

Determinación y Cuantificación de Proteínas en Leche en Polvo

Natali Rocha

Bachillerato de Química Básica e Industrial

Introducción al Análisis Químico - Química

Biorgánica - Química General III - Física III

3° BG

2019

Índice

Índice	1
Resumen	3
Abstract	3
Introducción	3
Objetivos	4
Pregunta Investigable	4
Hipótesis	4
Marco teórico	4
Proteínas	5
Salting Out	6
Espectrofotometría	7
Electroforesis	8
Materiales y Sustancias	10
Materiales	10
Sustancias	10
Técnica	10
Extracción de caseínas de Leche en polvo.	10
Cuantificación de proteínas totales	10
Fraccionamiento	11
Espectrofotometría (BCA)	11
Determinación de proteínas por electroforesis.	12
Recolección y Análisis de Datos	13
Electroforesis	13
Proteínas totales. Espectrofotometría	15
BCA	15
Discusión de resultados	19
Conclusiones	19
Perspectivas	19
Bibliografía	20
Anexos	22
Anexo 1: Observaciones	22
Anexo 2: PBS para diálisis	22
Anexo 3: Concentraciones para Salting Out	22
Anexo 4: Buffer para muestras de electroforesis	22
Anexo 5: Medidas de Seguridad	23
Anexo 6: Encuestas	25
Anexo 7: Imágenes	28

Resumen

Este proyecto consistió en la determinación y cuantificación de proteínas en un complemento de leche en polvo: Svelty de Nestlé®, fortificado con vitaminas (D,C y E), calcio, hierro y zinc. La pregunta que se intentó responder fue: ¿Cómo varía la composición proteica y la concentración total de proteínas según la fracción del suero de la leche en polvo de la línea Svelty de Nestlé?. Se esperó que los valores fueran similares al suero de leche bovino. Para dar respuesta se realizó el fraccionamiento del suero de leche con el método de salting out. Se determinó la composición proteica de cada fracción con una electroforesis (SDS-PAGE). Se cuantificó la concentración total y parcial de proteínas por medio de espectrofotometría. Se logró concluir que el complemento estudiado posiblemente contiene β -lactoglobulina, osteopontina y cadenas menores que conforman la inmunoglobulina en la fracción del suero que precipita al 35 % de sulfato de amonio, representando un 1.4261 % del polvo en seco. La fracción que precipita al 50 % puede estar formada por α -lactoalbúmina, transferrina, albúmina, lactoferrina y lactoperoxidasa. Las proteínas de dicha fracción representan el 0.0542 % de la leche en polvo. El sobrenadante a 50 % de sulfato de amonio puede estar compuesto por lactoglobulina, transferrina, albúmina, lactoperoxidasa, lactoferrina y α -lactoalbúmina, representando un 0.2961 % de la leche en polvo en seco. La concentración de proteínas totales en el suero es de 1.5072×10^{-3} mol/L.

Abstract

This project consisted in the determination and quantification of proteins on a milk powder complement: Svelty by Nestlé® complement, fortified with vitamins (D, C y E), calcium, iron and zinc. This investigation tries to answer how does the composition and protein content in different fractions of the Svelty Nestlé® milk powder whey change. It was expected for it to be similar to the bovine whole milk. In order to find the answer to that question the salting out method was used to obtain different whey fractions. The proteins of each fraction were determined with an SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Total and partial protein concentration was quantified by spectrophotometry. It was concluded that the complement might contain β -lactoglobulin, osteopontin and soft chains of immunoglobulin in the 35 % ammonium sulfate precipitated fraction, it is an 1.4261 % of the powder. The 50 % ammonium sulfate precipitated fraction could contain α -lactalbumin, transferrin, albumin, lactoferrin and lactoperoxidase. This proteins are the 0.0542 % of the powder. The supernatant at 50% ammonium sulfate might contain lactoglobulin, transferrin, albumin, lactoperoxidase, lactoferrin and α -lactalbumin, which represents the 0.2961 % of the powder. Total protein concentration in the whey is 1.5072×10^{-3} mol/L.

Introducción

Un problema muy frecuente en el Uruguay es la deficiencia nutricional tanto en niños como en adultos. A causa de esto se ve necesario recurrir a distintos complementos para equilibrar esta deficiencia. Uno de ellos es la leche de fórmula enriquecida de distintas maneras.

De estos hechos surge la idea de estudiar la composición proteica de uno de estos complementos, ya que las proteínas son una de las bases fundamentales de la nutrición.

Por lo tanto se analizó una muestra de Leche en Polvo *Svelty* de Nestlé.

Objetivos

- Cuantificar la concentración de proteínas por espectrofotometría con BSA en distintas fracciones del suero de leche preparada a partir del complemento *Svelty*.

- Determinar por medio de electroforesis las proteínas presentes en cada fracción obtenida

Pregunta Investigable

¿Cómo varía la composición proteica y la concentración total de proteínas según la fracción del suero de la leche en polvo de la línea *Svelty* de Nestlé?

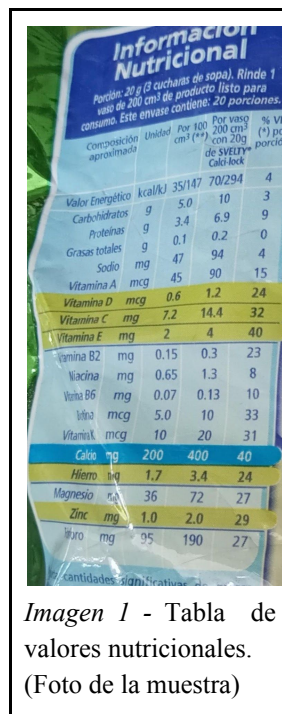
Hipótesis

Se cree que, si bien la mayor cantidad de proteínas precipitan por ser caseínas, el complemento debería tener concentraciones similares o mayores a la leche entera bobina en el lactosuero.

Marco teórico

Las proteínas son biomoléculas fundamentales en la vida. Por esto es importante asegurarse de que son incluidas en la dieta. En algunos casos, por ejemplo en lactantes, personas con deficiencias nutricionales (distintas edades), etc, se ve necesario recurrir a complementos alimenticios como es la leche de fórmula (que en muchos casos está enriquecida con minerales o nutrientes). Muchos alimentos con soja o derivados de la misma, son recomendados por sus valores nutricionales. Incluso muchos complementos para lactantes contienen derivados de la soja.

Este es el caso de la leche en polvo *Svelty* de Nestlé. (Ver tabla de valores nutricionales)



Información Nutricional

Porción: 20 g (3 cucharas de sopa). Rinde 1 vaso de 200 cm³ de producto listo para consumo. Este envase contiene: 20 porciones.

Composición aproximada	Unidad	Por 100 g (**)	Por vaso de 200 cm ³ con 20g de SVELTY® Cálculo	% VD (*) por porción
Valor Energético	kcal/kJ	351/147	70/294	4
Carbohidratos	g	5.0	10	3
Proteínas	g	3.4	6.9	9
Grasas totales	g	0.1	0.2	0
Sodio	mg	47	94	4
Vitamina A	mcg	45	90	15
Vitamina D	mcg	0.6	1.2	24
Vitamina C	mg	7.2	14.4	32
Vitamina E	mg	2	4	40
Vitamina B2	mg	0.15	0.3	23
Niacina	mg	0.65	1.3	8
Vitamina B6	mg	0.07	0.13	10
Vitamina B12	mcg	5.0	10	33
Vitamina B9	mcg	10	20	31
Cálcio	mg	200	400	40
Hierro	mg	1.7	3.4	24
Magnesio	mg	36	72	27
Zinc	mg	1.0	2.0	29
Fósforo	mg	95	190	27

(cantidades significativas)

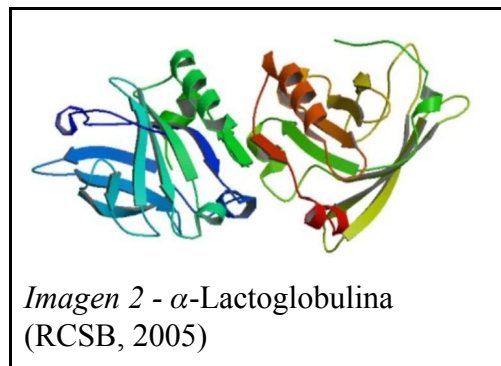
Imagen 1 - Tabla de valores nutricionales. (Foto de la muestra)

En el suero de leche se encuentra un 20 % de las proteínas totales de la leche. Por definición son "aquellas que se mantienen en solución luego de precipitar las caseínas a pH = 4.6 a 20°C" (Calvo, s.f.). Algunas de las proteínas presentes en el suero de leche son:

Albumina. Su estructura primaria consiste en 528 residuos de aminoácidos. Su estructura secundaria está formada por α -hélice y β -lámina. Es una proteína globular y no presenta estructura cuaternaria. Se encuentra en concentraciones de aproximadamente 0.4 mg/mL. Su masa molar es de 67 kDa.

