



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO DE LOS GRUPOS AMINO DE LA  $\beta$ -LACTOGLOBULINA  
SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA  $\beta$ -GALACTOSIDASA”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA :**

**ELIZABETH DEL MORAL RAMÍREZ**



**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D.F.**

**2005**

m. 347344



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** Profa. Zoila Nieto Villalobos

**VOCAL:** Profa. Rosario Adelaida Muñoz Clares

**SECRETARIA:** Profa. Judith Jiménez Guzmán

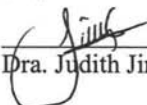
**PRIMER SUPLENTE:** Profa. Amanda Gálvez Mariscal

**SEGUNDO SUPLENTE:** Profa. Rosa María Argote Espinosa

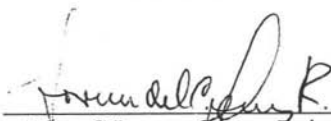
### LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Planta Piloto Dos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Departamento de Biotecnología,  
Universidad Autónoma Metropolitana, Plantel Iztapalapa.

**ASESORA**

  
Dra. Judith Jiménez Guzmán

**SUPERVISORA TÉCNICA  
EXTERNA**

  
M'en C Lorena Gómez Ruiz

**SUSTENTANTE**

  
Elizabeth Del Moral Ramírez

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

*¡Dichoso el hombre que halla la sabiduría y obtiene la inteligencia, porque su ganancia es más que la ganancia de la plata, sus beneficios más que los del oro fino! Más preciosa es que las piedras preciosas: ¡nada que puedas desear se puede comparar con ella! Larga vida hay en su mano derecha, y en su izquierda, riquezas y honra. Sus caminos son caminos deleitosos; todas sus veredas, paz. Es árbol de vida para los que de ella echan mano, y dichosos son los que la retienen.*

*Proverbios 3:13-18*

Gracias a mis papás, **Lucy y Paco**, por darme la vida, por cuidarme, por dar siempre lo mejor de sí y por dar todo por mí y mis hermanos. Gracias mamá por estar a mi lado, por ser la mejor y la más incondicional de mis amigas, por escucharme cuando tengo problemas, celebrar mis éxitos como si fueran tuyos y por soportarme cuando nadie más lo hace. Gracias papá, por sembrar en mí la semilla de la perseverancia, por enseñarme a hacer las cosas lo mejor posible y así ser mejor cada día.

Gracias a mis hermanos, **Maru y Benjamín**, por compartir sus vidas conmigo y enseñarme a sonreír, a ser tolerante, a jugar, a ser feliz. Gracias “dotorcita” por tu compañía, tus consejos y paciencia, por todo aquello que hemos hecho juntas y por quererme tal y como soy. Gracias “flaquito” por tu chispa, por tu sabiduría de niño que hace que la familia sea mejor día con día, porque tu nos enseñas a dar amor.

Gracias a mis abuelitos, **Emita y Juan**, porque ustedes son la luz de la familia, porque con el ejemplo nos enseñan que los valores no pasan de moda. Gracias Emita por tus cuidados, tu paciencia, por estar allí siempre que te necesito, por ser un ejemplo de valentía, de amor, de trabajo. Gracias abuelito por tu plática, tus experiencias, tu amor. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, gracias por ser como unos padres para mí.

Gracias a mis tíos: **Queta, Chucho, Juan y Agus**; porque han sido un gran apoyo y porque sé que siempre que los necesite allí estarán, gracias por ayudarme en los momentos difíciles, por respetar mis decisiones demostrando con ello que me quieren.

Gracias a mi novio, **Ale**, por ser mi compañero en estos años que han sido los mejores de mi vida, gracias por ayudarme, por estar a mi lado y entenderme en todo, gracias por tus consejos, por tu amor, por ser el hombro en el que lloro y mi compañero incondicional en todos los momentos de mi vida; buenos y malos. Gracias amor, por ser mi mejor amigo y por incluirme en tu vida.

Gracias a la **Familia Enciso Flores** por abrirme las puertas de su casa, por preocuparse por mí y por estar dispuestos a ayudarme,

Gracias al **Dr. Anibal y a la Maestra Lucía Bascuñán**, porque sin conocerme me hicieron sentir parte de su hermosa familia. Gracias doctor por enseñarme mucho más que sólo Química, porque con su ejemplo he aprendido a distinguir las cosas valiosas de la vida, a manejar el éxito y la derrota, he

aprendido a ser una mejor persona . Gracias por sus consejos y ayuda invaluable. Gracias Maestra Lucía por permitirme conocerla, por sus atenciones, por abrirme las puertas de su casa, por ser un ejemplo de vida, gracias por ser una gran mujer.

Gracias a todos mis maestros por contribuir a mi formación profesional y por ayudarme a definir poco a poco el camino en el que ahora me encuentro y que tanto disfruto.

Gracias al **Dr. Mariano García Garibay**, por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por confiar en mí y así ayudarme a estar segura de lo que sé, gracias por darme palabras de aliento sin saber que justo en ese momento las necesitaba.

Gracias a mi asesora, la **Dra. Judith Jiménez Guzmán**, por su entusiasmo, por sus enseñanzas que fueron la base de este trabajo. Gracias Judith por tu tiempo, por ser un ejemplo de éxito, de alegría, de amistad. Gracias por hacer amenos los momentos de trabajo, por tratarme siempre bien, por echarme porras y demostrarme que las mujeres ¡sí podemos!

Gracias a la **M en C Lorena Gómez Ruiz**, por sus consejos, por escucharme y por siempre tener las palabras justas en el momento que más se necesitan. Gracias maestra Lore por su ayuda para hacer posible este trabajo y por estar al pendiente de él.

Gracias a los miembros del jurado por enriquecer este trabajo con sus comentarios y sugerencias.

Gracias a mi querida Universidad, por ser mi refugio y por ser el lugar en el que pude conocer a mis mejores amigas y en donde encontré mi vocación.

Gracias a mis amigas: **Ene, Lili, Abi, Jimenita, Licha, Chantis, Ivonne, Chabela**. Gracias por enseñarme a echar relajo y ayudarme a entender que es importante tener amigos en esta vida, gracias por estar al pendiente de mí y por compartir conmigo el amor por el mejor deporte del mundo: ¡el básquetbol! Gracias también a **Robert** por aguantarnos y por enseñarme a jugar.

Gracias a mis compañeros y amigos de la Planta Piloto 2: **Angélica, Carmen, Omar, Luis y Chris**, por estar siempre dispuestos a ayudar, por compartir sus experiencias conmigo y brindarme su amistad.

# CONTENIDO

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| A. Resumen.....                             | 1             |
| B. Abreviaturas.....                        | 3             |
| C. Introducción.....                        | 4             |
| D. Objetivos.....                           | 6             |
| E. Hipótesis.....                           | 6             |
| F. Antecedentes y Generalidades.....        | 7             |
| F. 1. Composición general de la leche.....  | 7             |
| F. 1. 1. Proteínas de la leche.....         | 9             |
| F. 1. 1. 1. Caseínas.....                   | 9             |
| F. 1. 1. 2. Proteínas del suero.....        | 11            |
| F. 1. 1. 2. 1. $\beta$ -Lactoglobulina..... | 13            |
| F. 1. 2. Hidratos de carbono.....           | 14            |
| F. 1. 2. 1. Lactosa.....                    | 15            |
| F. 2. Hidrólisis de la lactosa.....         | 17            |
| F. 3. Lactosilación.....                    | 18            |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>G. Metodología.....</b>   | <b>21</b> |
| <b>G.1. Diagrama general.....</b>  | <b>21</b> |
| <b>G.2. Metodología detallada.....</b>   | <b>22</b> |
| <b>H. Resultados y discusión.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>H. 1. Caracterización de la preparación comercial Maxilact LX 5000®.....</b>                                      | <b>33</b> |
| <b>H. 2. Succinilación de los grupos amino de la <math>\beta</math>-lactoglobulina.....</b>                          | <b>34</b> |
| <b>H. 3. Cuantificación de proteína en los derivados succinilados.....</b>   | <b>38</b> |
| <b>H. 4. Determinación de la actividad de la <math>\beta</math>-galactosidasa en los derivados succinilados.....</b> | <b>39</b> |
| <b>I. Conclusiones.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>J. Perspectivas.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>K. Bibliografía.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>L. Apéndice.....</b>  | <b>51</b> |



## A. RESUMEN

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

En estudios recientes se ha encontrado que la presencia de  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) en el medio de reacción durante la hidrólisis enzimática de la lactosa produce un efecto activador sobre la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) de *Kluyveromyces lactis* de hasta un 230% y se ha sugerido que tal efecto probablemente se debe a la unión entre la enzima y dicha proteína. Por otro lado, se ha demostrado que la lactosa se une a la  $\beta$ -lactoglobulina principalmente a través de la Lys<sub>47</sub>, disminuyendo con esto su capacidad activadora sobre la enzima (Jiménez -Guzmán y col., 2005). Algunos de los grupos químicos más reactivos de la  $\beta$ -Lg son los grupos amino de los residuos de lisina, siendo el grupo amino de la lisina 47 (Lys<sub>47</sub>) uno de los más expuestos y más reactivos (Creamer y Sawyer, 2003). Lo anterior sugiere que la misma región de la molécula podría estar involucrada también en la unión entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que es muy probable que la unión entre la  $\beta$ -Lg y la  $\beta$ -gal se lleve a cabo a través de dichos grupos.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la importancia de los grupos amino de los residuos de lisina en el efecto activador de la  $\beta$ -lactoglobulina sobre la  $\beta$ -galactosidasa.

