

## ХИМИЯ, ХИМИЧЕСКИЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ

---

---

УДК 577.112.4

В.М. Востоков<sup>1</sup>, В.М. Смирнова<sup>1</sup>, Г.Л. Дегтяренко<sup>2</sup>

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДОВ В КОРМОВЫХ ДРОЖЖАХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

Нижегородский государственный технический университет им. Р.Е. Алексеева<sup>1</sup>,  
Волжский государственный инженерно-педагогический университет<sup>2</sup>

Определение массовой доли нуклеотидов в кормовых дрожжах, предусматривающее выделение всех простых и сложных белков из двух одинаковых навесок с последующей оценкой результатов по двум независимым методикам, и оценка массовой доли нуклеотидов путем сопоставления результатов параллельных измерений.

*Ключевые слова:* кормовые дрожжи, сырой протеин, истинный белок, нуклеотиды.

Проблемы обеспечения человечества доброкачественными продуктами питания в достаточном количестве остаются нерешенными, тем более что темпы развития земледелия и интенсификации природопользования намного отстают от темпов роста народонаселения планеты. Для того, чтобы ликвидировать природный дефицит растительного белка, витаминов, антибиотиков и многих других биологически активных веществ (БАВ), потребовалось разработать современные технологии микробиологического и биохимического синтеза указанных компонентов и построить соответствующие крупнотоннажные биотехнологические производства. Так, с целью решения проблемы природного дефицита растительного белка были созданы нанотехнологии промышленного микробиологического синтеза кормового белка из растительной клетчатки и парафинов нефти и газа, в которых происходит ускоренная ассимиляция азота, минуя продолжительную стадию его усвоения в естественных условиях.

Контролируемыми показателями уровня качества разнообразной биопродукции являются содержание в ней некоторых полезных и вредных биоконпонентов: аминокислот и протеинов; жирно- и водорастворимых витаминов; микроэлементов и тяжелых металлов; микотоксинов; диоксинов; антибиотиков, в том числе, "остаточных"; флавоноидов и т.д. Для указанных БАВ предложены или разработаны различные методы производственного контроля. Для определения содержания белка в кормовых дрожжах, комбикормах обычно используются методы определения содержания «сырого протеина» по Кьельдалю и «истинного белка» по Барнштейну. Однако данные методы не удовлетворяют современным требованиям рутинного контроля биопроизводства как в отношении их достоверности и селективности, так и в отношении контроля экологической чистоты и безопасности выпускаемой биопродукции. Согласно ГОСТ 51417-99 [1] массовая доля белка определяется по общему содержанию азота в анализируемой пробе, что может приводить к погрешностям измерений, так как в пробе могут содержаться азотистые соединения небелкового характера (рис. 1). Вследствие этого возникают систематические погрешности аналитических измерений, и происходит завышение результатов содержания в анализируемой пробе белка. Таким образом, данный

контролируемый показатель качества кормовых дрожжей – массовая доля «сырого протеина» - не является достоверным показателем содержания белка.

Использование метода Кьельдаля для определения белка позволяет фальсифицировать белковую продукцию путем добавления к кормовым дрожжам азотистых соединений небелкового характера (мочевина, аммонийные соли). С целью выявления фальсификации белка был предложен метод определения «истинного белка» по Барнштейну.

Метод Барнштейна не отличается концептуально от метода Кьельдаля, так как содержание белка вычисляется по азоту. Однако на стадии пробоподготовки согласно ГОСТ 28178-89 в методе Барнштейна происходит отделение белка от мешающих азотистых соединений небелкового характера [2].

