



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
LABORATORIO DE ALIMENTOS I (1618)
Elaboraron:
Miguel Ángel Hernández Valdepeña
Bertha Julieta Sandoval Guillén



Adaptada por Brenda Sánchez Salazar

Semestre 2024-2

PLANIFICACIÓN DE ACTIVIDADES: CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivos de aprendizaje para el alumno:

- Reconocerá el fundamento de algunos métodos para cuantificar proteínas.
- Identificará algunas características fisicoquímicas de las proteínas que determinan su solubilidad
- Argumentará la selección de un método para caracterizar las proteínas de un alimento.
- Calculará el contenido de proteína de un alimento empleando algoritmos.

Actividades individuales previas a la clase (≈2 h)

1. Revisará los videos en la página del AMyD relacionados con los conceptos básicos y procedimentales para la determinación de proteína en alimentos empleando los métodos Kjeldahl, Biuret y Absorción a 280 nm.
2. Después de leer el protocolo completo, realizará un diagrama con la estrategia general para resolver el problema planteado, que incluya los diagramas de cada uno de los métodos que se realizarán de manera experimental.
3. Diseñará una estrategia general (diagrama y cálculos) para preparar las cruvas patrón correspondientes, acorde con el estándar y los límites de detección para su cuantificación, de los métodos espectrofotométricos a utilizar en el laboratorio.

Actividades presenciales (1ª. Sesión):

4. Responderá la evaluación previa del tema "Caracterización de proteínas" durante los primeros 15 minutos de la sesión.
5. **EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS**
Se asignarán equipos para llevar a cabo la extracción de fracciones proteicas (45 min a temperatura ambiente) a partir de 15 g de muestra con 75 mL de agua y posteriormente otra extracción con 75 mL de solución salina (NaCl 0.5 M).
 - 5.a. Transcurrido el tiempo de extracción, separar las fases por centrifugación (10,000 rpm, 15 min)
 - 5.b. Medir volumen del sobrenadante de cada fracción y guardar en envase con tapa en refrigeración.
 - 5.c. El residuo sólido final deberá secarse en estufa y guardarse en recipiente hermético.

NOTA: Todas las fases se reservarán para cuantificar proteína cruda en la 3ª. Sesión.

6. **PREPARACIÓN DE CURVAS ESTÁNDAR.**

Se formarán agrupaciones para preparar las curvas patrón de los métodos espectrofotométricos, de acuerdo con los criterios establecidos para cada metodología y el planteamiento diseñado de manera individual.

Materiales y Recursos de trabajo

- Dispositivo electrónico con acceso a internet.
- Manual de Procedimientos del Laboratorio.
- Videos localizados en la carpeta del AMyD 1618 Laboratorio de Alimentos <https://cutt.ly/txrLxCL>

Referencias Bibliográficas

Videos localizados en la carpeta del AMyD "1618 Laboratorio de Alimentos I" <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.
 - Solubilidad. Extracción de proteínas.
 - Met. Eval. de prot. Biuret
- Méndez-Palacios, I.A. (2021). Determinación de proteína cruda por el método de Kjeldahl.

Material Adicional Recomendado

- Badui Dergal, S. (2006) Capítulo 3 Proteínas. Química de Alimentos Pearson Educación, Cuarta Edición. México.
- Nielsen, S. (2010) Chapter 9 Protein Analysis. Chapter 15 Protein Separation and Characterization Procedures. Chapter 21 Spectroscopy. Food Analysis. Springer. Fourth Edition. Recuperado el 30 de Enero de 2023 del sitio: <https://cutt.ly/K9SSmaL>

<p>Actividades presenciales (sesión 2, 1ª. Etapa)</p> <p>7. Cuantificar el contenido de proteína cruda y proteína soluble de los ingredientes proteicos asignados por equipo.</p> <p>Actividades presenciales (sesión 3, 2ª. Etapa)</p> <p>8. Cuantificar proteína cruda en la muestra completa, extractos de proteínas y residuo sólido después de la extracción.</p> <p>9. Cuantificar proteína soluble en el extracto proteico mediante los métodos de Absorción a 280 nm y Biuret.</p> <p>Actividad extraclase y entregable (≈6 h)</p> <p>10. Con los datos obtenidos experimentalmente y los datos complementarios, realizar un informe respondiendo los cuestionarios de resultados de las tres etapas enfocadas en la caracterización de proteínas (Anexo I)</p> <p>11. Revisar que el archivo cumpla con los criterios de evaluación del Anexo II.</p>	<p>Productos esperados:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Examen previo individual sobre “Caracterización de Proteínas” • Informe en equipo con la resolución del cuestionario de la secuencia didáctica acorde a las actividades realizadas en el laboratorio.
---	---

ANEXO I. PROCEDIMIENTO PARA CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS.

