



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**“Estudio sobre el papel de los grupos ϵ -amino de la
 β -lactoglobulina en su interacción con la
 β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*”**

Tesis que para obtener el grado de:

Maestra en Biotecnología

Presenta:

Q. A. Elizabeth Del Moral Ramírez

Directora:

Dra. Judith Jiménez Guzmán

México D. F., Septiembre de 2008

Iztapalapa, D. F., a 3 de Septiembre de 2008

El jurado asignado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa aprobó la tesis

**Estudio sobre el papel de los grupos ϵ -amino de la
 β -lactoglobulina en su interacción con la
 β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis***

Que presentó

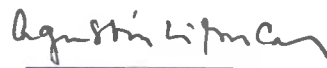
Q. A. Elizabeth Del Moral Ramírez

Director: Dra. Judith Jiménez Guzmán
Depto. Biotecnología, UAM-Iztapalapa

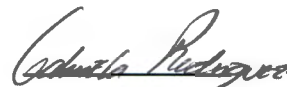


Jurado

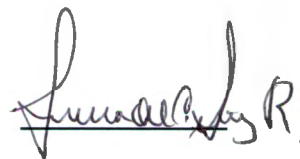
Presidente: Dr. Agustín López Murguía Canales
Depto. Biotecnología y Bioingeniería,
Instituto de Biotecnología, UNAM



Secretaria: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano
Depto. Biotecnología, UAM-Iztapalapa



Vocal: M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruiz
Depto. Biotecnología, UAM-Iztapalapa



Vocal: Dra. María de los Dolores Reyes Duarte
Depto. Procesos y Tecnología,
UAM-Cuajimalpa



*Gracias a **Dios**, por permitirme formar parte de su plan, por nunca dejarme sola, cuidarme y poner en mi camino a esos ángeles que me han ayudado a ser quien soy y a llegar hasta aquí.*

Gracias a los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias para mejorar la comunicación de este trabajo.

Dedicatorias

A mi mamá quien no sólo me ha dado la vida sino que me ha enseñado a vivirla y a esforzarme por alcanzar mis metas y ser feliz en el camino. Gracias por tu cariño y tu ejemplo.

A ti papá por ser quien me ha impulsado a luchar en esta vida.

A mis hermanos quienes han sido mis compañeros, mis confidentes mis cómplices, doctora gracias por tus consejos y tu amistad, flaquito gracias por ser quien eres y por enseñarme que hay que vivir la vida con alegría.

A mi amado esposo, Ale tu has cambiado por completo mi forma de ver este mundo. Sin ti, sin tu paciencia, tu carácter, tu ayuda este logro jamás habría sido posible, te amo y te agradezco el estar siempre a mi lado.

A mis abuelos que siempre están al pendiente de mí y que con su cariño y ayuda incondicional han sido parte de mis logros.

A mis tíos quienes me han apoyado y me han acompañado en los momentos importantes de mi vida.

A mis primos los mayores con quienes compartí mi infancia.

A mis primos los pequeños para quienes deseo ser un buen ejemplo.

A mi inolvidable Doctor Aníbal que se convirtió en mi mejor ejemplo para vencer las adversidades que trae la vida y que con su alegría de vivir me enseñó que todos los seres humanos funcionamos mejor con amor. Gracias Doctor por encaminarme en el hermoso mundo de la docencia, sé que desde donde está aun me cuida.

A la maestra Lucía quien con su fortaleza logra hacer que todos los problemas se vean pequeños.

A mis maestros que me han apoyado en todo:

A la Dra. Judith Jiménez Guzmán mi directora, maestra y amiga, gracias por compartir conmigo tus conocimientos y por tus palabras de aliento cuando el trabajo es difícil. Haces que lo que parece imposible sea posible.

A la M. en C. Lorena Gómez Ruiz quien siempre me logra sorprender con una interesante y retadora pregunta y a quien admiro por su inteligencia y la forma en que logra transmitir su amor por la ciencia, trabajo y familia.

A la Dra. Gabriela Rodríguez Serrano quien siempre me ha brindado ayuda cada vez que la he necesitado y cuyo ejemplo de constancia ha sido importante en mi formación.

A la Dra. Alma Cruz Guerrero quien es un ejemplo de responsabilidad, constancia y en quien siempre he encontrado ayuda cuando la he necesitado.

Al Dr. Mariano García Garibay, gracias a quien puedo dedicarme a hacer lo que mas me gusta: investigar y enseñar. Gracias porque con su sencillez hace ver que los genios también son seres humanos.

A mis compañeras de trabajo, Angélica, Claudia, Ivonne y Nataly quienes hacen posible que el trabajo en el laboratorio sea menos pesado.

A mis queridos alumnos de quienes siempre tengo algo que aprender.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
Resumen.....	1
A. Introducción.....	3
A. 1. Antecedentes y Justificación.....	3
A. 2. Objetivos.....	5
A. 2. 1. Objetivo general.....	5
A. 2. 2. Objetivos particulares.....	5
A. 3. Hipótesis.....	6
B. Antecedentes y Generalidades.....	7
B. 1. Composición general de la leche de vaca.....	7
B. 1. 1. Proteínas de la leche de vaca.....	8
B. 1. 1. 1. Caseínas.....	9
B. 1. 1. 2. Proteínas del suero de la leche de vaca.....	10
B. 1. 1. 2. 1. α-Lactoalbúmina.....	11
B. 1. 1. 2. 2. Albúmina Sérica.....	11
B. 1. 1. 2. 3. Inmunoglobulinas.....	11
B. 1. 1. 2. 4. β-Lactoglobulina.....	11
B. 1. 1. 2. 1. 1. Succinilación de la β-lactoglobulina....	13
B. 1. 2. Hidratos de carbono.....	15

B. 1. 2. 1. Hidrólisis de la lactosa.....	16
B. 2. Lactosilación de la β -lactoglobulina.....	19
B. 3. Uso de Programas de Cómputo para la construcción de un modelo tridimensional y docking de una proteína.....	20
C. Metodología.....	23
C. 1. Obtención del modelo tridimensional de la β -lactoglobulina y docking molecular.....	23
C. 2. Succinilación gradual de la β -lactoglobulina.....	23
C. 2. 1. Seguimiento de la succinilación gradual de la β -lactoglobulina.....	24
C. 3. Medición de la Actividad Enzimática.....	24
C. 4. Interacciones proteína-enzima.....	25
C. 4. 1. Succinilación de la β -lactoglobulina para su inmovilización en Eupergit®.....	26
C. 4. 2. Inmovilización de los ligandos en Eupergit®.....	26
C. 4. 3. Bloqueo de los grupos oxirano libres de la resina.....	27
C. 4. 4. Evaluación de las interacciones proteína-enzima.....	27
C. 5. Análisis Estadístico.....	27
D. Resultados y Discusión.....	28
D. 1. Reactividad de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina.....	28
D. 2. Succinilación de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina.....	31

D. 2. 1. Verificación del bloqueo de los grupos amino de la β -lactoglobulina.....	31
D. 2. 2. Efecto del bloqueo de los grupos amino de la β -lactoglobulina en la actividad de la β -galactosidasa.....	32
D. 3. Estudio de las interacciones entre la β -lactoglobulina y succinilada y la β -galactosidasa por Cromatografía de Afinidad.....	34
D. 3. 1. Purificación de la β -lactoglobulina succinilada.....	34
D. 3. 2. Inmovilización de la β -lactoglobulina nativa y la β -lactoglobulina succinilada.....	36
D. 3. 3. Interacción entre β -lactoglobulina nativa y la β -lactoglobulina succinilada y la β -galactosidasa.....	37
E. Conclusiones.....	40
F. Perspectivas.....	41
G. Bibliografía.....	42
H. Apéndices.....	45
H. 1. Abreviaturas.....	45
H. 2. Curvas patrón.....	46

“Estudio sobre el papel de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina en su interacción con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*”

RESUMEN

La hidrólisis de la lactosa utilizando la enzima β -galactosidasa (o lactasa) ha sido objeto de numerosos estudios que han proporcionado información muy útil para lograr la optimización del proceso industrial de deslactosado de la leche por vía enzimática, pues tratan de explicar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la hidrólisis, así como los factores que intervienen en ella.

En estudios recientes se ha encontrado que la presencia de β -lactoglobulina (β -lg) en el medio de reacción durante la hidrólisis enzimática de la lactosa produce un efecto activador sobre la β -galactosidasa (β -gal) de *Kluyveromyces lactis* de hasta un 230% y se ha sugerido que tal efecto se debe a la interacción entre la enzima y dicha proteína.

Los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina son algunos de los grupos más expuestos y reactivos de la β -lg, siendo los de la Lys⁴⁷ y la Lys¹³⁸ los más expuestos (Creamer y Sawyer, 2003). Se ha reportado que la lactosilación de la β -lg se lleva a cabo a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina, específicamente a través de los de la Lys⁴⁷. También se ha reportado que la lactosilación de la β -lg provoca una disminución tanto de las interacciones entre la β -lg y la β -gal como del efecto activador de la β -lg sobre la β -gal (Jiménez-Guzmán y col., 2006) así que es muy probable que la misma región de la β -lg se encuentre involucrada en la interacción entre la β -lg y la β -gal; por lo que dicha interacción podría ser a través de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de la β -lg.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la importancia de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de la β -lactoglobulina en su efecto activador sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

La estructura tridimensional de la β -lactoglobulina permitió observar que los residuos de lisina 15, 47, 69 y 138 son los más expuestos y con menor impedimento estérico, mientras que el docking molecular mostró que la lisina 138 de la β -lactoglobulina es el residuo aminado mediante el cual la proteína podría interactuar tanto con la lactosa como con el anhídrido succínico que se utilizó en este trabajo debido a que es una molécula pequeña y que reacciona con las proteínas en condiciones no destructivas y por lo tanto permite que se realicen estudios posteriores. Los experimentos de cromatografía de afinidad demostraron que la β -lactoglobulina se une específicamente a la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y que esto produce un efecto activador. La succinilación de la β -lg provoca la desaparición tanto de las interacciones entre la β -lg y la β -gal como del efecto activador de la β -lg sobre la β -gal. Se concluyó que el efecto activador de la β -lactoglobulina sobre la β -galactosidasa se debe a la interacción entre ambas proteínas y que ésta es a través de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina, por lo que el papel de los grupos amino de la β -lactoglobulina es determinante tanto para la activación de la β -galactosidasa como para la interacción con ésta.

A. INTRODUCCIÓN

A. 1. Antecedentes y Justificación

La leche ha sido uno de los alimentos más importantes para el hombre desde que logró la domesticación del ganado; es el más versátil de los alimentos de origen animal por todos los subproductos que de ella se pueden obtener por lo que, además de su alto valor nutrimental, se ha convertido en un componente de la dieta de los seres humanos (Varnam y Sutherland, 1994).

La lactosa es el azúcar característico de la leche; es un disacárido reductor constituido por glucosa y galactosa y da a la leche un sabor ligeramente dulce (Walstra y Jennes, 1984). La lactosa no puede asimilarse en su forma natural, por lo que es necesario que sea hidrolizada para poder asimilar los monómeros que la constituyen. En el ser humano, el proceso de hidrólisis se lleva a cabo en el intestino delgado; sin embargo, a medida que el individuo crece va perdiendo la capacidad de efectuar este proceso y es probable que, al llegar a la edad adulta, haya perdido una buena parte de la actividad lactásica de su intestino presentando por ello, un cuadro de flatulencia, dolor abdominal y/o diarrea denominado “intolerancia a la lactosa” (López y col., 1996).

Además, debido a su baja solubilidad y su tendencia a la cristalización, la lactosa puede generar problemas técnicos de precipitación; formación de grumos y arenosidades indeseables en productos lácteos con un alto contenido de sólidos como son: helados, leches condensadas y azucaradas, cajetas y flanes (García-Garibay y col., 1993). Por estas razones, la hidrólisis de la lactosa en sus dos monosacáridos por la adición de la enzima β -galactosidasa es una alternativa para resolver los problemas mencionados y ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista.

En estudios recientes se ha observado que la presencia de la β -lactoglobulina en el medio de reacción reproduce en efecto activador sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* de hasta 230% (Jiménez-Guzmán y col., 2002) y que este efecto

activador podría deberse a la unión entre la enzima y dicha proteína (Jiménez-Guzmán y col., 2006).

Por otro lado el calentamiento del suero puede causar la lactosilación de la β -lactoglobulina, la cual implica la glicosilación de la proteína con la lactosa presente en el medio vía reacción de Maillard en sus primeras etapas (Léonil y col., 1997) donde el grupo carbonilo de la lactosa se condensa con los grupos amino de la proteína para formar una base de Schiff, que sufre un rearrreglo para producir una cetoamina más estable y cuantificable (Morgan y col., 1999a). La reacción ocurre a través de los residuos de lisina más reactivos: Lys^{47,91}; así como a través de los que no son tan reactivos pero que también reaccionan con la lactosa: Lys^{15,70,100,60,69,75,77,83,135,138,8,141} (Morgan y col., 1998). De tal forma que todos los residuos de lisina de la β -lactoglobulina con excepción de los de la Lys¹⁰¹ se encuentran implicados en la unión con la lactosa (Morgan y col., 1998).

La lactosilación de la β -lactoglobulina disminuye el efecto activador sobre la β -galactosidasa alrededor de un 30% y es en la lisina 47 (Lys⁴⁷) el primer sitio en donde se lleva a cabo la lactosilación (Léonil y col. 1997), pues es el residuo aminado más expuesto en la molécula de la β -lactoglobulina por estar cerca de una prolina, la cual provoca una torsión en esta región y expone al residuo de lisina haciendo a su grupo amino el más reactivo de los 16 grupos amino de la proteína (Creamer y Sawyer 2003; Morgan y col., 1998, 1999b; Léonil y col. 1997).

