

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS. CARACTERIZACIÓN.

ENUNCIADO DEL PROBLEMA

¿Qué proporción de la proteína total de la muestra corresponde a las albúminas y globulinas? ¿Cuál es su peso molecular promedio y qué proporción de aminoácidos aromáticos contienen las proteínas de cada fracción?

CUESTIONARIO PREVIO

1. Para los métodos que serán utilizados, complete el Cuadro 1:

Cuadro 1. Características de los métodos para medir proteínas solubles

Método	Tipo de Prueba	Fundamento	Límites de detección y cuantificación del método	Característica de la proteína analizada
Kjeldahl				
Absorción 280 nm				
Biuret				

2. ¿Cuáles son las características fisicoquímicas (estructura, composición química de aminoácidos, peso molecular promedio de las proteínas, solubilidad, etc.) de la amiloglucosidasa, la albúmina bovina sérica, el extracto de levadura y la tirosina?
3. Indique dos alimentos en los cuales puedan ser utilizados cada uno de los métodos para determinar proteína (Kjeldahl, Absorción a 280 nm y Biuret). Justifique su respuesta con referencias de las Normas Oficiales Mexicanas o de la AOAC.
4. ¿Cómo se clasifican las proteínas de acuerdo a su solubilidad (método de Osbourne-Mendel)?
5. Lea el protocolo completo (3 etapas) y diseñe un diagrama con la estrategia general para resolver el problema planteado.
6. Realice el planteamiento de cálculos y procedimiento necesario para la preparación de una de las curvas patrón de los métodos espectrofotométricos que se emplearán en éste protocolo.

1ª ETAPA: MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: RESPUESTA DE DIFERENTES INGREDIENTES PROTEICOS.

PROCEDIMIENTO

- A) Preparar la curva patrón de los métodos espectrofotométricos para cuantificar proteína soluble, utilizando la Albúmina Bovina Sérica (ABS) como estándar, considerando los límites de detección del método.
- B) Cuantificar el contenido de nitrógeno y proteína cruda en cada ingrediente proteico, empleando el método de Kjeldahl.
- C) Preparar 25 mL de una solución acuosa al 1.0 % de los ingredientes que se le proporcionan (Tirosina, Extracto de levadura y Amiloglucosidasa).
NOTA: Para disolver la tirosina se pueden agregar unas gotas de HCl concentrado.
- D) Determinar el contenido de proteína soluble de las soluciones de ingredientes proteicos mediante los métodos Biuret y absorción a 280 nm (ver procedimientos en el manual de metodologías).

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

UTILIZAR BATA, GUANTES DE NITRILO Y GOGLES.

USO DE ACIDO SULFÚRICO, LIQUIDO CORROSIVO, MANEJO EXCLUSIVO EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN.

CONOCER PROTOCOLO BASICO DE USO DEL EQUIPO BÜCHI EMPLEADO PARA EL MÉTODO DE KJELDAHL. USAR PINZAS PARA TUBOS KJELDAHL.

LA PREPARACIÓN Y MANIPULACIÓN DEL REACTIVO DE BIURET DEBE REALIZARSE CON GUANTES DE NITRILO Y LENTES DE SEGURIDAD.

CUESTIONARIO DE RESULTADOS PARA INGREDIENTES PROTEICOS ESTÁNDAR

1. Completar Cuadro 2 a partir de los porcentajes de nitrógeno determinados para cada ingrediente. Incluir un ejemplo de cálculo para contenido de nitrógeno y proteína cruda en uno de los ingredientes proteicos.

Cuadro 2. Contenido de nitrógeno y proteína cruda por el método de Kjeldahl para ingredientes estándar.

Ingrediente	% N Total (g N/100g de ingrediente)	% Proteína (g proteína/100g de ingrediente)	Factor ¹ (g proteína/g N)
Tirosina			
Extracto de levadura			
Amiloglucosidasa			

¹Indicar cómo se calcula el factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda.

2. Colocar en el Cuadro 3 los resultados del contenido de proteína soluble medido por el método de Biuret para cada ingrediente. Incluir un ejemplo del planteamiento de algoritmos para calcular proteína soluble en alguna de las soluciones de ingrediente proteico.

Cuadro 3. Contenido de proteína soluble de los ingredientes proteicos utilizando el método de Biuret.

Ingrediente	% Proteína soluble (g proteína/100 g de ingrediente)
Tirosina	
Extracto de levadura	
Amiloglucosidasa	

3. Con el objeto de "normalizar" los resultados y considerando que el contenido de nitrógeno representa la pureza de las preparaciones, expresar el contenido de proteínas obtenido por el método de Biuret por gramo de Nitrógeno (g proteína/g N) para cada ingrediente proteico. Incluir cálculos y colocar los resultados en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Contenido de proteína "normalizado" de los ingredientes proteicos por el método de Biuret

Ingrediente	PM promedio (Daltons)	Contenido de proteínas "normalizado" (g proteína/g N)
Tirosina	181	
Extracto de levadura	37 000	
Amiloglucosidasa	74 500	
Albúmina Bovina Sérica (ABS)	66 000	6.25*

*ABS se utilizada como proteína de referencia que contiene 16 % de Nitrógeno y se considera como el 100 % de respuesta de proteína soluble.

4. Con los datos del Cuadro 4, realizar un gráfico de la cantidad de proteína "normalizada" (g proteína/g N) en función del PM para cada ingrediente proteico.

De acuerdo con el contenido de proteína normalizada para cada ingrediente, ¿existe congruencia en los resultados obtenidos? Explicar con base en el fundamento del método y características de los ingredientes.

5. En el Cuadro 5, colocar los resultados del contenido de proteína soluble medida por el método de absorción 280 nm para cada ingrediente. Incluir ejemplo de cálculo para alguno de los ingredientes.