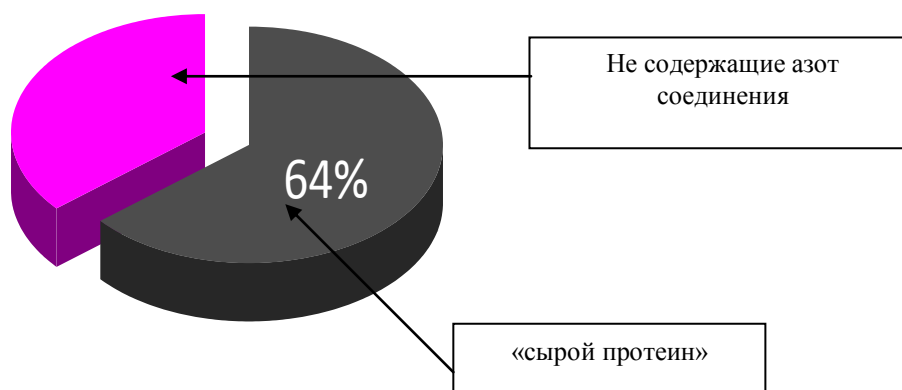


Рис. 1. «Сырой протеин» по Кьельдалю

Белок, определяемый по методу Барнштейна, включает протеиновую и нуклеотидную части. Среди определяемых данным способом компонентов одни белки являются полезными нутриентами, а другие могут нанести вред живому организму. Так, некоторые белковые ингредиенты кормовых дрожжей, в частности, генетически неадекватные живому организму нуклеотиды и нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК) способствуют мутагенезу, вызывают аллергические заболевания. Они становятся опасными загрязнителями биосферы.

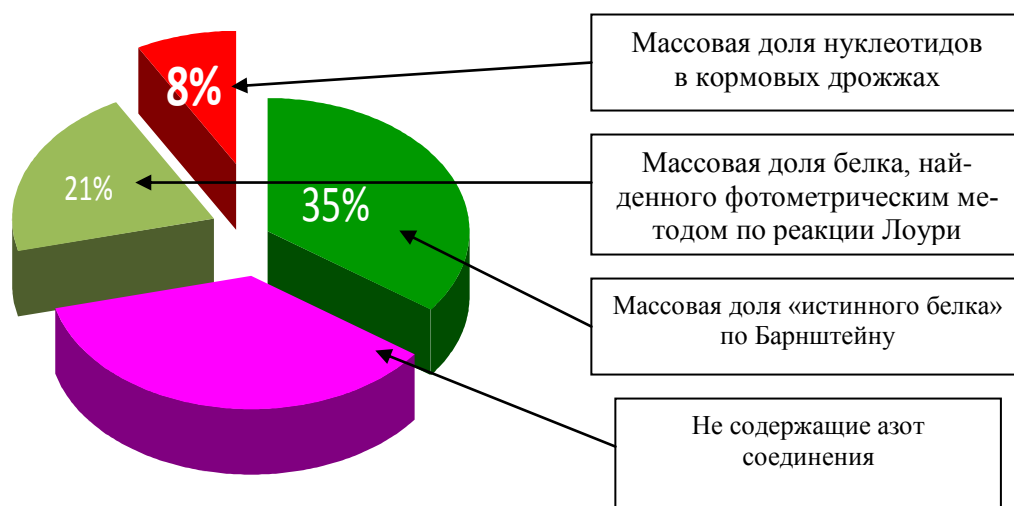
В связи с этим возникла необходимость в экоаналитическом контроле качества белковой биопродукции, где востребован достаточно простой и доступный способ априорной оценки массовой доли нуклеотидов в кормовых дрожжах микробиологического синтеза. Ныне действующие методы количественного определения белка в кормовых дрожжах (по Кьельдалю или по Барнштейну), как и ранее созданный нами, экспрессный и селективный метод фотометрического определения протеинов по реакции Лоури (Авт.св. SU 1401380 F1), оказались непригодными для количественной оценки массовой доли геномодифицированных нуклеотидов в кормовых дрожжах микробиологического производства [3]. Потребовался иной, достаточно простой и доступный способ производственного контроля экологической чистоты и безопасности указанной биопродукции.

Предложен способ количественной оценки содержания нуклеотидов в кормовых дрожжах, где сочетаются две известных и независимых методики определения массовой доли «истинного белка»: по Барнштейну и по Лоури, которые значительно отличаются друг от друга, прежде всего, по своей селективности. В связи с этим, «истинный белок», определенный методом Барнштейна, по общему содержанию азота, по составу существенно отличается от белка, найденного фотометрическим методом по специфической реакции Лоури.