Se llevó a cabo la modificación química de la  $\beta$ -Lg mediante una reacción de succinilación, la cual permite bloquear específica y gradualmente sus grupos amino (Klapper y Koltz, 1972; Hanock y Benz, 1986) sin que pierda estabilidad, cuando menos hasta que 10 de estos grupos se encuentran bloqueados (Hollecker y Creighton, 1981); también se midió la actividad de lactasa

en presencia de la  $\beta$ -Lg modificada. Se encontró que la capacidad activadora de la  $\beta$ -Lg desapareció al estar succinilados sus grupos amino más reactivos, con lo que se determinó que estos grupos juegan un papel determinante en la activación de la  $\beta$ -galactosidasa.

## B. ABREVIATURAS

**AE:** Actividad específica (UE/mg)

**$\beta$ -gal:**  $\beta$ -galactosidasa

**$\beta$ -Lg:**  $\beta$ -lactoglobulina

**Cys<sub>66, 106, 119, 121, 166</sub>:** Cisteínas 66, 106, 119, 121 y 166 de la  $\beta$ -lactoglobulina

**Lys<sub>47</sub>:** Lisina 47 de la  $\beta$ -lactoglobulina

**ONP:** *o*-nitrofenol

**ONPG:** *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido

***R<sub>f</sub>*:** Coeficiente de correlación en electroforesis

**SA:** Seroalbúmina

**SH:** Grupo sulfhidrilo

**UE:** Unidades enzimáticas en 1 mL de medio de reacción

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

## C. INTRODUCCIÓN

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

La composición de la leche varía de especie a especie de acuerdo con las necesidades dietéticas del mamífero. El mayor constituyente es el agua y, dependiendo de la especie, la leche contiene cantidades variables de lípidos, proteínas e hidratos de carbono; en pequeñas cantidades se encuentran minerales y otros componentes hidro- o liposolubles.

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

Además, debido a su baja solubilidad y su tendencia a la cristalización, la lactosa puede generar problemas técnicos de precipitación; formación de grumos y arenosidades indeseables en productos lácteos con un alto contenido de sólidos como son: helados, leches condensadas y azucaradas, cajetas y flanes (García-Garibay, 1993). 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 los problemas mencionados y ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista.

En estudios recientes se ha observado que la presencia en el medio de reacción de seroalbúmina o  $\beta$ -lactoglobulina (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) y que este efecto activador podría deberse a la unión entre la enzima y dichas proteínas (Jiménez-Guzmán y col., 2005).

Jiménez-Guzmán y col. (2005) encontraron que la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina, como consecuencia del tratamiento térmico de la proteína en presencia de lactosa, disminuye la capacidad de la  $\beta$ -lactoglobulina de unirse a la  $\beta$ -galactosidasa, reduciendo con esto su poder activador. Por otro lado, se ha demostrado que la lactosa se une a la  $\beta$ -lactoglobulina principalmente a través de la lisina 47 (Lys<sub>47</sub>) (Léonil y col., 1997; Morgan y col., 1998 y Morgan y col., 1999 a). En la molécula de  $\beta$ -lactoglobulina la Lys<sub>47</sub> se localiza muy cerca de una prolina, cuya presencia provoca una torsión en la cadena polipeptídica; lo cual hace que la Lys<sub>47</sub> esté en una región muy expuesta y por lo tanto que reaccione fácilmente (Creamer y Sawyer, 2003). El hecho de que la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina disminuya su capacidad de unirse a la enzima, sugiere que la misma región de la molécula podría estar involucrada en ambas uniones (Jiménez-Guzmán y col., 2005). No existen reportes que indiquen si tal efecto se debe a un impedimento estérico para que se lleve a cabo la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa, o si es esta región de la proteína el sitio de unión con la  $\beta$ -galactosidasa.

El propósito de este estudio fue determinar si los grupos amino de los residuos de lisina (en especial de la Lys<sub>47</sub>) están relacionados con el efecto activador de la  $\beta$ -lactoglobulina sobre la  $\beta$ -galactosidasa.

## D. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Determinar si los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina juegan un papel importante en el efecto activador de esta proteína sobre la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Bloquear los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina por medio de una reacción de succinilación.
- Determinar la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en presencia de  $\beta$ -lactoglobulina bloqueada y nativa.

## E. HIPÓTESIS

El bloqueo de los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina puede interferir con las interacciones entre dicha proteína y la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* alterando con ello la capacidad activadora de la  $\beta$ -lactoglobulina.

## F. ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

### F. 1. Composición general de la leche

Dentro de la amplia gama de alimentos que el hombre ha seleccionado como parte de su alimentación, la leche es el único que ha sido diseñado por la naturaleza para este propósito; tiene una composición compleja y es conocida y aceptada a nivel mundial por su alta calidad 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 acuosa. Por otro lado, la actividad acuosa tiene una gran influencia sobre el proceso de secado; pues establece la cantidad de energía necesaria para llevar a cabo dicho proceso (Spreer, 1991).

De todos los componentes de la leche, la fracción formada por las grasas es la que más varía 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 Jennes, 1984).



## F. 1. 1. Proteínas de la leche

Las proteínas de la leche son de dos tipos: proteínas del suero y caseínas. Las caseínas constituyen más del 80% de las proteínas totales de la leche (Walstra y Jennes, 1984). 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 Jennes, 1984).

### F. 1.1.1. Caseínas

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<br>kDa | % en masa del<br>total de caseínas | No. de grupos<br>fosfato | mol Ca <sup>2+</sup><br>ligado* |
|------------------------|-------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| $\alpha_{s1}$ -caseína | $\alpha_{s1}$ -CN | 23.6                  | 42                                 | 7-9                      | 8                               |
| $\alpha_{s2}$ -caseína | $\alpha_{s2}$ -CN | 25.1                  | 11                                 | 10-13                    | **                              |
| $\beta$ -caseína       | $\beta$ -CN       | 24.0                  | 31                                 | 5                        | 5                               |
| $\kappa$ -caseína      | $\kappa$ -CN      | 19.0                  | 11                                 | 1                        | 2                               |
| Otras caseínas         |                   |                       | 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  $\lambda$ -caseína, las  $\gamma$ -caseínas ( $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  y  $\gamma_3$ ) y las proteosas peptonas, que anteriormente se consideraban como proteínas del suero, pues son solubles a pH 4.6, sin embargo, provienen de la hidrólisis de las  $\beta$ -caseínas y por ello ahora se les considera parte de las caseínas (Fox y McSweeney, 1998; Amiot, 1991).

Se han encontrado, por lo menos, otros 30 péptidos que aún no han sido completamente caracterizados e identificados; los cuales se consideran caseínas minoritarias y comprenden el 5% del total de las caseínas (Amiot, 1991).

Una característica inusual de todas las caseínas es la 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  $\text{Ca}^{2+}$  (Tabla 2) sobre todo a pH alto (Varnam y Sutherland, 1994; Walstra y Jennes, 1984).

En general, todas las caseínas tienen pocos grupos sulfhidrilo, pero estos grupos no se encuentran libres sino formando enlaces disulfuro intramoleculares o bien con otras proteínas. Además tienen una alta incidencia de prolina, de cadenas hidrofóbicas en su estructura y de aminoácidos con carga, especialmente ácido aspártico y ácido glutámico.

El carácter anfífilico 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).

### F. 1. 1. 2. Proteínas del suero

Las proteínas del suero comprenden dos tipos de proteínas sintetizadas en la glándula mamaria:  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina; además de pequeñas cantidades de proteínas 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, que se pueden encontrar en estado nativo si la leche o el suero no se han calentado por encima de los 75°C; 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 14.2 kDa; es muy soluble en agua y su punto isoeléctrico es de 4.8. En comparación con la  $\beta$ -lactoglobulina, es poco soluble en soluciones diluidas de sales neutras (Walstra y Jennes, 1984).

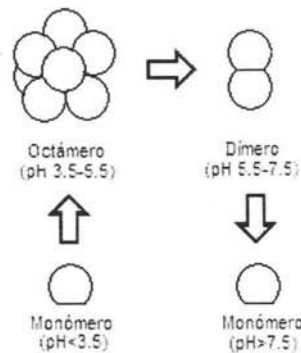
La albúmina sérica representa el 6.2 % del las proteínas de suero y es exactamente igual que la albúmina del suero sanguíneo. Su masa molecular es de 66.3 kDa y tiene un punto isoeléctrico de 4.7; es especialmente rica en lisina y cisteína, muy soluble en agua y se puede cristalizar a partir de una solución concentrada de sulfato de amonio (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 contienen una parte glucídica (Walstra y Jennes, 1984). Son menos solubles en agua que la lactoalbúmina y precipitan en una solución semi-saturada de sulfato de amonio; 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).

