
Milch und Milchprodukte	6,38
übrige Lebensmittel	6,25

gepasste Faktoren vorgegeben. In Tabelle 1 sind die im Schweizerischen Lebensmittelbuch (6) vorgeschlagenen Faktoren aufgeführt. Je nach Land und Gesetzgebung werden zum Teil andere Werte angegeben. In den britischen Nährwerttabellen von *McCance* und *Widdowson* (7) wird für jede Getreideart ein anderer Faktor verwendet, der zwischen 5,70 für Weizenmehl und 6,25 für Mais schwankt. In Deutschland (8) dagegen wird, wie in der Schweiz, ein einziger Wert für die gesamte Getreidegruppe angegeben; mit 5,80 ist er aber höher als der entsprechende schweizerische Wert von 5,70.

Dank der Entwicklung von Chromatographiemethoden zur Bestimmung der Aminosäuren kann der Proteingehalt nun direkt bestimmt werden. Er wird in diesem Fall aus der Summe der Aminosäuren nach saurer Hydrolyse der Probe abgeleitet. Für die Berechnung des Proteingehaltes müssen die Mengen an Anhydroaminosäuren eingesetzt werden, weil für jede gebildete Peptidbindung (Kondensationsreaktion) ein Molekül Wasser freigesetzt wird. *Tkachuk* (4) bestimmte als erster den Umrechnungsfaktor für Getreideprodukte auf diese Weise, indem er den durch die Aminosäureanalyse ermittelten Proteingehalt zum Stickstoffgehalt der Aminosäuren in Beziehung brachte.

Aus den ermittelten Aminosäuregehalten lassen sich verschiedene Umrechnungsfaktoren berechnen:

- Die faktorielle Methode bezieht die Summe der Anhydroaminosäuren (AAS) zur Summe des Stickstoffgehaltes der Aminosäuren. Der faktorielle Umrechnungsfaktor F_f entspricht deshalb dem von *Jones* (3) vorgeschlagenen Wert.
- Der Kjeldahl-Umrechnungsfaktor F_k bezieht die Summe der Anhydroaminosäuren zum Gesamtstickstoff, bestimmt nach der Methode von Kjeldahl. Er ermöglicht also die richtige Umrechnung, wenn, wie in der Praxis üblich, der Proteingehalt über die Bestimmung des Gesamtstickstoffes nach Kjeldahl ermittelt wird.

Problemstellung

Bei Routineuntersuchungen konnte für viele Proben regelmässig eine Diskrepanz zwischen dem Proteingehalt bestimmt als Summe der Anhydroaminosäuren und demjenigen nach der traditionellen Kjeldahl-Methode beobachtet werden. So

zeigte sich zum Beispiel, dass die Umrechnungsfaktoren einzelner Weizenfraktionen deutlich variierten (9). Ausgehend von diesen Daten schien es interessant, die analytisch ermittelten Faktoren den in der Routineanalytik eingesetzten gegenüberzustellen und die Tendenzen der beobachteten Abweichungen aufzuzeigen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Berechnungsgrundlage für die Bestimmung der Umrechnungsfaktoren von Stickstoff zu Protein zu präsentieren, und die Grenzen und resultierenden Ungenauigkeiten ihrer Anwendung aufzuzeigen.

Zur Validierung der angewendeten Analysen- und Berechnungsmethoden wurden am Beispiel eines reinen Proteines die Wiederfindung der einzelnen Aminosäuren, der faktorielle Umrechnungsfaktor und die Stickstoffwiederfindung in den Aminosäuren bestimmt. Die analytisch erhaltenen Resultate wurden theoretischen, aus Tabellen von Aminosäuresequenzen abgeleiteten Werten F_T gegenübergestellt. Anhand einiger Lebensmittel wurden anschliessend die spezifischen Umrechnungsfaktoren berechnet und mit Literaturwerten verglichen. Dies ermöglichte eine kritische Beurteilung der Resultate im Hinblick auf die Anwendung der Kjeldahl-Methode.

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial

Rinderserumalbumin: Merck 12018, Darmstadt, D, > 90% Protein
Dosenkarotten, Eierteigwaren (Hörnli), gelbe Erbsen, Hühnereier, Kartoffelflocken, Vialone-Reis, Truthahnsteak: Coop, Zürich
Fertigmenüs: *Menü 1:* Tortellini mit Schinken (Hipp GmbH, Gmunden, A)
Menü 2: Chicken Curry «Madras» mit Reis (Midi, Coop, CH)
Menü 3: Truthahnsteak an Morchelsauce mit Kartoffelpüree und Karotten (Midi)

Probenvorbereitung

Eierteigwaren, Erbsen, Kartoffelflocken und Reis wurden mit einer Kaffeemühle (Typ 234, Moulinex, Zürich, CH) auf Mehlfeinheit gemahlen. Ei, Truthahnsteak, Karotten und Fertigmenüs wurden in einem Waring Blendor (Waring, New Hartford, USA) homogenisiert, das Homogenat gefriergetrocknet und auf eine Korngrösse von weniger als 1 mm zerkleinert.

