

PRÁCTICA 4: ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

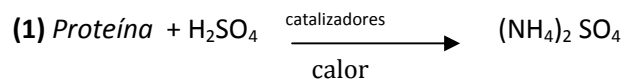
1. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA BRUTA POR EL MÉTODO DE KJELDAHL.

1.1. FUNDAMENTO:

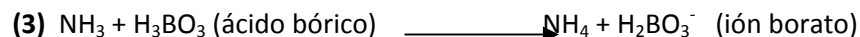
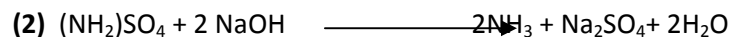
En los análisis de rutina se suele determinar el contenido de nitrógeno total y expresar el conjunto de sustancias nitrogenadas como “% de nitrógeno total” o como “porcentaje de proteínas”. La estimación del contenido de proteínas de los alimentos a partir de la determinación del contenido de nitrógeno total no siempre es correcta pero en general el contenido de compuestos nitrogenados no proteicos es pequeño comparado con el de las proteínas en la mayoría de los alimentos.

En 1883 el investigador danés Johann Kjeldahl desarrolló el método más usado en la actualidad para el análisis de proteínas (método Kjeldahl) mediante la determinación del nitrógeno orgánico. En esta técnica se digieren las proteínas y otros componentes orgánicos de los alimentos en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total se convierte mediante esta digestión en sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente. El amoníaco liberado es arrastrado por destilación y recogido en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titulan con HCl estandarizado para determinar el nitrógeno contenido en la muestra. Las etapas generales del método son:

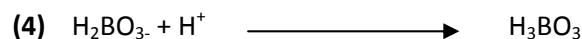
A. DIGESTIÓN: se lleva a cabo con H_2SO_4 en presencia de un catalizador y calor:



B. NEUTRALIZACIÓN Y DESTILACIÓN: neutralización del $(NH_4)_2SO_4$ digerido con una base fuerte (disolución de NaOH, 35%) seguida de una destilación sobre un volumen conocido de un ácido fuerte (disolución de ácido bórico al 4%):



C. VALORACIÓN: El anión borato (proporcional a la cantidad de nitrógeno) es titulado con HCl estandarizado:



1.2. REACTIVOS Y MATERIAL NECESARIOS, MUESTRAS:

- Ácido Sulfúrico 95-98%
- NaOH, solución 35%
- Indicador mixto, especial para titulaciones de amoníaco
- Catalizador Kjeldahl
- Ácido bórico, solución al 4%
- HCl 0,31 N

- Unidad digestora (Bloc-Digest)
- Colector/Extractor de humos
- Destilador Pro-Nitro I ó II
- Bureta para valoración

Muestras

- Harina de trigo
- Leche en polvo
- Salchicha frankfurt

1.3. PROCEDIMIENTO:

A) Digestión:

Pesar **1** g de muestra perfectamente molida y homogeneizada e introducirlo en un tubo de digestión. Añadir al tubo con muestra **5** g de catalizador Kjeldahl (1 pastillas), **10** mL de ácido sulfúrico al 95-98%.

Colocar los tubos de digestión con las muestras en el Bloc-digest con el colector de humos funcionando. Realizar la digestión a una temperatura de 400°C y un tiempo de **30** minutos.

Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente. Dosificar lentamente 50 ml de agua destilada en cada tubo de muestra (**con cuidado y dejando caer el agua lentamente por las paredes del tubo**). Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.

B) Neutralización y destilación:

Añadir **25** mL de ácido bórico en un matraz erlenmeyer de 250 mL y 2 o 3 gotas de indicador mixto. Colocar el erlenmeyer en la alargadera del refrigerante teniendo la precaución de que ésta quede sumergida dentro de la disolución de ácido bórico.

Colocar el tubo con la muestra en el lado izdo del destilador.

Una vez colocados el tubo de muestra y el erlenmeyer con el ácido bórico, dosificar unos **40** mL de NaOH (indicar en el equipo la cantidad de NaOH) e iniciar la destilación.

La destilación debe prolongarse el tiempo suficiente para que se destilen un mínimo de 150 mL, aproximadamente de 5 a 10 minutos.

c) Valoración:

Valorar con ácido clorhídrico 0,31N el destilado obtenido, hasta que la solución vire de verde a violeta.