### F. 1. 1. 2. 1. $\beta$ - Lactoglobulina

La  $\beta$ -lactoglobulina es la más importante de las proteínas del suero. Es la más abundante pues constituye el 50.8% de las proteínas del suero y el 9.8 % del total de las proteínas de la leche (Walstra y Jennes, 1984). Su masa molecular es de 18.4 kDa, pero en la literatura se da a veces la de 36 kDa debido a que se presenta en la naturaleza como un dímero de dos subunidades monoméricas entrecruzadas por dos puentes disulfuro (aproximadamente a pH de 6.5) e incluso polímeros de hasta más cadenas polipeptídicas dependiendo del pH (Figura 1) (Ortiz, 2004; Walstra y Jennes, 1984).



**Figura 1.** Efecto del pH en la estructura cuaternaria de la  $\beta$ -lactoglobulina (Ortiz, 2004).

Su punto isoelectrico 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<sub>66</sub> con la Cys<sub>160</sub> y el otro a la Cys<sub>106</sub> con la Cys<sub>119</sub> (Walstra y Jennes, 1984). El grupo tiol libre se encuentra en la Cys<sub>121</sub> (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 gusto a cocido de la leche sobrecalentada (Spreer, 1991).

|   |                                 |
|---|---------------------------------|
| 1   | 11                              |
| Leu Ile Val Thr Gin 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 Arg Leu Ser Phe Asn Pro Thr Gln Leu Glu Glu Gln Cys |                                 |
| 161 162   |                                 |
| His Ile   |                                 |

Figura 2. 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<sub>121</sub>.

## F. 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 3) (Louquet y col., 1991).

**Tabla 3.** Clasificación de los hidratos de carbono presentes en la leche de vaca (Louquet y col., 1991):

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

### F. 1. 2. 1. Lactosa

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

La lactosa es un disacárido constituido por dos moléculas, una de  $\alpha$ -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 apropiado para la molécula es el de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-glucopiranososa (Fig. 3).

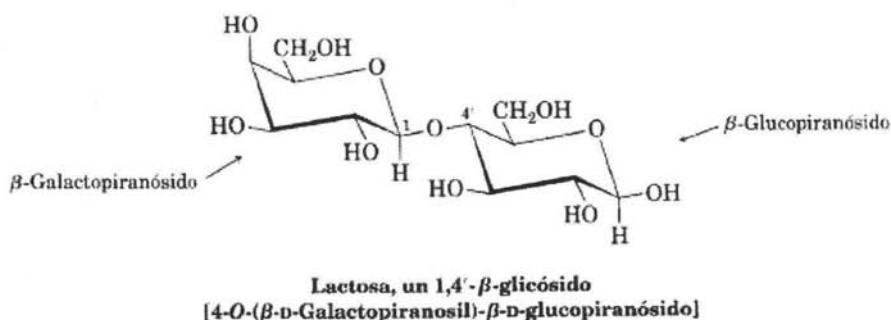


Figura 3. Estructura de la lactosa (Mc Murry, 2001)

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. 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 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.

## F. 2. Hidrólisis de la lactosa

La  $\beta$ -galactosidasa es la 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; pero comercialmente se explotan sólo algunas lactasas de origen microbiano (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

A la fecha se han realizado diversas investigaciones en relación con la hidrólisis enzimática de la lactosa; incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimos, efecto de algunos factores como la presión osmótica, fuerza iónica, presencia de iones, etcétera), su utilización y las diferentes fuentes comerciales que son: hongos como *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*; bacterias como *Streptococcus thermophilus* y levaduras, entre las que se encuentran *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *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).

En 1958 se publicaron los primeros resultados 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. No fue sino hasta 1994 que Zhu y Damodaran lograron concluir que dicho efecto se debe a la presencia de las proteínas del suero durante el calentamiento, desatándose así una polémica sobre cuál era el papel de las proteínas del suero en el aumento de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa (Fox y McSweeney, 2002).

Finalmente en el 2002 se logró determinar que el aumento en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en presencia de las proteínas del suero y a temperaturas de hasta de 75°C está relacionado con la descomposición de los grupos sulfhidrilo de las proteínas del suero (especialmente de la  $\beta$ -Lg) 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). Además se encontró que la sola presencia de seroalbúmina ó  $\beta$ -lactoglobulina en el medio de reacción, produce un efecto activador que podría deberse a una unión entre la enzima y dichas proteínas (Jiménez-Guzmán y col., 2002).

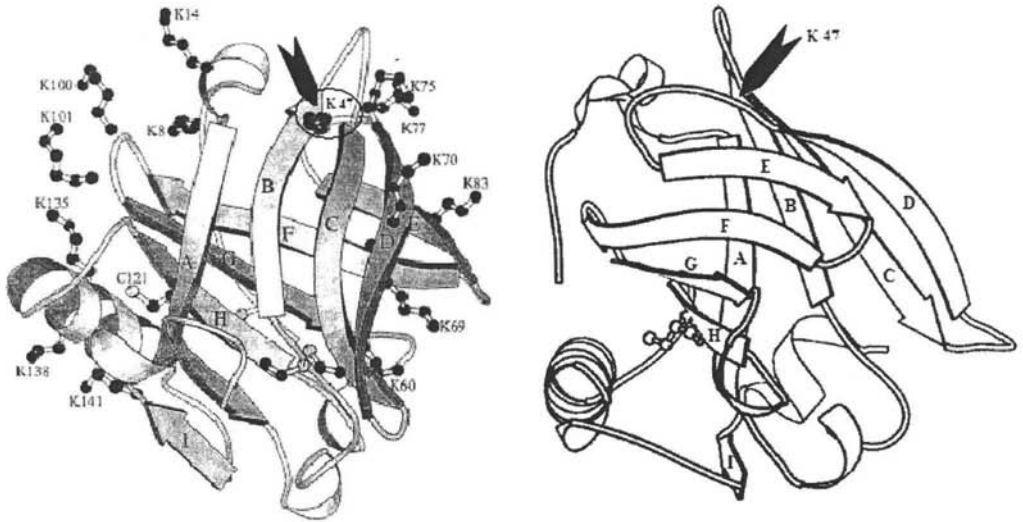
### **F. 3. Lactosilación**

El calentamiento del suero puede causar una gran variedad de reacciones; una de ellas es la lactosilación de la  $\beta$ -lactoglobulina, la cual implica la glicosilación de la proteína con la lactosa

presente en el medio vía reacción de Maillard en sus primeras etapas (Léonil y col., 1997) donde 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 (Morgan y col., 1999a) y cuantificable.

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 40% y se ha observado que esto se puede deber a que la lactosilación disminuye la capacidad de la  $\beta$ -lactoglobulina para unirse con la  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto, también su capacidad de activarla (Jiménez-Guzmán, 2003; Jiménez-Guzmán y col., 2005).

También se ha determinado que es en la lisina 47 (Lys<sub>47</sub>) 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 y expone al residuo de lisina haciendo a su grupo amino el más reactivo de los 16 grupos amino de la proteína (Fig. 3) (Morgan y col., 1998, 1999b).

