

Tutoriales prácticos de aplicación en Alimentación, Nutrición y Trazabilidad en Acuicultura

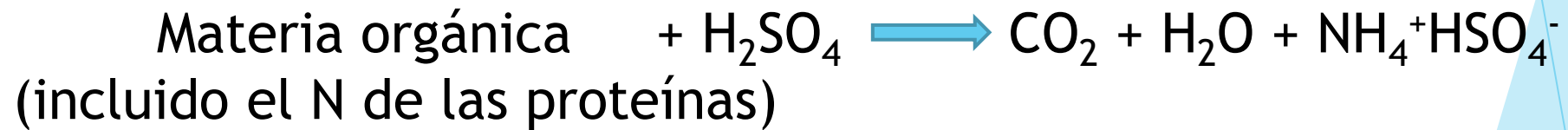
Práctica 4.1. Protocolo de determinación de proteína por el método Kjeldahl

Determinación de proteína por el método Kjeldahl

Objetivo: determinar la cantidad de proteína que contiene una muestra a partir de su contenido en N, según el método ideado en 1883 por el químico danés Johan Kjeldahl.

Principio:

A. Mineralización o digestión con H_2SO_4 . El H_2SO_4 oxida la muestra hasta formar CO_2 y H_2O , y oxida el N reducido de las proteínas formando $NH_4^+HSO_4^-$.



Para ello se hace hervir la muestra en H_2SO_4 concentrado. Se añade K_2SO_4 para aumentar el punto de ebullición de la mezcla y conseguir temperaturas más altas que aceleran la reacción, entre 370-400°C. Además se añade Cu en forma de $CuSO_4$ como catalizador de la reacción.

Al final obtenemos sales de $NH_4^+HSO_4^-$ disueltas en H_2SO_4 . Se le añade H_2O para disolverlas mejor.

Determinación de proteína por el método Kjeldahl

B. Destilación del NH₃. Para ello se neutraliza la disolución de H₂SO₄ y NH₄⁺HSO₄⁻ con exceso de NaOH concentrado hasta que se libera NH₃



El NH₃ luego se condensa

C. Valoración del NH₃. Hay diferentes formas de realizar la valoración. En nuestro caso, el NH₃ se recoge en una solución de H₃BO₃ saturado. El ⁻³BO₃ formado se valora con una disolución de HCl conocida.



D. Cálculos. Se relaciona la cantidad de disolución valoradora y el porcentaje de proteína en la muestra

METODOLOGÍA

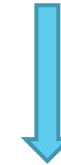
A. MINERALIZACIÓN O DIGESTIÓN

Nota: trabajaremos con las muestras y un blanco.

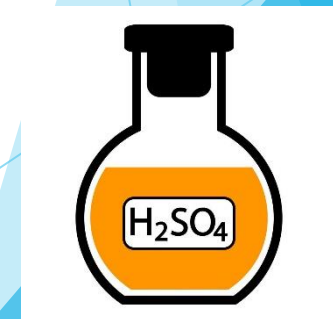
1. Pesar una cantidad de muestra en un papel carente de N_2 (papel de fumar) e introducirla en el tubo. En el blanco no introduciremos nada. Si la muestra se adhiere con facilidad, se pesa en un papel especial (carente de N).



2. Añadir 2g de K_2SO_4 y 1g de $CuSO_4$.



3. Añadir 7 mL de H_2SO_4 concentrado (95-98%).



4. Colocar los tubos en el bloque digestor



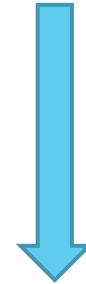
METODOLOGÍA

A. MINERALIZACIÓN O DIGESTIÓN

5. Encender el bloque digestor y la bomba purificadora ó Scrubber (extrae y neutraliza vapores tóxicos de la digestión).



6. Durante 30' se calienta en la posición 5 (300 ° C), adquiriendo un color negro. Después, pasar a la posición 8 (470 ° C) durante una hora, donde alcanza un color verde transparente.



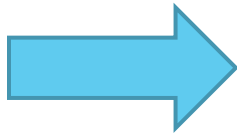
7. Apagar y dejar enfriar. Alrededor de 30'.



