



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

Tesis que para obtener el grado de:

Doctor en Biotecnología

Presenta:

M.B. Judith Jiménez Guzmán

Directora:

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

México, D.F., a 3 de junio de 2003.

INDICE

Resumen	1
Abstract	4
1. Introducción	7
1.1 Antecedentes y Justificación	7
1.2 Hipótesis	11
1.3 Objetivo General	11
2. Generalidades y Antecedentes	13
2.1 Composición química de la leche	13
2.1.1 Lactosa	14
2.1.2 Proteínas de la leche	14
2.1.3 Minerales	19
2.1.4 Cambios producidos en la leche por el tratamiento térmico	20
2.2 Antecedentes bibliográficos	23
2.2.1 Características de las β -galactosidasas	23
2.2.2 Efecto del tratamiento térmico del medio (leche, suero o solución amortiguadora) sobre la actividad de lactasa ...	24
2.2.3 Efecto de las proteínas sobre la actividad de lactasa	28
2.2.4 Efecto de los iones sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa	29
3. Metodología	31
3.1 Medios de Reacción	31
3.1.1 Leche	31
3.1.2 Suero	31
3.1.3 Permeado de suero	31
3.1.4 Soluciones de proteínas del suero	31
3.2 Tratamientos	32

3.2.1 Calentamiento	32
3.2.2 Oxidación de los grupos SH	32
3.3 Determinación de la actividad enzimática	33
3.3.1 Definición de Unidades Enzimáticas	33
3.3.2 Preparación enzimática	33
3.3.3 Reacción de hidrólisis usando lactosa como sustrato	33
3.3.4 Reacción de hidrólisis usando ONPG como sustrato	34
3.3.5 Actividad in situ en gel de electroforesis usando 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido como sustrato.....	35
3.4 Análisis	35
3.4.1 Determinación de lactosa en leche y suero	35
3.4.2 Determinación de proteína en las muestras	36
3.4.3 Determinación de grupos sulfhidrilo	36
3.4.4 Evaluación del grado de desnaturalización de las proteínas del suero por efecto del tratamiento térmico	36
3.4.5 Estudio de las interacciones entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa	38
3.4.6 Equipos utilizados	40
4. Resultados	41
4.1 Efecto del tratamiento térmico de leche y suero	41
4.1.1 Efecto del calentamiento en la desnaturalización de las proteínas del suero y su relación con la actividad de la lactasa	42
4.1.2 Efecto de los grupos sulfhidrilo (SH) reactivos en la actividad de lactasa	47
4.2 Efecto de las proteínas del suero	54
4.2.1 Efecto del tratamiento térmico de la β -lactoglobulina en presencia de lactosa	56
4.2.4 Efecto de la lactosilación de la β -lg sobre la actividad de la lactasa	58
4.2.3 Estudio de la afinidad de la β -lactoglobulina nativa por la β -galactosidasa	60
5. Conclusiones	70
6. Perspectivas	71
7. Bibliografía consultada	72
8. Apéndices	82

8.1 Artículo “Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment” J. Dairy Sci., 85 (10), 2497-2502	83
8.2 Glosario de abreviaturas	90
8.3 Curvas Patrón	91

Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

RESUMEN

Desde 1958 ha existido cierta controversia respecto a si el tratamiento térmico de la leche previo a la hidrólisis de la lactosa puede o no aumentar la actividad de la lactasa (Fox, 1998; Greenberg y Mahoney, 1983; 1984; Kosikowski y Wiezbicki, 1973; Mahoney y Adamchuck, 1980; Wendorf y col., 1970; 1971). Aunque se han planteado varias posibles explicaciones, como aquella en la que el efecto se debe a la destrucción de un inhibidor termolábil, o a un cambio en el equilibrio salino de la leche, o bien a la desnaturalización térmica de las proteínas, a la fecha, la polémica sobre esta situación no ha sido resuelta. Este trabajo estuvo encaminado a determinar cuáles de los cambios que se producen por el tratamiento térmico de la leche, tienen algún efecto sobre la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

En una primera etapa del proyecto se llevaron a cabo estudios calentando leche, suero de leche, permeado de suero y soluciones puras de las 3 principales proteínas del suero, con y sin lactosa, en un rango de temperaturas entre 55 y 85°C, para después determinar la actividad de la lactasa en estos medios a 37°C. Se comprobó que el calentamiento de la leche sí produce un aumento en la actividad de la lactasa, principalmente entre 55 y 65°C. El calentamiento del suero, por otro lado, causó una disminución de la actividad entre 55 y 75°C, así como un aumento de la misma al calentarlo a 85°C

Con la obtención de los patrones electroforéticos, espectros de absorción y concentración de SH, se determinaron los cambios provocados por el calentamiento en la conformación de las principales proteínas del suero, y se correlacionaron con el

cambio en la actividad de la enzima. Se observó que la β -lactoglobulina (β -lg) sufre cambios conformacionales fuertes a las temperaturas probadas y expone y/o libera grupos SH al medio, los cuales son capaces de aumentar la actividad de la enzima.

Se determinó además que la sola presencia de β -lg (sin calentamiento) en el medio de reacción es capaz de aumentar la tasa de hidrólisis de lactosa y que durante el calentamiento (independientemente de la temperatura) en presencia de lactosa, la β -lg se “lactosila”, perdiendo con ello su capacidad activadora.

Utilizando β -lg o β -lactoglobulina lactosilada como ligando en cromatografía de afinidad se determinó que la β -galactosidasa se une fuertemente a la β -lg. Este podría ser el mecanismo por el cual se da la activación de la enzima. Se determinó también que cuando la β -lg se lactosila disminuye su capacidad de unirse a la enzima, que probablemente se traduce en la disminución de su capacidad activadora.

A partir de los resultados anteriores se demostró que el efecto del calentamiento de la leche sobre la actividad de la β -galactosidasa es un fenómeno multifactorial y complejo. Al respecto, en este trabajo se demostró que la activación de la enzima no ocurre por la destrucción de algún inhibidor termolábil de naturaleza no protéica, sino que el efecto está relacionado principalmente con los cambios que se dan en el sistema proteico de la leche como consecuencia del calentamiento.

Se comprobó que el sistema protéico de la leche puede afectar a la actividad de la enzima en al menos dos formas: a través de la exposición de grupos reactivos que puedan activar a la enzima, o bien a través de interacciones entre las proteínas y la enzima. La primera involucra cambios de algunas proteínas del suero, principalmente la β -lactoglobulina; la cual, a través de la exposición y/o liberación de grupos SH reactivos debido a los reacomodos de su estructura provoca un aumento en la tasa de reacción de la enzima. Y la segunda, que implica el efecto de la seroalbúmina y la β -lactoglobulina *per se*. Se demostró además que el efecto activador de la β -lactoglobulina se debe a que ésta se une fuertemente a la enzima y que tal efecto se pierde al glicosilar a la β -lg calentándola en presencia de lactosa, probablemente

debido a que la región de la molécula involucrada en la lactosilación (en la cercanía de la lys₄₇) es la misma involucrada en la unión entre la β -lg y la enzima.

Influence of Milk Proteins and their Heat Treatment on the Activity of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase

ABSTRACT

Since 1958, there has been a controversy with respect to whether or not the heat treatment of milk previous to lactose hydrolysis with β -galactosidase could increase the rate of reaction. Even though several possible explanations have been established such as the effect being due to the destruction of a thermo labile non-protein inhibitor, to a shift in the saline equilibrium of milk, or rather to the thermal denaturation of milk proteins, today no explanation has been demonstrated, and the polemic to this matter remains unresolved. The aim of this work was to determine which or the changes induced in milk as a consequence of heat treatment have an effect on the activity of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase.

In a first stage of the project studies were carried out heating milk, milk whey, whey permeate and pure solutions of the 3 most abundant proteins in whey, heated with or without lactose, in a temperature range from 55 to 85°C. Lactase activity was determined after lowering the heat-treated media temperature to 37°C. It was demonstrated that heat treatment of milk causes an increase in lactase activity, mainly when milk is treated between 55-65°C; treating whey at 85°C resulted in a significant increase in the activity.

The extent of the conformational changes that whey proteins had undergone due to the heat treatment was determined through the analysis of electrophoretic patterns, absorption spectra and SH concentration of wheys treated at the temperatures stated above. Correlation tests between structural changes and enzyme activity established that the enzyme rate of reaction is strongly affected by the changes on the protein system of milk. Furthermore, it was observed that β -lactoglobulin (β -lg) undergoes

strong conformational changes when heated at the temperatures studied, and these structural changes cause the exposure and/or release of reactive SH groups to the media, which may increase the activity of the enzyme.

In this work, it was also determined that the sole presence of unheated β -lg or serum albumin (SA) in the reaction media increases the rate of lactose hydrolysis. More over, heating β -lg in buffer solutions increased activity even more; but when β -lg was heated in the presence of 5% lactose, it lost its ability to activate the enzyme, probably due to the glycosilation of β -lg with lactose: “lactolation” forming lactolated β -lg (β -lg_{lac}) which is unable to activate the enzyme.

Using native β -lg or β -lg_{lac} as ligands in affinity chromatography tests, it was determined that β -galactosidase binds strongly to β -lg, which could be the mechanism through which β -lg activates the enzyme. It was also determined that when β -lg is lactolated its capacity to bind to the enzyme decreases, which is probably reflected in the diminution of its capacity to activate the enzyme.

From the results obtained it was demonstrated that the effect of heat treatment of milk on lactase activity is a complex and multifactorial phenomenon. To this respect, in this work it was demonstrated that the activation of the enzyme is not due to the destruction of a non-protein inhibitor, but it is rather related mainly to the changes in the protein system of milk induced as a consequence of the heat treatment.

It was also proved that the protein system of milk could affect the activity in at least two ways: either through the exposure of reactive groups which could activate the enzyme; or through interactions between the milk proteins and the enzyme. The first involves the conformation of whey proteins, mainly β -lactoglobulin, which through the exposure and/or release of reactive SH groups due to the rearrangement of its molecule, causes an increase in the rate of reaction of the enzyme. The former implies the activating effect of serum albumin and β -lg *per se* (independently of the heat treatment).

It was also demonstrated that the activating effect of β -lactoglobulin is due to its strong binding capacity to the enzyme, and that its activating capacity can be lost due to its lactolation when β -lg is heated in the presence of lactose, this suggests that the region involved in the glycolation (close to lys₄₇) could be the same region involved in the binding of β -lg to enzyme.

1. INTRODUCCION

1.1 Antecedentes y Justificación

La leche es el alimento más cercano a lo ideal en términos nutricionales ya que posee todo tipo de nutrientes en diferentes proporciones. Es debido a esto que la leche es un producto muy susceptible a la contaminación y degradación por microorganismos así como por las enzimas que estos producen, obligando a la industria lechera a utilizar diferentes procesos para conservar sus cualidades nutritivas.

Desde sus inicios el hombre ha tratado de extender la vida de anaquel de sus alimentos. En el caso particular de la leche lo ha logrado a través de la concentración, secado, fermentación o salado, sin embargo, esto provoca cambios en sus características sensoriales. Se han desarrollado además diversos procedimientos con el fin de conservar las características originales del producto, algunos de ellos basados en el tratamiento térmico como la refrigeración, pasteurización, o ultrapasteurización.

Por otro lado, el interés por aprovechar los diferentes componentes de la leche de una manera eficiente ha llevado a buscar diferentes mecanismos para modificar las características del producto, mejorándolas o bien adecuándolas para su uso en otros procesos. Es aquí donde la tecnología enzimática ha tenido gran impacto en la industria lechera: por un lado aprovechando las enzimas naturales de la leche (endógenas), ya sea favoreciendo o evitando sus actividades degradativas, o bien agregando enzimas exógenas que representen alguna ventaja tecnológica.

La lactosa es un disacárido que no puede asimilarse en su forma natural, es necesario hidrolizarla para poder asimilar los monómeros que se generan: glucosa y galactosa. La capacidad de producir la β -galactosidasa, enzima que lleva a cabo esta hidrólisis en el intestino delgado, se pierde a medida que el individuo crece, y cuando llega a la edad adulta es probable que haya perdido parcial o totalmente la actividad lactásica de su intestino. Esto provocará que cuando consuma lactosa, ya sea en leche o

sus derivados, se presente un cuadro de flatulencia, dolor abdominal y/o diarrea, denominado “intolerancia a la lactosa” (López y col., 1996).

En México, aproximadamente el 33 % de los adultos son malabsorbedores (no tienen actividad lactásica, pero no presentan síntomas), y entre el 20 y el 31% son intolerantes (Rosado y col., 1994 a; b). De acuerdo con estos datos, la mitad de la población adulta tiene algún tipo de deficiencia lactásica, y por lo tanto tiene dificultad para digerir o utilizar adecuadamente los nutrimentos de la leche fresca y sus derivados.

Aunado a eso, en algunos casos una persona tolerante puede llegar a perder temporalmente la actividad lactásica del intestino principalmente por enfermedades que afecten a las mucosas intestinales, como la diarrea, y volverse intolerante, esto se denomina deficiencia secundaria de lactasa. La deficiencia secundaria de lactasa acarrea problemas nutricionales, principalmente cuando se presenta en niños, puesto que la leche es el principal componente de su dieta y en algunos casos el único.

Además de las inconveniencias fisiológicas de la lactosa, ésta puede generar problemas tecnológicos al transformar la leche en sus derivados. En algunos productos lácteos edulcorados el disacárido tiende a precipitar por su baja solubilidad, formando grumos y arenosidades como consecuencia de su alta tendencia a cristalizar (García-Garibay y col., 1993; Palma y col., 1996). La baja solubilidad de la lactosa, así como su falta de sabor dulce y su tendencia a la cristalización, limitan la cantidad de sólidos no grasos que puede usarse en helados, leches concentradas, algunos quesos fundidos, y muchos otros productos. La hidrólisis de la lactosa en sus dos monosacáridos por la acción de la enzima β -galactosidasa, puede ser una alternativa para resolver estos problemas.

Debido a su importancia tecnológica, la hidrólisis enzimática de la lactosa para la elaboración de productos deslactosados ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista. Se han estudiado las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimos, efecto de algunos componentes de la leche sobre su actividad, etc.), sus usos y las fuentes de donde pueden ser obtenidas.

En la industria lechera, la leche es calentada para una gran variedad de propósitos. Dependiendo de la temperatura de calentamiento este procedimiento puede causar diversos cambios en la leche, que van desde la precipitación de sales debido a la formación de complejos insolubles (Fox y Mc Sweeney, 1998), o la desnaturalización de proteínas, hasta la formación de interacciones entre los componentes de la leche (Dalgleish, 1990; Hillier y Lyster, 1979; Morgan y col., 1998). Los cambios físicos y químicos producidos en la leche como consecuencia del calentamiento, pueden afectar otros procesos que se llevan a cabo en ella, entre ellos los enzimáticos.

En 1950 Van Dam y col. sugirieron que el calentamiento de la leche previo a la hidrólisis de la lactosa con β -galactosidasa podía aumentar la tasa de reacción de la enzima. Sfortunato y Connors (1958) reportaron que la actividad de la lactasa *de Saccharomyces fragilis* (hoy *Kluyveromyces marxianus*), medida a 37°C, es más alta en leche pasteurizada que en leche esterilizada. Desde entonces, se han llevado a cabo relativamente pocos estudios para explicar este fenómeno, y aunque algunos autores han reportado el mismo tipo de observaciones tanto en leche como en suero calentados (Wendorfff y col, 1970, 1971; Guy y Bingham, 1978; Greenberg y Mahoney, 1984; Greenberg y col; 1985) otros no han encontrado tal efecto (Kosikowski y Wierzbicki, 1973; Mahoney y Adamchuck, 1980).

Wendorfff y col. (1970, 1971) reportaron que la actividad de lactasa es más alta en leche o suero precalentados al compararla con un control preparado calentando lactosa en una solución amortiguadora en el que la actividad de la enzima no cambió. Mahoney y Adamchuck (1980) y Greenberg y col. (1985) no observaron ningún efecto en la actividad de la enzima cuando calentaron leche; sin embargo, detectaron un aumento en la tasa de hidrólisis cuando la actividad se determinó en suero precalentado.

Aunque se han reportado varias posibles explicaciones, como que el efecto se debe a la destrucción de un inhibidor termolábil, a un cambio en el equilibrio salino de la leche, o bien, a la desnaturalización térmica de las proteínas de la leche, no se ha determinado

cuál es la causa del efecto observado en la actividad de la enzima. Recientemente, Mahoney (1997) remarcó que la polémica sobre esta situación no ha sido resuelta.

1.2 Hipótesis

Se planteó como hipótesis de este trabajo que el calentamiento de la leche (y/o el suero) provoca cambios en el sistema proteico de los mismos, ya sean conformacionales, interacciones entre proteínas o bien con los iones presentes en el medio; y que dichos cambios pueden ocasionar alteraciones en la actividad de la enzima.

1.3 Objetivo General

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los tratamientos térmicos de la leche y el suero sobre la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, así como correlacionar los cambios físicos y químicos de los componentes de la leche con el efecto observado.

1.3.1 Objetivos Particulares

Para cumplir el objetivo general se llevaron a cabo estudios calentando leche, suero, permeado de suero, permeado de suero precalentado y soluciones puras de las principales proteínas del suero. Se determinó si se presentaban cambios conformacionales en ellos y se correlacionaron con los cambios en la actividad de la enzima. Estos estudios se desarrollaron para cumplir con diversos objetivos particulares:

- Comprobar si existe o no un inhibidor termolábil en la leche cuya destrucción sea responsable del aumento en la actividad de lactasa.

- Comprobar si el aumento en la actividad de β -galactosidasa se debe a algún compuesto liberado al medio o a la exposición sin liberación de grupos de las proteínas del suero.

- Estudiar el grado de desdoblamiento (desnaturalización) de las proteínas del suero dependiendo del tratamiento térmico y su relación con el aumento en la actividad enzimática.

- Estudiar si existe alguna interacción entre la enzima y alguna proteína de la leche que pudiera aumentar su actividad y cómo se modifica dicha unión por los cambios conformacionales que sufra la proteína como consecuencia del calentamiento.

2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1 Composición química de la leche

La leche es un sistema coloidal en el que están disueltos una gran variedad de compuestos: lactosa (5%), grasa (4%), proteínas (3.2%) y sales (0.7%). Sin embargo, la composición exacta no se puede definir en forma general, puesto que varía en función de múltiples factores, como son la raza, el período de lactación y la alimentación del animal, entre otros (Alais, 1991).

La lactosa y las sales se encuentran completamente disueltas en el medio, debido al tamaño pequeño de sus moléculas, y en el caso de las sales, a que se encuentran ionizadas. Las proteínas, en cambio, se encuentran como una suspensión coloidal, que se estabiliza por la carga superficial de la molécula, y puede desestabilizarse y precipitar al cambiar dicha carga; la grasa al no ser soluble en agua, forma aglomeraciones (glóbulos) que se encuentran suspendidas en el sistema, pero que se desestabilizan fácilmente y tienden a unirse, separándose del resto del sistema (Riel, 1991).

La estabilidad del sistema depende de los factores que puedan afectar las cargas de las moléculas arriba mencionadas, alterando su capacidad para solvatarse o mantenerse en equilibrio. Algunos de estos factores pueden ser el pH o la temperatura de tratamiento o almacenamiento de la leche. Se ha propuesto que la estabilidad de la leche al calentamiento se debe principalmente a una reacción que se da entre algunas proteínas del suero y la κ -caseína, aumentando la estabilidad de esta última y evitando la disociación micelar (Singh y Fox, 1987).

Para entender los cambios que se llevan a cabo en la leche como consecuencia de los procesos a los que se le somete; y sus repercusiones tanto en la estabilidad, como en la carga y poder de oxido-reducción del sistema es necesario conocer la química de sus componentes, que se describe a continuación:

2.1.1 Lactosa

Los carbohidratos presentes en la leche son esencialmente lactosa y algunos otros que se encuentran presentes en concentraciones muy bajas, como glucosa y galactosa (0.1%).

La lactosa es un disacárido compuesto por α o β glucosa y β galactosa. Dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula, la lactosa tiene dos formas isoméricas (α o β), que tienen propiedades fisicoquímicas completamente diferentes (solubilidad, cristalización, refracción de la luz, etc.). Estas características fisicoquímicas pueden causar problemas tecnológicos en la manufactura de los productos lácteos, o fisiológicos, cuando un mal absorbedor o intolerante consume este azúcar (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

En la leche normal, están presentes los dos isómeros de la lactosa, y la relación α : β es tal que los dos isómeros estén en equilibrio. La forma β es más soluble que la α , lo que desvía el equilibrio hacia la primera, y a 25°C el equilibrio es: 1 α :1.58 β .

2.1.2 Proteínas de la leche

Las sustancias nitrogenadas (proteicas y no proteicas) constituyen la parte más compleja de la leche. Las sustancias no proteicas se encuentran en pequeñas cantidades y tienen pesos moleculares menores a 500 Da, son dializables y permanecen en solución cuando las proteínas flocculan. Entre ellas se encuentran aminoácidos libres, urea, creatina, nucleótidos y vitaminas.

Las proteínas de la leche son de las más estudiadas de las proteínas de los alimentos. Actualmente se conocen las estructuras primarias, secundarias, y en algunos casos terciarias de las principales proteínas presentes en la leche, y de sus variantes genéticas.

Las proteínas de la leche se clasifican en dos diferentes grupos, en función de sus características fisicoquímicas y funcionales. Estos dos grupos son: a) Las caseínas, que constituyen aproximadamente el 80% de las sustancias proteicas de la leche, y que precipitan a pH 4.6 (punto isoeléctrico); y b) Las proteínas del suero, que son solubles a ese pH, a menos que hayan sido modificadas o desnaturalizadas por tratamientos, como el calor (Alais, 1991).

2.1.2.1 Caseínas

Aunque inicialmente se pensaba que la caseína era una sola proteína, actualmente se sabe que en realidad el término “caseína” comprende a un grupo de aproximadamente 20 proteínas fosforadas; las principales se denominan caseínas primarias, y son:

Nombre	Abreviación	Peso Molecular (kDa)	% de las Caseínas
α_{s1} -caseína	α_{s1} -CN	23.6	42
α_{s2} -caseína	α_{s2} -CN	25.5	11
β -caseína	β -CN	24	31
κ -caseína	κ -CN	19	11
Otras caseínas			5

El resto de las caseínas se denominan menores, por que se originan a partir de la ruptura o hidrólisis (principalmente enzimática, por la acción de algunas proteasas propias de la leche) de las caseínas primarias. Estos polipéptidos incluyen a las γ -caseínas (γ^1 , γ^2 y γ^3); a las proteasas peptonas, que anteriormente se consideraban como proteínas del suero, pues son solubles a pH 4.6, sin embargo, provienen de la hidrólisis de las β -caseínas, y por ello ahora se les considera parte de la caseína. La caseína λ (PM 30.65 kDa) se deriva

de la caseína α_{s1} ; se han encontrado por lo menos otros 30 péptidos que aún no han sido completamente caracterizados e identificados. Estas últimas se consideran caseínas minoritarias, y comprenden el 5% del total de las caseínas (Fox, 1989; Riel, 1991).

Además de la variabilidad en la estructura de estas proteínas, en las proteínas primarias se da la microheterogeneidad, que puede presentarse como variaciones en el grado de fosforilación, glicosilación, uniones de disulfuro, polimerización de aminoácidos, etc., que alguna vez llevaron a pensar que eran proteínas diferentes. Actualmente se ha demostrado que estas son variaciones genéticamente controladas (Fox y Mc Sweeney, 1998).

Por ejemplo, las caseínas α_{s1} y α_{s2} son las que contienen mayor número de grupos fosfato (8 o 9 P para α_{s1} y 10 a 13 P para α_{s2}). Como se mencionó anteriormente, la variación en el número de grupos fosfato hizo que en alguna época se les considerara proteínas diferentes: la α_{s1} con 9 P se denominaba α_{s0} , y la α_{s2} podía ser α_{s3} , α_{s4} o α_{s6} si presentaba 11, 12, o 13 grupos P. Actualmente se les denomina $\alpha_{s1\ 9P}$, $\alpha_{s2\ 11P}$, $\alpha_{s2\ 12P}$, y $\alpha_{s2\ 13P}$. La β -caseína contiene 5 grupos fosfato, aunque también existen variantes genéticas con 4 grupos fosfato. La κ -caseína contiene solamente 1 grupo fosfato (sus variantes genéticas contienen 2 o 3) (Fox, 1989).

Por tener diferente composición y estructura, no todas las proteínas que se cuentan entre las caseínas son igualmente sensibles a los diferentes componentes del medio; por ejemplo, las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β , que contienen gran número de grupos fosfato en su estructura son sensibles al ión calcio (Ca^{2+}), que disminuye su solubilidad y consecuentemente precipitan en su presencia; en cambio, la κ -caseína contiene solamente un grupo fosfato, lo que la hace altamente estable frente al ión Ca^{2+} , y es por esto que juega un papel importante en la estabilización de la micela de caseína frente al Ca^{2+} (Riel, 1991; Schmidt y Morris, 1984, Fox, 1989).

Todas las caseínas contienen estos grupos prostéticos formados por ésteres fosfóricos de la serina, y en algunos casos, de la treonina. Aquellas proteínas que

contengan un gran número de residuos de fosfoserina, como las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β , tenderán a unirse así a cationes polivalentes, principalmente Ca^{2+} , lo que conlleva a la neutralización de sus cargas, y como se dijo al inicio de este capítulo, son las cargas las que mantienen a las proteínas en suspensión, por lo que al neutralizarse precipitan.

En general, todas las caseínas tienen pocos grupos sulfhidrilo (aproximadamente $\frac{1}{2}$ cistina por molécula), pero estos grupos no se encuentran libres, sino formando enlaces de disulfuro intramoleculares, o bien con otra proteína (que en leche fresca es generalmente alguna de las caseínas), al unirse dos moléculas cualesquiera de caseína forman otras proteínas, por ejemplo, la caseína α_{s5} se forma a partir de la unión de la α_{s2} con la α_{s2-11P} (Schmidt y Morris, 1984; Fox, 1989).

Debido al bajo contenido de grupos sulfhidrilo, y a que estos se encuentran ligados formando puentes de disulfuro, las caseínas en general tienen una dependencia estructural mínima de los puentes de disulfuro y por lo tanto presentan resistencia a la desnaturalización por calentamiento, sobre todo al compararse con las proteínas del suero, que por su alto contenido de grupos sulfhidrilo son muy termolábiles (Schmidt y Morris, 1984).

Otras características comunes a todas las caseínas son que tienen una alta incidencia de prolina y de cadenas hidrofóbicas en su estructura, con los aminoácidos esenciales predominando en regiones discretas de la molécula, y que tienen alta incidencia de aminoácidos cargados, especialmente ácido aspártico y ácido glutámico (cargados negativamente); estas cargas afectan la solubilidad de este tipo de proteínas.