α -Lactoalbúmina. Encargada de la síntesis de la lactosa. Es una de las proteínas más abundantes en el lactosuero con concentraciones que varían entre 1 y 1.5 mg/mL. Su estructura primaria consta de 123 residuos de aminoácidos, presenta α -hélice y β -lámina en su estructura secundaria, su estructura terciaria globular, es estabilizada por 4 puentes disulfuro. No presenta estructura cuaternaria ya que está formada por una sola cadena.

β -Lactoglobulina. No se encuentra en la leche materna (humana). Con concentraciones que varían de 2 a 4 mg/mL, representa la mitad de las proteínas en el suero de leche bovina, es la más abundante. Su estructura primaria consiste en 162 residuos de aminoácidos de los cuales 84 son esenciales. Su masa molar es de 18400 Da. Su estructura secundaria está formada por α -hélice y β -lámina. Es una proteína globular mantenida por dos puentes disulfuro. (Ver imagen 2).



Immunoglobulina. Se encuentra presente en la leche de vaca con concentraciones que varían entre 0.4 y 1 mg/mL. Está formada por cuatro cadenas: dos más ligeras que las otras. Las cadenas más pesadas se unen entre sí con dos puentes disulfuro y cada una de ellas se une a una cadena liviana con un puente disulfuro. Su masa molar es de 97 kDa.

“Constituye aproximadamente el 75 % de los anticuerpos en un adulto; se transfiere de la madre al niño en el útero a través de la sangre y en la lactancia materna” (Marshall, Hernandez, 2014).

Lactoferrina. Tiene una masa molar de aproximadamente 80 kDa. En algunos países se utiliza como ingrediente en alimentos para niños.

Osteopontina. Cadena de 316 residuos de aminoácidos. Masa molar entre 41 y 75 kDa.

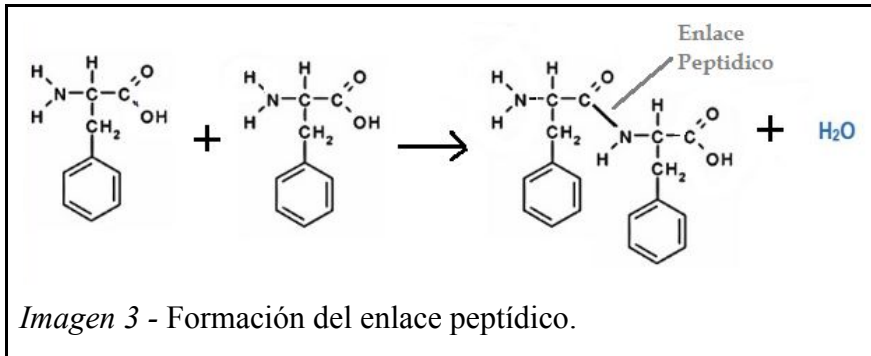
Transferrina. Masa molar de 70 - 95 kDa.

Lactoperoxidasa. 78 kDa.

Proteínas

Las proteínas constituyen el 50 % de la masa en seco de una célula. Su nombre deriva de una palabra griega que significa "lo principal", ya reflejando la importancia de estas biomoléculas. Desempeñan gran cantidad de funciones biológicas, por ejemplo: dan estructura en las membranas celulares, permiten que la célula o distintos organelos se muevan (por ejemplo la contracción de los músculos se da gracias a que estos están compuestos por miosina y actina), transportan sustancias dentro de la célula y entre células, regulan la actividad fisiológica y metabólica de las células, tienen importancia en la protección inmune, y actúan como catalizadores biológicos (enzimas). También tienen importancia en los alimentos, por sus propiedades ayudan a establecer la estructura y características del alimento, son nutrientes (ya que se obtienen moléculas nitrogenadas que contribuyen a conservar la estructura y al desarrollo de quién lo consume). (Badui, 2006)

Las proteínas son polipéptidos con cadenas de más de 100 residuos de aminoácidos. Estos están unidos por un enlace muy estable: el enlace peptídico. Un hidrógeno del grupo amino se une con el grupo oxidrilo formando una molécula de agua y el enlace peptídico entre ambos aminoácidos. En la siguiente imagen se ilustra la formación de dicho enlace.



Los aminoácidos más comunes en las proteínas de los seres vivos son 20. De estos hay nueve esenciales: Isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina (la histidina solo en niños).

La estructura de las proteínas se clasifica en cuatro niveles:

1. El primero es simplemente la cadena de residuos de aminoácidos.
2. El segundo nivel se clasifica en α -hélices (se forman puentes de hidrógeno entre los aminoácidos de una misma cadena formando un espiral), β -láminas (la cadena se pliega sobre sí misma con interacciones de puentes de hidrógeno) y tipo colágeno (solo presente en el colágeno, forma fibrosa); en una misma proteína se pueden encontrar varios tipos del segundo nivel.
3. El nivel terciario se clasifica según la forma que adopta la proteína completa: globular o fibrosa.
4. El cuarto nivel se presenta solo si hay más de dos cadenas de residuos de aminoácidos y hace referencia a la cantidad de estas cadenas.

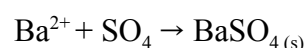
Estos niveles estructurales pueden perderse fácilmente por causa de varios agentes y solo permanece la estructura primaria. Cuando esto ocurre se dice que se desnaturaliza la proteína (pierde su forma natural). Algunos agentes desnaturalizantes son: la temperatura, la energía mecánica, los ácidos, algunas radiaciones, etc.

Salting Out

El Salting Out es una técnica que permite separar mezclas de proteínas en distintas fracciones. Las proteínas muestran cambios en su solubilidad al variar la concentración de una sal ya que las partículas de sal se rodean con las moléculas de agua y las proteínas tienen menor cantidad de agua que las disueltas. Es entonces que precipitan.

Las sales más usadas son el sulfato de potasio y el sulfato de amonio.

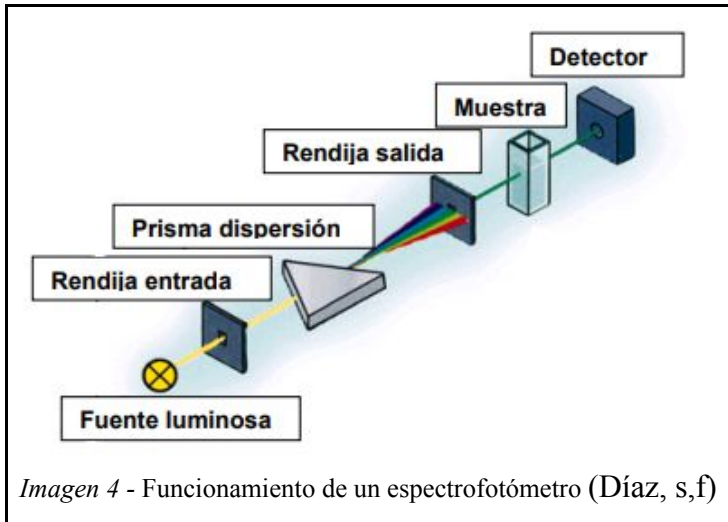
Luego de fraccionada la muestra se debe retirar la sal para poder proseguir con distintos ensayos en los cuales ésta sería una interferencia. Para esto se realiza una diálisis. Se coloca la muestra dentro de una membrana que permite el paso de las moléculas salinas pero no el de las proteínas. Se coloca un solvente en el cual la concentración de sal sea menor que en la muestra, por ejemplo PBS (Fosfato Base con Sal) (ver anexos). De esta forma por presión osmótica se igualan las concentraciones de sal en la muestra y en el solvente. Se realizan varios cambios del solvente para extraer toda la sal. Para verificar que se ha extraído en su totalidad puede hacerse una reacción de reconocimiento. Por ejemplo, para confirmar la presencia de sulfato de amonio puede agregarse una sal de bario (como cloruro de bario) para que precipite sulfato de bario (precipitado blanco).