Se sabe que puede haber interacciones proteína-proteína que activen a una enzima (Mandrich y col., 2002) y es probable que el aumento de la actividad de la β -galactosidasa en presencia de la β -lactoglobulina se de a través de este mecanismo, pues se ha encontrado que la β -lactoglobulina se une fuertemente a la β -galactosidasa y que cuando estas interacciones se impiden, como en el caso de la β -lactoglobulina lactosilada, el efecto activador desaparece (Jiménez-Guzmán y col., 2006). Aunque se ha demostrado que la unión entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa es necesaria para la activación de la enzima, aún no se ha establecido el mecanismo de la interacción, sin embargo el hecho de que la lactosilación de la β -lactoglobulina disminuya la capacidad activadora es un buen indicio de que la unión puede ser a través de los grupos ϵ -amino más reactivos de la β -lactoglobulina.

Hasta la fecha no existen reportes que indiquen si la desaparición del efecto activador de la β -lactoglobulina cuando se encuentra lactosilada se debe a un impedimento estérico para que se lleve a cabo la interacción entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa, o si es la región más expuesta de la proteína la misma del sitio de unión con la β -galactosidasa. El propósito de este estudio es contribuir con el conocimiento del mecanismo de interacción entre la β -galactosidasa y la β -lactoglobulina tratando de dar una explicación sobre cuál es el papel de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina, lo cual puede ser posible si se bloquean los grupos ϵ -amino más reactivos de la β -lactoglobulina y se realizan estudios sobre el efecto que dicho bloqueo tiene sobre la actividad de la β -galactosidasa.

A. 2. Objetivos

A. 2. 1. Objetivo General

- Estudiar si los grupos amino de la β -lactoglobulina participan en las interacciones entre esta proteína y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

A. 2. 2. Objetivos Particulares

- Determinar, mediante el estudio de la estructura tridimensional de la β -lactoglobulina, cuáles son sus grupos amino más expuestos.
- Evaluar las interacciones entre la lactosa y la β -lactoglobulina por docking molecular.
- Evaluar las interacciones entre el anhídrido succínico y la β -lactoglobulina por docking molecular.
- Bloquear los grupos amino de la β -lactoglobulina por medio de una reacción de succinilación.
- Evaluar por medio de cromatografía de afinidad las interacciones entre la β -lactoglobulina (nativa y succinilada) y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

A. 3. Hipótesis

Los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina de la β -lactoglobulina son esenciales para que se lleve a cabo la interacción entre aquella proteína y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, por lo que el bloqueo de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina puede interferir con las interacciones entre dicha proteína y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* alterando con ello la capacidad activadora de la β -lactoglobulina.

B. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

B. 1. Composición general de la leche

Dentro de la amplia gama de alimentos que el hombre ha seleccionado como parte de su alimentación, la leche es el único que ha sido diseñado por la naturaleza para este propósito; tiene una composición compleja y es conocida y aceptada a nivel mundial por su alta calidad nutricional y por ser propia de cada especie (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

En la leche se encuentran disueltos una gran variedad de compuestos como son: lactosa, grasa, proteínas, sales y otro tipo de compuestos en pequeñas cantidades. La composición exacta de la leche no se ha podido definir en forma general, ya que ésta varía en función de diversos factores como la raza, periodo de lactación y alimentación del mamífero del cual provenga (Alais, 1991).

La siguiente tabla (Tabla 1), muestra la composición porcentual promedio de las leches de mayor importancia comercial y la humana.

Tabla 1. Composición porcentual promedio de la leche de mayor importancia comercial y humana (Spreer, 1991).

Especie animal	Agua	ST*	Grasa	Proteínas	Lactosa	Cenizas
Vaca	87.3	12.7	3.7	3.4	4.5	0.7
Cabra	86.8	13.2	4.5	2.9	4.1	0.8
Oveja	80.7	19.3	7.4	5.5	4.8	1.0
Humana	87.6	12.4	3.8	1.0	7.0	0.2

* ST = Sólidos totales

La lactosa y las sales se encuentran completamente disueltas en el medio. 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 glóbulos que se encuentran suspendidos en el sistema, pero que se desestabilizan fácilmente y tienden a unirse, separándose de los demás componentes.

Para entender los cambios que se llevan a cabo en la leche como consecuencia de los procesos a los que se le somete, es necesario conocer el comportamiento químico de sus componentes que a continuación se describe brevemente.

El agua es el componente más abundante de la leche; su función esencial es la de actuar como disolvente de los demás componentes. También puede encontrarse en algunos derivados lácteos como agua ligada químicamente o como agua libre. La presencia del agua repercute directamente en la estabilidad de la leche, ya que el crecimiento bacteriano, así como las reacciones no enzimáticas, son dependientes de la actividad acuosa. Por otro lado, la actividad acuosa tiene una gran influencia sobre el proceso de secado; pues establece la cantidad de energía necesaria para llevar a cabo dicho proceso (Spreer, 1991).

De todos los componentes de la leche, la fracción formada por las grasas es la que más varía. Esta se encuentra en la leche en forma de glóbulos esféricos suspendidos en la fase acuosa (Amiot, 1991). Entre los componentes grasos predominan los triglicéridos, que constituyen el 98% de la grasa láctea, además de encontrarse pequeñas cantidades de di- y monoglicéridos así como ácidos grasos libres. También se encuentran fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol y cerebrósidos.

Otros componentes se encuentran en cantidades muy pequeñas, pero pueden ser importantes en las propiedades organolépticas o desde el punto de vista nutricional. Entre ellos se pueden citar: las vitaminas liposolubles, principalmente A, D y E, junto con pequeñas cantidades de vitamina K; los compuestos responsables del aroma y sabor como aldehídos, cetonas y lactonas y los pigmentos carotenoides (Walstra y Jenness, 1984).

B.1. 1. Proteínas de la leche de vaca

Normalmente se distingue entre las caseínas, que precipitan a pH 4.6, y las proteínas del suero que no precipitan con las caseínas a menos que previamente hayan sido desnaturalizadas por el calor u otros tratamientos. Las proteínas del suero incluyen a la α -

lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas (Amiot, 1991; Walstra y Jennes, 1984).

B. 1. 1. 1. Caseínas

Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales de la leche de vaca (Walstra y Jennes, 1984). Inicialmente se pensaba que la caseína era una sola proteína; actualmente se sabe que en realidad el término caseína comprende a un grupo de proteínas que contienen fosfato y que son propias de la leche. Son cuatro las de mayor importancia y se les denomina caseínas primarias (Tabla 2) (Fox y McSweeney, 1998; Amiot, 1991; Walstra y Jennes, 1984).

Tabla 2. Caseínas primarias y algunas de sus características (Amiot, 1991; Walstra y Jennes, 1984; Varnam y Sutherland, 1994).

Nombre	Abreviación	Masa molecular	% en masa del total de caseínas	No. de grupos fosfato	mol Ca^{2+} ligado*
α_{s1} -caseína	α_{s1} -CN	23.6	42	7-9	8
α_{s2} -caseína	α_{s2} -CN	25.1	11	10-13	**
β -caseína	β -CN	24.0	31	5	5
κ -caseína	κ -CN	19.0	11	1	2

*moles de Ca^{2+} ligados por mol de caseína, **No determinado.

El resto de las caseínas se denominan menores, porque se originan a partir de la ruptura o hidrólisis por la acción de algunas proteasas propias de la leche sobre las caseínas primarias. Dentro de este grupo se encuentran: la λ -caseína, las γ -caseínas (γ_1 , γ_2 y γ_3) y 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 las caseínas (Fox y McSweeney, 1998; Amiot, 1991).

Una característica inusual de todas las caseínas es una modificación post-transduccional, que consiste en la fosforilación de los grupos hidroxilo de la serina (Varnam y Sutherland, 1994). Los residuos de fosfoserina (llamados también grupos fosfato), se concentran en grupos y son responsables de la existencia de áreas hidrofílicas de fuerte carga negativa que ligan, de manera proporcional al contenido de grupos serínfosfato, iones divalentes como el Ca^{2+} (Tabla 2) sobre todo a pH alto (Varnam y Sutherland, 1994; Walstra y Jennes, 1984). El carácter anfifílico de las caseínas y su fosforilación facilita las interacciones entre ellas para formar complejos esféricos altamente hidratados conocidos como micelas y que se forman bajo condiciones específicas de temperatura y fuerza iónica (Walstra y col., 2001, Amiot, 1991). La estabilidad coloidal de las micelas de caseína se debe principalmente a la κ -caseína y al fosfato de calcio coloidal (Walstra y Jennes, 1984).

B. 1. 1. 2. Proteínas del suero de la leche de vaca

Las proteínas del suero de la leche de vaca comprenden dos tipos: las sintetizadas en la glándula mamaria (β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina) y las de origen sanguíneo (seroalbúmina e inmunoglobulinas). Las proteínas del suero una estructura típica de proteínas globulares compactas con una secuencia en la que los grupos no polares, polares y cargados tienen una distribución relativamente uniforme; sufren un plegamiento intramolecular formándose puentes disulfuro que las estabilizan ante los cambios de pH (Varnam y Sutherland, 1994).

Estas proteínas permanecen solubles en el suero, tanto si la leche se ha coagulado por acidificación a pH 4.6, como si se ha hecho por vía enzimática (por ejemplo, en la elaboración de queso por la acción de la quimosina). Por el contrario, el calentamiento de la leche las desnaturaliza, es decir, provoca el desenrollamiento de la estructura globular de la proteína y la consecuente precipitación de la misma; sin embargo, esta insolubilización depende mucho del grado de calentamiento y las condiciones técnicas tales como la acidificación, tratamientos previos o la presencia de otras proteínas.

Estas proteínas pueden ser separadas del suero por ultrafiltración. La fracción retenida está enriquecida en estas proteínas y también pueden separarse por cromatografía de intercambio iónico (Louquet y col., 1991).

B. 1. 1. 2. 1. α -Lactoalbúmina

La α -lactoalbúmina representa el 19.2% de las proteínas del suero. Su masa molecular es de 14.4 kDa; es muy soluble en agua y su punto isoeléctrico es de 4.8 (Walstra y Jennes, 1984).

B. 1. 1. 2. 2. Albúmina Sérica

La albúmina sérica o seroalbúmina representa el 6.2 % del las proteínas de suero de leche de vaca y es exactamente igual que la albúmina del suero sanguíneo. Su masa molecular es de 66.2 kDa y tiene un punto isoeléctrico de 4.7; es especialmente rica en lisina y cisteína y es muy soluble en agua (Amiot, 1991; Walstra y Jennes, 1984).

B. 1. 1. 2. 3. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas de la leche de vaca representan el 10.9% de las proteínas del suero. Se caracterizan por tener una masa molecular elevada (entre 150 y 900 kDa) y porque contienen una parte glucídica (Walstra y Jennes, 1984). Se les llama inmunoglobulinas por sus importantes propiedades inmunológicas, pues su presencia en gran proporción en el calostro es esencial para transmitir al animal joven los anticuerpos necesarios para la lucha contra las infecciones; además, se cree que contribuyen al sistema antibiótico de la leche cruda (Amiot, 1991).

B. 1. 1. 2. 4. β - Lactoglobulina

La β -lactoglobulina es la más importante de las proteínas del suero de la leche de vaca. Es la más abundante pues constituye el 50.8% de las proteínas del suero y el 9.8 % del total

de las proteínas de la leche de vaca (Walstra y Jennes, 1984). Su masa molecular es de 18.3 kDa, pero en la literatura se da a veces la de 36.6 kDa debido a que se presenta en la naturaleza como un dímero de dos subunidades monoméricas entrecruzadas por dos puentes disulfuro (aproximadamente a pH de 6.5) e incluso polímeros de hasta más cadenas polipeptídicas dependiendo del pH (Figura 1) (Ortiz, 2004; Walstra y Jennes, 1984).

El punto isoeléctrico de la β -lactoglobulina bovina es de 5.2 (Amiot, 1991), tiene 162 aminoácidos con cinco cisteínas (Cys) de las que cuatro están implicadas en los enlaces disulfuro; uno de ellos une la Cys⁶⁶ con la Cys¹⁶⁰ y el otro a la Cys¹⁰⁶ con la Cys¹¹⁹ (Walstra y Jennes, 1984). El grupo tiol libre se encuentra en la Cys¹²¹ (Figura 2) y su existencia es muy importante para los cambios que ocurren en la leche durante el calentamiento, pues está implicado en reacciones con otras proteínas, especialmente la κ -caseína y la α -lactoalbúmina (Walstra y Jennes, 1984).

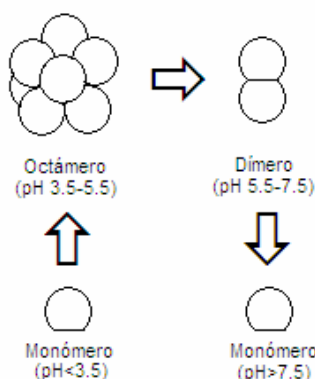


Figura 1. Efecto del pH en la estructura cuaternaria de la β -lactoglobulina (Ortiz, 2004).