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

Der Stickstoffgehalt wurde nach der Methode des Schweizerischen Lebensmittelbuches (6) mit folgenden Änderungen bestimmt: als Katalysator wurden 2

Tabletten Missouri-Katalysator (Merck 16469) verwendet. Die Rücktitration erfolgte mit Salzsäure 0,1 mol/l auf pH 4,60.

Aminosäureanalyse

Eine ca. 2 mg Protein enthaltende Probemenge wurde in ein 10-ml-Hydrolyseröhrchen genau eingewogen und mit 1 ml HCl 6 mol/l versetzt. Zur Verhinderung der Oxidation der schwefelhaltigen Aminosäuren wurde der Kopfraum des Röhrchens während 10 min mit Stickstoff begast. Die Proben wurden während 24 Stunden bei 110 °C im Ölbad hydrolysiert und anschliessend die Salzsäure am Rotationsverdampfer (Temperatur < 50 °C) abgedampft. Der trockene Rückstand wurde mit 5 ml Puffer (pH 2,2, [Na⁺] = 0,16 mol/l, Pharmacia Biosystems 4310-131, Uppsala, S) versetzt, kräftig geschüttelt und durch ein Mikrofilter 0,45 µm (Acro-disk 13, Skan, Basel, CH) filtriert.

Die Aminosäuren wurden durch Ionenauschromatographie aufgetrennt und mittels einer Nachsäulenfarbreaktion mit Ninhydrin bei 570 nm und 440 nm spektrophotometrisch erfasst (Alpha Plus Amino Acid Analyser, Pharmacia Biosystems). Jeweils 50 µl der hydrolysierten Lösung wurden aufgetragen und an einer Ultropac-7-Säule (200 x 4,6 mm, Pharmacia Biosystems) getrennt. Zur Derivatisierung der getrennten Aminosäuren wurden 10 g Ninhydrin in 300 ml Acetatpuffer (pH 4,95, 5 mol/l) und 700 ml Ethylenglykol gelöst, und die Ninhydrinlösung dem Eluat zugesetzt. Der Pufferfluss wurde auf 28 ml/h und der Ninhydrinfluss auf 22 ml/h eingestellt. Das Puffer- und Temperaturprogramm für die Trennung der Aminosäuren und die Regenerierung/Äquilibrierung des Systems sind in Tabelle 2 angegeben. Alle Puffer wurden durch ein Mikrofilter 0,3 µm (PHWP04700, Millipore, Bedford, USA) filtriert. Die gesamte Laufzeit inklusive Regenerierung und Äquilibrierung des Systems betrug 87 min. Ein Aminosäure-Standardgemisch (AA-S-18, Sigma, St. Louis, USA), welches 5 nmol jeder Aminosäure (Ausnahme: Cystin, 2,5 nmol) enthielt, wurde zur Quantifizierung aufgetrennt. Die Auswer-

Tabelle 2. Puffer- und Temperaturprogramm für die Auftrennung der Aminosäuren an Ultropac-7-Kationentauscher

Puffer	pH	(Na ⁺) (mol/l)	Temp. (° C)	Dauer (min)	Bemerkung
2	3,50	0,16	45	10	
3	4,25	0,16	50	7	
3	4,25	0,16	55	12	
5	8,80	0,56	65	4	
5	8,80	0,56	90	24	
NaOH		0,40	90	8	Regenerierung
1	3,00	0,16	90	5	Äquilibrierung
1	3,00	0,16	85	11	Äquilibrierung
2	3,50	0,16	45	6	Äquilibrierung

tung der Chromatogramme erfolgte mittels eines Chromatography Data System, Model 2600, Rev. 5.1 (P.E. Nelson, Cupertino, USA).