Dado que el PBS contiene fosfato, puede que el precipitado blanco sea fosfato de bario. Para eliminar esta interferencia se añade ácido clorhídrico, que disuelve el fosfato de bario. Si no hay precipitado blanco se da por terminada la diálisis.

Espectrofotometría

La espectrofotometría es un método analítico utilizado para determinar la concentración de distintas soluciones. Se basa en que las moléculas absorben radiaciones electromagnéticas y la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración (Díaz, s,f). Se llama absorbancia a la cantidad de luz absorbida por una sustancia. Para medirla se utiliza un espectrofotómetro: se puede seleccionar la longitud de onda de trabajo y así medir cuánto absorbe el analito de este haz de luz.



Una forma para determinar la concentración de una solución problema es realizar una curva de calibración. Esto consiste en preparar soluciones patrón, con el mismo analito que la solución problema, a distintas concentraciones y medir su absorbancia (preparar las soluciones para que la absorbancia esté en rangos de 0.7 a 1.5 para asegurar que la absorbancia medida con el aparato es confiable). Al graficar absorbancia en función de concentración se obtiene la ecuación que describe a la gráfica. Utilizando esta ecuación puede saberse la concentración de la solución problema con sólo medir su absorbancia.

En la mayoría de los casos no sólo el analito tiene un efecto sobre el haz de luz. Para poder restar este efecto se puede preparar un blanco, es decir, una solución con todos los componentes excepto el analito. La absorbancia del blanco debe restarse a cada valor de absorbancia (tanto de los patrones como de la solución problema).

Las proteínas en general absorben a una longitud de onda de 280 nm (región de las radiaciones ultravioletas, que van de 195 a 400 nm), a causa de los grupos aromáticos del triptófano y la tirosina. Para calcular la concentración de una solución con este método se aplica la ley de Lambert-Beer. Esta ley expresa la relación que hay entre la absorbancia y la concentración de una solución. La absorbancia es proporcional a la concentración, es decir, a mayor cantidad de moléculas mayor interacción tiene el haz de luz. (Díaz, s,f)

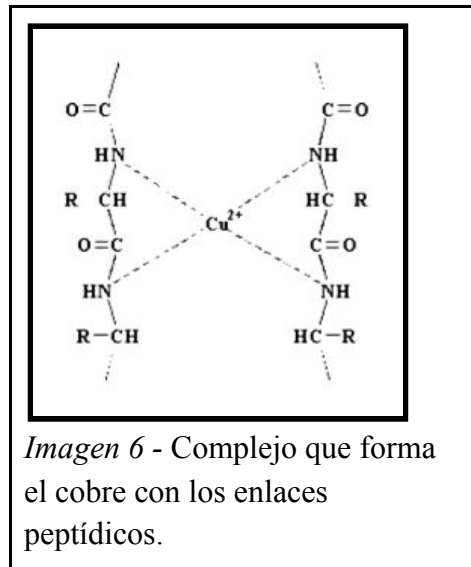
$$A = \epsilon \cdot C \cdot i$$

Donde i es la longitud de la celda, A es la absorbancia, ϵ es el coeficiente de absortividad molar y representa la cantidad de luz absorbida por unidad de concentración (se usa el de la albúmina bovina que es $43824 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), y C es la concentración de la proteína. (Del Puerto; 2013). La ley de Lambert-Beer sólo se cumple con soluciones diluidas.

Pueden usarse también otros métodos colorimétricos como el Biuret, Bradford, Folin, Lowry o BCA (ácido bicinconínico)

El reactivo de biuret está compuesto por hidróxido de sodio o potasio (para dar un medio básico) y sulfato de cobre (II). El catión cobre reacciona con el nitrógeno de los enlaces peptídicos formando un complejo que se mide a 540 nm (ver imagen 2)

Otro método colorimétrico es el del ácido bicinconínico (BCA). En un medio básico las proteínas reducen el Cu^{2+} del BSA a Cu^+ (PB-L, s.f.). Este complejo se lee en el espectrofotómetro a 562 nm



Electroforesis

La electroforesis es una técnica usada en biotecnología para el estudio de proteínas y también de ADN. Se basa en la diferencia de masa de las distintas moléculas y su comportamiento frente a un campo eléctrico. Esto es posible ya que las proteínas se encuentran cargadas. Cuando las proteínas se encuentran en su punto isoeléctrico (pH al que los aminoácidos se encuentran como zwitterion) no presentan movilidad frente a un campo eléctrico. Por esto se agrega un buffer a las muestras: para que todas las proteínas permanecen cargadas y se distribuyan en el gel.

Las muestras se colocan en un gel de poliacrilamida (aunque este es el medio más usado, se usan otros como el papel, celulosa, gel de agarosa, etc.), y por el efecto de un campo eléctrico se separan las distintas fracciones que hay en cada muestra según su masa molar. Cuanto mayor masa tenga la molécula menos distancia recorre en el gel. Esto permite diferenciar distintas moléculas e incluso identificarlas comparandolas con un patrón de masa conocida.

El gel se prepara en un sistema que consiste en dos placas de vidrio iguales (aunque en algunos modelos un vidrio tiene mayor altitud que el otro), dos separadores (que se ubican entre los vidrios), un soporte con prensas que sellan el sistema y un peine que permite que se formen los espacios para colocar las muestras.

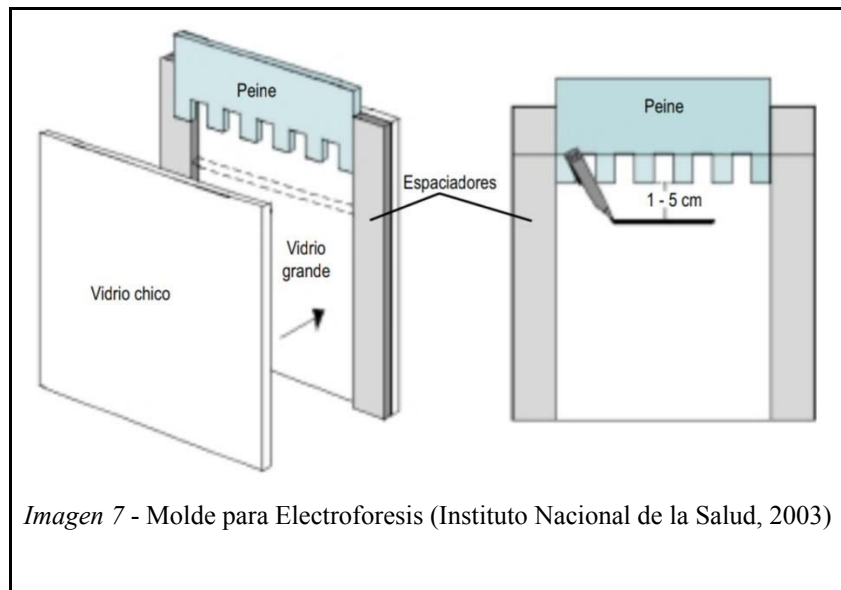


Imagen 7 - Molde para Electroforesis (Instituto Nacional de la Salud, 2003)

El sistema de electroforesis usado en esta práctica es discontinuo ya que se preparan dos geles diferentes. Ambos contienen agua, una mezcla de acrilamida y bisacrilamida, buffer Tris (tris_aminometano), y SDS (Dodecil sulfato de sodio). Por último se agrega el TEMED (tetrametiletilendiamina) y el APS (persulfato de amonio) ya que estos son los agentes que aceleran la polimerización. En otros casos se utilizan otros agentes para la polimerización, como por ejemplo luz ultravioleta.