En la leche, las caseínas se asocian con el calcio, los fosfatos y otras especies iónicas para formar estructuras esféricas grandes (40 -300 nm de diámetro), altamente porosas y solvatadas, denominadas micelas. Estas micelas de caseína consisten básicamente de proteína (94%) y algunos iones y sales (6%); estos son principalmente fosfato de calcio, magnesio y citrato. Las principales fuerzas de las que depende la estabilidad de la micela de caseína son las cargas eléctricas y su grado de hidratación (Alais, 1991; Fox, 1989; Schmidt y Morris, 1984).

La estabilidad coloidal de las micelas de caseína se debe principalmente a la κ -caseína y al fosfato de calcio coloidal. Actualmente se acepta que la κ -caseína estabiliza la estructura de la micela por su naturaleza anfifílica, dada por casi todos los aminoácidos cargados, más un residuo de carbohidrato en el extremo carbonilo-terminal (Schmidt y Morris, 1984).

2.1.1.3.2 Proteínas del suero:

Entre las proteínas del suero de leche bovina, los principales componentes son: β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, albúmina sérica bovina, inmunoglobulinas, lactoferrina, y algunas enzimas propias de la leche. Para coagular estas proteínas no basta con neutralizar sus cargas, es necesario disminuir su grado de hidratación, ya sea por calor o por medio de alcohol (Alais, 1991; Fox, 1989; Reni, 1991)

De estas proteínas, la β -lactoglobulina y la α -lactalbúmina están presentes en mayor concentración y probablemente son las más importantes en cuanto a propiedades fisicoquímicas de los productos de proteína de suero (Schmidt y Morris, 1984).

La β -lactoglobulina es la más importante de las proteínas del suero. Su peso molecular es de 18.362 kDa, aunque en la literatura se da a veces el de 36 kDa, pues esta proteína tiende a formar estructura cuaternaria (dímeros) entre unidades iguales, entrecruzadas por dos puentes de disulfuro. Cada monómero tiene un puente de disulfuro y un sulfhidrilo intramolecular en forma de una cisteína y dos residuos de cistina. La β -lactoglobulina provee aproximadamente el 90% de los grupos sulfhidrilo libres en la leche.

La estructura secundaria y terciaria de la β -lactoglobulina, además de cercanía física de los grupos sulfhidrilo con los puentes de disulfuro en la estructura de la molécula, la convierte en la proteína de la leche más susceptible a la desnaturalización por

calor, pues se puede dar muy fácilmente un intercambio entre los grupos sulfhidrilo libres y los que participan en el enlace de disulfuro, desestabilizando a la molécula (Evans y Gordon, 1980; Schmidt y Morris, 1984).

La α -lactalbúmina es una globulina compacta, casi esférica, y de una sola cadena (14.4 kDa) que no contiene grupos sulfhidrilo. Los grupos disulfuro (4 por molécula) no están involucrados en el entrecruzamiento de las distintas cadenas. La α -lactalbúmina no se considera una proteína susceptible a la desnaturalización, pero si ésta llega a darse puede afectar de manera importante la funcionalidad del suero para los diferentes usos (Evans y Gordon, 1980; Fox, 1989; Schmidt y Morris, 1984).

La albúmina sérica representa el 5 % de las proteínas del suero. Es una proteína de peso molecular de 62.5 kDa, y punto isoeléctrico de 4.7. Es especialmente rica en lisina y cistina y contiene ácido aspártico y alanina en posiciones terminales (Evans y Gordon, 1980).

2.1.3 Minerales

La leche contiene varias sales y minerales, que aunque se encuentren en concentraciones muy bajas (0.3 a 1 %), son importantes para conservar la estabilidad del sistema. Entre estas sales y minerales destacan los citratos, cloruros, fosfatos, magnesio Mg^{2+} (12 mg/100 g de leche), sodio Na^+ (50 mg/100 g de leche), potasio K^+ (150 mg/100 g de leche), calcio Ca^{2+} (130 mg/100 g de leche), fierro Fe^{3+} , cobre Cu^{2+} y zinc Zn^{2+} , que se encuentran en proporciones menores a 0.5 mg/100 g de leche. Todos los iones arriba mencionados pueden encontrarse en solución en la fase acuosa de la leche (suero); el Mg^{2+} y el Ca^{2+} se encuentran, además, formando parte del sistema coloidal de la leche (Alais, 1991; Badui, 1990; Reni, 1991).

El contenido total de Ca^{2+} de la leche es de 130 mg/100 g de leche, este valor es superior a la concentración de saturación en una solución acuosa, y el hecho de que no

precipite en la leche se debe a que no todo el calcio presente se encuentra en solución. La mayor parte (67% del calcio total) se encuentra ligada a las caseínas, formando fosfocaseinato de calcio, el cual es importante porque ayuda a dar estabilidad a las micelas de caseína, pues se encuentra en las uniones de las submicelas. Este tipo de calcio no está en realidad disuelto en la fase acuosa, sino suspendido como parte de la micela de caseína, y por lo tanto no es ultrafiltrable (Alais, 1991; Badui, 1990).

El resto del Ca^{2+} se encuentra en la fracción ultrafiltrable de la leche, aunque no todo está en forma iónica: el 21.5 % del Ca^{2+} total de la leche se encuentra disperso formando sales como el citrato y fosfato de calcio. Solamente el 11.5 % del Ca^{2+} total se encuentra verdaderamente disuelto en el suero, y está ionizado. Es este último el que se encuentra libre para reaccionar, y que podría afectar a los procesos que se lleven a cabo en la leche (Badui, 1990).

Existe un equilibrio entre el calcio coloidal y el soluble, que depende del pH y de la temperatura del sistema; en condiciones ácidas hay un desplazamiento del calcio coloidal al soluble que incrementa la inestabilidad de las proteínas, mientras que a temperaturas elevadas se favorece la formación de calcio coloidal (Badui, 1990).

2.1.4 Cambios producidos en la leche por el tratamiento térmico

La desnaturalización de las proteínas del suero por calor es un proceso de dos fases: inicia con un desdoblamiento reversible de la proteína que involucra la ruptura de los puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos, seguido de una desnaturalización irreversible y la agregación de las moléculas que se da a temperaturas más altas. Las reacciones irreversibles son de intercambio tiol-disulfuro. Se ha sugerido una tercera fase, que depende de la interacción del calcio y resulta en la formación de un agregado proteico mayor. La gelificación de las proteínas del suero puede describirse como la manifestación física de la desnaturalización inducida por el calentamiento de las proteínas cuando hay

una alta concentración de las mismas (Hillier y col., 1979; Iametti y col., 1995; Parris y col., 1991).

Zhu y Damodaran (1994) y Iametti y col. (1995) estudiaron los cambios inducidos en los aislados de proteínas de suero al calentarlos a temperaturas entre 70 y 90 °C. Observaron que cuando la concentración de proteína era baja (5%), se desdobra la estructura β -plegada de la proteína, dándole a ésta una estructura más desordenada “al azar”, en cambio, cuando la concentración de proteína era mayor (9%), los cambios en la estructura secundaria de la proteína eran menores, incluso a temperaturas mayores (90°C).

Estudios más profundos demostraron que al calentarse a 90°C, las proteínas del suero se polimerizan (entrecruzan) vía reacciones de intercambio de sulfhidrilos-disulfuros; tal efecto es también dependiente de la temperatura a la que se lleve la solución. Estos cambios son de vital importancia en las propiedades reológicas de estas proteínas, como son la viscosidad del gel que se forma, que aumenta con el entrecruzamiento y la estabilidad de las espumas que pueden formarse. Un conocimiento más detallado de como se dan estas reacciones y su dependencia con la temperatura podría ayudar a controlar y optimizar los procesos industriales en los que se utiliza el suero de leche (Elfagm y Wheelock, 1978; Haque y col., 1987; Haque y Kinsella, 1987; Hillier y Lyster, 1979).

Hay un creciente interés en el procesamiento a altas temperaturas de la leche y los efectos que pueda tener en ella, principalmente por el desarrollo de sabores a cocido y la desestabilización de las proteínas, que provoca precipitaciones en el envase.

Se ha demostrado que la liberación de los grupos sulfhidrilo de la leche contribuye de manera importante en el desarrollo de estos sabores, además también se le ha relacionado con la desestabilización de las proteínas de la leche (Riel, 1991; Patrick y Swaisgood, 1976; Imhof y Bosset, 1994).

El calor altera el equilibrio salino de la leche. El calcio y fosfato coloidales tienen la tendencia de separarse de la micela de caseína y a precipitar en forma de fosfato

tricálcico. Los tratamientos superiores a las temperaturas de pasteurización pueden coagular las albúminas y las globulinas. Los tratamientos térmicos aumentan la capacidad de retención de agua (CRA) de las proteínas en comparación con la CRA de la proteína a temperatura ambiente, probablemente por que los puntos reactivos de las cadenas polipeptídicas quedan más accesibles o debido a una mayor polimerización de las proteínas (Riel, 1991).

Algunas investigaciones referentes al efecto que tiene el someter a la leche a tratamientos térmicos severos y su posterior almacenamiento sobre los grupos sulfhidrilo y disulfuro indican que del 6 al 15% de la cisteína (aminoácido que aporta una parte importante del azufre en la leche) se pierde durante el tratamiento térmico fuerte (temperaturas de 85 °C o mayores, durante 30 min), posiblemente por la volatilización de grupos sulfhidrilo o por la ruptura de uniones disulfuro; a esta disminución en la cantidad de cisteína determinable, corresponde un ligero aumento en la cantidad de grupos sulfhidrilo reactivos (Carbonaro y col, 1996; Patrick y Swaisgood, 1976).

Esta pérdida puede reducirse al disminuir el tiempo de calentamiento aún aumentando la temperatura. Estos estudios muestran además que después del tratamiento térmico, durante el almacenamiento de la leche, se dan reacciones de oxidación de los grupos sulfhidrilos, que se asocian con el sabor a “cocido” de la leche y con la inestabilidad de las proteínas, pues pueden darse también reacciones de intercambio de grupos disulfuro. Con el tiempo de almacenamiento de la leche, la cantidad de grupos sulfhidrilo reactivos va disminuyendo, como resultado de la oxidación de los grupos expuestos por el tratamiento térmico, disminuyendo el sabor a cocido (Carbonaro y col., 1996; Parnell-Clunies y col, 1988; Patrick y Swaisgood, 1976).

La liberación de grupos sulfhidrilos de la leche comienza a producirse cuando el tratamiento térmico es superior a 70 °C/30 min o a 75 °C/3 min, y origina una disminución del potencial de óxido-reducción. La susceptibilidad de la leche para la liberación de grupos sulfhidrilo varía con la raza y el individuo (Riel, 1991; Parris y col., 1991).

2.2 Antecedentes bibliográficos

2.2.1 Características de las β -galactosidasas

A la fecha, se han realizado diversas investigaciones en relación a la hidrólisis enzimática de la lactosa, incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimas, efecto de algunos parámetros, etc.), su utilización, y las diferentes fuentes de donde se pueden obtener, que son: hongos como *Aspergillus oryzae* (Park y col, 1977) o *Aspergillus niger* (Jakubowski y col., 1975); bacterias, como *Streptococcus thermophilus* (Byeong y Mahoney, 1989; Greenberg y Mahoney, 1983; 1984) y levaduras, entre las que se encuentran, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Picchia jadinii* (Mahoney y Adamchuck, 1980; Guy y Bingham, 1978; García-Garibay y col., 1993). Sin embargo, existen aún muchas incógnitas por resolver.

Las características y propiedades de las lactasas varían dependiendo de la fuente, por ejemplo, las de origen fúngico presentan mayor termoestabilidad que las de levadura y bacterias, y su pH óptimo de actividad cae dentro del rango ácido (4.5-6.5) y temperatura óptima entre 35 y 55 °C (García Garibay y Gómez Ruíz, 1996; Jackson y Jelen, 1989; Park y col, 1979). Las lactasas de levadura y bacterias son en general más termolábiles, y su pH óptimo de actividad es cercano al neutro, por lo que se les llama lactasas neutras. Estas lactasas tienen una temperatura óptima al rededor de 37 °C, y muestran una pérdida considerable de actividad a pH 5.3, al elevar la temperatura a 55 °C, o bien la pierden completamente a pH 4.5 (Jackson y Jelen, 1989).

Con respecto a la enzima lactasa de *Kluyveromyces marxianus*, se han realizado estudios en cuanto a su estructura. Mahoney propuso en 1980, que esta proteína tiene 6 grupos sulfhidrilo, de los cuales depende en gran medida su capacidad hidrolítica, y que a medida que estos van desapareciendo o se van oxidando a enlaces de disulfuro, la actividad va disminuyendo, principalmente por que su modificación conlleva cambios en la estructura terciaria de la enzima. Estudios cinéticos con ácido 5,5-ditiobis(2-

nitrobenzónico) (DTNB) sugieren que ninguno de estos sulfhidrilos están en el sitio activo, pero su modificación resulta en una pérdida gradual de la actividad.

2.2.2 Efecto del tratamiento térmico del medio (leche, suero, o solución amortiguadora) sobre la actividad de lactasa.

Desde hace varios años se reportó que al precalentar la leche (pasteurizarla) se podía aumentar la velocidad de hidrólisis de la lactosa con la β -galactosidasa. Estas observaciones despertaron mucha polémica, pues más tarde otros autores reportaron el efecto contrario, o bien reportaron efectos dependientes de los cambios en los constituyentes del medio de la reacción, como son el ambiente iónico (minerales) o las proteínas, al tratamiento térmico de la misma (Sfortunato y Connors, 1958; Wendorff y col, 1970; 1971; Kosikowski y Wiezbicki, 1973; Guy y col., 1978; Mahoney y Adamchuck, 1980; Greenberg y Mahoney 1984)

En 1958 se publicaron los primeros resultados que sugieren que al someter la leche a un tratamiento térmico previo a la hidrólisis con la enzima β -galactosidasa, la actividad de la misma se incrementaba (Sfortunato y Connors, 1958).

Wendorff y col. reportaron en 1970 que en la leche descremada y condensada la velocidad de la hidrólisis podía aumentar dependiendo del tratamiento (calentamiento a diferentes temperaturas). Los tratamientos que probaron fueron: 62.8, 68.3, 73.9, 79.5, y 85 °C durante 30 minutos, como un primer calentamiento, y en esta etapa se obtuvo una hidrólisis hasta 10 veces mayor en la leche tratada a 85 °C, que en la tratada a 62.8 °C (156 y 17 g de lactosa hidrolizada después de 30 min. a 37 °C en cada caso). Al dar un segundo tratamiento térmico a la leche y medir la actividad enzimática en ella, no se observó un aumento respecto al primer tratamiento, sino una disminución en la actividad.

Para ayudar a determinar qué fracciones de la leche eran las principales responsables de la variación en la hidrólisis de la lactosa en las leches precalentadas, Wendorff y col. (1970) realizaron otros experimentos poniendo por separado leche

descremada, suero, y una solución al 5% de lactosa, los cuales fueron tratados de la misma manera que la leche en el experimento anterior. En la solución de lactosa no se observó ninguna variación entre los diferentes tratamientos térmicos, sin embargo, en la leche descremada y el suero sí se observaron diferencias notables.

De los resultados anteriores, era evidente que al calentar la lactosa en presencia de las proteínas de la leche se obtenía un gran efecto en la actividad hidrolítica de la enzima.

En 1971 Wendorff y col. propusieron como causa de las diferencias en la velocidad de hidrólisis algún cambio en el sistema proteico, por ejemplo la propia desnaturalización de las proteínas, o bien, un aumento en el poder reductor de las mismas por la exposición de los grupos sulfhidrido de las proteínas del suero al desnaturalizarse. Sin embargo, con los experimentos realizados no era posible determinar si la variación se debía a las proteínas del suero, a la caseína, interacciones proteína - proteína, a la presencia de algún inhibidor termolábil o a alguna otra alteración del sistema.

En 1973, Kosikowski y Wiezbicki, hicieron pruebas para comparar actividad de lactasa en leche bronca (sin ningún tipo de tratamiento), y leche pasteurizada, demostrando que después de 24 h de reacción a una temperatura de 4 °C y utilizando una concentración de enzima de 25 mg/l se obtenían 80 y 75% de lactosa hidrolizada en leche bronca y pasteurizada respectivamente, y al utilizar 100 mg/l en las mismas condiciones de reacción, 95 y 90 % de lactosa hidrolizada en la leche pasteurizada y bronca respectivamente.

Los resultados de Kosikowski y Wiezbicki (1973) difieren de los reportados por Wendorff y col. (1970; 1971), pues ellos habían encontrado que al precalentar la leche se obtenía cerca de un 100% de aumento en la actividad y Kosikowski y Wiezbicki obtuvieron solamente una diferencia del 5%, aunque se debe tomar en cuenta que los tiempos y temperatura de reacción utilizados por Kosikowski y Wiezbicki son de 24 h, a 4 °C, mientras que los que usó Wendorff son de 30 min, a 37 °C, por lo que es posible que si en algún momento hubo alguna diferencia en la velocidad de reacción en el caso de

Kosikowski y Wiezbicki, ésta pudo no evidenciarse por el largo periodo de tiempo utilizado para la hidrólisis.

Cabe mencionar que en ambos estudios la actividad hidrolítica se midió utilizando únicamente un punto: la medición de lactosa hidrolizada después de cierto tiempo, y no se siguió la cinética de reacción a través del tiempo.

Wendorff y col. (1971) propusieron como posibles explicaciones para el fenómeno, algún cambio en el sistema proteico de la leche, la precipitación de Ca^{2+} (inhibidor de la enzima) en forma de fosfato de Ca^{2+} coloidal, o bien la desnaturalización de algún inhibidor termolábil, pero no ahondaron más en ello.

Una de las teorías que se manejaban para explicar la diferencia en la tasa de hidrólisis en las leches precalentadas suponía que en la leche sin tratar había algún inhibidor de la actividad que durante el tratamiento térmico se eliminaba, sin embargo, al comparar la hidrólisis obtenida para leche bronca y leche pasteurizada no se observa una diferencia significativa, lo que indica que a largo plazo la inhibición no es un factor importante en la leche bronca (Kosikowski y Wiezbicki, 1973). Además, Mahoney y Adamchuck. (1980) trataron de probar la existencia o ausencia del inhibidor termolábil, calentando soluciones con diferentes fracciones de proteína (controlando totalmente los componentes del medio) y observando el efecto del calentamiento. Al calentar las proteínas de leche observaron un aumento en la actividad enzimática, que no podía deberse a la presencia de un inhibidor.

Otro aporte de Mahoney y Adamchuck. (1980) es que la actividad enzimática no solo se incrementó al utilizar proteínas presentes en la leche, sino que también al utilizar proteínas de origen no lácteo como la ovoalbúmina, lo que sugiere que el efecto activador se da por algún cambio en las proteínas, sin que éstas tengan que ser de leche.

En 1978, Guy y col. observaron que al pasteurizar la leche previo a la hidrólisis con lactasa de *Kluyveromyces lactis*, aumentaba la tasa de hidrólisis de la lactosa; también observaron que al concentrar la leche daba una reducción de la tasa de hidrólisis de aproximadamente 15%.

En contraste con lo establecido por Wendorff y col. (1970) y Sfortunato y Connors (1958), Mahoney y Adamchuck en 1980 no obtuvieron diferencias en la actividad de lactasa al precalentar leche a 85 °C, sin embargo, sí observaron este efecto al precalentar el suero a la misma temperatura, por lo que concluyen que el aumento en la actividad se da por algún cambio en las proteínas del suero.

Para definir si ese cambio era en la concentración de la proteína, Greenberg y Mahoney (1983) midieron la cantidad de la misma presente en las muestras antes y después del tratamiento térmico. El precalentamiento de las muestras no tuvo efecto en la concentración de proteínas de la leche descremada, pero causó una considerable desnaturalización y precipitación de las proteínas del suero. El calentamiento no afectó las concentraciones de calcio soluble y magnesio de la leche y suero, los que sugiere que el aumento en la actividad se debe a la desnaturalización de las proteínas del suero.

Cuando Greenberg y Mahoney (1983) precalentaron las proteínas del suero junto con iones manganeso, que se habían reportado como activadores, el aumento en la actividad enzimática no fue aditivo, sino ligeramente menor, lo que tiene tres posibles explicaciones: 1.- Que haya interacciones enzima manganeso, lo que limita la acción activadora de la proteína; 2.- Que haya interacciones enzima - proteína, lo que limita la acción activadora del manganeso; o bien 3.- que haya interacciones manganeso - proteína, limitando el poder activador de ambos compuestos.

Más adelante, Greenberg y Mahoney (1984) obtuvieron aumentos de 6 y 8% al comparar la actividad que se obtiene en leche bronca con la obtenida en leches precalentadas a 63 y 85 °C durante 30 minutos. Este no es un aumento tan espectacular como el reportado por Wendorff y col. en 1970, pero sugiere que sí existe un cambio en la actividad enzimática.

Para poder definir el efecto que tienen las proteínas del suero en la activación de la enzima, y el por qué después de un tratamiento térmico este efecto aumenta, es necesario conocer los cambios que sufren dichas proteínas con el tratamiento térmico. Sobre este

tema, Zhu y Damodaran publicaron en 1994 un estudio sobre los cambios conformacionales inducidos por el calentamiento de las proteínas del suero.

Zhu y Damodaran (1994) concluyeron que la magnitud de la desnaturalización e insolubilización de las proteínas del suero depende de la concentración de las mismas, la temperatura y el tiempo de calentamiento, como se explicó con más detalle en la sección 2.1.4.

2.2.3 Efecto de las proteínas sobre la actividad de lactasa

En cuando al efecto de las proteínas, se han reportado diversos estudios: Reed (1966) observó que en una solución de lactosa la velocidad de hidrólisis con lactasa es mayor que en suero, y que en leche descremada. En contraste, Wendorff y col. (1970) establecieron que la actividad hidrolítica es mayor en suero, que en leche descremada y que la actividad en leche o suero es mayor que aquella observada en una solución de lactosa, aunque ninguno propuso explicación sobre el por qué de estas diferencias.

En 1980 Mahoney y Adamchuk retomaron los trabajos de Wendorff y col. e intentaron explicar las diferencias encontradas en los distintos medios a través de diversos factores, como son el ambiente iónico en el que está diluido cada substrato, y/o los efectos que éste pueda tener sobre las proteínas de la leche. Observaron que la actividad enzimática era ligeramente mayor en leche descremada que entera; también que en ausencia de iones de manganeso todas las fracciones proteicas de la leche aumentaban la actividad de lactasa varias veces. Finalmente, para comparar el efecto de las diferentes proteínas las diluyeron en solución amortiguadora, y encontraron un aumento mayor para la caseína que para el resto de las proteínas, sin embargo, el experimento se realizó probando diferentes concentraciones de cada proteína, por lo que no es posible comparar los incrementos encontrados, que pueden deberse más a la concentración de proteína que al efecto de la misma.

En 1984, Greenberg y Mahoney estudiaron el efecto combinado de las proteínas y los iones, encontrando que las proteínas de la leche por sí solas aumentan ligeramente la

actividad, pero aminoran el efecto del ambiente iónico de la leche y el suero, induciendo así un aumento en la tasa de hidrólisis.

Chen y Tsen (1991) comprobaron que al combinar varios factores (iones, proteínas y precalentamiento), como el calentar una mezcla de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , y K^+ , la actividad enzimática se inhibía; y también que a pesar de que aquella mezcla presentó capacidad inhibitoria, al agregar caseína o proteínas del suero, tal efecto disminuye, posiblemente debido al efecto enmascarador de las proteínas hacia los iones metálicos.

Los resultados publicados por Chen y Tsen (1991) sugieren, a diferencia de lo establecido por Mahoney y Adamchuck en 1980, que algunas proteínas de la leche descremada y de la fracción ultrafiltrada de la leche descremada tienen un efecto inhibitorio de la actividad de lactasa. Ellos observaron que la caseína y proteínas del suero preparadas por precipitación isoeléctrica, diálisis y liofilización resultaron inhibitorias para la lactasa. El tratamiento de la caseína con enzimas colagenasa o tripsina no cambió su poder inhibitorio, más aún, al calentar la proteína a 65 °C su efecto inhibitorio se incrementó ligeramente.

2.2.4 Efecto de los iones sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa

Se han realizado una gran variedad de estudios con el fin de elucidar qué efecto tienen los iones presentes en el medio sobre la actividad de las lactasas (neutras y de hongos).

Diversos investigadores han observado diferentes efectos de los iones, dependiendo del tipo de enzima de que se trate, principalmente la fuente de la misma, y el tipo de solución en que se haya medido la actividad (leche entera, descremada, suero o soluciones amortiguadoras).

Los resultados obtenidos varían en magnitud dependiendo del tipo de solución en que la enzima reaccione, pero no en el tipo de efecto (inhibidor o activador) del ión sobre la tasa de reacción.

Es así como después de muchas investigaciones ha quedado establecido que tanto en solución acuosa como en leche, los iones Mg^{+2} , Mn^{+2} y K^{+} son activadores de la reacción de hidrólisis y que el Ca^{+2} es un inhibidor; respecto al sodio, existe todavía la controversia iniciada por Dickson y col. (1979) y Guy y col. en 1978.

Pivarnik y Rand (1992) estudiaron el efecto de los diferentes iones, pero comparando soluciones amortiguadoras con lactosa y leche; sus resultados muestran que todos los iones (tanto activadores como inhibidores) tienen mayor efecto cuando se encuentran en presencia de proteínas (leche descremada).

Cabe mencionar que la mayoría de estos estudios, donde se pretendió demostrar la influencia de las proteínas y de los minerales, resultan poco claros, y en ocasiones confusos, ya que se mezclan más de una variable y/o se utilizan proporciones muy altas de proteínas sin ofrecer explicaciones claras de los criterios con los que se seleccionaron tanto las variables como los niveles usados.

3. METODOLOGÍA

3.1 Medios de reacción

3.1.1 Leche

Para el proyecto se utilizó leche bronca que se obtuvo en el Rancho Buena Vista, en Zumpango del Río, Edo de México.

3.1.2 Suero

La leche bronca se calentó a 37 °C y se agregó un extracto comercial de quimosina (Cuamex), 1 mL de preparación/ l de leche. La leche se agitó para distribuir la enzima uniformemente y se dejó actuar durante 1 h (hasta la obtención de un gel firme).

El gel se cortó en pedazos pequeños con ayuda de una varilla de vidrio para facilitar la separación del suero. Una vez que el suero se separó, se coló a través de algodón y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 30 minutos para precipitar la caseína que hubiera quedado suspendida. El suero se filtró dos veces más a través de un filtro Whatman # 42.

