

**INTERACCIONES DE LA LACTOSA CON PROTEINAS DE LA  
LECHE Y CALCULO DE PARAMETROS TERMODINAMICOS.  
II-  $\alpha_s$  CASEINA.**

*Por J. Zapico,  
D. Ordóñez y  
J. Burgos.*

El estudio de las interacciones entre los componentes de la leche, especialmente entre las proteínas y la lactosa, sin olvidar las posibles interacciones de las proteínas entre sí orientado hacia los cambios producidos en sus propiedades fisiológicas, sabor, empardeamiento, pérdida del valor nutritivo, etc., ha sido objeto de consideración en numerosos trabajos (1, 2, 3, 4, 5, 6). Llama la atención, por otra parte, la ausencia en la bibliografía de datos relativos a la interacción entre la lactosa y fracciones de la caseína total electroforéticamente puras.

El objeto del presente trabajo es el estudio de la interacción entre la  $\alpha_s$  caseína y la lactosa, a diferentes temperaturas, para establecer la magnitud de tal unión, la influencia del calor en la misma y los parámetros termodinámicos que gobiernan el proceso.

**MATERIALES**

La  $\alpha_s$  caseína empleada ha sido obtenida en nuestro laboratorio a partir de la caseína isoelectrica de Hammersten, mediante una derivación del método seguido por TRIPATHI y GEHRKE.<sup>7</sup> La pureza de la fracción obtenida se contrastó por electroforesis en gel de almidón-urea y se le asignó un peso molecular, una vez efectuadas las correcciones debidas al contenido en humedad de la proteína, de 16.500.

La lactosa y los fosfatos monosódico y disódico utilizados en la preparación de las disoluciones reguladoras, han sido de grado reactivo.

Tanto las muestras objeto de estudio como los correspondientes tampones y los reactivos utilizados para el análisis, se prepararon inmediatamente antes de su empleo.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las muestras que contienen una cantidad constante de  $\alpha_s$  caseína ( $3 \times 10^4$   $\mu$ gr/ml) y cantidades variables de lactosa (de  $10^4$  a  $10^5$   $\mu$ gr/ml) disueltas en tampón fosfato pH=6.9 y fuerza iónica=0.2, se calientan durante 20 minutos a temperaturas comprendidas entre los 80 y los 98° C. A continuación se someten a diálisis siguiendo la técnica descrita por PATEL<sup>8</sup>. A las membranas de diálisis se les libera de impurezas manteniéndolas en agua destilada a 90°C durante una hora y lavándolas, posteriormente, con agua destilada. En un estudio previo se pone de manifiesto la permeabilidad de las membranas a la lactosa y su impermeabilidad a la caseína.

La diálisis se efectúa en baño a temperatura constante con la agitación correspondiente. El equilibrio se estableció al cabo de 16 horas.

Una vez finalizada la diálisis, se toman muestras a ambos lados de la membrana para su posterior análisis colorimétrico mediante la reacción de antrona, específica de azúcares, que da un máximo de absorción a 620 nm. El contenido en azúcar de la proteína se calcula, por la misma reacción, en muestras de proteína calentadas a la misma temperatura, efectuándose las correspondientes correcciones.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados experimentales para tres temperaturas de trabajo se recogen en la Tabla I. Se comprueba que la magnitud de la interacción aumenta con el incremento de la temperatura; y, para una temperatura dada, con el incremento de azúcar en la muestra.

Tomando como base los estudios de SCATCHARD<sup>9</sup> y suponiendo que las constantes de asociación intrínseca son idénticas para todos los lugares posibles de la proteína, se obtiene el valor de estas constantes para cada temperatura de trabajo.