El gel de empacamiento se ubica en la parte superior y es menos denso. El buffer usado es pH 6.8 (Tris 0.5 mol/L). Es en este gel donde se forman los pocillos y donde se colocan las muestras. El gel de corrida es más denso y es en el cual las proteínas van a migrar formando un patrón electroforético (que varía según la masa molar de cada molécula y la concentración del gel). El buffer usado es pH 8.8 (Tris 1.5 mol/L). Antes de la polimerización los geles se mezclan con facilidad, así que primero debe prepararse el gel de corrida y, luego de que este polimeriza en el molde, se agrega el gel de empacamiento colocando el peine para la formación de los pocillos (Instituto Nacional de la Salud, 2003).

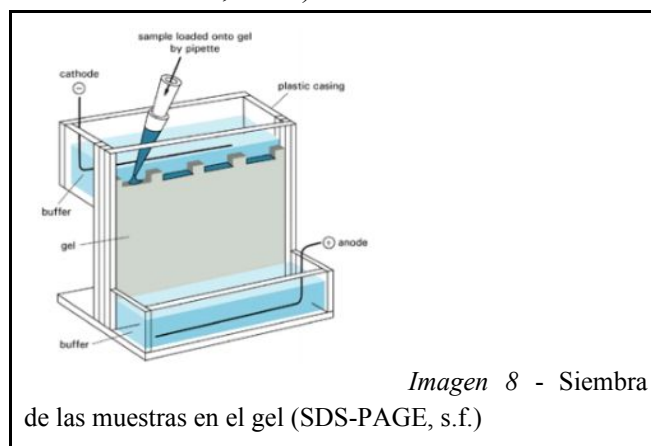


Imagen 8 - Siembra de las muestras en el gel (SDS-PAGE, s.f.)

Materiales y Sustancias

Materiales

- Espectrofotómetro Amersham Ultrospec 3100 *pro*
- Celda de cuarzo para espectrofotómetro
- Placa
- Equipo de electroforesis.
- Vaso de bohemia de 500 mL

- Pipeta aforada de 20 mL
- Plancha calefactora
- Termómetro
- Moldes para Gel
- Micropipeta 100- 1000 μ L
- Micropipeta 20- 100 μ L
- Micropipeta 2 - 20 μ L
- Balanza
- Balanza analítica
- Centrífuga SIGMA 3_30K
- Agitador Magnético

Sustancias

- Ácido Acético 10 %
- Dodecil sulfato de sodio
- Patrón marcador de masa molecular
- Albúmina patrón
- Buffer para electroforesis
- Agua destilada
- Hidróxido de sodio
- Hidróxido de potasio
- Fosfato de sodio anhidro.
- Azul de coomassie
- Solución de decoloración

Técnica

Extracción de caseínas de Leche en polvo.

1. Se preparó una solución de 200 mL disolviendo 20 g de leche en polvo en agua destilada.
2. Se agregó ácido acético 10% hasta la precipitación total de las caseínas.
3. Se filtró el precipitado y se centrifugó la solución sobrenadante durante 30 minutos a 14000 rpm.

Cuantificación de proteínas totales

Se realizó una dilución 1/50 del suero obtenido.

Se midió la absorbancia de dicha solución en un espectrofotómetro.

Se calcula la concentración aplicando la ley de Lambert Beer.

Fraccionamiento

1. Se trabajó con la solución sobrenadante obtenida de la centrifugación y con una dilución 1/50 de la misma¹
2. Se llevó a ambas soluciones al 35 % de sulfato de amonio y se dejó toda la noche reposando para la precipitación total de las proteínas. (Ver anexo 3)
3. Se centrifugaron las soluciones durante 30 minutos a 14000 rpm.
4. Los pellet se disolvieron en el mínimo volumen de agua destilada posible.
5. Se llevó al 50 % de sulfato de amonio a los sobrenadantes de ambas soluciones y se dejó reposar toda la noche para la precipitación total de las proteínas.

¹ Se hará referencia a la solución sin diluir como solución 1, y a la solución diluida como solución 2.

6. Se centrifugó durante 30 minutos a 14000 rpm.
7. Se disolvieron los pellet en el mínimo volumen posible de agua destilada. y se conservó el sobrenadante.

Diálisis

1. Se preparó una solución de PBS para la diálisis (ver anexo 2).
2. Se realizó la diálisis de las muestras cambiando el PBS 4 veces.
3. Para la verificación de la total extracción de sulfato de amonio se tomó una muestra del PBS y se le añadió cloruro de bario. La formación de un precipitado blanco indica presencia de sulfato de amonio. Una posible interferencia es el fosfato que, junto con el bario, precipita fosfato de bario. Por esto se añade ácido clorhídrico 3 mol/L, que disuelve dicho precipitado.

Espectrofotometría (BCA)

Se realizaron 5 diluciones de un patrón de albúmina bovina 2.98 mg/mL ²

[] mg/mL	Volumen de solución stock (µL)	Diluyente (µL)
2.98 (solución stock)	80.0	---
2.45	65.8	14.2
1.75	47.1	32.9
1.05	28.2	61.8
0.70	19.0	61.2
0.35	9.5	70.5

Se realizaron diluciones de las muestras:

Muestra 1 (solución 1, pellet al 50 % de sulfato de amonio): diluciones 1/3, 1/5 y 1/10.

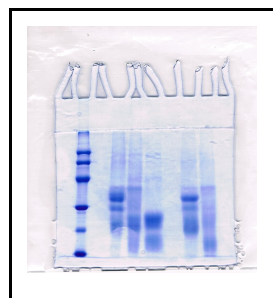
Muestra 3 (solución 1, pellet al 35 % de sulfato de amonio): diluciones 1/3, 1/5 y 1/10.

Muestra 5 (solución 1, sobrenadante al 50 % de sulfato de amonio): una muestra sin diluir, diluciones 1/2 y 1/3.

Se añadieron 20 µL de cada dilución por triplicado en la placa y 200 µL de reactivo

Determinación de proteínas por electroforesis.

Preparación del Gel



² Se utilizó un patrón que en la etiqueta figuraba una concentración errónea, luego de calcular exactamente la concentración se realizaron los cálculos. En la tabla se muestran las concentraciones reales ya corregidas

Imagen 9 - Gel de esta electroforesis

Se prepararon los geles de poliacrilamida siguiendo las proporciones de la tabla.

Gel de Resolución	Gel de Empaque	
4.1 mL	670 μ L	Acilamida/Bisacilamida
2.0 mL	2.7 μ L	H ₂ O qq
3.7 mL	---	Tris 1.5 mol/L pH=8.8
---	500 μ L	Tris 0.5 mol/L pH=6.8
100 μ L	40 μ L	SDS 10%
100 μ L	40 μ L	APS 10%
4 μ L	4 μ L	TEMED

Se utilizó un peine para 10 pocillos.

Preparación y siembra de las Muestras

Se prepararon soluciones con la muestra de forma tal que la cantidad de proteínas estuviera en un rango de 24 a 30 μ g.

Se agregó buffer para muestra a cada solución. (Ver anexo 4)

Se colocó en el segundo pocillo el marcador de masa molecular.