3.1.3 Permeado de Suero

El suero, ya fuera calentado o sin calentar, se ultrafiltró utilizando un Sistema de Ultrafiltración de Flujo Tangencial de Acrílico Minitan (Millipore, Bedford MA, EUA) a través de membranas de celulosa NMWL de 10,000 ó 30,000 Da (Millipore, Bedford MA, EUA).

3.1.4 Soluciones de Proteínas del Suero Puras

Se prepararon soluciones puras de las 3 proteínas más abundantes del suero a las concentraciones a las que se encuentran en el mismo: β -lactoglobulina (3 mg/mL), α -lactalbúmina (1 mg/mL) y seroalbúmina (0.3 mg/mL) (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH 6.6. En algunos experimentos se agregaron diferentes concentraciones (1 - 20 %) de lactosa (J.T. Baker, Xalostoc México) antes de dar el tratamiento térmico.

3.2 Tratamientos

3.2.1 Calentamiento

Muestras de 100 mL de leche, suero, ultrafiltrado de suero o soluciones de proteínas puras se trataron a 55, 65, 75 u 85 °C durante 30 minutos. Se utilizaron controles para cada substrato los cuales no se sometieron a ningún tratamiento térmico. Las muestras se calentaron por inmersión de los frascos de 250 mL en un baño de agua con la temperatura requerida; se permitió que alcanzaran la temperatura requerida y se mantuvieron a dicha temperatura durante 30 minutos, después de los cuales se enfriaron con agua corriente y se almacenaron a 4 °C.

3.2.2 Oxidación de los grupos SH

En algunos experimentos se agregó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) después del calentamiento en proporción equimolar a los grupos sulfhidrilo medidos en el permeado para oxidarlos.

3.3 Determinación de la actividad enzimática

La actividad enzimática se midió ya fuera determinando el aumento de glucosa liberada a partir de la hidrólisis de la lactosa; el del o-nitro fenol (ONP) liberado por la hidrólisis del o-nitro-fenil- β -D-galactósido (ONPG, Jiménez-Guzmán y col, 2002).

3.3.1 Definición de unidades enzimáticas

Para calcular la actividad, en los casos en los que se utilizó lactosa como sustrato, se definió una unidad enzimática ($UE_{lactosa}$) como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μ mol de lactosa en un minuto a 37°C y pH 7.0.

Cuando el sustrato utilizado fue ONPG, la unidad enzimática (UE_{ONPG}) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μ mol de ONPG en un segundo a 37 °C y pH 7.0.

3.3.1 Preparación enzimática

Se utilizó una solución enzimática de Maxilact LX-5000 (Gist-Brocades). Se diluyó 1:10 en solución amortiguadora 0.05 M de fosfatos pH 6.6 cuando se utilizó lactosa como sustrato, y 1:400 en solución amortiguadora 0.05 M de fosfatos pH 6.6 cuando se utilizó ONPG como sustrato.

3.3.2 Reacción de hidrólisis utilizando lactosa como sustrato

Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo en matraces de 50 mL a los que se agregaron 20 mL de leche, suero, permeado de suero o solución amortiguadora cuyo pH fue previamente ajustado a 6.6 para evitar que la acidez del medio ejerciera algún efecto inhibitor sobre la enzima. Los matraces se calentaron a 37 °C y se agregó 0.1 mL de la preparación enzimática.

Se tomaron muestras de 0.2 mL a los 3, 6, y 10 minutos. La reacción se detuvo trasasándolas a tubos con 1.8 mL de agua destilada y 1 mL de ácido tricloroacético

(TCA) (J.T. Baker, Xalostoc, México) al 10% para precipitar las proteínas y posteriormente medir la concentración de glucosa.

La determinación de glucosa se hizo por el método de Glucosa Oxidasa (GOD-PAP) (SPINREACT Co.), que emplea las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, y como compuesto colorido a la 4-aminofenazona.

La concentración de glucosa en las muestras se calculó comparando la absorbancia de la muestra contra una curva patrón de glucosa con un rango de 0.5 – 3.0 mg_{glucosa}/mL. La ecuación de la curva fue la siguiente:

$$G \text{ (mg/ml)} = (\text{Abs}_{505\text{nm}} + 8.5714 \times 10^{-4})/0.02337$$

$$R = 0.9714$$

3.3.3 Reacción de hidrólisis utilizando ONPG como sustrato

Se utilizó como sustrato una solución de ONPG 0.034 M (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA) preparada en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 6.6. La solución enzimática se mantuvo a 37 °C durante 15 minutos antes de llevar a cabo la reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo directamente en el espectrofotómetro utilizando una celda de temperatura controlada para mantener la temperatura a 37 °C. En una celda de vidrio de 3 mL se colocaron 0.2 mL del sustrato y se agregaron 2.8 mL de la solución de enzima previamente atemperada. Se registró la absorbancia a $\lambda=410$ nm cada 10 segundos durante los 3 minutos que duró la reacción.

Los valores de absorbancia obtenidos se compararon contra una curva patrón de o-nitro-fenol (ONP) con un rango de 0.5 – 2.5 $\mu\text{mol}_{\text{ONP}}$ /mL. La ecuación de la curva patrón de ONP fue:

$$\text{ONP } (\mu\text{mol/ml}) = (\text{Abs}_{410\text{nm}} + 0.07865)/0.4141$$

$$R = 0.9827$$

3.3.4 Actividad *in situ* en gel de electroforésis utilizando 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido como sustrato

En algunos experimentos la actividad se determinó en un gel de electroforésis, utilizando 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido como sustrato, según Brady y col. (1995).

En estos casos las muestras se corrieron en un gel no-desnaturalizante, T=10 o 12.5%. Las muestras no se fijaron después de correrlas. El gel se enjuagó 2 veces con buffer de fosfatos 0.05M pH 6.6 hasta eliminar los restos del frente del gel.

Una vez que los geles fueron enjuagados se sumergieron en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 6.6 con 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido 0.001 M (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA).

Los geles se incubaron a 37 °C con el sustrato durante 2-5 horas, después de las cuales se analizó la imagen por fluorescencia en luz ultravioleta utilizando un Gel Doc (Bio Rad).

3.4 Análisis

3.4.1 Determinación de lactosa en leche y suero

Con base en el hecho de que la lactosa es el único azúcar reductor presente en la leche fresca, se determinó midiendo azúcares reductores en leche sin hidrolizar, por el método del ácido 5-5'-dinitro-salicílico (DNS) (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA). Debido a que las proteínas de la leche dan opacidad, antes de llevar a cabo la determinación de lactosa fue necesario precipitarlas con ácido tricloroacético (TCA) al 10% seguido de una centrifugación a 10,000 rpm. La lactosa se determinó en el sobrenadante.

La curva patrón se realizó suponiendo una concentración de lactosa aproximadamente igual a la de la leche entera, y con base en el límite de detección del método (2 mg de lactosa/ml) se decidió diluir a la leche 1:2

La ecuación de la curva para el método fue:

$$L \text{ (mg/ml)} = (\text{Abs}_{\lambda,540} + 0.0537)/0.0076$$

$$R = 0.9983$$

3.4.2 Determinación de la proteína presente en las muestras

Se utilizó la técnica de Lowry, según Jiménez-Guzmán y col (2002):

La concentración de proteína se calculó comparando las absorbancias contra una curva patrón de seroalbúmina (SA) con un rango de 0 a 500 $\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{ml}$.

$$P \text{ (}\mu\text{g/ml)} = (\text{Abs}_{\lambda,590} - 0.1209)/0.0156$$

$$R = 0.9931$$

3.4.3 Determinación de grupos sulfhidrilo

Para la determinación de grupos sulfhidrilo se utilizó la reacción de Ellman de acuerdo con Habeeb (1972), y se midió el nitrobenzoato (TNB⁻) liberado por la reacción del grupo tiol con el ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzónico) (DTNB o reactivo de Ellman, Sigma) a pH alcalino (8.0).

La concentración de grupos sulfhidrilo se calculó a partir del coeficiente de extinción molar del ión liberado ($\xi_{\text{TNB}^-} = 14,150 \text{ l/M cm}$) utilizando la ecuación de la ley de Lambert-Beer:

$$A = \xi bc$$

3.4.4 Evaluación del grado de desnaturalización de las proteínas del suero por efecto del tratamiento térmico

La evaluación se hizo midiendo el cambio del coeficiente de migración (Rf) en una electroforésis no desnaturalizante. Se ha comprobado que por este método se pueden ver cambios hasta de un solo grupo, al comparar los coeficientes de migración (Rf) obtenidos para cada banda (Goldenberg, 1990). Debido a que en el suero se encuentran presentes proteínas de muy distintos pesos moleculares, se llevaron a cabo electroforésis en geles que contenían una "T" o porcentaje

de acrilamida y bisacrilamida (ambas de Bio Rad, México) diferentes: T= 15, 12.5, 10, 7 y 5% y una “c” o relación de bisacrilamida/acrilamida de 5 % en el gel de separación y de 25% para el gel de concentración. En el gel de concentración se utilizó una T=3.125% para todos los casos.

La polimerización de ambos geles se llevó a cabo con persulfato de amonio (Bio Rad) y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina, Sigma Chemical Co., St Louis MO, EUA). Para el persulfato se utilizó una solución al 10% p/v. Se agregaron 50 µl de esta solución por cada 10 ml de gel. El TEMED se agregó en una concentración de 0.1 ml por 100 ml de gel.

No se agregó dodecil sulfato de sodio a los geles por ser no-desnaturalizantes. Las muestras se agregaron diluidas en proporciones de 2 a 1 con una solución de glicerol al 25% (J.T. Baker, Xalostoc, México) con azul de bromofenol al 0.1% (Bio Rad, México).

La fijación y tinción se llevó a cabo con una solución de azul de Coomassie (Bio Rad, México) en una mezcla de agua-metanol-ac. acético al 50-40-10 % v/v durante 30 min (ambos reactivos de J.T. Baker, Xalostoc, México).

Para desteñir los geles se utilizó la misma mezcla de agua-metanol-ac. acético pero sin azul de Coomassie.

3.4.4.1 Corrida de las muestras

Las muestras se corrieron manteniendo el voltaje constante a 200 v hasta que el frente recorrió todo el gel de separación.

Junto con las muestras se corrieron dos soluciones patrón de proteína de pesos moleculares conocidos:

Patrón 1 (Sigma):	PM (kDa)
Miosina (músculo de conejo)	205.0
β-galactosidasa (<i>E. coli</i>)	116.0
Fosforilasa (músculo de conejo)	97.4
Albúmina bovina	62.50
Albúmina de huevo	45.0
Anhidrasa carbónica (eritrocitos)	29.0

Patrón 2 (Sigma):	PM (kDa)
Miosina (músculo de conejo)	205.0
β -galactosidasa (<i>E. coli</i>)	116.0
Fosforilasa (músculo de conejo)	97.4
Albúmina bovina	62.5
Albúmina de huevo	45.0
Anhidrasa carbónica (eritrocitos)	29.0
Inhibidor de Tripsina	21.5
Lisozima	14.4
Aprotinina	6.5

3.4.5 Estudio de las interacciones entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa

Para evaluar si existe algún tipo de interacción entre la β -lactoglobulina (β -lg) y la enzima se utilizó cromatografía de afinidad.

Se utilizó como soporte una resina cargada “Eupergit®” (Pharmacia Biotech) y como ligando β -lg (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo, EUA) o bien β -lactoglobulina lactosilada (β -lg_{lac}) (obtenida en el laboratorio a partir de la lactosilación de la β -lg). Como mezcla problema de proteínas se utilizó Maxilact LX 5000 (Gist-Brocades) el cual contiene 8 proteínas, de las cuales solamente 3 presentan actividad de lactasa y las 5 restantes se consideran impurezas.

3.4.5.1 Inmovilización con Eupergit

Se trabajó a 2 pH's: 4.6 y 7.0, a los cuales se sabe que la β -lg es soluble. El pH 4.6 se trabajó con una solución amortiguadora de acetatos 1M; y el pH 7.0 se trabajó con una solución amortiguadora de fosfatos 1M.

La carga total del ligando (β -lg o β -lg_{lac}) se calculó en 20 mg_{proteína}/g_{Eupergit} y se agregó diluída en 10 mL de solución amortiguadora (pH 4.6 ó 7.0) a una concentración de 2 mg/mL.

La inmovilización de la proteína en la resina se llevó a cabo durante 26 h a temperatura ambiente, después de las cuales la resina se filtró y se lavó 2 veces con agua destilada, 1 vez con NaCl 1M y finalmente 1 vez con solución amortiguadora del pH correspondiente.

Se determinó la concentración de proteína en el filtrado para calcular la eficiencia de la inmovilización.

3.4.5.2 Bloqueo de los grupos NH₃ libres del Eupergit

Una vez que la proteína fue inmovilizada, se bloquearon los grupos amino que pudieran haber quedado reactivos para evitar que al poner la resina en contacto con la mezcla de proteínas, éstas se pegaran a la resina en lugar de interactuar con el ligando.

El bloqueo se llevó a cabo con glicina (Bio Rad, México) en una proporción de 0.3 g_{glicina}/g_{Eupergit}. Se calculó el volumen necesario para llegar a la cantidad de glicina requerida con una solución 0.05M en solución amortiguadora al pH correspondiente.

Se preparó un control con resina sin proteína inmovilizada al cual se le bloquearon los grupos reactivos con glicina.

Las pruebas de afinidad se llevaron a cabo poniendo 0.1 g de Eupergit con diferentes ligandos en 1 ml de soluciones con diferentes concentraciones de Maxilact LX 5000, las cuales se calcularon en relación molar con la proteína que había sido inmovilizada. Los viales con la mezcla de Eupergit y solución problema se incubaron a temperatura ambiente con agitación constante de 250 rpm durante 30 minutos, después de los cuales se centrifugaron para separar la resina del sobrenadante.

Para comprobar si se presentaban cambios en la solución problema después de interactuar con el Eupergit se determinó el contenido de proteína y la actividad de lactasa en los sobrenadantes (según las técnicas 3.4.2 y 3.3.3). Además se hizo electroforesis no desnaturalizante (según la técnica 3.4.4) para comprobar si todas las proteínas que se encontraban en la solución original permanecían en el sobrenadante.

Para calcular la actividad específica del sobrenadante, una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar una μmol de ONPG en un segundo a 37 °C y pH 7.0.

3.4.6 Equipos utilizados

En todos los análisis, la centrífuga utilizada fue una Beckman modelo J2-MI, y se leyeron las absorbancias de las diferentes pruebas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A. En todas las electroforésis se utilizó una cámara de electroforésis mini-Protean II con una fuente de poder Power/Pac 300 de Bio Rad. Para el análisis de los geles se utilizó un equipo Gel Doc de Bio Rad, con interface a una computadora Pentium con el programa Molecular Analyst.

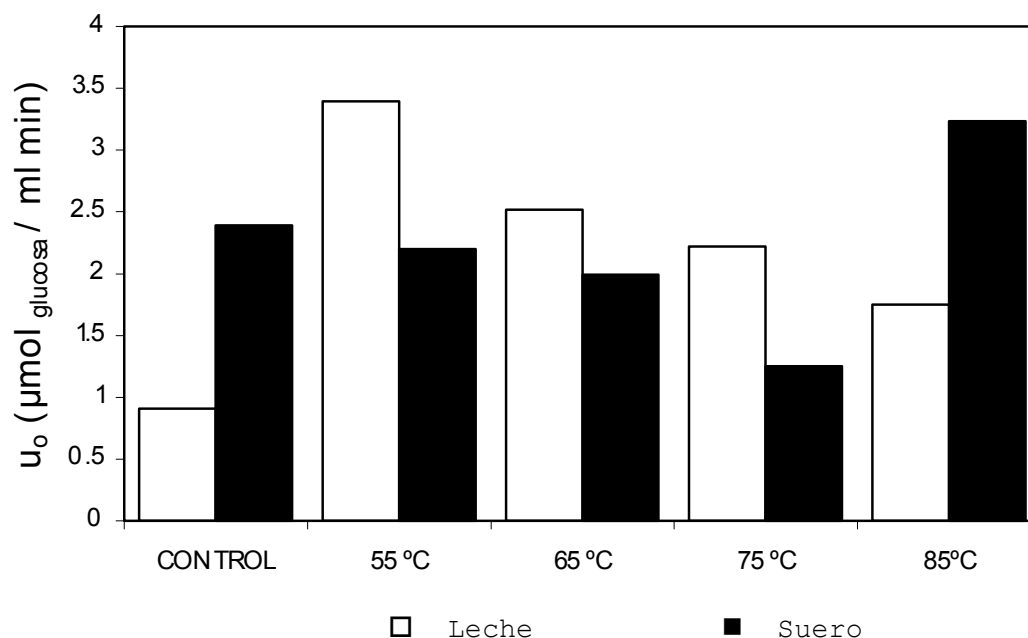
4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Efecto del tratamiento térmico de leche y suero

Cuando la leche se calentó se observó un incremento significativo de la actividad de la β -galactosidasa con relación al control (Figura 1). La tasa de hidrólisis observada cuando la leche se calentó a 55°C fue 3 veces mayor que el control ($\alpha=0.0001$). En la leche tratada a temperaturas más altas (65 – 85 °C), la tasa de actividad fue también más alta que en el control ($\alpha=0.0001$), sin embargo, después del máximo observado a 55°C, tendió a disminuir a medida que la temperatura aumentaba. La leche está compuesta por una gran variedad de proteínas y minerales, que son sensibles al tratamiento térmico y podrían afectar a la actividad de la enzima. Con el fin de estudiar un sistema un poco más simple, el resto del trabajo se llevó a cabo en suero de leche.

Cuando el suero se trató a las mismas temperaturas (Figura 1), la actividad de la lactasa disminuyó conforme la temperatura aumentó hasta 75 °C, pero a 85°C se observó un aumento significativo en la actividad, que fue 35.4 % más alta que en el control ($\alpha=0.0503$).

Figura1. Efecto del tratamiento térmico de la leche o suero sobre la actividad de la β -galactosidasa



4.1.1 Efecto del calentamiento en la desnaturalización de las proteínas del suero y su relación con la actividad de la lactasa

El cambio en la actividad de la enzima en suero podría deberse a los cambios conformacionales que sufren las proteínas durante el calentamiento. En vista de esto, se estudiaron los cambios conformacionales de las proteínas y se correlacionaron con la actividad observada previamente en el suero.

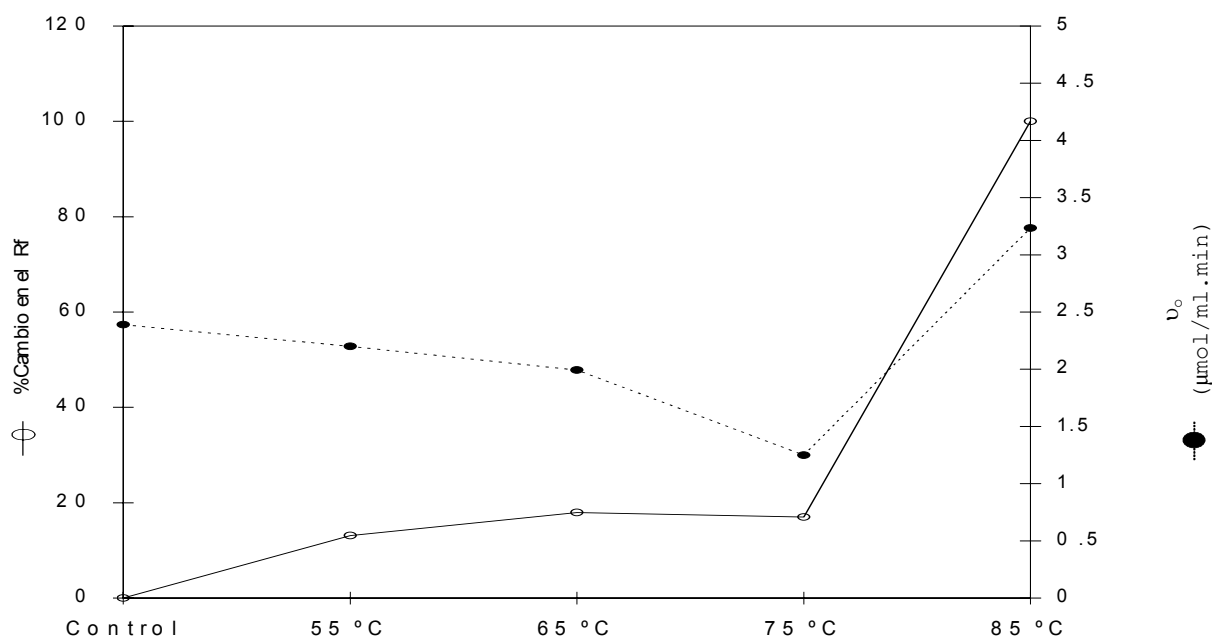
La electroforesis nativa, o no-desnaturalizante, es una herramienta muy útil para determinar si ha habido cambios conformacionales en las proteínas; en algunos casos es posible incluso detectar diferencias hasta en uno o dos aminoácidos (Goldenberg, 1990). En este trabajo este tipo de electroforesis se utilizó como una primera aproximación para determinar si a las temperaturas usadas se producen cambios conformacionales en las proteínas del suero y de esta manera poder correlacionarlos con la actividad de la enzima.

El coeficiente de migración (R_f) de algunas proteínas cambió significativamente conforme la temperatura de calentamiento aumentaba, particularmente el de la β -lactoglobulina (β -lg) (Figura 2), que ha sido reportada como la proteína más termolábil del suero (Fox y Mc Sweeney, 1998), demostrando que esta proteína sufre al menos una desnaturalización parcial.

Se ha reportado que la primera etapa de desnaturalización de las proteínas del suero comienza a temperaturas entre 61 y 67 °C, y que el grado de desnaturalización es directamente proporcional al incremento de la temperatura (Parris y col., 1991). El cambio en la actividad enzimática observado en el suero calentado (Figura 1) muestra un patrón similar al reportado por Parnell-Clunies y col. (1988) y Parris y col. (1991) para la desnaturalización de las proteínas del suero, sugiriendo que existe una relación entre la desnaturalización de las proteínas y la actividad de la enzima.

Por otro lado, al comparar los cambios en el R_f de la β -lg con la actividad obtenida en el suero, se observa una clara correlación ($r = 0.79$) entre los dos (Figura 2), lo que sugiere que la desnaturalización de las proteínas podría tener un efecto en la actividad enzimática. Este efecto es particularmente visible a 85°C, temperatura a la cual la β -lg está completamente desnaturalizada.

Figura 2. Efecto del tratamiento térmico del suero sobre el cambio en el Rf de la β -lg y su relación con la actividad de la β -galactosidasa



Dado que los resultados anteriores sugieren que los cambios conformacionales de las proteínas del suero podrían estar relacionados con el cambio en la actividad, se llevaron a cabo experimentos calentando soluciones puras de las proteínas más abundantes del suero (α -lactalbúmina (α -la), β -lactoglobulina (β -lg) y seroalbúmina (SA)) a las mismas temperaturas que la leche y el suero. Se siguieron los cambios en sus espectros de absorción UV (Figuras 3, 4 y 5a y b) para determinar si el calentamiento provocaba cambios conformacionales en ellas.

Solamente el espectro de absorción de la β -lg cambió significativamente con el calentamiento aplicado (Figura 5a y b); más aún, el mayor cambio se observó a una longitud de onda (λ) de 252 nm, que corresponde a la longitud a la que absorben los grupos sulfhidrilo (-SH) (Figura 5 a). Estos resultados sugieren que los cambios conformacionales de la β -lactoglobulina resultan en la exposición y/o liberación de grupos -SH, coincidiendo con resultados reportados previamente por varios autores para las primeras etapas del calentamiento de la β -lg (Parnell-Clunies y col., 1988; Taylor y Richardson, 1980; Prabakaran y Damodaran, 1997; Iametti y col, 1995 y 1996).

De acuerdo con los espectros de absorción mostrados en la figura 5b, la mayor desnaturalización de la β -lactoglobulina ocurre a 85°C, temperatura a la que se observó la mayor activación de la lactasa en el suero (Figura 1).