В состав «истинного белка», определяемого неселективным методом Барнштейна, входят все белковые соединения, включая протеины и нуклеотиды. Тогда как в «истинном белке», определенном фотометрическим методом, нуклеотиды отсутствуют, так как они не дают характерного окрашивания, по реакции Лоури. Следовательно, по разности результа-

тов определения массовой доли “истинного белка” двумя указанными альтернативными методами можно оценить массовую долю нуклеотидов в кормовых дрожжах микробиологических производств (рис. 2).

Это становится особенно важным для экоаналитического контроля качества биопродукции, выпускаемой предприятиями микробиологического синтеза кормового белка из жидких парафинов нефти (производство паприна), где значительно возрастает риск выпуска недоброкачественной биопродукции, содержащей генномодифицированные нуклеиновые кислоты (РНК и ДНК). По указанной причине, вследствие надвигающейся угрозы возникновения экологической катастрофы, были остановлены крупнейшие заводы по производству паприна.



**Рис. 2. Массовые доли компонентов кормовых дрожжей, определяемые различными методами**

Для определения массовой доли нуклеотидов по разности результатов определения массовой доли “истинного белка” двумя указанными альтернативными методами требуется выполнять следующие операции:

- 1) выделение белка в раствор путем осаждения производится в одинаковых условиях;
- 2) две навески для анализа делаются одновременно;

3) пробоподготовка на первой стадии осуществляется идентично: берут две точных навески средней пробы кормовых дрожжей, массой каждая около 0,4 г; помещают их в стаканы вместимостью 200 см<sup>3</sup>, добавляют в каждый стакан 50 см<sup>3</sup> доведенной до кипения дистиллированной воды; 10 см<sup>3</sup> 12%-го раствора сульфата меди и, по каплям, при перемешивании, 10 см<sup>3</sup> 2,5%-го раствора гидроксида натрия. После отстаивания осадка его отделяют путем фильтрования через бумажный фильтр, одновременно промывая его методом декантации двумя порциями (по 20 см<sup>3</sup>) дистиллированной воды.

Далее для первой пробы выполняют все аналитические операции, необходимые для определения белка известным методом Кьельдаля по стандартной методике (ГОСТ 51417-99). В ней сначала осуществляют “мокрое сжигание” выделенной белковой массы (осадка) и производят отгонку аммиака в стандартный раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Затем, методом обратного титрования полученных аммонийных солей определяют общую массу азота (*mN*) и вычисляют массовую долю белка (*mБ*), определяемую методом Барнштейна по формуле:

$$mБ = mN k 100 / a (1 - \omega/100). \quad (1)$$

где  $mN$  – масса азота в анализируемом образце, г;  $a$  – навеска образца, г;  $k$  – коэффициент пересчета на белок, устанавливаемый для каждого сорта кормовых дрожжей;  $\omega$  – массовая доля влаги в кормовых дрожжах, %.

Для второй пробы промытый осадок медно-белкового комплекса, выделенный на бумажном фильтре, возвращают в исходный стакан вместе с фильтром и добавляют туда при перемешивании 20 см<sup>3</sup> 0,25 М раствора комплексона III и 60 см<sup>3</sup> 1 М раствора едкого натра. Содержимое стакана нагревают в течении 30 мин на кипящей водяной бане, перемешивая раствор стеклянной палочкой. Раствор переносят в мерную колбу на 500 см<sup>3</sup>, оставляя фильтр в стакане, промывая его небольшими порциями горячей воды и сливая все промытые воды в мерную колбу с анализируемым раствором. После охлаждения до комнатной температуры раствор в колбе доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. Аликвоту, 100 см<sup>3</sup> полученного раствора, переносят в мерную колбу на 250 см<sup>3</sup>; раствор доводят до метки водой и перемешивают. С целью удаления взвешенных частиц около 20 см<sup>3</sup> раствора фильтруют в сухой стакан через фильтр, с синей лентой, отбрасывая первую порцию фильтрата. С помощью пипетки отбирают 5 см<sup>3</sup> чистого фильтрата, помещая его в мерную колбу на 25 см<sup>3</sup>. Добавляют туда 15 см<sup>3</sup> свежеприготовленной смеси растворов, содержащей гидроксид и карбонат натрия, калий-натрий виннокислый и сульфат меди. После 10 мин перемешивания в мерную колбу добавляют 1,5 см<sup>3</sup> свежеприготовленного раствора реактива Фолина; доводят раствор до метки водой, перемешивают и дают ему постоять около 30 мин. Методики приготовления указанных растворов приведены в описании изобретения “Способ количественного определения истинного белка в кормовых дрожжах” (Авт.св. № 1401380 от 8.02.88).

