

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

**IZTAPALAPA**



**Casa abierta al tiempo**

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**

**“Estudio sobre la interacción entre la  $\beta$ -Lactoglobulina y la  $\beta$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y el Papel que Juegan los Aminoácidos de las Proteínas en la Interacción y el Efecto Activador sobre la Enzima”**

**T E S I S**

**para obtener el grado de:**

**Doctora en Biotecnología**

**P R E S E N T A:**

**M. en B. Elizabeth Del Moral Ramírez**

**Directora:**

**Dra. Judith Jiménez Guzmán**

**México D. F., Marzo de 2012**

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

México D.F. a 14 de Marzo de 2012

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

“Estudio sobre la interacción entre la  $\beta$ -Lactoglobulina y la  $\beta$ -Galactosidasa de  
Kluyveromyces lactis y el Papel que Juegan los Aminoácidos de las Proteínas en la  
Interacción y el Efecto Activador sobre la Enzima”

que presentó

M. en B. Elizabeth Del Moral Ramírez

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Judith Jiménez Guzmán

Asesor: Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez

Asesor: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

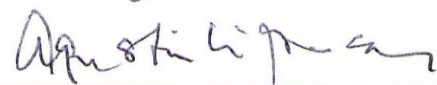
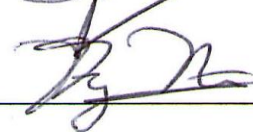
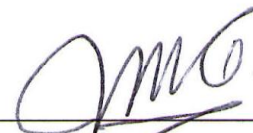
Jurado:

Presidente: Dr. José Mariano García Garibay

Secretaria: Dra. María de los Dolores Reyes Duarte

Vocal: Dr. Agustín López Munguía Canales

Vocal: Dr. Julio Lenin Domínguez Ramírez



ÍNDICE

	<u>Página</u>
Resumen.....	1
Abstract.....	2
A. Introducción.....	3
B. Antecedentes .....	6
B. 1. Composición general de la leche.....	6
B. 1. 1. Proteínas de la leche.....	7
B. 1. 1. 1. Caseínas.....	8
B. 1. 1. 2. Proteínas del suero.....	9
B. 1. 1. 2. 1. $\beta$ -Lactoglobulina.....	10
B. 1. 1. 2. 1. 1. Succinilación.....	12
B. 1. 2. Hidratos de carbono.....	14
B. 1. 2. 1. Lactosa.....	14
B. 2. Reacción de Maillard.....	15
B. 3. Lactosilación.....	16
B. 4. Hidrólisis de la lactosa.....	17
B. 5. $\beta$ -Galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	18
B. 5. 1. Efecto de la $\beta$ -lactoglobulina en la actividad de la $\beta$ -galactosidasa de <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	18
B. 6. Esterificación de proteínas .....	20
B. 7. Uso de programas de cómputo para la construcción de un modelo tridimensional y docking de una proteína.....	20

<b>C.</b>	Objetivos.....	22
	C. 1. Objetivo general .....	22
	C. 2. Objetivos particulares.....	22
<b>D.</b>	Resultados.....	23
	D. 1. Role of Lysine $\epsilon$ -Amino Groups of $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of <i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -Galactosidase.....	23
	D. 2. Determination of the probable interaction site of bovine $\beta$ -lactoglobulin dimer with electrophilic molecules.....	29
	D. 3. Effect of pH on the interaction of $\beta$ -lactoglobulin with <i>Kluyveromyces</i> <i>lactis</i> $\beta$ -galactosidase and its effect on enzymatic activity.....	41
	D. 4. Role of carboxyl groups of <i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -galactosidase in the interaction with $\beta$ -lactoglobulin and its activating effect.....	54
<b>E.</b>	Discusión.....	70
<b>F.</b>	Conclusiones.....	75
<b>G.</b>	Referencias.....	77

---

**RESUMEN**

Algunos reportes han establecido el efecto activador de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -lg) sobre la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (KL $\beta$ -gal), sugiriendo que la interacción entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal podría ser la responsable de este efecto. El objetivo de este trabajo fue estudiar la interacción entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal para tratar de determinar su efecto en la activación y los factores que influyen en ella así como identificar los residuos de ambas proteínas responsables de dicha interacción.

Por medio de la succinilación de la  $\beta$ -lg y la esterificación de la KL $\beta$ -gal se demostró que los residuos de lisina de la  $\beta$ -lg y los residuos carboxilados de la KL $\beta$ -gal son indispensables tanto para la interacción entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal como para la activación, por lo que muy probablemente la interacción suceda por la vía de un ataque nucleofílico. Los resultados de docking ciego de la  $\beta$ -lg con lactosa y anhídrido succínico usados como ligandos modelo de electrófilos sugieren que la Lys<sup>138</sup> de un monómero y la Lys<sup>141</sup> del otro son los que muestran una mayor probabilidad de interactuar con ambos (energías finales de docking o EFD de -3.30 y -3.11 kcal/mol para la lactosa y el anhídrido succínico respectivamente). Por otro lado al realizar estudios de docking ciego para la KL $\beta$ -gal usando lisina como ligando modelo de nucleófilo se encontró que el aminoácido con mayor probabilidad de participar en la interacción es el Glu<sup>592</sup> (EFD=-4.5kcal/mol).

Se encontró que el estado dimérico de la  $\beta$ -lg es esencial tanto para la interacción como para la activación de la enzima. Es probable que la formación del dímero de la  $\beta$ -lg sea necesaria para fortalecer las interacciones mediante la participación de la Lys<sup>138</sup> de uno de los monómeros y la Lys<sup>141</sup> del otro para formar una estructura tipo “pinza” que podría estabilizar los ligandos mediante la formación de puentes de hidrógeno para que el ataque nucleofílico pueda llevarse a cabo. Al estudiar el efecto del pH en la interacción de las proteínas y en la activación se observó que ambas son más fuertes a pH 7.0 y completamente ausentes a valores de pH de 6.0 y 8.5, lo cual coincide con la disociación del dímero de  $\beta$ -lg. También se observó un desplazamiento del pH óptimo de 7.5 (solo solución amortiguadora), a 7.0 (en presencia de  $\beta$ -lg) lo cual sugiere que a este pH la fuerte interacción entre las proteínas podría ayudar a alcanzar una conformación de la KL $\beta$ -lg más activa en la que el sitio activo sería más accesible para el sustrato.

**ABSTRACT**

Some reports have established the activating effect of bovine  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) on *Kluyveromyces lactis*'  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal) activity, suggesting that the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal could be responsible for this effect. The aim of this work was to study the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal in order to determine the effect on the activation and the factors that affect it as well as to identify the residues involved.

Succinylation of  $\beta$ -lg and esterification of KL $\beta$ -gal demonstrated that lysine residues of  $\beta$ -lg and carboxyl residues of KL $\beta$ -gal are essential for both, the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal and the activation of KL $\beta$ -gal. Blind docking of  $\beta$ -lg with either lactose or succinic anhydride used as electrophile model ligands, suggested that Lys<sup>138</sup> from one monomer and Lys<sup>141</sup> from the other are the most likely to react with both (final docking energies or FDE of -3.30 y -3.11 kcal/mol for lactose and succinic anhydride, respectively). On the other hand blind docking of KL $\beta$ -gal with lysine used as nucleophile model ligand, showed that Glu<sup>592</sup> is the most probable to be involved in the interaction (FDE= -4.55 kcal/mol).

It was found that the dimeric form of  $\beta$ -lg is essential for both, the interaction and the activation of the enzyme. It is very likely that the formation of the dimer of  $\beta$ -lactoglobulin is necessary to strengthen the interactions since, as predicted by docking, Lys<sup>138</sup> from one of  $\beta$ -lg monomers and Lys<sup>141</sup> from the other form a claw-like structure that may stabilize the ligands by the formation of hydrogen bonds so that the nucleophilic attack may take place. When the effect of pH on the interaction and on the activation was studied, it was observed that both are stronger at pH 7.0 but completely absent at pH values of 6.0 and 8.5 as well as the dimer is formed and then dissociated. It was observed that the optimum pH gets shifted from 7.5 (buffer) to 7.0 (with  $\beta$ -lg) suggesting that at this pH the strong interaction with  $\beta$ -lg promotes a KL $\beta$ -gal conformation in which the active site is better suited for catalysis.

## A. INTRODUCCIÓN

La  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (EC 3.2.1.23) (KL $\beta$ -gal) es la enzima más ampliamente utilizada en industria láctea para resolver tanto el problema de intolerancia a la lactosa como problemas técnicos relacionados con la baja solubilidad de la lactosa y su tendencia a la cristalización que generan 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 (Mahoney, 1997; García-Garibay, 1993; García-Garibay, 1992; Gekas & López-Leyva, 1985). Por estas razones, la hidrólisis de la lactosa en sus dos monosacáridos por la adición de la enzima  $\beta$ -galactosidasa es una alternativa para resolver estos problemas y ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista.

A pesar de ser la lactasa de mayor uso comercial, la estructura de la KL $\beta$ -lg no ha sido muy estudiada. Tello-Solis y col. (2005), determinaron mediante estudios con dicroísmo circular que la KL $\beta$ -gal es básicamente una proteína- $\beta$ , formada por un 22% de giros, 14% de láminas- $\beta$  paralelas, 25% de láminas- $\beta$  antiparalelas, 34% de estructura desordenada y tan solo un 5% de hélice- $\alpha$ .

En estudios recientes se ha observado que la presencia en el medio de reacción de seroalbúmina (SA) o  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -lg) (ambas proteínas del suero de la leche), produce un efecto activador sobre la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* de hasta 230% por parte de la  $\beta$ -lactoglobulina (Jiménez-Guzmán, 2002). Estudios realizados con cromatografía de afinidad demostraron que la KL $\beta$ -gal se une específicamente a la  $\beta$ -lg provocando la activación de la enzima (Jiménez-Guzmán y col., 2006). Por otro lado, se ha encontrado que el calentamiento de  $\beta$ -lg pura incrementa la actividad de la KL $\beta$ -gal, pero al calentarla en presencia de lactosa el efecto activador disminuye. Existen otros reportes que indican que el calentamiento de la  $\beta$ -lg en presencia de lactosa provoca una reacción entre la proteína y el azúcar, reacción conocida como lactosilación (Léonil y col., 1997), la cual provoca una disminución en la capacidad de unión entre la proteína y la enzima al mismo tiempo que disminuye la capacidad de la  $\beta$ -lg de activar a la KL $\beta$ -gal (Jiménez-Guzmán y col., 2006). Se ha demostrado que la  $\beta$ -lactoglobulina incrementa la actividad de la KL $\beta$ -gal a través de dos mecanismos diferentes: uno que depende de la liberación de grupos



sulfhidrilo durante el tratamiento térmico de la proteína desnaturalizada (Jiménez-Guzmán y col., 2002) y otro que resulta de la habilidad de la proteína nativa para unirse a la enzima (Jiménez-Guzmán y col., 2006).

Los grupos  $\epsilon$ -amino de la  $\beta$ -lg son de los grupos más expuestos y reactivos en la proteína, teniendo a los residuos de Lys<sup>47</sup> y Lys<sup>138</sup> como los más expuestos de todos los que existen en la molécula (Creamer y Sawyer, 2003). Se ha encontrado que la lactosilación de la  $\beta$ -lg se da a través de los grupos amino de la lisina, específicamente de la Lys<sup>47</sup> (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998; Morgan y col., 1999), por lo que es muy probable que dicha región de la  $\beta$ -lg también se encuentre implicada en la unión entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal.

La  $\beta$ -lg es la proteína del suero de leche de vaca más abundante, constituyendo el 50% de las proteínas del suero y el 12% del total de las proteínas de la leche de vaca (Verheul, Pedersen, Roefs, y Kruif, 1999; Fox, 2003). Cada monómero de la  $\beta$ -lg está formado por 162 aminoácidos con una masa de aproximadamente 18.3 kDa. La estructura secundaria de la  $\beta$ -lg está compuesta de ocho láminas- $\beta$  antiparalelas que forman un cáliz (Papiz, et al., 1986) seguidas de una hélice- $\alpha$  de 3 giros y terminando en una lámina- $\beta$  (Blanch, Hecht, y Barron, 1999). La  $\beta$ -lg pertenece a la familia de las lipocalinas, que está formada por proteínas extracelulares pequeñas y que son capaces de unir ligandos hidrofóbicos (Brignon y col., 1985; Monti y col., 1989; Uhrinova y col., 2000). A pesar de que la función biológica de la  $\beta$ -lg es incierta (Bell y McKenzie, 1968; Fogolari y col., 2000; Noiseux y col., 2002; Qin y col., 1998; Halpin y Richardson, 1985) ésta ha sido objeto de numerosos estudios debido a su abundancia, la facilidad para purificarla y su capacidad de unir diversos ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos, retinol, vitamina D<sub>3</sub> y péptidos (Brownlow y col., 1997; Flower y col., 2000; Fogliano y col., 1998; Noiseux y col., 2002).

Existen numerosos estudios en los que se ha intentado establecer el sitio de unión de ligandos de la  $\beta$ -lg (Noiseux y col., 2002); se han propuesto dos sitios de unión potenciales para moléculas hidrofóbicas pequeñas: uno dentro del cáliz y el otro en la superficie externa de la proteína, entre la hélice- $\alpha$  y el barril- $\beta$  (Papiz y col., 1986; Monaco y col., 1987).

La  $\beta$ -lg tiene la capacidad de alternar entre diferentes estados oligoméricos que dependen del pH del medio a través del fenómeno conocido como Transiciones de Trandford (Fox y McSweeney, 1998). Se sabe que a temperatura ambiente y valores de pH menores a 4.0 y

mayores a 5.2, la proteína está formada principalmente por monómeros y dímeros. Alrededor de pH 4.7, se forman estructuras oligoméricas más grandes tales como octámeros (Verheul y col., 1999). En valores cercanos a un pH de 6.8 (el cual es el pH de la leche de vaca) la  $\beta$ -lg existe como un dímero (Fox y col., 1998). No existe información acerca de los posibles sitios y mecanismos de interacción entre la KL $\beta$ -gal y el dímero de la  $\beta$ -lg, que es el estado oligomérico real de la  $\beta$ -lg en las condiciones bajo las cuales se encuentran reportados la mayoría de los estudios existentes. Aunque existen muchos estudios que explican las interacciones de la  $\beta$ -lg con moléculas hidrofóbicas a través del cáliz interno de la proteína (Yang y col., 2008a; Kontopidis y col., 2002; Ragona y col., 2000; Wu y col., 1999) este mecanismo no puede explicar la interacción con una proteína grande como lo es la KL $\beta$ -gal y que debería ocurrir a través de una región muy expuesta de la proteína. En 2005, Tello y col., además de contribuir con estudios sobre la estructura secundaria de la KL $\beta$ -gal, demostraron que existe una relación entre la estructura y la actividad de la KL $\beta$ -gal dependiente del pH, misma que podría verse afectada con el fenómeno de interacción con la  $\beta$ -lg y por consiguiente relacionarse con la capacidad activadora. El propósito de este trabajo fue describir el mecanismo de interacción entre la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y la  $\beta$ -lg para así contribuir con la explicación del fenómeno de activación de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* por la  $\beta$ -lg. Para cumplir dicho objetivo se estudió tanto el papel de los grupos  $\epsilon$ -amino de la  $\beta$ -lg en el efecto activador y en las interacciones entre la KL $\beta$ -gal y la  $\beta$ -lg así como la importancia del dímero de la  $\beta$ -lactoglobulina en dicho fenómeno.

## B. 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 de biomoléculas y es conocida y aceptada a nivel mundial por su alta calidad nutrimental 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. Sin embargo, en algunos derivados lácteos puede estar 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 de agua ( $a_w$ ). Por otro lado, la actividad de agua ( $a_w$ ) 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 y 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**

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  $\alpha$ -lactoalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas (Amiot, 1991; Walstra y Jenness, 1984).

**B. 1. 1. 1. Caseínas**

Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales de la leche (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 <sup>2+</sup> ligado*
α <sub>s1</sub> -caseína	α <sub>s1</sub> -CN	23.6	42	7-9	8
α <sub>s2</sub> -caseína	α <sub>s2</sub> -CN	25.1	11	10-13	**
β-caseína	β-CN	24.0	31	5	5
κ-caseína	κ-CN	19.0	11	1	2
Caseínas menores			5		

\*moles de Ca<sup>2+</sup> 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 éste grupo se encuentran: la λ-caseína, las γ-caseínas (γ<sub>1</sub>, γ<sub>2</sub> y γ<sub>3</sub>) 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<sup>2+</sup> (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  $\kappa$ -caseína y al fosfato de calcio coloidal (Walstra y Jennes, 1984).

### **B. 1. 1. 2. Proteínas del suero**

Las proteínas del suero comprenden dos tipos de proteínas: las sintetizadas en la glándula mamaria:  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina; y las de origen sanguíneo: la seroalbúmina e inmunoglobulinas. Tienen 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).

La  $\alpha$ -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).

La albúmina sérica representa el 6.2 % de las proteínas de suero 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).

Las inmunoglobulinas de la leche representan el 10.9% de las proteínas del suero. Se caracterizan por tener una masa molecular elevada (entre 150 y 900 kDa) y porque están glicosiladas (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).

Existen otras proteínas que se encuentran en la leche en pequeñas cantidades: las que están en la superficie de los glóbulos grasos de la leche, constituidas por una euglobulina, la fosfatasa alcalina y la xantín-oxidasa. Además se han aislado en la leche una mucoproteína, una lipoproteína y algunas ferroproteínas (lactoferrina y transferrina) (Amiot, 1991).

#### **B. 1. 1. 2. 1. $\beta$ - Lactoglobulina**

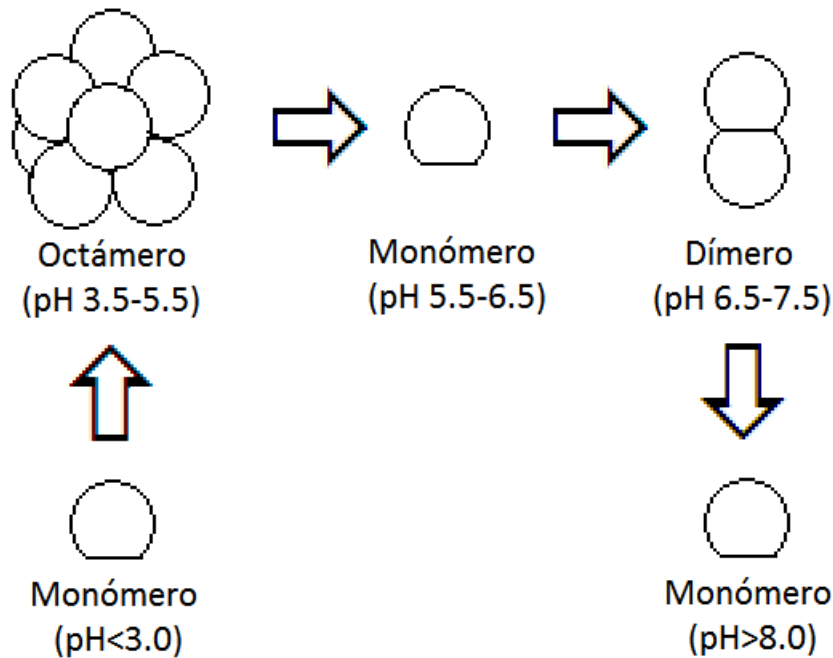
La  $\beta$ -lactoglobulina bovina ( $\beta$ -lg) es la más importante de las proteínas del suero pues constituye el 50.8% de las proteínas del suero y el 9.8 % del total de las proteínas de la leche (Walstra y Jennes, 1984). Su masa molecular es de 18.3 kDa, pero en la literatura se da a veces la de 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 más cadenas polipeptídicas dependiendo del pH (Figura 1) (Ortiz, 2004; Walstra y Jennes, 1984).