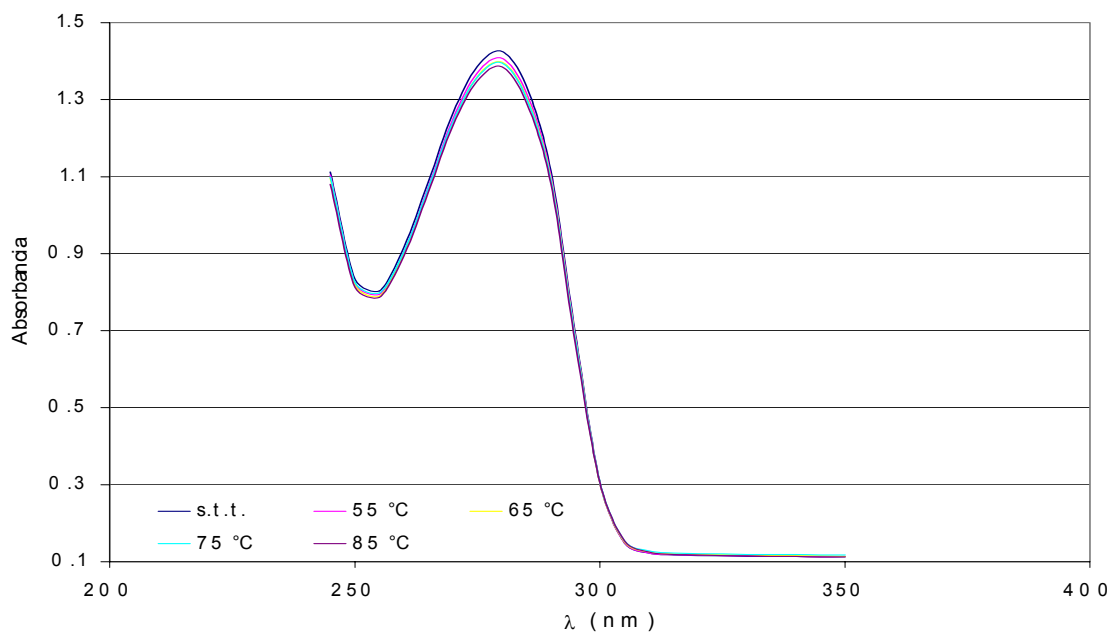
Figura 3. Espectro de absorción de la α -lactoalbúmina con diferentes tratamientos térmicos

Figura 4. Espectro de absorción de la seroalbúmina con diferentes tratamientos térmicos

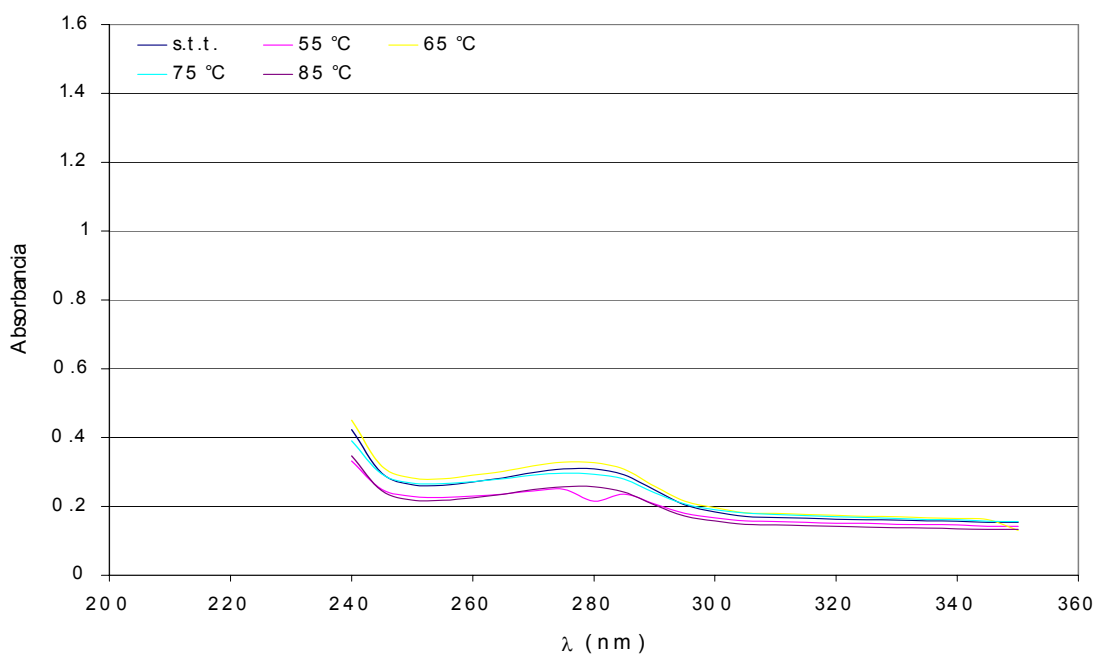
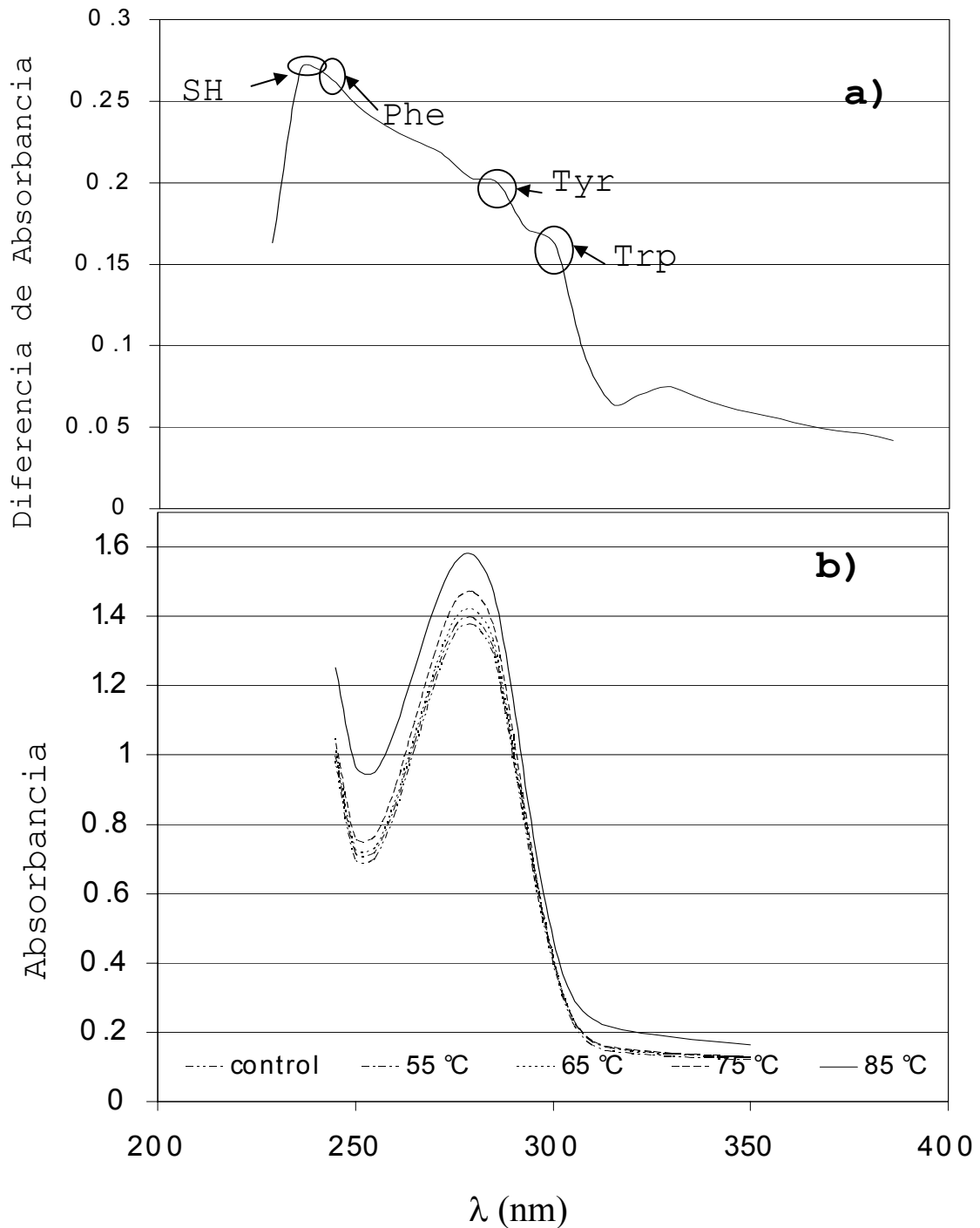


Figura 5. Efecto del tratamiento térmico sobre los cambios conformacionales de la β -lactoglobulina. a) Espectro diferencial de β -lg calentada a 85°C contra β -lg sin calentar. b) Espectro de absorción de β -lg con diferentes tratamientos térmicos

Al analizar los espectros de absorción obtenidos se observa que la β -lg es la proteína que



sufre mayores cambios a las temperaturas usadas en los experimentos. Como se mencionó antes,

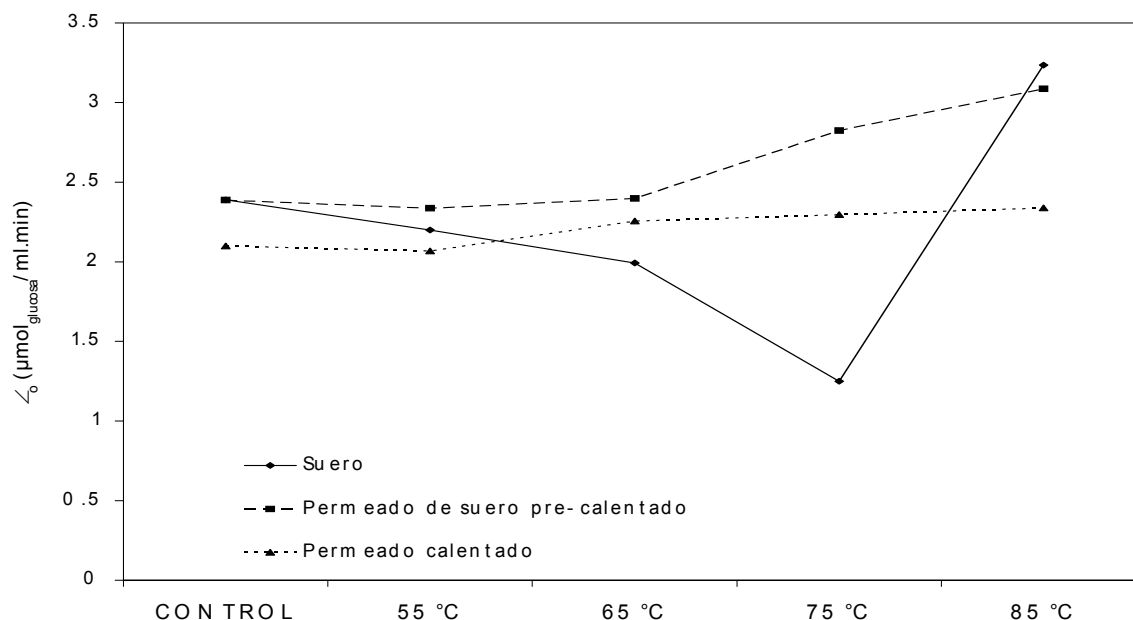
el grado de desnaturalización de la β -lg se relacionó con el cambio en su Rf y se comparó con el cambio en la actividad enzimática (Figura 2) obteniéndose una buena correlación ($R = 0.79$). Estos resultados, sugieren que la desnaturalización y/o precipitación de algunas proteínas del suero (por lo menos la β -lg) pueden estar relacionadas con el efecto observado en la actividad de la lactasa.

Con el fin de determinar si el efecto activador se debe a cambios en la estructura de la proteína, o bien a la liberación de compuestos de bajo peso molecular, se ultrafiltró el suero y se midió la actividad en el permeado obtenido.

El permeado de suero ultrafiltrado no contiene proteína pero sí todos los demás sólidos solubles (SS) del suero; razón por la cual si el efecto activador se debiera a un cambio en el sistema proteico, al eliminar la proteína dicho efecto desaparecería. Otra teoría que ha sido propuesta, pero no demostrada, para explicar este efecto es la presencia de un inhibidor de naturaleza no proteica, cuya destrucción aumenta la actividad de la enzima; si tal fuera el caso, dicho inhibidor migraría al permeado, y el efecto de su destrucción sería observable conforme el permeado se calienta. Considerando estas dos posibilidades, se plantearon dos experimentos: uno en el que el suero se ultrafiltró y después se calentó el permeado, (calentamiento en ausencia de proteínas) que en adelante se denominará “permeado de suero” (PS); y otro en el que se calentó el suero y después se ultrafiltró (calentamiento en presencia de proteínas), que en adelante se denominará “permeado de suero pre-calentado” (PSP). En ambos casos, la actividad de la enzima se determinó a 37 °C.

Cuando el PS se calentó después de ultrafiltrarlo no se observaron cambios significativos en la actividad (Figura 6). Por otro lado, cuando el suero se calentó antes de ultrafiltrarlo (PSP), la actividad de la enzima en el PSP aumentó conforme aumentaba la temperatura, alcanzándose a 55 y 85 °C valores exactamente iguales a los obtenidos en el suero calentado a la misma temperatura; sin embargo, al comparar la actividad obtenida en el PSP y el suero calentados a 65 y 75°C se observó que mientras que en el suero la tendencia de la actividad es a disminuir entre 55 y 75 °C, en el PSP ésta tiende a aumentar de manera proporcional a la temperatura usada (Figura 6).

Figura 6. Actividad (v_0) de lactasa en suero, permeado de suero pre-calentado y permeado de suero calentado después de ultrafiltrar



Estos resultados muestran que la probabilidad de que el efecto se deba a un inhibidor termolábil es muy baja, pues si éste hubiera existido, habría migrado al PS y habría sido destruido cuando el permeado se calentó, causando un aumento en la actividad de la enzima conforme el inhibidor se destruyera, lo cual no se observó. Por otro lado, cuando el suero se calentó antes de ultrafiltrar (PSP), la actividad aumentó, demostrando que el efecto activador se debe a algún compuesto de bajo peso molecular que se forma durante el calentamiento de las proteínas y que se libera al medio.

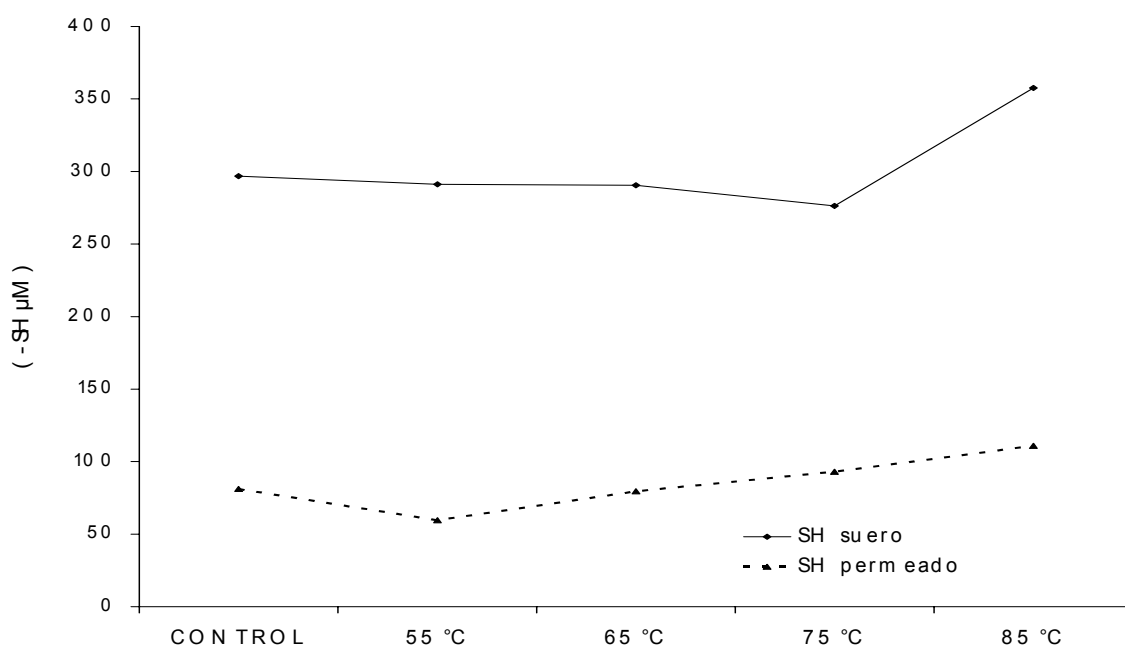
4.1.2 Efecto de los grupos sulfhidrilo (SH) reactivos en la actividad de lactasa

Se ha reportado que una consecuencia del calentamiento de la leche es la formación de compuestos azufrados de bajo peso molecular tales como H_2S o $\text{H}_3\text{C-S-CH}_3$; dicho fenómeno se ha reportado aún a temperaturas por debajo del punto de desnaturalización de las proteínas del suero si el tiempo de retención es suficientemente largo (Lewis, 1994; Ihmhof y Bosset, 1994; Contarini y col., 1997) tal como se llevó a cabo en este trabajo. Estos compuestos se producen a partir de las proteínas del suero total o parcialmente desnaturalizadas por el tratamiento térmico (Lewis, 1994; Fox y Mc Sweeney, 1998). Tales compuestos podrían cruzar la membrana de

ultrafiltración y aparecer en el permeado. En trabajos previos en el laboratorio se ha observado que los grupos SH reactivos aumentan la actividad de lactasa en solución amortiguadora (Jiménez-Guzmán, 1996).

Considerando que el espectro de absorción de la β -lactoglobulina mostró un aumento en la absorbancia a $\lambda=252$ nm (Figura 5a), longitud a la que absorben los sulfhidrilos, además del hecho de que la β -lg es la proteína que aporta el 90% de los sulfhidrilos reactivos en la leche, se determinó la concentración de -SH en las muestras de suero y permeado de suero precalentado (Figura 7).

Figura 7. Efecto del tratamiento térmico del suero sobre la concentración de -SH reactivos en suero y permeado de suero



En el suero calentado entre 55 y 75 °C, los grupos SH reactivos disminuyeron ligeramente, pero cuando el suero se calentó a 85 °C su concentración aumentó significativamente ($\alpha = 0.0013$); estos cambios podrían deberse a los reajustes que sufre la β -lg conforme se calienta.

La desnaturalización de las proteínas del suero por calentamiento es un proceso complejo. Dagleish (1990) e Iametti y col. (1996) reportaron que dependiendo de la temperatura se forman agregados entre las proteínas del suero, consigo mismas o bien con otras proteínas, unidos a

través de enlaces de disulfuro (S-S). Reportes recientes establecen que la formación de este tipo de enlaces, particularmente con la β -lactoglobulina, puede darse aún a temperatura ambiente, pero la intensidad de la reacción aumenta con el incremento de la temperatura (Apenten y Galani, 2000). Esta interacción podría explicar la disminución de los grupos -SH cuando el suero se calienta a las temperaturas más bajas (Figura 7); mientras que a la temperatura más alta (85 °C) la β -lg está completamente desnaturalizada, lo cual conlleva un aumento en los grupos -SH reactivos, posiblemente debido a su liberación en forma de moléculas pequeñas como el H_2S y el CH_3-S-CH_3 (Carbonaro y col., 1997; Patrick and Swaisgood, 1976; Lewis, 1994; Fox and Mc Sweeney, 1998; Ihmhof y Bosset, 1994; Contarini y col., 1997). Estos compuestos de bajo peso molecular son capaces de migrar a través de la membrana de ultrafiltración, y es posible determinarlos en el permeado de suero precalentado (Figura 7). La concentración de SH en el PSP es más baja que en el suero, debido a que en el suero se determinan tanto los SH que se encuentran ligados a las proteínas como los que están en forma de compuestos de bajo peso molecular, mientras que en el permeado se determinan solamente los que se liberaron como compuestos de bajo peso molecular.

Al comparar la actividad de la enzima con la concentración de SH, se observó que el cambio en la tasa de hidrólisis de la β -galactosidasa tanto en el suero (Figura 8), como en el PSP (Figura 9) está claramente correlacionado con la concentración de los SH, presentando un coeficiente de correlación de 0.92 y 0.86 respectivamente. Esto sugiere que existe un efecto de la exposición y/o liberación de los grupos SH de las proteínas del suero sobre la actividad de la enzima.

Figura 8. Relación entre la actividad de la β -galactosidasa y los sulfhidrilos presentes en el suero como consecuencia del calentamiento.

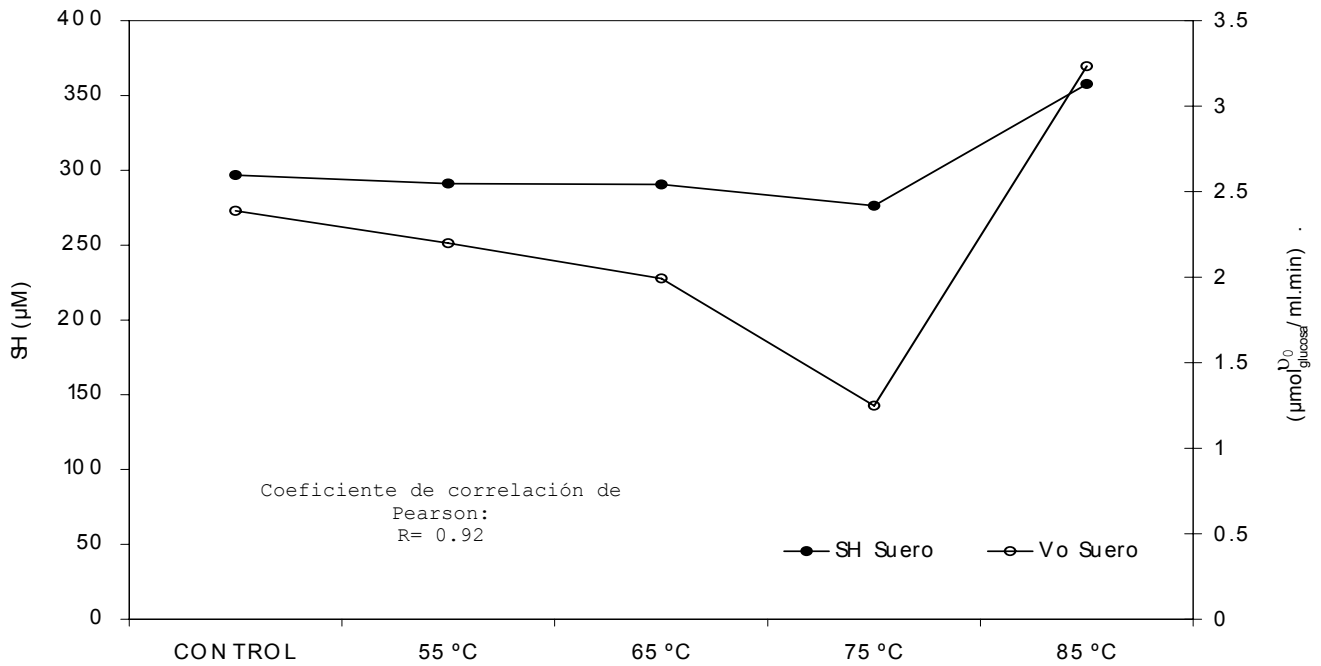
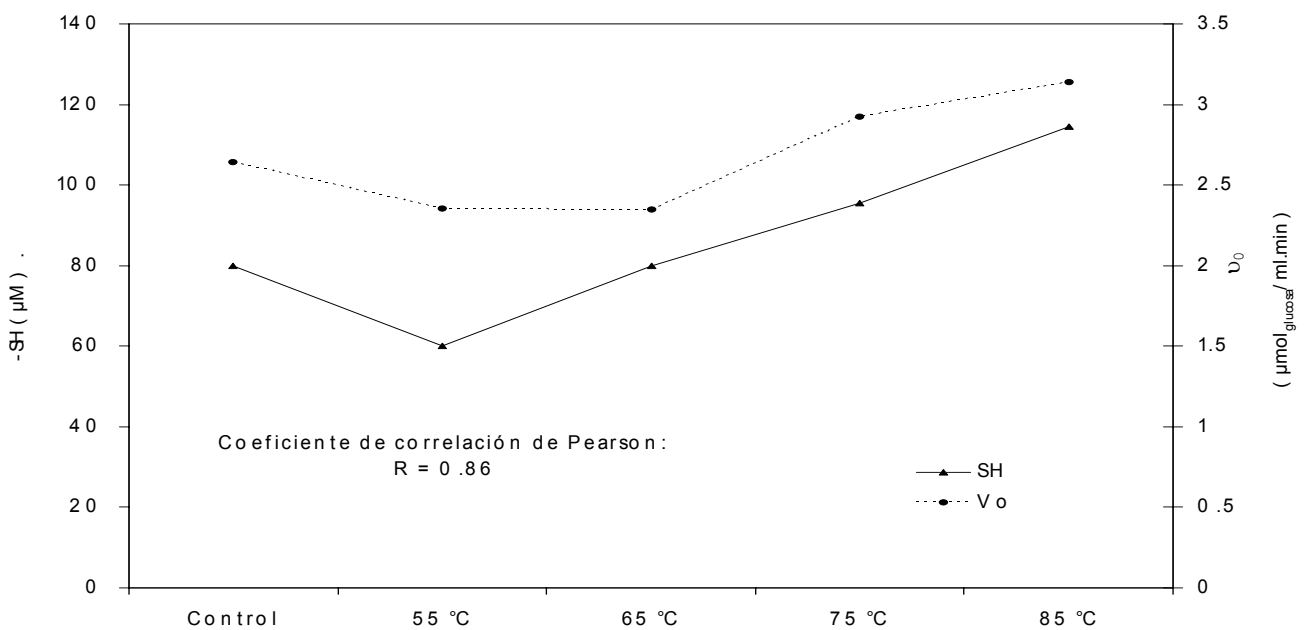


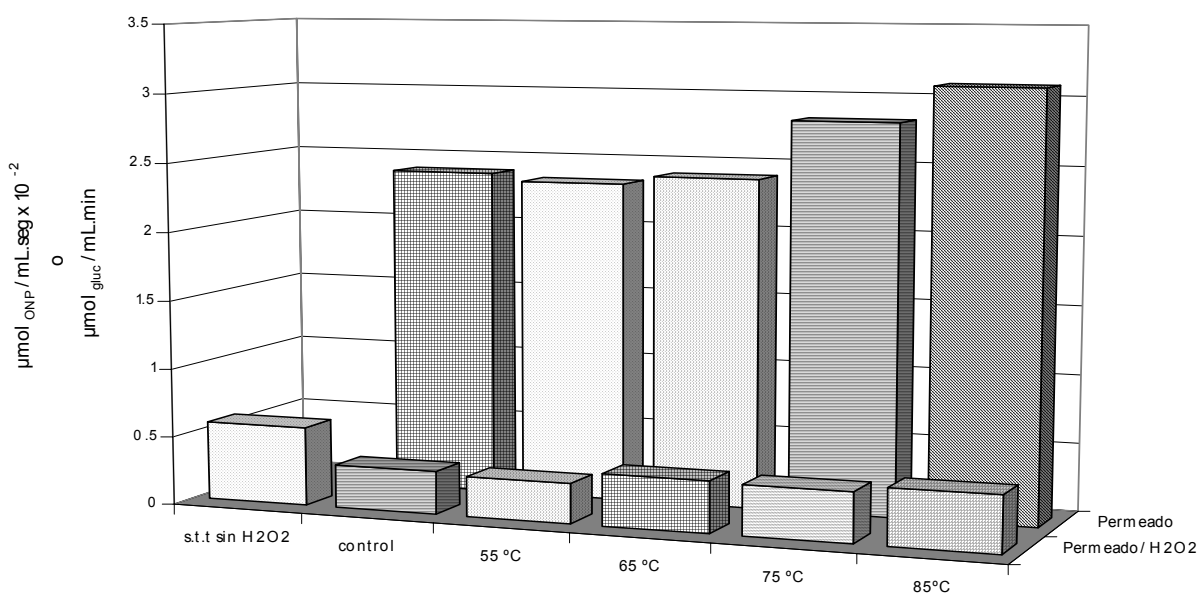
Figura 9. Relación entre la actividad de la β -galactosidasa y los sulfhidrilos presentes en el permeado de suero como consecuencia del calentamiento.



Al analizar la actividad obtenida en el suero y PSP (Figuras 6, 8 y 9) se observó que en cada caso hay una alta correlación entre los SH y la actividad. Sin embargo, dado que el comportamiento de los SH es diferente en cada sustrato, la actividad también lo es: mientras que en el suero la actividad tiende a disminuir entre 55 y 75 °C para finalmente aumentar a 85 °C, en el PSP tiende a subir desde 55 hasta 85 °C. No obstante, los valores (excepto a 75 °C) no difieren significativamente entre un sustrato y otro ($\alpha_{\text{controles}}=1$; $\alpha_{55^\circ}=0.9993$; $\alpha_{65^\circ}=0.5932$; $\alpha_{75^\circ}=0.00018$; $\alpha_{85^\circ}=0.9999$) sugiriendo que son los SH liberados al medio, y no los que están ligados a las proteínas los que son responsables del cambio en la actividad de la enzima.

Cuando los SH del permeado se oxidaron con H_2O_2 , el efecto activador desapareció, demostrando que participan en la activación de la enzima (Figura 10). Estos resultados, aunados al hecho de que el calentamiento del permeado en ausencia de proteína no afectó a la actividad enzimática, pero en presencia de proteína sí (Figura 6), demuestran que el efecto en la enzima no se debe a la destrucción de un inhibidor termolábil, sino a la liberación de SH por la desnaturalización de las proteínas.