Tryptophanbestimmung

Tryptophan wurde nach enzymatischem Abbau der Proteine mittels einer Farbreaktion bestimmt (10). Eine ca. 60 mg Protein enthaltende Probe wurde in ein 10-ml-Schliffreagenzglas eingewogen und mit 2,5 ml Natriumhydroxid 0,05 mol/l, 1,0 ml einer filtrierten Papainlösung (0,2 g/l, Fluka 76222, Buchs, CH) und 0,05 ml Natriumcyanid 0,5 g/l versetzt. Eine Blindprobe mit dreifacher Enzymmenge wurde zur Ermittlung der Enzymselfhydrolyse parallel bestimmt. Die Hydrolyse erfolgte bei 70 °C während 15 Stunden, und das Hydrolysat wurde anschliessend mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt. Davon wurden 5 ml in einen 50-ml-Schliffmeyer pipettiert und zur Extraktion der Lipide mit 5 ml Kaliumhydroxid 0,1 mol/l und 3 ml Chloroform versetzt. Das Gemisch wurde 10 min geschüttelt und 12 min bei 2000 g zentrifugiert. Für die Farbreaktion wurde 1 ml der wässrigen Phase abpipettiert und mit 1 ml 1,4-Dimethylaminobenzaldehyd (DAB) 0,5 g/l in konzentrierter Salzsäure und 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Nach 10 min wurden 0,2 ml Natriumnitrit 0,02 g/l zugesetzt und die Lösung für weitere 5 min stehengelassen. Anschliessend wurde die Extinktion bei 590 nm gegen den entsprechenden Probenblindwert (ohne DAB) gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade mit Tryptophankonzentrationen zwischen 10 und 100 µg/ml aufgenommen (Merck 8374, Darmstadt, D). Der Tryptophangehalt in den gemessenen Lösungen wurde nach Abzug des $1/3$ -Wertes der Enzymselfhydrolyse aus der Eichgeraden abgelesen.

Berechnung der Umrechnungsfaktoren und der Wiederfindung der Aminosäuren

Die faktoriellen und Kjeldahl-Umrechnungsfaktoren wurden gemäss folgenden Formeln berechnet:

$$F_f = \frac{\sum AS_{Anhydro}}{\sum N_{AS}} \qquad F_k = \frac{\sum AS_{Anhydro}}{N_{Kjeldahl}}$$

Zur Validierung der Berechnungs- und Analysenmodelle wurde Rinderserumalbumin (RSA) analysiert und die Resultate für die einzelnen Aminosäuren mit theoretischen, aus Aminosäuresequenztabelle abgeleiteten Werten (11) verglichen. Der molare Anteil jeder Aminosäure wurde ermittelt und der Umrechnungsfaktor F_T auf die gleiche Art wie für Analysenresultate bestimmt. Für jede Aminosäure wurde zusätzlich die molare Wiederfindung, bezogen auf die theoretisch zu erwartenden Molanteile, berechnet.

Resultate und Diskussion

Beurteilung der Umrechnungsfaktoren

Definitionsgemäss sollen die nach der Kjeldahl-Methode berechneten Proteingehalte als Rohprotein- und nicht als Proteingehalt bezeichnet werden. Darunter ist die Summe sämtlicher stickstoffhaltiger Bestandteile zu verstehen, die unter Verwendung eines bestimmten Umrechnungsfaktors in Protein umgerechnet wurde.

Der faktorielle Umrechnungsfaktor F_f hängt direkt und ausschliesslich von der Aminosäurezusammensetzung eines Proteins ab. Um diesen Faktor deutlich zu beeinflussen, muss eine Aminosäure einen stark abweichenden prozentualen Stickstoffgehalt und gleichzeitig eine unterschiedliche Häufigkeit in verschiedenen Proteinen zeigen (12). Wie aus Abbildung 1 ersichtlich ist, führen die Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin, Methionin und Glutaminsäure, welche einen gewichtsmässig niedrigen Stickstoffanteil aufweisen, zu einem hohen Faktor, während Glutamin, Lysin, Asparagin, Glycin, Histidin und Arginin (hoher prozentualer N-Gehalt) zu einem niedrigen Faktor führen. *De Rham* (12) zeigte, dass vor allem ein hoher Arginingehalt zu einem tiefen Umrechnungsfaktor führt. Die übrigen 10 Aminosäuren haben einen Stickstoffgehalt, der um $\pm 4\%$ um den durchschnittlichen Gehalt von 16% liegt. Sie beeinflussen den Umrechnungsfaktor somit nur wenig (13). Aus diesen Überlegungen sind neben *Arginin* (4 Stickstoffatome) primär *Asparagin/Asparaginsäure* bzw. *Glutamin/Glutaminsäure* von Bedeutung. Die letztgenannten sind hauptsächlich durch das in verschiedenen Proteinen stark unterschiedliche Verhältnis von Amid zu Säure gekennzeichnet.