La β -lactoglobulina es la principal portadora de grupos sulfhidrilo, que se modifican o descomponen en el curso de la desnaturalización por calentamiento y que intervienen en el desarrollo del sabor a cocido de la leche sobrecalentada (Spreer, 1991).

```

1          11
Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile Gln Val Lys Ala Gly Thr Thr Trp
21          31
Ser Leu Ala Met Ala Ala Ser Asp Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser Ala Pro Leu Arg
41          51
Val Tyr Val Glu Glu Leu Lys Pro Thr Pro Glu Gly Asp Leu Glu Ile Leu Leu Gln Lys
61          71
Asp Glu Asn Asp Glu Cys Ala Gln Lys Lys Ile Ile Ala Glu Lys Thr Lys Ile Pro Ala
81          91
Val Phe Lys Ile Asp Ala Leu Asn Glu Asn Lys Val Leu Val Leu Asp Thr Asp Tyr Lys
101         111
Lys Thr Leu Leu Phe Cys Met Glu Asn Ser Ala Glu Pro Glu Gln Ser Leu Val Cys Gln
121         131
Cys Leu Val Arg Thr Pro Glu Val Asp Asp Glu Ala Leu Glu Lys Phe Asp Lys Ala Leu
141         151
Lys Ala Leu Pro Met His Ile Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys
161 162
His Ile

```

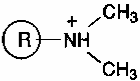
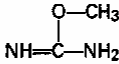
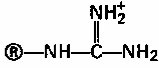
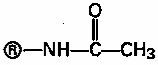
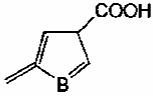
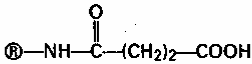
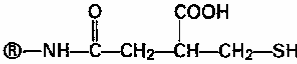
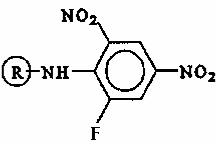
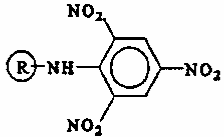
Figura 2. Estructura primaria de la β -lactoglobulina bovina; sólo cuatro de las cinco cisteínas que contiene se encuentran formando enlaces disulfuro, el grupo tiol libre se encuentra en la Cys¹²¹.

B. 1. 1. 2. 4. 1. Succinilación de la β -lactoglobulina

La modificación química de las proteínas es un recurso ampliamente utilizado para diversos fines como: facilitar el estudio de su estructura primaria, identificar grupos reactivos, lograr su unión a soportes y modificar sus propiedades basándose en el principio de que sólo las cadenas laterales de los diferentes residuos de aminoácidos son accesibles para reaccionar (Belitz, 1997).

La succinilación es un método para modificar químicamente las cadenas laterales de los residuos de lisina (Tabla 3) en el que el anhídrido succínico reacciona específicamente con los grupos amino ya sean terminales o pertenecientes a los residuos de lisina (ϵ -amino) de las proteínas e introduce grupos con cargas negativas en su lugar, permitiendo con ello la detección sencilla de grupos amino (Hollecker y Creighton 1980).

Tabla 3. Reacciones químicas comunes para la modificación de los grupos amino de las proteínas y sus características más importantes (Fennema, 2000, modificada)

Tipo de reacción	Condiciones reactivas	Producto	Notas
A. Grupos amino			
1. Alquilación reductora	CHOH, BH ₄ Na (formaldehído)		Útil para el marcaje radiactivo de las proteínas
2. Guanidación			Convierte la cadena lateral lisilo en homoarginina
3. Acetilación	O-Metilisourea pH 10,6, 4°C para 4 días Anhídrido acético		Elimina la carga positiva
4. Succinilación	Anhídrido succínico 		Introduce una carga negativa en el resto lisilo
5. Tiolación	(Ácido tioparacónico)		Elimina la carga positiva y sitúa un grupo tiol en el extremo del resto lisilo
6. Arilación	1-Fluoro-2,4-dinitro-benceno (FDBN)		Se usa para la determinación de grupos amino
	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfónico (TNBS)		Coefficiente de extinción $1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 367 nm; usado para determinar restos lisilo reactivos en las proteínas

Además de ser un agente no-volátil, razonablemente estable y fácil de manejar (Klapper y Koltz, 1972) se ha encontrado que el uso de anhídrido succínico para modificar los grupos amino de la β -lactoglobulina no afecta su estabilidad cuando se encuentran succinilados menos de 10 de sus grupos amino por lo que es posible evaluar la importancia de dichos grupos en las funciones de la proteína (Hollecker y Creighton 1982).

B. 1. 2. Hidratos de carbono

El hidrato de carbono más importante de la leche de casi todas las especies es la lactosa; de hecho es propia de la leche (Walstra y Jennes, 1984).

La lactosa es un disacárido constituido por dos moléculas, una de α -D-glucosa y otra de β -D-galactosa unidas por un enlace β -1,4-glicosídico. Ambas moléculas se presentan predominantemente en forma de anillo piranósico, por lo que el nombre apropiado para la molécula es el de 4-O- β -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa (Figura 3).

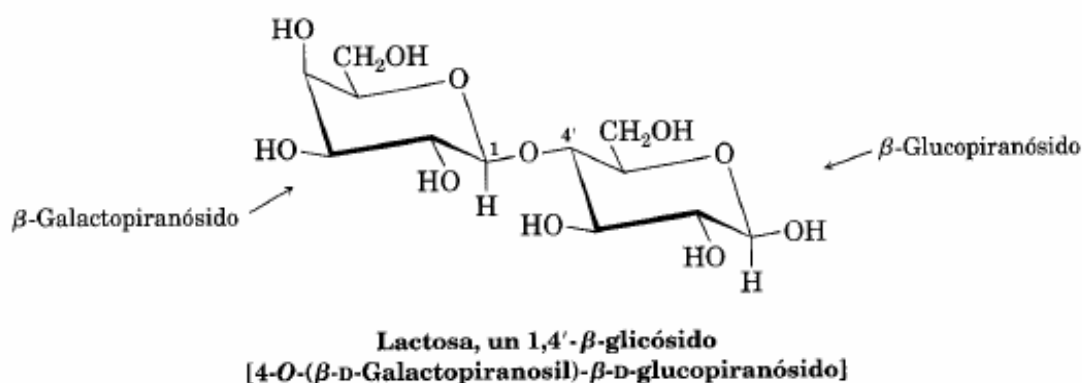


Figura 3. Estructura de la lactosa (Mc Murry, 2001)

En la leche fresca se encuentran glucosa y galactosa libres en una concentración de aproximadamente 50 mg/mL. Otros hidratos de carbono encontrados en solución libre en la leche son aminoazúcares, azúcarfosfatos, oligosacáridos neutros y ácidos y azúcar-nucleótidos; parte de ellos representan probablemente los bloques de construcción de otras

moléculas grandes sintetizadas por la glándula mamaria (Walstra y Jennes, 1984). Se puede resumir su presencia en una clasificación basada en la polaridad de las moléculas (Tabla 4) (Louquet y col., 1991).

Tabla 4. Clasificación de los hidratos de carbono presentes en la leche de vaca (Louquet y col., 1991)

Clasificación	Hidratos de carbono
Neutros	Lactosa
	Glucosa
	Galactosa
Con nitrógeno	N-acetilglucosamina
	N-acetilgalactosamina
	ácido N-acetilneuramínico
Ácidos con nitrógeno	o
	Ácido siálico

B. 1. 2. 1 Hidrólisis de la lactosa

Dependiendo del tipo de glucosa (α ó β) que se presente en la molécula de lactosa, esta puede tener dos formas isoméricas: alfa lactosa o beta lactosa; que tienen propiedades fisicoquímicas completamente diferentes (solubilidad, cristalización, refracción de la luz, etc.). La forma β tiene una solubilidad mucho mayor, pero por mutarrotación se alcanza un equilibrio entre las dos formas. La lactosa es uno de los azúcares comunes menos soluble; esta baja solubilidad tiene consecuencias durante la elaboración de leche concentrada y productos lácteos congelados, donde a menudo es necesario inducir la cristalización para producir un gran número de pequeños cristales y de esta forma evitar el defecto conocido como textura arenosa. La forma cristalina α hidratada, que es la más frecuente, tiene numerosas conformaciones; de las cuales la principal causante de la textura arenosa es la conformación conocida como “*tomahawk*” (hacha de guerra india). Estas características fisicoquímicas pueden causar problemas tecnológicos en la manufactura de los productos lácteos (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996). Como respuesta a esta problemática y a los

problemas fisiológicos presentados cuando un mal absorbedor o intolerante consume lactosa, se han desarrollado procesos industriales de hidrólisis de la lactosa en leche y productos lácteos con lo que se inició desde hace varios años la exploración de diversas fuentes microbianas de la enzima lactasa o β -galactosidasa que pudieran ser utilizadas para hidrolizar la lactosa.

La β -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) cataliza la hidrólisis de la lactosa mediante la inclusión de una molécula de agua para dar lugar a los respectivos monómeros. Además de estos productos de la reacción de hidrólisis, que son los productos mayoritarios, se producen pequeñas cantidades de di- y trisacáridos como resultado de las reacciones de transgalactosidación, particularmente a altas concentraciones de sustrato. La enzima es producida por una gran variedad de seres vivos como bacterias, hongos, levaduras, animales y plantas; pero comercialmente se explotan sólo algunas lactasas de origen microbiano (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

A la fecha se han realizado diversas investigaciones en relación con la hidrólisis enzimática de la lactosa; incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimos, efecto de algunos factores como la presión osmótica, fuerza iónica, presencia de iones, etcétera), su utilización y las diferentes fuentes comerciales que son: hongos como *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*; bacterias como *Streptococcus thermophilus* y levaduras, entre las que se encuentran *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefir*, *Picchia jadinii*, entre otras (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996). Las características y propiedades de las lactasas varían dependiendo de la fuente; por ejemplo, las de origen fúngico presentan mayor termoestabilidad que las de levaduras y bacterias, su pH óptimo de actividad se encuentra dentro del intervalo ácido (4.5 – 6.5) y temperatura óptima entre 35 y 65°C. Las lactasas de levaduras 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 alrededor 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; son las más utilizadas en el proceso de hidrólisis

enzimática de la lactosa en leche a nivel industrial (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Jiménez-Guzmán, 2003).

En 1958 Sfortunato y Connors (Sfortunato y Connors, 1958) publicaron los primeros estudios que sugieren que al someter a la leche a un tratamiento térmico previo a la hidrólisis con la enzima β -galactosidasa, la actividad de la misma aumenta; estas observaciones desataron polémica en torno al tema pues otros autores no encontraban tal efecto. Años después, los experimentos de Wendorf y col. (1970, 1971) comprobaron el efecto activador por el tratamiento térmico de la leche y dieron lugar a pensar que la explicación sobre el aumento en la actividad de la β -galactosidasa se podía encontrar en la precipitación de fosfato de calcio coloidal que pudiera actuar como inhibidor de la enzima, en la destrucción de un inhibidor termolábil o en cambios del sistema protéico de la leche durante su calentamiento. Kosikowski y Wiezbicki en 1973 y Mahoney y Adamchuck en 1980 descartaron la posibilidad de la existencia del inhibidor termolábil, sin embargo los últimos observaron un aumento en la actividad de la β -galactosidasa al calentar suero de leche, por lo que concluyeron que las proteínas del suero estaban implicadas en el efecto activador por el tratamiento térmico. Durante varios años este fenómeno no pudo ser explicado por completo y no fue sino hasta el 2002 que Jiménez-Guzmán y col. encontraron que el incremento en la actividad de la β -galactosidasa en leche y suero tratados térmicamente previo a la hidrólisis se debe a la liberación de grupos $-SH$ provenientes de las proteínas del suero, principalmente de la β -lactoglobulina. Por otro lado encontraron que aunque el incremento de la concentración de $-SH$ y la formación de H_2S y $H_3C-S-CH_3$ a partir de aquéllos (Fox y McSweeney, 1998; Jiménez-Guzmán y col., 2003) podía explicar la mayor parte del efecto en la actividad cuando el suero se calentaba, las proteínas del suero, además podrían estar participando de otra forma. En el 2006, Jiménez y col. encontraron que no sólo el calentamiento de las proteínas del suero causaba un incremento en la actividad de la β -galactosidasa sino que la sola presencia de β -lactoglobulina y albúmina sérica bovina provocaba un aumento de hasta tres veces en la actividad de la β -galactosidasa.

Existen reportes que indican que la presencia de algunas proteínas pueden afectar la actividad de la β -galactosidasa aumentándola y que esto pudiera deberse a un efecto enmascarante de las proteínas sobre algunos iones metálicos inhibidores (Chen y Tsen, 1991; Greenberg y Mahoney, 1984); por otro lado también existen estudios que indican que algunas proteínas mejoran la estabilidad térmica de las enzimas, como es el caso de la albúmina sérica bovina que aumenta a la termoestabilidad de la β -galactosidasa de *Streptococcus thermophilus* (Chang y Mahoney, 1995). Se sabe que puede haber interacciones proteína-proteína que activen a una enzima y es probable que el aumento de la actividad de la β -galactosidasa en presencia de la β -lactoglobulina se de a través de este mecanismo, pues existen reportes que indican que la β -lactoglobulina se une a la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y que cuando estas interacciones se impiden, como en el caso de la β -lactoglobulina lactosilada, el efecto activador desaparece (Jiménez-Guzmán y col., 2006). Aunque se ha demostrado que la interacción entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa es necesaria para la activación de la enzima, aún no se ha establecido el mecanismo de la interacción, sin embargo el hecho de que la lactosilación de la β -lactoglobulina disminuya su capacidad activadora sobre la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* es un buen indicio de que los grupos ϵ -amino más reactivos de la β -lactoglobulina podrían ser esenciales para la interacción.