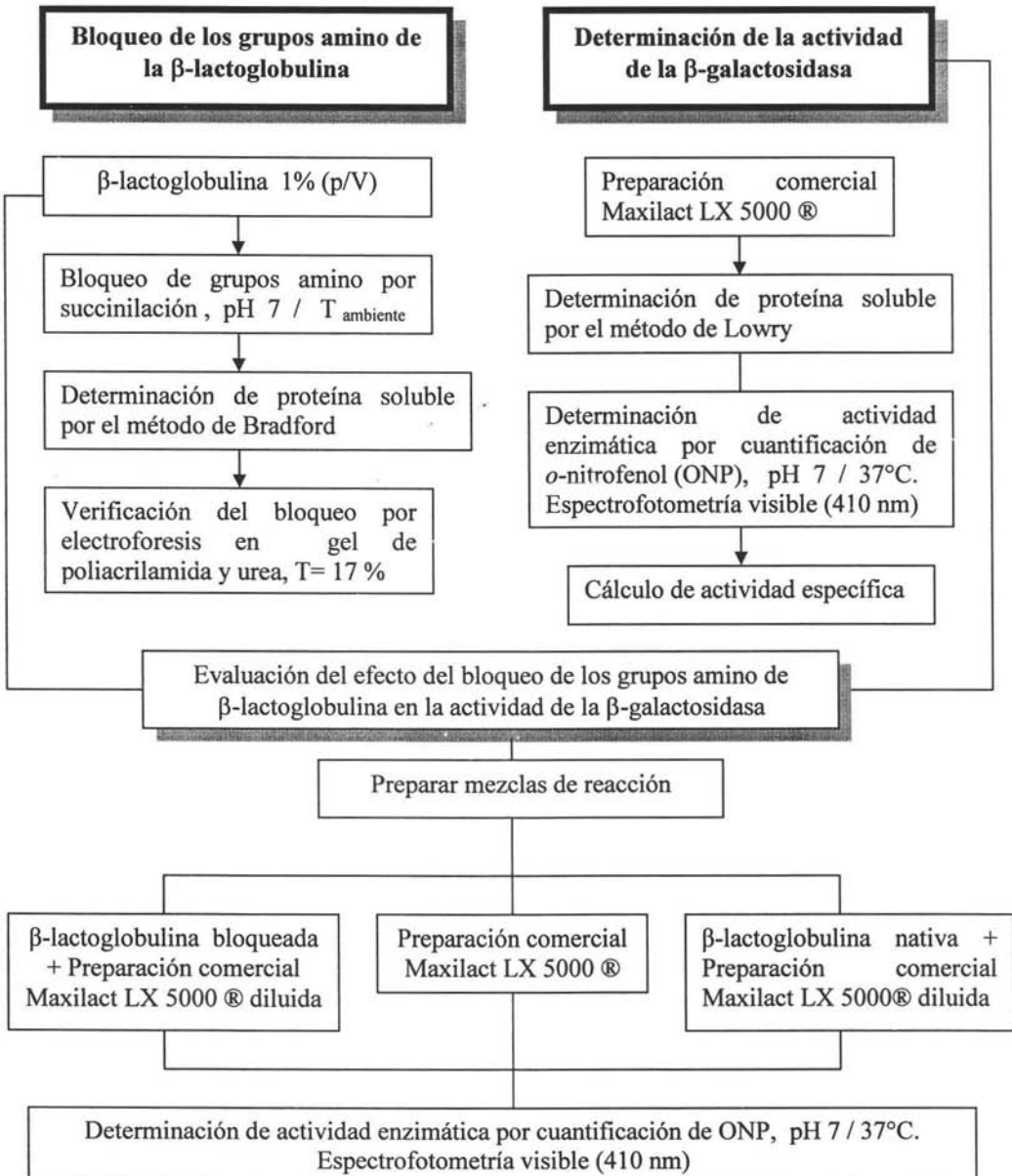


**Figura 3.** Modelos tridimensionales de la estructura de los monómeros de  $\beta$ -lactoglobulina dibujados con el programa MOLSCRIPT. Las hebras- $\beta$  están marcadas de la A a la I. La lisina 47 (marcada con una flecha) se encuentra sumamente expuesta (Morgan y col., 1999; Sawyer y col., 1999,2002a, 2002b).

En el 2005 Jiménez-Guzmán y col., demostraron que existe una fuerte unión entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa. También encontraron que cuando la  $\beta$ -lactoglobulina está lactosilada su capacidad de unirse con la  $\beta$ -galactosidasa disminuye en aproximadamente un 30% (Jiménez-Guzmán, 2003) al mismo tiempo que desaparece el efecto activador; por lo que es muy probable que la activación de la  $\beta$ -galactosidasa se dé gracias a la unión entre ésta y la  $\beta$ -lactoglobulina; además de que sea el sitio de unión entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la lactosa el implicado también en la unión entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa.

## G. METODOLOGÍA

### G.1. Diagrama General



## G.2. Metodología detallada

Actividad de la  $\beta$ -galactosidasa por cuantificación de ONP-Espectrofotometría visible (410 nm), según Jiménez-Guzmán (2003)

### Fundamento:

El ONP, de color amarillo, liberado por la acción de la  $\beta$ -galactosidasa sobre el *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactósido (ONPG) es cuantificable coloriméricamente y es proporcional a la actividad enzimática.

### Muestras:

- Dilución 1:6000 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® (Gist Brocades, Suecia) como fuente de  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7, conservada en refrigeración a 4°C.

### Reactivos:

- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 6.8-7.0, conservado en refrigeración a 4°C preparado con fosfato de potasio monobásico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y fosfato de potasio dibásico,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J. T. Baker, México) conservados a temperatura ambiente.
- Solución 0.034 M de *o*-nitrofenil- $\beta$ -galactósido,  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_8$  (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7, almacenado en frasco ámbar y congelación a -8°C.

- Solución 10 mM de *o*-nitrofenol (solución patrón), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub> (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M con pH 7, almacenado en frasco ámbar y refrigeración a 4°C.
- Solución de β-lactoglobulina al 1% (p/V) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) en agua desionizada conservada en refrigeración a 4°C.
- Solución de β-lactoglobulina bloqueada con anhídrido succínico en agua desionizada, conservada en congelación a -8°C.

Equipo:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japón).
- Controlador de temperatura para espectrofotómetro: Shimadzu Temperature Controlled Cell Holder TCC-240A (Shimadzu, Japón).
- Micropipetas de 0.5-10 μL, 40-200 μL y 100-1000 μL

**Procedimiento (Caracterización de la preparación comercial Maxilact LX 5000®)**

1. Colocar con micropipeta en un tubo de ensayo, 900 μL de solución amortiguadora de fosfatos.
2. Incubar en baño de agua a 37°C durante 15 min.
3. Colocar en celda de vidrio 33 μL de una dilución 1:6000 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® y 67 μL de ONPG.

4. Vaciar el contenido del tubo a la celda de vidrio. Agitar
5. Determinar absorbancia a 410 nm y a temperatura de 37°C cada 30 s durante 3 min.
6. Calcular concentración de ONP con ayuda de ecuación obtenida a partir de la curva patrón (Figura 1) que se preparó en un intervalo de 0-833.33  $\mu\text{M}_{\text{ONP}}$ .

**Procedimiento (Determinación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en los derivados succinilados)**

1. Colocar con micropipeta en un tubo de ensayo, 900  $\mu\text{L}$  de cada uno de los derivados succinilados así como de la solución de  $\beta$ -Lg nativa 1% (pV)
2. Incubar en baño de agua a 37°C durante 15 min.
3. Colocar en celda de vidrio 33  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:6000 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® y 67  $\mu\text{L}$  de ONPG.
4. Vaciar el contenido del tubo a la celda de vidrio. Agitar
5. Determinar absorbancia a 410 nm y a temperatura de 37°C cada 30 s durante 3 min.
6. Calcular concentración de ONP con ayuda de ecuación obtenida a partir de la curva patrón (Figura 1) que se preparó en un intervalo de 0-833.33  $\mu\text{M}_{\text{ONP}}$ .



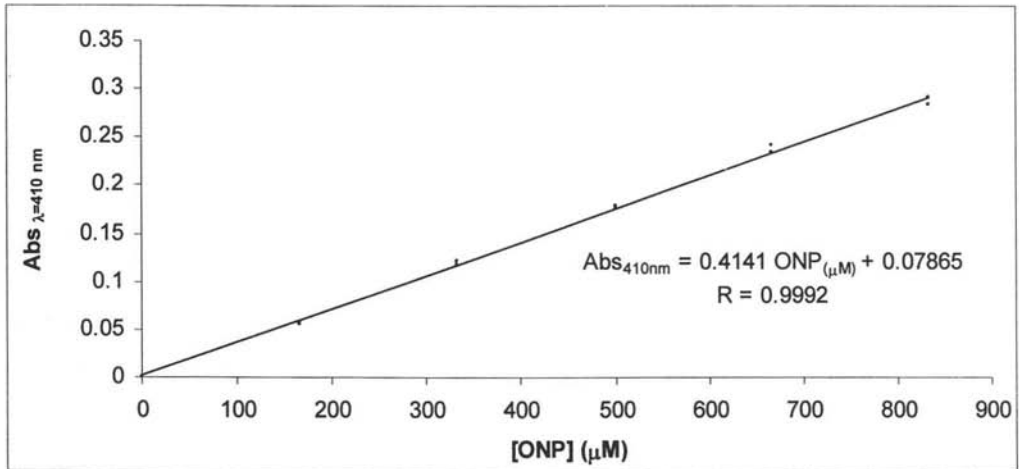
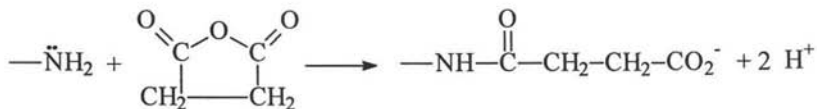


Figura 1. Curva patrón de ONP para la determinación de actividad de la β-galactosidasa en la preparación comercial Maxilact LX 5000®.

Succinilación de los grupos amino de la β-lactoglobulina, según Hollecker y Creighton (1982).

Fundamento:

El anhídrido succínico introduce un grupo carboxilo en la proteína al reaccionar específicamente con los grupos amino de los residuos de lisina y los grupos amino terminales de la proteína.



Muestra:

- Solución de β-lactoglobulina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) al 1% (p/V).

## Reactivos:

- Anhídrido succínico ( $\text{OCCH}_2\text{CH}_2\text{OO}$ ) en cristales, (Matheson Coleman and Bell, Ohio, EUA) almacenado en frasco ámbar a temperatura ambiente.
- Solución de hidróxido de potasio 0.1 M, KOH (J. T. Baker, México).

## Equipo:

- Potenciómetro Conductronic pH120.
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$

## Procedimiento:

1. Tomar 25 mL de solución de  $\beta$ -lactoglobulina al 1% (p/V) (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) y colocarlos en un vaso de precipitados con agitación constante; medir pH con potenciómetro.
2. Ajustar pH a 7 con KOH.
3. Tomar 1 mL de la solución con pH ajustado a 7 que servirá de control y guardar a  $-8^\circ\text{C}$  para posteriormente medir actividad enzimática.
4. Pesar 5 mg de anhídrido succínico y agregarlo poco a poco a la solución de  $\beta$ -lactoglobulina restante en el vaso.
5. Ajustar pH a 7 con KOH una vez que el anhídrido succínico se haya disuelto.
6. Una vez que el pH haya permanecido en 7 durante 10 minutos, tomar una muestra de 1 mL que corresponderá al primer derivado succinilado de  $\beta$ -Lg.
7. Guardar la muestra a  $-8^\circ\text{C}$  para posteriormente medir actividad enzimática.
8. Repetir desde el paso 4 hasta obtener 12 derivados succinilados de  $\beta$ -Lg.