Полученный окрашенный раствор (синего цвета) фотометрируют в кювете на 1 см, при длине волны  $\lambda = 690$  нм. В качестве нулевого используют раствор “холостого опыта”, в котором отсутствует белок [4]. По величине оптической плотности исследуемого раствора, используя метод градуировочного графика, находят содержание белка в анализируемой пробе ( $\gamma$ , мкг) и вычисляют массовую долю “истинного белка” ( $mЛ$ ) по формуле

$$mЛ = \gamma \cdot 0,025 / a (1 - \omega/100), \quad (2)$$

где 0,025 – коэффициент, учитывающий разбавление и соотношение размерностей;  $a$  – масса навески дрожжей, г;  $\omega$  – массовая доля влаги в кормовых дрожжах, %.

Массовую долю нуклеотидов в кормовом белке ( $mМ$ ) оценивают по формуле

$$mМ = mБ - mЛ. \quad (3)$$

В качестве примера в табл. 1 приведены сравнительные результаты определения массовой доли белковых соединений в кормовых дрожжах, выпускаемых тремя ведущими предприятиями отрасли: Астраханским ГДЗ, Волжским ГДЗ и Кировским БХЗ. В сравнительных испытаниях использованы известные способы численной оценки массовой доли белка:

- неселективный метод Кьельдаля, предназначенный для оценки содержания “сырого протеина”, в котором белок определяют в пересчете на содержание азота в анализируемой пробе;
- более избирательный метод Барнштейна, используемый для численной оценки массовой доли “истинного белка”, который отличается от метода Кьельдаля лишь тем, что в нем, на стадии пробоподготовки, белок отделяют от небелковых соединений, содержащих азот и мешающих анализу;
- высокоселективный метод фотометрического определения “истинного белка” по фотометрической реакции Лоури, где в реакцию вступают лишь простые протеины.

Таблица 1

**Локальный мониторинг качества биопродукции микробиологических производств**

1. Оценка массовой доли белка в кормовых дрожжах микробиологического синтеза методами Кьельдаля, Барнштейна и методом фотометрического определения белка по реакции Лоури

Заводы по производству кормового белка (кормовых дрожжей)	Интервальное значение ( $n = 10$ ) массовой доли белка, определенное:		
	по Кьельдалю, %	по Барнштейну, %	фотометрическим методом, по Лоури
Астраханский ГДЗ	$54,18 \pm 0,64$	$52,54 \pm 0,92$	$48,94 \pm 0,57$
Волжский ГДЗ	$56,93 \pm 0,97$	$33,36 \pm 1,84$	$30,02 \pm 1,01$
Кировский БХЗ	$46,82 \pm 0,92$	$40,40 \pm 1,34$	$35,94 \pm 0,90$

2. Оценка содержания нуклеотидов из разности результатов определения истинного белка по Барнштейну и по Лоури

Заводы БВК	Средние значения массовой доли белка, %		Массовая доля нуклеотидов, %
	по Барнштейну	по Лоури	
Астраханский ГДЗ	52,54	48,94	3,60
Волжский ГДЗ	33,36	30,02	3,34
Кировский БХЗ	40,40	35,94	4,46

В табл. 2 приведены результаты контрольных испытаний модельных двухкомпонентных смесей простого и сложного белков, приготовленных из альбумина (0,145 г) и эталонного образца ДНК "SERVA", масса которого составляет около 13% от массы альбумина.