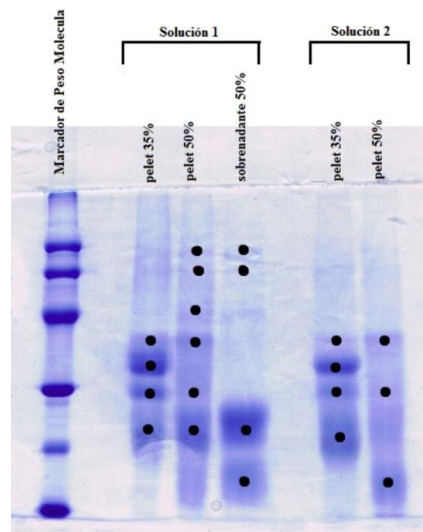
En el cuarto, quinto y sexto pocillo se colocaron fracciones de la solución sin diluir: el pellet precipitado al 35 % de sulfato de amonio, el pellet precipitado al 50 % de sulfato de amonio y el sobrenadante respectivamente.

En el octavo y noveno pocillo se colocaron las fracciones obtenidas de la solución diluida: el pellet de la precipitación al 35 % y el pellet de la precipitación al 50 %. No se colocó el sobrenadante ya que la concentración total de proteínas era demasiado baja para poder ser observada en el gel

Recolección y Análisis de Datos

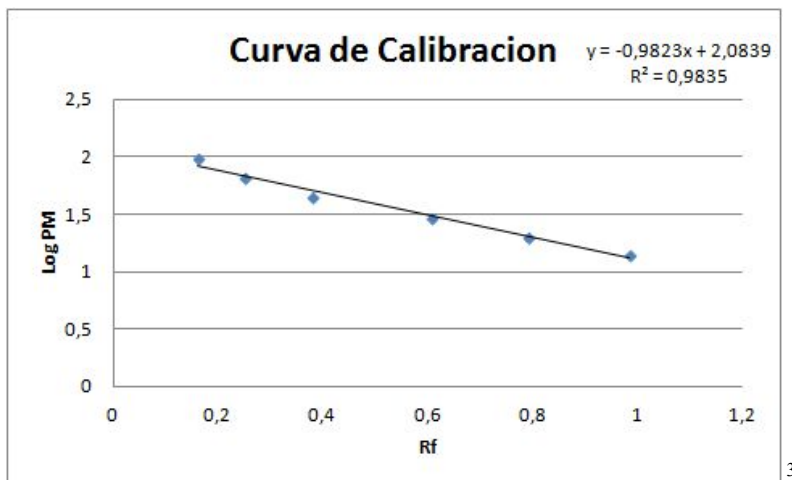
Electroforesis

Resultados en el gel: se marca con un punto cada banda que fue tomada en cuenta.



Marcador de Masa Molecular (MM)

Rf	log MM	MM (Da)	
0.9838709677	1.146128036	14	Fosforilasa
0.7903225806	1.301029996	20	Albúmina
0.6048387097	1.477121255	30	Ovoalbúmina
0.3790322581	1.653212514	45	Anhidrasa
0.25	1.826074803	67	inhibidor de la tripsina
0.1612903226	1.986771734	97	α -Lactoalbúmina



3

Resultados de la electroforesis en las muestras

	Muestras				
	Solución 1			Solución 2	
Bandas ⁴	pellet 35 %	pellet 50 %	Sobre. 50 %	pellet 35 %	pellet 50 %

³ Se utiliza PM en la gráfica para hacer referencia a la masa molar.

⁴ El número de banda se cuenta de menor a mayor distancia recorrida en el gel en cada una de las muestras.

Frente	6,25 cm	6,25 cm	6,30 cm	6,30 cm	6,30 cm
B1	2,80 cm	1,20 cm	1,20 cm	2,90 cm	2,90 cm
B2	3,30 cm	1,70 cm	1,60 cm	3,35 cm	4.00 cm
B3	3,85 cm	2,40 cm	4,50 cm	3,90 cm	5,65 cm
B4	4,70 cm	2,90 cm	5,55 cm	4,75 cm	---
B5	---	3,70 cm	---	---	---
B6	---	4,50 cm	---	---	---

--- Rf de las muestras ---						
	1 pellet 35 %		1 pellet 50 %		1 sobre 50 %	
	log MM	MM (Da)	log MM	MM (Da)	log MM	MM (Da)
B1	1,6438296	44,0382041	1,8952984	78,5775349	1,89679524	78,8488276
B2	1,5652456	36,7490063	1,8167144	63,3390352	1,83442698	68,3009871
B3	1,4788032	30,1164099	1,7066968	50,8975409	1,38225714	24,1133274
B4	1,3452104	22,1065535	1,6281128	42,4729865	1,21854048	16,5401895
B5	---	---	1,5023784	31,7964328	---	---
B6	---	---	1,376644	23,8036743	---	---

	2 pellet 35 %		2 pellet 50 %	
	log MM	MM (Da)	log MM	MM (Da)
B1	1,63173016	42,8282333	1,63173016	42,8282333
B2	1,56156587	36,4389513	1,46021746	28,8547596
B3	1,47580952	29,9095253	1,20294841	15,9568958
B4	1,34327698	22,0433187		

Proteínas totales. Espectrofotometría

$$A=1.321$$

$$C = \frac{1.321}{43824 \text{ mol/L} \cdot 1 \text{ cm}^{-1}} = 3.01430 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$$

$$X50 = 1.5072 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

BCA

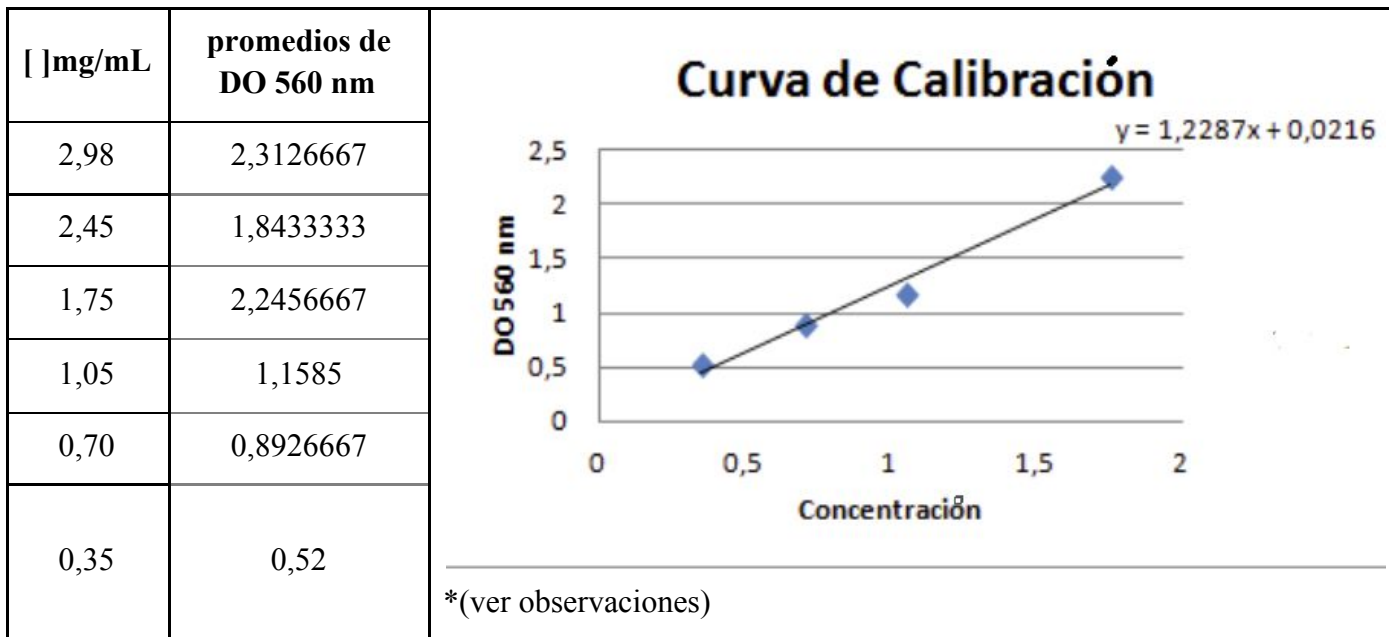
Resultados de la lectura de la placa en el lector:

Measurement count: 1 Filter: 560 nm												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,344	2,645	2,288	0,634	0,639	0,666	0,448	0,49	0,539	0,034	0,035	0,034
B	2,154	1,921	1,794	0,451	0,474	0,549	0,038	0,036	0,036	0,035	0,035	0,035
C	2,348	2,374	2,354	0,302	0,27	0,363	0,034	0,034	0,035	0,034	0,035	0,035
D	1,24	1,059	1,303	1,116	1,12	1,249	0,034	0,034	0,035	0,034	0,035	0,034
E	1,023	1,008	0,986	0,829	0,844	0,859	0,034	0,035	0,034	0,034	0,034	0,035
F	0,663	0,623	0,613	0,59	0,58	0,598	0,035	0,039	0,037	0,037	0,038	0,037
G	0,112	0,112	0,11	0,757	0,721	0,835	0,034	0,034	0,035	0,035	0,034	0,034
H	0,116	0,11	0,113	0,464	0,476	0,478	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035	0,035
Blanco	0,113											

Muestras sin el blanco:

1	2	3	4	5	6	7	8	9
2,231	2,532	2,175	0,521	0,526	0,553	0,335	0,377	0,426
2,041	1,808	1,681	0,338	0,361	0,436			
2,235	2,261	2,241	0,189	0,157	0,25			
1,127	0,946	1,19	1,003	1,007	1,136			
0,91	0,895	0,873	0,716	0,731	0,746			
0,55	0,51	0,5	0,477	0,467	0,485			

			0,644	0,608	0,722			
0,003	-0,003	0	0,351	0,363	0,365			



Concentración en las muestras:

M.1	promedio	[] dilución	[] concentrada	[] promedio
1/3	0,533	0,416	1,249	1,381
1/5	0,378	0,290	1,452	
1/10	0,199	0,144	1,441	

M.3	promedio	[] dilución	[] concentrada	[] promedio
1/3	1,049	0,836	2,508	3,032
1/5	0,731	0,577	2,887	
1/10	0,476	0,370	3,701	

M.5	promedio	[] dilución	[] concentrada	[] promedio
1	0,658	0,518	0,518	0,647
1/2	0,360	0,275	0,550	
1/3	0,379	0,291	0,873	

Porcentaje de cada muestra en la leche en polvo.

Muestra 1 (pellet 50 % Sulfato de amonio)

BCA → 1.381 mg/mL

$$C_1 = \frac{1.381 \text{ mg/mL} \cdot 3 \text{ mL}}{33.5 \text{ mL}} = 0.1237 \text{ mg/mL} \text{ (en la solución al 35 \% de sulfato de amonio)}$$

$$C_1 = \frac{0.1237 \text{ mg/mL} \cdot 33.5 \text{ mL}}{36 \text{ mL}} = 0.1151 \text{ mg/mL} \text{ (en el suero de leche)}$$

$$C_1 = \frac{0.1151 \text{ mg/mL} \cdot 95 \text{ mL}}{200 \text{ mL}} = 0.0547 \text{ mg/mL} \text{ (en la leche preparada)}$$

→ (20.1981 ± 0.0002) g de leche en polvo en 200 mL de leche

0.0547 mg ----- 1 mL

x ----- 200 mL

$$x = 10.94 \text{ mg} = 0.01094 \text{ g (en los 200 mL de leche preparados)}$$

20.1981 g ---- 100 %

0.01094 g ---- x %

x = 0.0542 % (el porcentaje que representan las proteínas precipitadas al 50 % de sulfato de amonio en la leche en polvo)

Muestra 3 (pellet a 35 % de sulfato de amonio)

BCA → 3.032 mg/mL

$$C_1 = \frac{3.032 \text{ mg/mL} \cdot 36 \text{ mL}}{36 \text{ mL}} = 3.032 \text{ mg/mL} \text{ (en el suero)}$$

$$C_1 = \frac{3.032 \text{ mg/mL} \cdot 95 \text{ mL}}{200 \text{ mL}} = 1.4402 \text{ mg/mL} \text{ (en la leche preparada)}$$

1.4402 mg ---- 1 mL

x ----- 200mL

$$x = 0.28804 \text{ mg (en los 200 mL de leche preparados)}$$

20.1981 g ---- 100 %

0.28804 g ---- x %

x = 1.14261 % (el porcentaje que representan las proteínas precipitadas al 50% de sulfato de amonio en la leche en polvo)

Muestra 5 (sobrenadante a 50 % de sulfato de amonio)

BCA → 0.647 mg/mL

$$C_1 = \frac{0.647 \text{ mg/mL} \cdot 35 \text{ mL}}{33.5 \text{ mL}} = 0.6760 \text{ mg/mL} \text{ (al 35 \% de sulfato de amonio)}$$

$$C_1 = \frac{0.6760 \text{ mg/mL} \cdot 33.5 \text{ mL}}{36 \text{ mL}} = 0.6290 \text{ mg/mL (en el suero)}$$

$$C_1 = \frac{0.6290 \text{ mg/mL} \cdot 95 \text{ mL}}{200 \text{ mL}} = 0.2988 \text{ mg/mL (en la leche preparada)}$$

0.2988 mg ---- 1 mL

x ---- 200 mL

x = 59.76 mg = 0.0598 g (en los 200 mL de leche preparada)

20.1981 g ---- 100 %

0.0598 g ---- x %

x = **0.2961 %**

Fracción (en porcentaje de sulfato de amonio)	[] en leche en polvo	[] en el Lactosuero	Proteínas posiblemente presentes
Precipitado a 35 %	1.4261 %	0.1151 mg/mL	β -Lactoglobulina, osteopontina, cadenas polipeptídicas que forman la inmunoglobulina
Precipitado a 50 %	0.0542 %	3.032 mg/mL	α -lactoalbúmina, transferrina, osteopontina, lactoperoxidasa, lactoferrina.
Sobrenadante a 50 %	0.2961 %	0.6290 mg/mL	α -lactoalbúmina, lactoglobulina, transferrina, albúmina, lactoferrina, lactoperoxidasa.

Discusión de resultados

El 50 % de las personas encuestadas afirman que la leche en polvo es parte de su dieta y un 47.8 % usan o han utilizado complementos alimenticios. La razón más frecuente de consumo de complementos es la alimentación de adultos seguida de la alimentación en bebés. De los encuestados, un 15.2 % opina que la leche en polvo tiene ventajas, y un 71.7 % cree que el valor proteico de la leche en polvo es diferente al de la leche entera. Esto se comprobó experimentalmente ya que las proteínas del suero de leche entera representan un 0.9 %, y en la práctica se llegó a la conclusión de que en el lactosuero de leche en polvo representan un 0.16 %.

Las proteínas que precipitaron al llevar a la solución al 35 % de sulfato de amonio representan el 1.4261 % de la leche en polvo. Las que precipitaron al 50 % representan el 0.0542 % y las que quedaron en el sobrenadante representan el 0.2961 %.

En la **fracción precipitada a 35 %** de sulfato de amonio es muy probable que haya beta lactoglobulina (de masa molar 18.4 kDa aproximadamente), y osteopontina. Las masas molares entre los 22 y los 44 kDa también pueden pertenecer a las cadenas que forman a la inmunoglobulina.

En la **fracción precipitada a 50 %** de sulfato de amonio hay una banda de proteínas de aproximadamente 78 kDa que probablemente pertenezca a la lactoferrina, transferrina o peroxidasa. La banda de 15 kDa puede ser α -lactalbúmina o lactoglobulina, aunque lo más probable es que sea la segunda. También puede haber presencia de osteopontina.

En la **fracción sobrenadante a 50 %** de sulfato de amonio hay una banda de proteínas de aproximadamente 78.8 kDa que probablemente pertenezcan a la lactoferrina, transferrina o lactoperoxidasa. La banda que corresponde a 68 kDa es muy probable que sea albúmina.

La banda de 16 kDa probablemente pertenezca a la α -lactoalbúmina o la β -lactoglobulina.