B. 2. Lactosilación de la β -lactoglobulina

El calentamiento del suero de leche de vaca puede causar la lactosilación de la β -lactoglobulina, la cual implica la glicosilación de la proteína con la lactosa presente en el medio vía reacción de Maillard en sus primeras etapas (Léonil y col., 1997) donde el grupo carbonilo de la lactosa se condensa con los grupos amino de la proteína para formar una base de Schiff, que sufre un rearrreglo para producir una cetoamina más estable y cuantificable (Morgan y col., 1999a). La reacción ocurre a través de los residuos de lisina más reactivos: Lys^{47,91} (Morgan y col., 1998); así como a través de los que no son tan reactivos pero que también reaccionan con la lactosa: Lys^{15,70,100,60,69,75,77,83,135,138,8,141}. De

tal forma que todos los residuos de lisina de la β -lactoglobulina con excepción de los de la Lys¹⁰¹ se encuentran implicados en la unión con la lactosa (Morgan y col, 1998).

Se ha reportado que la lactosilación de la β -lactoglobulina ocurre de manera gradual a temperaturas entre 55 y 75°C; y que a 85°C la β -lactoglobulina precipita debido a su desnaturalización, lo que hace difícil la determinación del compuesto glicosilado (Morgan y col., 1998, 1999a).

La lactosilación de la β -lactoglobulina disminuye el efecto activador sobre la β -galactosidasa alrededor de un 30% y es la lisina 47 (Lys₄₇) la primera en lactosilarse pues es el residuo aminado más expuesto en la molécula de la β -lactoglobulina por estar cerca de una prolina, la cual provoca una torsión en esta región y expone al residuo de lisina haciendo a su grupo amino el más reactivo de los 16 grupos amino de la proteína (Figura 4) (Creamer y Sawyer 2003; Morgan y col., 1998, 1999b; Léonil y col. 1997).

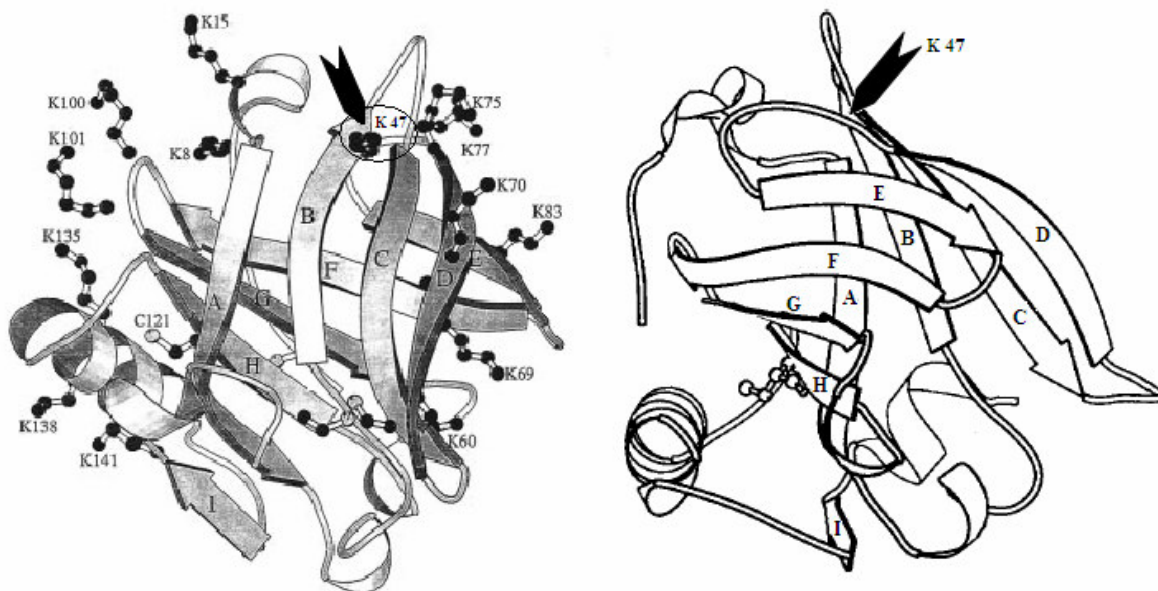


Figura 4. Modelos tridimensionales de la estructura de los monómeros de β -lactoglobulina bovina dibujados con el programa MOLSCRIPT. Las hebras- β están marcadas de la A a la I. La lisina 47 (marcada con una flecha) se encuentra sumamente expuesta (Morgan y col., 1999; Sawyer y col., 1999, 2002a, 2002b).

B. 3. Uso de programas de cómputo para la construcción de un modelo molecular y docking de una proteína

El acelerado crecimiento de la información sobre las macromoléculas se traduce en una labor de investigación sumamente importante e imprescindible, sin embargo la misma demanda de información ha obligado a los investigadores a construir herramientas que les permitan cumplir con su tarea en un corto tiempo para atender a la demanda de información. Para ello se ha recurrido a la informática y se han creado programas de cómputo que, por su disponibilidad y difusión en el medio científico, han podido ser mejorados continuamente brindando con ello una alta confiabilidad en los resultados obtenidos.

El conocimiento de la estructura tridimensional de una proteína permite obtener una gran cantidad de información sobre sus funciones así como de su comportamiento al modificar diversos factores como el medio de reacción y condiciones experimentales e incluso permite hacer predicciones sobre las consecuencias de modificar su estructura primaria. Para poder obtener la estructura tridimensional de una proteína es necesario un arduo trabajo experimental, sin embargo actualmente es posible obtener la información mencionada anteriormente aun si se desconoce la estructura tridimensional proteína. Basta con obtener un modelo de la proteína cuya estructura tridimensional es desconocida construyéndolo a partir de la estructura cristalográfica de otra proteína muy parecida a la proteína en estudio con ayuda de programas de cómputo, procedimiento conocido como modelaje por homología y que permite obtener modelos de las estructuras tridimensionales de las proteínas con una precisión comparable a la que se tendría usando los métodos experimentales (Krieger y col., 2003). El modelaje por homología se ha convertido en un método ampliamente usado para poder tener una idea sobre la estructura tridimensional de una proteína y utilizarla como herramienta en el diseño de mutantes, predicción de una función, identificación de sitios de unión, planeación de experimentos, entre muchas otras aplicaciones (Fisher y col., 2003).

Por otra parte, una vez obtenido el modelo, es necesario optimizarlo con el fin de cerciorarse que el modelo sea verdaderamente lo más cercano a la estructura real de la proteína y para ello se han creado programas de cómputo para analizar los cambios energéticos que sufrirían los átomos de una molécula si se les sometiera a un gran número de condiciones que, si se intentara hacer de forma manual, el tiempo sería insuficiente para llevarlo a cabo. Por tal razón, la dinámica molecular que se hace con los programas de cómputo también se ha convertido en una herramienta indispensable en el modelaje molecular. Finalmente, el saber dónde se unen diferentes tipos de ligandos a una proteína es una tarea a la que muchos grupos de trabajo dedican gran parte de su tiempo, es por ello que ahora se cuenta con programas que ayudan a predecir las interacciones de ligandos de pequeño tamaño -incluso sin tener una idea de cuál o cuáles son los sitios de interacción (docking ciego) (Hetényi y col., 2002)- hasta de proteínas completas; esto permite dirigir la atención del investigador hacia determinados puntos de unión con una certeza mayor a la que tendría si no conociera dónde sería probable la interacción, permitiéndole con ello reducir el tiempo de experimentación, lo cual tiene un gran número de ventajas tanto científicas como económicas.

C. METODOLOGÍA

C. 1. Obtención del modelo tridimensional de la β -lactoglobulina y docking molecular

El modelo tridimensional de la β -lactoglobulina bovina (β -lg) se obtuvo a partir de las coordenadas de RMN de la β -lg obtenidas en solución a pH 7.1 (ID del PDB: 1CJ5) (Kuwata, 1999). El archivo pdb se procesó en el programa de cómputo PyMOL (DeLano Scientific LLC, 2008).

Posteriormente se llevó a cabo un docking ciego para estimar la energías de interacción de los diferentes aminoácidos de la β -lactoglobulina con la lactosa y el anhídrido succínico para así determinar el sitio más probable de interacción utilizando el programa AutoDock 3.05 (The Scripps Research Institute, 2008). La temperatura de simulación fue de 25°C y el cluster se realizó en un rango de RMSD de 5 Å. Los modelos tridimensionales de la lactosa y el anhídrido succínico se crearon en el sitio *The Dundee PRODRG2 Server* (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/>).

C. 2. Succinilación gradual de la β -lactoglobulina

Se ajustó el pH a 7.0 con KOH 0.04 N (JT Baker, Xalostoc, México) a 100 mL de una solución de β -lactoglobulina bovina 5 mg/mL en agua desionizada (MP Biomedicals, Inc., Ohio, EUA) y se tomó una primera muestra de 1 mL que sirvió de control para determinar el efecto del KOH. Se pesaron 5 mg de anhídrido succínico pulverizado (Matheson Coleman and Bell, Ohio, EUA) y se agregaron poco a poco a la solución restante de β -lactoglobulina manteniendo el pH de 7.0 con KOH y en agitación constante de acuerdo con el método de Hollecker y Creighton (1980, 1982). Una vez que el pH permaneció constante durante 10 minutos se tomó otra muestra de 2 mL. Se pesaron nuevamente 5 mg de anhídrido succínico y se repitió el resto del procedimiento. Las adiciones de 5 mg de anhídrido succínico pulverizado, ajuste de pH a 7.0 y la toma de muestras de 2 mL se

repiteieron hasta realizar 12 adiciones en las que cada adición constituyó un derivado succinilado (D1-D12). El control de KOH y los derivados succinilados se almacenaron a -8°C para posteriormente medir la actividad de lactasa en cada uno de ellos.

C. 2. 1. Seguimiento de la succinilación gradual de la β -lactoglobulina.

Para verificar el grado de succinilación de la β -lactoglobulina se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida y urea (T=11%, C=0.4%, pH=4.7, Urea 8 M) según la técnica de Creighton (1989). El gel se corrió iniciando con un voltaje de 30 V hasta que el frente llegó al gel de separación y se aumentó a 90 V manteniéndolo en este valor durante aproximadamente 6 horas hasta que el frente recorrió todo el gel. El gel se colocó en Azul de Coomassie 0.25 % por 1 hora y se enjuagó con solución decolorante de Metanol, Ácido Acético y Agua 40%, 10% y 50% respectivamente hasta lograr apreciar bandas bien definidas.

C. 3. Medición de la Actividad Enzimática

Se utilizó una dilución 1:400 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® (Gist Brocades, Suecia) como fuente de β -galactosidasa (β -gal) de *Kluyveromyces lactis* según el método de Jiménez-Guzmán y col. (2006) usando como medio de dilución para la preparación comercial una solución amortiguadora de fosfatos 0.05M con pH de 7.1. La solución de enzima se mantuvo a una temperatura de 37° C durante 15 minutos antes de llevar a cabo la reacción en el espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japón) y usando una cámara de temperatura controlada (Shimadzu Temperature Controlled Cell Holder TCC-240A, Shimadzu, Japón) para mantener la temperatura constante a 37°C durante toda la reacción.

En un tubo de ensayo se colocaron como medio de reacción 900 μ L ya fueran de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.1 para el control, solución de β -lg nativa

5mg/mL o de los diferentes derivados succinilados resultantes de las adiciones de anhídrido succínico y se incubaron en un baño de agua a 37°C durante 15 minutos. Por otro lado colocaron en una celda de vidrio reducida 33 µL de la dilución 1:400 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® y 67 µL de sustrato, pasados los 15 minutos de incubación de los tubos de ensayo se vació su contenido a la celda.

Se usó como sustrato orto-nitro-fenil-β-D-galactósido (ONPG) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) 0.034M en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.1 y la actividad enzimática se midió espectrofotométricamente a 410 nm en intervalos de 30 segundos durante 3 minutos.

Se definió a la unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 µmol de ONP en un minuto a 37 °C y pH de 7.1. La actividad específica (AE) se calculó dividiendo la actividad enzimática volumétrica entre la concentración de proteína que fue determinada según la técnica de Bradford (1976).

C. 4. Interacciones proteína-enzima

Se realizaron experimentos de cromatografía de afinidad de acuerdo con el método de Jiménez-Guzmán y col. (2006) usando Eupergit® (Röhm GmbH & Co., Darmstadt, Alemania) como matriz y β-lactoglobulina nativa o β-lactoglobulina previamente succinilada como ligando. Se preparó un control para cada ligando usando únicamente glicina para bloquear los grupos oxirano reactivos de la matriz y tanto los ligandos como los controles se hicieron interactuar con la preparación comercial Maxilact LX 5000® durante una hora, posteriormente se separó el sobrenadante por cenrifugación a 500 rpm por 15 minutos en una cetrífuga Beckman J2-MI (Beckman Instruments, Palo Alto CA, EUA) y se le determinó la actividad específica usando ONPG como sustrato.

C. 4. 1. Succinilación de la β -lactoglobulina para su inmovilización en Eupergit®

La β -lactoglobulina succinilada (β -lg_{SUCC}) se preparó haciendo reaccionar 100 mL de una solución 5 mg/mL de β -lg en agua desionizada (MP Biomedicals, Inc., Ohio, EUA) con 194 mg de anhídrido succínico pulverizado (Matheson Coleman and Bell, Ohio, EUA) manteniendo un pH de 7.1 con KOH 0.04 N (JT Baker, Xalostoc, México) y en agitación constante de acuerdo con el método de Hollecker y Creighton (1980; 1982). La solución resultante se ultrafiltró utilizando membranas de celulosa de corte de 10 kDa (Pellicon XLPLCGC 10, Millipore, Bedford, Massachussets, EUA) para eliminar el anhídrido succínico residual. Después se separó la β -lactoglobulina succinilada por isoelectroenfoque en un aparato Rotofor (Bio Rad, Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante (15 W por 4-6 h). Se recolectaron 20 fracciones del rotofor y se les midió el pH. Posteriormente se corrieron las fracciones en un gel de poliacrilamida y urea (T=11%, C=0.4%, pH=4.7, Urea 8 M) según la técnica de Creighton (1989) para determinar en cuál de las fracciones se encontraba la β -lactoglobulina succinilada sin β -lg nativa.

