

Práctica 3

EXTRACCIÓN DE LA CASEINA Y DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELECTRICO

1.- OBJETIVO

El objetivo fundamental de esta practica es la determinación del punto isoeléctrico de la caseína una vez extraída esta mediante procedimiento químico de la leche entera líquida.

2.- FUNDAMENTO

a) CASEINA

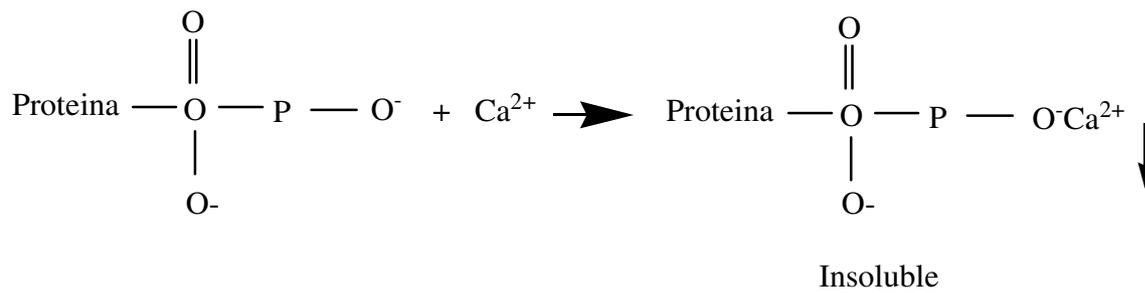
La leche contiene vitaminas (principalmente tiamina, riboflavina, ácido pantotéico y vitaminas A, D y K), minerales (calcio, potasio, sodio, fósforo y metales en pequeñas cantidades), proteínas (incluyendo todos los aminoácidos esenciales), carbohidratos (lactosa) y lípidos. Los únicos elementos importantes de los que carece la leche son el hierro y la vitamina C.

Las proteínas se pueden clasificar de manera general en proteínas globulares y fibrosas. Las proteínas globulares son aquellas que tienden a agregarse en formas esféricas y no establecen interacciones intermoleculares como son los puentes de hidrógeno (característicos de las proteínas fibrosas) siendo solubilizadas en suspensiones coloidales.

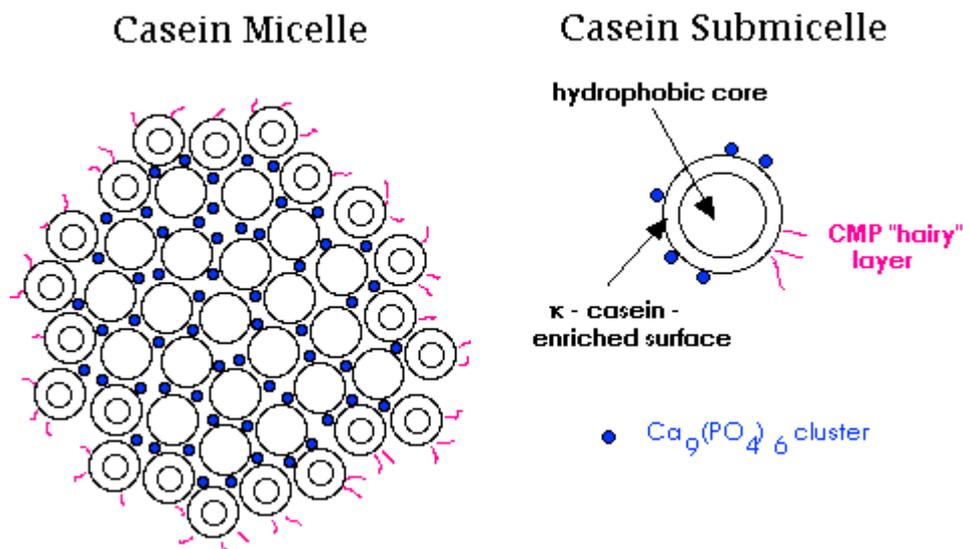
En la leche hay tres clases de proteínas: caseína, lacto albúminas y lacto globulinas (todas globulares).

La caseína es una proteína conjugada de la leche del tipo fosfoproteína que se separa de la leche por acidificación y forma una masa blanca. Las fosfoproteínas son un grupo de proteínas que están químicamente unidas a una sustancia que contiene ácido fosfórico. En la caseína la mayoría de los grupos fosfato están unidos por los grupos hidroxilo de los aminoácidos serina y treonina. La caseína en la leche se encuentra en forma de sal cálcica (caseinato cálcico). La caseína representa cerca del 77% al 82% de las proteínas presentes en la leche y el 2,7% en composición de la leche líquida.