Calcular el % de proteína aplicando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{1,4 \times (V_1 - V_0) \times N}{P}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= peso en g de la muestra

V_1 = volumen de HCl consumido en la valoración (mL)

N = normalidad del HCl

V_0 = volumen de HCl consumido en la valoración de un blanco (mL)

F= Factor de conversión para pasar de contenido en nitrógeno a contenido en proteínas. La mayoría de las proteínas contienen un 16% de N₂, de modo que el factor de conversión es 6,25 ($100/16 = 6,25$), pero se han obtenido empíricamente otros factores de conversión en función de la materia prima utilizada.

Factores de conversión de nitrógeno a proteína para diversos alimentos	
	FACTOR
Huevos o carnes	6,25
Productos lácteos	6,38
Trigo	5,70
Otros cereales y semillas oleaginosas	6,25
Almendras	5,18
Cacahuets y nueces del Brasil	5,46
Otros frutos secos de árbol y nuez de coco	5,30

2. MÉTODO DE BIURET

2.1. FUNDAMENTO

Cuando los iones cúpricos se acomplejan, bajo **condiciones alcalinas**, con los enlaces peptídicos (de sustancias que contengan, al menos, dos enlaces peptídicos, como las proteínas) se produce un color violeta-purpúreo, cuya absorbancia puede ser determinada a 540 nm. La intensidad del color (o absorbancia) es proporcional al contenido en proteínas de la muestra.

Este método es utilizado para determinar las proteínas contenidas en los cereales, carne, proteínas de las semillas de soja y como ensayo cualitativo para el pienso. Se puede utilizar así mismo, para medir el contenido en proteína de los extractos de proteínas.

2.2. MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS, MUESTRA

- Disolución patrón de albúmina sérica bovina (BSA, 4 mg/ml)
- Reactivo de Biuret: sulfato de cobre, NaOH y tartrato de sodio y potasio, el cual se usa para estabilizar el ión cúprico en la disolución alcalina.

Muestras:

- Lactosuero bovino
- Solución BSA 6 mg/ml

2.3. PROCEDIMIENTO

Se dan instrucciones para el análisis por duplicado:

1. **Preparar las soluciones estándar.** Para ello, se prepara una solución de albúmina sérica bovina de 8 mg /ml (Pasar 48 mg de albúmina y disolverlos en 6 ml de agua destilada) y haciendo las diluciones que se indican a continuación. Los tubos contendrán de 0 a 8 mg/ml de albúmina.

		Albúmina sérica bovina (mg/ml)					
		Blanco	0.5	1	2	4	8
ml de disolución patrón de albúmina	de	0	0.25	0.5	1	2	3
mL de agua destilada		4	3.75	3.5	3	2	0

2. Preparar soluciones de las muestras de lactosuero y BSA

	Muestras		
	1/4	1/2	Neta
Muestras	1	2	3
ml agua destilada	3	2	0

- 3. Incubar las soluciones estándar o de la muestra.** Añadir por duplicado a los tubos de ensayo 1 ml de las soluciones estándar o de la muestra y 1.5 ml del Reactivo de Biuret e incubar a 37°C durante 30 minutos.
- 4. Leer la absorbancia:** Utilizar el cero de la solución estándar para hacer el blanco. Leer la absorbancia de los estándares y de las muestras a 560 nm. Tomar la lectura de los tubos de la curva de calibrado desde la concentración inferior a la superior y seguidamente, las de las muestras de lactosuero.
- 5. Calcular la recta de calibrado:** Con los datos de absorbancia obtenidos con las soluciones estándar, construir una curva de calibrado y determinar la ecuación de la recta
- 6. Determinar la concentración de proteína de la muestra:** Calcular el contenido en proteína de las soluciones de las muestras de lactosuero utilizando la recta de calibrado.

3. ESPECTROFOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

Medir la absorbancia a 280 nm de las soluciones de BSA (Neta, 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16).
Representar la absorbancia frente a la concentración.

4. COMENTAR

Comentar los resultados obtenidos para las soluciones de BSA por los dos métodos usados en función de la proteína que se ha pesado.