Verificación del bloqueo de los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina en gel de poliacrilamida y saturado con urea 8M, según Hollecker y Creighton (1982)

Fundamento:

La separación de las proteínas en un gel de poliacrilamida, con un tamaño de poro determinado, es posible gracias a su tamaño, forma y carga neta.

Muestra:

- Derivados succinilados de la  $\beta$ -lactoglobulina y solución de  $\beta$ -lactoglobulina nativa con pH ajustado a 7.

Reactivos:

- Solución de acrilamida al 30%, almacenada en frasco ámbar y refrigeración a 4°C: N,N'-metilen-bis-acrilamida, acrilamida (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) y agua desionizada.
- Solución amortiguadora Acético-tris 1M con pH 4.7 almacenada en refrigeración a una temperatura de 4°C; Ácido acético glacial (J. T. Baker, México) 1M, Tris, Electrophoresis (BIO-RAD, Hercules, CA,EUA), agua desionizada.
- Solución amortiguadora de corrida Acético-tris 0.05 M con pH 4.7 almacenado en refrigeración a una temperatura de 4°C; Ácido acético glacial (J. T. Baker, México) 1M, Tris, Electrophoresis (BIO-RAD, Hercules, CA,EUA), agua desionizada.
- Solución de persulfato de amonio 20%: Persulfato de amonio (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) conservado en frasco ámbar y dentro de un desecador.

- TEMED, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA) almacenado en frasco ámbar y en refrigeración a temperatura de 4°C.
- Solución amortiguadora de la muestra o colorante almacenado en tubo de plástico y congelación a temperatura de -8°C; solución amortiguadora Acético-tris 0.5 M con pH 6.8; Ácido acético glacial (J. T. Baker, México) 0.5 M, Tris, Electrophoresis (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA), glicerol (J. T. Baker, México), azul de bromofenol (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA).
- Solución decolorante, almacenada a temperatura ambiente: Metanol y ácido acético glacial (J. T. Baker, México) 40 y 10% y agua 50%.
- Azul de coomasie al 0.25% en solución decolorante almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad: Coomasie® Brilliant Blue R-250 (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA).

#### Equipo:

- Mini PROTEAN® 3 Cell Chamber, (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA).
- Fuente de poder Power Pac 300 (BIO-RAD, Hercules, CA, EUA)
- Micropipetas de 0.5-10 µL, 5-40 µL, 40-200 µL y 100-1000 µL.

#### Procedimiento:

1. Preparar gel de separación disolviendo primero la urea en la solución de acrilamida y en la solución amortiguadora acético-tris 0.1 M, pH 4.7
2. Degasificar durante 15 min. con agitación en una bomba de vacío.
3. Agregar TEMED y persulfato.
4. Colocar en equipo de electroforesis limpio y seco.

5. Preparar gel de concentración sin urea y siguiendo los pasos de la preparación del gel de separación.
6. Dejar polimerizar.
7. Montar el quipo para correr el gel, vaciar el solución amortiguadora Acético-tris 0.05 M pH 4.7 en la cámara e inyectar 15  $\mu$ L de los derivados succinilados (20  $\mu$ L de colorante y 40  $\mu$ L de las mezclas de reacción).
8. Correr el gel iniciando con 30 V y aumentar el voltaje hasta que las muestras lleguen al gel de separación; aumentar el voltaje a 90 V y mantener constante durante aproximadamente 6 h hasta que el frente haya recorrido todo el gel. Colocar hielo alrededor de la cámara.
9. Sacar los geles y colocarlos en Azul de Coomasie por 1 h.
10. Pasar los geles a la solución decolorante y cambiar esta las veces que sea necesario hasta lograr apreciar bandas bien definidas.
11. Interpretar los resultados.

*Eliminación del anhídrido succínico residual en los derivados succinilados por ultrafiltración utilizando celdas de membranas de celulosa de corte igual a 10 000, según Jiménez-Guzmán y col. (2003).*

#### Fundamento:

La ultrafiltración se basa en la separación de los componentes de una disolución a través de una membrana semipermeable, por la diferencia en el tamaño de sus moléculas, cuando se le somete a una fuerza centrífuga.

Muestras:

- Derivados succinilados de la  $\beta$ -lactoglobulina.

Equipo:

- Centrífuga Beckman J2-M1

Reactivos:

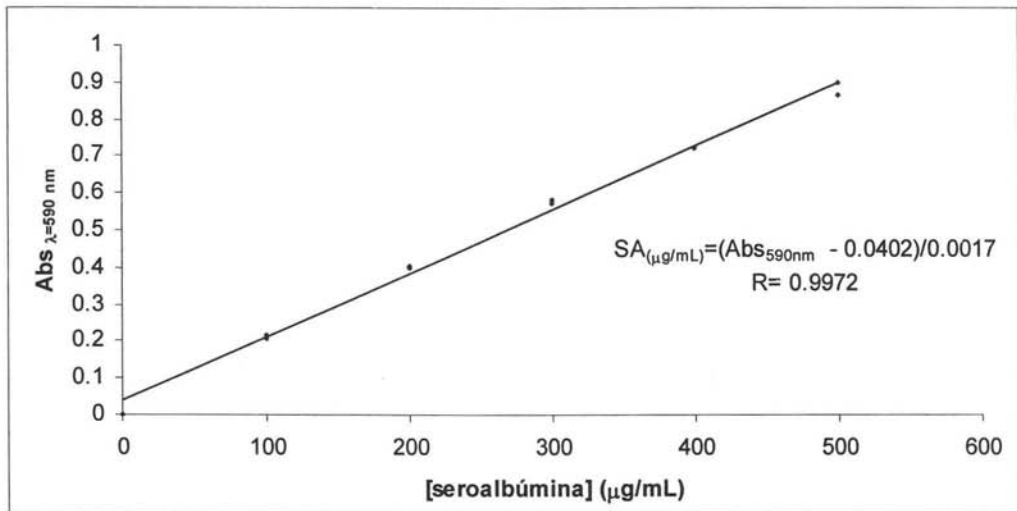
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 6.8-7.0 conservado en refrigeración a 4°C; preparado con fosfato de potasio monobásico,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y fosfato de potasio dibásico,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (J. T. Baker, México) conservados a temperatura ambiente.
- Soluciones de hidróxido de sodio 0.1 y 0.05 N, NaOH en lentejas, Industrial (Reactivos Analíticos REASOL, México).

Procedimiento:

- Colocar en las celdas de membranas de celulosa de corte igual a 10 000, 1.5 mL de cada uno de los derivados succinilados.
- Centrifugar a 2500 G durante 30 minutos.
- Enjuagar los ultrafiltrados con 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M para resuspender la  $\beta$ -Lg succinilada libre de anhídrido succínico residual.
- Lavar las celdas con NaOH 0.1 N y almacenarlas en solución de NaOH 0.05 N a 4°C.
- Determinar concentración de proteína por el método de Bradford.

Para la determinación de la proteína presente en la preparación comercial Maxilact LX 5000® se utilizó la técnica de Lowry (Lowry y col., 1951) que se encuentra detallada en el Apéndice.

La concentración de proteína se calculó comparando las absorbancias contra una curva patrón de seroalbúmina (SA) con intervalo de 0 a 500  $\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}$  (Figura 2).



**Figura 2.** Curva patrón de seroalbúmina para la determinación de proteína soluble por el método de Lowry en la preparación comercial Maxilact LX 5000®

Para la determinación de la proteína presente en las muestras correspondientes a los derivados succinilados de  $\beta$ -Lg se utilizó la técnica de Bradford (Bradford, 1976) que se encuentra detallada en el Apéndice.

La concentración de proteína se calculó comparando las absorbancias contra una curva patrón de  $\beta$ -Lg con intervalo de 0 a 30  $\mu\text{g}_{\beta\text{-Lg}}/\text{mL}$  (Figura 3).

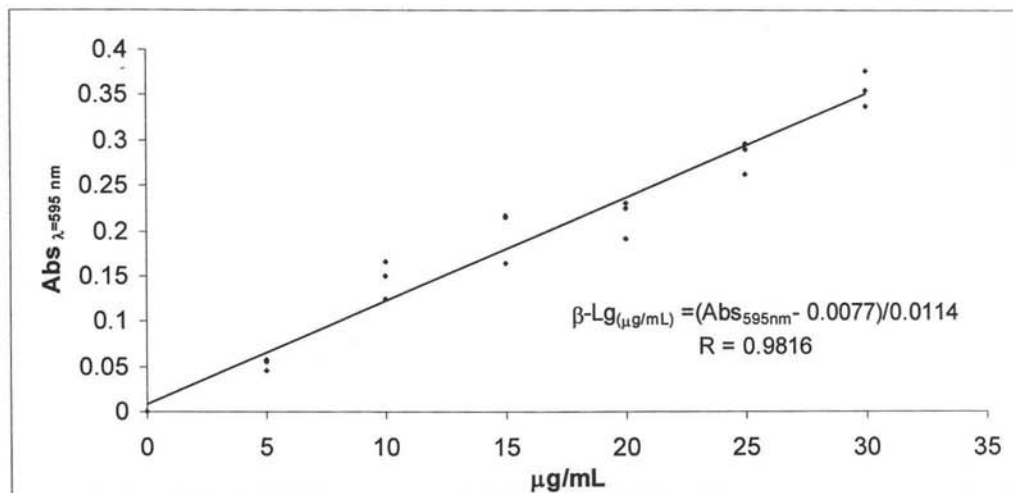


Figura 3. Curva patrón de  $\beta$ -lactoglobulina para la determinación de proteína soluble por el método de Bradford en los derivados succinilados de  $\beta$ -lactoglobulina.