Conclusiones

La fracción que precipita al 35 % de sulfato de amonio puede contener β -Lactoglobulina, osteopontina y cadenas polipeptídicas que forman la inmunoglobulina. Esta representa el 1.4261 % del polvo.

La fracción que precipita al 50 % de sulfato de amonio representa un 0.0542 % del polvo y puede contener α -lactoalbúmina, transferrina, osteopontina, lactoperoxidasa y lactoferrina.

La fracción que no precipitó representa el 0.2961 % del polvo y puede contener α -lactoalbúmina, lactoglobulina, transferrina, albúmina, lactoferrina y lactoperoxidasa.

La concentración total de proteínas en el suero de leche es de 1.5072×10^{-3} mol/L.

Perspectivas

Realizar la electroforesis de muestras de una parte inicial del proceso de fraccionamiento ya que se observaron bandas de proteínas de baja masa molecular que podrían corresponder a proteínas que están compuestas por más de una cadena de residuos de aminoácidos. Y a lo largo del proceso de fraccionamiento estas cadenas se hayan separado.

Lavar los precipitados luego de centrifugar y realizar la electroforesis con esas muestras.

Puede que la albúmina haya sido arrastrada al precipitar la caseína con ácido acético.

Bibliografía

Proteínas. Recuperado en Septiembre de 2019 de

<https://www.docsity.com/es/investigacion-sobre-proteinas/830297/>

Calvo, M. (s.f.) *Bioquímica de los alimentos*. Recuperado de

<http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/proteins/lactosuero.html>

McKee T. y McKee J. R. (2014). *Bioquímica, las Bases Moleculares de la Vida*. (5ta edición). México McGraw Hill.

Instituto Nacional de la Salud (2003). *Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN*. LASER S.R.LTDA. Lima, Perú

Diaz, N. A. (s.f.) *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Recuperado en octubre de 2019 de https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf

Ing. Agr. Del Puerto, M (2013). *Determinacion de Proteinas*

Hernández-Rojas, M. y Vélez-Ruiz, J. F. (2014) *Suero de leche y su aplicación en la elaboración de alimentos funcionales*. Universidad de las Américas Puebla, México.

Badui, S. (2006). *Química de los Alimentos*. (Cuarta Edición) México, Pearson Education

Ringgenberg, E. (2011). *The Physico-Chemical Characterization of Soymilk Particles and Gelation Properties of Acid-Induced Soymilk Gels, as a Function of Soymilk Protein Concentration*. Recuperado en septiembre de 2019 de <https://pdfs.semanticscholar.org/f53e/8b8e23a16efe5468bbe07fbc040c03d5eadf.pdf>

Khan Academy (s.f.). *Electroforesis en Gel*. Recuperado de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/el-electrophoresis>

Rubino D. M. (1991). *Curso en Purificación de Antígenos de Hemoparásitos y su Aplicación en Técnicas Avanzadas de Diagnóstico*. Montevideo Uruguay.

López, D. A.; Sandoval A. S. (2013). *Biología Molecular* (primera edición). McGraw Hill

Johnson, M. (2012). *Cuantificación de Proteinas*. Recuperado en octubre de 2019 de <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>

PB-L Productos Bio-Logicos (s.f.). *qPROTEIN (BCA)*. Recuperado de <http://www.pb-l.com.ar>

Universidad San Francisco de Quito (s.f.). *Salting Out*. Recuperado en octubre de 2019 de <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BOblog/Salting-in-Salting-out-precipitacion-solventes.pdf>

Ministerio de la Salud Pública (2016) *Guía: Para una Alimentación Saludable, compartida y placentera*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/guia-para-una-alimentacion-saludable-compartida-y-placentera>

Imagen de la β -lactoglobulina extraída de <http://www.rcsb.org/structure/2AKO>

Medidas de seguridad del ácido acético extraídas de http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-101830?Origin=PDP

Medidas de seguridad del dodecilsulfato de sodio extraídas de: http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-817034?Origin=PDP

Medidas de seguridad del sulfato de amonio extraídas de http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-101217?Origin=PDP

Medidas de seguridad del fosfato de sodio extraídas de http://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/msds/MDA_CHEM-106586?Origin=PDP

Anexos

Anexo 1: Observaciones

- (1) No se lavaron los pellets obtenidos de la precipitación con sulfato de amonio, por lo que puede que parte de las proteínas que quedaban en el sobrenadante estén contaminando los pellets.
- (2) Se descartaron algunos valores de patrón (de albúmina bovina en la espectrometría con BCA) porque estaban fuera del rango que el lector de placas es confiable, ya que se usó un patrón con una concentración en etiqueta que no era la real. Se determinó la concentración del patrón con espectrofotometría a 280 nm y a partir de esta concentración se realizaron los cálculos.
- (3) Algunos cálculos se hicieron con valores que quedaron fuera de la curva de calibración.

Anexo 2: PBS para diálisis

en 1 L de agua destilada

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	0.61 g

Anexo 3: Concentraciones para Salting Out

Ammonium Sulfate Saturation Tables

Starting concentration	Final concentration													
	10%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%
0%	56	114	144	176	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10%	—	57	86	118	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494
20%	—	—	29	59	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424
25%	—	—	—	30	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390
30%	—	—	—	—	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356
35%	—	—	—	—	—	31	63	94	129	164	200	238	278	319
40%	—	—	—	—	—	—	31	63	97	132	168	205	245	285
45%	—	—	—	—	—	—	—	32	65	99	134	171	210	250
50%	—	—	—	—	—	—	—	—	33	66	101	137	176	214
55%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	33	67	103	141	179
60%	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	34	69	105	143

Values given are the number of grams to be added to 1 liter of solution to change the ammonium sulfate concentration from the starting concentration to final concentration. All values are adjusted for changes in volume at room temperature. The saturation of ammonium sulfate does not vary significantly between 4°C and 25°C, so the values given here can normally be used at both temperatures. Saturated ammonium sulfate is 4.1 M at 25°C (add 761 grams to 1 liter of distilled H₂O).

(Rubino, 1991)

Anexo 4: Buffer para muestras de electroforesis

Reactivos	Cantidad de Reactivo	Concentración Final
Tris 0,5 mol/L, pH 6,8	2.5 mL	0.125 mol/L
SDS al 10%	2.5 mL	2.5 %
2-Mercaptoetanol	2.5 mL	25 %
Glicerol	2.5 mL	25 %

Azul de Bromofenol	1 mg	0.1 mg/mL
--------------------	------	-----------

(Tabla extraída del *Manual de Procedimientos de Electroforesis para Proteínas y ADN*, pág. 43)

Anexo 5: Medidas de Seguridad

- *Ácido Acético*



Palabra de advertencia Peligro

Indicaciones de peligro

H226 Líquidos y vapores inflamables.

H314 Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves.

Consejos de prudencia

Prevención

P210 Mantener alejado de fuentes de calor.

P280 Llevar guantes/ prendas/ gafas/ máscara de protección.

Intervención

P301 + P330 + P331 EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagar la boca. NO provocar el vómito.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P308 + P310 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

- *Dodecilsulfato de Sodio*



Palabra de advertencia Peligro

Indicaciones de peligro

H228 Sólido inflamable.

H302 Nocivo en caso de ingestión.

H315 Provoca irritación cutánea

H318 Provoca lesiones oculares graves.

H335 Puede irritar las vías respiratorias.

H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Consejos de prudencia

Prevención

P210 Mantener alejado de fuentes de calor.

P273 Evitar su liberación al medio ambiente.

P280 Llevar gafas de protección.

Intervención

P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P313 Consultar a un médico.

- *Sulfato de Amonio*

No presenta riesgos

- *Acrilamida*



Indicaciones de peligro

H340 Puede provocar defectos genéticos.

H350 Puede provocar cáncer.

H301 Tóxico en caso de ingestión.

H312 + H332 Nocivo en contacto con la piel o si se inhala.

H315 Provoca irritación cutánea.