Таблица 2

**Оценка содержания нуклеотидов в модельных смесях, имитирующих белковый состав кормовых дрожжей микробиологического производства**

Модельная смесь белков, взято, г		Найдено белка, г, по способам		Найдено нуклеотидов, г по предлагаемому
Альбумин, г	ДНК "SERVA", г	фотометрическому	Барнштейна	
$0,146 \pm 0,001$	0	$0,146 \pm 0,003$	$0,146 \pm 0,003$	0
$0,146 \pm 0,001$	$0,020 \pm 0,001$	$0,145 \pm 0,003$	$0,162 \pm 0,003$	$0,017 \pm 0,003$

Масса белков в анализируемой смеси была определена двумя способами: методом Барнштейна и фотометрическим методом. Как и ожидалось, методом Барнштейна была определена суммарная масса обоих компонентов смеси, а по фотометрической реакции Лоури найдено лишь содержание простого протеина, что подтверждает возможность определения предлагаемым способом массовой доли нуклеиновых кислот или других нуклеотидов в кормовых дрожжах микробиологического производства.

По результатам сравнительных испытаний результатов определения массовых долей белковых соединений в кормовых дрожжах производств и модельных двухкомпонентных смесей можно сделать заключение:

1. Численное значение массовой доли "сырого протеина" в комовых дрожжах, установленное методом Кьельдаля, не дает достоверной информации о качестве выпускаемой биопродукции, так как высокое численное значение этой величины может быть связано не только с высоким содержанием протеинов, но также, с наличием азотосодержащих соединений небелкового характера.

2. Отличие результатов определений массовой доли белка методами Кьельдаля и Барнштейна свидетельствует о высокой "загрязненности" кормовых дрожжей небелковыми азотистыми соединениями.

3. Отличие результатов определений массовой доли “истинного белка” методами Барнштейна и по фотометрической реакции Лоури свидетельствует о том, что в “истинном белке” содержатся нуклеотиды.

4. Содержание нуклеотидов в белковой продукции, выпускаемой однотипными производствами, не одинаково, что можно объяснить генетической неоднородностью используемого в качестве питательной среды биосырья и штаммов, применяемых в данном биопроизводстве.

#### Библиографический список

1. ГОСТ 51417-99. Комбикорма. Комбикормовое сырье. Методы определения сырого протеина. – М.: Изд-во стандартов, 2002. – 19 с.
2. ГОСТ 28178-89. Дрожжи кормовые. Методы испытаний. М.: Изд. стандартов, 1989. 50 с.
3. Худякова Т.А., Востоков В.М., Арбатский А.П., Мешкова Л.А., Петрова В.П., Рыбакова Л.Г. / А.с. СССР SU 1401380 A1 G 01 N 33/48 Способ количественного определения истинного белка в кормовых дрожжах, / № 4040783/31-13. Заяв. 20.03.86. Бюл. № 21 от 07.06.88.
4. **Востоков, В.М.** Аналитический контроль содержания протеинов в продукции предприятий микробиологического синтеза кормового белка / В.М. Востоков, Е.Г. Ивашкин, В.Р. Карташев // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2007. Т. 79. № 3. С. 11–24.

*Дата поступления  
в редакцию 05.10.2010*

**V.M. Vostokov, B.M. Smirnova, G.L. Degtjarenko**

#### **DEFINITION NUCLEIC ACIDS IN FODDER YEAST OF MICROBIOLOGICAL MANUFACTURE**

Mass fraction definition nucleic acids in the fodder yeast, providing allocation of all simple and difficult fibers from two identical part with the subsequent estimation of results by two independent techniques, and a mass fraction estimation nucleic acids by comparison of results of parallel measurements.

*Key words:* fodder yeast, crude protein, true fiber, nucleic acids.