Die in dieser Arbeit angewendeten Berechnungsmethoden sind mit zwei inneren Fehlern verbunden:

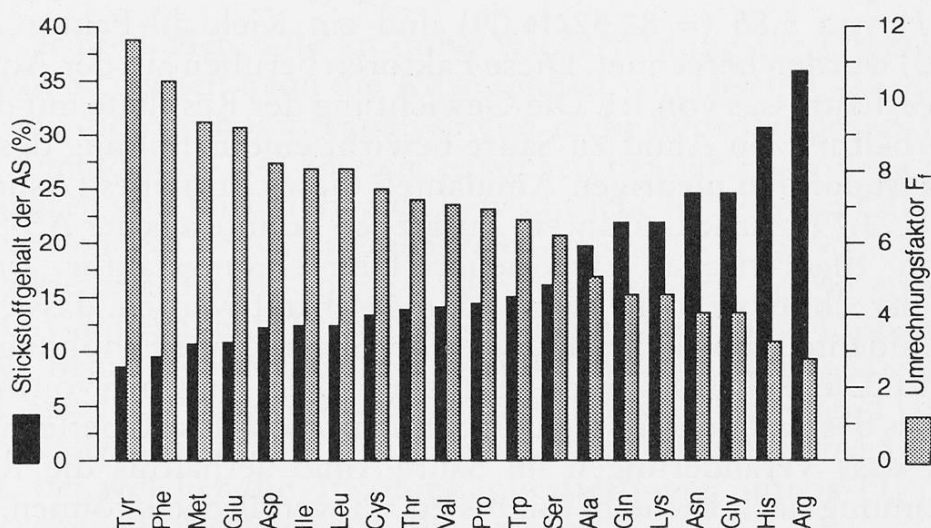


Abb. 1. Stickstoffgehalt der Aminosäuren und entsprechende faktorielle Umrechnungsfaktoren (geordnet nach steigendem Stickstoffgehalt)

- Der Abzug eines Wassermoleküls pro Aminosäure ist nicht ganz korrekt, da die endkettigen Aminosäuren nur an einer Peptidbindung beteiligt sind. *Tkachuk* (4) schätzt, dass dadurch ein Fehler von 0,035% auf den Proteingehalt zu erwarten ist.
- Bei der Proteinhydrolyse werden Asparagin und Glutamin zu den entsprechenden Säuren desaminiert, so dass nur die Summe von Amid und Säure (bezeichnet als Asx bzw. Glx) erfasst werden kann. Das Verhältnis von Amid zu Säure ist je nach Protein unterschiedlich und nicht auf eine einfache Art zu ermitteln, so dass mit einem willkürlich gewählten Verhältnis von Amid zu Säure von 1:1 gearbeitet wird. *De Rham* (12) zeigte, dass eine Verschiebung von 50% zugunsten des Amids (Verhältnis von Amid zu Säure von 3:1) eine Änderung des Stickstoffgehaltes des Proteins von ca. 5% bewirkt. Der Umrechnungsfaktor wird somit um ca. 3,5% verändert.

Diese «inneren Fehler» führen dazu, dass die Berechnung der faktoriellen Umrechnungsfaktoren aus der Aminosäureanalyse zwangsläufig mit einer Unsicherheit von ungefähr 4% verbunden ist. Dies ist nicht ungenauer als eine Abschätzung des Faktors aus dem Stickstoffgehalt der Hauptproteine (vgl. (3)).

Die Verwendung des Kjeldahl-Umrechnungsfaktors F_k ist für die Ermittlung des Proteingehaltes aus dem Gesamtstickstoff richtiger, weil auf diese Weise die Resultate um den Anteil an Nichtproteinstickstoff (NPN) korrigiert werden. In dieser Arbeit ist unter NPN die Gesamtheit aller stickstoffhaltigen Verbindungen zu verstehen, die bei der Aminosäureanalyse nicht erfasst werden.

Validierung der Analysen- und Berechnungsmethode mit Rinderserumalbumin (RSA)

Zur Illustration der Berechnungsmethode sind in Tabelle 3 die Resultate der Aminosäureanalyse von RSA detailliert wiedergegeben. Ein faktorieller Umrechnungsfaktor F_f von 5,85 (= 82,52/14,09) und ein Kjeldahl-Faktor F_k von 6,02 (= 82,52/13,70) wurden berechnet. Diese Faktoren beruhen auf der Annahme eines Säure/Amid-Verhältnisses von 1:1. Die Gewichtung der Resultate mit dem für RSA korrekten Verhältnis von Amid zu Säure bewirkt eine Erhöhung des F_f von 5,85 auf 6,15. Dies ist auf den niedrigen Amidanteil dieses Proteines (Asn:Asp = 21:79 und Gln:Glu = 21:79) zurückzuführen. Zusätzlich konnte aus der AS-Sequenz von RSA (11) ein theoretischer faktorieller Umrechnungsfaktor F_T von 6,49 (= 100/15,40) berechnet werden. Somit kann geschätzt werden, dass eine Verminderung des Amidanteils um 60% zugunsten der Säuren, eine Erhöhung des Faktors um 5% bewirkt. Diese Größenordnung entspricht den Angaben von *de Rham* (12), der den Einfluss des Amidanteils gleich hoch schätzte. Diese Überlegungen führen zum Schluss, dass Veränderungen im Säure/Amid-Verhältnis die Resultate der Proteinbestimmung nach Kjeldahl um bis zu 5% verfälschen können.