La estructura secundaria de la  $\beta$ -lg está compuesta de ocho láminas- $\beta$  antiparalelas que forman un cáliz (Papiz, y col., 1986) seguidas de una hélice- $\alpha$  de 3 giros y terminando en una lámina- $\beta$  (Blanch y col., 1999) (Figura 2). La  $\beta$ -lg pertenece a la familia de las lipocalinas, que está formada por proteínas extracelulares pequeñas y que son capaces de unir ligandos hidrofóbicos (Brignon y col., 1985; Monti y col., 1989; Uhrinova y col., 2000), a pesar de que la función biológica de la  $\beta$ -lg es incierta (Bell y McKenzie, 1968; Fogolari y col., 2000; Noiseux y col., 2002; Qin y col., 1998; Halpin y Richardson, 1985), ésta ha sido objeto de numerosos estudios debido a su abundancia, la facilidad para purificarla y su capacidad de unir diversos ligandos hidrofóbicos como ácidos grasos,

retinol, vitamina D<sub>3</sub> y péptidos (Brownlow y col., 1997; Flower y col., 2000; Fogliano y col., 1998; Noiseux y col., 2002).

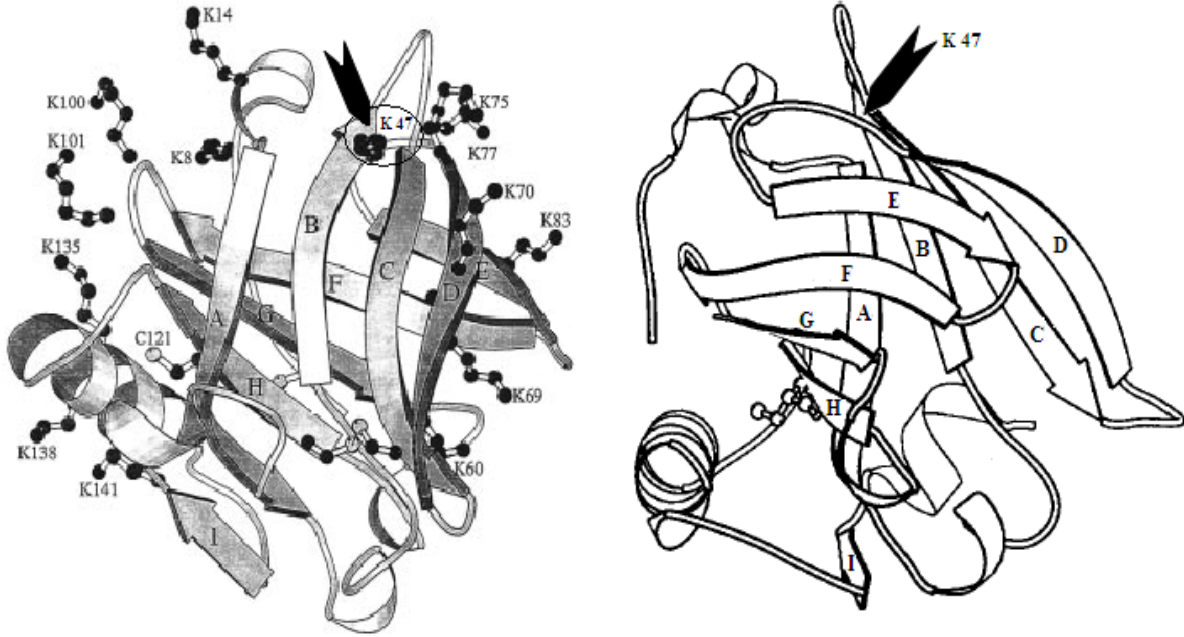
Su punto isoeléctrico es de 5.2 (Amiot, 1991), tiene 162 aminoácidos con cinco cisteínas (Cys) de las que cuatro están implicadas en los enlaces disulfuro; uno de ellos une la Cys<sup>66</sup> con la Cys<sup>160</sup> y el otro a la Cys<sup>106</sup> con la Cys<sup>119</sup> (Walstra y Jennes, 1984). El grupo tiol libre se encuentra en la Cys<sup>121</sup> (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  $\kappa$ -caseína y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Walstra y Jennes, 1984).

La  $\beta$ -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).



**Figura 1.** Efecto del pH en la estructura cuaternaria de la  $\beta$ -lactoglobulina.





**Figura 2.** Modelos tridimensionales de la estructura de los monómeros de  $\beta$ -lactoglobulina dibujados con el programa MOLSCRIPT. Las hebras- $\beta$  están marcadas de la A a la I. La lisina<sup>47</sup> (marcada con una flecha) se encuentra sumamente expuesta (Morgan y col., 1999; Sawyer y col., 1999, 2002a, 2002b).

1	11
Leu Ile Val Thr Gln Thr Met Lys Gly Leu Asp Ile	Gln Lys Val 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 Agr Leu Ser	Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys
161 162	
His Ile	

**Figura 3.** Estructura primaria de la  $\beta$ -lactoglobulina; sólo cuatro de las cinco cisteínas que contiene se encuentran formando enlaces disulfuro, el grupo tiol libre se encuentra en la Cys<sup>121</sup>.

### B. 1. 1. 2. 1. 1. Succinilación

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 terminales o pertenecientes a los residuos de lisina ( $\epsilon$ -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). 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 de amino de la  $\beta$ -lactoglobulina no afecta su estabilidad con lo que es posible evaluar la importancia de dichos grupos en las funciones de la proteína (Hollecker y Creighton 1982).

**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 <sub>3</sub> 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			Elimina la carga positiva y sitúa un grupo tiol en el extremo del resto lisilo
6. Arilación	(Ácido tioparacónico) 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 $1,1 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ a 367 nm; usado para determinar restos lisilo reactivos en las proteínas

### C. 1. 2. Hidratos de carbono

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).

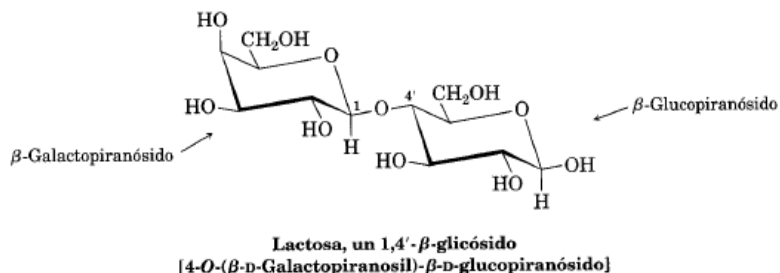
**Tabla 4.** Clasificación de los hidratos de carbono presentes en la leche de vaca (Louquet y col., 1991)

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

#### B. 1. 2. 1. Lactosa

El hidrato de carbono más importante de la leche de casi todas las especies es la lactosa (Walstra y Jennes, 1984). La lactosa es un disacárido constituido por dos moléculas, una de  $\alpha$ -D-glucosa y otra de  $\beta$ -D-galactosa unidas por un enlace  $\beta$ -1,4-glicosídico. Ambas moléculas se presentan predominantemente en forma de anillo piranósico, por lo que el nombre correcto para la molécula es el de 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranosa (Figura 3).

Dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula ( $\alpha$  ó  $\beta$ ) la lactosa 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  $\beta$  tiene una solubilidad mucho mayor, pero por mutarrotación se alcanza un equilibrio entre las dos formas.



**Figura 4.** Estructura de la lactosa (Mc Murry, 2001)

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  $\alpha$  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 o problemas fisiológicos, cuando un mal absorbedor o intolerante consume este azúcar (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996). Como respuesta a esta problemática, se han desarrollado procesos industriales de hidrólisis de la lactosa en leche y productos lácteos que se pueden llevar a cabo con ácidos fuertes o enzimas. La hidrólisis ácida de la lactosa requiere un pH inferior a 2 y temperaturas elevadas (150°C y presión elevada), con el riesgo de formación de productos secundarios que pueden alterar el gusto final (Varnam y Sutherland, 1994). Por ello es preferible recurrir a la hidrólisis enzimática, con lo que se inició desde hace varios años la exploración de diversas fuentes microbianas de la enzima lactasa o  $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) que pudieran ser utilizadas para hidrolizar la lactosa.

## B. 2. Reacción de Maillard

En determinadas condiciones de temperatura, pH y humedad, los azúcares reductores producen colores pardos que son de gran interés e importancia en el área de alimentos ya que dan lugar a sustancias que proporcionan colores y olores característicos y deseables en los alimentos y a otras que son indeseables por ser tóxicas.

La aparición de estas sustancias se debe a una reacción química entre azúcares reductores y un aminoácido libre o uno que forme parte de una cadena protéica y que contenga grupos amino libres, principalmente residuos de lisina. Esta reacción es conocida como reacción de Maillard (Fennema, 2000). En las primeras etapas de la reacción, el grupo carbonilo de la cetosa o aldosa del azúcar reductor reacciona con las aminas primarias provenientes de los aminoácidos libres o de los residuos de lisina dando lugar a iminas que son comúnmente llamadas bases de Schiff y que son intermediarios importantes en muchas vías metabólicas (McMurry, 2001; Fennema, 2000).

### **B. 3. Lactosilación**

El calentamiento del suero puede causar la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina bovina, 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 un 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<sup>49,91</sup>; así como a través de los que no son tan reactivos pero que también reaccionan con la lactosa: Lys<sup>15, 70, 100, 60, 69, 75, 77, 83, 135, 138, 8, 141</sup>. De tal forma que todos los residuos de lisina de la  $\beta$ -lactoglobulina con excepción de los de la Lys<sup>101</sup> se encuentran implicados en la unión con la lactosa (Morgan y col, 1998).

Se ha reportado que la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina ocurre de manera gradual a temperaturas entre 55 y 75°C; y que a 85°C la  $\beta$ -lactoglobulina precipita debido a su desnaturalización, lo que hace difícil la determinación del compuesto glicosilado (Morgan y col., 1998, 1999a). La lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina disminuye el efecto activador sobre la  $\beta$ -galactosidasa alrededor de un 30% y es en la lisina 47 (Lys<sup>47</sup>) donde se lleva a cabo la mayor parte de la lactosilación, pues es el residuo aminado más expuesto en la molécula de la  $\beta$ -lactoglobulina por estar cerca de una prolina, la cual provoca una torsión en esta región (Figura 2) (Creamer y Sawyer 2003; Morgan y col., 1998, 1999b; Léonil y col. 1997).

Morgan y col. (1999b) y French y col. (2002) encontraron que la humedad del medio en el que la  $\beta$ -lactoglobulina y la lactosa reaccionan influye en la estructura de la  $\beta$ -

lactoglobulina y reportaron que en un medio seco la estructura de la proteína no se ve alterada considerablemente, mientras que en medio acuoso y dependiendo del grado de lactosilación, la estructura de la proteína se ve gradualmente alterada.

#### **B. 4. Hidrólisis de la lactosa**

La  $\beta$ -galactosidasa (E.C. 3.2.1.23) es la enzima responsable de catalizar 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; 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*, etcétera (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 a nivel industrial (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Jiménez-Guzmán, 2003).

## **B. 5. $\beta$ -Galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.**

La  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (EC 3.2.1.23) (KL $\beta$ -gal) es la enzima más ampliamente utilizada en la industria láctea para resolver tanto el problema de intolerancia a la lactosa como problemas técnicos relacionados con la baja solubilidad de la lactosa y su tendencia a la cristalización, que generan 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 (Mahoney, 1997; García-Garibay, 1993; García-Garibay, 1992; Gekas y López-Leyva, 1985). Tiene una masa molar aproximada de 117.62 KDa y se ha reportado que existen diversas formas oligoméricas de la enzima, con actividad en las formas dimérica y tetramérica (Becerra y col., 1998; Tello-Solis y col., 2005). A pesar de ser la lactasa de mayor uso comercial, la estructura de la KL $\beta$ -lg no ha sido muy estudiada. Tello-Solis y col. (2005), determinaron mediante estudios con dicroísmo circular que la KL $\beta$ -gal es básicamente una proteína- $\beta$ , formada por un 22% de giros, 14% de láminas- $\beta$  paralelas, 25% de láminas- $\beta$  antiparalelas, 34% de estructura desordenada y tan solo un 5% de hélice- $\alpha$ .

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico por la KL $\beta$ -gal se lleva a cabo a través de un mecanismo general de catálisis ácida que requiere de dos residuos críticos: un donador de protones y un nucleófilo o base, y aunque las enzimas provenientes de diversos microorganismos tienen diferentes propiedades, la mayoría de las lactasas tiene al mismo residuo, el ácido glutámico, en su sitio catalítico (Zhou y Chen, 2001). En la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* los residuos de glutámico 482 y 551 participan como donador de protones y como nucleófilo (o base) al mismo tiempo en la reacción enzimática.

### **B. 5. 1. Efecto de la $\beta$ -lactoglobulina en la actividad de la $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.**

En 1958, Sfortunato y Connors publicaron los primeros estudios que sugieren que al someter a la leche a un tratamiento térmico previo a la hidrólisis con la enzima  $\beta$ -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 tratamiento térmico de la leche. Mahoney y Adamchuck en 1980 observaron un aumento en la actividad de la  $\beta$ -

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 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  $\beta$ -galactosidasa sino que la sola presencia de  $\beta$ -lactoglobulina y albúmina sérica bovina provocaba un aumento en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de hasta 230%.

Existen reportes que indican que la presencia de algunas proteínas pueden afectar la actividad de la  $\beta$ -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 BSA que ayuda a la termoestabilidad de la  $\beta$ -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  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en presencia de la  $\beta$ -lactoglobulina sea a través de este mecanismo, pues se encontró que la  $\beta$ -lactoglobulina se une fuertemente a la  $KL\beta$ -gal y que cuando estas interacciones se impiden, como en el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina lactosilada, el efecto activador desaparece (Jiménez-Guzmán y col., 2006). Aunque se ha demostrado que la unión entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa es necesaria para la activación de la enzima (Jiménez-Guzmán y col., 2006; Del Moral-Ramírez y col., 2008), aún no se ha establecido el mecanismo de la interacción. Sin embargo el hecho de que la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina disminuya la capacidad activadora es un buen indicio de que la unión se da a través de los grupos  $\epsilon$ -amino más reactivos de la  $\beta$ -lactoglobulina.



## **B. 6. Esterificación de proteínas.**

Desde inicios del siglo XX, se han estudiado diversos métodos para esterificar los grupos carboxilo de las proteínas (Blackburn, Carter, & Phillips, 1941; Blackburn & Phillips, 1944; Fraenkel-Conrat & Olcott, 1945). El uso de ácido clorhídrico como catalizador para esterificar proteínas y polipéptidos fue sugerido por primera vez en 1932 (Felix & Reindl, 1932) y actualmente se sabe que concentraciones bajas de iones hidrógeno (entre 0.02 y 0.1M) son suficientes para catalizar la esterificación completa de muchos ácidos carboxílicos con alcohol metílico a temperatura ambiente en 24 horas. Tales condiciones son considerablemente más suaves que las que se emplean normalmente, por lo que pueden ser utilizadas para modificar químicamente sustancias lábiles como son las proteínas.

## **B. 7. 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.

Anteriormente, para poder obtener un modelo tridimensional de una proteína era necesario un arduo trabajo experimental, sin embargo actualmente basta contar con un modelo cristalográfico con alta homología a la proteína cuya estructura es desconocida para poder construir un modelo tridimensional con una precisión comparable a la que se tendría usando los métodos experimentales de mediana resolución (Krieger y col., 2003). El modelaje por homología se ha convertido en un método ampliamente usado para poder conocer la estructura tridimensional de una proteína y con ello obtener gran cantidad de información sobre ella. Además, el modelaje por homología tiene una amplia gama de aplicaciones como: diseño de mutantes, predicción de una función, identificación de sitios

de unión, planeación de experimentos, etc. (Fisher y col., 2003) es por esto que es necesario saber cómo se construye y cómo se puede validar el modelo obtenido.

Por otra parte, una vez obtenido el modelo, es necesario optimizarlo 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 experimentalmente, el tiempo sería demandante y quizá nunca suficiente como 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 los diferentes tipos de ligandos a una proteína es una tarea a la que muchos grupos de trabajo dedican gran parte de su tiempo. Actualmente se cuenta con programas que ayudan a predecir las interacciones tanto de ligandos de tamaño pequeño como de proteínas completas incluso sin tener una idea de cuál o cuáles son los sitios de interacción (docking ciego) (Hetényi y col., 2002). Lo anterior 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, con lo que es posible reducir el tiempo de experimentación y obtener un gran número de ventajas tanto científicas como económicas.

## C. OBJETIVOS

### C. 1. Objetivo General

- Caracterizar el mecanismo de interacción entre la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y la  $\beta$ -lactoglobulina, así como su relación con el efecto activador de la  $\beta$ -lg en la actividad de la KL $\beta$ -gal

### C. 2. Objetivos Particulares

- Obtener un modelo de la estructura tridimensional del monómero y el dímero de la  $\beta$ -lactoglobulina.
- Determinar, mediante el estudio de los modelos tridimensionales y docking ciego, cuáles son los grupos amino más expuestos y reactivos de la  $\beta$ -lactoglobulina.
- Evaluar el efecto del pH en las interacciones entre la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y en el efecto activador.
- Bloquear los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina por medio de una reacción de succinilación.
- Evaluar por medio de cromatografía de afinidad el efecto de la succinilación de la  $\beta$ -lg en su interacción con la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y en su capacidad activadora.
- Construir un modelo tridimensional del monómero y del dímero de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.
- Determinar, mediante el estudio de los modelos tridimensionales y docking ciego, cuáles son los grupos carboxilo más expuestos y reactivos de la KL $\beta$ -gal.
- Bloquear los grupos carboxilo de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* por medio de una reacción de esterificación con metanol.
- Evaluar por medio de cromatografía de afinidad el efecto de la esterificación de la KL $\beta$ -gal en la interacción con la  $\beta$ -lactoglobulina y el efecto activador.

**D. 1. Role of Lysine  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase.**

Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Jiménez-Guzmán, J.

(2008). Role of Lysine  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase.

*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5859-5863.

**D. 2. Determination of the probable interaction site of bovine  $\beta$ -  
lactoglobulin dimer with electrophilic molecules.**

Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L.,  
Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012).  
Determination of the probable interaction site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer with  
electrophilic molecules.

*Enviado a: Food Chemistry*

---

1 Short Communication

2 **Determination of the probable interaction site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin**  
3 **dimer with electrophilic molecules**

4

5 Running Title: **Probable interaction site of  $\beta$ -lg dimer with electrophilic molecules**

6

7 Elizabeth Del Moral-Ramírez<sup>1</sup>, Lenin Domínguez-Ramírez<sup>2</sup>, Alma E. Cruz-Guerrero<sup>1</sup>,  
8 Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup>, Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>1</sup>, Mariano García-Garibay<sup>1,3</sup>, Judith  
9 Jiménez-Guzmán<sup>1\*</sup>

10

11 <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa,  
12 Mexico City, Mexico

13 <sup>2</sup>Molecular and Cellular Biology, College of Biological Sciences, University of California  
14 at Davis, Davis Ca. USA

15 <sup>3</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,  
16 Lerma, Lerma de Villada, México

17

18 \*Corresponding author: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
19 Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535, Mexico City, 09340, Mexico. E-mail:  
20 [jjg@xanum.uam.mx](mailto:jjg@xanum.uam.mx), phone:+(52)(55)5804-4720, Fax: +(52)(55)5804- 4712

21

22

---

**23 ABSTRACT**

24

25 The probable interaction site of bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer with electrophile molecules  
26 was studied. Blind dockings of  $\beta$ -lactoglobulin dimer with lactose and succinic anhydride  
27 used as model ligands showed that Lys<sup>138</sup> of one monomer and Lys<sup>141</sup> of the other are the  
28 most probable to interact with both lactose and succinic anhydride (Final Docking  
29 Energies -3.30 and -3.11 kcal mol<sup>-1</sup> respectively). Moreover, the dimer formation of  $\beta$ -  
30 lactoglobulin is necessary to strengthen the interactions due to the participation of Lysine<sup>138</sup>  
31 of one of  $\beta$ -lg monomers and Lys<sup>141</sup> of the other. Besides binding to Lys<sup>138</sup> and  
32 Lys<sup>141</sup> electrophiles form hydrogen bonds with other nearby exposed amino acids of both  
33 monomers; this may strengthen the interaction by approaching and stabilizing the ligands in  
34 a claw-like structure so that the nucleophilic attack may take place.