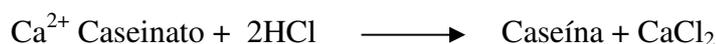
La caseína está formada por $\alpha(s1)$, $\alpha(s2)$ -caseína, β -caseína, y kappa-caseína formando una micela o unidad soluble. Ni la alfa ni la beta caseína son solubles en la leche, solas o combinadas. Si se añade la kappa caseína a las dos anteriores o a cada una de ellas por separado se forma un complejo de caseína que es solubilizado en forma de micela. Esta micela está estabilizada por la kappa caseína mientras que las alfa y beta son fosfoproteínas que precipitan en presencia de iones calcio.



La kappa caseína, sin embargo, tiene pocos grupos fosfato y un alto contenido de carbohidratos unidos a ella. También tiene todos sus residuos de serina y treonina con sus correspondientes grupos hidroxilo, así como los carbohidratos dispuestos en una sola cara de su superficie por lo que esta parte exterior es fácilmente soluble en agua gracias a los grupos polares que posee. La otra parte de su superficie se une fácilmente a las alfa y beta caseína insolubles, lo que da lugar a la formación de la micela.



La propiedad característica de la caseína es su baja solubilidad a pH 4,6. El pH de la leche es 6,6 aproximadamente, estando a ese pH la caseína cargada negativamente y solubilizada como sal cálcica. Si se añade ácido a la leche, la carga negativa de la superficie de la micela se neutraliza (los grupos fosfato se protonan) y la proteína neutra precipita



La conformación de la caseína es similar a las proteínas desnaturalizadas globulares. El alto número de residuos de prolina en la caseína causa un especial plegamiento en la cadena de proteína e inhibe la formación de una fuerte y ordenada estructura secundaria. La caseína no contiene puentes de sulfuro. De igual manera la falta de estructura secundaria es importante para la estabilidad de la caseína frente a la desnaturalización por calor. La carencia

de estructura terciaria facilita la situación al exterior de los residuos hidrofóbicos lo que facilita la unión entre unidades proteicas y la convierte en prácticamente insoluble en agua. En cambio es fácilmente dispersable en álcalis diluidas y en soluciones salinas tales como oxalato sódico y acetato sódico.

La función biológica de las micelas de caseína es transportar grandes cantidades de Ca y P altamente insoluble en forma líquida a los lactantes y formar un coágulo en el estómago para favorecer una nutrición eficiente. Además de caseína, Ca y P la micela formada también contiene citrato, iones, lipasa, enzimas plasmáticos y suero. Estas micelas ocupan del 6-12% del volumen total de la leche.

Las proteínas que aparecerán en el sobrenadante cuando precipitemos la caseína en medio ácido son proteínas globulares, hidrofílicas y fácilmente solubles en agua así como susceptibles de desnaturalización por calor. Las principales son β -lacto globulina, α -lactalbumina, bovine serum albumin (BSA), y inmunoglobulinas (Ig).

La caseína se emplea en la industria para la fabricación de pinturas especiales y en el apresto de tejidos, la clarificación de vinos, la elaboración de preparados farmacéuticos y la fabricación de plásticos. La pintura de caseína ha sido usada desde la antigüedad por los egipcios.

b) PUNTO ISOELECTRICO

Todas las macromoléculas de la naturaleza adquieren una carga cuando se dispersan en agua. Una característica de las proteínas y otros biopolímeros es que la carga total que adquieren depende del pH del medio.

Así, todas las proteínas tienen una carga neta dependiendo del pH del medio en el que se encuentren y de los aminoácidos que la componen, así como de las cargas de cualquier ligando que se encuentre unido a la proteína de forma covalente (irreversible).

Debido a la composición en aminoácidos de la proteína, los radicales libres pueden existir en tres formas dependiendo del pH del medio: catiónicos, neutros y aniónicos.

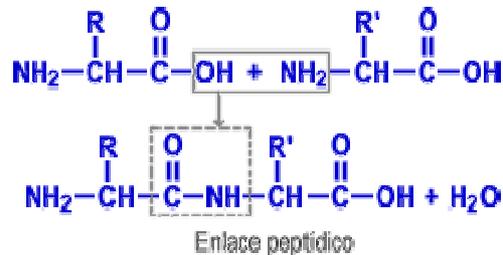
Cualquier proteína tendría una carga neta positiva si se encuentra en un medio lo suficientemente ácido debido a que los grupos COOH de los aminoácidos aspártico y glutámico estarían en su forma neutra pero los grupos amino de Arginina y lisina estarían protonados ($-\text{NH}_3^+$).

De igual forma si la proteína se encuentra en un medio con un pH muy alto estaría cargada negativamente ya que en este caso los grupos carboxilo estarían desprotonados (COO^-) y los grupos amino estarían en su forma neutra (NH_2).

De lo anterior se deduce que las proteínas tienen un pH característico al cual su carga neta es cero. A este pH se le denomina punto isoelectrico (pI).

En el punto isoelectrico (pI), se encuentran en el equilibrio las cargas positivas y negativas por lo que la proteína presenta su máxima posibilidad para ser precipitada al disminuir su solubilidad y facilitar su agregación.