8. Añadir 40 mL de H₂O destilada para que se disuelvan las sales de amonio y dejar enfriar de nuevo.



40 mL

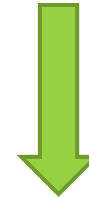


B. DESTILACIÓN DEL NH_3

1. En el destilador: precalentar, limpiar, calibrar que la cantidad de NaOH (al 40 %) sea de 50 mL y volver a limpiar.



2. Se pone el tubo con la muestra a destilar: Automáticamente se añaden los 50 ml de NaOH y se genera vapor de H_2O que arrastra al NH_3 liberado, el cual es condensado gracias al circuito de H_2O fría.



3. El condensado es recolectado en un matraz Erlenmeyer que ha sido previamente preparado para llevar a cabo una valoración.



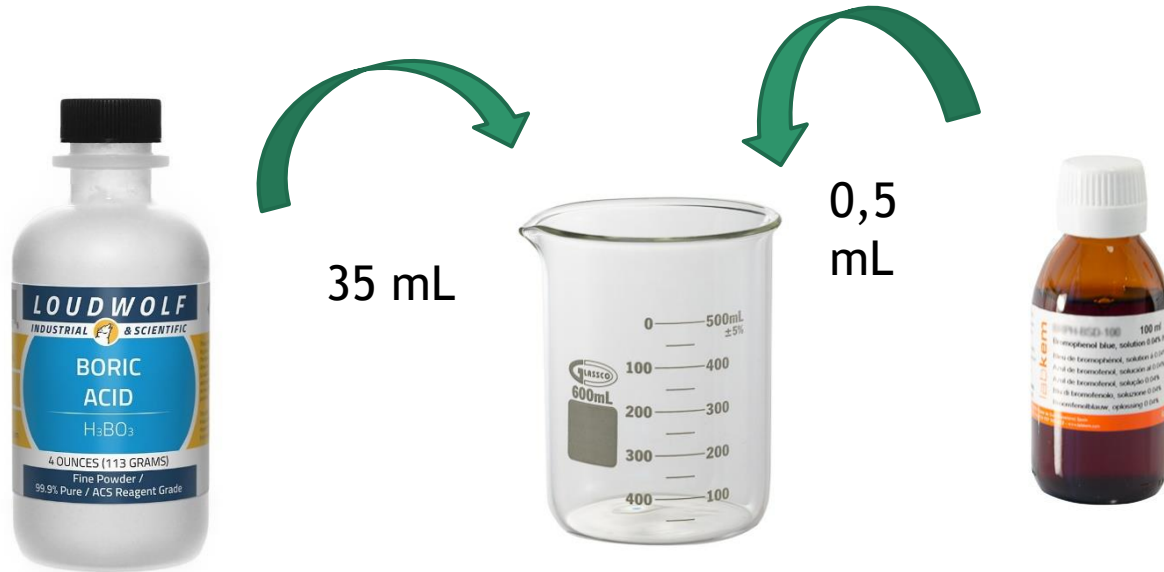
4. Se vuelve a limpiar el circuito.