Die Wiederfindung der einzelnen Aminosäuren ist gut. Für alle Aminosäuren ausser Glycin und Tryptophan liegt sie innerhalb von $\pm 7\%$. Dies bestätigt, dass die gewählten Hydrolyse- und Analysebedingungen eine gute Quantifizierung der

Tabelle 3. Gewichts- und Molanteile der AS bzw. AAS und Wiederfindung der AS bezogen auf theoretische Molanteile für RSA

	AS (g/100 g)	AAS (g/100 g)	N in AS (g/100 g)	Mol _{gef.} ¹ (mol %)	Mol _{ber} ² (mol %)	AS-Wiederfindung (%)
Asx	8,76	7,58	1,38	9,09	9,17	99,14
Thr	5,09	4,32	0,60	5,90	5,88	100,23
Ser	3,93	3,26	0,52	5,17	4,84	106,64
Glx	14,89	13,07	2,13	13,98	13,49	103,59
Pro	4,12	3,48	0,50	4,94	4,84	102,05
Gly	1,72	1,31	0,32	3,16	2,60	121,89
Ala	5,08	4,05	0,80	7,88	7,96	98,95
Cys	5,01	4,64	0,58	5,76	6,06	95,08
Val	5,62	4,75	0,67	6,27	6,23	106,38
Met	0,70	0,61	0,07	0,65	0,69	93,48
Ile	2,21	1,91	0,24	2,33	2,42	96,19
Leu	9,49	8,19	1,02	10,00	10,55	94,75
Tyr	4,19	3,77	0,32	3,19	3,29	97,07
Phe	5,32	4,74	0,45	4,45	4,50	98,96
Lys	10,28	9,01	1,97	9,71	10,21	95,16
His	3,11	2,74	0,84	2,77	2,94	94,06
Arg	4,92	4,41	1,58	3,91	3,98	98,10
Trp	0,74	0,68	0,10	0,50	0,35	144,65
Summe	95,18	82,52	14,09	100,00	100,00	

Gesamtstickstoff (Kjeldahl) (%) 13,70

N-Wiederfindung in den AS (%) 102,85

¹ analytisch ermittelt

² aus der AS-Sequenz berechnet

Aminosäuren ermöglichen. Die zu hohe Wiederfindung für Glycin (+ 21%) ist unerwartet. Mit Sicherheit kann die Anwesenheit von freiem Glycin ausgeschlossen werden, wie die Aminosäureanalyse von nicht hydrolysiertem RSA deutlich machte. Wie *Amadò et al.* (14) zeigten, entstehen bei der Hydrolyse mit Salzsäure aus Nukleinsäuren und Purinderivaten beträchtliche Mengen an Glycin. Da das in diesem Fall verwendete RSA nur einen Proteingehalt von ca. 90% aufweist, ist es denkbar, dass kleinste Spuren solcher Verbindungen zur beschriebenen Überbewertung des Glycingehaltes führen. Die Probleme bei der Tryptophanbestimmung hingegen sind bekannt und auf eine relativ schlechte Reproduzierbarkeit und ungenügende Spezifität der Methode zurückzuführen. Ausgehend von der Arbeit von *Bech-Andersen* (15) wird in unserem Laboratorium zurzeit eine Methode ausgearbeitet, bei welcher die Tryptophanbestimmung mittels HPLC (Fluoreszenzdetektor) nach alkalischer Hydrolyse erfolgt.

Weil Glycin und Tryptophan in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proteinen gewichtsmässig nicht von primärer Bedeutung sind, dürfen die hier beschriebenen Berechnungen trotzdem durchgeführt werden.

Die Stickstoffwiederfindung in den Aminosäuren von 102,8% (Tabelle 3) bestätigt, dass das untersuchte RSA keinen Nichtproteinstickstoff enthielt: der gesamte Stickstoff wurde in den Aminosäuren wiedergefunden.