C. 4. 2. Inmovilización de los ligandos en Eupergit®

La inmovilización tanto de β -lg nativa como de β -lg_{SUCC} se llevó a cabo durante 26 horas a temperatura ambiente y agitación constante según las instrucciones del proveedor calculando una carga total de ligando (β -lg nativa ó β -lg_{SUCC}) de 20 mg_{proteína}/g_{Eupergit} que se agregaron a partir de soluciones de proteína de 2 mg/mL disuelta en solución amortiguadora de fosfatos 1 M y pH de 7.0.

Después de transcurridas las 26 horas, se filtró la resina y se lavó dos veces con agua destilada, una vez con NaCl 1M y al final una vez con la solución amortiguadora de fosfatos 1 M y pH de 7.0. Se determinó la concentración de proteína en el filtrado por el método de Bradford para calcular la eficiencia de la inmovilización.

C. 4. 3. Bloqueo de los grupos oxirano libres de la resina

El bloqueo de los grupos oxirano que pudieran haber quedado reactivos y que pudieran haber reaccionado con la mezcla de proteínas provocando que éstas se pegaran a la resina y no a los ligandos se llevó a cabo haciendo reaccionar la resina con glicina (Bio Rad, México) diluida en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M y pH de 7.0 en una proporción de 0.3 g_{Glicina}/g_{Eupergit}.

C. 4. 4. Evaluación de las interacciones proteína-enzima

Para determinar las interacciones entre la β -galactosidasa y la β -lactoglobulina se hizo interactuar la preparación comercial Maxilact LX500 diluida de tal forma que se tuviera una relación molar de 0.05 mol _{β -gal}/mol_{proteína inmovilizada} con 0.1 g de la resina, se dejó la mezcla en agitación constante durante 1 h y después se separó la resina del sobrenadante.

Para evaluar si hubo una interacción de la mezcla de proteínas y los ligandos se determinó la cantidad de proteína y se calculó la actividad específica en los sobrenadantes.

C. 5. Análisis estadístico

Las curvas patrón para las técnicas que las requieren se hicieron por triplicado, utilizando una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y teniendo el margen de confiabilidad que proporciona el coeficiente de correlación de la ecuación (mayor o igual a 0.9). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA); en algunos casos se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tuckey usando el programa de cómputo Statistica 5.0 (Stat Soft, Tulsa OK, EUA) con un nivel de confianza del 5%.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

D. 1. Reactividad de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina

Para poder conocer la localización de los diferentes residuos aminados de la β -lg y así determinar su grado de exposición y los posibles impedimentos estéricos, se obtuvo un modelo tridimensional de la β -lg bovina basado en las coordenadas de RMN del registro 1CJ5 del PDB (Kuwata, 1999). La β -lactoglobulina tiene un grupo amino terminal y 15 residuos de lisina, cada uno con una reactividad diferente. A pesar de que existe evidencia experimental de que la lactosilación de la β -Lg ocurre principalmente a través del grupo ϵ -amino del residuo de lisina número 47 (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998; Morgan y col., 1999b;), también la hay de que el residuo 138 es altamente reactivo (Creamer y Sawyer 2003). Por otro lado Fogliano y col. (1998) reportaron a la Lys¹⁰⁰ como una de las más reactivas y explicaron que la reactividad de los residuos de lisina dependía de su grado de exposición así como de las condiciones del medio en el que se disolviera la proteína. En el modelo obtenido (Fig. 1) se puede apreciar que los residuos de lisina 15, 37, 69 y 138 se encuentran sumamente expuestos y que por lo tanto podrían ser los más reactivos.

El docking molecular entre la lactosa y la β -lg (Figura 2) mostró que el aminoácido con una energía de interacción favorable y con mayor probabilidad de unión con la lactosa a un pH de 7.1 es la Lys¹³⁸ ($\Delta G_{\text{UNIÓN}}$ de -4.7 kcal/mol). Al realizar un docking ciego se calculan las energías de interacción de todos los aminoácidos de la proteína con el ligando (Hetényi y col., 2002), por lo que fue sumamente importante el hecho de que las energías de interacción más bajas (entre -8.2 y -4.0 kcal/mol) correspondieran únicamente a residuos de lisina y no a algún otro aminoácido. Lo anterior sugiere que son los residuos de lisina de la β -Lg los que podrían reaccionar fácilmente con la lactosa.

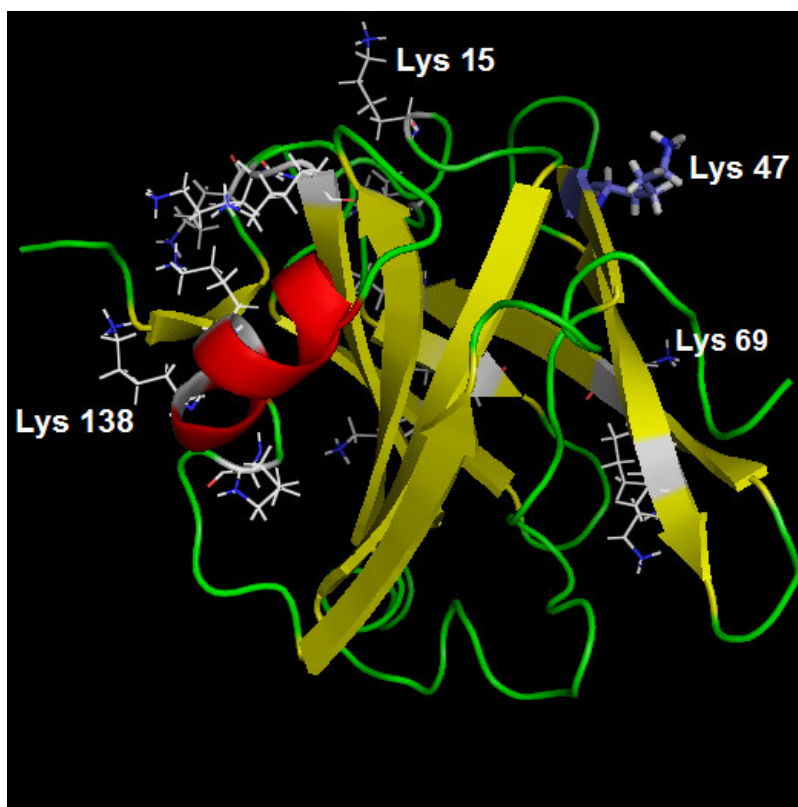


Figura 1. Modelo tridimensional de la β -lactoglobulina obtenido con el programa PyMOL, DeLano Scientific LLC, 2006. Se muestran todos los residuos de lisina siendo los más expuestos los residuos 15, 47, 69 y 138.

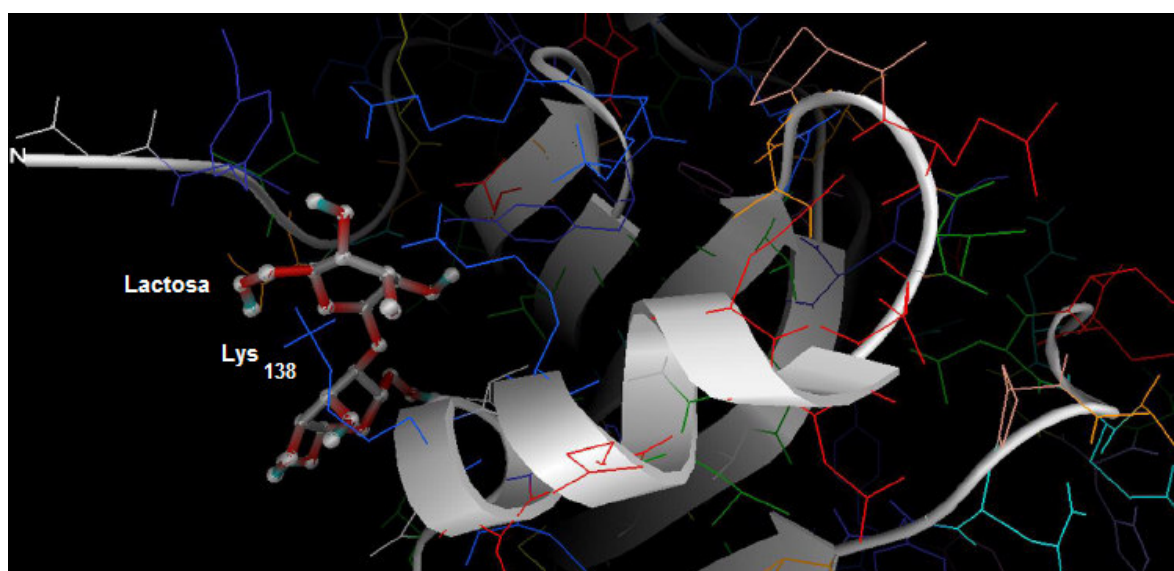


Figura 2. Docking de la lactosa y la β -lactoglobulina, la lactosa (gris y rojo) se une al residuo de lisina número 138, que es el de más baja energía y por lo tanto el más estable y probable.

Jiménez-Guzmán y col. (2006) encontraron que cuando la β -lactoglobulina se encuentra lactosilada disminuyen las interacciones entre ésta y la β -galactosidasa y por lo tanto la capacidad activadora (Jiménez-Guzmán y col., 2006), sin embargo no se sabe si la interacción entre las proteínas disminuye debido a que la lactosa unida a la β -lg impide el acceso de los sitios de interacción de la β -galactosidasa a los de la β -lactoglobulina o si los grupos amino de la β -lactoglobulina que se encuentran bloqueados con la lactosa son esenciales para la interacción con la β -galactosidasa. Por tal razón en este estudio se utilizó anhídrido succínico para bloquear los grupos amino de la β -lactoglobulina, el cual es una molécula pequeña que no significaría un impedimento estérico para el acceso a otros grupos y que permite conservar la estructura tridimensional de la β -lg cuando se encuentran succinilados menos de 10 de sus grupos amino (Hollecker y Creighton, 1982).

Para tener una idea de la afinidad de los grupos amino de la β -lg con el anhídrido succínico se realizó un docking ciego para éste y la proteína (Figura 3). Los resultados mostraron que a pH de 7.1, la Lys¹³⁸ es el único aminoácido con una energía de interacción favorable ($\Delta G_{\text{UNIÓN}}$ de -6.6 kcal/mol) para unirse con el anhídrido succínico, de tal forma que éste fue utilizado como modelo para estudiar el efecto del bloqueo de los grupos amino en la actividad de la lactasa.

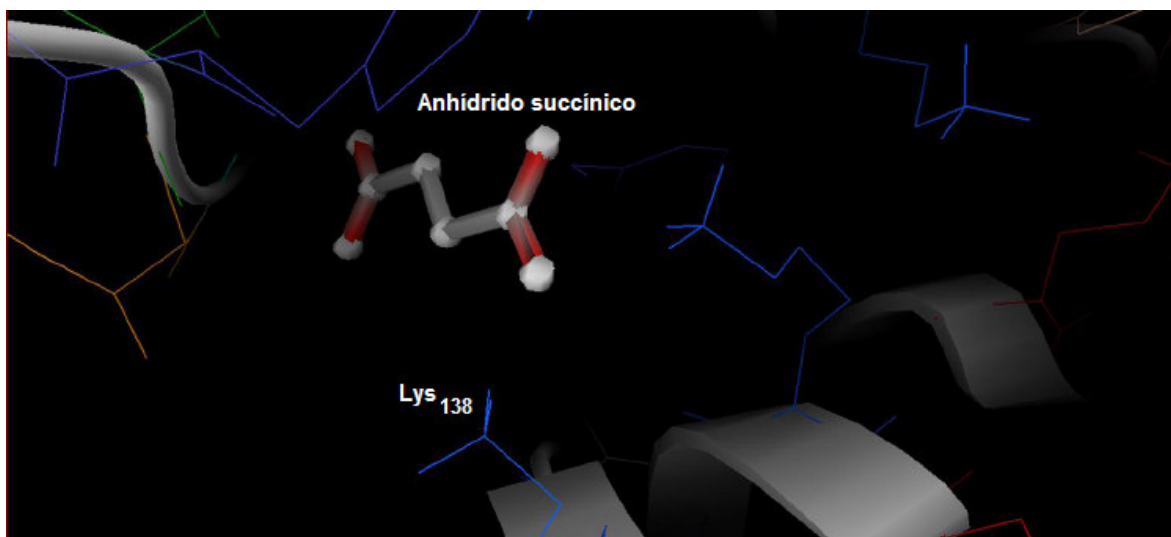


Figura 3. Docking del anhídrido succínico y la β -lactoglobulina, el anhídrido succínico (gris y rojo) se une al residuo de lisina número 138.

D. 2. Succinilación de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina

D. 2. 1. Verificación del bloqueo de los grupos amino de la β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina fue sometida a una reacción de succinilación con anhídrido succínico para bloquear los grupos amino que se encuentran posiblemente implicados en la activación de la β -galactosidasa y se determinó la efectividad de dicho bloqueo mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y urea 8M de acuerdo con el método de Hollecker y Creighton (1982).

