

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?

CUESTIONARIO Y ACTIVIDADES PREVIAS

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	Sensibilidad
Biuret			
UV			

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. Mencione cómo se clasifican las proteínas de acuerdo con su solubilidad (método de Osbourne-Mendel) y da un ejemplo de cada grupo.

4. Revisar 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.

5. Realizar los diagramas de cada uno de los métodos que se realizarán de manera experimental.

6. Diseñar una estrategia general (diagrama y cálculos) para preparar las curvas patrón correspondientes, acorde con el estándar y la sensibilidad de cada método indicado en el manual de procedimientos del laboratorio.

PROCEDIMIENTO

1) EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Realizar la extracción de proteínas solubles de la muestra problema

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).

1a) Transcurrido el tiempo de extracción, separar las fases (centrifugar a 10,000 rpm, 15 min).

1b) Medir volumen del sobrenadante de cada fracción y guardar en envase con tapa en refrigeración.

1c) 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 2ª. etapa.

2) 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.

LABORATORIO DE ALIMENTOS I
SEMESTRE 25-2

Utilice la Albúmina Bovina Sérica (ABS) para la curva patrón de los métodos de proteínas solubles.

Nota: Considerar en la elaboración de la curva patrón para cada método el intervalo de sensibilidad.

1ª ETAPA

1) MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: RESPUESTA DE DIFERENTES INGREDIENTES.

A) Cuantificar el contenido de nitrógeno y proteína cruda en cada ingrediente proteico, empleando el método de Kjeldahl.

B) Prepare 25 mL de una solución acuosa al 1% de los ingredientes que se proporcionan (Tirosina, Extracto de levadura y Amiloglucosidasa) y determine su contenido proteico mediante los métodos Biuret y absorción UV (ver procedimiento en el manual de metodologías).

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

UTILIZAR BATA Y GOGLES.

USO DE ÁCIDO SULFÚRICO, LÍQUIDO CORROSIVO, MANEJAR EXCLUSIVAMENTE 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 Y GUANTES DE AISLAMIENTO TÉRMICO.

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

CUESTIONARIO DE RESULTADOS

1) Complete el cuadro 2 a partir de los porcentajes de nitrógeno que se cuantificaron para cada ingrediente. Incluir un ejemplo de cálculo para contenido de nitrógeno y proteína cruda.

Cuadro 2. Resultados de la cuantificación de nitrógeno y proteína cruda por el método de Kjeldahl

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

¹Indique cómo calculó el factor de conversión de nitrógeno a proteína cruda.

2) Coloque en el cuadro 3 los resultados del contenido de proteína soluble medida por el método de Biuret para cada ingrediente. Incluir gráfica de la curva patrón, ecuación de la recta y un ejemplo de cálculo de proteína soluble.

Cuadro 3. Contenido de proteínas (g proteína/100 g de muestra) de los diferentes ingredientes utilizando el método de Biuret

Ingrediente	% Proteína soluble
Tirosina	
Extracto de levadura	
Amiloglucosidasa	

1. Con el objeto de “normalizar” los resultados y considerando que el contenido de nitrógeno representa la pureza de las preparaciones, exprese el contenido de proteínas obtenido por el método de Biuret por gramo de Nitrógeno (g proteína/g N) para cada ingrediente. Incluya los cálculos y coloque los resultados en el Cuadro 4.

LABORATORIO DE ALIMENTOS I

SEMESTRE 25-2

Cuadro 4. Contenido de proteínas "normalizado" de los diferentes ingredientes por el método de Biuret

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

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

De acuerdo con el contenido de proteína normalizada para cada ingrediente, ¿existe congruencia en los resultados obtenidos? Explique ampliamente.

5 En el Cuadro 5, coloque los resultados del contenido de proteína soluble medida por el método de absorción UV para cada ingrediente. Incluya gráfica de la curva patrón, ecuación de la recta y un ejemplo para cálculo de proteína soluble.

Tabla 5. Contenido de proteínas (g de proteína/ 100 g de muestra) de los diferentes ingredientes obtenidos con el método de Absorción UV

Ingrediente	% Proteína soluble
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, exprese el contenido de proteínas obtenido por el método de absorción UV por gramo de Nitrógeno (g proteína/g N) para cada ingrediente. Incluya los cálculos y coloque los resultados en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Contenido de proteínas "normalizado" de los diferentes ingredientes por el método de absorción UV

Ingrediente	% Aminoácidos aromáticos	Contenido de proteínas "normalizado" g prot/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, realice un gráfico de la cantidad de proteína "normalizada" (g proteína/g N) en función del contenido de aminoácidos aromáticos para cada ingrediente.

8

¿Existe congruencia en los resultados obtenidos? Explique con base en el fundamento del método y características fisicoquímicas de los ingredientes.

2da ETAPA

ANÁLISIS DE LA MUESTRA, RESIDUO SÓLIDO DESPUÉS DE LA EXTRACCIÓN Y EXTRACTOS PROTEÍCOS

PROCEDIMIENTO.

- A) Determinar el contenido de Nitrógeno total por método de Kjeldahl de la muestra original y en el residuo sólido después de la extracción.

LABORATORIO DE ALIMENTOS I
SEMESTRE 25-2

B) 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 UV de la misma manera que en la primera etapa, a la fracción de proteínas solubles extraídas.

CUESTONARIO DE RESULTADOS

1. De acuerdo con el procedimiento de extracción de proteínas, ¿qué características fisicoquímicas (polaridad, tipo de aminoácidos, etc.) pueden tener las proteínas de las fracciones obtenidas?
2. Coloque en el Cuadro 7 los resultados obtenidos del contenido de proteína de la fracción proteica por los métodos de Biuret y absorción UV. Incluir un ejemplo de cálculos.

Cuadro 7 Cuantificación de proteína en los extractos de la muestra problema

% Proteína (g proteína/100 g de muestra)			
Fracción	Kjeldahl	Biuret	Absorción UV
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, “normalice” la concentración de proteínas de los extractos proteicos, para los métodos de Biuret y absorción UV. Incluir ejemplo de los cálculos.
5. Utilizando los gráficos de las preguntas 4 y 7 de la primera parte, calcule el PM promedio y el contenido de aminoácidos aromáticos de los extractos proteicos. Incluya 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 original) que hay en la muestra sólida completa? Incluya cálculos.
- 2) ¿Qué cantidad de proteína cruda (g proteína cruda/100 mL de extracto) que encontró en cada extracto proteico? Incluir ejemplo de cálculos y expresar en (g proteína cruda/100 g muestra original)
- 3) Respecto al total de la proteína en la muestra original, ¿cuál es el porcentaje que corresponde al extracto de albúminas y cuál 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 de 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.

LABORATORIO DE ALIMENTOS I

SEMESTRE 25-2

Referencias Bibliográficas

- Iturbe Chiñas, A. F. y Sandoval Guillén, B. J. (2011). Análisis de alimentos: fundamentos y técnicas. Universidad Nacional Autónoma de México
- Nielsen, S. S. (Ed.). (2017). Food analysis (p 318). Gaithersburg: Aspen Publisher.

Material Adicional Recomendado

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.

Ejercicio interactivo

<https://view.genial.ly/60b9844da83d1a0d896f5824/interactive-content-caracterizacion-proteinas>