Faktorberechnung einiger Lebensmittel

Zur Illustration des Einflusses der Berechnungsmethode auf den Umrechnungsfaktor und damit auf den Proteingehalt wurden einige Lebensmittel untersucht. Ziel war es, auf Tendenzen aufmerksam zu machen und nicht einen extensiven Überblick über die Umrechnungsfaktoren zu geben. In Tabelle 4 sind der faktorielle und der Kjeldahl-Umrechnungsfaktor sowie die Stickstoffwiederfindung in den Aminosäuren für die 10 untersuchten Lebensmittel angegeben.

Die faktoriellen Umrechnungsfaktoren, die definitionsgemäss nur für die Proteinfraktion gültig sind, liegen für die Getreideprodukte im Bereich der Vorgabe (5,70). Für die übrigen Lebensmittel liegen sie etwas unter dem allgemein verwendeten Faktor von 6,25.

Unter Berücksichtigung des Nichtproteinstickstoffes sind die Kjeldahl-Faktoren hingegen bis zu 20% tiefer als die mit der faktoriellen Methode berechneten Faktoren. Der berechnete NPN-Anteil entspricht der in Tabelle 4 angegebenen prozentualen Abweichung und schwankt also bei den untersuchten Proben zwischen 6 (Hühnerei, Menü 3) und 21% (Kartoffelflocken). Bei verarbeiteten Produkten (z. B. Kartoffelflocken) könnte die Zugabe von stickstoffhaltigen Hilfsstoffen bei der Verarbeitung die Faktoren stark beeinflussen. So würde zum Beispiel die Zugabe eines Ammoniumsalzes den Kjeldahl-Faktor sicher deutlich senken. In einem solchen Fall ist es um so wichtiger, für jedes Produkt den spezifischen F_k zu bestimmen, da nur dieser eine richtige Umrechnung vom Gesamtstickstoff zu Protein ermöglicht.

Tabelle 4. Faktorieller und Kjeldahl-Umrechnungsfaktor, entsprechende Abweichung und N-Wiederfindung von 10 Lebensmitteln

Probe	F_f	F_K	Abweichung bez. F_f (%)	N-Wiederfindung in den AS
Dosenkarotten	5,93	5,30	10,57	89,45
Eierteigwaren	6,06	5,05	16,67	83,43
Gelbe Erbsen	5,53	4,96	10,24	89,85
Hühnerei	5,88	5,54	5,73	94,26
Kartoffelflocken	5,75	4,53	21,22	78,81
Reis Vialone	5,65	4,90	13,27	86,78
Truthahnschnitzel	5,61	4,95	11,68	88,32
Menü 1	5,92	5,48	7,45	92,55
Menü 2	5,72	4,73	17,24	82,76
Menü 3	5,74	5,39	5,96	94,04

Tabelle 5. Proteingehalt von 10 Lebensmitteln, berechnet auf verschiedene Arten

Probe	Summe der AAS	Produktdeklaration	$N \cdot F_f$	$N \cdot F_{LMB}$
Dosenkarotten	0,47	0,58 ¹	0,53	0,56
Eierteigwaren	13,90	15,00 ²	14,36	13,51
Gelbe Erbsen	18,03	20,00 ²	20,07	20,69
Hühnerei	11,46	12,90 ¹	12,11	12,88
Kartoffelflocken	5,29	7,00 ²	5,81	6,31
Reis Vialone	5,32	6,00 ²	6,16	6,21
Truthahnschnitzel	21,69	24,10 ¹	24,57	27,38
Menü 1	4,19	5,50 ²	4,56	4,81
Menü 2	4,75	6,86 ²	5,72	6,25
Menü 3	5,19	7,71 ²	5,53	6,00

¹ nach *Souci* et al. (8)

² Produktdeklaration

Bei der Anwendung von mit der Methode von *Jones* (3) oder *Tkachuk* (4) ermittelten Faktoren und somit den in offiziellen Methodensammlungen vorgegebenen Zahlen wird also der Proteingehalt bis zu 20% überschätzt. Dies wird in Tabelle 5 ersichtlich, in welcher die auf unterschiedliche Arten berechneten Proteingehalte miteinander verglichen werden. Dabei werden einerseits die Produktdeklarationen (bzw. die entsprechenden Literaturwerte), die mit dem faktoriellen Umrechnungsfaktor berechneten ($N \cdot F_f$) sowie die mit dem offiziellen Faktor ermittelten ($N \cdot F_{LMB}$) Werte aufgelistet. Diesen werden andererseits die Summen der Anhydroaminosäuren gegenübergestellt. Die Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bestätigen, dass der NPN-Anteil solcher Produkte nicht zu vernachlässigen ist.