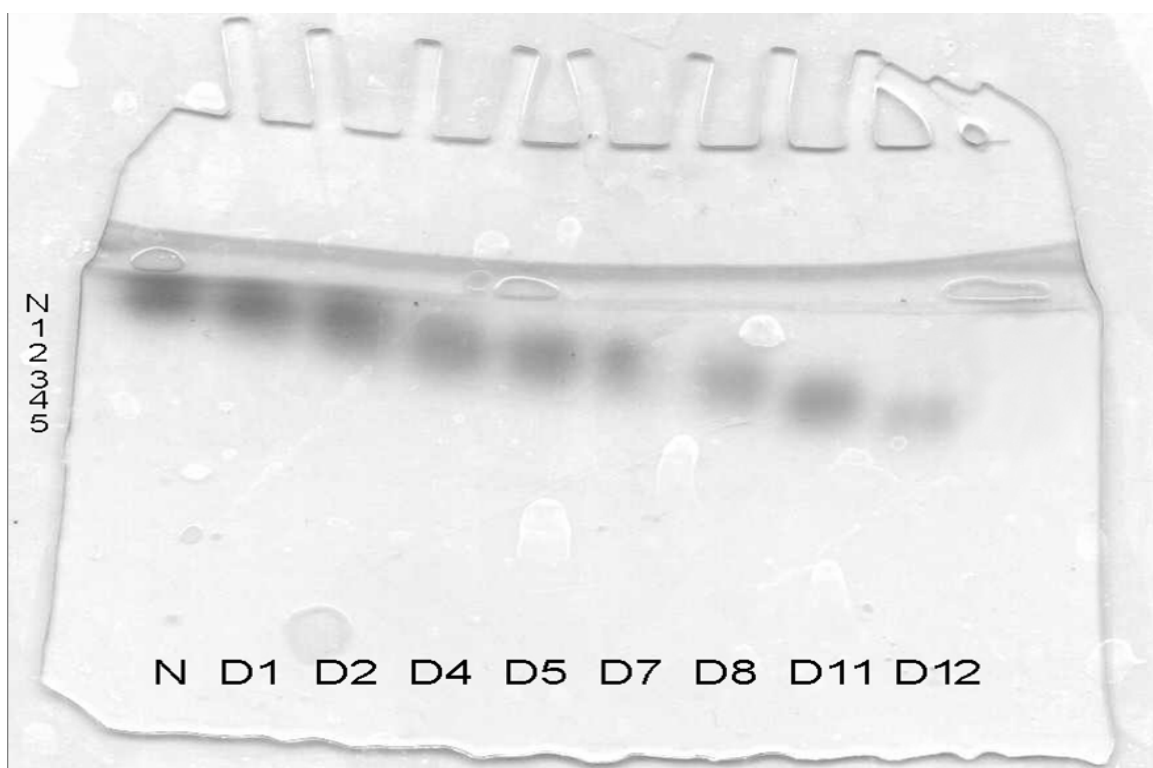


Figura 4. Electroforesis de la β -Ig nativa (N) y los diferentes derivados succinilados de β -lactoglobulina (D1-D12). Del lado izquierdo se señala el número de grupos amino que se han bloqueado en cada uno de los derivados. Gel de concentración: T= 4%, C= 4%, pH= 8.45; gel de separación: T= 11%, C= 0.4%, pH=4.7, solución amortiguadora de corrida: HCl-Tris 0.05 M, pH 4.7

La succinilación de cada uno de los grupos amino provoca un cambio en la migración de la proteína (R_f) debido al cambio en la carga de la proteína conforme se va succinilando. Cuando se analizaron los cambios en el R_f de los diferentes derivados (Figura 4) se observó que a partir de D1 hasta D12 la cantidad de grupos amino bloqueados varió de uno hasta cinco. Los resultados muestran que en los dos primeros derivados succinilados (Figura 4, D1 y D2) se puede observar una banda correspondiente a un grupo amino bloqueado, también se puede ver que aún se encuentra presente la β -lg nativa, mientras que en el resto de los derivados (D4-D12), ya no se logra observar la β -lg nativa. Los derivados 2 y 4 (D2 y D4) contienen dos y tres grupos amino bloqueados respectivamente, siendo la principal diferencia entre ellos la presencia de β -lg nativa

D. 2. 2. Efecto del bloqueo de los grupos amino de la β -lactoglobulina en la actividad de la β -galactosidasa

De acuerdo con Hollecker y Creighton (1982) la succinilación es un método que permite bloquear gradualmente los grupos amino de la β -lg sin cambiar su conformación nativa al menos hasta que 10 de estos grupos se han succinilado (Hollecker y Creighton, 1982). Para determinar si los grupos amino de los residuos de lisina de la β -lg participan en la activación de la β -gal, se midió la actividad de lactasa en presencia de β -lg nativa y β -lg con diferentes grados de succinilación y se compararon con un control que no tenía proteína, también se utilizó un control de β -lg neutralizada con KOH (β -lg_{KOH}) para determinar si había algún efecto del agente neutralizante en la reacción de succinilación sobre la actividad de la β -gal.

La presencia de β -lg nativa provocó un aumento del 47% en la actividad de la β -gal con respecto al control ($\alpha=0.0003$) (Figura 5) confirmando con esto el efecto activador de la β -lg reportado por Jiménez-Guzmán y col. en 2006. No se encontró diferencia significativa en la actividad de la β -gal en presencia de β -lg_{KOH} con respecto a la β -lg nativa ($\alpha=0.2069$) indicando que el KOH no tiene efecto alguno sobre la actividad de la enzima. Cuando se midió la actividad enzimática en presencia de los primeros derivados succinilados, se

observó el efecto activador (Fig. 6, D1-D2). Sin embargo, en presencia del resto de los derivados succinilados, la actividad disminuyó hasta el valor del control sin encontrarse diferencia significativa con respecto a él ($\alpha=0.0717$) (Fig. 6, D4-D12).

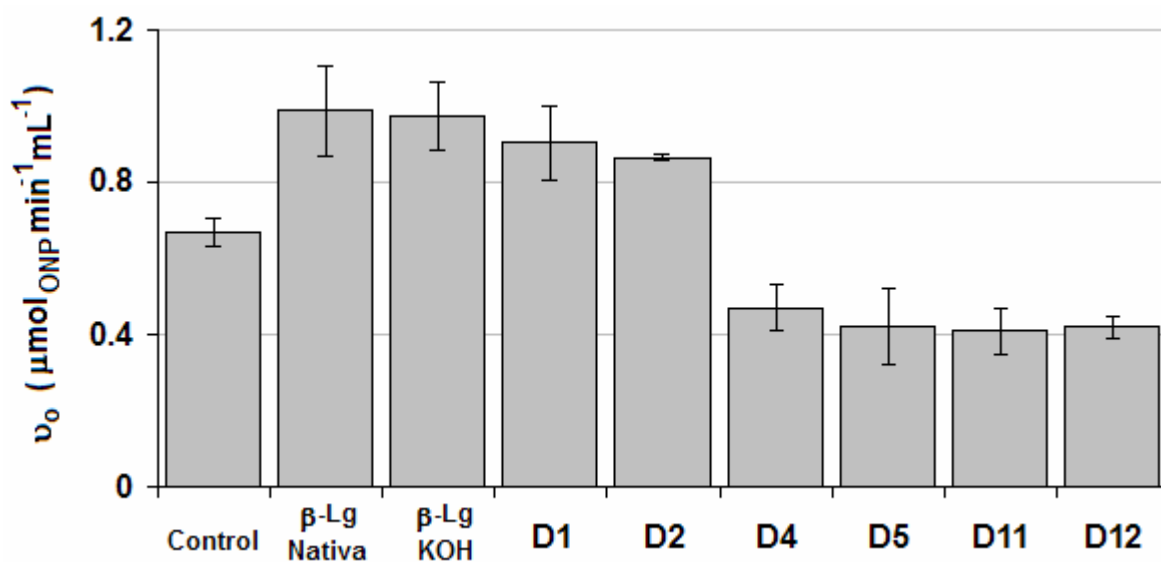


Figura 5. Actividad de β -galactosidasa, en presencia de β -lg nativa y β -lg con diferentes grados de succinilación (D1-D12). El control corresponde a la actividad medida en solución amortiguadora sin proteína; β -lg KOH corresponde a la solución de β -lg neutralizada.

De acuerdo con los resultados del seguimiento de la succinilación de los grupos amino de la β -lg es claro que mientras la β -lg nativa todavía se encontraba presente en el medio de reacción se observó el efecto activador aún cuando ya había β -lg succinilada (Figuras 4 y 5, D1 y D2). Este hecho se debe a que a que pequeñas cantidades β -lg nativa pueden activar a la enzima (Ortiz, 2004). Por otro lado cuando se logró succinilar toda la proteína en al menos un grupo amino y la β -lg nativa ya no se encontraba presente en el medio de reacción, el efecto activador se perdió (Figuras 4 y 5, D4-D12). En este punto, los grupos amino más reactivos de la β -lg se encontraban bloqueados, sugiriendo que la pérdida de la capacidad activadora se debe al bloqueo de los grupos amino.

D. 3. Estudio de las interacciones entre la β -lactoglobulina nativa y succinilada y la β -galactosidasa por Cromatografía de Afinidad

La cromatografía de afinidad es un método utilizado ampliamente para la purificación de proteínas basándose en la afinidad de la proteína por un ligando específico el cual se inmoviliza en un soporte. Se hace pasar una mezcla de proteínas que contiene entre ellas a la proteína de interés y si esta tiene afinidad por el ligando interactúa con aquél y el resto de las proteínas pasan a través de la columna dejando únicamente la proteína de interés.

D. 3. 1. Purificación de la β -lactoglobulina succinilada.

La solución de β -lactoglobulina que se succiniló para inmovilizarla en la resina fue preparada de tal forma que se procurara que no se encontrara β -lg nativa presente en el medio de reacción según el derivado 4 (Figura 4). Las 20 fracciones recolectadas del rotofor presentaron un rango de pH de 2.1 a 9.5 y se les realizó una electroforesis para determinar en cuál de las fracciones se encontraba la β -lactoglobulina succinilada sin β -lg nativa (Figura 6).

En la Figura 6 se presentan las primeras 9 fracciones recolectadas del rotofor y se puede apreciar que la β -lactoglobulina (N) se encuentra presente en todos los carriles, a partir del segundo carril (R1) se observa una banda en la parte inferior que corresponde a la β -lactoglobulina succinilada. Hasta este punto no fue posible separar a la β -lactoglobulina succinilada por este método quizá porque existían tantas especies distintas por tener diferentes grupos amino bloqueados que el punto isoeléctrico fue muy variado en todos los casos. Así que se decidió tomar las 20 fracciones, juntarlas y agregar una cantidad adicional de anhídrido succínico (38.8 mg, según el derivado 4) para que toda la β -lactoglobulina se succinilara y desapareciera por completo la β -lactoglobulina nativa.

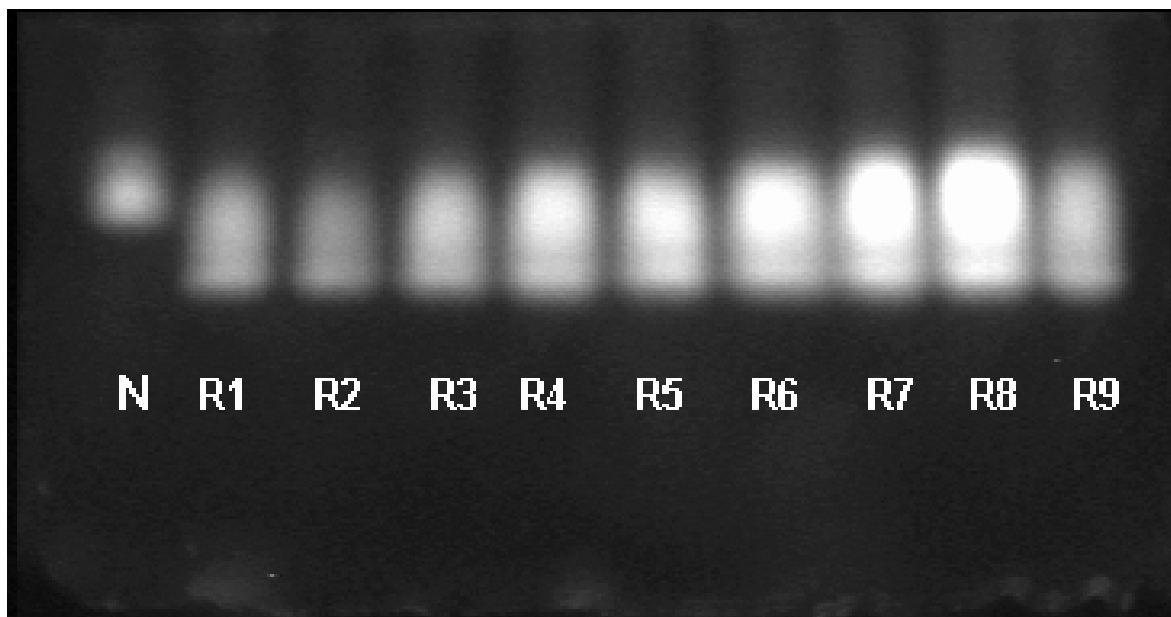


Figura 6. Electroforesis de β -lactoglobulina nativa (N) y de las primeras 9 fracciones recolectadas del equipo Rotofor (R1-R9). Gel de concentración: T= 4%, C= 4%, pH= 8.45; gel de separación: T= 11%, C= 0.4%, pH=4.7, solución amortiguadora de corrida: HCl-Tris 0.05 M, pH 4.7