35

36 **KEYWORDS:**  *$\beta$ -lactoglobulin dimer, blind docking, electrophile, lysine  $\epsilon$ -amino groups*

37

**38 1. Introduction**

39 Bovine  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) is the major whey protein conforming up to 50% of whey  
40 proteins and 12% of whole cow milk proteins (Verheul, Pedersen, Roefs, & Kruif, 1999;  
41 Fox, 2003). Each  $\beta$ -lg monomer consists of 162 aminoacids with a mass of approximately  
42 18.3 kDa. Secondary structure of  $\beta$ -lg is composed of eight up and down antiparallel  $\beta$ -  
43 strands which form a calyx (Papiz, et al., 1986) followed by a three turn  $\alpha$ -helix and ending  
44 with a  $\beta$ -strand (Blanch, Hecht, & Barron, 1999).  $\beta$ -Lg belongs to the lipocalin family  
45 which constitutes small, extracellular proteins that are capable of binding hydrophobic  
46 ligands (Brignon, Chtorou, & Ribadeau-Dumas, 1985; Monti, Mermoud, & Jolles, 1989;  
47 Uhrinova, Smith, Jameson, Uhrin, Sawyer, & Barlow, 2000) and although its biological  
48 function is uncertain (Bell & McKenzie, 1968; Fogolari, Ragona, Licciardi, Romagnoli,  
49 Michelutti, Ugolini, & Molinari, 2000; Noiseux, Gauthier, & Turgeon, 2002; Qin, Bewley,  
50 Creamer, Baker, Baker, & Jameson, 1998; Halpin & Richardson, 1985) it has been subject  
51 of numerous studies because of its abundance, ease of purification and its ability to bind

---

52 small hydrophobic ligands such as fatty acids, retinol and peptides (Brownlow et al., 1997;  
53 Flower, North, & Sansom, 2000; Fogliano et al., 1998; Noiseux et al., 2002).

54 Many studies have attempted to establish the ligand-binding site of  $\beta$ -lg (Noiseux et al.,  
55 2002) and despite of remaining uncertain, two potential binding sites have been postulated  
56 for hydrophobic and small molecules: one inside the calyx and the other at the outer surface  
57 of the protein between the  $\alpha$ -helix and the  $\beta$ -barrel (Papiz et al., 1986; Monaco, Zanotti,  
58 Spadon, Bolognesi, Sawyer, & Eliopoulos, 1987). Recent studies showed that besides  
59 binding small, polar and non polar ligands,  $\beta$ -lactoglobulin can also bind to *Kluyveromyces*  
60 *lactis*  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal) increasing its activity (Jiménez-Guzmán et al., 2006, Del  
61 Moral-Ramírez, et al., 2008). It has been recently reported that the interaction between  
62 these proteins is very likely to occur through lysine  $\epsilon$ -amino groups of  $\beta$ -lg and studies  
63 using molecular docking of the monomer and succinic anhydride used as a model ligand for  
64 the protein showed that the interactions between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal may specifically occur  
65 through Lys<sup>138</sup> (Del Moral-Ramírez et al., 2008).

66 Oligomeric association and dissociation behavior of  $\beta$ -lg has been widely studied by  
67 different experimental techniques. Bovine  $\beta$ -lg oligomeric states change as a function of  
68 pH, phenomenon known as Tandford Transitions (Fox &McSweeney, 1998) and it has been  
69 found that at room temperature and pH values below 4.0 and above 5.2 the protein consists  
70 predominantly of monomers and dimers. Around pH 4.7, larger oligomeric structures as  
71 octamers are formed (Verheul et al., 1999). At around pH 6.8, which is cow's milk pH,  $\beta$ -lg  
72 exists as a dimer (Fox et al., 1998).

73 Many studies explain the interactions of  $\beta$ -lg with hydrophobic molecules through the  
74 internal calix of the protein (Yang et al., 2008a; Kontopidis, Holt, & Sawyer, 2002; Ragona  
75 et al., 2000; Wu, Pérez, Puyol, & Sawyer, 1999); however this mechanism cannot explain  
76 the interaction with a large protein such as KL $\beta$ -gal, suggesting that the interactions should  
77 occur through a very exposed region of the protein. As far as we know, there are only a few  
78 studies reporting this kind of interactions, and there is very limited information about the  
79 possible interaction sites or mechanisms. Since at most experimental conditions bovine  $\beta$ -lg  
80 exists as a dimer, this work aimed to compare the probable interaction sites of the dimer  
81 with those previously reported for the monomer (Del Moral-Ramírez et al, 2008).



---

82 Molecular docking of  $\beta$ -lactoglobulin dimer with lactose and succinic anhydride was  
83 carried out to determine the probable binding site of  $\beta$ -lactoglobulin dimer with  
84 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase.

85

## 86 **2. Materials and methods**

### 87 2.1 Three-Dimensional Modeling

88

89 Bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer three-dimensional (3D) model was built with PyMOL  
90 software (DeLanoScientific, 2009) using the X-Ray diffraction coordinates of bovine  $\beta$ -  
91 lactoglobulin triclinic crystal from growth at pH 6.5 and at 1.8 Å resolution found in the  
92 Protein Data Bank (PDB) database (PDB ID: 1BEB) (Brownlow et al., 1997)

93

### 94 2.2 Molecular Docking

95 Blind docking was performed to estimate the binding energies between all  $\beta$ -lg dimer  
96 aminoacid residues and lactose or succinic anhydride using AutoDock 3.05 software (The  
97 Scripps Research Institute, 2006). The runs were submitted at 25°C and were clustered at a  
98 range of RMSD of 5 Å. The 3D models for lactose and succinic anhydride were drawn at  
99 The Dundee PRODRG2 Server site (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrgr/>).

100

## 101 **3. Results and discussion**

102

### 103 *3.1 Bovine $\beta$ -lactoglobulin dimer model and molecular docking*

104 A 3D model of  $\beta$ -lg dimer was built in order to study the exposition and the possible steric  
105 hindrance that the different lysines in the molecule would show when reacting with lactose,  
106 succinic anhydride and/or another protein (Figure 1). Potential  $\beta$ -lg binding sites for small  
107 hydrophobic molecules have been largely studied and have shown to be located in highly  
108 hydrophobic areas of the monomer (Yang et al., 2008a; Yang et al., 2008b; Kontopidis, Holt,  
109 & Sawyer, 2002; Ragona et al., 2000; Wu, Pérez, Puyol, & Sawyer, 1999; Ragona,  
110 Pusterla, Zetta, Monaco, & Molinari, 1997); the binding site may vary as the dimer is  
111 formed, but it is always located in the same region of the protein as shown in figure

112 1, whereas the binding site of small charged molecules seems to be nonspecific (Noiseux et  
113 al., 2002; Wenbing et al, 2011). Lysine  $\epsilon$ -amino groups are some of the most exposed and  
114 reactive ones in  $\beta$ -lg, with Lys<sup>47</sup> and Lys<sup>138</sup> being the most exposed (Creamer & Sawyer,  
115 2003); it has also been reported that lactolation of  $\beta$ -lg occurs through the amino groups of  
116 lysine, specifically Lys<sup>47</sup> (Léonil, Mollé, Fauquant, Maubois, Pearce, & Bouhallab, 1997;  
117 Collin, D'Alfonso, & Baldini, 2000).

118 Despite the function of  $\beta$ -lg has not been well established, its probable function as a  
119 transporter protein has led to many studies focused on determining the binding sites of  $\beta$ -lg  
120 for different ligands. Most of ligand-protein interaction studies have been performed in  
121 conditions involving the dimeric state of  $\beta$ -lg; however, the techniques for determination of  
122 ligand binding sites require digestion of  $\beta$ -lg and therefore the loss of the dimer. As  
123 interactions in many studies take place under conditions where the dimer is formed, and  
124 given the difficulty for determining binding sites without hydrolysing the protein, blind  
125 docking of  $\beta$ -lg dimer with lactose and succinic anhydride was performed to compare the  
126 probable binding site of the dimer with those reported for the monomer and hydrolysates.

127 Docking results for lactose and  $\beta$ -lg dimer (Figure 2) showed that Lys<sup>138</sup> and Lys<sup>141</sup> were  
128 the aminoacids with the most favorable interaction energy at pH 7.0 (FDE=-3.30 kcal mol<sup>-1</sup>)  
129 and thus the most probable to interact with lactose. Since a great variation in binding  
130 sites has been found, it was recently proposed that ligand exchange among different sites of  
131  $\beta$ -lg might occur in solution and that Lys<sup>138</sup> and Lys<sup>141</sup> are involved in such phenomenon  
132 (Hu, et al., 2010; Ragona et al., 2000); our results agree with this finding, but it is  
133 remarkable that the molecular docking performed showed that among all aminoacids  
134 involved in the interactions, Lys<sup>138</sup> and Lys<sup>141</sup> had the same docking energy but they  
135 correspond to different monomers (Figure 2). This suggests that the dimeric state of  $\beta$ -lg is  
136 important for the interaction since both residues are required for it. This may also explain  
137 the variation in binding sites found by other authors when hydrolysates are used, since upon  
138 hydrolysis the ligand may remain in one or the other monomer.

139 Léonil et al. (1997) reported for the first time a binding site for the lactolation of  $\beta$ -lg. The  
140 fact that the binding occurs only through lysines suggests the importance of  $\beta$ -lg $\epsilon$ -amino  
141 groups in such reaction in which a nucleophilic attack must take place between an amino

142 group and an electrophile such as lactose. As shown in figure 2, besides binding to Lys<sup>138</sup>  
143 and Lys<sup>141</sup> lactose forms hydrogen bonds with other nearby exposed amino acids of both  
144 monomers; this may strengthen the interaction by approaching and stabilizing lactose in a  
145 claw-like structure so that the nucleophilic attack may take place. The former can explain  
146 experimental evidence of strong and stable interactions found between  $\beta$ -lg and larger  
147 proteins such as KL $\beta$ -gal, in which  $\beta$ -lg $\epsilon$ -amino groups of very exposed regions of the  
148 proteins are involved (Del Moral-Ramírez et al., 2008; Jiménez-Guzmán et al., 2006).

149 In order to determine where the nucleophilic attack would take place in  $\beta$ -lg dimer, succinic  
150 anhydride (SA) was used as a stronger electrophile for docking studies. As with lactose,  
151 Lys<sup>138</sup> and Lys<sup>141</sup> were the aminoacids with the most favorable interaction energy at pH 7.0  
152 (FDE=-3.11 kcal mol<sup>-1</sup>) and thus the most probable to interact with SA (Figure 3) via the  
153 same mechanism proposed for lactose in which the ligand is stabilized by a claw-like  
154 structure forming hydrogen bonds with some nearby aminoacids. Our results suggest that  
155 besides being a highly electrophilic region, Lys<sup>138</sup> of one  $\beta$ -lg monomer and Lys<sup>141</sup> of the  
156 other may be a specific binding site for electrophilic molecules.

157

#### 158 **4. Conclusions**

159 Our results show that the interaction sites found for  $\beta$ -lg dimer and succinic anhydride or  
160 lactose are consistent with those found for the monomer (Del Moral-Ramírez et al., 2008);  
161 however, despite several studies pointing Lysine<sup>47</sup> as the main amino acid involved in the  
162 reaction with lactose (Léonil et al., 1997), this study suggests that in the case of the dimer  
163 the interaction with the highly electrophilic molecules lactose and succinic anhydride is  
164 more likely to occur through Lysine<sup>138</sup>. Moreover, the dimer formation of  $\beta$ -lactoglobulin is  
165 necessary to strengthen the interactions due to the participation of Lysine<sup>138</sup> of one of  $\beta$ -lg  
166 monomers and Lys<sup>141</sup> of the other: as the dimer associates, the regions around Lys<sup>138</sup> and  
167 Lys<sup>141</sup> of both monomers form a claw-like structure which may establish strong interactions  
168 through several electrophilic and hydrogen bonds (Figures 2 and 3) which could also  
169 explain the interactions with larger molecules such as KL $\beta$ -lg which according to Jimenez-  
170 Guzman et al. (2006) results in a very stable binding.

171

---

---

172 **5. Abbreviations used**

173 RMSD: Root-mean-square deviation; FDE: Final Docking Energy

174

175 **6. References**

176 Bell, K., & McKenzie, H. A. (1964).  $\beta$ -lactoglobulins. *Nature*, 204, 1275-1279.

177 Blanch, E. W., Hecht, L., & Barron, L. D. (1999). New insight into the pH- dependent  
178 conformational changes in bovine  $\beta$ -lactoglobulin from Raman optical activity. *Protein*  
179 *Science*, 8, 1362-1367.

180 Brignon, G., Chtorou, A., & Ribadeau-Dumas, B. (1985). Does  $\beta$ -lactoglobulin occur in  
181 human milk? *Journal of Dairy Research*, 52, 249-254.

182 Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I.,  
183 North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution— still an  
184 enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.

185 Collin, M., D'Alfonso, L., & Baldini, G. (2000). New insight on  $\beta$ -lactoglobulin binding sites  
186 by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Science*, 9, 1968-1974.

187 Creamer, L. K., & Sawyer, L. (2003). Beta lactoglobulin. *Encyclopedia of Dairy Sciences*

188 Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano,  
189 G. M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Jiménez-Guzmán, J. (2008). Role of Lysine  
190  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -  
191 Galactosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5859-5863.

192 Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family:  
193 structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 9-24.

194 Fogliano, V., Monti, M. S., Visconti, A., Randazzo, G., Facchiano, M. A., Colonna, G., &  
195 Ritenti, A. (1998). Identification of a beta-lactoglobulin lactosylation site. *Biochimica et*  
196 *Biophysica Acta*, 1338, 295-304.

197 Fogolari, F., Ragona, L., Licciardi, S., Romagnoli, S., Michelutti, R., Ugolini, R., &  
198 Molinari, H. (2000). Electrostatic properties of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Proteins: Structure*  
199 *Function and Bioinformatics*, 39, 4, 317-330.

- 
- 200 Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P. F. Fox, & P. L. H.  
201 McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1* (pp 1-48). New York: Kluwer  
202 Academic/Plenum Publishers.
- 203 Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). *Dairy Chemistry and Biochemistry*. New York:  
204 Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- 205 Halpin, M. I., & Richardson, T. (1985). Selected Functionality Changes of  $\beta$ -Lactoglobulin  
206 upon Esterification of Side-Chain Carboxyl Groups. *Journal of Dairy Science*, 68, 3189-  
207 3198.
- 208 Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., López-  
209 Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2006). Interaction between  $\beta$ -  
210 lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. *International Dairy Journal*,  
211 16, 1169-1173.
- 212 Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J., & Bouhallab, S. (1997).  
213 Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl $\beta$ -Lactoglobulin Conjugates  
214 Formed During Heat Treatment of Milk and Whey and Identification of One Lactose-  
215 Binding Site. *Journal of Dairy Science*, 80, 2270-2281.
- 216 Monaco, H. L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L., & Eliopoulos, E. E.  
217 (1987). Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its  
218 complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 197, 695-706.
- 219 Monti, J. C., Mermoud, A. F., Jolles, P. (1989). Antibovine $\beta$ -lactoglobulin antibodies react  
220 with a human lactoferrin fragment and bovine  $\beta$ -lactoglobulin present in human milk.  
221 *Experientia*, 45, 178-180.
- 222 Noiseux, I., Gauthier, S. L., & Turgeon, S. (2002). Interactions between Bovine  $\beta$ -  
223 lactoglobulin and Peptides under Different Physicochemical Conditions. *Journal of*  
224 *Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1587-1592.
- 225 Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C.,  
226 Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure  
227 of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-  
228 385.

- 
- 229 Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., & Jameson, G. B.  
230 (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin.  
231 *Biochemistry*, 37, 14014-14023.
- 232 Ragona, L., Fogolari, F., Zetta, L., Perez, D. M., Puyol, P., De Kruif, K., Lohr, F.,  
233 Ruterjans, H., & Molinari, H. (2000). Bovine beta-lactoglobulin: interaction studies with  
234 palmitic acid. *Protein Science*, 9, 1347-1356.
- 235 Uhrinova, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrin, D., Sawyer, L., & Barlow, P. N.  
236 (2000). Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the  $\beta$ -lactoglobulin  
237 dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
- 238 Ragona, L., Pusterla, F., Zetta, L., Monaco, H. L., & Molinari, H. (1997). Identification of a  
239 conserved hydrophobic cluster in partially folded bovine beta-lactoglobulin at pH 2.  
240 *Folding and Design*, 2, 281-290.
- 241 Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & Kruif, K. G. (1999). Association  
242 behavior of native  $\beta$ -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.
- 243 Wenbing, H., Jianan, L., Qun, L., Yumiao, H., Kui, W., Shuang, L., Shaoxiang, X., & Fuyi,  
244 W. (2011). Elucidation of the binding sites of sodium dodecil sulfate to  $\beta$ -lactoglobulin  
245 using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry combined with docking simulation.  
246 *Mass Spectrometry*, 25, 1429-1436.
- 247 Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J., &  
248 Mao, S. J. T. (2008a). Crystal Structure of a secondary vitamin D<sub>3</sub> binding site of milk  
249 beta-lactoglobulin. *Proteins*, 71, 3, 1197-1210.
- 250 Yang, M. C., Guan, H. H., Yang, J. M., Ko, C. N., Liu, M. Y., Lin, Y. H., Huang, Y. C.,  
251 Chen, C. J., & Mao, S. J. T. (2008b). Rational Design for Crystallization of  $\beta$ -  
252 Lactoglobulin and Vitamin D<sub>3</sub> Complex: revealing a Secondary Binding Site. *Crystal*  
253 *Growth and Design*, 8, 12, 4268-4276.
- 254  
255  
256  
257  
258

**Figure Captions**

Figure 1. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer showing hydrophobic potential binding sites (calyx and outer surface) and reactive lysines.

262

Figure 2. Molecular docking of lactose (gray and red) and  $\beta$ -lactoglobulin's dimer showing lactose interaction with Lys<sup>141</sup> of one  $\beta$ -lactoglobulin monomer (green) and with Lys<sup>138</sup> of the other  $\beta$ -lactoglobulin's monomer (cyan).