A partir de la ecuación reducida:

$r/c = nk - rk$  donde:

$r$ =moles de lactosa enlazada por mol de proteína

$k$ =constante de asociación intrínseca

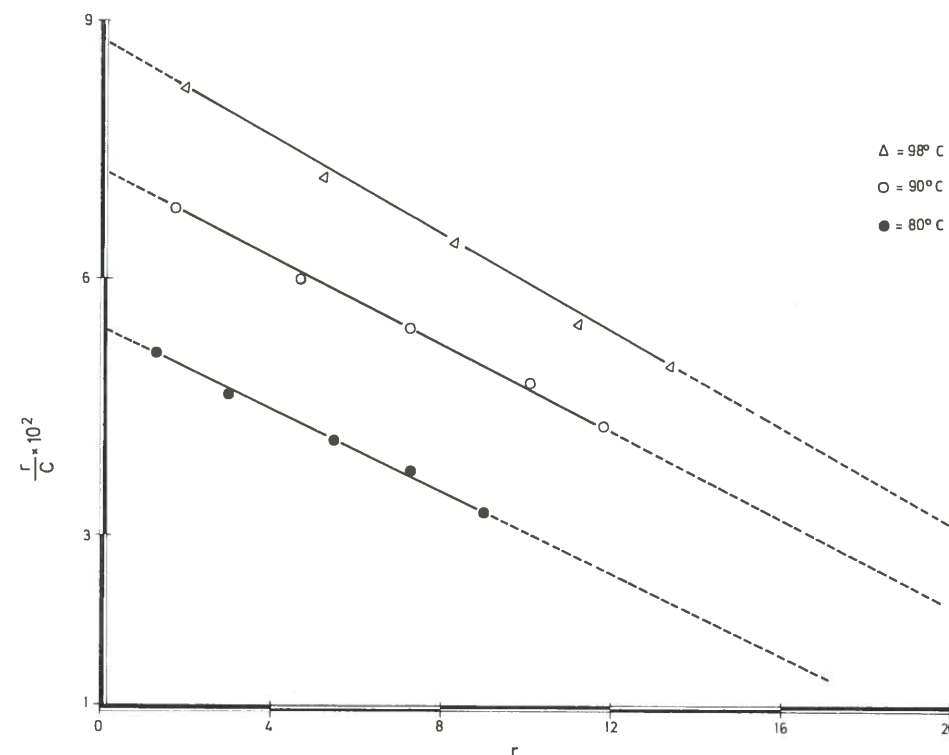
$c$ =concentración de lactosa libre y

$n$ =número de lugares de enlaces disponibles por molécula de proteína.

TABLA I  
Interacción de lactosa -  $\alpha_s$  caseína.

Temperatura °C	pH (a)	fuerza iónica	$n k \cdot 10^2$	$n$	Constante de asociación intrínseca $k$ l/mol
80	6.9	0.2	5.40	23.0	23.01
90			7.32	28.3	25.50
98			8.82	30.8	28.20

(a) buffer fosfato 0.01 M.



Enlace de Lactosa a la  $\alpha_s$  Caseína. pH=6.9,  $\mu=0.2$

Fig. 1

De la representación gráfica de  $r/c$  frente a  $r$  se obtiene una línea recta de pendiente negativa a partir de la cual pueden calcularse  $n$  y  $k$ .

Una vez conocido el valor de  $k$ , las funciones termodinámicas  $\Delta H^0$ ,  $\Delta F^0$  y  $\Delta S^0$  correspondientes al proceso, se calculan a partir de las fórmulas de relación con  $k$ .

De la ecuación de van t'Hoff

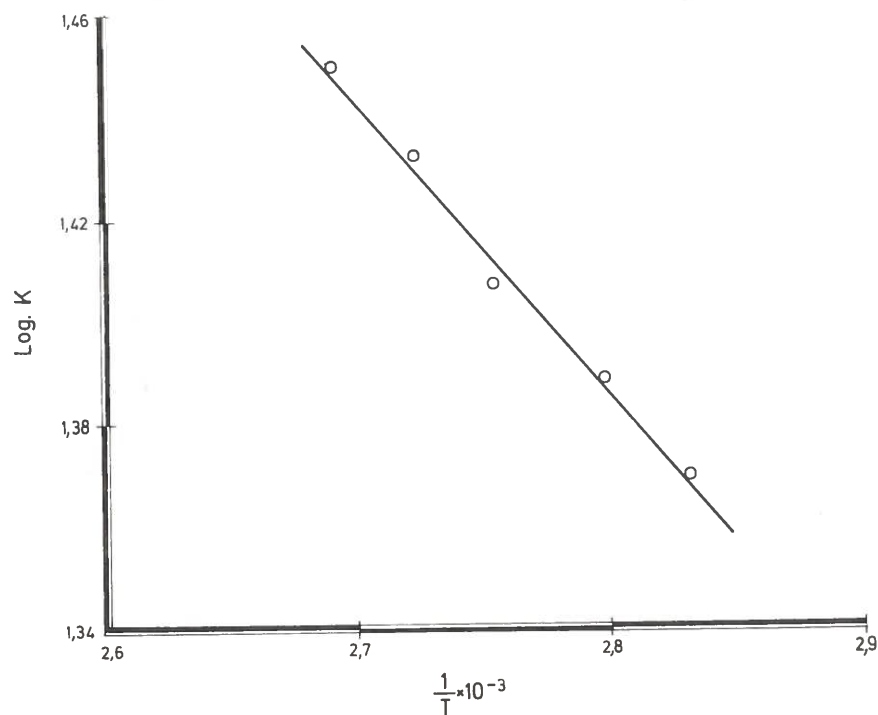
$$\frac{d \ln k}{dT} = -\frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