Schlussfolgerungen

Die Berechnung des Proteingehaltes von Lebensmitteln durch die Bestimmung des Gesamtstickstoffes ist zwar eine einfache, schnelle, gut reproduzierbare und billige Methode, aber die dabei angewendeten Umrechnungsfaktoren können zu Fehlresultaten führen. Wenn sie für ein einziges Produkt oder bei Lebensmitteln mit ähnlicher Protein- und NPN-Zusammensetzung angewendet werden, darf ein relativer Vergleich des Proteingehaltes auf diese Weise durchgeführt werden. Sobald die Stickstofffraktion verändert wurde oder wenn absolute Werte gewünscht werden, sollten die spezifischen Umrechnungsfaktoren F_f und F_k mit Hilfe einer Aminosäureanalyse bestimmt werden, bevor der Proteingehalt nach Kjeldahl berechnet wird. Erst dann ist für die entsprechenden Lebensmittel eine richtige Umrechnung vom Gesamtstickstoff zu Protein gewährleistet.

Besonders problematisch ist es, wenn die Rohproteingehalte nach Kjeldahl mit Resultaten einer anderen Methode verglichen werden müssen. Bei der Ermittlung der Proteinbedarfsdeckung durch ein Lebensmittel besteht die Gefahr einer Unterversorgung mit Proteinstickstoff, wenn der Proteingehalt nach Kjeldahl bestimmt und ein zu hoher Umrechnungsfaktor verwendet wurde. Insbesondere bei Bevölkerungsgruppen, deren Proteinbedarf nur knapp gedeckt wird, könnte die Deckung des Bedarfs an essentiellen Aminosäuren nicht mehr gesichert sein.

Vor der Bestimmung des Proteingehaltes nach der Methode von Kjeldahl sollten deshalb die zu verwendenden Umrechnungsfaktoren kritisch beurteilt und die spezifischen Faktoren der zu untersuchenden Probe mit Hilfe einer Aminosäureanalyse berechnet werden. Für Proteinangaben sollte die Art und Weise, wie der Protein- bzw. der Stickstoffgehalt bestimmt wurde, immer präzisiert werden. Unserer Meinung nach sollte der Proteingehalt auf eine der zwei folgenden Arten angegeben werden:

- *Stickstoffgehalt* oder *Rohproteingehalt* ermittelt aus dem Gesamtstickstoffgehalt, immer mit Angabe des verwendeten Umrechnungsfaktors.
- *Proteingehalt*, bestimmt nach einer für Proteine spezifischen Methode, z. B. Aminosäureanalyse.

Es ist also empfehlenswert, vor der Anwendung der Kjeldahl-Methode den spezifischen Kjeldahl-Umrechnungsfaktor zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Probleme rechtfertigen es, am Nutzen von 2 Kommastellen bei Faktorempfehlungen zu zweifeln. Es wird damit eine nicht vorhandene Genauigkeit vorgetäuscht. Sinnvoller scheint die Erstellung von Tabellen, in welchen für möglichst viele Lebensmittelgruppen die Kjeldahl-Umrechnungsfaktoren F_k auf eine Kommastelle genau angegeben werden. Solange solche Tabellen nicht vorliegen, müssen Umrechnungsfaktoren und die nach Kjeldahl ermittelten Proteingehalte kritisch beurteilt werden.

Zusammenfassung

Der Proteingehalt von Lebensmitteln wird routinemässig indirekt über die Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl berechnet. Dazu werden Umrechnungsfaktoren angewendet, die von der Aminosäurezusammensetzung der Proteine und des Anteils an Nichtproteinstickstoff abhängen. Die Aminosäureanalyse mittels Ionenauschromatographie ermöglicht eine direkte Bestimmung des Proteingehaltes und somit die Berechnung eines Umrechnungsfaktors von Gesamtstickstoff nach Kjeldahl zum wahren Proteingehalt. Die offiziellen Faktoren stützen sich nicht auf eine solche Berechnung, da sie auf der Proteinfraction basieren. In dieser Arbeit werden die Grundlagen für die Faktorberechnung präsentiert und die resultierenden Ungenauigkeiten ihrer Anwendung aufgezeigt. Am Beispiel von 10 Lebensmitteln wird gezeigt, dass die Verwendung der offiziellen Faktoren zu einer deutlichen Überschätzung des Proteingehaltes (5–20%) führen kann. Die vorgegebenen Faktoren sollten deshalb derart korrigiert werden, dass der Anteil an Nichtproteinstickstoff mitberücksichtigt wird.