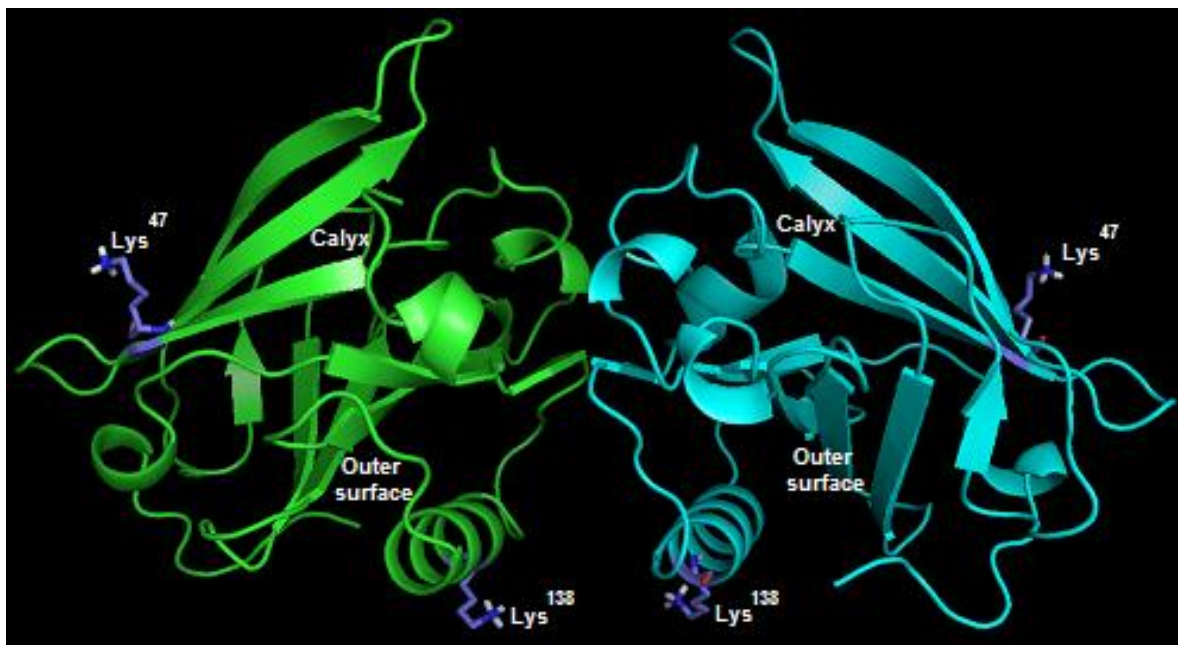
266

Figure 3. Molecular docking of succinic anhydride (SA) (gray and red) and  $\beta$ -lactoglobulin dimer showing lactose interaction with Lys<sup>141</sup> of one  $\beta$ -lactoglobulin's monomer (green) and with Lys<sup>138</sup> of the other  $\beta$ -lactoglobulin monomer (cyan).

270

**Figures**

Figure 1



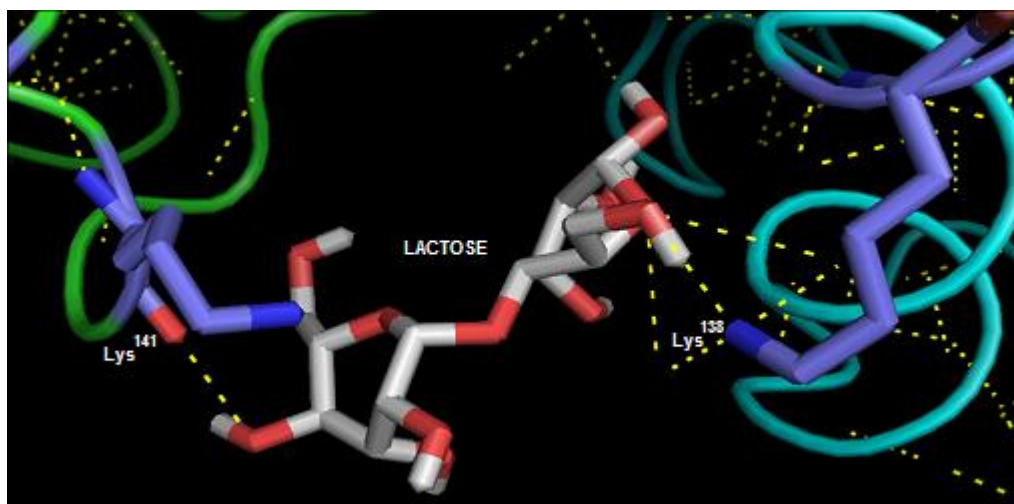
273

Figure 1. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin dimer showing hydrophobic potential binding sites (calyx and outer surface) and reactive lysines.

276

277

278 Figure 2

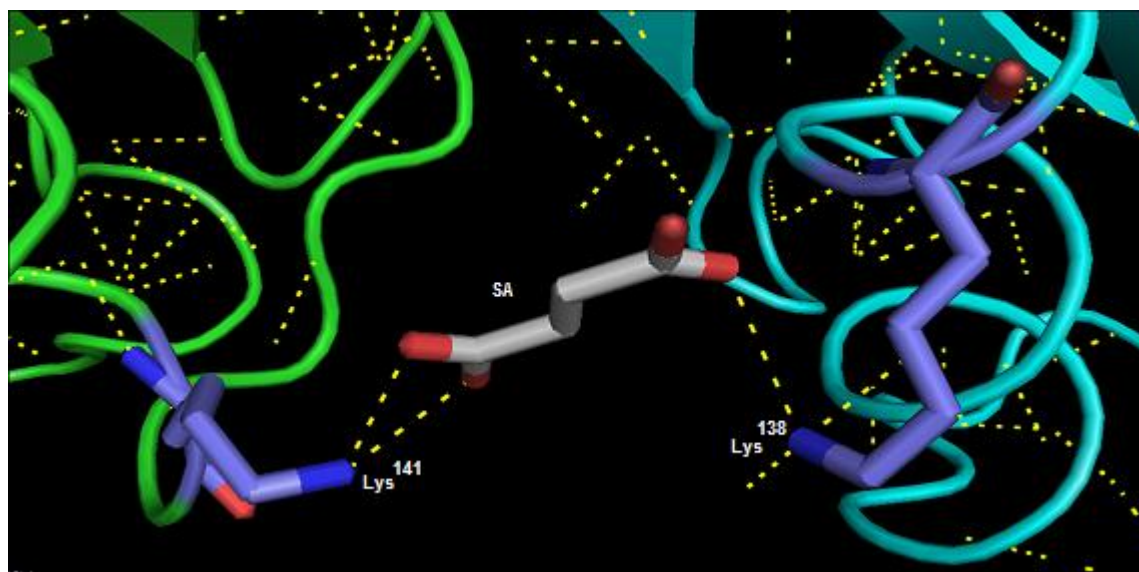


279

280 Figure 2. Molecular docking of lactose (gray and red) and  $\beta$ -lactoglobulin dimer showing  
281 lactose interaction with Lys<sup>141</sup> of one  $\beta$ -lactoglobulin monomer (green) and with Lys<sup>138</sup> of  
282 the other  $\beta$ -lactoglobulin monomer (cyan).

283

284 Figure 3



285

286 Figure 3. Molecular docking of succinic anhydride (SA) (gray and red) and  $\beta$ -  
287 lactoglobulin's dimer showing lactose interaction with Lys<sup>141</sup> of one  $\beta$ -lactoglobulin  
288 monomer (green) and with Lys<sup>138</sup> of the other  $\beta$ -lactoglobulin monomer (cyan).



**D. 3. Effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase and its effect on enzymatic activity.**

Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Pérez-Rangel, M. C., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase and its effect on enzymatic activity.

*Enviado a: Biochimica et Biophysica Acta*

---

---

1 **Effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with *Kluyveromyces***  
2 ***lactis*  $\beta$ -galactosidase and its effect on enzymatic activity.**

3

4 Running Title: **Effect of pH on activation and interaction of  $\beta$ -lg with KL $\beta$ -gal.**

5

6 Elizabeth Del Moral-Ramírez<sup>1</sup>, Lenin Domínguez-Ramírez<sup>2</sup>, María del Carmen Pérez-  
7 Rangel<sup>1</sup>, Alma E. Cruz-Guerrero<sup>1</sup>, Lorena Gómez-Ruiz<sup>1</sup>, Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>1</sup>,  
8 Mariano García-Garibay<sup>1,3</sup>, Judith Jiménez-Guzmán<sup>1\*</sup>

9

10 <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa,  
11 Mexico City, Mexico12 <sup>2</sup>Molecular and Cellular Biology, College of Biological Sciences, University of California  
13 at Davis, Davis Ca, USA14 <sup>3</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,  
15 Lerma, Lerma de Villada, México

16

17 \*Corresponding author: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
18 Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535, Mexico City, 09340, Mexico. E-mail:  
19 [jjg@xanum.uam.mx](mailto:jjg@xanum.uam.mx), phone:+(52)(55)5804-4720, Fax: +(52)(55)5804- 4712

20

21

---

---

**22 ABSTRACT**

23 Some reports have established the activating effect of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) on  
24 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal) activity, suggesting that the interaction  
25 between  $\beta$ -lg and the enzyme could be responsible for this effect. Since both structure-  
26 activity of KL $\beta$ -gal and dimer formation of  $\beta$ -lg are pH dependent, the present work studies  
27 the effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -  
28 galactosidase and its effect on enzymatic activity. The presence of  $\beta$ -lg has an activating  
29 effect on KL $\beta$ -gal, which is stronger at pH 7.0 and absent at pHs 6.0 and 8.5. Comparison  
30 of the changes on the activation by pH with the changes on the interactions between  $\beta$ -lg  
31 and KL $\beta$ -gal showed a direct correlation: as the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal  
32 increases the activity increases. Furthermore, it was observed that the dimeric state of  $\beta$ -lg  
33 is essential for both the interaction and the activation of the enzyme. The activating effect  
34 of  $\beta$ -lg yielded a higher activity than the one found at the optimum pH in buffer solution  
35 (142% activation) suggesting that the interaction between both proteins could help to reach  
36 an even more active conformation of KL $\beta$ -gal. It also shifts the optimum pH from 7.5 in  
37 buffer solution to 7.0 in the presence of the  $\beta$ -lg suggesting that at this pH  $\beta$ -lg promotes  
38 the KL $\beta$ -gal conformational state in which the active site is more accessible to the  
39 substrate.

40

41

42 Key words:  $\beta$ -lactoglobulin, *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase, protein-protein  
43 interaction

44

---

---

## 45 INTRODUCTION

46 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal) is by far the most important commercial  
47 lactase used in the dairy industry. Several reports have established that the presence of  
48 some proteins in the reaction medium may affect the activity of  $\beta$ -gal (Greenberg &  
49 Mahoney, 1984; Chen & Tsen, 1991). Jiménez-Guzmán et al. (2006) studied the effect of  
50 whey proteins in  $\beta$ -gal activity and demonstrated that the activity of *Kluyveromyces lactis*  
51  $\beta$ -gal increased when it was measured in the presence of either  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) or  
52 bovine serum albumin; this finding is particularly interesting since these proteins are  
53 available in milk and whey, which are the natural reaction media for this enzyme in dairy  
54 processing.

55 Recent studies have demonstrated that  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg), the major whey protein in  
56 cow milk, enhances lactase activity up to 230% by binding to KL $\beta$ -gal through lysine  $\epsilon$ -  
57 amino groups probably involving Lysine<sup>138</sup> of  $\beta$ -lg (Jiménez-Guzmán et al., 2006, Del  
58 Moral-Ramírez, et al., 2008). It is well known that  $\beta$ -lg monomers can associate to form  
59 different oligomeric structures and then dissociate into the monomers as a function of pH  
60 by the phenomenon known as Trandford Transitions (Fox & McSweeney, 1998). It has  
61 been found by different experimental techniques that at room temperature and pH values  
62 below 4.0 and above 5.2 the protein consists predominantly of monomers and dimers.  
63 Larger oligomeric structures as octamers are formed at around pH 4.7 (Verheul et al.,  
64 1999). At pH 6.8, which is cow's milk pH,  $\beta$ -lg exists as a dimer (Fox et al., 1998). It has  
65 been recently reported that  $\beta$ -lg dimer can interact with electrophilic molecules such as  
66 lactose and succinic anhydride and that the dimer formation of  $\beta$ -lactoglobulin is necessary  
67 to strengthen these interactions due to the participation of Lysine<sup>138</sup> of one of  $\beta$ -lg  
68 monomers and Lys<sup>141</sup> of the other. Since  $\beta$ -lg interactions with KL $\beta$ -gal occur through  $\epsilon$ -  
69 amino groups, it is very likely that the region of  $\beta$ -lg dimer involved in the interaction with  
70 electrophilic molecules may be the same involved in the interaction with KL $\beta$ -gal.

71 Although there is scarce information on KL $\beta$ -gal structure, in 2005 Tello-Solis et al. found  
72 by circular dichroism that KL $\beta$ -gal is mainly a  $\beta$ -type protein consisting of 22% turns, 14%  
73 parallel  $\beta$ -sheet, 25% antiparallel  $\beta$ -sheet, 34% unordered structure and only 5%  $\alpha$ -helix,  
74 they also showed that there is a structure-activity relationship as a function of pH.

---

75 This work aimed to study the effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with  
76 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase and its effect on enzymatic activity since both,  
77 structure-activity of KL $\beta$ -gal and dimer formation of  $\beta$ -lg are pH dependent.

78

## 79 **MATERIALS AND METHODS**

### 80 **Enzyme Activity Measurement**

81 The source of KL $\beta$ -gal was a commercial enzyme preparation, Maxilact LX-5000, (Gist  
82 Brocades, Delft, The Netherlands). All reactions were carried out at 37°C by dilution of  
83 1:400 of Maxilact LX-5000 into 0.05 M potassium phosphate buffer at pH values of 6.0,  
84 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5. A solution of 0.034 M *ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactoside*  
85 (ONPG) (Sigma Chemical Co. St. Louis MO, USA) was used as substrate and enzyme  
86 activity was measured spectrophotometrically at 410 nm on the basis of *ortho-nitro-phenol*  
87 (ONP) release after mixing 0.2 mL of ONPG solution with 0.1 mL of enzyme solution in  
88 2.7 mL of phosphate buffer at each pH value. The hydrolysis rate ( $v_o$ ) for each pH value  
89 was calculated from the linear portion of data of ONP production versus time. One enzyme  
90 unit (U) was defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1  $\mu$ mol of substrate (ONPG)  
91 in 1 min at 37°C and the corresponding pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 or 8.5). Specific activity  
92 was calculated dividing the enzyme units by the protein concentration of the sample  
93 determined according to Lowry, Rosegrough, Farr, & Randall (1951).

94 KL $\beta$ -Gal activity of Maxilact LX-5000 was also measured in the presence of 0.3 mg/mL of  
95 native  $\beta$ -lg, at different pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5).

### 96 **Protein-Enzyme Interaction**

97 Affinity chromatography was used to determine  $\beta$ -lg interaction with KL $\beta$ -gal using a  
98 Eupergit (Röhm GmbH & Co. Darmstadt, Germany) support with immobilized  $\beta$ -lg at pH  
99 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5. Immobilization was performed following the instructions of  
100 the producer. Controls without ligand were prepared at each pH by blocking the active  
101 oxyrane groups of the support with glycine. After immobilization, the amount of  
102 immobilized protein was calculated through the difference between the protein in solution  
103 before and after interacting with the support the efficiency of immobilization was 0.640,

104 0.634, 0.687, 0.712 0.699 and 0.705  $\mu\text{mol/g}_{\text{support}}$  at pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 and 8.5,  
105 respectively.

106 Maxilact LX-5000, determined by electrophoresis to contain a mixture of eight proteins,  
107 was used as the KL $\beta$ -gal sample. Because of the differences in the amount of protein  
108 immobilized at each pH,  $\beta$ -gal samples were prepared to have a concentration according to  
109 a molar ratio of 0.05  $\text{mol}_{\beta\text{-gal}}/\text{mol}_{\text{immobilized } \beta\text{-lg}}$  for each pH. Immobilized ligands and the  
110 controls were allowed to interact with  $\beta$ -gal by directly adding 0.1 g of support with  
111 immobilized ligands to 3 mL of KL $\beta$ -gal sample and shaking for 1 h, then the supernatant  
112 was separated from the support by centrifugation (3220g, 15 min) using a Beckman J2-MI  
113 centrifuge (Beckman Instruments, Palo Alto CA, USA), and its specific activity was  
114 measured using ONPG as a substrate.

#### 115 **Statistical Analyses.**

116 Each experiment was performed three times. Data were analyzed by means of a variance  
117 test (ANOVA); in some cases, a Tukey test was performed. All statistical analyses were  
118 carried out using the statistical analysis software Statistica 5.0 (Stat Soft, Tulsa OK, USA),  
119 with  $p < 0.05$  used as a threshold of statistical significance.

120

## 121 **RESULTS AND DISCUSSION**

122 Figure 1 shows the variation of ONPG hydrolysis rate ( $v_o$ ) by KL $\beta$ -gal as a function of pH.  
123 It was observed that lactase activity is low at around pH 6.0 and 8.5 consistent with that  
124 reported by Tello et al. (2005) and Kim, Lim, & Kim (1997). The maximum  $v_o$  was found  
125 at pH 7.5, and activity variation found at different pH values from 6.0 to 8.5 is consistent  
126 with that reported by Tello et al. (2005) who found an important increase in lactase activity  
127 when pH changed from 6.5 to 7.0 and suggested that pH changes cause small modifications  
128 in KL $\beta$ -gal secondary structure and that the increase in enzyme activity is mostly caused by  
129 small local changes in structure such as the charges in some residues. Furthermore, when  
130 pH increases from 7.0 to 7.5 (Figure 1) hydrolysis rate reaches its maximum, suggesting  
131 that this change in pH may cause an important modification on KL $\beta$ -gal secondary  
132 structure and thus a considerable increase in lactase activity.

133 When lactase activity was measured in the presence of 0.3 mg/mL  $\beta$ -lg at different pH  
134 values (Figure 1) an increase in  $v_o$  was observed at pH between 6.5 – 8.0 ( $\alpha < 0.0002$ ),  
135 confirming that the presence of  $\beta$ -lg enhances lactase activity as reported by Jiménez-  
136 Guzmán et al., 2006 and Del Moral et al., 2008. At pHs of 6.0 and 8.5  $\beta$ -lg did not activate  
137 KL $\beta$ -gal ( $\alpha > 0.05$ ) showing that the activation effect is dependent on pH. Optimum pH, at  
138 which the maximum activity was reached, shifted from 7.5 to 7.0 in the presence of  $\beta$ -lg.  
139 Some reports have already established the activating effect of some whey proteins such as  
140  $\beta$ -lg or bovine serum albumin on KL $\beta$ -gal activity (Jiménez-Guzmán et al, 2002; Jiménez-  
141 Guzmán et al, 2006). Jiménez-Guzmán et al (2006) suggested that this effect could be  
142 related to the ability of the protein to bind to the enzyme. It is very likely that as pH  
143 changes, charges in the residues of  $\beta$ -lg are modified, changing the protein's ability to bind  
144 to the enzyme. In order to study the effect of pH on the interaction of  $\beta$ -lg with KL $\beta$ -gal,  
145 affinity chromatography was performed at different pH values immobilizing  $\beta$ -lg on  
146 Eupergit, and allowing the immobilized protein to interact with a solution of Maxilact  
147 LX5000 at different pHs. A control for each pH was used in which no protein was  
148 immobilized, but the reactive groups of the resin were blocked with glycine.  
149 The specific activity of the control was not significantly different from that of the initial  
150 lactase solution at any of the pHs tested ( $\alpha > 0.05$  for all cases) meaning that lactase was  
151 not specifically bound to the support without protein (Figure 2). When the same solution of  
152 lactase (Maxilact LX5000), containing eight proteins as determined by electrophoresis, was  
153 mixed with the support containing  $\beta$ -lg as ligand it was observed that at pH 6.0 and 8.5 the  
154 specific activity of the supernatant remained the same as that of the control ( $\alpha = 0.9794$  and  
155 0.5430 for pH 6.0 and 8.5 respectively) (Table 1) demonstrating that at these pHs, there is  
156 no specific interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal. At pH between 6.5 and 8.0 the specific  
157 activity of the enzyme solution that interacted with immobilized  $\beta$ -lg changed significantly  
158 with respect to the control (support without ligand,  $\alpha < 0.00033$  in all cases), reaching a  
159 maximum diminution of 70% at pH 7.0 showing a specific interaction between  $\beta$ -lg and  
160 KL $\beta$ -gal, which decreased as pH increased further more (Table 1). This suggests that KL $\beta$ -  
161 gal bound specifically to  $\beta$ -lg and that the interaction was favored at pH 7.0. At pHs below  
162 or above 7.0, the interaction gradually decreased until it was not observable at pH 6.0 or

---

163 8.5. When comparing the changes on the activation caused by pH with the changes on the  
164 interactions between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal (Figure 3), a direct correlation was observed: as the  
165 interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal is stronger the activation increases.