Tabla 5. Contenido de proteína soluble de los ingredientes proteicos cuantificado por el método de Absorción 280 nm.

Ingrediente	% Proteína soluble (g de proteína/ 100 g de ingrediente)
Tirosina	
Extracto de levadura	
Amiloglucosidasa	

6. Con el objeto de “normalizar” los resultados y considerando que el contenido de nitrógeno representa la pureza de las preparaciones, expresar el contenido de proteínas obtenido por el método de absorción 280 nm por gramo de Nitrógeno (g proteína/g N) para cada ingrediente proteico. Incluir los cálculos y completar con los resultados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Contenido de proteína “normalizado” de los diferentes ingredientes proteicos por el método de absorción 280 nm

Ingrediente	% Aminoácidos aromáticos	Contenido de proteínas “normalizado” g proteína/g N
Tirosina	100	
Extracto de levadura	21.0	
Amiloglucosidasa	11.45	
Albúmina Bovina Sérica (ABS)	5.51	6.25*

*ABS se utilizó como proteína de referencia que contiene 16 % de Nitrógeno y se considera como el 100 % de respuesta de proteína soluble.

7. Con los datos del Cuadro 6, realizar un gráfico de la cantidad de proteína “normalizada” (g proteína/g N) en función del contenido de aminoácidos aromáticos para cada ingrediente proteico. ¿Existe congruencia en los resultados obtenidos? Explicar con base en el fundamento del método y características de los ingredientes.

2ª ETAPA: ANÁLISIS DE LA MUESTRA PROBLEMA. EXTRACCIÓN DE LAS FRACCIONES DE PROTEÍNAS SOLUBLES Y CONTENIDO DE NITRÓGENO

PROCEDIMIENTO.

- A) Determinar el contenido de Nitrógeno total de la muestra original.
- B) Extracción de las fracciones de proteínas solubles empleando método de Osborne-Mendel.
Realizar la extracción de proteínas solubles de la muestra problema como se indica en el manual de metodologías para las fracciones de albúminas y globulinas.
- C) Determinar en las fracciones de proteínas solubles: contenido de Nitrógeno total por método de Kjeldahl y contenido de proteína soluble por los métodos de Biuret y Absorción a 280.

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

1. De acuerdo al procedimiento de extracción de proteínas, ¿cuáles podrían ser las características fisicoquímicas (polaridad, tipo de aminoácidos, etc.) de las proteínas contenidas en cada fracción obtenida de la muestra problema?
2. Colocar en el Cuadro 7 los resultados obtenidos del contenido de proteína de la fracción proteica por los métodos de Biuret y Absorción 280 nm. Incluir ejemplo de cálculos. Cuadro 7. Cuantificación de proteína en los extractos de la muestra problema.

Fracción	Kjeldahl (g Proteína cruda/100 mL solución)	Biuret (g Proteína soluble/100 mL solución)	Absorción 280 nm (g Proteína soluble/100 mL solución)
Albúminas			
Globulinas			

3. ¿Encontró diferencias en el contenido de proteínas por los diferentes métodos? Si/No ¿Cómo se podría explicar químicamente?
4. De la misma forma que con los ingredientes proteicos analizados en la primera etapa, “normalizar” la concentración de proteínas de los extractos proteicos, para los métodos de Biuret y Absorción 280 nm. Incluir ejemplo de los cálculos.
5. Utilizando los gráficos de las preguntas 4 y 6 de la primera etapa del protocolo, calcular el PM promedio y el contenido de aminoácidos aromáticos de los extractos proteicos. Incluir los cálculos realizados.

3ª ETAPA: RESOLUCIÓN DEL PROBLEMA

¿Qué proporción de la proteína total de la muestra corresponde a las albúminas y las globulinas? ¿Cuál es el peso molecular promedio de las proteínas de los extractos y que proporción de aminoácidos aromáticos contienen?

CUESTONARIO

1. ¿Cuál es la concentración de proteína cruda (g proteína cruda/100 g de muestra) que hay en la muestra sólida original? Incluir cálculos.
2. ¿Cuál es el contenido de proteína cruda (g proteína cruda/100 mL de extracto) encontró en cada extracto? Incluir los cálculos y expresar en g proteína cruda/100 g muestra.
3. Respecto al total de proteína en la muestra original, ¿cuál es el porcentaje correspondiente a extracto de albúminas y cuánto al de globulinas? Incluir cálculos.
4. Con base en la naturaleza de la muestra y las propiedades de las proteínas, ¿existe diferencia entre el PM y contenido de aminoácidos aromáticos las albúminas evaluadas (Sérica bovina, amiloglucosidasa y la del extracto proteico)? Argumentar con base en las características fisicoquímicas de los ingredientes y la muestra problema.

REFERENCIA <https://cutt.ly/txrLxCL>

- Hernández-Valdepeña, M.A. (2020). Met. Eval. de prot. UV Videos 1 y 2
- Sandoval-Guillén, B.J. (2020). Solubilidad. Clasificación de proteínas.
Sandoval-Guillén, B.J. (2020). Solubilidad. Extracción de proteínas.
Sandoval-Guillén, B.J. (2020). Met. Eval. de prot. Biuret
- Méndez-Palacios, I.A. (2021). Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl.
- Badui Dergal, S. (2006) Capítulo 3 Proteínas. Química de Alimentos Pearson Educación, Cuarta Edición. México.
https://www.academia.edu/28233446/Qu%C3%ADmica_de_los_alimentos_badui_4edi
- Nielsen, S. (2010) Chapter 9 Protein Analysis. Chapter 15 Protein Separation and Characterization Procedures. Chapter 21 Spectroscopy. Food Analysis. Springer. Fourth Edition.
<https://cutt.ly/K9SSmaL>