puede escribirse:

$$\log k = \frac{\Delta H^0}{2,303 R} \frac{1}{T}$$

donde  $\Delta H^0$  es el cambio de entalpía del sistema;  $T$ , la temperatura absoluta y  $R$ , la constante de los gases.

De la representación gráfica de  $\log k$  frente a  $1/T$  se obtiene el valor de  $\Delta H^0$  para el intervalo de temperatura considerado. Fig. 2.



Calculo de  $\Delta H^0$  para la interacción lactosa- $\alpha$ -Caseína.

Fig. 2

Por otra parte:

$$\Delta F^0 = -R T \ln k = -2,303 R T \log k.$$

donde  $\Delta F^0$  es el cambio de energía libre.

Una vez conocidos  $\Delta H^0$  y  $\Delta F^0$  el cambio de entropía del sistema  $\Delta S^0$  se calcula a partir de la relación:

$$\Delta F^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \text{ y } \Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta F^0}{T}$$

Los valores encontrados para estas magnitudes termodinámicas aparecen en la Tabla II.

TABLA II  
Parámetros termodinámicos de la interacción  
Lactosa- $\alpha$ s caseína

Temp. °C	Cambio de energía libre $\Delta F^0$ Kcal/mol	Cambio de entalpía $\Delta H^0$ Kcal/mol	Cambio de entropía $\Delta S^0$ u. e.	Índice osmótico
80	-2,20	2,51	13,3	0,3
90	-2,32		13,3	
98	-2,45		13,6	0,5

Se comprueba la existencia de interacción entre la lactosa y la  $\alpha$ -caseína, sin llegar a producir efectos de empareamiento debido a las condiciones de temperatura y tiempo de calentamiento utilizadas.

El valor creciente de la constante de asociación intrínseca con la temperatura y el valor positivo del cambio de entalpía indican que es un proceso endotérmico.

El valor positivo de la entropía y su ligero incremento con la temperatura es un comportamiento típico de enlace hidrofóbico, no considerable en este caso al no existir radicales de tal naturaleza.<sup>10</sup> Este valor, para el tipo de interacciones como la presente, ha sido descrito (11, 12 y 13) y se explica como la energía que acompaña a la rotura de la estructura «iceberg» de las moléculas de agua alrededor de los grupos hidrocarbonados en solución acuosa. Esto nos lleva a sugerir que la formación del complejo lactosa- $\alpha$ -caseína es debida a fuerzas de VAN DER WAALS, sin la aparición de enlaces de hidrógeno. El pequeño valor de  $\Delta H^0$  y  $-\Delta F^0$  avala esta opinión ya que indica que el sistema no está termodinámicamente estabilizado, lo que ocurriría si la fuerza del enlace estuviera incrementada con aportación de otros tipos.

## RESUMEN

Se ha estudiado la interacción entre la fracción electroforéticamente pura de la caseína, la  $\alpha$ -caseína, y la lactosa a diferentes temperaturas estableciéndose la magnitud de tal unión, la influencia del calor en la misma y se han calculado los parámetros termodinámicos del proceso.