166 Tello et al (2005) established that small changes in KL $\beta$ -gal structure might cause  
167 significant changes in enzyme's activity. Mbuyi-Kalala, Schnek, & Léonis (1988) reported  
168 that  $\beta$ -galactosidase activity is influenced by some ionizable groups, prototropic groups and  
169 by conformational changes. Jurado, Camacho, & Luzón (2003) reported that the effect of  
170 pH on lactase activity is usually described by a kinetic model which involves the  
171 dissociation of one or two protons in  $\beta$ -gal. Although KL $\beta$ -gal has its most stable  
172 conformation at pH 7.0 (Tello et al., 2005) this is not the conformational state at which it  
173 reaches the highest activity which is at pH 7.5 (Figure 1) and in which conformational  
174 changes caused by pH variation may leave the active site more accessible to the substrate,  
175 increasing enzyme activity. The interaction between KL $\beta$ -gal and  $\beta$ -lg could cause a  
176 structural change on the enzyme leading to the exposure of the active site and thus a more  
177 active conformation.

178 Many studies have attempted to establish the ligand-binding site of  $\beta$ -lg (Noiseux et al.,  
179 2002); two potential binding sites have been postulated for hydrophobic and small  
180 molecules: one inside the calyx and the other at the outer surface of the protein between the  
181  $\alpha$ -helix and the  $\beta$ -barrel (Papiz et al., 1986; Monaco, Zanotti, Spadon, Bolognesi, Sawyer,  
182 & Eliopoulos, 1987). Jiménez-Guzmán et al., 2006 and Del Moral-Ramírez, et al., 2008  
183 showed that besides binding small, polar and non-polar ligands,  $\beta$ -lactoglobulin can also  
184 bind to *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase increasing its activity and that the interaction  
185 between these proteins is very likely to occur through lysine  $\epsilon$ -amino groups of  $\beta$ -lg,  
186 specifically Lys<sup>138</sup>.

187 Sawyer, Kontopidis, & Wu (1999) reported that lysine, tyrosine and tryptophan residues  
188 show a variable reactivity that is dependent on the media, and that cysteine<sup>121</sup> (Cys<sup>121</sup>) has a  
189 free thiol group with a reactivity that is dependent on pH and structural changes that take  
190 place at pH values from 6 to 8.

191 It has also been reported that the quaternary structure of  $\beta$ -lg undergoes structural changes  
192 when pH is modified (Verheul et al, 1999). At pH 6.0 and 8.5 at which no activation or



---

193 interaction with KL $\beta$ -gal was observed,  $\beta$ -lg exists as a monomer, while between 6.5 and  
194 8.0 where both interaction and activation were observed, it exists as a dimer, showing that  
195 the dimeric state of  $\beta$ -lg is essential for both the interaction and the activation of the  
196 enzyme.

197 In buffer solution, as pH approximates 7.5 the most active conformation of KL $\beta$ -gal is  
198 reached (Figure 1); however, in the presence of the  $\beta$ -lg dimer the interaction between both  
199 proteins could help to reach an even more active conformation of KL $\beta$ -gal, shifting the  
200 optimum pH from 7.5 in the absence of  $\beta$ -lg to 7.0 in the presence of the protein and  
201 achieving a rate of hydrolysis significantly higher ( $\alpha = 0.00018$ ) than the one obtained in  
202 the optimum pH in the absence of  $\beta$ -lg (142% activation with respect to optimum pH in  
203 buffer solution), suggesting that at this pH  $\beta$ -lg promotes the KL $\beta$ -gal conformational state  
204 in which the active site is more accessible to the substrate.

205

## 206 **CONCLUSIONS**

207 The presence of  $\beta$ -lg has an activating effect on KL $\beta$ -gal activity, which is stronger at pH  
208 7.0 and absent at pHs 6.0 and 8.5 showing that the activation effect is dependent on pH.  
209 When comparing the changes on the activation caused by pH with the changes on the  
210 interactions between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal a direct correlation was observed: as the interaction  
211 between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal is stronger the activation increases. Furthermore, when the  
212 oligomeric structure of  $\beta$ -lg was compared to the pHs at which both interaction and  
213 activation were found, it was observed that the dimeric state of  $\beta$ -lg is essential for both the  
214 interaction and the activation of the enzyme. The fact that in the presence of  $\beta$ -lg the  
215 activity observed was significantly higher than the one found at the optimum pH in buffer  
216 solution suggests that the interaction between both proteins could help to reach an even  
217 more active conformation of KL $\beta$ -gal, shifting the optimum pH from 7.5 in buffer solution  
218 to 7.0 in the presence of the protein suggesting that at this pH  $\beta$ -lg promotes the KL $\beta$ -gal  
219 conformational state in which the active site is more accessible to the substrate.

220

221 **REFERENCES**

- 222 1. Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov,  
223 I., North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—  
224 still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.
- 225 2. Chen, J. Y. & Tsen, H. Y. (1991). Effect of milk and milk constituents on heath  
226 stability of lactase from *Saccharomyces lactis*, *J. Chinese Agric. Chem. Soc.*, 29, 4,  
227 456-464.
- 228 3. Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-  
229 Serrano, G. M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Jiménez-Guzmán, J. (2008).  
230 Role of Lysine  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of  
231 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,  
232 56, 5859-5863.
- 233 4. Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1998). Milk proteins. In *Dairy Chemistry and*  
234 *Biochemistry*. Blackie Academic & Professional: United Kingdom, 187-192.
- 235 5. García-Garibay, M. (1992). Recuperación de enzimas intracelulares de interés  
236 industrial.  $\beta$ -Galactosidasa de levadura. *Ciencia (Mex.)*, 43, 23-33.
- 237 6. Gekas, V., López-Leyva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process*  
238 *Biochem.* 20, 2-11.
- 239 7. Greenberg, N. A., & Mahoney, R. R. (1994). The activity of lactase *Streptococcus*  
240 *thermophilus* in milk and whey. *Food Chem.*, 15, 4, 307-313.
- 241 8. Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía,  
242 A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2002). Enhancement of lactase activity in  
243 milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *Journal of Dairy*  
244 *Science*, 85, 2497-2502.
- 245 9. Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G.,  
246 López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2006). Interaction  
247 between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. *International*  
248 *Dairy Journal*, 16, 1169-1173.
- 249 10. Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J., & Bouhallab, S.  
250 (1997). Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl  $\beta$ -Lactoglobulin

- 251 Conjugates Formed During Heat Treatment of Milk and Whey and Identification of  
252 One Lactose-Binding Site. *Journal of Dairy Science*, 80, 2270-2281.
- 253 11. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with  
254 the Folin phenol reagent, *Biol. Chem.*, 193, 265.
- 255 12. Mahoney, R. R. (1997). Lactose: Enzymatic modification. In *Advanced Dairy*  
256 *Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Fox, P. F., Ed.: Chapman & Hall: London, Vol. 3, p 95.
- 257 13. Tello-Solis, S., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez Ruiz, L., Cruz-  
258 Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., & García-Garibay, M. (2005). Determination  
259 of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase and its Structure-  
260 Activity Relationship as a Function of the pH.
- 261 14. Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & Kruif, K. G. (1999). Association  
262 behavior of native  $\beta$ -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.

263  
264

## 265 **FIGURE CAPTIONS**

266

267 Figure 1. Effect of pH on ONPG hydrolysis rate ( $v_o$ ) by KL $\beta$ -gal and over the effect of  $\beta$ -lg  
268 on KL $\beta$ -gal activity.

269

270 Figure 2. Effect of pH on the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal determined by affinity  
271 chromatography.

272

273 Figure 3. Relation between the activating effect of  $\beta$ -lg and its interaction with KL $\beta$ -gal.

274

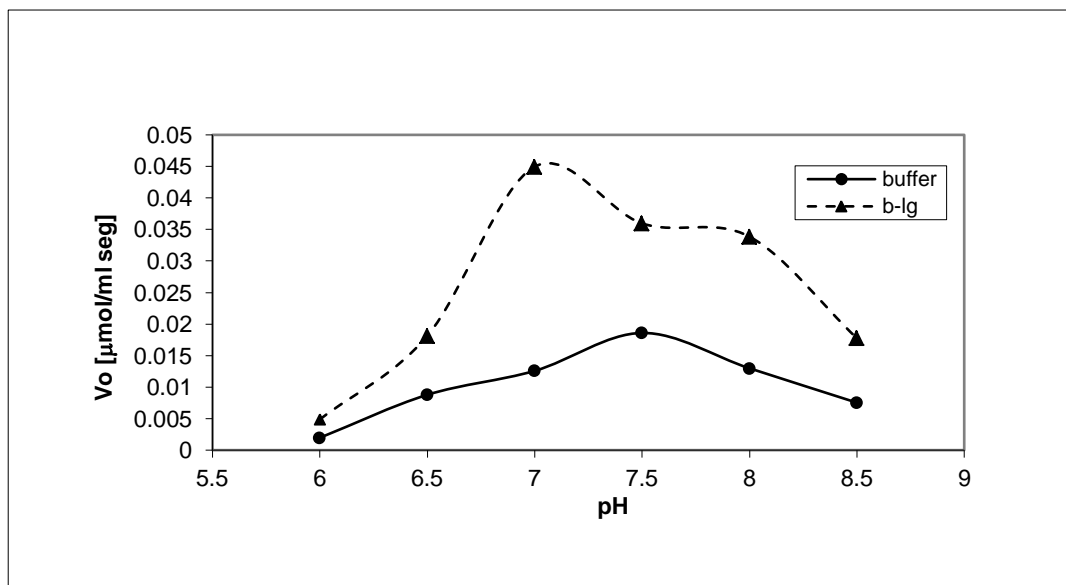
275 Table 1. Effect of pH on the activation of KL $\beta$ -gal by  $\beta$ -lg.

276

277 Table 2. Interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal as determined by affinity chromatography.

278

279 Figure 1

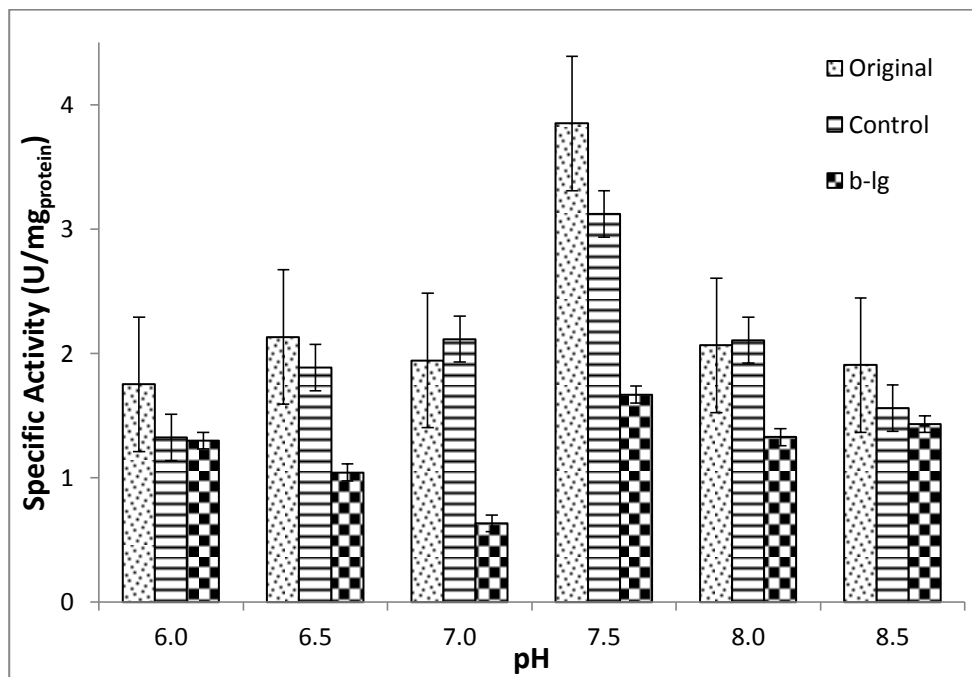


280

281 Figure 1. Effect of pH on ONPG hydrolysis rate ( $v_o$ ) by KL $\beta$ -gal and on the effect of  $\beta$ -Ig  
282 on KL $\beta$ -gal activity.

283

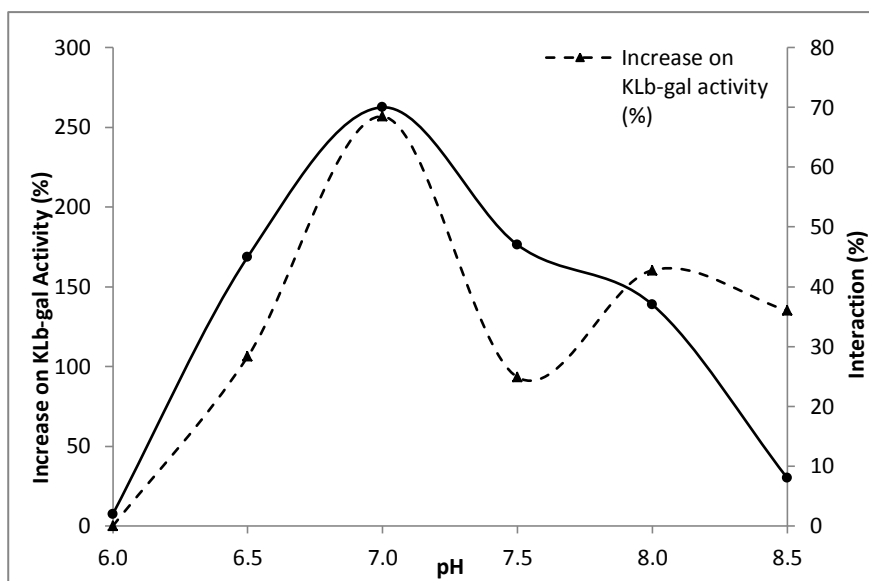
284 Figure 2



285

286 Figure 2. Effect of pH on the interaction between  $\beta$ -Ig and KL $\beta$ -gal determined by affinity  
287 chromatography.

288 Figure 3



289

290 Figure 3. Correlation between the activating effect of  $\beta$ -Ilg and its interaction with KL $\beta$ -gal.

291

292 Table 1. Effect of pH on the activation of KL $\beta$ -gal by  $\beta$ -Ilg.

pH	Vo [ $\mu$ molONP/ml.seg] Buffer solution	Vo [ $\mu$ molONP/ml.seg] With 0.3 mg/mL $\beta$ -LG	% Increase on enzyme activity	$\alpha$	% of increase with respect to buffer pH 7.5
6	0.002	0.0049	*	0.6408	
6.5	0.0088	0.01815	106.25	0.00021261	
7	0.0126	0.04495	256.746032	0.00018156	141.68
7.5	0.0186	0.03595	93.2795699	0.00018156	
8	0.013	0.03385	160.384615	0.00018156	
8.5	0.00755	0.01775	135.099338	0.0001877	

293

294 Table 2. Interaction between  $\beta$ -Ilg and KL $\beta$ -gal as determined by affinity chromatography.

pH	Interaction (%)	$\alpha$
6.0	2	0.97940
6.5	45	0.00015
7.0	70	0.00015
7.5	47	0.00018
8.0	37	0.00030
8.5	8	0.54300

**D. 4. Role of carboxyl groups of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in the interaction with  $\beta$ -lactoglobulin and its activating effect.**

Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., & Jiménez-Guzmán, J. (2012). Role of carboxyl groups of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in the interaction with  $\beta$ -lactoglobulin and its activating effect.

*Enviado a: Enzyme and Microbial Technology*

---

1 **Role of carboxyl groups of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase in the**  
2 **interaction with  $\beta$ -lactoglobulin and its activating effect.**

3

4 Running Title: **Study of the interaction between KL $\beta$ -gal and  $\beta$ -lg.**

5

6 Elizabeth Del Moral-Ramírez<sup>1</sup>, Lenin Domínguez-Ramírez<sup>1,2</sup>, Alma E. Cruz-Guerrero<sup>3</sup>,  
7 Lorena Gómez-Ruiz<sup>3</sup>, Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>3</sup>, Mariano García-Garibay<sup>1,3</sup>, Judith  
8 Jiménez-Guzmán<sup>1\*</sup>

9

10 <sup>1</sup>División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana,  
11 Lerma, Lerma de Villada, México12 <sup>2</sup>Molecular and Cellular Biology, College of Biological Sciences, University of California  
13 at Davis, Davis Ca. USA14 <sup>3</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa,  
15 Mexico City, Mexico

16

17 \*Corresponding author: Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
18 Metropolitana, Iztapalapa, AP 55-535, Mexico City, 09340, Mexico. E-mail:  
19 [jjg@xanum.uam.mx](mailto:jjg@xanum.uam.mx), phone:+(52)(55)5804-4720, Fax: +(52)(55)5804- 4712

---

**20 ABSTRACT**

21 Reports have established the activating effect of  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) on *Kluyveromyces*  
22 *lactis*  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal), suggesting that the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal  
23 is directly responsible for this effect. Since lysine  $\epsilon$ -amino groups of  $\beta$ -lg have been found  
24 essential for both the interaction and activation of KL $\beta$ -gal, the interaction with KL $\beta$ -gal is  
25 expected to occur via electrophilic groups such as side-carboxyl groups of the enzyme. The  
26 aim of this work was to determine the role of side-carboxyl groups of KL $\beta$ -gal on both the  
27 interaction with  $\beta$ -lg and its activating effect. A 3D model was constructed for KL $\beta$ -gal.  
28 After excluding carboxyl amino acids that are involved in the formation of the dimer, it was  
29 observed that only a few are exposed and likely to interact with  $\beta$ -lg. Blind docking of  
30 KL $\beta$ -gal with lysine showed that the amino acid that could be involved in the interaction is  
31 Glu<sup>592</sup> (FDE= -4.55 kcal/mol). Esterification of the most exposed and reactive carboxyl  
32 groups of KL $\beta$ -gal, among which Glu<sup>592</sup> is found, resulted in the loss of the enzyme's  
33 ability to interact with  $\beta$ -lg. When lactase activity of the esterified KL $\beta$ -gal derivatives was  
34 determined in the presence of  $\beta$ -lg it was observed that as long as there are carboxyl groups  
35 available  $\beta$ -lg has an activating effect on the enzyme. When those groups were blocked by  
36 esterification no activating effect was observed, suggesting that carboxyl groups of KL $\beta$ -gal  
37 are essential for both, the ability of the enzyme to interact with  $\beta$ -lg and its capacity to be  
38 activated by it.