Figura 10. Efecto de la oxidación de los SH del permeado de suero sobre la actividad de la β -galactosidasa.



4.1.2.1 Relación entre los grupos sulfhidrilo y la actividad de lactasa en leche.

Los niveles de enzima utilizados para determinar la actividad en leche y suero fueron exactamente los mismos, sin embargo, debido a las diferencias entre ambos sistemas, e independientemente de que sean calentados o no, la actividad de la enzima mostró diferencias importantes. Esto se debe a que la reactividad de los grupos SH y el potencial redox resultante, son distintos en leche y suero.

Mientras que en la leche cruda la concentración de sulfhidrilos reactivos es muy baja o completamente nula (Taylor y Richardson, 1980) debido a las asociaciones que se forman a través del intercambio de disulfuros entre las proteínas del suero con las caseínas o consigo mismas (Patrick y Swaisgood, 1976; Taylor y Richardson, 1980), en el suero, las proteínas pueden encontrarse como monómeros, los cuales exponen sus grupos SH reactivos con mayor facilidad; se ha sugerido que este comportamiento podría estar en función del pH, pues en el suero es mucho más bajo que en la leche (Apenten y Galani, 1999; 2000).

El calentamiento de la leche aumenta su actividad antioxidante, con la correspondiente disminución en el potencial redox (Taylor y Richardson, 1980). Esto por sí mismo podría aumentar la actividad de la lactasa: se ha reportado que la lactasa de *K. lactis* tiene un SH en su sitio activo, el cual podría participar en la reacción ligando la lactosa a la enzima para su hidrólisis (Whitaker, 1994). De esta forma, un ambiente reductor podría aumentar la reactividad de los SH y por lo tanto ayudar a aumentar la actividad de la lactasa; sin embargo, si ésta fuera la única causa del efecto observado en la leche, la actividad tendería a aumentar constantemente con el aumento de la temperatura en lugar de disminuir a temperaturas arriba de 65 °C (Figura 1).

El hecho de que se presente un máximo de actividad cuando la leche se precalienta entre 55 y 65 °C (Figura 1), puede explicarse por el aumento en la exposición de grupos sulfhidrilo de las proteínas de la leche, que ha sido reportado en diversas ocasiones (Carbonaro y col., 1996 y 1997; Lewis, 1994; Elfgam y Weelock, 1978; Iametti y col., 1996; Parnell-Clunies y col., 1988; Shimada y Cheftel, 1989; Apenten y Galani, 1999; Apenten y Galani 2000).

El cambio en el potencial redox provoca un aumento en la reactividad de los sulfhidrilos de la κ -caseína, α_{S2} -caseína, y β -lactoglobulina (Taylor y Richardson, 1980; Apenten y Galani, 1999), que han sido reportados como “de baja reactividad” en la leche cruda. Algunos autores han demostrado que con tratamientos térmicos bajos, la reactividad de los grupos sulfhidrilo

aumenta, pero al calentar la leche a temperaturas mayores que la de desnaturalización de las proteínas del suero (alrededor de 61 °C) la concentración de SH disminuye debido a reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro entre las diferentes proteínas (Parnell-Clunies y col., 1988; Patrick y Swaisgood, 1976). Haque y col. (1987) y Haque y Kinsella (1988) reportaron que el tratamiento térmico de la leche a altas temperaturas induce una reacción entre los SH reactivos de la β -lactoglobulina y la κ -caseína, resultando en cambios en la concentración de grupos SH reactivos en la leche. Dalgleish (1990) reportó además que debido al calentamiento se forman agregados entre las micelas de caseína y las proteínas del suero desnaturalizadas: estas proteínas se agregan rápida y eficientemente, ya sea entre sí mismas o bien con la κ -caseína. De acuerdo con este autor, el calentamiento de la leche arriba de 70 °C resulta en una disminución de los grupos SH reactivos debido a las interacciones arriba mencionadas entre las proteínas del suero, y la tasa de agregación es más alta conforme la temperatura aumenta.

El perfil de actividad observado para la lactasa a lo largo de los diferentes tratamientos térmicos de la leche (Figura 1) es muy similar al cambio en la concentración de SH reactivos reportado por Parnell-Clunies y col. (1988). Este autor observó que conforme aumenta la temperatura del tratamiento térmico, los grupos SH primero aumentan hasta 55 °C, para luego disminuir a temperaturas mayores debido a las reacciones de intercambio entre la κ -caseína y la β -lactoglobulina. Esto sugiere que el efecto observado en la actividad de la enzima está relacionado con el cambio en la concentración de grupos SH reactivos de la leche, y en este trabajo fue demostrado también que lo mismo sucede en el caso del suero, aunque en este caso el patrón de liberación de grupos SH es diferente al de la leche debido a que se presentan diferentes interacciones proteína-proteína.

La razón por la que otros autores no encontraron ningún efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de la lactasa se debe posiblemente a las diferentes técnicas utilizadas en el ensayo de determinación de actividad. Kosikowski y Wiezbicki (1973) midieron la hidrólisis de la lactosa después de 48 horas de incubación con la enzima, pero no reportan velocidades iniciales de reacción. Mahoney y Adamchuck (1980) y Greenberg y col. (1985), no encontraron ningún efecto en leche calentada a 63 u 85 °C, mientras que en suero encontraron un marcado aumento en la actividad de la lactasa, particularmente a 85 °C. La razón por la que estos autores no encontraron diferencia en la leche no está clara, particularmente cuando tanto en este

trabajo, como en los de Van Dam y col. (1950), Sfortunato y Connors (1958), y Wendorfff y col. (1970; 1971) se ha demostrado que el efecto del tratamiento térmico existe.

4.2 Efecto de las proteínas del suero

Varios reportes establecen que la presencia de algunas proteínas en el medio de reacción puede afectar a la actividad de la lactasa, aunque todavía existe mucha polémica respecto a cómo o por qué se afecta la actividad de la enzima (Reed, 1966; Wendorfff y col, 1970; Greenberg y Mahoney, 1983; Chen y Tsen, 1991).

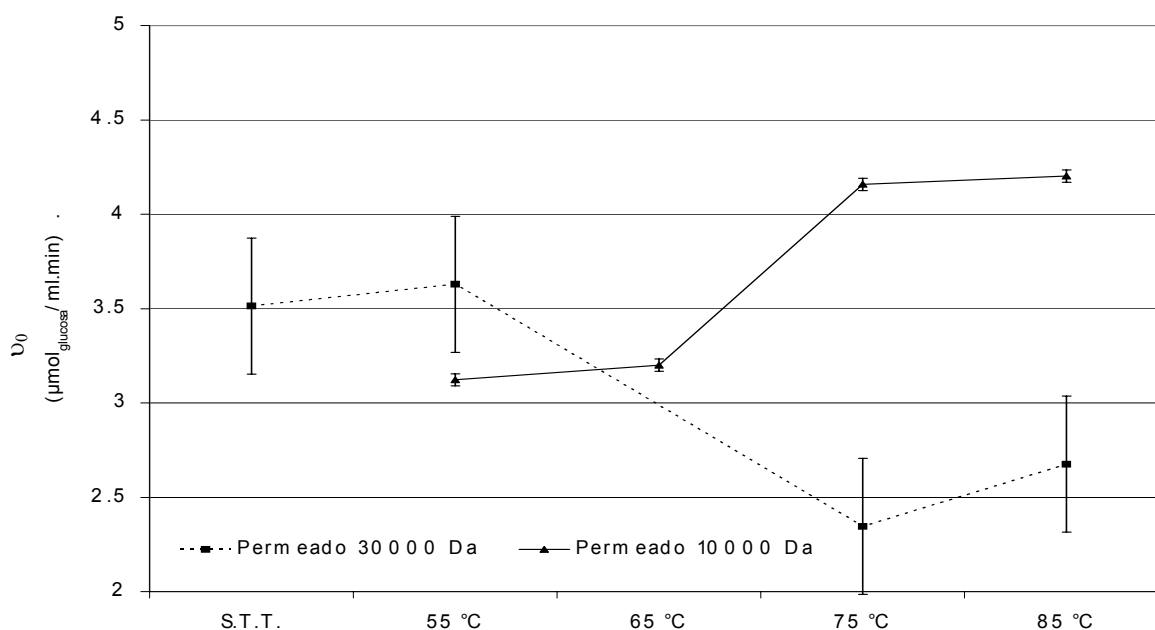
En las primeras etapas de este trabajo se estableció que el calentamiento del suero afecta la actividad de la lactasa de *K. lactis*. Al medir la concentración de grupos sulfhidrilo reactivos en el suero y permeado de suero, y compararlos con el patrón de actividad obtenido en dichos substratos, se demostró que el cambio en la actividad está relacionado con la concentración de grupos SH reactivos. Más aún, se observó que cuando el suero se calienta a 85 °C, la actividad en él y en el permeado obtenido a partir de éste no difieren significativamente, demostrando que la activación a esta temperatura se debe a la liberación de compuestos azufrados de bajo peso molecular a partir de las proteínas parcial o totalmente desnaturalizadas.

Por otro lado, al comparar los patrones de actividad obtenidos en el suero y el permeado de suero calentado entre 55 y 75 °C se observa que existen diferencias significativas entre los dos substratos ($\alpha = 0.000215$, Figura 6), sugiriendo que además del efecto activador de los sulfhidrilos (que se expresa claramente a 85°C), se producen efectos adicionales por las proteínas del suero o sus productos de desnaturalización.

Como una primera aproximación para definir cuáles de las proteínas del suero podían tener algún efecto sobre la lactasa se midió su actividad en permeado de suero precalentado a las diferentes temperaturas y ultrafiltrado parcialmente, ya fuera a través de membranas de corte de 30 kDa (que permiten el paso de la β -lg y la α -la al permeado) o bien a través de membranas de corte de 10 kDa (que producen un permeado libre de proteína).

Los resultados demostraron que mientras la α -la y la β -lg permanecen en el permeado, la disminución observada en la actividad entre 55 y 75 °C se mantiene; pero si estas proteínas se retiran (ultrafiltrando a través de membranas de 10 kDa) se elimina el efecto “inhibidor” de la proteína y la actividad aumenta constantemente (Figura 11).

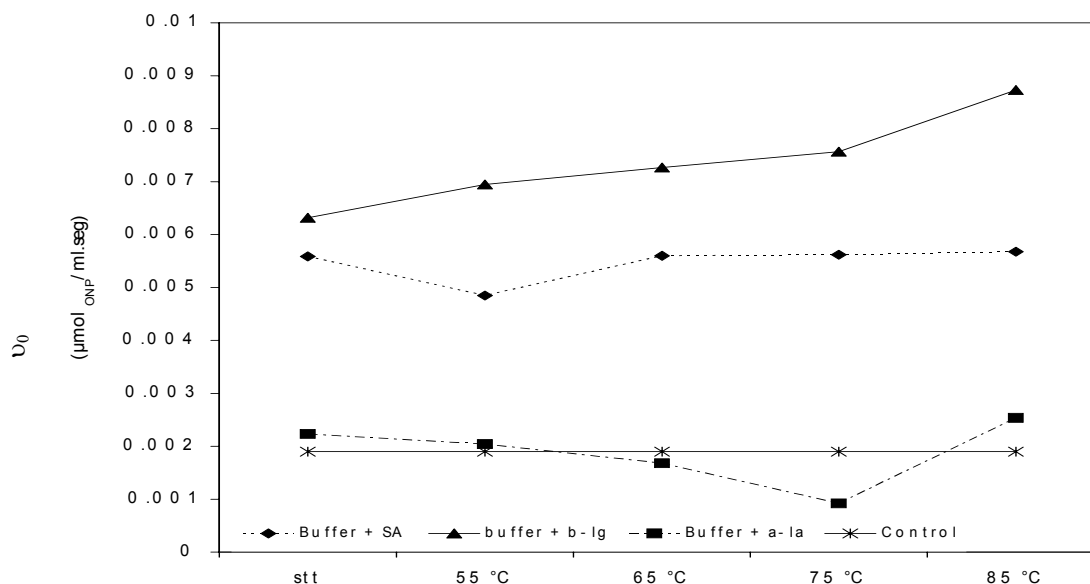
Figura 11. Actividad en permeado de 30 o 10 kDa de suero precalentado.



Dado que los pesos moleculares de la β -lg y la α -la son muy cercanos, no es posible separarlas ultrafiltrando con las membranas utilizadas. En virtud de que los resultados anteriores sugieren que cualquiera de las dos podría estar relacionada con la disminución de la actividad entre 55 y 75 °C, se probó el efecto de calentar soluciones puras (sin lactosa) de las 3 proteínas más abundantes en el suero: β -lactoglobulina, α -lactalbúmina y seroalbúmina para comprobar si su presencia y/o calentamiento tenía algún efecto sobre la actividad de la enzima.

La actividad obtenida en las soluciones de β -lg y SA sin ningún tratamiento térmico es significativamente mayor que la actividad obtenida en solución amortiguadora (Figura 12); sugiriendo que la sola presencia de estas proteínas puede activar a la enzima. Por otro lado, la presencia de α -la en el medio no modifica la actividad de la enzima, como puede observarse en la misma figura.

Figura 12. Efecto del tratamiento térmico de diferentes proteínas del suero sobre la actividad de la β -galactosidasa



En la figura 12 se observa que solo en la β -lg el calentamiento aumentó la actividad. Dado que la β -lg es la proteína que aporta aproximadamente el 90% de los grupos SH de la leche, y habiendo comprobado previamente que la activación de la enzima por el calentamiento del suero está relacionada con la liberación de grupos SH reactivos, es fácil asumir que el efecto del calentamiento de la β -lg se debe a la exposición y/o liberación de compuestos azufrados de bajo peso molecular que activan a la enzima conforme se van produciendo. Sin embargo, esto no explica por qué la sola presencia de seroalbúmina o β -lactoglobulina en el medio de reacción activa a la enzima, ni por qué al calentar la β -lg en ausencia de lactosa no se observa la disminución de actividad a 75 °C, sugiriendo que además del efecto de la liberación de los grupos SH, existe al menos otro efecto de la proteína *per se*.

4.2.1 Efecto del tratamiento térmico de la β -lactoglobulina en presencia de lactosa

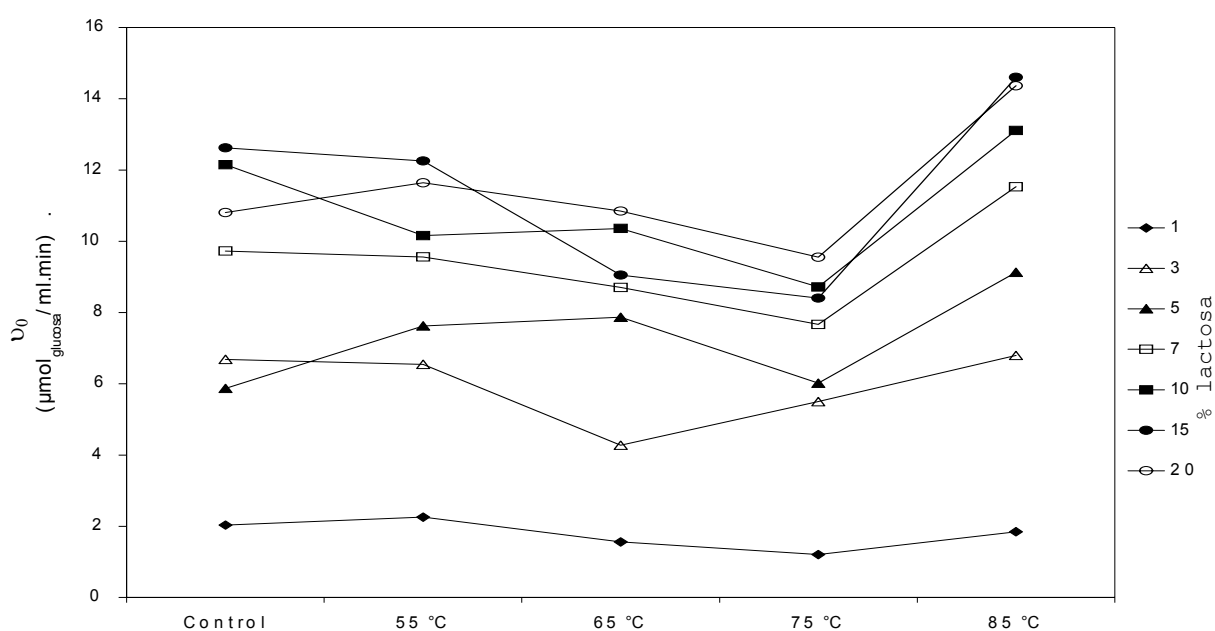
Para simular el calentamiento que se da en el suero, se calentaron soluciones de β -lg con diferentes concentraciones de lactosa y se midió la actividad de lactasa en ellas.

Algunos autores han reportado que la lactosa puede unirse a proteínas del suero, principalmente a la β -lactoglobulina a través de una reacción que es parte de la etapa inicial de

las reacciones de Maillard. Este fenómeno, en el caso de la lactosa se denomina lactosilación y se ha reportado en leche aún a 40 °C, sin embargo su intensidad aumenta en función del tratamiento térmico al que la leche se someta, presentándose un máximo a 75 °C (Léonil y col., 1997). Se ha reportado también que a 85 °C la β -lg precipita, por lo que encontrar el complejo β -lg-lactosa en leches calentadas a estas temperaturas es muy difícil (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998; 1999).

Al calentar la β -lg en presencia de lactosa la actividad disminuyó entre 55 y 75 °C, y después aumentó a 85 °C (Figura 13) tal como había sucedido en el suero; más aún, la disminución de la actividad se vuelve más pronunciada conforme aumenta la concentración de lactosa presente al calentar la proteína (conforme aumenta el grado de lactosilación de la β -lg). Estos resultados podrían explicar el cambio de actividad que se observa en el suero: cuando se calienta el suero entre 55 y 75 °C (β -lg en presencia de lactosa) la β -lg se lactosila y la actividad de la enzima disminuye sugiriendo que la β -lg lactosilada tiene un efecto inhibitorio sobre la β -galactosidasa; cuando a 85 °C la proteína desnaturizada precipita, se expresa el efecto activador de los sulfhidrilos liberados por su desnaturalización y la actividad aumenta significativamente.

Figura 13 Efecto del tratamiento térmico de la β -lg en presencia de diferentes concentraciones de lactosa sobre la actividad de la β -galactosidasa

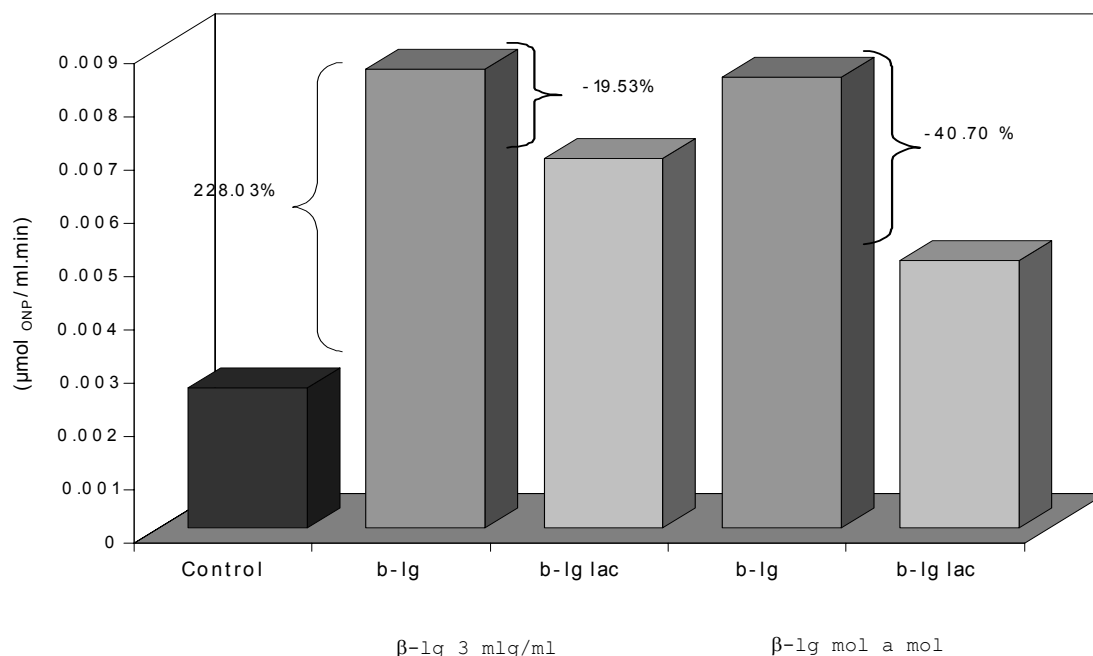


4.2.2 Efecto de la lactosilación de la β -lg sobre la actividad de la lactasa

En experimentos anteriores se comprobó que la sola presencia de la β -lg activa a la enzima; además, se observó que al calentarla en presencia de lactosa se presenta una disminución en la actividad (Figuras 12 y 13) que podría deberse a la lactosilación de la β -lg, que de alguna manera inhibe a la lactasa. Más aún, esta inhibición desaparece al quitar a la β -lg lactosilada del medio de reacción, ya sea por ultrafiltración (Figura 11) o precipitación a 85°C (Figuras 1, 6 y 13).

Para comprobar si la β -lg lactosilada tiene algún efecto sobre la actividad de la lactasa, se lactosiló β -lg pura manteniéndola a 75 °C durante 30 min en una solución amortiguadora de fosfatos que contenía 5 % de lactosa, de acuerdo a como lo habían hecho Léonil y col. (1997) y Morgan y col (1998). Cabe mencionar que en los trabajos reportados por Morgan y col (1998) este tratamiento era el más efectivo para lactosilar a la β -lg, sin embargo en estas condiciones se logra lactosilar como máximo el 35 % de la β -lg presente al momento de calentar. Una vez lactosilada la β -lg, se liofilizó y se usó según conviniera en los experimentos.

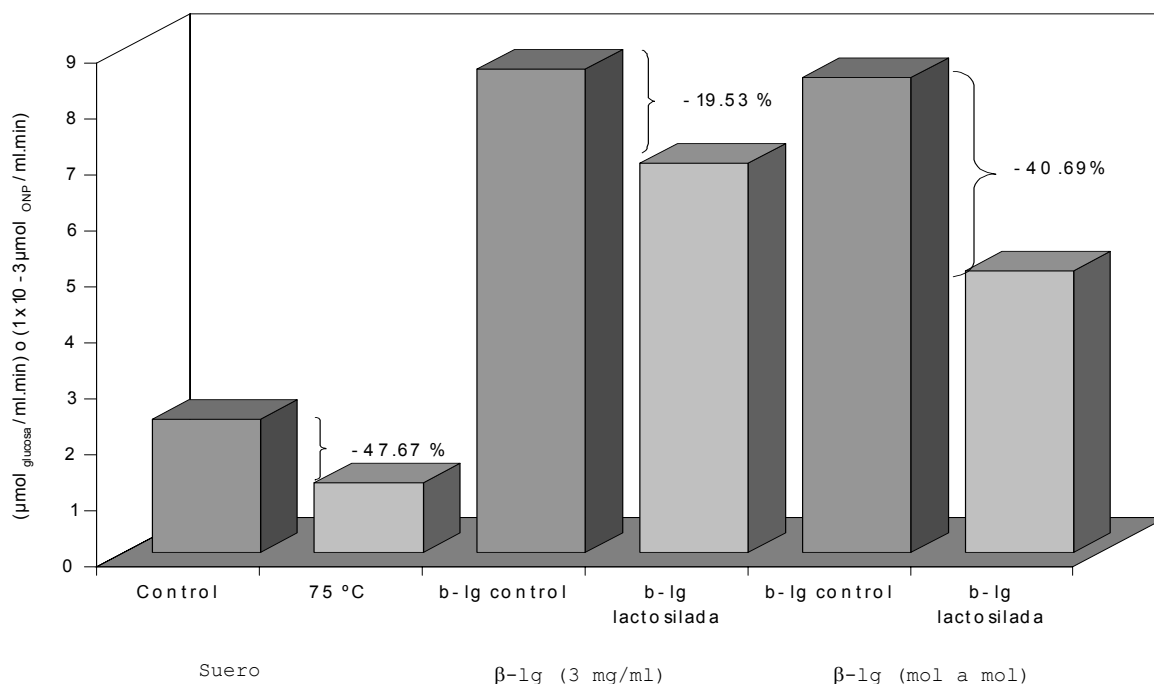
Como una primera forma de aproximación al problema, se prepararon soluciones de β -lg (ya fuera lactosilada o sin lactosilar) en dos concentraciones: a) 3mg/ml, que es la concentración a la cual se encuentra en el suero de leche, y b) mol a mol con respecto a la β -galactosidasa; se determinó la actividad de la enzima en estas soluciones y se comparó con la actividad obtenida en solución amortiguadora sin proteína. Los resultados se muestran en la figura 14.

Figura 14. Efecto de la lactosilación de la β -lactoglobulina sobre la actividad de la lactasa.

Al analizar los resultados (Figura 14) queda de manifiesto el efecto activador de la β -lg *per se*, la cual activa a la enzima hasta en un 230 %. Por otro lado, se observa que cuando la β -lg lactosilada está presente, la actividad es significativamente mayor que en el control, descartando la posibilidad de que su efecto sea inhibitorio. Sin embargo, a pesar de que la lactosilación de la β -lactoglobulina no inhibe a la enzima, sí disminuye su poder activador, puesto que la actividad cuando la proteína está lactosilada es menor que cuando la proteína se encuentra en su forma nativa.

Para comprobar si éste es el efecto que se presenta en el suero se compararon los resultados anteriores con el cambio en la actividad obtenido en suero (Figura 1). Cabe mencionar que en el caso del suero la actividad se midió por aumento en la concentración de glucosa, mientras que en las soluciones de β -lg se midió por aumento de ONP, usando ONPG como sustrato, razón por la cual para determinar qué efecto se está dando sobre la actividad de la enzima, se compararon los perfiles de actividad (% de cambio) a lo largo de las diferentes temperaturas, no los valores en sí.

Figura 15. Comparación de la actividad de β -galactosidasa en soluciones de β -lg, β -lg lactosilada y suero



Al comparar la pérdida de actividad producida en las soluciones de β -lactoglobulina lactosilada con la producida al calentar el suero a 75 °C (Figura 15), se observa que el efecto es muy similar: 40.59 % cuando la β -lg lactosilada se encuentra mol a mol con respecto a la enzima, y 47.87% en el caso del suero. Esto sugiere que la lactosilación de la β -lg podría ser responsable de la disminución de actividad observada cuando el suero se precalienta a 75 °C.