Si suponemos una proteína formada únicamente por aminoácidos sin grupos laterales ionizables la carga neta de la proteína dependería exclusivamente de la protonación / desprotonación de los grupos amino y carboxilo terminal. En la realidad las proteínas están formadas por multitud de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y la carga va a depender de los grupos ionizables que poseen los aminoácidos que la componen (anexo I) y del pH del medio.



3.- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1.- MATERIALES Y REACTIVOS

- Diez vasos precipitado de 25 ml
- Dos vasos de precipitados de 50ml
- Un vaso de precipitado de 250ml
- Probeta de 50ml
- Matraz aforado de 50 ml
- pipeta graduada de 5,0 ml
- pipeta graduada de 1,0 ml
- pipeta graduada de 10,0 ml
- Embudo de vidrio mediano
- Papel de filtro
- Termómetro
- Reactivos por grupo:
 - Agua destilada
 - Acetato sódico 0,1 N
 - Ácido acético 0,01 N
 - Ácido acético 0,1 N
 - Ácido acético 1,0 N
 - NaOH 1N
 - Éter etílico
 - Etanol al 70%
- Materiales y reactivos de uso general:
 - Soluciones buffer pH 4,0 y 7,0 para calibrar el potenciómetro
 - Potenciómetro (pH-metro)
 - Leche entera corriente (1 litro)

3.2.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

A. Aislamiento de la caseína:

- Caliente en un vaso de precipitado 150ml de agua destilada a 38°C, añade 50ml de leche y luego gota a gota y con agitación, adicione ácido acético 1M hasta que observe que se forma un precipitado (la leche se corta).
- Deje sedimentar y filtre sobre papel de filtro usando un embudo de cristal.
- Lave el precipitado con 20ml de etanol en el mismo filtro.
- Seque el precipitado colocando varios pliegues de papel de filtro.
- Coloque el precipitado en un vaso de precipitado pequeño previamente pesado, vuelva a pesar el vaso con el precipitado y luego adicione 5ml/g de éter etílico.
- Filtre nuevamente.
- Deseche el líquido quedando un precipitado blanco de fácil manipulación que es la caseína.

B. Preparación de la solución de caseína:

- Coloque aproximadamente 250 mg de caseína en un vaso de 50ml.
- Agregue 20ml de agua destilada y 5 ml de NaOH 1N; agite hasta lograr una solución total de la caseína.
- Una vez disuelta la caseína, se vierte en un matraz aforado de 50 ml, adicione 5 ml de ácido acético 1N y diluya con agua destilada hasta 50ml y mezcle bien.
- La solución debe ser clara y limpia y si no es así, debe volver a filtrar.

C. Determinación del pI de la caseína:

En diez vasos de 25 ml limpios y secos adicione exactamente los volúmenes de los reactivos según la siguiente tabla:

TABLA DE DISOLUCIONES

TUBO	Acetato 0.1N	Acético 0.1N	Acético 0.01 N	pH resultante (aprox.)
1	0.5	9.5	-	3.2
2	1	9	-	3.6
3	1.5	8.5	-	3.8
4	2	8	-	4.0
5	3	7	-	4.2
6	4	6	-	4.5
7	6	4	-	4.7
8	8	2	-	5.1
9	6	-	4	5.5
10	8	-	2	6.1

- Medir experimentalmente el pH de todos los vasos, que debe cubrir un rango aproximado semejante al teórico (3 a 6,5). Anotar los valores reales en la Tabla, que deben ser semejantes a los expresados y en todo caso crecientes.
- Añadir 1 ml de disolución de caseína a cada tubo.
- Agitar suavemente cada uno y esperar aproximadamente 3 minutos.
- Medir la absorbancia de cada muestra a 640 nm con las cubetas de colorimetría de 1 cm de paso óptico, teniendo la precaución de agitar bien el contenido de cada tubo para obtener una solución / suspensión homogénea antes de verter una parte en la cubeta.
- Anotar resultados, representar la absorbancia frente al pH, y determinar el pI aproximado de la caseína.

4.- BIBLIOGRAFÍA:

- Miller D.D. 2001. Química de Alimentos, Manual de Laboratorio. Limusa Wiley, México

5.- CUESTIONES

- 1) Representar A_{640} frente al pH de cada tubo en el apartado 3. ¿Qué sucedería si se representa la transmitancia?
- 2) ¿Cuál es el punto isoeléctrico de la caseína?
- 3) Por qué las proteínas tienen solubilidad mínima en el pI?

ANEXO I

Preparar:

2 litros leche entera

2 litros acetato sódico 0,1 N (16 g acetato en 2 L agua destilada)

2 litros ácido acético 0,1 N (12 g acético glacial en 2 L agua destilada)

400 mL ácido acético 0,01 N (0,24 g acético glacial en 400 mL agua destilada)

500 mL ácido acético 1 N (30 g acético glacial en 500 mL agua destilada)

300 mL NaOH 1 N (12 g NaOH en 300 mL agua destilada)