39

40

41 **KEYWORDS:** *blind docking, carboxyl groups, esterification, electrophile.*



---

## 42 INTRODUCTION

43 Among several microbial  $\beta$ -galactosidases, *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase (KL $\beta$ -gal)  
44 is by far the most important commercial lactase used in the dairy industry (Gekas & Lopez-  
45 Leiva, 1985; German, 1997; Nijipels, 1981). KL $\beta$ -Gal is mainly a  $\beta$ -type protein consisting  
46 of 22% turns, 14% parallel  $\beta$ -sheet, 25% antiparallel  $\beta$ -sheet, 34% unordered structure and  
47 only 5%  $\alpha$ -helix (Tello-Solis et al., 2005). Enzymatic hydrolysis of the glycosidic bond by  
48  $\beta$ -galactosidase takes place via general acid catalysis that requires two critical residues: a  
49 proton donor and a nucleophile/base, and although the enzymes derived from various  
50 microbial origins have different properties, such as molecular weight, protein chain length,  
51 and the position of the active site, most  $\beta$ -galactosidases have the same residue, a glutamic  
52 acid, at their catalytic site (Zhou & Chen, 2001). *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase has  
53 glutamic acid<sup>482</sup> (Glu<sup>482</sup>) and glutamic acid<sup>551</sup> (Glu<sup>551</sup>) as the proton donor and the  
54 nucleophile/base, respectively, in the enzymatic reaction (Zhou et al., 2001).

55 Several reports have established that the presence of some proteins in the reaction medium  
56 may affect the activity of KL $\beta$ -gal; this raises the possibility that the proteins prevent the  
57 inhibitory effect of ions in the reaction medium (Greenberg & Mahoney, 1984; Chen &  
58 Tsen, 1991). Jiménez-Guzmán et al. (2006) studied the effect of whey proteins in KL $\beta$ -gal  
59 activity and demonstrated that the activity of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -gal increased when it  
60 was measured in the presence of either  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg) or bovine serum albumin; this  
61 finding is particularly interesting since these proteins are available in milk and whey, which  
62 are the natural reaction media for this enzyme in dairy processing. Affinity chromatography  
63 assays demonstrated that KL $\beta$ -gal bound specifically to  $\beta$ -lg, resulting in enzyme  
64 activation. Moreover, heating pure  $\beta$ -lg further increased  $\beta$ -gal activity, but heating it in the  
65 presence of lactose diminished its activating effect. Other reports have established that  
66 heating  $\beta$ -lg in the presence of lactose resulted in a reaction between the protein and the  
67 sugar (lactosylation) (Léonil, Mollé, Fauquant, Maubois, Pierce, & Bouhallab, 1997) which  
68 diminished the binding capacity of the protein to the enzyme and therefore its activating  
69 effect (Jiménez-Guzmán et al., 2006). It has been recently reported that  $\beta$ -lg dimer can  
70 interact with electrophilic molecules such as lactose and succinic anhydride and that the  
71 dimer formation of  $\beta$ -lactoglobulin is necessary to strengthen these interactions due to the

72 participation of Lysine<sup>138</sup> of one of  $\beta$ -lg monomers and Lys<sup>141</sup> of the other. Since  $\beta$ -lg  
73 interactions with KL $\beta$ -gal occur through  $\epsilon$ -amino groups, it is very likely that the region of  
74  $\beta$ -lg dimer involved in the interaction with electrophilic molecules may be the same  
75 involved in the interaction with KL $\beta$ -gal via electrophilic groups such as the side-carboxyl  
76 groups of the enzyme.

77 The aim of this work was to determine the role of the side-carboxyl groups of  
78 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase on both the interaction with  $\beta$ -lg and the activating  
79 effect.

80

## 81 MATERIALS AND METHODS

### 82 *Kluyveromyces lactis* $\beta$ -galactosidase three-Dimensional Modeling

83 *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase three-dimensional (3D) model was built by homology  
84 modeling with Modeller v9.2 software (Eswar et al., 2006; Marti-Renom et al., 2000; Sali,  
85 1993; Fiser, Do, & Sali, 2000). The template corresponded to X-ray diffraction coordinates  
86 of *E.coli*  $\beta$ -galactosidase A chains (PDB ID: 1JZ7 and 1JZ8) (Juers et al., 2001) at 1.5 Å  
87 ( $E=9 \times 10^{-125}$  and  $E=3 \times 10^{-124}$  respectively) with a 48% of homology. The best model had a  
88 DOPE of -103795.781 kJ/mol.

### 89 *Molecular Docking*

90 Blind docking was performed to estimate the binding energies between all KL $\beta$ -gal amino  
91 acid residues and lactose or lysine using AutoDock 3.05 software (The Scripps Research  
92 Institute, 2006). The runs were submitted at 25°C and were clustered at a range of RMSD  
93 of 2 Å. The 3D models for lactose and lysine were drawn at The Dundee PRODRG2 Server  
94 site (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg>).

### 95 *Kluyveromyces lactis* $\beta$ -galactosidase Esterification

96 Methyl alcohol gradually and specifically blocks the side-chain carboxyl groups of KL $\beta$ -  
97 gal. Maxilact LX 5000 containing 461.92 mg<sub>protein</sub>/mL was used as source of KL $\beta$ -gal. A  
98 solution of methyl alcohol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) containing 1% of  
99 protein and 0.05 N of hydrochloric acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was  
100 prepared. The mixture was left under vigorous agitation for two hours at room temperature  
101 according to Fraenkel-Conrat & Olcott (1945). Samples with KL $\beta$ -gal ester derivatives

---

102 were taken at the beginning of reaction (E0), after 1 hour (E1) and after two hours (E2) of  
103 reaction; they were centrifuged at 2057 x g for 5 minutes and diluted 1:1 (vol/vol) with  
104 deionized, distilled water and dialyzed in the cold against 10 volumes of 0.001 M HCl for 4  
105 hours. In order to determine the degree of esterification, a general method to quantify  
106 carboxyl groups of proteins employing the formation of a colored hydroxamate-ferric ion  
107 complex was used according to Halpin & Richardson (1985): 500  $\mu$ L of 1.0 N  
108 hydroxylamine hydrochloride (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, MI, USA) were added  
109 slowly while vortexing to 500  $\mu$ L of E0, E1, E2 or diluted Maxilact LX 5000, followed by  
110 the addition of 200  $\mu$ L of 6.0 N potassium hydroxide (JT Baker, Xalostoc, Mexico). The  
111 samples were heated at 74°C for 55 min and then cooled in ice. Thereafter, 1.6 mL of 1.0 N  
112 HCl and 75 mL of 5.0% (wt/vol) ferric chloride hexahydrate (Sigma Chemical Co., St.  
113 Louis, MO, USA), were added to each sample, with vortexing. Absorbance of the ferric  
114 ion-hydroxamate complex was read at 475 nm within 30 min. An equimolar concentration  
115 of KL $\beta$ -gal served as blank.

116 L-Glutamic acid  $\gamma$ -monoethyl ester (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was used  
117 to prepare a standard curve for molar absorption of the ferric ion-hydroxamate complex,  
118 using the foregoing procedure. The blank contained an equimolar amount of L-glutamic  
119 acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) treated in the same manner as the  
120 corresponding ester.

#### 121 *Enzyme Activity Measurement*

122 Maxilact LX-5000 was used as source of KL $\beta$ -gal (Gist Brocades, Delft, The Netherlands).  
123 All reactions were carried out at 37°C by dilution of 1:10000 of Maxilact LX-5000 or  
124 ester derivatives (E0, E1 and E2) into 0.05 M potassium phosphate buffer at pH 7.0. A  
125 solution of 0.034 M *ortho-nitro-phenyl- $\beta$ -D-galactoside* (ONPG) (Sigma Chemical Co. St.  
126 Louis MO, USA) was used as substrate, and enzyme activity was measured  
127 spectrophotometrically at 410 nm on the basis of *ortho-nitro-phenol* (ONP) release.  
128 Reactions were carried out by mixing 67  $\mu$ L of ONPG solution with 33  $\mu$ L of enzyme  
129 solution in 900  $\mu$ L of phosphate buffer. The hydrolysis rate ( $v_o$ ) was calculated from the  
130 linear portion of data of ONP production versus time. One enzyme unit (U) was defined as  
131 the amount of enzyme that hydrolyses 1  $\mu$ mol of substrate (ONPG) in 1 min at 37°C and

132 pH 7.0. Specific activity was calculated dividing the enzyme units by the protein  
133 concentration of the sample determined according to Bradford (1976).

134 In order to evaluate the activating effect of  $\beta$ -lg in some experiments activity was  
135 determined in the presence of 0.3 mg/mL  $\beta$ -lg.

#### 136 *Protein-Enzyme Interaction*

137 Affinity chromatography was used to determine  $\beta$ -lg interaction with KL $\beta$ -gal using a  
138 Eupergit (Röhm GmbH & Co. Darmstadt, Germany) support with immobilized  $\beta$ -lg at pH  
139 7.0. Immobilization was performed following the instructions of the producer. Controls for  
140 each derivative without ligand were prepared by blocking the active oxyrane groups of the  
141 support with glycine 0.05 M. After immobilization, the amount of immobilized protein was  
142 calculated through the difference between the protein in solution before and after  
143 interacting with the support, the efficiency of immobilization was 1.6568  $\mu\text{mol}_{\beta\text{-lg}}/\text{g}_{\text{support}}$  at  
144 pH 7.0.

145 Derivatives E0 and E1 were used as the KL $\beta$ -gal samples. Samples were prepared to have a  
146 concentration according to a molar ratio of 0.05  $\text{mol}_{\beta\text{-gal}}/\text{mol}_{\text{immobilized}\beta\text{-lg}}$ . Immobilized  
147 ligand and the controls were allowed to interact with  $\beta$ -gal by directly adding 0.1 g of  
148 support with immobilized ligands to 1.5 mL of KL $\beta$ -gal samples and shaking for 30 min,  
149 then the supernatant was separated from the support by centrifugation (3220 x g, 15 min)  
150 with an Eppendorf Centrifuge 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), and its  
151 specific activity was measured using ONPG as a substrate.

#### 152 *Statistical Analyses.*

153 Each experiment was performed three times. Data were analyzed by means of a variance  
154 test (ANOVA); in some cases, a Tukey test was performed. All statistical analyses were  
155 carried out using the statistical analysis software Statistica 5.0 (Stat Soft, Tulsa OK, USA),  
156 with  $p < 0.05$  used as a threshold of statistical significance.

157

## 158 **RESULTS AND DISCUSSION**

159 Recent studies have demonstrated that  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -lg), the major whey protein in  
160 cow milk, enhances lactase activity up to 230% by binding to KL $\beta$ -gal through lysine  $\epsilon$ -  
161 amino groups probably involving Lys<sup>138</sup> of  $\beta$ -lg (Jiménez-Guzmán et al., 2006, Del Moral-

162 Ramírez, et al., 2008) and suggesting that the interaction mechanism might be via the  
163 nucleophilic attack of Lys<sup>138</sup> of  $\beta$ -lg to an electrophile group in KL $\beta$ -gal.

164 In order to study how KL $\beta$ -gal would interact with nucleophiles such as lactose, lysine  
165 and/or other protein, a 3D model of KL $\beta$ -gal was built using the X-ray diffraction  
166 coordinates of *E.coli*  $\beta$ -galactosidase A chains (PDB ID: 1JZ7 and 1JZ8) as template (Juers  
167 et al., 2001).

168 Blind docking of KL $\beta$ -gal with lactose showed that the amino acids with the most favorable  
169 interaction energy at pH 7.0 were Glu<sup>482</sup> and Glu<sup>551</sup> (FDE= -4.82 kcal/mol) which are  
170 consistent with the catalytic sites reported for KL $\beta$ -gal (Zhou et al., 2001).

171 Since Lys<sup>138</sup> of  $\beta$ -lg has been suggested to be the amino acid most likely responsible for the  
172 interaction between KL $\beta$ -gal and  $\beta$ -lg, blind docking of KL $\beta$ -gal with lysine was  
173 performed, and 250 possible binding sites were displayed. It has been reported that at pH  
174 7.0, which is the pH at which our studies were performed, KL $\beta$ -gal exists as a dimer (Tello-  
175 Solis et al., 2005) because of this, a 3D model of the KL $\beta$ -gal dimer was built to select the  
176 possible amino acids interacting with lysine (Figure 1). The selection criteria for the  
177 possible interaction site of KL $\beta$ -gal with lysine was based on the most favorable binding  
178 energy as well as on the exclusion of those amino acids located at the dimer interface and  
179 those of the catalytic site, which due to steric hindrance, or the loss of enzyme activity  
180 would clearly not be available to interact with another protein. By selecting with these  
181 criteria, Glu<sup>592</sup> was found to be the most probable interaction site with lysine (FDE= -4.55  
182 kcal/mol) (Figure 1).

183 It is well known that carboxyl groups of proteins can be chemically modified through  
184 gradual esterification with alcohols of low molecular weight by adding low concentrations  
185 of hydrogen ions (0.02 to 0.1 M) to catalyze the reaction in mild conditions (Feeney, 1977;  
186 Halpin et al., 1985). *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase has 157 esterifiable groups per  
187 monomer (156 combined glutamic acid and aspartic acid residues and 1 carboxyl end  
188 group). In order to determine if side-carboxyl groups of KL $\beta$ -gal actively participate in the  
189 interaction with  $\beta$ -lg, KL $\beta$ -gal carboxyl groups were esterified for 1(E1) or 2 (E2) hours. A  
190 sample was taken immediately after mixing all reagents (E0) in order to discard the effect  
191 of the reagents in lactase activity.

---

192 Esterification was monitored to determine the degree of side-carboxyl groups blocked in  
193 the different esterified derivatives. After 1 and 2 hours of reaction, 3.9% and 16.5% of  
194 carboxyl groups of KL $\beta$ -gal respectively were esterified. It is very likely that after 1 hour,  
195 the first side-chain carboxyl groups to be esterified were the most reactive and exposed  
196 groups, thus the most probable to interact with  $\beta$ -lg. According to the results of the blind  
197 docking, such exposed and thus reactive side-carboxyl group in KL $\beta$ -gal, could be Glu<sup>592</sup>  
198 (Figure 1).

199 Activity of KL $\beta$ -gal ester derivatives obtained at 1 and 2 hours of esterification (E1 and E2)  
200 was measured to ensure that the enzyme was still active after esterification process. It was  
201 observed that activity significantly decreased after 1 hour of reaction ( $\alpha=0.007$ ) and  
202 completely disappeared after 2 hours (Figure 2); because of this, E2 was excluded of all  
203 further experiments. As reported by Zhou et al. (2001), *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -  
204 galactosidase has Glu<sup>482</sup> and Glu<sup>551</sup> at its catalytic site, it is very likely that after 2 hours of  
205 esterification these residues were esterified and thus activity was lost.

206 Jiménez-Guzmán et al. (2006) demonstrated that the activating effect of  $\beta$ -lg could be due  
207 to the interaction of  $\beta$ -lg with KL $\beta$ -gal. In order to study the effect of KL $\beta$ -gal side-  
208 carboxyl groups in the interaction with  $\beta$ -lg, the capacity of KL $\beta$ -gal ester derivative (E1)  
209 to bind to immobilized  $\beta$ -lg was compared with that of unesterified KL $\beta$ -gal (E0) through  
210 affinity chromatography.

211 Interaction tests were performed immobilizing  $\beta$ -lg on Eupergit, and allowing the esterified  
212 derivatives (E0 and E1) to interact with the immobilized ligand. In order to discard  
213 unspecific interactions, a control for each derivative (CE0 or CE1) was used in which no  
214 protein was immobilized, but the reactive oxyran groups of the resin were blocked with  
215 glycine.

216 Specific activity relates the activity ratio to the amount of protein present in a given sample,  
217 and therefore helps to establish the proportion of enzyme among other contaminating  
218 proteins; when the interaction with the ligand is unspecific any of the proteins may be  
219 bound to the support but their proportions in the eluting mixture would not change;  
220 however, if there were specific interactions between one protein (in this case KL $\beta$ -gal) and  
221 the ligand, its proportion in the eluting mixture would decrease. Results showed that the

222 specific activity of the control was not significantly different from that of the initial KL $\beta$ -  
223 gal solution ( $\alpha = 0.1483$  and  $0.2841$  for CE0 and CE1 respectively) meaning that KL $\beta$ -gal  
224 was not specifically bound to the support without protein (Figure 3). When E0 was allowed  
225 to interact with the immobilized  $\beta$ -lg, lactase activity of the supernatant significantly  
226 decreased ( $\alpha = 0.03$ ) with respect to the control, suggesting that while the carboxyl groups  
227 of KL $\beta$ -gal are not esterified, there is still a specific interaction between KL $\beta$ -gal and  $\beta$ -lg.  
228 On the other hand, when E1 (containing the esterified KL $\beta$ -gal) was allowed to interact  
229 with immobilized  $\beta$ -lg specific activity of the supernatant remained the same as in the  
230 control (Figure 3,  $\alpha = 0.061$ ), suggesting that when the carboxyl groups of KL $\beta$ -gal were  
231 blocked by the esterification, its ability to bind to  $\beta$ -lg was lost.

232 Blind docking of KL $\beta$ -gal and lysine showed that the most exposed and reactive carboxyl  
233 groups of the enzyme would be the most likely to participate in an interaction with  $\beta$ -lg  
234 (Figure 1). On the other hand, after 1 hour of esterification, only the most reactive and  
235 exposed groups would be esterified; the fact that the interaction between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal  
236 was lost as the side-carboxyl groups of KL $\beta$ -gal were esterified up to 3.9%, suggests that  
237 these groups could be essential for the interaction between the enzyme and the protein.

238 The interaction of KL $\beta$ -gal with  $\beta$ -lg could induce some structural changes of the enzyme,  
239 and according to Tello-Solis et al. (2005), those changes could induce an important  
240 activation of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -galactosidase. In order to evaluate the effect of KL $\beta$ -  
241 gal esterification in its activation by  $\beta$ -lg, lactase activity of the esterified derivatives (E0  
242 and E1) was determined in the presence of 0.3 mg/mL  $\beta$ -lg (Figure 2). Results showed that  
243 when KL $\beta$ -gal is not esterified (E0), the presence of  $\beta$ -lg in the reaction media induces a  
244 significant activation of the enzyme (18.75%,  $\alpha=0.0254$ ). Jiménez-Guzmán et al (2006) and  
245 Del Moral-Ramírez et al (2008) had reported an important activation of the enzyme by  $\beta$ -lg  
246 of up to 235%, even though our results showed a significant activation of the enzyme, it  
247 was lower than the one reported before. This could be explained by the fact that in order to  
248 discard the effects of the esterification reagents in lactase activity, enzyme activity was  
249 determined in the presence of hydrochloric acid. Hydrochloric acid is known to diminish  
250 enzyme activity. On the other hand, when KL $\beta$ -gal was esterified (E1), the presence of  $\beta$ -lg  
251 did not induce any significant activation of the enzyme ( $\alpha=0.4808$ ), suggesting that the  
252 availability of carboxyl groups of KL $\beta$ -gal is essential for the activation.

---

253 When comparing the changes on the activation caused by esterification of KL $\beta$ -gal with the  
254 changes on the interactions between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal a direct correlation was observed: as  
255 long as  $\beta$ -lg may interact with KL $\beta$ -gal its activating effect is observable. Tello-Solis et al.  
256 (2005) established that small changes in KL $\beta$ -gal structure may cause significant changes  
257 in enzyme's activity; these changes may be induced by different factors, such as pH or an  
258 interaction with another protein. Our results suggest that the interaction with  $\beta$ -lg promotes  
259 a conformational change of KL $\beta$ -gal leading to a state in which the active site is more  
260 accessible to the substrate and thus, activity is enhanced.

261

## 262 CONCLUSIONS

263 A 3D model was constructed for KL $\beta$ -gal, and after excluding the carboxyl amino acids  
264 that are involved in the formation of the dimer, it was observed that only a few carboxylic  
265 amino acids are exposed and likely to interact with  $\beta$ -lg. Blind docking of KL $\beta$ -gal with  
266 lysine showed that the most exposed and reactive amino acid that could be involved in the  
267 interaction with  $\beta$ -lg is glu<sup>592</sup> (FDE= -4.55 kcal/mol). Esterification of the most exposed  
268 and reactive carboxyl groups of KL $\beta$ -gal among which glu<sup>592</sup> is found, resulted in the loss  
269 of the enzyme's ability to interact with  $\beta$ -lg. When lactase activity of the esterified KL $\beta$ -gal  
270 was determined in the presence of  $\beta$ -lg no activating effect was observed.