En la Figura 7 se puede observar que la banda correspondiente a la β -lg nativa desapareció y que sólo se encontraba la proteína succinilada (Fig. 7, S)

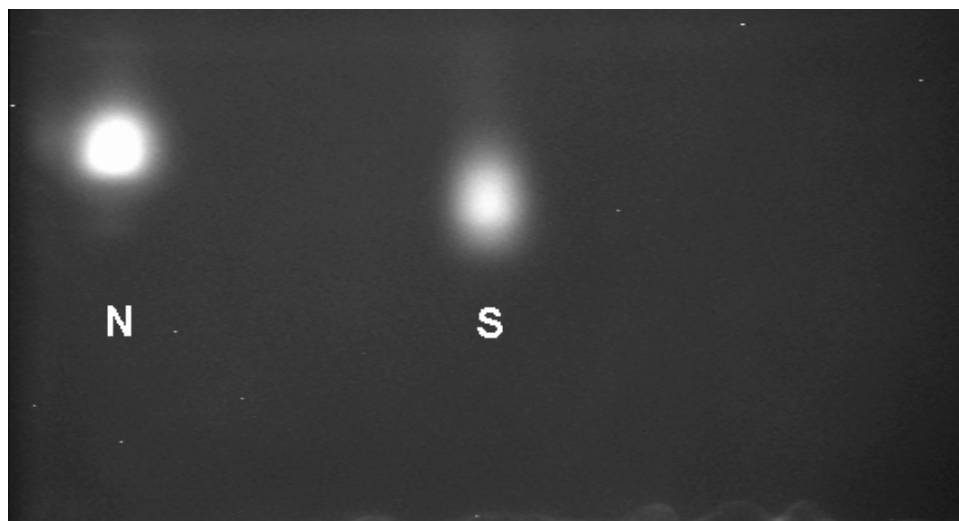


Figura 7. Electroforesis de la β -lactoglobulina nativa (N) y β -lactoglobulina succinilada con exceso de anhídrido succínico (S). Gel de concentración: T= 4%, C= 4%, pH= 8.45; gel de separación: T= 11%, C= 0.4%, pH=4.7, solución amortiguadora de corrida: HCl-Tris 0.05 M, pH 4.7

Una vez preparada la β -lactoglobulina succinilada se hicieron las diluciones necesarias para preparar soluciones de proteína tanto succinilada como nativa de 2 mg/mL que se hicieron reaccionar con la resina para inmovilizarlas.

D. 3. 2. Inmovilización de la β -lactoglobulina nativa y la β -lactoglobulina succinilada

La cromatografía de afinidad es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de proteínas que son afines a una molécula (ligando) que se inmoviliza en un soporte (matriz). Se usó como matriz una resina acrílica con grupos oxirano activos (Eupergit®) y como ligando β -lactoglobulina nativa y β -lactoglobulina succinilada. Tanto la β -lactoglobulina nativa como la β -lactoglobulina succinilada fueron inmovilizadas en la resina. La eficiencia de la inmovilización se calculó midiendo la cantidad de proteína presente antes de la inmovilización y se comparó con la cantidad de proteína presente en el sobrenadante después de la inmovilización (30 h, 25°C, 250 rpm). Se logró inmovilizar 80.61% de la β -lactoglobulina nativa y 40.4% de la β -lactoglobulina succinilada (Figura 8) lo cual corresponde a 0.54 y 0.32 μ moles de proteína/g de Eupergit respectivamente.

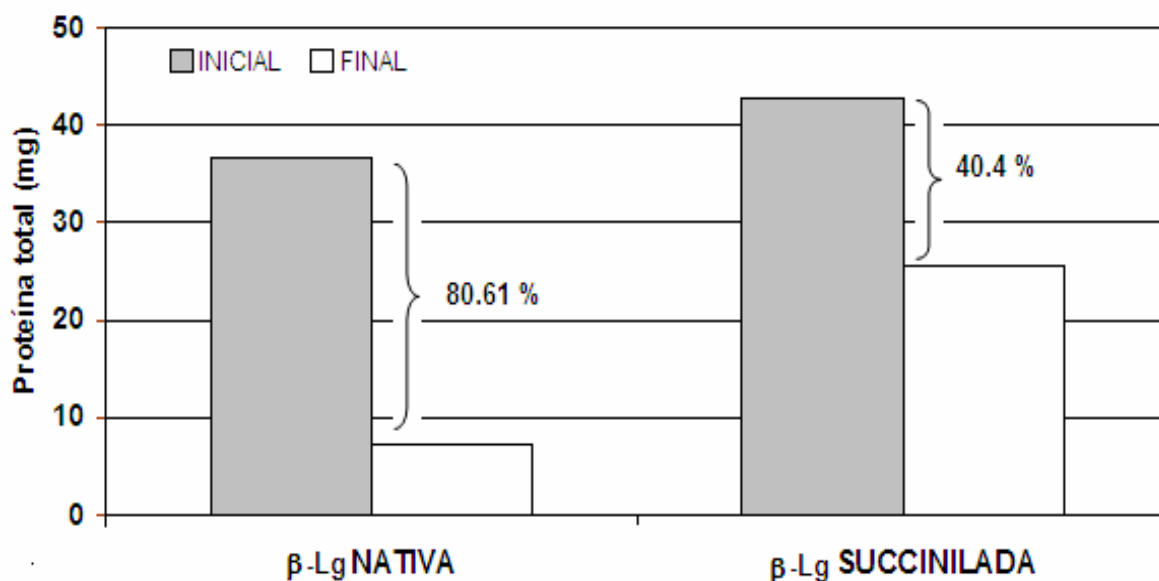


Figura 8. Eficiencia de la inmovilización de la β -lactoglobulina nativa y la β -lactoglobulina succinilada en una resina comercial con grupos oxirano activos (Eupergit®)

La diferencia en la eficiencia de la inmovilización de ambos ligandos se debe principalmente al hecho de que los grupos oxirano de la resina reaccionan con grupos amino libres, de tal forma que al tener la β -lg succinilada menos grupos amino libres para reaccionar con la resina, la cantidad de ligando que se logra inmovilizar es menor con respecto a la inmovilización de β -lg nativa cuyos grupos amino están intactos y pueden interactuar más fácilmente con la resina.

El hecho de que se haya logrado inmovilizar β -lactoglobulina succinilada demuestra que no todos los grupos amino de la proteína se encontraban bloqueados ya que pudieron reaccionar con los grupos oxirano de la resina y por ello se logró inmovilizar la proteína succinilada.

D. 3. 3. Interacción entre la β -lactoglobulina nativa y succinilada y la β -galactosidasa

Para saber si la β -galactosidasa era capaz de unirse a la β -lactoglobulina se realizaron los experimentos de cromatografía haciendo interactuar la mezcla comercial Maxilact LX 5000® con los ligandos inmovilizados en la resina. Se prepararon dos controles, uno para cada proteína inmovilizada en los cuales se sustituyó la proteína por glicina para bloquear los grupos oxirano de la resina que pudieran quedar libres.

Se hicieron interactuar 0.1 g de Eupergit® (con β -lactoglobulina nativa, β -lactoglobulina succinilada y glicina inmovilizadas) con soluciones de Maxilact LX 5000®, la cual es una mezcla de 8 proteínas de las cuales dos tienen actividad de lactasa, preparadas de tal forma que en todas se tuviera una relación de $0.05 \text{ mol}_{\beta\text{-galactosidasa}}/\text{mol}_{\beta\text{-lactoglobulina}}$ (nativa o succinilada) inmovilizada en la resina.

Cuando se usó tanto β -Lg nativa como β -Lg succinilada como ligando se observó que la cantidad de proteína disminuyó con respecto a la cantidad inicial y al control (Figura 9),

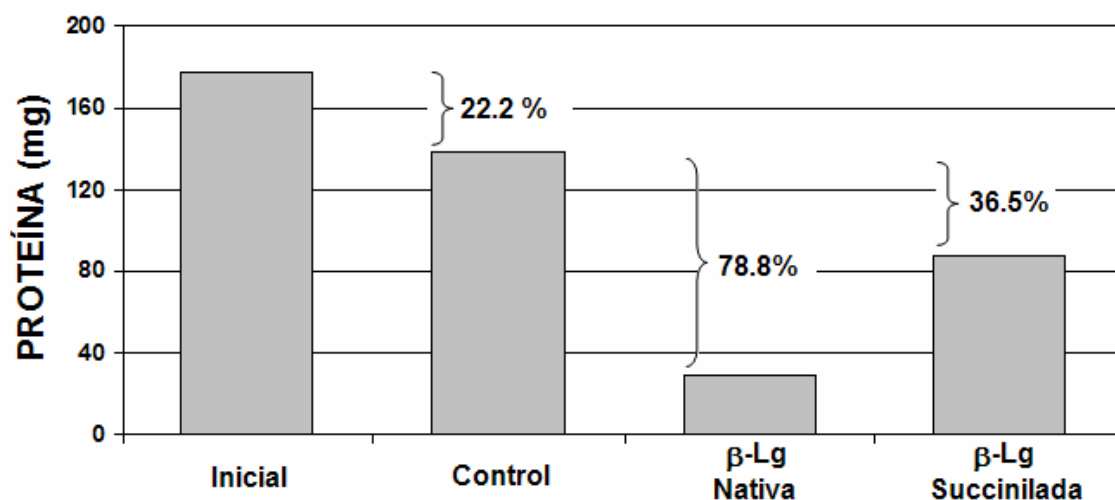


Figura 9. Proteína presente antes (Inicial) y después de la cromatografía de afinidad (Control, β -Lg nativa y β -Lg succinilada). El control corresponde a la resina sin ligando, sólo bloqueada con glicina 0.05 M

La disminución de proteína en el control con respecto a la inicial indica que no todos los grupos oxirano de la resina se encontraban bloqueados con glicina. Por otro lado la disminución de proteína después de la interacción con el soporte respecto a la inicial y al control cuando se usó como ligando tanto β -Lg_N como β -Lg_{SUCC} indica que las proteínas de la mezcla comercial Maxilact LX 5000®, están interactuando con los ligandos.

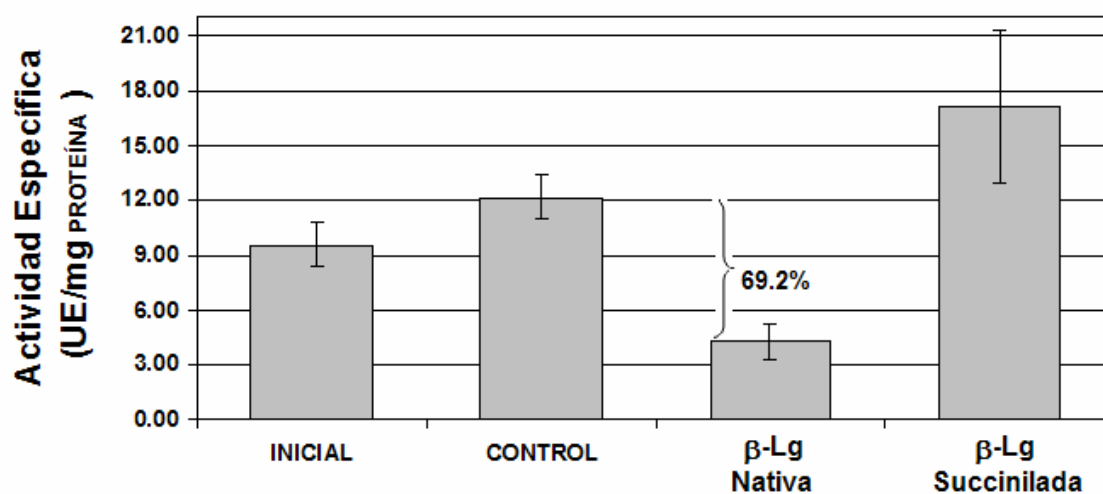


Figura 10. Actividad específica antes (Inicial) y después de la cromatografía de afinidad (Control, β -lg nativa y β -lg succinilada). El control corresponde a la resina sin ligando, sólo bloqueada con glicina 0.05 M. No hay diferencia significativa entre el control y la inicial.

Se calculó la actividad específica inicial y en el sobrenadante después de hacer interactuar la resina y la mezcla comercial Maxilact LX 5000® para saber si la interacción entre la proteína pegada en la resina con β -lactoglobulina nativa y con β -lactoglobulina succinilada inmovilizadas era específica o no. Se encontró que no hubo un cambio significativo en la actividad específica del control con respecto a la inicial ($\alpha=0.3362$) lo que indica que la interacción de las proteínas de la preparación comercial con el soporte sin ligando no era específica (Figura 10). Por otro lado, cuando se hizo interactuar la mezcla comercial Maxilact LX 5000® con la resina que tenía como ligando a la β -lactoglobulina nativa la actividad específica del sobrenadante disminuyó significativamente en un 69.2 % ($\alpha=0.0037$) con respecto al control lo cual indica que hubo una unión específica de la β -galactosidasa con la β -lactoglobulina nativa. Sin embargo, cuando se utilizó como ligando la β -lactoglobulina succinilada, no se observó diferencia significativa en la actividad específica con respecto al control ($\alpha=0.1184$).

Lo anterior indica que la interacción de las proteínas de la preparación comercial Maxilact LX 5000® no es específica y que es con la resina con la que interactúan y no con la β -lactoglobulina succinilada, demostrando con ello que la β -lactoglobulina succinilada no es capaz de unirse con la β -galactosidasa.