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H361f Se sospecha que puede perjudicar la fertilidad.

H372 Perjudica a determinados órganos (Sistema nervioso periférico) por exposición prolongada o repetida.

Consejos de prudencia

Prevención P201 Solicitar instrucciones especiales antes del uso.

P280 Llevar guantes de protección.

Intervención P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Enjuagar con agua cuidadosamente durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto cuando estén presentes y pueda hacerse con facilidad. Proseguir con el lavado.

P308 + P310 EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

- *Bisacrilamida*



Palabra de advertencia

Peligro

Indicaciones de peligro

H340 Puede provocar defectos genéticos.

H350 Puede provocar cáncer.

H302 Nocivo en caso de ingestión.

H315 Provoca irritación cutánea.

H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

H319 Provoca irritación ocular grave.

H361f Se sospecha que perjudica a la fertilidad.

H372 Perjudica a determinados órganos (Testículos, Sistema nervioso periférico) por exposición prolongada o repetida.

Consejos de prudencia

Prevención

P201 Pedir instrucciones especiales antes del uso.

P280 Llevar guantes de protección.

Intervención

P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.

P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

P314 Consultar a un médico en caso de malestar.

- Fosfato de sodio

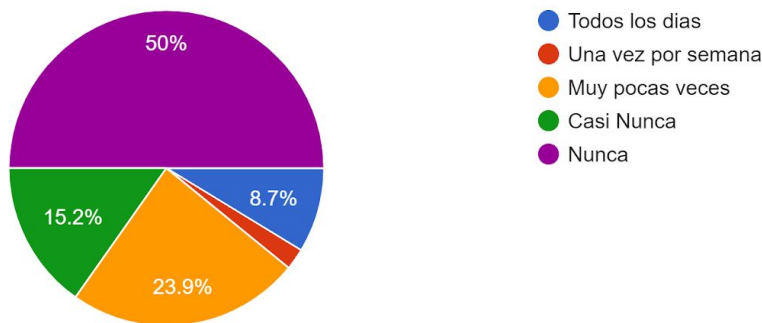
No Aplica

Anexo 6: Encuestas

Encuesta realizada a 46 personas

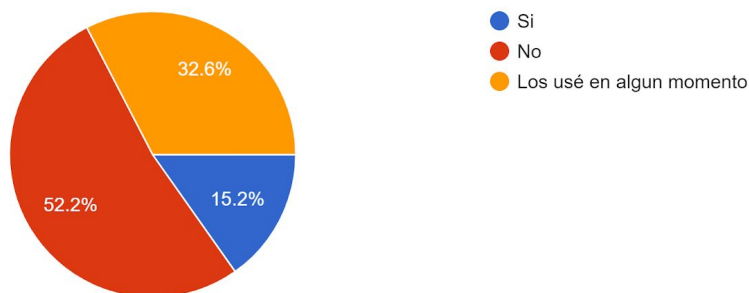
Con qué frecuencia consume leche en polvo?

46 respuestas



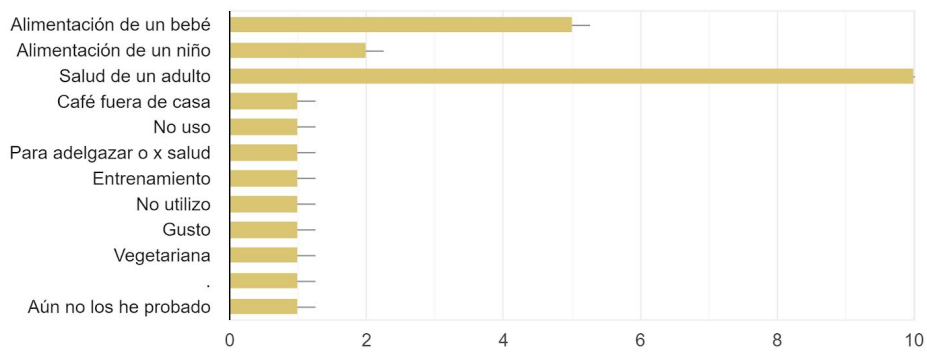
Utiliza complementos alimenticios?

46 respuestas



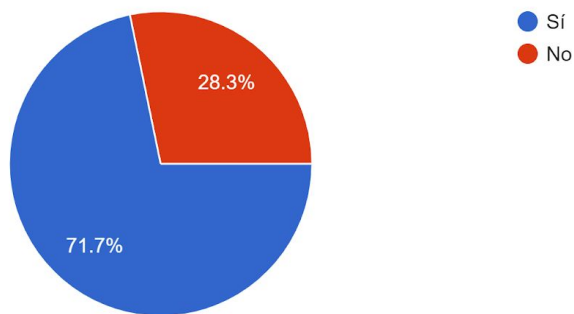
Por que motivo?

26 respuestas



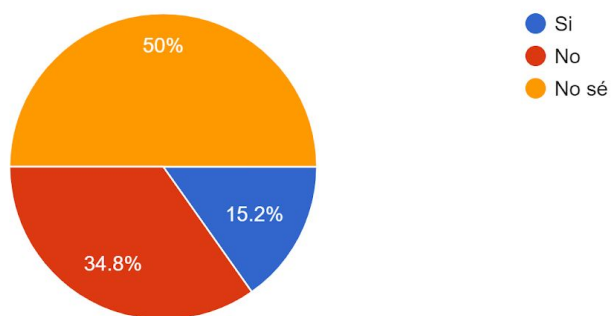
Cree que el valor proteico varía entre la leche en polvo y la entera?

46 respuestas



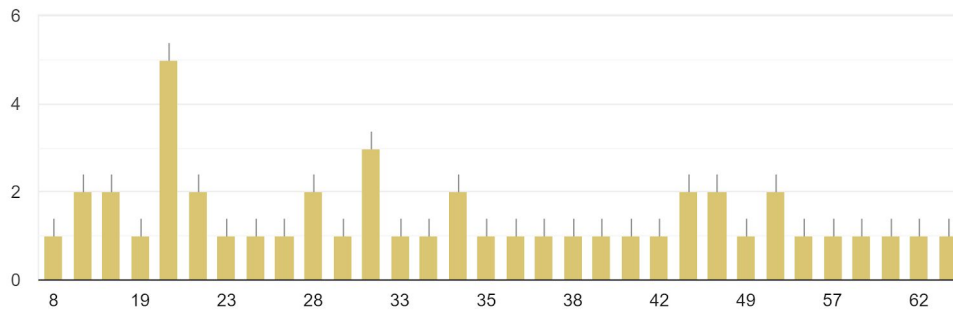
Cree que la leche en polvo tiene ventajas sobre la leche entera?

46 respuestas



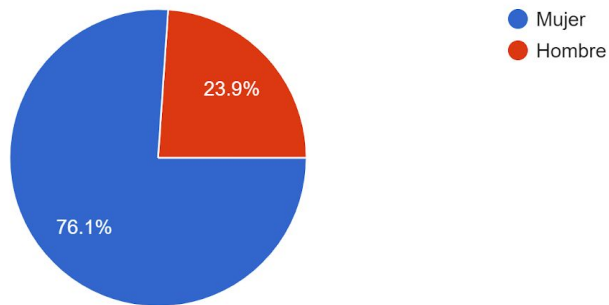
Edad

46 respuestas



Sexo

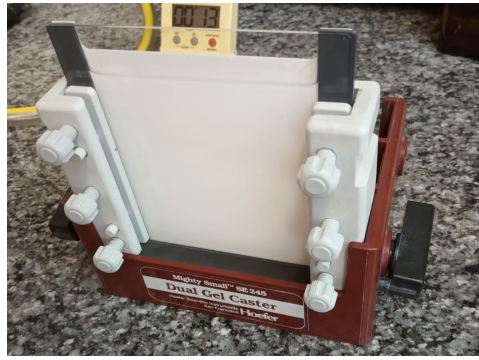
46 respuestas



Anexo 7: Imágenes



Muestra



Molde para gel de poliacrilamida



Centrífuga