4.2.3 Estudio de la afinidad de la β -lactoglobulina nativa y lactosilada por la β -galactosidasa

Se ha reportado que algunas enzimas se activan cuando se les pega una proteína, modificando de alguna manera su estructura terciaria. Para comprobar si la β -lactoglobulina es capaz de unirse a la lactasa se utilizó la cromatografía de afinidad, (esquema 1) que es una técnica empleada para la purificación de proteínas que tengan alguna afinidad especial por un compuesto (ligando), el cual se inmoviliza en un soporte.

Esquema 1. Cromatografía de afinidad

Cuando una proteína tiene afinidad por otra pueden formar complejos:



Inmovilización del ligando (L)



Adsorción de la sustancia de interés (M).



Desorción de la sustancia (M)



La cromatografía de afinidad se basa en el hecho de que al pasar una mezcla de proteínas a través de un soporte con algún ligando inmovilizado, aquella proteína con afinidad por el ligando se quedará pegada, y las demás (impurezas) pasarán por la columna separándose así la mezcla. La proteína de interés es entonces separada de la columna usando soluciones desorbedoras, como NaCl o urea.

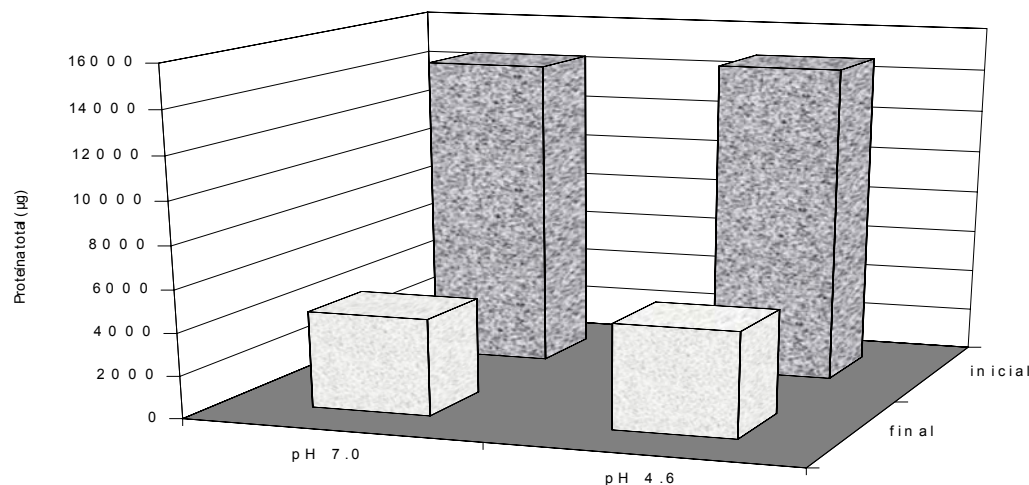
Como un primer intento para establecer si la β -lg es capaz de unirse a la β -galactosidasa, se utilizó la primera como ligando, y como mezcla de proteínas se utilizó Maxilact LX 5000 que contiene 8 proteínas, dos de las cuales presentan actividad de lactasa. Se utilizó como soporte una resina comercial (Eupergit[®])

Debido a que la cantidad de grupos que el Eupergit[®] tiene expuestos y a que las cargas de las proteínas varían con el pH, se utilizaron 2 pH's: 4.6 y 7.0 a los cuales se sabe que la β -lg es

soluble. La β -lg se inmovilizó entonces en esta resina para después usarla como ligando. Se preparó además un control para cada pH en el que la β -lg se substituyó por glicina

El rendimiento de la inmovilización se calculó midiendo el contenido de proteína en el sobrenadante después de inmovilizar y comparándolo con la proteína de la solución inicial. En ambos pH's se logró inmovilizar entre 66 y 69% de la β -lactoglobulina inicial (Figura 16), lo cual corresponde a 0.2657 moles de β -lg/g Eupergit[®]. Dado que los resultados fueron repetibles a lo largo de varios experimentos, es posible asumir que se saturaron todos los grupos expuestos del Eupergit[®].

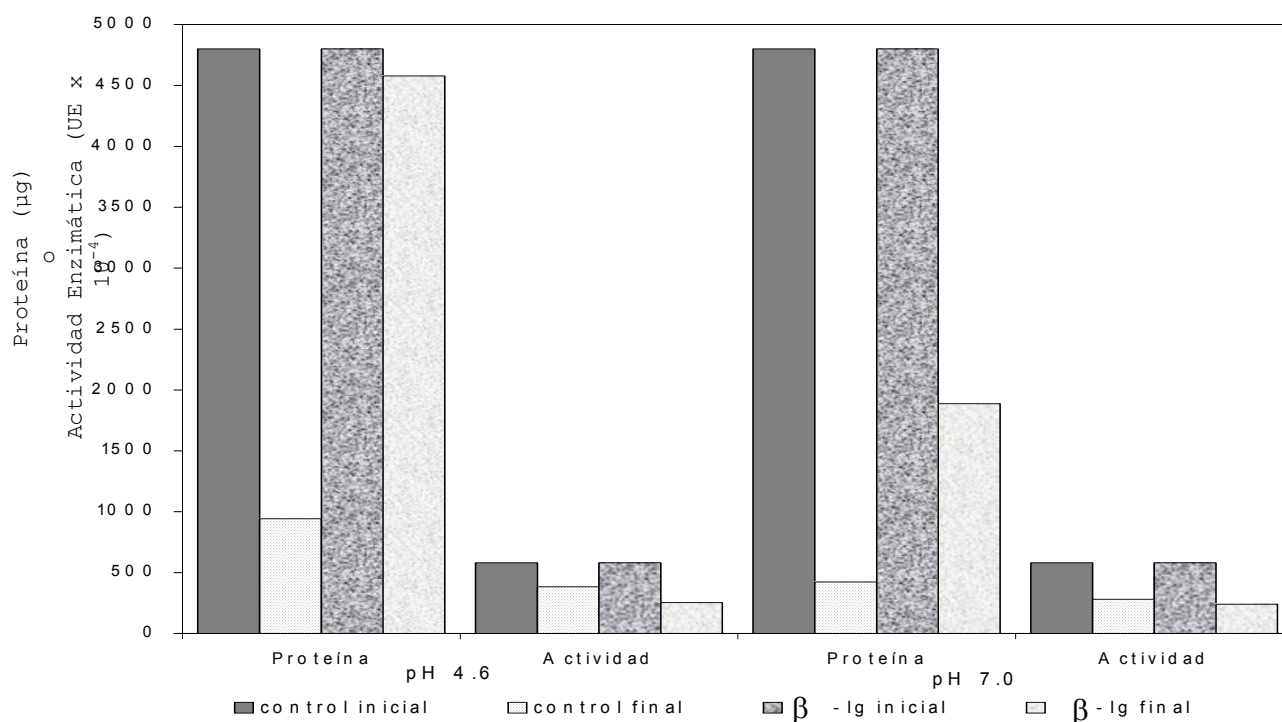
Figura 16. Inmovilización de la β -lactoglobulina en Eupergit[®].



Se hicieron interactuar 0.1g de Eupergit[®] (con β -lg o glicina inmovilizadas a pH 4.6 y 7.0) con soluciones de Maxilact LX 5000 preparadas a una concentración tal que se obtuvieran relaciones de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 moles de β -galactosidasa por mol de β -lactoglobulina inmovilizada en la resina.

En todos los experimentos (tanto en la resina con glicina, como en la resina con β -lg inmovilizada) se observó una notable disminución en la concentración de proteína de la solución después de la cromatografía, indicando que parte de la proteína presente en la muestra se había pegado en la resina. Al medir la actividad enzimática en los sobrenadantes, ésta disminuyó también (figura 17).

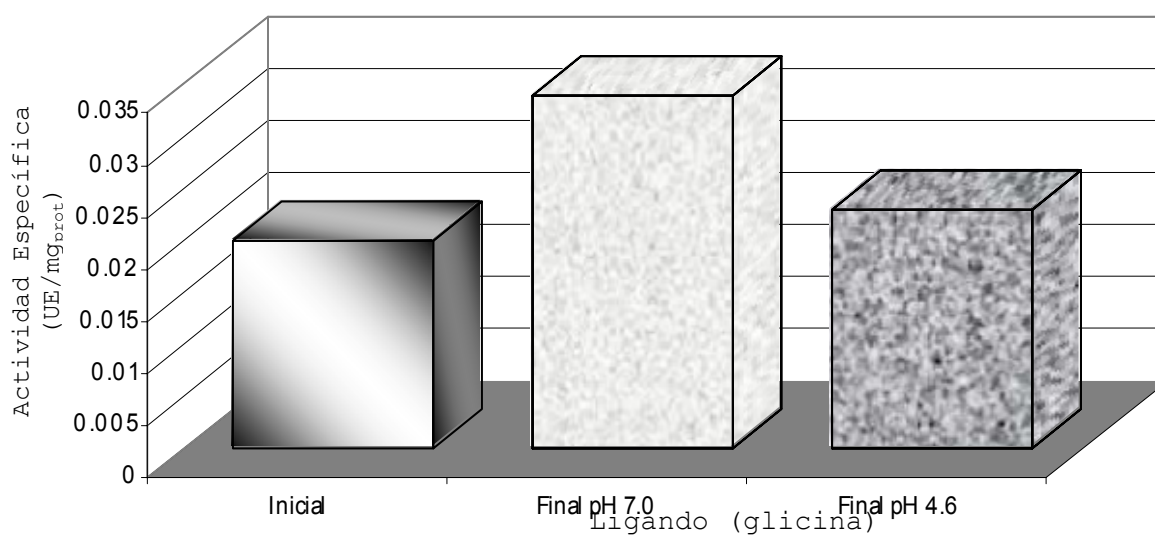
Figura 17. Contenido de proteína y actividad de lactasa en una solución de Maxilact LX5000 en una de las relaciones molares probadas (0.5 n β -galactosidasa/ n β -lactoglobulina) antes y después de la prueba de cromatografía de afinidad.



La disminución en la cantidad de proteína y la actividad del sobrenadante se debe a que la proteína se está quedando pegada en la resina. Dado que la actividad y concentración disminuyeron tanto en el control como en las columnas con β -lg inmovilizada, se calculó la actividad específica (AE) en los sobrenadantes para saber si la composición de la muestra estaba cambiando debido a que alguna proteína específica estuviera mostrando afinidad por la β -lg.

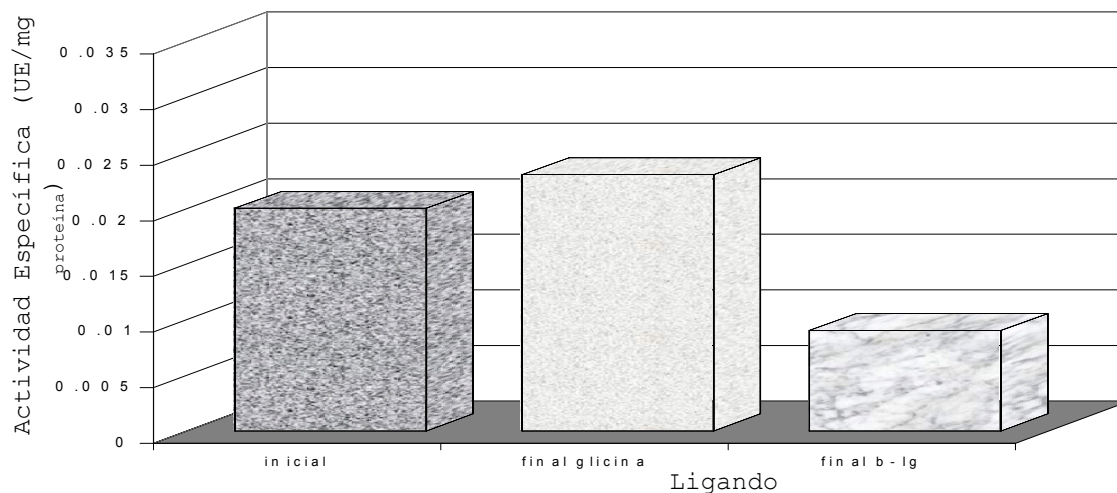
Al calcular la AE se observó que en el caso de los controles ésta no disminuye (Figura 18, Tabla 1), indicando que a pesar de que hay proteínas que están siendo retenidas por la resina, este proceso no es selectivo, sino que cualquiera de las 8 proteínas del Maxilact LX5000 se está pegando indistintamente.

Figura 18. Actividad específica del sobrenadante después de la cromatografía de afinidad en resina con grupos bloqueados por glicina.



Por otro lado, cuando se usó β -lg como ligando la AE específica del sobrenadante disminuyó, indicando que la proporción de β -galactosidasa disminuye con respecto a las demás proteínas de la muestra. Esto sugiere que la enzima se está uniendo a la β -lg inmovilizada en la resina (Figura 19, Tabla 1), demostrando que la β -lg tiene afinidad por la β -galactosidasa.

Figura 19. Actividad específica del sobrenadante después de cromatografía de afinidad usando como ligando glicina o β -lg (0.05 n β -gal/ n β -lg).



Cuando la lactasa se agregó en exceso respecto a las moles de β -lg contenidas en la resina, la disminución de la AE no fue apreciable (Figura 20); debido, probablemente, a que la proteína inmovilizada no es suficiente para ligar una parte importante de la enzima de la muestra. Este tipo de comportamiento se observó para todas las relaciones molares arriba de 1.

Figura 20. Actividad específica de lactasa después de cromatografía de afinidad usando como ligando β -lactoglobulina, cuando la enzima se agregó en exceso (1 n β -gal/ n β -lg)

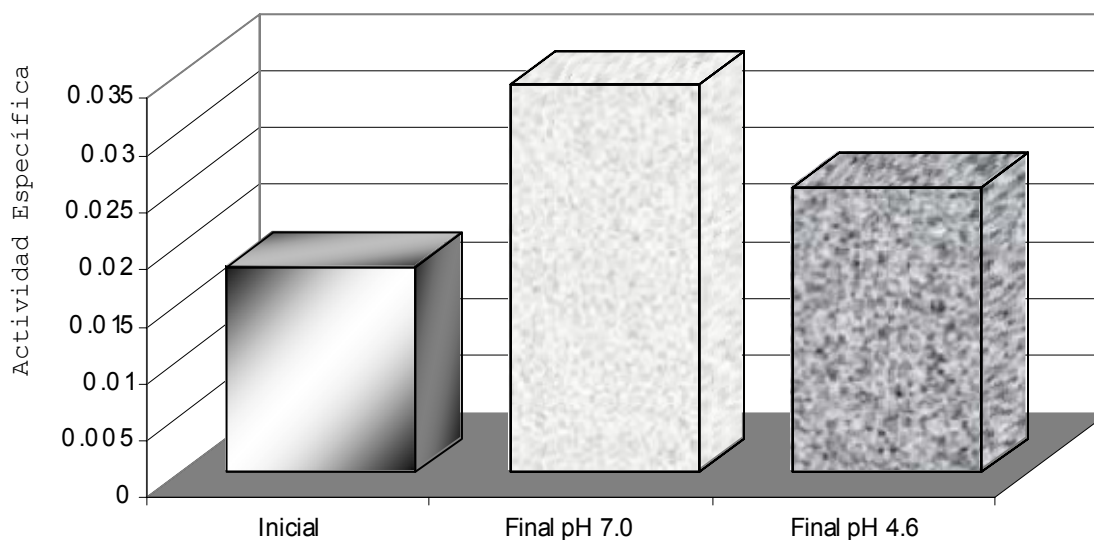
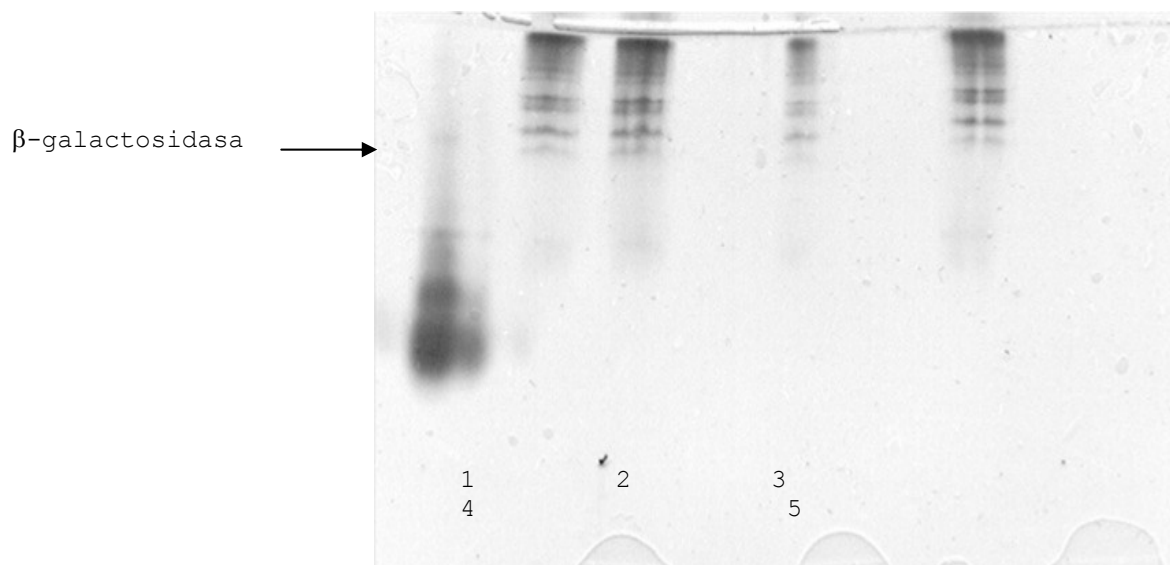


Tabla 1. Variaciones en la actividad específica de los sobrenadantes después de cromatografía de afinidad usando β -lg como ligando y soluciones de Maxilact LX 5000 con diferentes relaciones molares respecto a la β -lg inmovilizada

Relación molar		Actividad Específica (UE/ μ g proteína)				
		Inicial	Final pH 7.0	Variación (%)	Final pH 4.6	Variación (%)
β -lactoglobulina	$n_{\beta\text{-gal}}/n_{\beta\text{-lg}}$ 0.05	0.032	0.004	↓ 86.88	0.0002	↓ 99.38
	0.1	0.020	0.0067	↓ 66.50	0.003	↓ 85.00
	0.25	0.020	0.021	↑ 4.76	0.009	↓ 55.00
	0.5	0.020	0.021	↑ 4.76	0.009	↓ 55.00
	1	0.018	0.034	↑ 88.89	0.025	↑ 25.00

Los resultados anteriores se comprobaron por electroforesis (Figura 21); en los sobrenadantes que se obtuvieron cuando se usó β -lg como ligando se observó una disminución en las bandas correspondientes a la lactasa, en comparación con el Maxilact LX5000, por otro lado, cuando se usó glicina, no se observan cambios en la composición de la muestra.

Figura 21. Proteínas que se encuentran en el sobrenadante después de la cromatografía de afinidad con diferentes ligandos.



Carriles: 1.- β -lg, 2.- Maxilact LX5000 (solución inicial), 3.- Sobrenadante usando glicina como ligando, 4.- Sobrenadante usando β -lg como ligando, 5.- Sobrenadante usando β -lg lactosilada como ligando.

Una vez que se comprobó que la β -galactosidasa tenía afinidad por la β -lg y que en el sobrenadante permanecían las impurezas de la preparación enzimática, se hicieron varios intentos para desorber a la lactasa de la resina con β -lg, tanto variando el pH, como con diferentes concentraciones de NaCl, pero en ningún caso se logró separar a la enzima, sugiriendo que el enlace que se forma entre la β -galactosidasa y la β -lactoglobulina es fuerte.

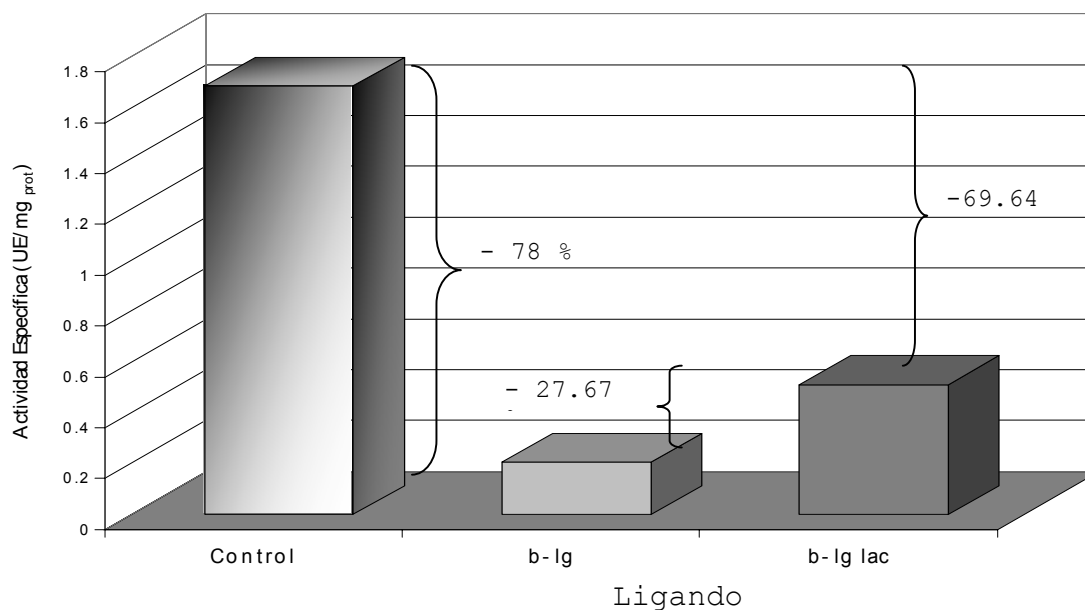
Hasta este punto es posible inferir que cuando la β -lg está presente en el medio de reacción se une a la lactasa y provoca en ella algún cambio conformacional que aumenta su actividad. La disminución del poder activador cuando la β -lg se lactosila podría deberse a que se provoque en ella un cambio conformacional que disminuya su capacidad de unirse a la enzima. Para comprobar si se presentan cambios en la afinidad de la proteína por la enzima se llevó a cabo una prueba de cromatografía de afinidad usando como ligando β -lg lactosilada.

Al comparar los resultados obtenidos con β -lg nativa y β -lg lactosilada, se observó que al utilizar β -lg como ligando la actividad específica del sobrenadante disminuye significativamente (78%) con respecto al control, demostrando que la lactasa se une a la β -lg, lo que sugiere que éste podría ser el mecanismo por el cual activa a la enzima. Por otro lado, cuando se usó β -lg

lactosilada como ligando (Figura 22), la actividad específica del sobrenadante disminuyó (69.64%), pero en menor proporción que cuando el ligando era β -lg nativa. Esto sugiere que la lactosilación de la β -lg disminuye su capacidad de unirse a la enzima, y como consecuencia, disminuye también su efecto activador.

Los resultados se comprobaron además por medio de electroforesis, en donde se observó que la banda correspondiente a lactasa disminuye en intensidad cuando se usa β -lg o β -lg lactosilada como ligando (Figura 21). Más aún, cuando el ligando fue β -lg lactosilada las bandas de lactasa se observan más intensas que cuando se utilizó β -lg.

Figura 22. Actividad específica de la lactasa después de la cromatografía de afinidad utilizando como ligandos β -lg (b-lg) y β -lg lactosilada (b-lg lac). El control se refiere al uso de la resina bloqueada con glicina.



Léonil y col. (1997) reportaron que cuando la β -lg se calienta en presencia de lactosa, se puede glicosilar como máximo un 35 % de la proteína, es posible asumir que la β -lg que se preparó en el laboratorio contiene un alto porcentaje (cerca de 70%) de β -lg no lactosilada. En vista de que la lactosilación disminuyó la capacidad de la proteína para unirse a la lactasa en un 30 % aproximadamente (Figura 22), es posible asumir que la disminución en la actividad específica observada cuando se usó como ligando β -lg lactosilada, se debe a la parte de β -lg no lactosilada de la muestra, sugiriendo que la lactosilación de la proteína evita que ésta se pegue a la enzima.

El hecho de que cuando se determinó la actividad de la enzima en solución amortiguadora con β -lactoglobulina lactosilada, ésta fue cerca de 40% menor que la determinada en β -lg nativa (Figuras 14 y 15), confirma que al lactosilarse, la proteína pierde su capacidad de unirse a la enzima y con esto su capacidad de activarla.

Se ha demostrado que la lactosa se une a la β -lg principalmente a través de la lisina 47 (lys_{47}) (Morgan y col., 1998; 1999; Léonil y col. 1997). En la molécula de β -lg la lys_{47} se localiza muy cerca de una prolina, cuya presencia provoca una torsión en la cadena polipeptídica (Bohinsky, 1993), lo cual hace que la lys^{47} esté en una región muy expuesta y por lo tanto reaccione fácilmente. El hecho de que la lactosilación de la β -lg disminuya su capacidad de unirse a la enzima sugiere que la misma región de la molécula podría estar involucrada en ambas uniones.

CONCLUSIONES

El tratamiento térmico de la leche previo a la hidrólisis de la lactosa produce al menos dos efectos sobre la actividad de la β -galactosidasa: uno activador por la liberación de grupos -SH al desnaturalizarse proteínas del suero como la β -lg y una disminución de la activación por la lactosilación de la β -lactoglobulina que desaparece al quitar del medio la β -lg lactosilada, ya sea por precipitación o ultrafiltración.

Existe una alta correlación entre los grupos -SH liberados al medio (PSP) y el aumento en la actividad de la β -galactosidasa. ($\alpha=0.0001$, $r=0.86$). Este efecto es muy similar al que se encontró al precalentar suero ($\alpha=0.0001$, $r=0.92$). Más aún, la actividad de lactasa en permeado de suero precalentado no es significativamente diferente de la encontrada en el suero para la mayoría de los tratamientos, lo que sugiere que el aumento en la actividad de la enzima se debe a los grupos -SH reactivos liberados al medio, y no simplemente a los expuestos por los cambios conformacionales de las proteínas.

Se demostró también que la probabilidad de que exista un inhibidor termolábil de naturaleza no protéica es muy baja, pues no se observa ninguna activación al calentar PS, además de que el aumento en la actividad en el PSP puede revertirse al oxidar los grupos SH reactivos, demostrando que el efecto activador se debe a la liberación de estos grupos por la desnaturalización de las proteínas del suero.

La sola presencia en el medio de reacción de seroalbúmina o β -lactoglobulina produce un efecto activador que podría deberse a una unión entre la enzima y dichas proteínas, como se observó por medio de cromatografía de afinidad y estudios de electroforesis.

La lactosilación de la β -lactoglobulina como consecuencia del tratamiento térmico disminuye la capacidad de la β -lg de unirse a la β -galactosidasa, disminuyendo con esto su poder activador. Esta es la causa del comportamiento observado al calentar el suero o soluciones de β -lg con lactosa entre 55 y 75 °C,

Dados los diferentes efectos encontrados en este estudio, es posible concluir que el efecto del tratamiento térmico de la leche previo a la hidrólisis de la lactosa es un fenómeno multifactorial y complejo.