El hecho de que a medida que los grupos amino de la β -lactoglobulina se bloquean por medio de la reacción de succinilación, el efecto activador sobre la β -galactosidasa se pierde (Figura 5) y el hecho de que al mismo tiempo que se pierde el efecto activador, también se pierde la capacidad de la proteína succinilada para unirse a la β -galactosidasa, demuestra que la activación de la enzima está estrechamente relacionada con las interacciones proteína-enzima.

E. CONCLUSIONES

Se demostró que el bloqueo de los grupos ϵ -amino de la β -lactoglobulina provoca la disminución de las interacciones entre la β -lactoglobulina y la β -galactosidasa al mismo tiempo que desaparece el efecto activador. Esto permitió comprobar que el efecto activador de la β -lactoglobulina sobre la β -galactosidasa se debe a la interacción entre ambas proteínas y que para dicha interacción los grupos amino de los residuos de lisina de la β -lactoglobulina juegan un papel determinante.

F. PERSPECTIVAS

Con este estudio se ha logrado confirmar que el efecto activador de la β -galactosidasa por la sola presencia de la β -lactoglobulina. También se determinó que dicha activación se debe a la interacción que se da entre ambas proteínas, fenómeno que no es común y que aquí se demuestra. Por otro lado, la evidencia de que los grupos amino de la β -lg son esenciales para que dichas interacciones se efectúen y por consiguiente se produzca el efecto activador, abre paso a una serie de nuevos cuestionamientos sobre cómo es que estos grupos participan en la interacción ya que hasta este punto no es posible saber si son los grupos amino de un solo residuo de lisina los que participan en esta unión o son varios los que lo hacen. A pesar de que los estudios realizados con ayuda los modelos tridimensionales son de suma utilidad y nos acercan a conocer la identidad de los residuos involucrados, es necesario sustentar estos hallazgos con evidencia experimental, tarea que representa un reto para dar continuidad al trabajo aquí presentado.

En estudios posteriores podría determinarse tanto la identidad de los grupos amino de la β -lg que participan en la interacción con la lactasa así como el o los sitios de esta última en los que se lleva a cabo la interacción, valiéndose nuevamente de modelos tridimensionales que han resultado ser indispensables para tener una idea de los grupos reactivos, al mismo tiempo que podría utilizarse la espectrometría de masas por ionización para identificar los grupos reactivos así como diferentes técnicas para la sustitución de los aminoácidos que parezcan involucrados en las interacciones como el bloqueo químico o la ingeniería de proteínas.

Por otro lado, técnicas para el estudio de proteínas como el dicroísmo circular podrían también ser útiles para evaluar el efecto que la interacción entre dos proteínas pudiera tener en la estructura y así obtener más información sobre el fenómeno de activación de una enzima por su interacción con una proteína.

G. BIBLIOGRAFÍA

- Alais, C., *Ciencia de la Leche Principios de la Técnica Lechera*, CECSA, México, D.F., (1991), Cap. 1, 5-38.
- Amiot, J., *Ciencia y Tecnología de la Leche Principios y aplicaciones*, Acribia, Zaragoza, España (1991), 18-37.
- Belitz, H. D. y Grosch, W., *Química de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, España (1997), 73-75, 551-52.
- Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analyt. Biochem.*, 72 (1976), 248-254.
- Chang, B., y Mahoney R. R., "Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: Evidence for hydrophobic interactions", *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 22 (1995), 203-214.
- Chen, J. Y. y Tsen, H. Y., "Effect of milk and milk constituents on heat stability of lactase from *Saccharomyces lactis*", *J. Chinese Agric. Chem. Soc.*, 29, 4 (1991), 456-464.
- Creamer, L. K., y Sawyer, L., "Beta Lactoglobulin", en *Enciclopedia of Dairy Sciences Vol. 3*, Roginski, H., Fuquay, J. W. y Fox, P. F., Academic Press, Londres, Inglaterra (2003), 1932-1938.
- Creighton, T. E., *Protein Structure A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Great Britain (1989), 148-153.
- Del Moral- Ramírez, E., "Efecto de los grupos amino de la β -lactoglobulina sobre la actividad de la β -galactosidasa" (Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005), 4-43.
- Fennema, O. R., *Química de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, España (2000), 204-206, 394-397.
- Fisher, A. y Salí, A., 2003, "Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models", *Methods Enzymol.*, 374, 461-491.
- Fogliano, V., Monti, M. S., Visconti, A., Randazzo, G., Facchiano, M. A., Colonna, G. y Ritieni, A. "Identification of a β -lactoglobulin lactosylation site", *Biochim Biophys Acta*, 1338 (1998), 295-304.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., **Cap. 9: Heat induced changes in milk**, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic and Professional Press, Reino Unido (1998), 21-39, 146-150, 188-192.
- French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B. y Green-Church, K. B., "Maillard Reaction Induced Lactose Attachment to Bovine β -lactoglobulin: Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Examination", *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002), 820-823.
- García Garibay, M. y Gómez Ruiz, "Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos", *Rev. Invest. Clin.*, 48 (supl.) (1996), 51-61.

- García-Garibay, M., Gómez-Ruíz, L., Revah Moissev, S., “Biotecnología de productos lácteos,” en *Biotecnología Alimentaria*, García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R. y López-Munguía, A., Limusa, México (1993), Cap. 9, 153-161.
- Greenberg, N. A., y Mahoney, R. R., “The activity of lactase *Streptococcus thermophilus* in milk and whey”, *Food Chem.*, 15, 4 (1984), 307-313.
- Hetényi, C. y van der Spoel, D., 2002, “Efficient docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site”, *Protein Science*, 11: 1729-1737.
- Hollecker, M. y Creighton, T. E., “Effect on Protein Stability of Reversing the Charge on Amino Groups”, *Biochim. Biophys. Acta*, 701 (1982), 395-404.
- Hollecker, M. y Creighton, T. E., “Counting Integral Numbers of Amino Groups per Polypeptide Chain”, *FEBS Lett.*, Vol. 119, 1 (1980), 187-189.
- Jiménez-Guzmán J., Sarabia-Leos C., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., López-Munguía A., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. “Interaction between β -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity”. *Int. Dairy J.*, 16, 10 (2006), 1169-1173
- Jiménez-Guzmán, J., “Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*,” (Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, 2003), 1-77.
- Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía Canales, A., Gómez-Ruiz L. y García-Garibay, M., “Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment”, *J. Dairy Sci.*, 85 (2002), 2497-2502.
- Klapper, M. H., y Koltz, I. M., “Acylation with Dicarboxylic Acid Anhydrides”, *Methods Enzymol.*, 25 (1972), 531-536.
- Kosikowski, F. y Wiezbicki, L., “Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase”, *J. Dairy Sci.*, 56, 1 (1973), 146-148.
- Krieger, E., Nabours, S. B. y Vriend, G., 2003, **Cap. 25. Homology Modeling**, Structural Bioinformatics, editores: Bourne, P. E y Weissig, H., Wiley-Liss, Inc.
- Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C.A. y Goto, Y. “Solution structure and dynamics of bovine beta-lactoglobulin”, *A. Protein Sci.*, 8 (1999), 2541-2545
- Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J. and Bouhallab, S., “Characterization by Ionisation 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 (1997), 2270-2281.
- López, P., Rosado, J. L., Palma, M., González, C. y Valencia, M., “Mala digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de la leche,” *Rev. Invest. Clin.*, 48 (supl.) (1996), 15-22.
- Louquet, M. F., Bonjean-Linczowsky, Y., Keilling, J. y Wilde, R., *Leche y Productos lácteos Vaca-Oveja-Cabra*, traducción de Miguel Calvo Rebollar, Acribia, España (1991), 11-25, 53-56.
- Mandrich, L., Caputo, E., Martin, B. M., Rossi, M., & Manco, G.. “The Aes protein and the monomeric β -galactosidase from *Escherichia coli* form a non-covalent complex”, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), 48241–48247.

- Mc Murry, J., *Química Orgánica*, Thomson Editores, México (2001), 1057.
- Morgan, F., Bouhallab, S., Henry, G., Maubois, J. L. y Léonil, J., "Lactolation of β -lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry," *Int. Dairy J.*, 8 (1998), 95-98.
- Morgan, F., Gwénaële, H., Le Graët, Y., Mollé, D., Léonil, J. y Bouhallab, S., "Resistance of β -lactoglobulin-bound Lactose to the HydroLysis by β -galactosidase," *Int. Dairy J.*, 9 (1999a), 813-816.
- Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J. L. y Bouhallab, S., "Glycation of Bovine β -lactoglobulin: effect on the Protein Structure", *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34 (1999b), 429, 435.
- Morgan, F., Vénien, A., Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J., Peltre, G. y Levieux, D., "Modification of Bovine β -lactoglobulin by Glycation in a Powered State or in an Aqueous Solution: Immunochemical Characterization", *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999), 4543, 4548.
- Ortiz-Chao, P. A., "Estudio de la interacción de las proteínas del suero de leche con la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y su efecto en la actividad" (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México (2004), 48-80.
- Sawyer, L., Barlow, P. N., Boland, M. J., Creamer, L. K., Helen D., Edwards, P. J.B., Holt, C., Jameson, G. B., Kontopidis, G., Norris, G. E., Uhrínová, S. y Wu, S., Erratum to: "Milk protein structure- what can it tell the dairy industry?", *Int. Dairy J.*, 12 (2002b), 709.
- Spreer, E., *Lactología Industrial. Leche Preparación y elaboración. Máquinas, Instalaciones y aparatos. Productos lácteos*, traducción de Oscar Dignoes Torres-Quevedo, Acribia, España (1991), 11-21.
- Varnam, A. H. and Sutherland, J. P., *Milk and milk Products Technology, Chemistry and Microbiology*, Chapman and Hall, Great Britain (1994), 1-10
- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S., *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*, Acribia, España (2001) 39-43, 91-94, 109-114.
- Walstra, P., Jennes, J., *Química y Física Lactológica*, traducción de Prof. Dr. Bernabé Sanz Pérez, Acribia, España (1984), 84-105.
- Wendorf, W. L., Amundson, C. C., y Olson, N. F., "The effect of heath treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the enzyme lactase", *J. Milk Food Technol.*, 22, 9 (1970), 377-379.
- Wendorf, W. L., Amundsen, C. H., y Olson, N. F., y Garver, J. C., "Use of yeast β -galactosidase in milk and milk products", *J. Milk Food Technol.*, 34,6 (1971), 294.

H. APÉNDICES

H. 1. Abreviaturas

AE: Actividad específica (UE/mg)

β -gal: β -galactosidasa

β -lg: β -lactoglobulina

β -lg_{SUCC}: β -lactoglobulina succinilada

β -lg_N: β -lactoglobulina nativa

Cys^{66, 106, 119, 121, 166}: Cisteínas 66, 106, 119, 121 y 166 de la β -lactoglobulina

Lys⁴⁷: Lisina 47 de la β -lactoglobulina

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ONP: *o*-nitrofenol

ONPG: *o*-nitrofenil- β -D-galactósido

PDB: Protein Data Bank

***R_f*:** Coeficiente de correlación en electroforesis

SA: Seroalbúmina

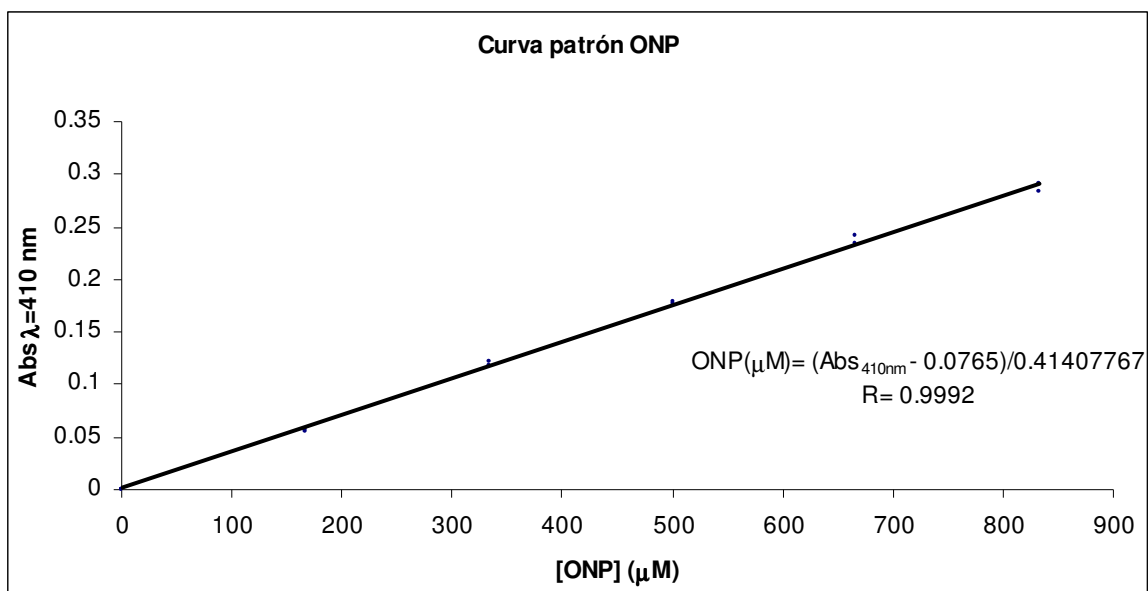
SH: Grupo sulfhidrilo

UE: Unidades enzimáticas en 1 mL de medio de reacción

v_0 : Actividad enzimática ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{ min}^{-1}$)

H. 2. Curvas Patrón

1.- Curva Patrón de ONP



2.- Curva Patrón de β -lg por el método de Bradford