### ➤ Diseño experimental y modelo estadístico

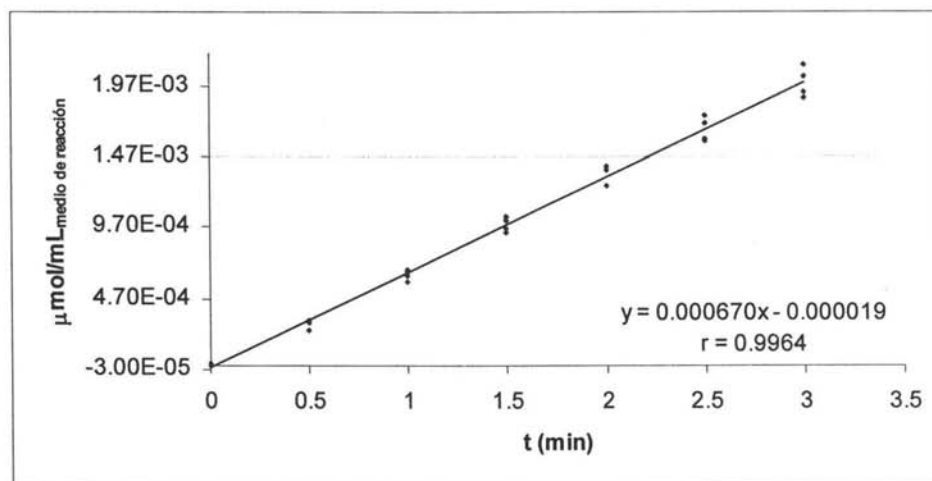
Las curvas patrón para las técnicas que las requieren se hicieron por triplicado, utilizando una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y teniendo el margen de confiabilidad que proporciona el coeficiente de correlación de la ecuación (mayor que 0.9). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA); en algunos casos se sometieron a una prueba de comparación de medias de Tuckey, con un rango de error ( $\alpha$ ) de 5% utilizando el software Statistica para Windows.



## H. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### H. 1. Caracterización de la preparación comercial Maxilact LX 5000®

La caracterización de la  $\beta$ -galactosidasa proveniente de la preparación comercial Maxilact LX 5000® se llevó a cabo midiendo la actividad de lactasa mediante la determinación del aumento de ONP liberado por la hidrólisis del ONPG (Jiménez-Guzmán, 2003) en una dilución 1:6000 de la preparación comercial en una solución amortiguadora de fosfatos con pH de 6.8; una temperatura de 37° C durante 3 minutos y con ello se obtuvo una  $v_o$  de  $6.70 \times 10^{-4} \mu\text{mol/mL min}$  (Figura 1).



**Figura 1.** Curva de actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en una dilución 1:6000 de la preparación comercial Maxilact LX 5000® suspendida en solución amortiguadora de fosfatos, pH 6.8 y a una temperatura de 37° C.

Para calcular la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa se definió a la unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima necesaria para liberar  $1 \mu\text{mol}$  de ONP en un minuto a 37° C y pH de 6.8. Así se obtuvo un valor de  $6.7 \times 10^{-4} \text{ UE/mL}_{\text{medio de reacción}}$ ; en el medio de

reacción se agregaron 33  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:6000 de la preparación comercial Maxilact LX 5000®. Con el valor de UE y la cantidad de proteína en la preparación comercial (Tabla 1) se calculó la actividad específica (AE) obteniéndose un valor de 0.581 UE/mg<sub>proteína</sub>.

**Tabla 1.** Determinación de proteína soluble en la preparación comercial Maxilact LX 5000® por el método de Lowry. La determinación se hizo por triplicado. \* Dilución 1:6000 de Maxilact

| Repetición | Abs   | [proteína] ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) | [proteína] x FD* (mg/mL) |
|------------|-------|--|--------------------------|
| 1          | 0.125 | 36.8824                                | 221.2941                 |
| 2          | 0.118 | 32.7647                                | 196.5882                 |
| 3          | 0.122 | 35.1176                                | 210.7059                 |
|            |       | <b>Promedio</b>                        | <b>209.5294</b>          |

## H. 2. Succinilación de los grupos amino de la $\beta$ -lactoglobulina

La modificación con anhídrido succínico de uno de los grupos amino de una proteína, mediante adiciones sucesivas de anhídrido succínico, modifica notablemente su motilidad en un gel de poliacrilamida y urea (Hollecker y Creighton, 1980) a tal grado que es posible determinar, mediante electroforesis en gel, el número de grupos amino que han sido sustituidos (Hollecker y Creighton, 1981).

La  $\beta$ -Lg fue sometida a una reacción de succinilación con anhídrido succínico para bloquear los grupos amino que están posiblemente implicados en la activación de la  $\beta$ -gal y se determinó la efectividad de dicho bloqueo mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y urea 8M (Fig. 2) que permitiría verificar mediante el cambio en la

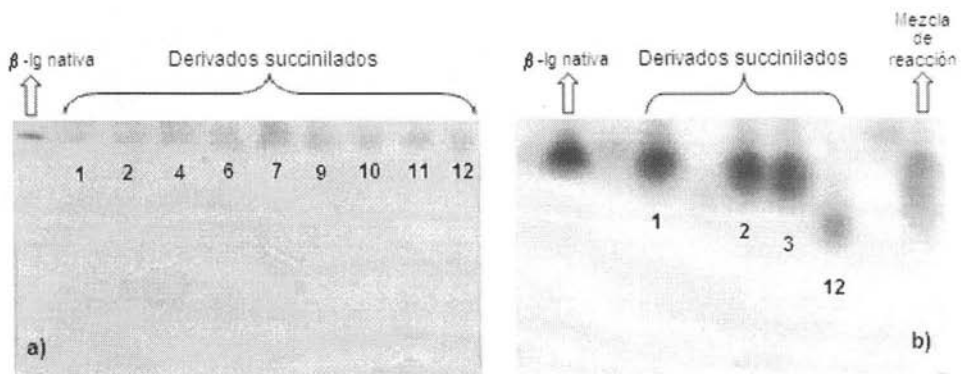
motilidad de la  $\beta$ -Lg nativa, la formación de diferentes especies con distintos grupos amino bloqueados (Creighton, 1989; Hollecker y Creighton, 1981).

La succinilación se llevó a cabo de forma gradual, lo que significa que al tomar las muestras de los distintos derivados succinilados de  $\beta$ -Lg no todos los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina se encontraban bloqueados (o cargados) de la misma manera; lo cual permitiría tener moléculas de  $\beta$ -lactoglobulina con diferente número de cargas de acuerdo con el número de grupos amino de la proteína (Hollecker y Creighton, 1981). Con ello se obtendrían 16 especies diferentes, pues la  $\beta$ -lactoglobulina tiene 15 residuos de lisina y un grupo amino libre terminal.

Durante este estudio se probaron diferentes composiciones y condiciones de corrida del gel sin que se pudiera obtener un gel con bandas bien resueltas correspondientes a los 16 grupos amino bloqueados, por lo que se seleccionaron los geles que proporcionaran la información necesaria para verificar la succinilación de los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina (Figura 2). Se logró observar un cambio en el coeficiente de migración de las muestras ( $R_f$ ) aunque no la separación de las diferentes especies succiniladas. Sin embargo en el gel con  $T=21.3\%$  (Fig. 2a), se logran apreciar distintas bandas no muy bien definidas.

A pesar de lo anterior, ambos geles fueron útiles para verificar que había grupos amino de la  $\beta$ -Lg succinilados. Se lograron medir los coeficientes de migración ( $R_f$ ) únicamente en el gel con  $T=17\%$  (Tabla 2). En este gel se puede observar que entre la

$\beta$ -Lg neutralizada con KOH 0.1 M (nativa) y el derivado succinilado de  $\beta$ -Lg resultante de la primer adición de anhídrido succínico (Fig. 2b, 1er derivado succinilado) no hay un cambio apreciable en el  $R_f$ , por lo que se puede decir que no hay  $\beta$ -lactoglobulina succinilada. Por el contrario, a partir del derivado succinilado de  $\beta$ -Lg resultante de la segunda adición de anhídrido succínico (Fig. 2b, 2° derivado succinilado), ya hay un cambio en el  $R_f$  (Tabla 2), lo cual indica que ya empiezan a haber grupos amino succinilados, puesto que al tener diferente número de cargas con respecto a la  $\beta$ -lactoglobulina nativa, se observa una migración diferente. Por otro lado, en el gel con T=21.3% (Fig. 2a) se logra apreciar la banda que corresponde a la  $\beta$ -Lg nativa en el 1er y 2° derivado succinilado y que aquélla va desapareciendo en los derivados succinilados siguientes al mismo tiempo que aparecen otras bandas que podrían corresponder a especies de  $\beta$ -Lg con diferente grado de succinilación. En ambos geles se puede ver que es hasta el 2° derivado en donde empiezan a haber grupos amino bloqueados.