6. PERSPECTIVAS

En este trabajo se demostró la influencia de los cambios en el sistema proteico de la leche sobre la actividad de la β -galactosidasa; sin embargo, debido a la complejidad del sistema y a la variedad de los efectos que se presentan, solamente se exploraron a fondo los efectos particulares de la β -lg. Quedan aún planteadas varias incógnitas, como el mecanismo por el cual la sola presencia de seroalbúmina puede activar a la enzima, la especificidad de la lactosilación por la β -lactoglobulina y el efecto de las reacciones que se dan entre las diferentes proteínas sobre la actividad de la enzima.

Por otro lado, a pesar de que los resultados obtenidos demuestran claramente la influencia de los cambios conformacionales de las proteínas de la leche sobre la actividad de la β -galactosidasa, las herramientas utilizadas no son capaces de demostrar el tipo de interacciones que se dan entre las proteínas desnaturalizadas y la enzima. Es por ello que el análisis utilizando técnicas más sensibles como el dicroísmo circular o la calorimetría de barrido diferencial, que permitan establecer cuáles son los cambios conformacionales que se dan y el tipo de interacciones que se establecen entre la enzima y las proteínas podría ayudar a establecer el mecanismo por el cual se lleva a cabo la activación.

Además, podría utilizarse la ingeniería de proteínas, substituyendo los aminoácidos de la región en la que se cree que está basada la unión entre la β -lg y la β -galactosidasa, por ejemplo la lys47 en la que se plantea que se une la lactosa o bien en las prolinas cercanas a este aminoácido, lo cual cambiaría su nivel de exposición que podría ser otro factor importante en la unión entre la enzima y la β -lg.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Alais, C., 1991, **Ciencia de la leche, principios de Técnica lechera**, edit. CECSA, México, D.F.
- Apenten R. y Galani D., 1999, **Is the rate of sulfur-disulfide exchange between the native β -lactoglobulin and PDS related to protein conformational stability?**, Int. J. Food Sci. Technol., 34, 483-486.
- Apenten R. y Galani D., 2000, **Protein Stability function relations: native β -lactoglobulin sulfhydryl-disulphide exchange with PDS**, J. Sci. Food Agric., 80, 447-452.
- Badui S., 1993, **Química de los Alimentos**, 3^a edición, edit. Alhambra Universitaria, México, D.F.
- Byeong S, y Mahoney R., 1989, **Purification and thermostability of β -galactosidase from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus***, J. Dairy Res., 56, 117-127.
- Brady D., Marchant R., McHale L., y McHale A., 1995, **Isolation and partial characterization of β -galactosidase activity produced by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* during growth on lactose-containing media**, Enzyme Microb. Technol., 17, 696-699.
- Carbonaro, M., Bonomi, F., Iametti, S. y Carnovale, E., 1996, **Modifications in disulfide reactivity of milk induced by different pasteurization conditions**, J. Food Sci., 61 (3), 495-499,509.
- Carbonaro, M., Cappelloni, M., Sabbadini, S., Carnovale, E., 1997, **Disulfide reactivity and in vitro protein digestibility of different thermal-treated milk samples and whey proteins**. J. Agric. Food Chem., 45, 95-100.
- Chen J.Y, y Tsen H. Y., 1991, **Effect of milk and milk constituents on heat stability of lactase from *Saccharomyces lactis***, J. Chinese Agric. Chem. Soc., 29(4), 456-464.
- Contarini G., Povo M., Leardi R., y Toppino P.M., 1997, **Influence of heat treatment on the volatile compounds of milk**, J. Agric. Food Chem., 45, 3171-3177.
- Dalgleish, D. G., 1990, **Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk**. J. Agric. Food Chem., 38, 1995-1999

- Dickson R., Dickson L, y Markin J., (1979), **Purification and Properties of an inducible β -galactosidase isolated from the yeast *Kluyveromyces lactis***, J. Bacteriol., 137(1), 51-61
- Elfagm, A.A. y Wheelock, J.V., 1978, **Heat interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk.**, J. Dairy Sci., 61, 159-163.
- Evans, M.T.A. y Gordon, J.F., 1980, **Cap. 2: Whey Proteins**, Applied Protein Chemistry, editor Grant, R.A., ed. Applied Science Publishers, Essex, U.K.
- Fox, P.F., 1989, **Cap. 1: The Milk Protein System**, Developments in Dairy Chemistry-4, editor Fox, P.F., ed. Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- Fox, P.F., y McSweeney, 1998, **Cap. 9: Heat-induced changes in milk**, Dairy Chemistry and Biochemistry, editores Blackie Academic and Professional Press, Chapman and Hall, 1a edición.7
- García-Garibay, M., Gómez.-Ruíz, L., 1996, **Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos**, Rev. Invest. Clin., 48(supl), 51-61.
- García-Garibay M., Gómez-Ruíz L., Revah Moissev S., 1993, **Cap. 9: Biotecnología de productos lácteos**, Biotecnología Alimentaria, editores: García-Garibay M., Quintero Ramírez R. y López Munguía A., edit. Limusa, México, D.F.
- Goldenberg D.P., 1990, **Cap. 10. Analysis of Protein Conformation by Gel Electrophoresis**, Protein Structure a Practical Approach, edit. Creighton T.E., Oxford University Press.
- Greenberg N.A. y Mahoney R.R., (1983), **Effect of milk constituents on the activity and stability of lactase of *Streptococcus thermophilus***, Proceedings of the 6th International Congress of Food Science and Technology, 2, 34-35.
- Greenberg N.A. y Mahoney R.R., (1984), **The activity of lactase *Streptococcus thermophilus* in milk and whey**, Food Chem., 15(4), 307-313.
- Greenberg, N.A.; Wilder, T.; Mahoney, R.R., 1985, **Studies on the Thermostability of Lactase (*Streptococcus thermophilus*) in Milk and Sweet Whey.** J. Dairy Res., 52, 439-449
- Guy, E.J. y Bingham, E.W., 1978, **Properties of β -galactosidasas of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products.** J. Dairy Sci., 61, 147-151

- Habeeb A.F.S.A., 1972, **Cap. 37 Reaction of Protein Sulphydryl Groups with Ellman's Reagent**, Methods in Enzymology Volume XXV (Enzyme Structure), Academic Press.
- Hames, B.D., y Rickwood, D., 1981, **Gel electrophoresis of proteins: A practical approach**, edit. IRL press, England.
- Haque Z. y Kinsella, J.E., 1987, **Interaction between κ -casein and β -lactoglobulin: Effect of calcium.**, Agric. Biol. Chem., 51 (7), pp.1997-1998.
- Haque, Z. y Kinsella, J.E., 1988, **Heat-induced changes in the hydrophobicity of κ -casein and β -lactoglobulin**, Agric. Biol. Chem., 51 (8), pp. 2245-2247.
- Haque, Z., Kristjansson, M.M. y Kinsella, J.E., 1987, **Interactions between κ -casein and β -lactoglobulin: Effects of anions on covalent stabilization of the complex**, Agric. Biol. Chem., 51 (7), pp. 1799-1803.
- Hashizume H. y Sato T., 1988, **Gel forming characteristics of milk proteins. 2. Roles of sulphydryl groups and disulfide bonds.**, J. Dairy Sci., 71,. 1447-1454.
- Hillier, R.M. y Lyster R.L.J., 1979, **Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey**, J. Dairy Res., 46, 95-102.
- Hillier, R.M., Lyster, R.L.J. y Cheeseman, G.C., 1979, **Thermal denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cheese whey: effect of total solids concentration and pH**, J. Dairy Res., 46 , 103-111.
- Iametti, S., Cairoli, S., De Gregori, B.y Bonomi, F., 1995, **Modifications of high-order structures upon heating of β -lactoglobulin: dependence on the protein concentration.**, J. Agric. Food Chem., 43, 53-58.
- Iametti S., De Gregori B., Vecchio G., y Bonomi F., 1996, **Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin**, Eur. J. Biochem., 237, 106-112.
- Imhof R. y Bosset J.O., 1994, **Quantitative GC-MS analysis of volatile flavour compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method**, Lebensm. Wiss. u. Technol., 27, 265-269.
- Jackson, E.H. y Jelen, P., 1989, **Comparison of acid and neutral lactases for batch hydrolysis of lactose in whey**, Milchwissenschaft, 44 (9), pp. 544-546.
- Jelen, P. y Buchheim, W., 1984, **Stability of whey protein upon heating in acidic conditions**, Milchwissenschaft, 39 (4), 215-218.

- Jiménez Guzmán Judith, 1996, **Efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactasa**, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias, UAM-Iztapalapa.
- Jiménez-Guzmán J., Cruz-Guerrero A.E., Rodríguez-Serrano G., López-Munguía Canales A., Gómez-Ruiz L., y García-Garibay M., 2002, **Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment**, J. Dairy Sci., 85 (10), 2497-2502
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Brady, J. y Bringe, N.A., 1989, **Cap. 2: Milk Proteins: Possible Relationships of Structure and Function**, Developments in Dairy Chemistry-4, editor Fox, P.F., ed. Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- Kosikowski F y Wiezbicki L, (1973), **Lactose Hydrolysis of Raw and Pasteurized Milks by *Saccharomyces lactis* Lactase**, J Dairy Sci., 56 (1) 146-148.
- Lewis M.J., 1994, **Heat Treatment of Milk**, Modern Dairy Technology Vol. 1: Advances in Milk Processing, Chapman and Hall, editor Robinson R.K., 2nd edition.
- Leonil J., Mollé D., Fauquant J., Maubois J.L., Pearce R.J. and Bouhallab S. 1997. **Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl β -lactoglobulin Conjugates Formed during Heat Treatment of Milk and Whey and Identification of one Lactose Binding Site**, J. Dairy Sci., 80, 2270-2281
- López, P., Rosado, J.L., Palma, M., González, C. y Valencia, M., 1996 **Mala digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de la leche**, Rev. Invest. Clin, 48 (supl), pp. 15-22.
- Ludescher, R.D., 1990, **Molecular dynamics of food proteins: experimental techniques and observations**, Trends Food Sci. Technol., 1, 145-149.
- Mahoney R.R., 1980, **Number and nature of the sulphhydryl groups of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Biochem., 4, 189-199.
- Mahoney, R.R., 1997 **Lactose: enzymatic modification**. In Advanced Dairy Chemistry Volume 3, Fox P.F., Ed. Chapman & Hall, London.
- Mahoney R.R. y Adamchuk C., 1980, **Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Sci., 45, 962-968.

- Morgan F, Bouhallab S, Henry G, Maubois JL y Léonil J, 1998, **Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry**, Int. Dairy J., 8, 95-98
- Morgan F., Gwénaële H., Le Graët Y., Mollé D., Léonil J. y Bouhallab S. 1999. **Resistance of β -lactoglobulin-bound Lactose to the Hydrolysis by β -galactosidase**, Int. Dairy J., 9, 813-816
- Morr, C.V., 1987, **Effect of HTST Pasteurization of milk, cheese whey and cheese whey UF retentate upon the composition, physicochemical and functional properties of whey protein concentrates**, J. Food Sci., 52 (2), 312-316.
- Mulvihill, D.M. and Fox, P.F., 1989, **Cap. 4: Physico-Chemical and Functional Properties of Milk Proteins**, Developments in Dairy Chemistry-4, editor Fox, P.F., ed. Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- Palma, M., Rosado, J.L., López, P., González, C. y Valencia, M., 1996, **Intolerancia a la lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de leche**, Rev. Invest. Clin. 48(supl), 25-31.
- Park, K.H. y Lund, D.B., 1984, **Calorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin**, J. Dairy Sci, 67, 1699-1706.
- Parnell-Clunies, E.; Kakuda, Y.; Irvine y D.; Mullen, K., 1988, **Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems**. J. Dairy Sci., 71, 1472-1483.
- Parris, N., Purcell, J.M. y Ptashkin, S.M., 1991, **Thermal denaturation of whey proteins in skim Milk**, J. Agric. Food Chem., 39,. 2167-2170.
- Patrick, P.S., y Swaisgood, H.E., 1976, **Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra high temperature heating and subsequent storage**, J. Dairy Sci., 59 (4), 594-560.
- Prabakaran S., y Damodaran S., 1997, **Thermal unfolding of β -lactoglobulin: characterization of initial unfolding events responsible for heat induced aggregation**, J. Agric. Food Chem, 45, 4303-4308.
- Pivarnik L y Rand A., (1992), **Assay conditions effect on β -galactosidase activity from *Kluyveromyces lactis***, J. Food Sci., 57(4).
- Reed, G., 1966, **Enzymes in food processing**, Academic press, N.Y.
- Riel, R., 1991, **Cap. 1: Composición y estructura de la leche**, Ciencia y Tecnología de la Leche, editor: Amiot, J., edit. Acribia, Zaragoza, España.

- Rosado, J.L., González, C., Valenzia M.E., López, P., Palma, M. y López, B., 1994a, **Lactose maldigestion and milk intolerance: a study in rural and urban México using physiological doses of milk**, J. Nutr., 124, 1051-1059.
- Rosado, J.L., López, P. y Palma, M., 1994b, **Mala digestión e intolerancia a la lactosa en adultos mexicanos. Importancia de evaluarlas con dosis habituales de leche**, Rev Invest. Clin. 46, 203-208.
- Schmidt, R.H. y Morris, H.A., 1984, **Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems**, Food Technol., Mayo, pp. 85-93.
- Schmidt, K. y Mc Neill, V., 1993, **Effect of heat treatments on the functional properties of caseinate and whey protein isolate solutions**, Milchwissenschaft, 48 (1), 3-6.
- Sfortunato, T y Connors, W.M., 1958, **Conversion of lactose to glucose and galactose with a minimum production of oligosaccharides**, U.S. patent No. 2,826,502
- Shimada, K. y Cheftel, J.C., 1989, **Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat induced gels of whey protein isolate**, J. Agric. Food Chem., 36, 1018-1025.
- Singh H., 1994, **Cross-linking of milk proteins on heating concentrated milk at 120 °C**, Int. Dairy J., 4, 477-489.
- Singh, H. y Fox, P.F., 1987, **Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH dependen dissociation of micellar κ -casein**, J. Dairy Res., 54, 509-521.
- Taylor, M.J. y Richardson, T., 1980, **Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups**, J. Dairy Sci., 63, 1783-1795.
- Tonyi A., Rouleau D., y Mayer R., (1987), **The effects of whey cations on the kinetic parameters of a model for the enzymic hydrolysis of lactose**, J. Chem. Technol. Biotechnol., 37, 153-168.
- Van Dam, B., Revallier-Warfemins, J.G., y Van Dam-Schermerhorn L.C., 1950, **Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis***, Neth. Milk Dairy J., 4, 96
- Wendorfff W. L., Amundson C.C., y Olson N.F., 1970, **The effect of heat treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the Enzyme lactase**, J. Milk Food Technol., 22 (9), 377-379.
- Wendorfff, W.L., Amundsen, C.H., Olson, N.F., y Garver, J.C., 1971, **Use of yeast β -galactosidase in milk and milk products**, J. Milk Food Technol. 34 (6), 294

- Whitaker J.R., 1994, **Principles of Enzymology for the Food Sciences**, 2nd edition, Dekker ed, New York, ISBN 0-8247-9148-7
- Zhu H. y Damodaran S., 1994, **Heat induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties**, J. Agric. Food Chem., 42 (4), 846-855.

8. Apéndices

8.1 ARTICULO

Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment

**J. Jiménez-Guzmán*, A.E. Cruz-Guerrero*, G. Rodríguez-Serrano*,
A. López-Munguía[†], L. Gómez-Ruiz*, y M. García-Garibay***

J. Dairy Sci. 85:2497-2502

J. Dairy Sci. 85:2497–2502

© American Dairy Science Association, 2002.

Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment

J. Jiménez-Guzmán,* A. E. Cruz-Guerrero,* G. Rodríguez-Serrano,*
A. López-Munguía,† L. Gómez-Ruiz,* and M. García-Garibay*

*Departamento de Biotecnología,
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, A.P. 55-535,
Mexico City D.F., 09340 Mexico.

†Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México,
A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, México

ABSTRACT

The effects of heat treatments of milk and whey prior to lactose hydrolysis with *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase were studied. It was observed that heat treatment of milk significantly increases lactase activity, with a maximum activity increase found when milk was heated at 55°C. In whey from 55 up to 75°C, β -galactosidase activity decreased slightly. Nevertheless, heating whey at 85°C for 30 min raised the rate of hydrolysis significantly. Electrophoretic patterns and UV spectra proved that the activity change correlated with milk protein denaturation, particularly that of β -lactoglobulin. Heating whey permeate did not increase the enzyme activity as heating whole whey; but heating whey prior to ultrafiltration also resulted in enzyme activation. Measurement of free sulfhydryl (SH) groups in both whey and heated whey permeate showed that the liberation of free SH is highly correlated to the change of the activity. Furthermore, this activation can be reversed by oxidizing the reactive sulfhydryl groups, proving that the observed effect may be related to the release of free SH to the medium, rather than to the denaturation of a thermolabile protein inhibitor.

(**Key words:** β -galactosidase, lactase, sulfhydryl groups, whey protein).

Abbreviation key: ONP = ortho-nitro-phenol, ONPG = ortho-nitro-phenyl- β -D-galactoside, Rf = migration coefficient, SH = sulfhydryl, ν_0 = hydrolysis rate.

INTRODUCTION

In the dairy industry, milk is commonly heated for a wide variety of purposes. Depending on the heating temperature, this procedure may cause several changes

in milk such as salt precipitation due to the formation of insoluble complexes (Fox and McSweeney, 1998), protein denaturation, and interactions among milk components (Hillier and Lyster, 1979; Dagleish, 1990; Morgan et al., 1998). The physical and chemical changes produced upon heating of milk may affect other processes carried out in milk.

Van Dam et al. (1950) suggested that heat treatment of milk previous to lactose hydrolysis with lactase could increase the rate of reaction. Sfortunato and Connors (1958) reported that *Saccharomyces fragilis* (*Kluyveromyces marxianus*) lactase yield rate increase was higher in pasteurized milk when compared with sterilized milk. Ever since, little research has been carried out to explain this phenomenon, although additional authors have reported the same type of observations in heated milk or whey (Wendorff et al., 1970; 1971; Guy and Bingham, 1978; Greenberg and Mahoney, 1984; Greenberg et al., 1985), others have not observed such effect (Kosikowski and Wierzbicki, 1973; Mahoney and Adamchuk, 1980).

Wendorff et al. (1970; 1971) reported that lactase activity was higher in heat-treated milk or whey when compared with a control prepared treating a buffer solution. Greenberg et al. (1985) and Mahoney and Adamchuk (1980) observed that there was no effect on the enzyme activity when heating milk, however, a rate increase was detected when acting on heated whey. Other unsuccessful experiments include heating buffer solutions containing lactose where no increase of activity was found (Wendorff et al., 1970; Mahoney and Adamchuk, 1980).

Recently, Mahoney (1997) pointed out that this situation remains unresolved and among several speculations explained the effect as the consequence of the presence of a thermolabile lactase inhibitor, and/or the thermal denaturation of milk proteins.

The aim of this work was to evaluate the effect of thermal treatments of milk on β -galactosidase (EC 3.2.1.23) activity, and to correlate physical or chemical changes on milk components with the observed effect.

Received November 1, 2001.

Accepted April 25, 2002

Corresponding Author: Dr. Mariano García-Garibay; e-mail: jmgg@xanum.uam.mx.

MATERIALS AND METHODS

Substrates

Raw milk was obtained from a local farm near Mexico City. Whey was prepared by clotting raw milk with commercial microbial rennet (Cuamex, Mexico City). The curd was cut and allowed to drain. The whey was filtered through a cotton layer, and then centrifuged at 10,000 rpm for 20 min using a Beckman J2-MI centrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). Ultrafiltrated whey permeate was prepared by means of a tangential bench Minitan Acrylic Ultrafilter System with 10,000 nominal molecular weight limit cellulose plates (Millipore, Bedford, MA).

Treatments

Samples of 100 ml of milk, whey, UF whey permeate, and solutions of α -lactalbumin (1 mg/ml), β -lactoglobulin (3 mg/ml), and bovine serum albumin (0.3 mg/ml) (proteins from Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) were treated at either 55, 65, 75, or 85°C for 30 min; controls for each substrate were not subjected to any heat treatment. All pure protein solutions were prepared in a phosphate buffer 0.05 M pH 6.6, and no lactose was added before or after the proteins were heated. The samples were heated by immersion of 250 ml flasks in a water bath with the required temperature; they were allowed to reach the treatment temperature at which they were held for 30 min, after which they were cooled by running tap water and storage at 4°C. Commercial H_2O_2 was used at an equimolar ratio to oxidize free sulfhydryls (SH) in whey permeate.

Enzyme Activity

Maxilact LX-5000 (Gist Brocades, Delft, The Netherlands) was used as a source of β -galactosidase. Lactose was hydrolysed with a proper dilution of the enzyme preparation in phosphate buffer 0.05 M, pH 6.8, and the enzyme activity measured following the increase in glucose in the reaction medium during the first 9 min sampling each 3 min. The reaction was stopped in each sample by mixing it with the same volume of 12% TCA solution (J.T. Baker, Xalostoc, Mexico); this treatment precipitated all proteins, resulting in a clear solution in which glucose was determined with a glucose enzymatic determining kit (Spinreact, S.A., Olot, Spain). In other cases, 0.034 M ortho-nitro-phenyl- β -D-galactoside (ONPG, Sigma Chemical Co.) was used as substrate. In this case, the enzyme activity was measured following the release of ortho-nitro-phenol (ONP) to the medium. The hydrolysis rate (ν_0) was calculated from the

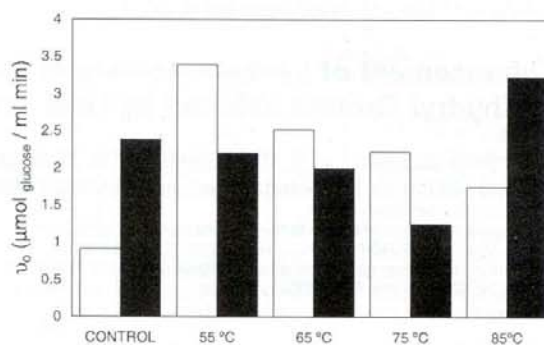


Figure 1. Effect of heat treatment of milk (\square) and whey (\blacksquare) on lactose hydrolysis rate (ν_0).

linear portion of data of either glucose or ONP production vs. time.

Analyses

Sulfhydryl groups were determined using Ellman's reaction as described by Patrick and Swaisgood (1976). Ellman's reagent was from Sigma Chemical Co.

Nondenaturing electrophoretic patterns were obtained using acrilamide/bisacrilamide gels prepared at several proportions of acrilamide/bisacrilamide ($T = 5, 7, 9, 10, 12.5$ and 15%). Electrophoresis were run at 200 volts in a mini-Protean II cell electrophoresis chamber using a Power/Pac 300 as a power supply (equipment and reagents from Bio Rad, Hercules, CA).

UV spectra were obtained using a Shimadzu UV 160 A spectrophotometer (Shimadzu, Japan).

Statistical Analyses

Each experiment was performed three times. Data were analysed with a variance test, and in some cases a Tukey test or a t-student test was performed using the Statistical Analysis System software (SAS Institute, Cary, NC). Pearson Correlation coefficients were calculated with the same software.

RESULTS AND DISCUSSION

Effect of Heat Treatment

Milk subjected to the various heat treatments showed significantly higher hydrolysis rates than those found in the control (Figure 1). The hydrolysis rate observed when milk was heated at 55°C was three times higher than that of the control ($\alpha = 0.0001$). In milk treated at higher temperatures (65 and 85°C), the rate was also

ENHANCEMENT OF LACTASE ACTIVITY BY HEATING MILK

2499

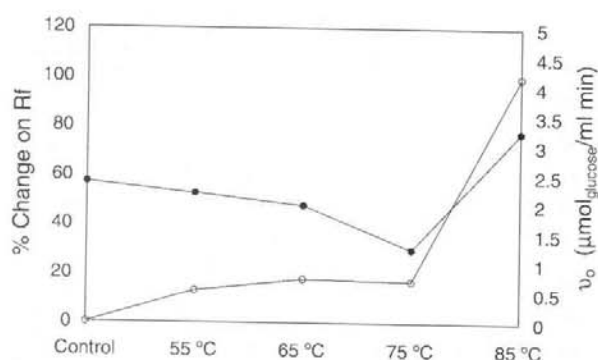


Figure 2. Effect of heat treatment of whey on change of migration coefficient (Rf) of β -lactoglobulin (O) and its relationship with lactose hydrolysis rate (v_0) (●).

higher than the control ($\alpha = 0.0001$); nevertheless, after the maximum observed at 55 °C, it decreased as the temperature increased.

When whey was subjected to the same treatments (Figure 1), the hydrolysis rate decreased with increasing temperature, particularly at 75 °C, but at 85 °C a dramatic activation effect was observed with an enzyme activity 35.4% higher than the control ($\alpha = 0.0503$).

Effect of Whey Protein Denaturation

The change in activity observed in whey may be due to protein unfolding or denaturation, since the change on enzyme activity observed in heated whey (Figure 1) shows a similar pattern to that reported for whey protein denaturation by Parnell-Clunies et al. (1988) and Parris et al. (1991). It has been reported that the first step in whey protein denaturation starts at temperatures between 61 and 67 °C and that the degree of denaturation increases with increasing the temperature (Parris et al., 1991). Therefore, whey protein denaturation was studied and correlated with the kinetic results.

Nondenaturing gel electrophoresis was used to follow the denaturation of whey proteins subjected to the different heat treatments as already described. The migration coefficient (Rf) of some proteins changed significantly as the temperature increased, particularly those of bovine serum albumin (data not shown) and β -lactoglobulin (Figure 2), which has been reported as the most thermolabile protein in whey (Fox and McSweeney, 1998) showing that these proteins undergo a partial heat-denaturation. Figure 2 suggests that protein denaturation could have an effect on enzyme activity, particularly at 85 °C, when the protein was fully denatured.