Résumé

La teneur en protéines de produits alimentaires est déterminée indirectement en y dosant l'azote total d'après la méthode de Kjeldahl. Les facteurs de conversion utilisés dépendent d'une part de la composition en acides aminés des protéines et d'autre part de la proportion d'azote non-protéique. L'analyse des acides aminés par chromatographie à échange d'ions permet un dosage direct des protéines et ainsi, le calcul d'un facteur de conversion mettant en rapport l'azote total d'après Kjeldahl et la teneur réelle en protéines. Malgré cela, les facteurs officiels ne sont pas calculés de cette façon, puisqu'ils se basent uniquement sur la fraction protéique. Ce travail présente les bases pour le calcul des facteurs de conversion et met en évidence les imprécisions inhérentes à leur application. A partir de 10 produits alimentaires, nous avons pu montrer que l'utilisation des valeurs officielles peut provoquer une nette surestimation de la teneur en protéines (5–20%). Ces facteurs devraient donc être corrigés de façon à tenir compte de la fraction azotée non-protéique.

Summary

The protein content of food products is traditionally determined by measuring the total nitrogen content with the method of Kjeldahl. The conversion factors used depend on the amino acid composition of the proteins and on the proportion of non-protein nitrogen. Amino acid analysis with ion-exchange chromatography offers a direct determination of proteins and thus a possibility to calculate a conversion factor for converting total nitrogen by the Kjeldahl method into the real protein content. The official values are not obtained by such a calculation, as they are based on the protein fraction. In this work the calculation methods for the conversion factors are presented and the limits and imprecisions caused by their application are discussed. The analysis of 10 different food products led to the conclusion that the protein content could be significantly overestimated (5–20%) by using the official conversion factors. These values should also be corrected for the non-protein nitrogen. Therefore, it is recommended to choose carefully the conversion factor used without neglecting the non-protein nitrogen fraction.

Literatur

1. *Kjeldahl, J.*: Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.* **22**, 366–382 (1883).
2. *Jones, D.B.*: A new factor for converting the percentage of nitrogen in wheat into that of protein. *Cereal Chem.* **3**, 194–198 (1926).
3. *Jones, D.B.*: Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. Circular 183, US Department of Agriculture, Washington D.C. 1931.
4. *Tkachuk, R.*: Nitrogen-to-protein conversion factors for cereals and oilseed meals. *Cereal Chem.* **46**, 419–423 (1969).
5. *Lakin, A.L.*: Determination of nitrogen and estimation of protein. In: King, R.D. (ed.), *Developments in food analysis techniques I*. Applied Science Publ. Ltd, London 1978.
6. *Schweizerisches Lebensmittelbuch*, Kapitel 22, Methoden 4.1–4.2. Eidg. Drucksachen- und Materialzentrale, Bern 1991.

7. *Holland, B., Welch, A.A., Unwin, I.D., Buss, D.H., Paul, A.A. and Southgate, D.A.T.:* McCance and Widdowson's composition of foods. Royal Society of Chemistry, Cambridge 1992.
8. *Souci, S.W., Fachmann, W. and Kraut, H.:* Food composition and nutrition tables 1989–90. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1989.
9. *Lebet, V.:* Zusammensetzung und Eigenschaften von Weizenkeimproteinen. Diplomarbeit, Institut für Lebensmittelwissenschaft, ETH-Zürich, nicht veröffentlicht (1991).
10. *Lombard, J.H. and Lange, D.J.:* The chemical determination of tryptophan in foods and mixed diets. *Anal. Biochem.* **10**, 260–265 (1965).
11. *Croft, L.R.:* Handbook of protein sequence analysis. John Wiley & Sons, Chichester 1980.
12. *De Rham, O.:* La proportion d'azote dans les protéines et le facteur de calcul protéine/azote. *Lebensm. Wiss. Technol.* **15**, 226–231 (1982).
13. *Mosse, J.:* Nitrogen to protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 18–24 (1990).
14. *Amadò, R., Rothenbühler, E., Arrigoni, E. und Solms, J.:* Abbau von Purinderivaten zu Glycin durch saure Hydrolyse. *Mitt. Geb. Lebensm. Hyg.* **74**, 23–30 (1983).
15. *Bech-Andersen, S.:* Determination of tryptophan with HPLC after alkaline hydrolysis in autoclave using α -methyl-tryptophan as internal standard. *Acta Agric. Scand.* **41**, 305–309 (1991).

Vincent Lebet
 Hanna Schneider
 Eva Arrigoni
 Prof. Dr. Renato Amadò
 Institut für Lebensmittelwissenschaft
 Laboratorium für Lebensmittelchemie
 und -technologie
 ETH-Zentrum
 CH-8092 Zürich