**Figura 2.** a) Gel de poliacrilamida y urea 8M, T=21.3%, pH=4.7, 90 V; el 1er carril corresponde a la  $\beta$ -lactoglobulina 0.3 mg/mL neutralizada con KOH (nativa). Se logra apreciar más de una banda en algunos de los carriles correspondientes a los distintos derivados succinilados pero no así el cambio apreciable del  $R_f$ . b) Gel de poliacrilamida T=17%, pH=5, 90 V; no se alcanzan a ver bandas separadas pero sí un cambio apreciable en el  $R_f$ .

**Tabla 2.** Migración de los diferentes derivados succinilados en el gel de electroforesis con pH 5 y T=17%.

| Especie                                   | Rf    |
|---|-------|
| $\beta$ -Lg neutralizada con KOH (nativa) | 0.203 |
| Derivado succinilado 1                    | 0.213 |
| Derivado succinilado 2                    | 0.246 |
| Derivado succinilado 3                    | 0.279 |
| Derivado succinilado 12                   | 0.443 |

La reacción de succinilación depende, entre otros factores, de la reactividad de los grupos amino de la proteína; siendo los grupos amino más reactivos los que reaccionan primero con el anhídrido succínico (Hollecker y Creighton 1981). En la  $\beta$ -Lg la Lys<sub>47</sub> es uno de los residuos aminados más expuestos de la molécula y por lo tanto, el más reactivo (Morgan y col., 1999b), por lo que muy probablemente el grupo amino de la Lys<sub>47</sub> fue uno de los primeros en ser succinilado.

A pesar de que no se obtuvieron bandas separadas y bien definidas, el cambio en el  $R_f$  fue un buen indicador de que se habían obtenido derivados de  $\beta$ -lactoglobulina succinilados; suficiente evidencia como para suponer que al menos los grupos amino más reactivos de la  $\beta$ -lactoglobulina se encontraban sustituidos y que además lo estaban en diferente grado, pues diferentes valores de  $R_f$  (Tabla 5) indican la presencia de diferentes especies correspondientes a los distintos grupos amino bloqueados.

Debido a la técnica de succinilación empleada al tomar las muestras correspondientes a las diferentes especies succiniladas y al neutralizar la reacción con solución de KOH,

la concentración de proteína va disminuyendo en cada adición de anhídrido succínico por lo que antes de medir la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en presencia tanto de la  $\beta$ -lactoglobulina nativa como de los derivados succinilados; se cuantificó la  $\beta$ -Lg con el fin de que todas las muestras tuvieran la misma cantidad de proteína y esto no fuera una fuente de variación en la determinación de la actividad enzimática.

### H. 3. Cuantificación de proteína en los derivados succinilados

La Tabla 3 muestra la cantidad de proteína presente en los diferentes derivados succinilados:

**Tabla 3.** Cuantificación de proteína soluble por el método de Bradford para determinar la cantidad de  $\beta$ -lactoglobulina presente en las muestras con  $\beta$ -lactoglobulina nativa neutralizada con KOH y en los derivados succinilados,

| Derivado succinilado | [proteína] (mg/mL) |
|----------------------|--------------------|
| 1                    | 10.61              |
| 2                    | 10.31              |
| 3                    | 10.11              |
| 4                    | 9.52               |
| 5                    | 8.24               |
| 6                    | 8.38               |
| 7                    | 7.08               |
| 8                    | 6.7                |
| 9                    | 6.03               |
| 10                   | 5.66               |
| 11                   | 5.29               |
| 12                   | 4.28               |

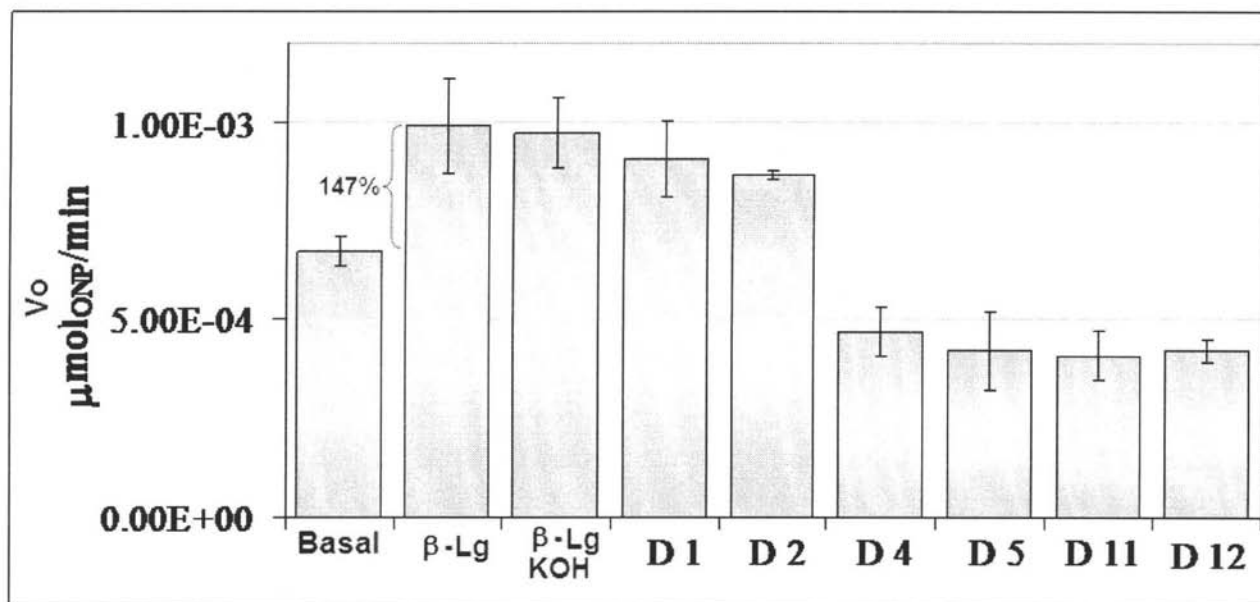
Una vez conocida la cantidad de proteína en cada uno de los productos de la reacción de succinilación; se hicieron diluciones para obtener en todas las muestras una concentración 0.3 mg/mL de  $\beta$ -Lg con diferentes grados de bloqueo.

#### H. 4. Determinación de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa en los derivados succinilados

Se midió la actividad ( $\nu_0$ ) de la  $\beta$ -galactosidasa en presencia de una solución de  $\beta$ -lactoglobulina nativa 0.3 mg/mL (primer control);  $\beta$ -lactoglobulina nativa 0.3 mg/mL neutralizada con KOH (como segundo control) y algunos de los derivados succinilados (0.3 mg/mL) a una temperatura de 37° C y pH de 6.77 (Figura 3).

Se confirmó que la sola presencia de la  $\beta$ -lactoglobulina en el medio de reacción activa a la  $\beta$ -galactosidasa (Ortiz, 2004; Jiménez -Guzmán y col., 2002) y se observó que conforme los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina fueron bloqueados; esta capacidad activadora desapareció por completo en los derivados 2 y 4 (Figura 3) que es precisamente en los que ya empieza a haber  $\beta$ -lactoglobulina con grupos amino bloqueados, según se vio en el gel de electroforesis por el cambio del  $Rf$  (Tabla 4).

A pesar de que en el derivado 1 ya se había agregado anhídrido succínico y se esperaba que desde allí ya hubiera pérdida de capacidad activadora, esto no sucedió pues en ese derivado aún había  $\beta$ -lactoglobulina nativa; por ello no se observó un cambio significativo en el  $Rf$ . Por otro lado, muy probablemente la cantidad de  $\beta$ -Lg nativa fue suficiente como para seguir activando a la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que tampoco se observó un cambio significativo en la actividad enzimática en presencia de este derivado. Por otro lado, a partir del derivado 5, se observa que la actividad de la  $\beta$ -gal disminuye incluso por debajo de la basal (Tabla 4) lo que quiere decir, que la enzima se estaba inhibiendo.



**Figura 3.** Actividad de la  $\beta$ -galactosidasa basal, en presencia de  $\beta$ -Lg nativa 0.3 mg/mL ( $\beta$ -Lg y  $\beta$ -Lg KOH) y  $\beta$ -Lg con diferentes grados de succinilación de los grupos amino (D1-D12). Cada una de las reacciones se llevó a cabo a una temperatura de 37° C, en solución amortiguadora de fosfatos con pH de 6.77 y utilizando ONPG 0.034 M como sustrato.