Las muestras disueltas en tampon fosfato (pH=6,9 y  $\mu$ =0,2) se calentaron durante 20' y fueron dializadas calculándose posteriormente la cantidad de lactosa enlazada. Se comprueba que la interacción aumenta con el aumento de temperatura y, para una misma temperatura, con el incremento de azúcar en la muestra. El cálculo de los parámetros termodinámicos se realizó mediante la ecuación de Scatchard. El valor hallado para los mismos sugiere que la interacción es debida a fuerzss de VAN DER WAALS sin aparición de otros tipos de enlace.

## RÉSUMÉ

On a étudié l'interaction entre la fraction électrophorétiquement pure de la caséine, l'alpha caséine et la lactose, à de différentes températures, en établissant la magnitude de cette union, l'influence de la chaleur sur elle, et l'on a calculé les paramètres thermodynamiques du procédé.

Les échantillons dissous dans du tampon de phosphate (pH = 6,9 et  $\mu$  = 0,2) furent chauffés pendant 20 minutes et dialysés; après on a calculé la quantité de lactose unie. On a vérifié que l'interaction augmente à mesure que la température augmente, et pour une même température avec une augmentation de sucre dans l'échantillon. Nous avons calculé les paramètres thermodynamiques au moyem de l'équation de Scatchard. La valeur trouvée par ces paramètres suggère que l'interaction est due à des forces de VAN DER WAALS, sans qu'il y ait d'autres types de liaison.

## SUMMARY

A study has been carried out on the interaction between the electrophoretically pure fraction of casein, alphas casein and lactose at different temperatures and we have established the extension of such union and the influence of heat on it; we have calculated the thermodynamic parameters of the process.

The samples, dissolved in phosphate buffer (pH = 6,9 and  $\mu$  = 0,2) were heated for 20 min and dialyzed; and the amount of lactose linked was calculated afterwards. It has been shown that the interaction increases as temperature increases, and for a same temperature with an increase of sugar in the

sample. The thermodynamid parameters have been calculated by Scatchard equation. Their values suggest that the interaction is due to Van Der Waals strengths without any appearance of other types of linking.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) GRIMBLEBY F. H. (1954).—«Heat-Induced Acidity in milk. *J. Dairy Research*, 21 : 207.
- 2) HODGE J. E. and RIST C. E. (1953).—The Amadori Rearrangement under New Conditions and its Significance for Nonenzymatic Browning Reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 75 : 316.
- 3) KASS J. P. and PALMER L. S. (1940).—Browning of Autoclaved Milk. *Ind. Eng. Chem.* 32: 1.360.
- 4) NIELSEN E. K. y col. Determination of Heat-Induced Lactose Protein Combination in Milk with Lactose 1-C<sup>14</sup>. *J. Dairy Sci.* 46: 660. 1963.
- 5) PATTON S. (1958).—Review of Organic Chemical Effects of Meat on Milk. *J. Agr. Food Chem.* 6: 132.
- 6) PATTON S. and FLIPSE R. J. (1953).—Studies of Heated Milk. V. The reaction of Lactose with Milk Protein as Show by Lactose 1-C<sup>14</sup>. *J. Dairy Sci.* 36 : 766.
- 7) TRIPATHI K. K. and GEHRKE Ch. W. (1970).—Chemical and Chromatographic isolation of K-casein. *J. Chromatog.* 46: 280.
- 8) PATEL N. K. and KOSTEMBAUDER H. B. (1958).—Binding of Parahydroxybenzoic Acid Esters by Polyoxyethylene 20 Sorbitan Monooleate (Tween 80) *J. Am. Pharm. Assoc. Sci.* 47 : 289.
- 9) SCATCHARD G. (1946).—*Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51 : 660.
- 10) LEVITON A. and PALLANSCH M. J. (1960).—Binding of Riboflavin and Riboflavin Phosphate by thr Proteins of Milk. *J. Dairy Sci.* 18: 1713.
- 11) KARUSH F. (1950).—Heterogeneity of the Binding Sites Of Bovine Serum Albumin». *J. Am. Chem. Soc.* 72: 1.705.
- 12) MOLINEUX P. and FRANK H. P. (1961).—The Interaction de Polyvinyl-pyrrolidone with Aromatic Compunds in Aqueous Solution». *J. Am. Chem. Soc.* 83: 3.169.
- 13) WEDER H. J. and BICKEL, M. H. (1970).—Interations of Drugs with Proteins. *J. Pharm. Sci.* 59 : 1.563.