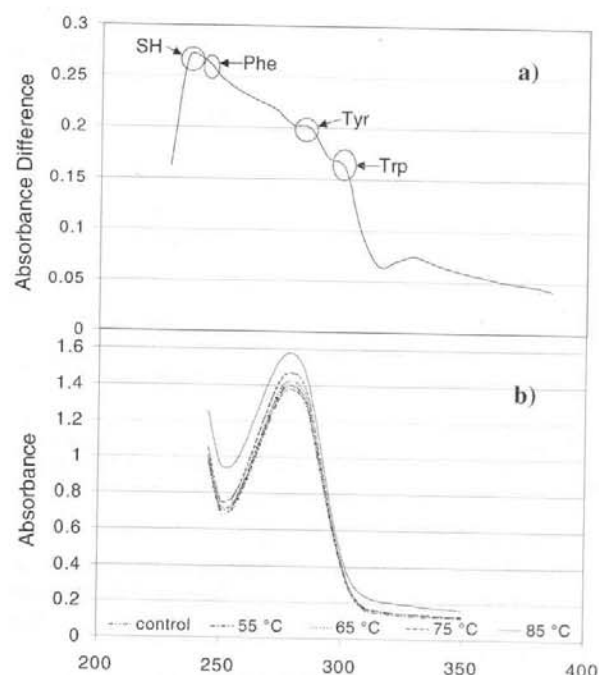


Figure 3. Effect of heat treatment on the denaturation of β -lactoglobulin a) Differential spectrum of β -lactoglobulin heated at 85 °C with respect to non-heated β -lactoglobulin. Circles show maximum absorbance wavelength of particular aminoacids. b) Absorbance spectra of β -lactoglobulin after different heat treatments.

Since α -lactalbumin, β -lactoglobulin and bovine serum albumin are the most abundant whey proteins, experiments were carried out with solutions of the pure proteins heated at the same temperatures as milk and whey in order to follow the changes in their UV spectra. Only the UV spectrum of β -lactoglobulin was considerably modified with heating (Figure 3); furthermore, the greatest change was observed at a wavelength of around 252 nm corresponding to the absorbance wavelength of SH groups (Figure 3a). These results suggest that the conformational changes of β -lactoglobulin resulted in free sulfhydryl groups (SH) exposure, as it had already been reported by several authors for the first stages of β -lactoglobulin heating (Taylor and Richardson, 1979; Parnell-Clunies et al., 1988; Iametti et al., 1995; 1996; Prabakaran and Damodaran, 1997). According to the spectra shown in Figure 3b, the highest degree of denaturation occurred at 85 °C, temperature at which the highest activation of lactase in whey was observed (Figure 1).

β -Lactoglobulin denaturation degree was related to the percent of change of its Rf, and was compared to the change on enzyme activity (Figure 2). These results show that denaturation and/or precipitation of some

2500

JIMÉNEZ-GUZMÁN ET AL.

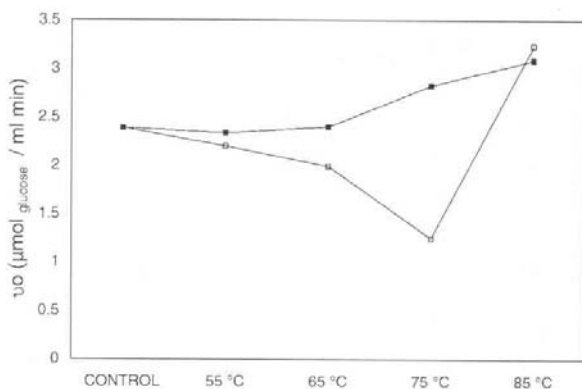


Figure 4. Comparison of hydrolysis rate (v_0) in whey (\square) and whey permeate heated before ultrafiltration (preheated whey permeate) (\blacksquare).

of the whey proteins may be related to the change of lactase activity ($r = 0.79$), suggesting that denatured proteins, at least β -lactoglobulin, could influence the observed effect.

In order to determine whether the activating effect was due to a change in the protein itself or the release of small molecular weight compounds, activity was measured in ultrafiltrated whey permeate. Whey ultrafiltration permeate does not contain protein. When the whey permeate was heat-treated, no statistically significant changes were observed (data not shown), and the values of v_0 obtained when whey permeate was heated did not differ from those obtained in unheated whey or preheated whey permeate. On the other hand, when whey was heated prior to ultrafiltration (in the presence of the proteins) the activity measured in the permeate increased with increasing temperature (Figure 4), suggesting that the activating effect is produced by a low molecular weight compound released to the medium after heat treatment of milk proteins.

Effect of Reactive Sulfhydryl Groups on Lactase Activity

The production of small molecular weight sulphur-containing compounds such as H_2S or $H_3C-S-CH_3$ has been reported in milk due to heat treatment even at temperatures below protein denaturation point if the holding time is long enough (Lewis, 1994), as it was done in this work. These compounds would be produced from denatured whey protein obtained as a result of the thermal treatments (Lewis, 1994; Fox and Mc Sweeney, 1998). Such compounds could cross the ultrafiltration membrane and appear in the permeate. It is also known that reactive sulfhydryl groups increase lactase activity

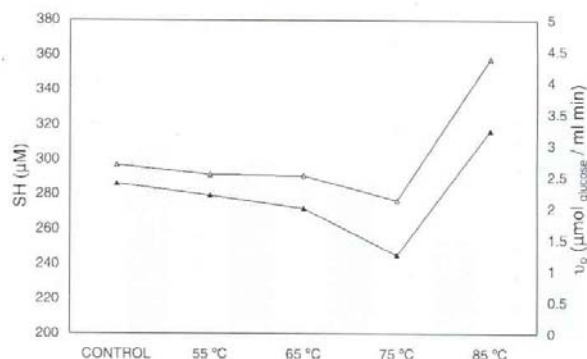


Figure 5. Relationship between SH groups released by heat treatment of whey (Δ) and lactose hydrolysis rate (v_0) (\blacktriangle). SH groups were measured by Ellman's reaction.

in buffer solutions, as was observed in our laboratory (data not shown). Considering that the UV spectra of β -lactoglobulin showed a considerable increase in absorbance at the wavelength at which sulfhydryls absorb, the change on their concentration was followed on samples of heat-treated whey.

Reactive sulfhydryls decreased slightly when whey was treated at 55 to 75°C, but when the treatment took place at 85°C their concentration increased significantly; this may be due to the fact that at 85°C, the protein is completely denatured displaying all its reactive groups: both denaturation and SH exposure at 85°C can be observed in Figures 2 and 3, respectively. As reported by Dalgleish (1990), denaturation of whey proteins is a complex process: disulfide-linked aggregates are formed between serum proteins themselves at first denaturation stages, as has also been reported by Iametti et al. (1996). Recent reports establish that this reaction may take place even at room temperature, but its extent increases with increasing temperature (Apen-ten and Galani, 2000). This interaction could explain the reduction of SH groups when the whey is heated at the lowest temperatures; while at the highest temperature (85°C) the complete denaturation of whey proteins leads to an increase of reactive sulfhydryl groups possibly by releasing them as part of small molecules (Patrick and Swaisgood, 1976; Lewis, 1994; Carbonaro et al., 1997; Fox and Mc Sweeney, 1998).

The change in β -galactosidase activity in whey is clearly correlated with the change on SH measured in treated whey with a high correlation coefficient ($r = 0.92$), suggesting an effect of the exposure of sulfhydryl groups from the whey proteins on the enzyme molecule (Figure 5). Measurement of sulfhydryls in the preheated whey permeate also showed that they correlate highly with the change of the activity ($r = 0.86$). Even

more, when the sulfhydryls in the permeate were oxidized with H_2O_2 the activating effect disappeared (data not shown), suggesting that they participate in the activation of the enzyme.

The possibility that the effect on the enzyme is due to a nonproteic thermolabile inhibitor as suggested by Mahoney (1997), is very unlikely since heating whey permeate after ultrafiltration did not increase the enzyme activity as heating whey. Additionally, the activating effect found when whey was heated prior to ultrafiltration was reversed by oxidizing reactive sulfhydryls demonstrating that these are responsible for the effect.

When comparing the activity patterns obtained in whey and preheated whey permeate (Figure 4), there is no significant observable difference between them after heating at 85°C. This demonstrates that the release of reactive sulfhydryls as low molecular weight compounds is responsible for the activating effect. Nevertheless, at 75°C there is a significant difference between activity observed in whey and preheated whey permeate, suggesting that besides the activating effect of sulfhydryls, additional effects are produced by whey proteins or their denaturation products.

The enzyme levels used to measure activity in milk and whey were exactly the same, nevertheless, these two systems are different from each other and undergo very different reactions either without heating or when subjected to the same heat treatment. Reactivity of SH groups, and the resulting redox potential, in the two systems (milk and whey) are different. While in raw milk, the concentration of reactive sulfhydryl groups is either absent or very low (Taylor and Richardson, 1980) due to the association of whey proteins with caseins or among themselves through disulfide interchanges (Patrick and Swaisgood, 1976; Taylor and Richardson, 1980), in whey, proteins can be found as monomers which expose their reactive SH groups more easily. Heating milk increases its antioxidant activity, with a corresponding decrease in the redox potential (Taylor and Richardson, 1980); this itself could also help to increase lactase activity: it has been reported that *K. lactis* lactase has one SH in its active site, which could participate in the binding of lactose to the enzyme prior to its hydrolysis (Whitaker, 1994). In that way a reducing environment could increase sulfhydryl reactivity thus helping to increase lactase activity; nevertheless, if this were the only cause of the effect on the activity rate, it would tend to increase constantly with the increasing temperature, instead of decreasing at temperatures above 65°C.

The fact that there was a maximum activity when milk was preheated between 55 and 65°C may be explained by the increase on the exposure of reactive sulf-

hydryl groups (SH) from milk proteins (Elfgam and Weelock, 1978; Parnell-Clunies et al., 1988; Shimada and Cheftel, 1989; Lewis, 1994; Jametti et al., 1996; Carbonaro et al., 1996; 1997; Apenten and Galani, 1999; 2000). The change in the redox potential causes an increase in the reactivity of sulfhydryls in κ -casein, α_{s2} -casein, and β -lactoglobulin (Taylor and Richardson, 1980; Apenten and Galani, 1999), which have been reported as "slowly reactive" in raw milk. Furthermore, it has been demonstrated that with low heat treatments, the reactive sulfhydryl groups increase, and upon heating above whey protein denaturation temperatures (around 61°C) SH group concentration in milk decreases owing to SH-disulphide exchange between different proteins (Patrick and Swaisgood, 1976; Parnell-Clunies et al., 1988). Haque and Kinsella (1988) and Haque et al. (1987) reported that heat treatment of milk at high temperatures induces a reaction between β -lactoglobulin's reactive SH and κ -casein, resulting in changes in the concentration of reactive SH. Parnell-Clunies et al. (1988) have already observed the effect of heat treatment in milk at different temperatures, finding a decrease in reactive SH when milk is treated above 65°C. Dalglish (1990) also reported that aggregates are formed between casein micelles and denatured whey proteins; denatured serum proteins are rapidly and efficiently aggregated, either with themselves or with κ -casein. According to Dalglish (1990), heating milk above 70°C results in a decrease in the amount of reactive SH due to the already mentioned protein interactions, aggregation rate being higher as the temperature increases. The lactase activity profile along the different milk treatment temperatures (Figure 1) is very similar to the change on reactive sulfhydryl groups reported by Parnell-Clunies et al. (1988). These authors observed that as milk treatment temperature increases, the reactive sulfhydryl groups decrease, due to reaction between κ -casein and β -lactoglobulin. This suggests that the effect on the enzyme activity could be related to the change on reactive sulfhydryl groups concentration in milk, which was also demonstrated here in the case of whey, where the pattern of SH groups release is different than in milk, due to different protein-protein interactions.

The reasons why other authors did not find effects of heat treatment of milk on lactase activity are possibly due to the different techniques used in the lactase activity assay. Kosikowski and Wierzbicki (1973) measured lactose hydrolysis after 48 h of incubation with lactase, but did not report initial reaction rates. Greenberg et al. (1985) and Mahoney and Adamchuk (1980) did not find an effect on milk heated at either 63 or 85°C, while in whey they found a marked increase in lactase activity particularly at 85°C. The reason why these authors did

not find a difference in milk is unclear, especially since the heat treatment effect has been demonstrated here as well as by Sfortunato and Connors (1958), Van Dam et al. (1950), and Wendorff et al. (1970; 1971).

CONCLUSION

Heat treatment of milk and whey previous to lactose hydrolysis increased enzyme activity; the hydrolysis rate change is highly correlated with the liberation of sulfhydryl groups from whey proteins. The possibility of a thermolabile lactase inhibitor is quite unlikely; as was demonstrated using UF whey permeate. Sulfhydryl exposure due to heat treatment follows different patterns in milk and whey due to protein interactions, which leads to different β -galactosidase activation profiles in both media.

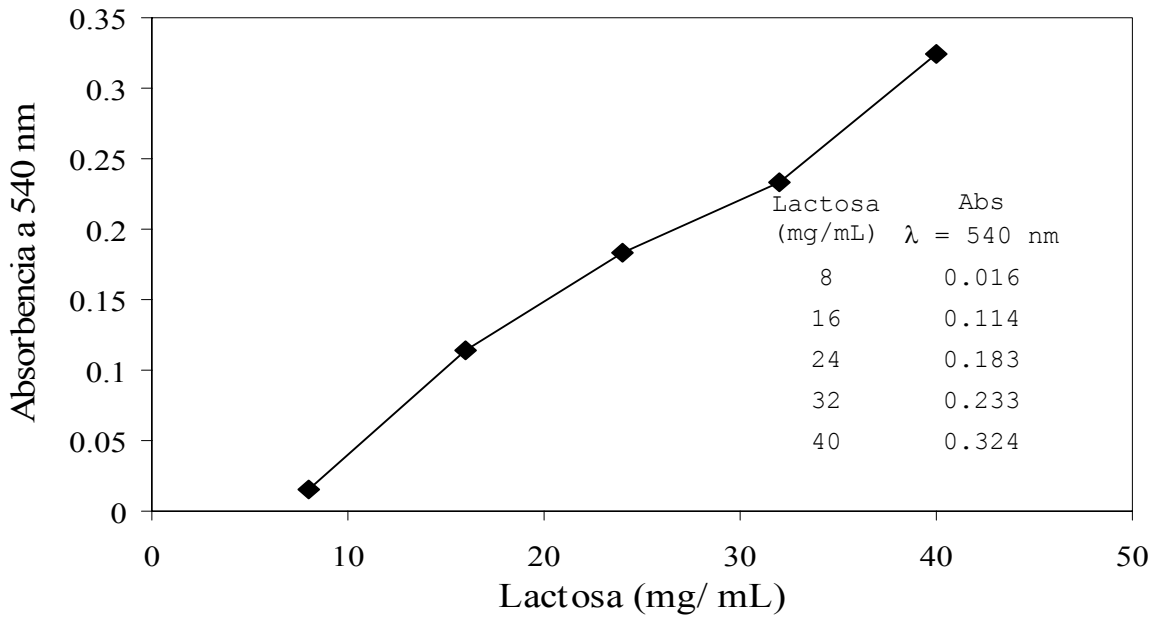
REFERENCES

- Apenten, R. K. O., and D. Galani. 1999. Is the rate of sulphur-disulfide exchange between the native β -lactoglobulin and PDS related to protein conformational stability? *Int. J. Food Sci. Technol.* 34:483-486.
- Apenten, R. K. O., and D. Galani. 2000. Protein Stability function relations: native β -lactoglobulin sulfhydryl-disulphide exchange with PDS. *J. Sci. Food Agric.* 80:447-452.
- Carbonaro, M., F. Bonomi, S. Iametti, and E. Carnovale. 1996. Modifications in disulfide reactivity of milk induced by different pasteurization conditions. *J. Food Sci.* 61:495-499,509.
- Carbonaro, M., M. Cappelloni, S. Sabbadini, and E. Carnovale. 1997. Disulfide reactivity and in vitro protein digestibility of different thermal-treated milk samples and whey proteins. *J. Agric. Food Chem.* 45:95-100.
- Dalgleish, D. G. 1990. Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agric. Food Chem.* 38:1995-1999.
- Elfagm, A., and J. Wheelock. 1978. Heat interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 61:159-163.
- Fox, P. F., and P. L. H. McSweeney. 1998. *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic and Professional, London.
- Galani, D., and R. K. O. Apenten. 1999. Heat induced denaturation and aggregation of β -lactoglobulin: Kinetics of formation of hydrophobic and disulphide-linked aggregates. *Int. J. Food Sci. Technol.* 34:467-476.
- Greenberg, N. A., and R. R. Mahoney. 1984. The activity of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *Food Chem.* 15:307-313.
- Greenberg, N. A., T. Wilder, and R. R. Mahoney. 1985. Studies on the thermostability of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *J. Dairy Res.* 52:439-449.
- Guy, E. J., and E. W. Bingham. 1978. Properties of β -galactosidases of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products. *J. Dairy Sci.* 61:147-151.
- Haque, Z., and J. E. Kinsella. 1988. Interaction between heated κ -casein and β -lactoglobulin. Predominance of hydrophobic interactions in the initial stages of complex formation. *J. Dairy Res.* 55:67-80.
- Haque, Z., M. M. Kristjansson, and J. E. Kinsella. 1987. Interaction between κ -casein and β -lactoglobulin: possible mechanism. *J. Agric. Food Chem.* 35:644-649.
- Hillier R. M., and R. L. J. Lyster. 1979. Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey. *J. Dairy Res.* 46:95-102.
- Iametti, S., S. Cairoli, B. De Gregori, and F. Bonomi. 1995. Modifications of high order structures upon heating of β -lactoglobulin: dependence on protein concentration. *J. Agric. Food Chem.* 43:53-58.
- Iametti, S., B. De Gregori, G. Vecchio, and F. Bonomi. 1996. Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of β -lactoglobulin. *Eur. J. Biochem.* 237:106-112.
- Kosikowski, F. V., and L. E. Wierzbicki. 1973. Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase. *J. Dairy Sci.* 56:146-148.
- Lewis, M. J. 1994. Heat Treatment of Milk. Pages 45-50 in *Modern Dairy Technology*. Vol. 1. Advances in Milk Processing. R. K. Robinson, ed. Chapman and Hall, 2nd edition, London.
- Mahoney, R. R. 1997. Lactose: Enzymatic modification. Page 95 in *Advanced Dairy Chemistry Volume 3*. P. F. Fox, ed. Chapman & Hall, London.
- Mahoney, R. R., and C. Adamchuk. 1980. Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Food Sci.* 45:962-964, 968.
- Morgan, F., S. Bouhallab, G. Mollé, G. Henry, J. L. Maubois, and J. Léonil. 1998. Lactolation of β -lactoglobulin monitored by electrospray ionisation mass spectrometry. *Int. Dairy J.* 8:95-98.
- Parnell-Clunies, E., Y. Kakuda, D. Irvine, and K. Mullen. 1988. Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems. *J. Dairy Sci.* 71:1472-1483.
- Parris, N., L. M. Purcell, and S. M. Ptashkin. 1991. Thermal denaturation of whey proteins in skim milk. *J. Agric. Food Chem.* 39:2167-2170.
- Patrick, P. S., and H. E. Swaisgood. 1976. Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra-high-temperature heating and subsequent storage. *J. Dairy Sci.* 59:594-600.
- Prabakaran S., and S. Damodaran. 1997. Thermal unfolding of β -lactoglobulin: Characterization of initial unfolding events responsible for heat induced aggregation. *J. Agric. Food Chem.* 45:4303-4308.
- Sfortunato, T., and W. M. Connors, inventors. 1958. Conversion of lactose to glucose and galactose with a minimum production of oligosaccharides. US Pat. No. 2,826,502.
- Shimada, K., and J. C. Sheftel. 1989. Sulfhydryl group/disulfide bond interchange reactions during heat induced gelation of whey protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* 37:161-168.
- Taylor, M. J., and T. Richardson. 1979. Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups. *J. Dairy Sci.* 63:1783-1795.
- Van Dam, B., J. G. Revallier-Warfemins, L. C. van Dam-Schermerhorn. 1950. Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis*. *Neth. Milk Dairy J.* 4:96.
- Wendorff, W. L., C. H. Amundson, and N. F. Olson. 1970. The effect of heat treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the enzyme lactase. *J. Milk Food Technol.* 33:377-379.
- Wendorff, W. L., C. H. Amundson, N. F. Olson, and J. C. Garver. 1971. Use of yeast β -galactosidase in milk and milk products. *J. Milk Food Technol.* 34:294-299.
- Whitaker, J. R. 1994. *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, 2nd edition, Marcel Dekker, New York.

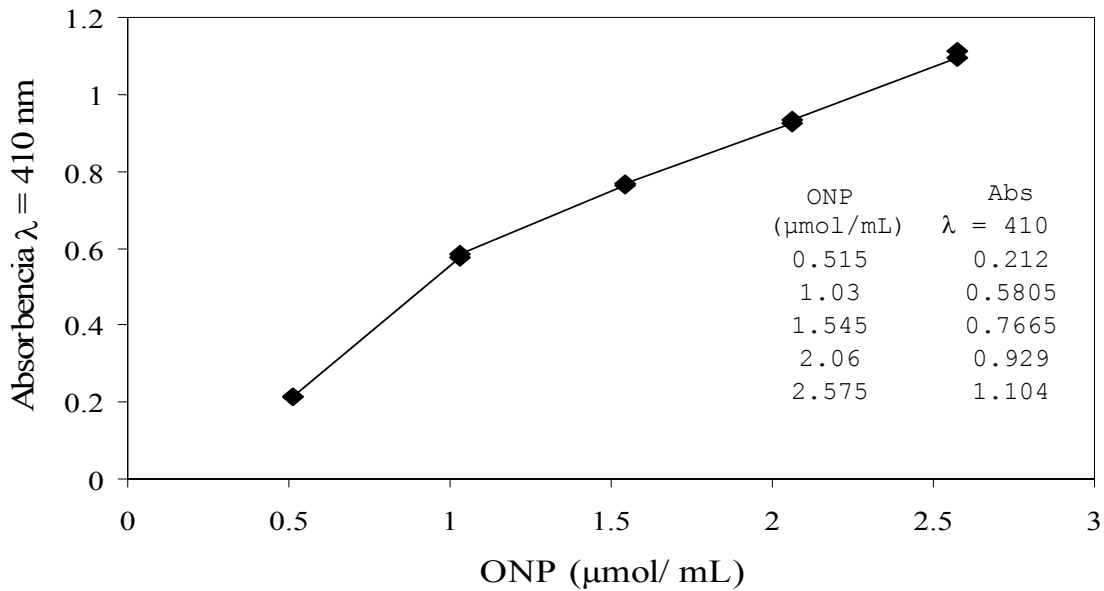
8.2 Glosario de abreviaturas

- λ → Longitud de onda en nanómetros
 α → Nivel de significancia estadística. Probabilidad de error al rechazar H_0
 β -gal → β -galactosidasa
 α -la → α -lactalbúmina
 β -lg → β -lactoglobulina
 β -lg_{lac} → β -lactoglobulina lactosilada
 ξ_{TNB} → Coeficiente de extinción molar del nitrobenzoato
AE → Actividad específica (UE/mg)
CRA → Capacidad de retención de agua
Da → Daltons
DNS → ácido 5-5'-dinitro-salicílico
DTNB → Acido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico)
KDa → KiloDaltons
lys₄₇ → Lisina 47 de la β -lactoglobulina
NMWL → Nominal Molecular Weight Limit
ONP → o-nitro-fenol
ONPG → o-nitro-fenil- β -D-galactósido
PM → Masa Molecular
PS → Permeado de suero
PSC → Permeado de suero calentado
 r → Coeficiente de correlación (regresión lineal)
 R → Coeficiente de correlación obtenido de la prueba estadística de Pearson.
 R_f → Coeficiente de Migración en electroforesis
SA → Seroalbúmina
SH → Grupo sulfhidrilo
SS → Puente disulfuro
TCA → ácido tricloroacético
TNB → nitrobenzoato
UE_{lactosa} → Unidades Enzimáticas determinadas usando lactosa como sustrato
UE_{ONPG} → Unidades Enzimáticas determinadas usando ONPG como sustrato
UV → Ultravioleta
WPC → Concentrado de proteína de suero

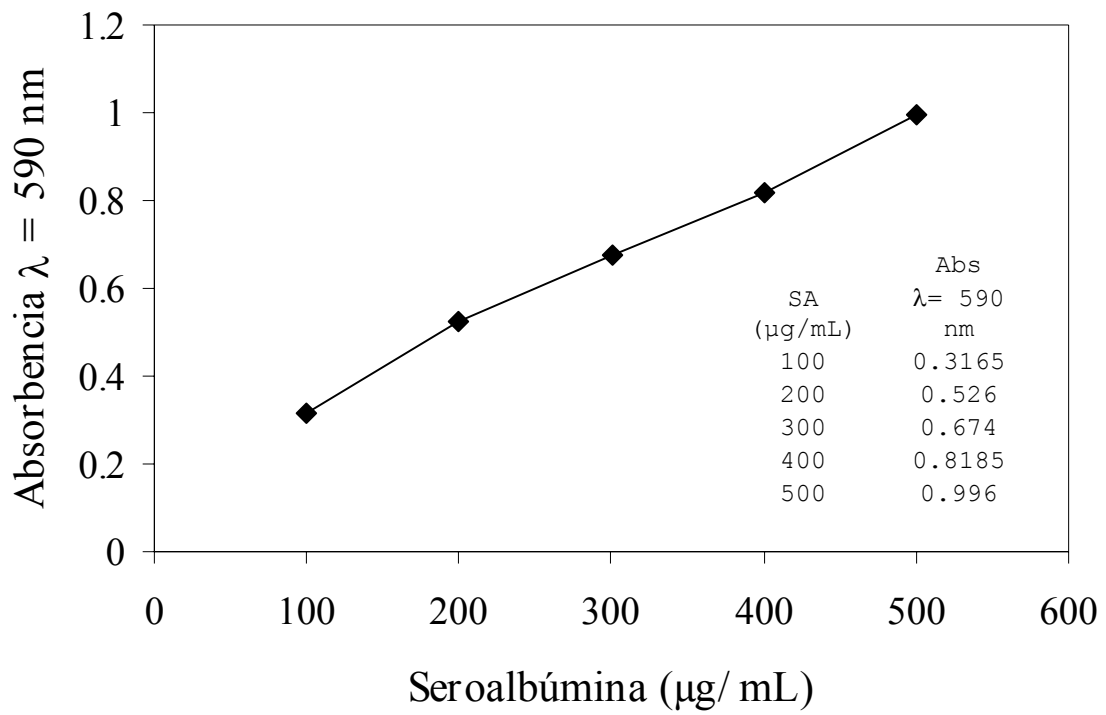
8.3 Curvas Patrón



1.- Curva Patrón de Lactosa (DNS): $L(\text{mg} / \text{mL}) = \frac{(Abs_{\lambda 540} + 0.0537)}{0.0076}$
 $r = 0.9983$



2. Curva Patrón de ONP: $ONP(\mu\text{mol} / \text{mL}) = \frac{(Abs_{\lambda 410} - 0.07895)}{0.41407767}$
 $r = 0.9828$



3. Curva Patrón de proteína (Lowry): $P(\mu\text{g} / \text{mL}) = \frac{(Abs_{\lambda 590} - 0.17075)}{0.0016515}$
 $r = 0.9971$