

EXPERIMENTO 9

PURIFICACION PARCIAL DE LA CASEINA PRESENTE EN LA LECHE Y DETERMINACION DE SU PESO MOLECULAR Y DEL PRODUCTO DE LA HIDROLISIS POR LA ENZIMA BROMELINA DE LA PIÑA MEDIANTE ELECTROFORESIS

REQUISITOS

Repasar los principios del intercambio iónico, electroforesis, influencia del pH.

OBJETIVOS

Purificar parcialmente la caseína que es una de las proteínas de la leche, por diálisis, cromatografía e intercambio iónico, luego seguir los pasos de la purificación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Comprobar la hidrólisis de la caseína por la enzima bromelina

1. FUNDAMENTOS

Entre las proteínas de la leche se encuentra la caseína y es sustrato de la enzima proteolítica, bromelina, presente en la piña. Mediante la precipitación con sales de amonio y diálisis separaremos la caseína del resto de moléculas de la leche, luego pasaremos por intercambiadores aniónicos o catiónicos para recoger las fracciones y aplicar la electroforesis a las fracciones. Por otra parte añadiremos a cada fracción la bromelina y compararemos con la hidrólisis de la caseína comercial.

2. MATERIALES EQUIPOS Y REACTIVOS

2.1 Materiales

Leche.

Piña

Caseína comercial

2 g de CM-Celulosa

2 g de DEAE-Celulosa

Bolsas para diálisis

Sulfato de amonio

Centrifuga

Columna de (1 cm por 25 cm)