ENUNCIADO 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?

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

PROCEDIMIENTO

- A) Cuantificar el contenido de nitrógeno y proteína cruda en cada ingrediente proteico, empleando el método de Kjeldahl.
- B) Preparar 25 mL de una solución acuosa al 1% de los ingredientes que se le proporcionan (Tirosina, Extracto de levadura y Amiloglucosidasa).
- C) Determinar el contenido proteico de la soluciones de ingredientes proteicos mediante los métodos Biuret y absorción a 280 nm (ver procedimiento en el manual de metodologías).

NOTA: Para disolver la tirosina se pueden agregar unas gotas de HCl concentrado, y para el caso de la albúmina bovina agregar un poco de solución de NaCl 0.5 M de ser necesario.

- D) Utilizar la Albúmina Bovina Sérica (ABS) como estándar para las curvas patrón de los métodos para cuantificar proteína soluble.

Nota: Considerar el intervalo de sensibilidad de concentración de proteína, para la preparación de la curva patrón en cada método.

MEDIDAS DE SEGURIDAD:

UTILIZAR BATA Y GOGLES.

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

EL EQUIPO USADO PARA EL MÉTODO DE KJELDAHL UTILIZA TEMPERATURAS MUY ELEVADAS ES NECESARIO EL USO DE PINZAS PARA TUBOS KJELDAHL.

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

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

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

Cuadro 1. Resultados de la cuantificación de nitrógeno y proteína por el método de Kjeldahl

<i>Ingrediente</i>	% N Total (g N/100g de muestra)	% Proteína (g proteína/100g de muestra)	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 2 los resultados del contenido de proteína soluble medida 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 2. Contenido de proteína 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 3.

Cuadro 3. Contenido de proteína “normalizado” de los ingredientes proteicos por el método de Biuret

Ingrediente	PM promedio (Daltons)	Contenido de proteína “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 3, realice 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 4 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.

Cuadro 4. Contenido de proteínas (g de proteína/ 100 g de muestra) de los ingredientes proteicos a partir del método de Absorción 280 nm

Ingrediente	% Proteína soluble (g de proteína/ 100 g de muestra)
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 coloque los resultados en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Contenido de proteínas “normalizado” de los ingredientes proteicos por el método de absorción 280 nm

Ingrediente	% Aminoácidos aromáticos	Contenido de proteína “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 5, 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? Explique con base en el fundamento del método y características de los ingredientes.

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

PROCEDIMIENTO.

- Determinar el contenido de Nitrógeno total de la muestra original
- Extracción de la fracción de proteínas solubles.

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.

- Análisis de la fracción de proteínas solubles.

Determinar el contenido de Nitrógeno total por método de Kjeldahl, contenido de proteína soluble con los métodos de Biuret y absorción 280 nm a la fracción de proteínas solubles extraídas, de la misma manera que se realizó en la primera etapa para los ingredientes proteicos.

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

- 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?
- Colocar en el Cuadro 6 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 6. Cuantificación de proteína en los extractos de la muestra problema.

Fracción	Kjeldahl (g Proteína cruda/100 g de muestra)	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 7 de la primera parte, 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? Incluya cálculos.
2. ¿Qué cantidad 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 la 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)? Discuta con base en las características fisicoquímicas de los ingredientes y la muestra problema.

ANEXO II. Criterios de Evaluación del Informe a entregar

Criterios a evaluar del trabajo en equipo	Puntuación
Datos de identificación (Institución, materia, estudiantes y del trabajo)	0.25
Ortografía y sintáxis correctas	0.25
Repuesta a las siete interrogantes de la 1ª. etapa	4.2
Repuesta a las cinco interrogantes de la 2ª. etapa	2.8
Repuesta a las cuatro interrogantes de la 3ª. etapa	2.0
Referencias bibliográficas en formato APA	0.5
Total	10