271 When comparing the changes on the activation caused by esterification of KL $\beta$ -gal with the  
272 changes on the interactions between  $\beta$ -lg and KL $\beta$ -gal a direct correlation was observed: as  
273 long as there are carboxyl groups available for the interaction with  $\beta$ -lg, its activating effect  
274 is observable; this suggests that carboxyl groups of KL $\beta$ -gal are essential for both, the  
275 ability of the enzyme to interact with  $\beta$ -lg and its capacity to be activated by it. The  
276 interaction with  $\beta$ -lg could induce a conformational change of KL $\beta$ -gal leading to a state in  
277 which the active site is more accessible to the substrate and thus, activity is enhanced.

278

## 279 ABBREVIATIONS USED

280 RMSD: Root-mean-square deviation; FDE: Final Docking Energy; DOPE: Discrete  
281 Optimized Protein Energy

## 282 REFERENCES



- 
- 283 • Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of  
284 microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
285 *Analyt. Biochem.*, 72, 248-254.
- 286 • Chen, J. Y. & Tsen, H. Y. (1991). Effect of milk and milk constituents on heat stability  
287 of lactase from *Saccharomyces lactis*. *Journal of the Chinese Agricultural*  
288 *Chemical Society*, 29, 456-464.
- 289 • Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-  
290 Serrano, G. M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Jiménez-Guzmán, J.  
291 (2008). Role of Lysine  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect  
292 of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase. *Journal of Agricultural and Food*  
293 *Chemistry*, 56, 5859-5863.
- 294 • Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Webb B., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen,  
295 M., Pieper, U., & Sali, A. (2006). Comparative Protein Structure Modeling With  
296 MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc.,  
297 Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.
- 298 • Feeney, R. E. (1997). Chemical modifications of food proteins. In Feeney, R. E. &  
299 Whitaker, J. R. (Eds.), *Food proteins: Improvements through chemical end*  
300 *enzymatic modification. Advances through chemical and enzymatic modification*  
301 (pp 3-3b). Washington, DC: American Chemical Society.
- 302 • Fiser, A., Do, R.K., & Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures, *Protein*  
303 *Science*, 9, 1753-1773.
- 304 • Fraenkel-Conrat, H. L. & Olcott, H. S. (1945). Esterification of proteins with alcohols  
305 of low molecular weight. *The Journal of Biological Chemistry*, 161, 259-268.
- 306 • Gekas, V. & Lopez-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review.  
307 *Process Biochemistry*, 20, 2-12.
- 308 • German, J. H. (1997). Applied enzymology of lactose hydrolysis. *Milk Powders for the*  
309 *Future*, 81-87.
- 310 • Greenberg, N. A. & Mahoney, R. R. (1984). The activity of lactase (*Streptococcus*  
311 *thermophilus*) in milk and sweet whey. *Food Chemistry*, 15, 307-313.

- 
- 312 • Halpin, M. I., & Richardson, T. (1985). Selected Functionality Changes of  $\beta$ -  
313 Lactoglobulin upon Esterification of Side-Chain Carboxyl Groups. *Journal of Dairy*  
314 *Science*, 68, 3189-3198.
- 315 • Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G.,  
316 López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2006). Interaction  
317 between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity.  
318 *International Dairy Journal*, 16, 1169-1173.
- 319 • Juers, D. H., Heightman, T. D., Vasella, A., McCarter, J. D., Mackenzie, L., Withers, S.  
320 G., & Matthews, B. W. (2001). A structural view of the action of *Escherichia coli*  
321 (*lacZ*) beta-galactosidase. *Biochemistry*, 40, 14781-14794
- 322 • Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J., & Bouhallab, S.  
323 (1997). Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl  $\beta$ -  
324 Lactoglobulin Conjugates Formed During Heat Treatment of Milk and Whey and  
325 Identification of One Lactose-Binding Site. *Journal of Dairy Science*, 80, 2270-  
326 2281.
- 327 • Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., & Sali, A. (2000).  
328 Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of*  
329 *Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 291-325.
- 330 • Nijpels, H. H. (1991). Lactases and their applications. In *Enzyme and Food*  
331 *Processing*. Applied Science Publishers: London, 89-104.
- 332 • Sali, A. & Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of  
333 spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234, 779-815.
- 334 • Tello-Solis, S., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez Ruiz, L., Cruz-  
335 Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., & García-Garibay, M. (2005).  
336 Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase  
337 and its Structure-Activity Relationship as a Function of the pH. *Journal of*  
338 *Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10200-10204.
- 339 • Zhou, Q. Z. K. & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic  
340 activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical*  
341 *Engineering Journal*, 9, 33-40.

---

**342 FIGURE CAPTIONS**

343

344 Figure 1. Probable interaction site of lysine with KL $\beta$ -gal dimer. Glu<sup>592</sup> (yellow spheres) is  
345 far from the catalytic site (red spheres) and is highly exposed.

346

347 Figure 2. Effect of  $\beta$ -lg on the activity of esterified derivatives of KL $\beta$ -gal.

348

349 Figure 3. Specific activity of KL $\beta$ -gal in esterified derivatives (E0 and E1) after affinity  
350 chromatography with immobilized  $\beta$ -lg. Initial refers to the specific activity in the solution  
351 before affinity chromatography. Control refers to the specific activity obtained when no  
352 ligand was immobilized in the support. Final refers to the specific activity obtained after  
353 affinity chromatography.

354 **FIGURES**

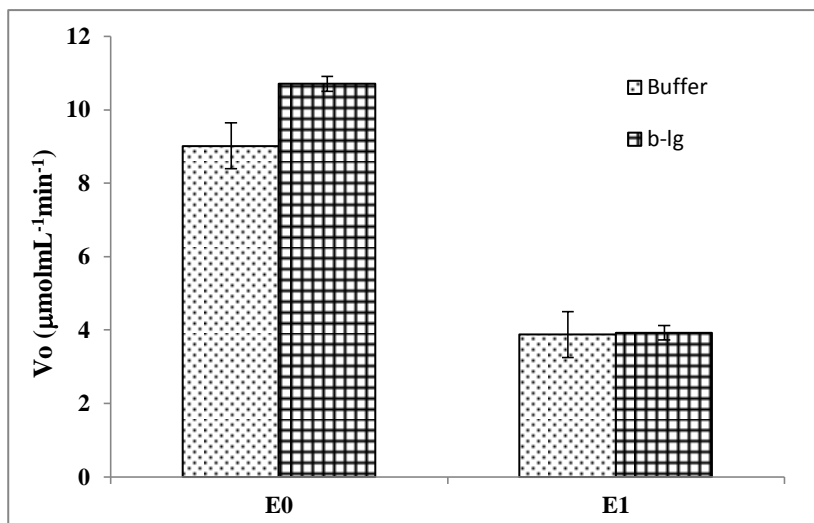
355 Figure 1



356

357 Figure 1. Putative interaction site of lysine with KLβ-gal dimer. Glu<sup>592</sup> (yellow spheres) is  
358 far from the catalytic site (red spheres) and is highly exposed.

359 Figure 2

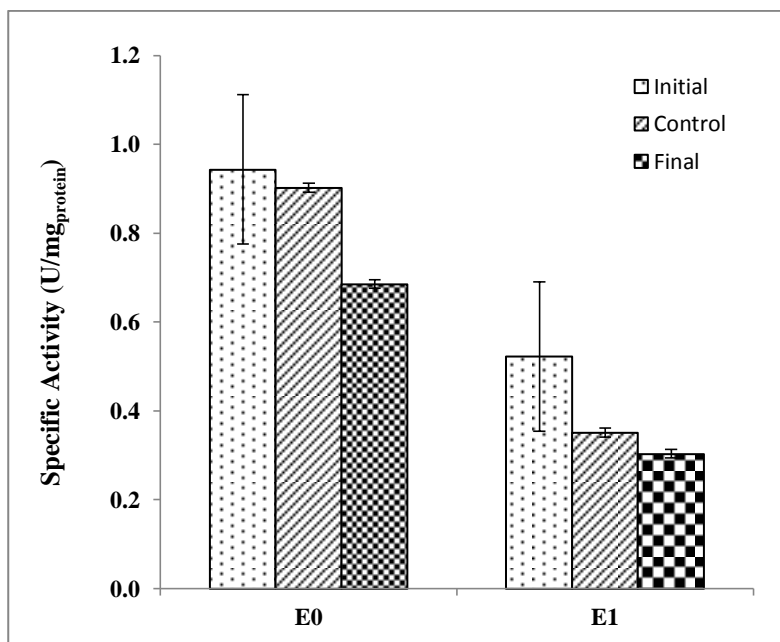


360

361 Figure 2. Effect of  $\beta$ -lg on the activity of esterified derivatives of KL $\beta$ -gal.

362

363 Figure 3



364

365 Figure 3. Specific activity of KL $\beta$ -gal in esterified derivatives (E0 and E1) after affinity  
 366 chromatography with immobilized  $\beta$ -lg. Initial refers to the specific activity in the solution  
 367 before affinity chromatography. Control refers to the specific activity obtained when no  
 368 ligand was immobilized in the support. Final refers to the specific activity obtained after  
 369 affinity chromatography.

---

## E. DISCUSIÓN

Se ha establecido que la lactosilación de la  $\beta$ -lg disminuye su capacidad de activar a la KL $\beta$ -gal al mismo tiempo que disminuye su capacidad de unirse a ella (Jiménez-Guzmán y col., 2006). La lactosilación de la  $\beta$ -lg se da a través de los grupos amino de la lisina, específicamente de la Lys<sup>47</sup> (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998; Morgan y col., 1999), por lo que es muy probable que dicha región de la  $\beta$ -lg también se encuentre implicada en su unión con la KL $\beta$ -gal y que ésta se lleve a cabo por vía de un ataque nucleofílico. Existe controversia sobre los residuos de lisina más reactivos; varios autores reportan que la Lys<sup>47</sup> es una de las más expuestas y reactivas (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998; Morgan y col., 1999) por lo que sería el primer residuo en reaccionar con la lactosa. Otros autores reportan a la Lys<sup>138</sup> como uno de los residuos de lisina más reactivos (Creamer y col. 2003). En 1998 Fogliano y col. reportaron a la Lys<sup>100</sup> como el principal sitio de lactosilación y sugirieron que la reactividad de los diferentes residuos de lisina depende de las condiciones del medio. Para poder determinar cuál es el residuo de lisina de la  $\beta$ -lg que participa en la interacción con la KL $\beta$ -gal se construyó un modelo tridimensional de la  $\beta$ -lg. El modelo se construyó al mismo pH en el que se realizaron los experimentos (pH=7.1) y mostró que las lisinas 15, 47, 69 y 138 se encuentran en la superficie de la proteína (D.1. Figura 1) siendo las más expuestas la Lys<sup>47</sup> y la Lys<sup>138</sup> y por lo tanto, las que probablemente interactúen con la KL $\beta$ -gal. Mediante docking ciego se estimaron las energías de interacción de los residuos de lisina tanto con lactosa como con anhídrido succínico usados como ligandos modelo de electrófilos, mostrando que la Lys<sup>138</sup> presenta la menor energía de interacción (-4.7 kcal/mol para la lactosa y -6.6 kcal/mol para el anhídrido succínico) (D.1. Figuras 2 y 3), por lo que es la que muy probablemente reacciona con ambos.

Para estudiar el papel de los residuos de lisina en la interacción de la  $\beta$ -lg con la KL $\beta$ -gal y en la activación, se succiniló la  $\beta$ -lg para bloquear los grupos amino y se estudió el efecto del bloqueo de dichos grupos sobre la interacción y la activación. La capacidad de interacción se determinó por cromatografía de afinidad, demostrando que la  $\beta$ -lactoglobulina succinilada pierde su capacidad de unirse a la KL $\beta$ -gal (D.1. Figura 6). Más aún, cuando la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se midió en presencia de  $\beta$ -lactoglobulina

---

succinilada, se perdió el efecto activador (D.1. Figura 5) y la actividad permaneció igual a la del control sin  $\beta$ -lactoglobulina. Debido a que la succinilación bloquea los grupos  $\epsilon$ -amino, lo anterior demuestra claramente que el bloqueo de los grupos  $\epsilon$ -amino de la  $\beta$ -lg disminuye las interacciones entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal, provocando la pérdida del efecto activador demostrando que los residuos de lisina son esenciales tanto para la interacción como para la activación.

Los monómeros de la  $\beta$ -lg se pueden asociar para formar diferentes estructuras oligoméricas y luego disociarse en monómeros en función del pH (Verheul et al., 1999; Fox & McSweeney, 1998; Fox et al., 1998); el pH en el que realizaron los experimentos en este trabajo promueve la formación del dímero de la  $\beta$ -lg. Los sitios potenciales de unión de la  $\beta$ -lg con moléculas hidrofóbicas pequeñas se han estudiado ampliamente, y se ha encontrado que estos se localizan en una región altamente hidrofóbica del monómero (Yang y col. 2008a; Yang y col., 2008b, Kontopidis y col., 2002; Ragona y col. 2000; Wu y col., 1999; Ragona y col., 1997). El sitio de unión para las moléculas hidrofóbicas puede variar conforme el dímero se forma pero siempre se localiza en la región del cáliz de la  $\beta$ -lg, mientras que el sitio de unión para moléculas hidrofílicas parece no ser tan específico (Noiseux y col., 2002; Wenbing y col., 2011).

Se estudió el probable sitio de interacción del dímero de la  $\beta$ -lg con moléculas electrofílicas. Para ello, se construyó un modelo del dímero con las condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos (D.2. Figura 1) y se estudió por docking molecular cuáles serían los aminoácidos con mejor probabilidad de participar en la interacción. Se hicieron dockings ciegos del dímero de la  $\beta$ -lg con lactosa y anhídrido succínico utilizados como ligandos modelo de electrófilos (D.2. Figura 2), la Lys<sup>138</sup> de uno de los monómeros y la Lys<sup>141</sup> del otro, son los que muestran una mayor probabilidad de interactuar tanto con la lactosa como con el anhídrido succínico (energías finales de docking, o EDF, de -3.30 y -3.11 kcal/mol, respectivamente). Es importante señalar que tanto en el monómero como en el dímero de la  $\beta$ -lg, los residuos con las mejores probabilidades de interactuar con los ligandos son residuos de lisina y que en ambos casos la Lys<sup>138</sup> participa en la interacción. Lo anterior sugiere que los residuos de lisina son sumamente importantes en la interacción, en especial la Lys<sup>138</sup>. Más aún, los resultados obtenidos en el docking del dímero con los ligandos sugieren que la formación del dímero de la  $\beta$ -lg es necesaria para fortalecer las

---

interacciones debido a la participación de la Lys<sup>138</sup> de uno de los monómeros y la Lys<sup>141</sup> del otro. En esta región del dímero se observó que además de unirse a la Lys<sup>138</sup> y a la Lys<sup>141</sup>, los electrófilos forman puentes de hidrógeno con otros aminoácidos cercanos y expuestos de ambos monómeros (D.2. Figuras 2 y 3); esto podría fortalecer la interacción mediante el acercamiento y la estabilización de los ligandos en una estructura tipo “pinza”, de tal manera que el ataque nucleofílico pueda llevarse a cabo.

Debido a que tanto la estructura y actividad de la KLβ-gal, así como la formación del dímero de la β-Ig son dependientes del pH, se estudió también el efecto del pH en la interacción de la β-Ig con la KLβ-gal y en la actividad enzimática. Para ello se determinó el % de activación de la KLβ-gal por la β-Ig a diferentes valores de pH (D.3. Tabla 1); se observó que la β-Ig tiene un efecto activador sobre la KLβ-gal, el cual es más fuerte a pH 7.0 y completamente ausente a valores de pH de 6.0 y 8.5. Al estudiar el efecto del pH en la interacción entre la β-Ig y la KLβ-gal se observó un comportamiento similar (D.3. Figura 2): la interacción es mucho más fuerte a pH de 7.0 (70%), y la capacidad de interacción disminuye gradualmente hasta desaparecer por completo a valores de pH de 6.0 y 8.5. Cuando se comparan los cambios en la activación provocados por el pH con los cambios en las interacciones entre la β-Ig y la KLβ-gal se observa una correlación (D.3. Figura 3): conforme la interacción entre la β-Ig y la KLβ-gal es más fuerte, la activación aumenta. Se sabe que a temperatura ambiente y valores de pH menores a 4.0 y mayores a 5.2, la β-Ig está formada principalmente por monómeros y dímeros. Alrededor de pH 4.7, se forman estructuras oligoméricas más grandes tales como octámeros (Verheul et al., 1999). En valores cercanos a un pH de 7.0 la β-Ig existe como un dímero (Fox et al., 1998). Al comparar la estructura cuaternaria de la β-Ig a diferentes valores de pH con su capacidad de interactuar y activar a la KLβ-gal, se observó que el estado dimérico de la β-Ig es esencial tanto para la interacción como para la activación de la enzima. Lo anterior refuerza los resultados obtenidos con el docking, pues explican la importancia del dímero al formar una estructura tipo “pinza” que estabilice la interacción con los ligandos. Por otro lado, al caracterizar el efecto del pH en la capacidad de activación de la enzima por la β-Ig, se observó que a pH 7.0, en el que la interacción es más fuerte, el efecto activador de la β-Ig dio lugar a una actividad más alta aún que la encontrada en el pH óptimo en solución amortiguadora (142%). Este resultado sugiere que la interacción entre ambas proteínas



---

podría ayudar a alcanzar una conformación de la KL $\beta$ -lg aún más activa, desplazando el pH óptimo de 7.5 (solo solución amortiguadora), a 7.0 (en presencia de  $\beta$ -lg); a pH 7.0 la fuerte interacción con la  $\beta$ -lg promueve un estado conformacional de la KL $\beta$ -gal en el que el sitio activo es más accesible para el sustrato.

Dado que la interacción entre ambas proteínas es esencial para la activación, es importante conocer qué región de la KL $\beta$ -gal podría ser la responsable de la interacción con la  $\beta$ -lg. En vista de que se ha encontrado que los grupos  $\epsilon$ -amino de la  $\beta$ -lg son esenciales tanto para la interacción como para la activación de la KL $\beta$ -gal, puede asumirse que la interacción tendría que suceder a través de grupos electrofílicos tales como los grupos carboxilo de la enzima. Para comprobarlo, se estudió el papel de los grupos carboxilo de la KL $\beta$ -gal tanto en la interacción con la  $\beta$ -lg como en el efecto activador. Para esto se construyó un modelo tridimensional de la KL $\beta$ -gal y se hizo un docking molecular con lisina (la contraparte por el lado de la  $\beta$ -lg); este docking mostró más de 250 posibles sitios de interacción. Para reducir el número de posibilidades se empleó la siguiente estrategia: dado que al pH de estudio la KL $\beta$ -gal es un dímero, se construyó un modelo del dímero de KL $\beta$ -gal y se localizaron los aminoácidos que el docking del monómero había resaltado. Después de excluir a los aminoácidos carboxílicos que están involucrados en la formación del dímero y a los que forman parte del sitio activo de la enzima, se observó que sólo unos cuantos se encuentran expuestos y por lo tanto podrían interactuar con la  $\beta$ -lg. El docking ciego de la KL $\beta$ -gal con lisina mostró que el aminoácido con la menor energía de interacción es el Glu<sup>592</sup> (EFD=-4.5kcal/mol) (D.4. Figura 1). Los grupos carboxilo de las proteínas pueden ser modificados químicamente por medio de su esterificación gradual con alcoholes de bajo peso molecular adicionando concentraciones bajas de iones hidrógeno para catalizar la reacción en condiciones suaves (Feeney, 1977). Para estudiar el papel de los aminoácidos carboxílicos más expuestos de la KL $\beta$ -gal se bloquearon estos grupos por medio de una reacción de esterificación. Al esterificar los grupos carboxilo más expuestos y reactivos de la KL $\beta$ -gal, entre los cuales se encuentra el Glu<sup>592</sup>, se observó la pérdida de la capacidad de la enzima para unirse a la  $\beta$ -lg (D.4. Figura 3). Además, al determinar la actividad de la enzima esterificada en presencia de  $\beta$ -lg la actividad no mostró diferencia significativa con el control (D.4. Figura 2), sugiriendo que los grupos carboxilo de la KL $\beta$ -gal son esenciales

tanto para la capacidad de la enzima para interactuar con la  $\beta$ -lg como para poder ser activada por ésta.