Buffer fosfato 0,1 M pH 6,5

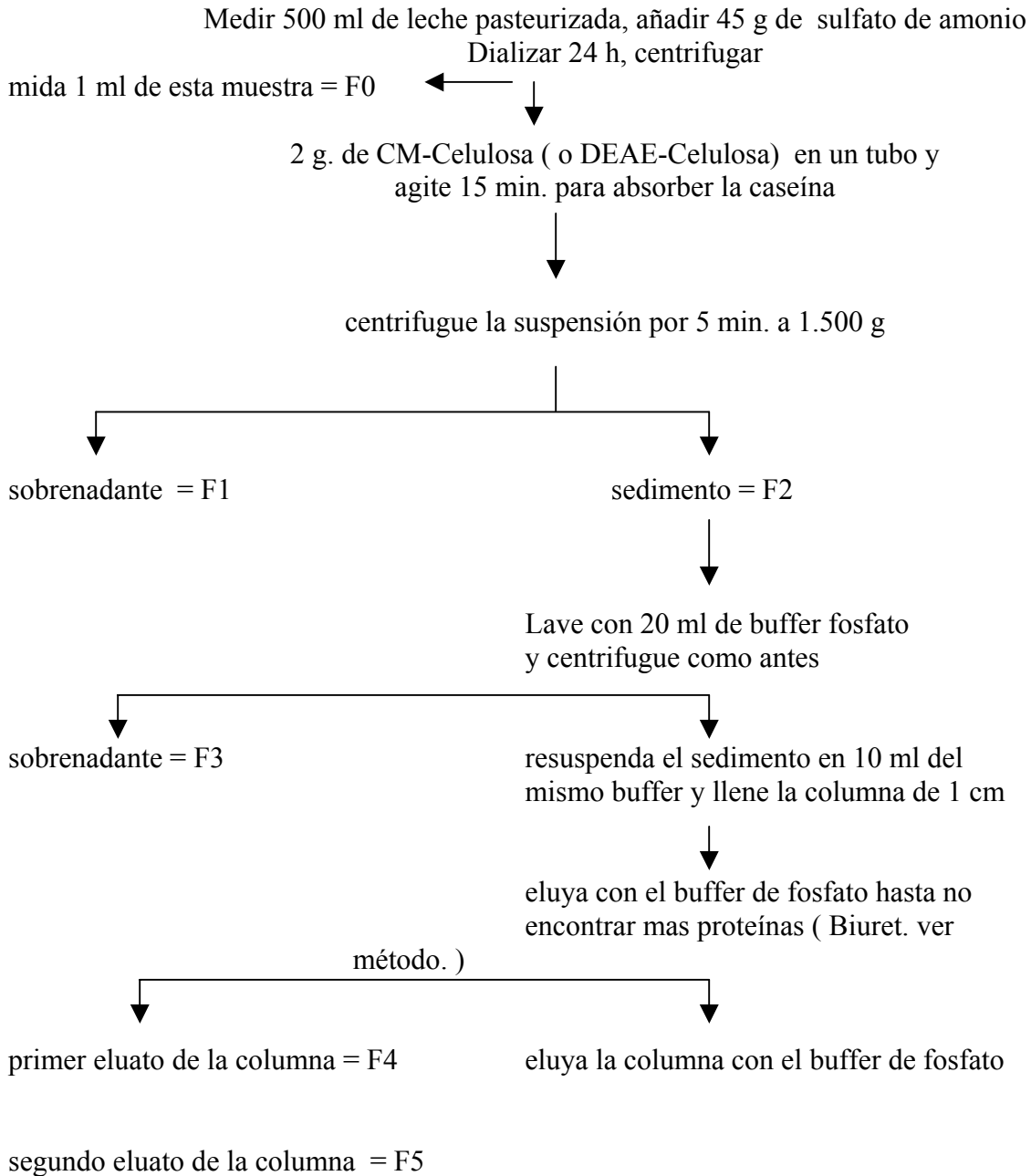
Equipo de electroforesis

Soluciones para electroforesis (ver método)