METODOLOGÍA

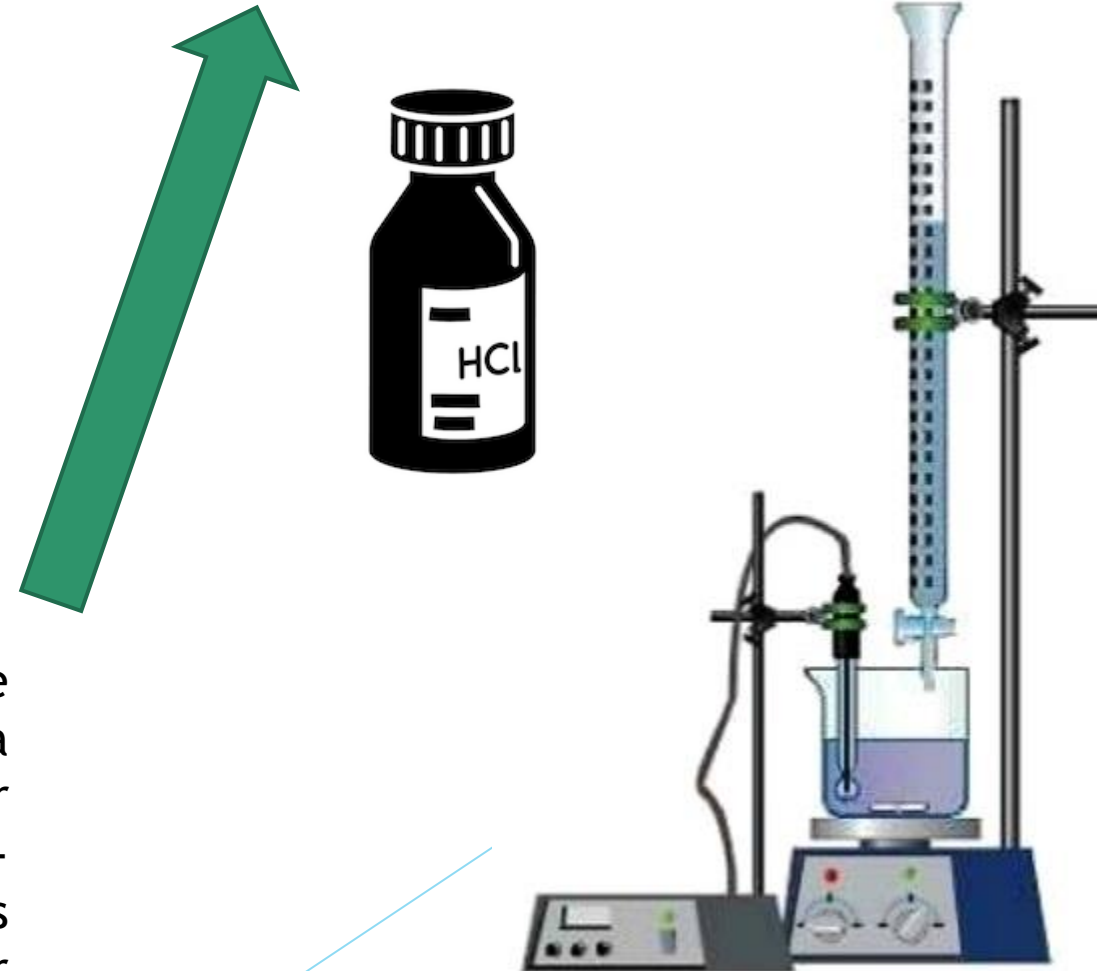
C. VALORACIÓN DEL NH_3

1. Introducir 35 mL de H_3BO_3 (4%) en el vaso de precipitado donde se recogerá el NH_3 destilado



2. Añadir 0,5 mL del Indicador Verde de Bromocresol. Este indicador es amarillo a $\text{pH} \leq 3,8$ y verde-azul a $\text{pH} > 3,8$. La disolución de H_3BO_3 está a $\text{pH} 3,8$ (color amarillo). Al añadir NH_3 (en el proceso de destilación) cambiará el color a verde-azul. Sabremos la cantidad exacta introduciendo cantidades conocidas de HCl hasta recuperar el pH y por tanto el color amarillo.

3. Valoramos en un pH-metro utilizando la bureta y HCl .



Determinación de proteína por el método Kjeldahl

D. Cálculos

Por último, se relaciona la cantidad de disolución valoradora y el porcentaje de proteína en la muestra

$$\% \text{ de proteína en la muestra} = \frac{N \text{ HCl} \times (V_m - V_b) \times 14 \times 6,25 \times 100}{1000 \times m} = \frac{N \text{ HCl} \times (V_m - V_b) \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

Donde:

- N HCl: Normalidad del HCl valorador (equivalentes/L)
- V_m (mL) = volumen de HCl valorado para la muestra
- V_b (mL) = volumen de HCl valorado para el blanco
- 14 = peso atómico del N
- 6,25 = factor que se utiliza para convertir la cantidad de N en cantidad de proteína, asumiendo que la proteína contiene un 16% de N_2
- m (g) = masa de la muestra



Universidad
de La Laguna



Tutorial realizado por:



Dra. Covadonga Rodríguez



Dra. Ana Galindo



Dr. Manuel Marrero



Dr. José A. Pérez



Dra. Deiene Rodríguez



Dra. Diana B. Reis



Jesús Villora



Nieves G. Acosta