---

## F. CONCLUSIONES

El hecho de que no se detectara interacción ni activación al bloquearse los grupos  $\epsilon$ -amino de la  $\beta$ -lg, sugiere que estos grupos podrían estar involucrados en la habilidad de la proteína para unirse a la enzima y por lo tanto activarla. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los sitios de interacción encontrados para el dímero de la  $\beta$ -lg y el anhídrido succínico o lactosa, son consistentes con aquellos encontrados para el monómero. Sin embargo, a pesar de que diversos estudios señalan a la Lys<sup>47</sup>, como el principal residuo involucrado en la reacción con lactosa, este estudio sugiere que en el caso del dímero, la interacción con moléculas altamente electrofílicas como la lactosa y el anhídrido succínico sucede más probablemente a través de la Lys<sup>138</sup>. Además, se demostró que la formación del dímero de la  $\beta$ -lg es necesaria para fortalecer las interacciones debido a la participación de la Lys<sup>138</sup> de uno de los monómeros y la Lys<sup>141</sup> del otro: conforme el dímero se forma las regiones cercanas a la Lys<sup>138</sup> y a la Lys<sup>141</sup>, podrían formar una estructura tipo “pinza” que podría establecer interacciones fuertes a través de varios enlaces de hidrógeno y electrofílicos que también podrían explicar las interacciones con moléculas más grandes como la KL $\beta$ -gal.

Por otro lado, también se demostró que la presencia de la  $\beta$ -lg tiene un efecto activador sobre la KL $\beta$ -gal que es más fuerte a pH 7.0 y que desaparece a valores de pH de 6.0 y 8.5, mostrando que el efecto activador es dependiente del pH. Cuando se compararon los cambios en la activación ocasionados por el pH con los cambios en las interacciones entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal, se observó una correlación directa: conforme la interacción entre  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal es más fuerte, la activación aumenta. Es más, cuando la estructura oligomérica de la  $\beta$ -lg se comparó con los valores de pH en los que se encontró tanto interacción como activación, se observó que el estado dimérico de la  $\beta$ -lg es esencial tanto para la interacción como para la activación de la enzima. El hecho de que, a pH 7.0 en presencia de  $\beta$ -lg la actividad observada fue significativamente mayor que la encontrada en el pH óptimo en solución amortiguadora, sugiere que la interacción entre ambas proteínas podría ayudar a alcanzar una conformación de la KL $\beta$ -gal aún más activa, desplazando el pH óptimo de 7.5 en solución amortiguadora a 7.0 en presencia de la proteína, sugiriendo que a este pH, la  $\beta$ -lg promueve un estado conformacional de la KL $\beta$ -gal en el cual, el sitio activo es más accesible para el sustrato.

También se construyó un modelo tridimensional para la KL $\beta$ -gal, y después de excluir los aminoácidos carboxílicos que están involucrados en la formación del dímero, se observó que sólo unos cuantos aminoácidos están expuestos y que probablemente podrían interactuar con la  $\beta$ -lg. El docking ciego de la KL $\beta$ -gal con lisina mostró que el aminoácido más expuesto y reactivo que podría estar involucrado en la interacción con la  $\beta$ -lg es el Glu<sup>592</sup> (EFD=-4.5kcal/mol). La esterificación de los grupos carboxilo de la KL $\beta$ -gal más expuestos y reactivos, entre los cuales se encuentra el Glu<sup>592</sup>, dio lugar a la pérdida de la capacidad de la enzima para unirse a la  $\beta$ -lg. Cuando se determinó la actividad de la KL $\beta$ -gal esterificada en presencia de la  $\beta$ -lg ésta no mostró diferencia significativa con el control. Al comparar los cambios en la actividad ocasionados por la esterificación de la KL $\beta$ -gal con los cambios en las interacciones entre la  $\beta$ -lg y la KL $\beta$ -gal se observó una correlación directa: mientras existen grupos carboxilo disponibles para la interacción con la  $\beta$ -lg, no hay diferencia significativa de la actividad con respecto al control; esto sugiere que los grupos carboxilo de la KL  $\beta$ -gal son esenciales tanto para la capacidad de la enzima para interactuar con la  $\beta$ -lg como para su capacidad de ser activada por ésta.

Todo lo anterior sugiere que la interacción con la  $\beta$ -lg podría inducir un cambio conformacional de la KL $\beta$ -gal en el que el sitio activo sea más accesible para el sustrato y por lo tanto la actividad aumente.

---

## H. REFERENCIAS

- Amiot, J., *Ciencia y Tecnología de la Leche Principios y aplicaciones*, Acribia, Zaragoza, España (1991), 18-37.
- Becerra, M., Cerdán, E., & González-Siso, M. I. (1998). Micro-scale purification of *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnology Techniques*, 12, 3, 253-256.
- Bell, K., & McKenzie, H. A. (1964).  $\beta$ -Lactoglobulins. *Nature*, 204, 1275-1279.
- Blackburn, S., Carter, E. G. H., & Phillips, H. (1941). The methylation of wool with methyl sulphate and methyl halides. *Biochemical Journal*, 35, 627-639.
- Blackburn, S. & Phillips, H. (1944). Experiments on the methylation and acetylation of wool, silk fibroin, collagen and gelatin. *Biochemical Journal*, 38, 171-178.
- Blanch, E. W., Hecht, L., & Barron, L. D. (1999). New insight into the pH- dependent conformational changes in bovine  $\beta$ -lactoglobulin from Raman optical activity. *Protein Science*, 8, 1362-1367.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brignon, G., Chtorou, A., & Ribadeau-Dumas, B. (1985). Does  $\beta$ -lactoglobulin occur in human milk? *Journal of Dairy Research*, 52, 249-254.
- Brownlow, S., Cabral, J. H. M., Cooper, R., Flower, D. R., Yewdall, S. J., Polikarpov, I., North, A. C. T., & Sawyer, L. (1997). Bovine  $\beta$ -lactoglobulin at 1.8 Å resolution—still an enigmatic lipocalin. *Structure*, 5, 481-495.
- Chen, J. Y. & Tsen, H. Y. (1991). Effect of milk and milk constituents on heat stability of lactase from *Saccharomyces lactis*. *Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society*, 29, 456-464.
- Collin, M., D'Alfonso, L., & Baldini, G. (2000). New insight on  $\beta$ -lactoglobulin binding sites by 1-anilinonaphthalene-8-sulfonate fluorescence decay. *Protein Science*, 9, 1968-1974.

- 
- Creamer, L.K.; Sawyer, L. Beta lactoglobulin. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Roginski, H.; Fuquay, J.W.; Fox, P.F., Eds.; Academic Press: London UK, 2003; Vol 3, pp 1932-1938.
  - Creighton, T. E. (1989). *Protein Structure A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Great Britain, 148-153.
  - Del Moral-Ramírez, E., Domínguez-Ramírez, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G. M., García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., & Jiménez-Guzmán, J. (2008). Role of Lysine  $\epsilon$ -Amino Groups of  $\beta$ -Lactoglobulin on Its Activating Effect of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5859-5863.
  - Eswar, N., Marti-Renom, M. A., Webb B., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M., Pieper, U., & Sali, A. (2006). Comparative Protein Structure Modeling With MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., Supplement 15, 5.6.1-5.6.30.
  - Feeney, R. E. (1997). Chemical modifications of food proteins. In Feeney, R. E. & Whitaker, J. R. (Eds.), *Food proteins: Improvements through chemical and enzymatic modification. Advances through chemical and enzymatic modification* (pp 3-3b). Washington, DC: American Chemical Society.
  - Fennema, O. R., *Química de los Alimentos*, Acirbia, Zaragoza, España (2000), 204-206, 394-397.
  - Fiser, A., Do, R.K., & Sali, A. (2000). Modeling of loops in protein structures, *Protein Science*, 9, 1753-1773.
  - Fisher, A. y Sali, A. (2003). Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods in Enzymology*, 374, 461-491.
  - Flower, D. R., North, A. C. T., & Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, 9-24.
  - Fogliano, V., Monti, M. S., Visconti, A., Randazzo, G., Facchiano, M. A., Colonna, G., & Ritenti, A. (1998). Identification of a beta-lactoglobulin lactosylation site. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1338, 295-304.

- 
- Fogolari, F., Ragona, L., Licciardi, S., Romagnoli, S., Michelutti, R., Ugolini, R., & Molinari, H. (2000). Electrostatic properties of bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, 39, 4, 317-330.
  - Fox, P. F. (2003). Milk proteins: general and historical aspects. In P. F. Fox, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1* (pp 1-48). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
  - 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.
  - Fraenkel-Conrat, H. L. & Olcott, H. S. (1945). Esterification of proteins with alcohols of low molecular weight. *The Journal of Biological Chemistry*, 161, 259-268.
  - French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B. y Green-Church, K. B., "Maillard Reaction Induced Lactose Attachment to Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Examination", *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002), 820-823.
  - García Garibay, M. & Gómez Ruiz, L. (1996). Usos de  $\beta$ -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *Revista de Investigación Clínica*, 48 (supl.), 51-61.
  - García-Garibay, M.. (1992). Recuperación de enzimas intracelulares de interés industrial.  $\beta$ -Galactosidasa de levadura. *Ciencia (Mex.)*, 43, 23-33.
  - García-Garibay, M., Gómez-Ruíz, L., Revah Moissev, S. (1993). Biotecnología de productos lácteos. In García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R. y López- Munguía, A., *Biotecnología Alimentaria*. Limusa, México, Cap. 9, 153-161.
  - Gekas, V. & Lopez-Leiva, M. (1985). Hydrolysis of lactose: a literature review. *Process Biochemistry*, 20, 2-12.
  - German, J. H. (1997). Applied enzymology of lactose hydrolysis. *Milk Powders for the Future*, 81-87.
  - Greenberg, N. A. & Mahoney, R. R. (1984). The activity of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *Food Chemistry*, 15, 307-313.

- 
- Halpin, M. I., & Richardson, T. (1985). Selected Functionality Changes of  $\beta$ -Lactoglobulin upon Esterification of Side-Chain Carboxyl Groups. *Journal of Dairy Science*, 68, 3189-3198.
  - Hetényi, C. & 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. & Creighton, T. E. (1982). Effect on Protein Stability of Reversing the Charge on Amino Groups. *Biochimica et Biophysica Acta*, 701, 395-404.
  - Hollecker, M. & Creighton, T.E. (1982). Counting integral numbers of amino groups per polypeptide chain. *FEBS Letters*, 119, 187-189.
  - Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2002). Enhancement of lactase activity in milk by reactive sulfhydryl groups induced by heat treatment. *Journal of Dairy Science*, 85, 2497-2502.
  - Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Cruz-Guerrero, A., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L., & García-Garibay, M. (2006). Interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. *International Dairy Journal*, 16, 1169-1173.
  - Juers, D. H., Heightman, T. D., Vasella, A., McCarter, J. D., Mackenzie, L., Withers, S. G., & Matthews, B. W. (2001). A structural view of the action of *Escherichia coli* (lacZ) beta-galactosidase. *Biochemistry*, 40, 14781-14794
  - Krieger, E., Nabours, S. B., & Vriend, G. (2003). In Bourne, P. E y Weissig, H., Cap. 25. Homology Modeling, Structural Bioinformatics. Wiley-Liss, Inc.
  - Kuwata, K., Hoshino, M., Forge, V., Era, S., Batt, C.A. & Goto, Y. (1999). Solution structure and dynamics of bovine beta-lactoglobulin A. *Protein Science*, 8, 2541-2545.
  - Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J., & Bouhallab, S. (1997). Characterization by Ionization Mass Spectrometry of Lactosyl  $\beta$ -Lactoglobulin Conjugates Formed During Heat Treatment of Milk and Whey and Identification of One Lactose-Binding Site. *Journal of Dairy Science*, 80, 2270-2281.



- 
- López, P., Rosado, J. L., Palma, M., González, C. & Valencia, M. (1996). Mala digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de la leche. *Revista de Investigación Clínica*, 48 (supl.), 15-22.
  - Louquet, M. F., Bonjean-Linczowsky, Y., Keilling, J. & Wilde, R. (1991). In *Leche y Productos lácteos Vaca-Oveja-Cabra*. Ed.: Acribia: España, 11-25, 53-56.
  - Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., & Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Biol. Chem.*, 193, 265.
  - Mahoney, R. R. (1997). Lactose: Enzymatic modification. In *Advanced Dairy Chemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., Fox, P. F., Ed.: Chapman & Hall: London, Vol. 3, p 95.
  - Mandrich, L., Caputo, E., Martin, B. M., Rossi, M., & Manco, G.. “The Aes protein and the monomeric b-galactosidase from *Escherichia coli* form a non-covalent complex”, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002), 48241–48247.
  - Marti-Renom, M.A., Stuart, A., Fiser, A., Sánchez, R., Melo, F., & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29, 291-325.
  - Mc Murry, J. (2001). In *Química Orgánica*, Ed.: Thomson: México, pp1057.
  - Monaco, H. L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L., & Eliopoulos, E. E. (1987). Crystal structure of the trigonal form of bovine beta-lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 197, 695-706.
  - Monti, J. C., Mermoud, A. F., Jolles, P. (1989). Antibovine β-lactoglobulin antibodies react with a human lactoferrin fragment and bovine β-lactoglobulin present in human milk. *Experientia*, 45, 178-180.
  - Morgan, F., Bouhallab, S., Henry, G., Maubois, J. L. & Léonil, J. (1998). Lactolation of β-lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *International Dairy Journal*, 8, 95-98.
  - Morgan, F., Gwénaële, H., Le Graët, Y., Mollé, D., Léonil, J. & Bouhallab, S. (1999a). Resistance of β-lactoglobulin-bound Lactose to the HydroLysis by β-galactosidase. *International Dairy Journal*, 9, 813-816.
  - Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J. L. & Bouhallab, S. (1999b). Glycation of Bovine β-lactoglobulin: effect on

- 
- the Protein Structure. *International Journal of Food Science & Technology.*, 34, 429, 435.
- Morgan, F., Vénien, A., Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J., Peltre, G. & Levieux, D. (1999). Modification of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin by Glycation in a Powered State or in an Aqueous Solution: Immunochemical Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4543, 4548.
  - Nijpels, H. H. (1991). Lactases and their applications. In *Enzyme and Food Processing*. Applied Science Publishers: London, 89-104.
  - Noiseux, I., Gauthier, S. L., & Turgeon, S. (2002). Interactions between Bovine  $\beta$ -lactoglobulin and Peptides under Different Physicochemical Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1587-1592.
  - Ortiz-Chao, P. A., “Estudio de la interacción de las proteínas del suero de leche con la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y su efecto en la actividad” (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México (2004), 48-80.
  - Papiz, M. Z., Sawyer, L., Eliopoulos, E. E., North, A. C. T., Findlay, J. B. C., Sivaprasadarao, R., Jones, T. A., Newcomer, M. E., & Kraulis, P. J. (1986). The structure of  $\beta$ -lactoglobulin and its similarity to plasma retinol-binding protein. *Nature*, 324, 383-385.
  - Qin, B. Y., Bewley, M. C., Creamer, L. K., Baker, H. M., Baker, E. N., & Jameson, G. B. (1998). Structural Basis of the Tanford Transition of Bovine  $\beta$ -Lactoglobulin. *Biochemistry*, 37, 14014-14023.
  - Ragona, L., Fogolari, F., Zetta, L., Perez, D. M., Puyol, P., De Kruif, K., Lohr, F., Ruterjans, H., & Molinari, H. (2000). Bovine beta-lactoglobulin: interaction studies with palmitic acid. *Protein Science*, 9, 1347-1356.
  - Ragona, L., Pusterla, F., Zetta, L., Monaco, H. L., & Molinari, H. (1997). Identification of a conserved hydrophobic cluster in partially folded bovine beta-lactoglobulin at pH 2. *Folding and Design*, 2, 281-290.
  - Sali, A. & Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234, 779-815.

- 
- 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. & Wu, S. (2002b). Erratum to: Milk protein structure- what can it tell the dairy industry? *International Dairy Journal*, 12, 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.
  - Tello-Solis, S., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez Ruiz, L., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., & García-Garibay, M. (2005). Determination of the Secondary Structure of *Kluyveromyces lactis*  $\beta$ -Galactosidase and its Structure-Activity Relationship as a Function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10200-10204.
  - Uhrinova, S., Smith, M. H., Jameson, G. B., Uhrin, D., Sawyer, L., & Barlow, P. N. (2000). Structural changes accompanying pH-induced dissociation of the  $\beta$ -lactoglobulin dimer. *Biochemistry*, 39, 3565-3574.
  - Varnam, A. H. & Sutherland, J. P. (1994). In *Milk and milk Products Technology, Chemistry and Microbiology*. Chapman and Hall: Great Britain, 1-10
  - Verheul, M., Pedersen, J. S., Roefs, S. P. F. M., & Kruif, K. G. (1999). Association behavior of native  $\beta$ -lactoglobulin. *Biopolymers*, 49, 11-20.
  - Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A. & van Boekel, M. A. J. S. (2001). In *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed.: Acribia: España, pp 39-43, 91-94, 109-114.
  - Walstra, P., Jennes, J. (1984). In *Química y Física Lactológica*. Ed.: Acribia: España, pp 84-105.
  - Wenbing, H., Jianan, L., Qun, L., Yumiao, H., Kui, W., Shuang, L., Shaoxiang, X., & Fuyi, W. (2011). Elucidation of the binding sites of sodium dodecil sulfate to  $\beta$ -lactoglobulin using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry combined with docking simulation. *Mass Spectrometry*, 25, 1429-1436.

- 
- Wendorf, W. L., Amundsen, C. H., y Olson, N. F., & Garver, J. C. (1971). Use of yeast  $\beta$ -galactosidase in milk and milk products *Journal of Milk and Food Technology*, 34, 6, 294.
  - Wendorf, W. L., Amundson, C. C., y Olson, N. F. (1970). The effect of heath treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the enzyme lactase. *Journal of Milk and Food Technology*, 22, 9, 377-379.
  - Yang, M. C., Guan, H. H., Liu, M.Y., Lin, Y. H., Yang, J. M., Chen, W. L., Chen, C. J., & Mao, S. J. T. (2008a). Crystal Structure of a secondary vitamin D3 binding site of milk beta-lactoglobulin. *Proteins*, 71, 3, 1197-1210.
  - Yang, M. C., Guan, H. H., Yang, J. M., Ko, C. N., Liu, M.Y., Lin, Y. H., Huang, Y. C., Chen, C. J., & Mao, S. J. T. (2008b). Rational Design for Crystallization of  $\beta$ -Lactoglobulin and Vitamin D<sub>3</sub> Complex: revealing a Secondary Binding Site. *Crystal Growth and Design*, 8, 12, 4268-4276.
  - Zhou, Q. Z. K. & Chen, X. D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9, 33-40.