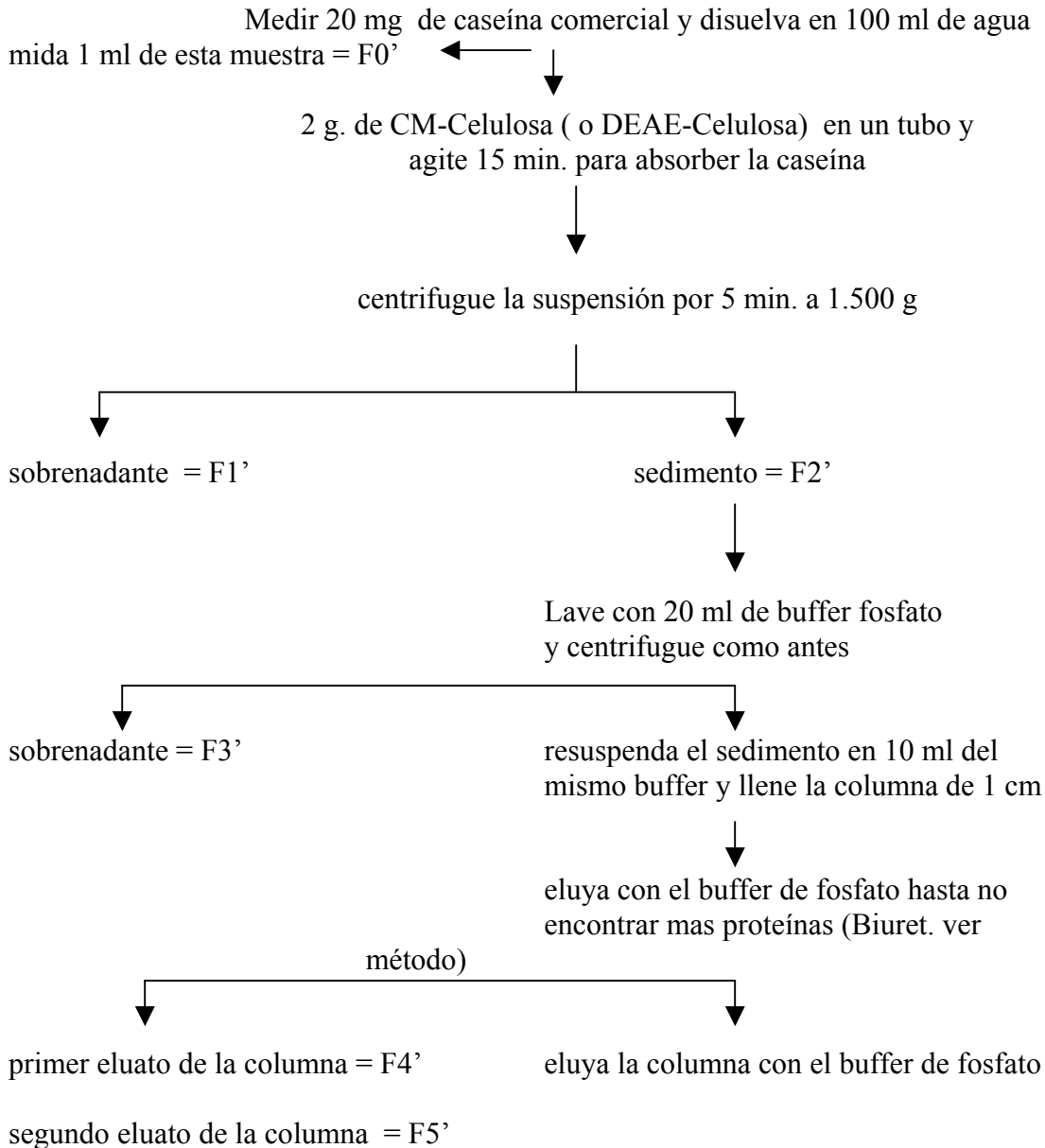
2.2 Métodos

2.2.1. Preparación de las fracciones

2.2.1.1 Purificación parcial de la Caseína. Seguiremos el siguiente protocolo:



2.2.1.2 Preparación de la caseína comercial.



2.2.1.3 Hidrólisis de la caseína por la bromelina.

a. Divida cada una de las fracciones obtenidas tanto las F como las F', guarde una mitad y la otra mitad le añadiremos 100 µl de la bromelina que obtendremos de la piña al licuar colar y ajustar el pH con amoniaco hasta pH 6-7. En este extracto bruto se encuentra la bromelina.

2.2 Corrida del electroforesis

- 2.2.1. Soluciones: Prepare todas las soluciones como se indica en el método.
- 2.2.2. Diluciones: Disuelva las fracciones en el buffer de la muestra en una proporción de 1:5
- 2.2.3. Marcadores: Prepare una mezcla de proteínas comerciales, (1 mg de proteínas en 5 ml del buffer de la muestra), utilice por lo menos 5 proteínas de peso moleculares variables.
- 2.2.4 Muestras: Con una jeringa Hamilton coloque las muestras en cada pozo, anote el orden de colocación.
- 2.2.5 Corrido: Corra el gel por 2 ½ h.
- 2.2.6. Teñido y desteñido: Tiña, destiña y deje secar por 24 h
- 2.2.7 Conclusiones: Compare las manchas y saque sus conclusiones.

3. AUTO-EVALUACION

1. Consulte sobre las propiedades liticas de la enzima, su sustrato, clasificación.
2. Diseñe un protocolo para determinar el punto isoelectrico de la caseína.
3. ¿Cómo cree Ud. que se verá el gel en las fracciones F5 y F5'?, explique sus razones.

4. INFORME 9 (CASEINA)

Apellidos

Grupo de prácticas

Fecha

Calificaciones

Nombres

N° del mesón

N° del estudiante

Entrada		Desarrollo		Informe		Definitiva	
---------	--	------------	--	---------	--	-------------------	--

1. Diseñe una tabla en esta hoja para presentar sus resultados

2. Coloque en este espacio una fotocopia o un dibujo de los geles de la electroforesis.

3. Discuta sus resultados.

Nota: El informe debe ser entregado al finalizar la práctica y sin anexar hojas.