**Tabla 4.** Comparación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa en presencia de  $\beta$ -Lg 0.3 mg/mL,  $\beta$ -Lg 0.3 mg/mL neutralizada con KOH y los diferentes derivados succinilados con el Rf determinado en el gel de electroforesis.

| Especie                          | Vo ( $\mu$ mol/min) | $\alpha^*$ | Diferencia significativa respecto a la actividad basal | Rf    |
|----------------------------------|---------------------|------------|--|-------|
| <b>Basal</b>                     | 6.72E-04            |            | <b>BASAL</b>   |       |
| $\beta$ -Lg 0.3 mg/mL            | 9.90E-04            | 0.0003724  | SI   |       |
| $\beta$ -Lg neutralizada con KOH | 9.72E-04            | 0.0005793  | SI   | 0.203 |
| Derivado 1                       | 9.06E-04            | 0.01231974 | SI   | 0.213 |
| Derivado 2                       | 8.64E-04            | 0.07167608 | NO   | 0.246 |
| Derivado 4                       | 4.68E-04            | 0.06147969 | NO   |       |
| Derivado 5                       | 4.20E-04            | 0.00687337 | SI   |       |
| Derivado 11                      | 4.09E-04            | 0.00393391 | SI   |       |
| Derivado 12                      | 4.19E-04            | 0.00634253 | SI   | 0.443 |

\* $\alpha$ : Porcentaje de error al rechazar la hipótesis nula

Uno de los factores principales que pueden inhibir a una enzima es el pH, por lo que este parámetro fue medido en cada una de las muestras para saber si era el motivo por el que la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa disminuía. Se observó que el pH (6.77) en cada muestra era el mismo y que se encontraba dentro de los límites en los que la  $\beta$ -galactosidasa de la preparación comercial es estable y con actividad óptima (6.5 a 7.3) (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996). Esto era lo que se esperaba, pues todas las mediciones de actividad se llevaron a cabo en solución amortiguadora de fosfatos con pH de 6.77. Todo lo anterior indicó que un cambio de pH en el medio de reacción que pudiera inhibir a la enzima, no fue la razón por la cual la actividad disminuyó en los últimos derivados succinilados.

Así mismo, se contempló la posibilidad de que el anhídrido succínico residual fuera el responsable de la inhibición de la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que se midió la actividad en presencia de diferentes concentraciones de anhídrido succínico para determinar si este

causaba la inhibición de la enzima *per se*. Se encontró que efectivamente, el anhídrido succínico es un inhibidor de la  $\beta$ -galactosidasa. Sabiendo esto, se eliminó el anhídrido succínico residual ultrafiltrando las muestras con los derivados succinilados y se determinó la actividad de la  $\beta$ -gal en los ultrafiltrados. Se encontró que el efecto inhibitorio ya no se daba y que la capacidad activadora desapareció a partir del segundo derivado succinilado.

Lo anterior demuestra que el hecho de que los grupos amino de la  $\beta$ -Lg se encuentren bloqueados; repercute notablemente en su efecto activador sobre la  $\beta$ -gal, poniendo de manifiesto la importancia de estos grupos para que la activación se lleve a cabo. Por otro lado, el uso de una molécula más pequeña que la lactosa, así como de condiciones de reacción menos drásticas para bloquear los grupos amino de la  $\beta$ -Lg; reduce las posibilidades de que se provoque un cambio en la conformación de la  $\beta$ -Lg que pudiera afectar su interacción con la  $\beta$ -gal y con ello el efecto activador; dejando como los más probables responsables de la interacción, a los grupos amino de la proteína.

## I. CONCLUSIONES

Se comprobó que la sola presencia de la  $\beta$ -lactoglobulina en el medio de reacción activa a la  $\beta$ -galactosidasa en un 147% a un pH de 6.77 y una concentración de 0.3 mg/mL de la proteína.

Al encontrarse succinilados los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina desaparece el efecto activador de ésta sobre la  $\beta$ -galactosidasa y es muy probable que estos grupos estén involucrados en la interacción que se da entre la  $\beta$ -Lg y la  $\beta$ -gal, pues al estar estos ocupados por otros grupos químicos podrían impedir la interacción con la  $\beta$ -gal y quizá sea esta la causa de la desaparición del efecto activador. Sin embargo, aún es necesario establecer los mecanismos exactos mediante los cuales se lleva a cabo la interacción entre la  $\beta$ -Lg y la  $\beta$ -gal.

Con los resultados obtenidos es posible concluir que los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina juegan un papel determinante en la activación de la  $\beta$ -galactosidasa.

## J. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en este trabajo se abre todo un campo de estudio sobre el papel de los grupos amino de la  $\beta$ -lactoglobulina en su interacción con la  $\beta$ -galactosidasa, pues aquí se estableció que aquellos están involucrados en el efecto de activación y por esto mismo se plantea una serie de cuestionamientos interesantes sobre los mecanismos que están implicados en dicho fenómeno, por ejemplo: la identidad de los grupos amino que participan en el efecto de activación y el grado en el que lo hacen. Lograr una resolución apropiada del gel de electroforesis, además de estudios con alguna técnica más sensible, como la espectrometría de masas por ionización para identificar los grupos amino succinilados, sería un buen inicio.

Por otro lado, una vez sabiendo que los grupos amino más reactivos sí influyen en la capacidad activadora de la  $\beta$ -Lg, aún quedaría por explicar si es mediante éstos que se lleva a cabo la interacción entre la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\beta$ -galactosidasa; con lo que se estaría también contribuyendo a resolver la duda sobre si son las interacciones entre la proteína y la enzima las responsables del efecto activador.

Cabe mencionar que actualmente la succinilación de una proteína no es la única manera (aunque sí la más rápida y económica) de estudiar la importancia de ciertos grupos. Hoy en día nuevas herramientas, como la ingeniería de proteínas, permiten agregar o quitar grupos químicos de interés. Ahora que ya se sabe que efectivamente los grupos amino son de importancia para la activación de la  $\beta$ -lactoglobulina, bien valdría la pena realizar estudios con una  $\beta$ -lactoglobulina mutante.

Es conveniente señalar que estudios como éste son esenciales para lograr entender cómo se lleva a cabo el proceso de hidrólisis de la lactosa y que sin ellos no sería posible ni siquiera pensar en cómo hacer mejoras en el proceso industrial del deslactosado de la leche por hidrólisis enzimática de la lactosa. De aquí que el impacto de este estudio no sólo se queda en papel, sino que también representa la base para lograr establecer las mejores condiciones para llevar a cabo tan importante proceso industrial.

## K. BIBLIOGRAFIA

- Alais, C., *Ciencia de la Leche Principios de la Técnica Lechera*, CECSA, México, D.F., (1991), Cap. 1, 5-38.
- Amiot, J., *Ciencia y Tecnología de la Leche Principios y aplicaciones*, Acribia, Zaragoza, España (1991), 18-37.
- Belitz, H. D. y Grosch, W., *Química de los Alimentos*, Acribia, Zaragoza, España (1997), 73-75, 551-52.
- Bradford, M. M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analyt. Biochem.*, 72 (1976), 248-254.
- Creighton, T. E., *Protein Structure A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, Great Britain (1989), 148-153.
- Creamer, L. K., y Sawyer, L., "Beta Lactoglobulin", en *Enciclopedia of Dairy Sciences Vol. 3*, Roginski, H., Fuquay, J. W. y Fox, P. F., Academic Press, Londres, Inglaterra (2003), 1932-1938.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., **Cap. 9: Heat induced changes in milk**, *Dairy Chemistry and Biochemistry*, Blackie Academic and Professional Press, Reino Unido (1998), 21-39, 146-150, 188-192.
- French, S. J., Harper, W. J., Kleinholz, N. M., Jones, R. B. y Green-Church, K. B., "Maillard Reaction Induced Lactose Attachment to Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: Electrospray Ionization and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Examination", *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002), 820-823.

- García Garibay, M., Gómez Ruiz, “Usos de  $\beta$ -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos”, *Rev. Invest. Clin.*, 48 (supl.) (1996), 51-61.
- García-Garibay, M., Gómez-Ruiz, L., Revah Moissev, S., “Biotecnología de productos lácteos,” en *Biotecnología Alimentaria*, García-Garibay, M., Quintero Ramírez, R. y López-Munguía, A., Limusa, México (1993), Cap. 9, 153-161.
- Hollecker, M. y Creighton, T. E., “Counting Integral Numbers of Amino Groups per Polypeptide Chain”, *FEBS Lett.*, Vol. 119, 1 (1980), 187-189.
- Hollecker, M. y Creighton, T. E., “Effect on Protein Stability of Reversing the Charge on Amino Groups”, *Biochim. Biophys. Acta*, 701 (1982), 395-404.
- Jiménez-Guzmán J., Sarabia-Leos C., Cruz-Guerrero A., Rodríguez-Serrano G., López-Munguía A., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. “Interaction between  $\beta$ -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity”. *Int. Dairy J.* Enviado para revisión (2005).
- Jiménez-Guzmán, J., “Influencia de las proteínas de la leche y su tratamiento térmico en la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*,” (Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, 2003), 1-77.
- Jiménez-Guzmán, J., Cruz-Guerrero, A. E., Rodríguez-Serrano, G., López-Munguía Canales, A., Gómez-Ruiz L. y García-Garibay, M., “Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment”, *J. Dairy Sci.*, 85 (2002), 2497-2502.
- Klapper, M. H., y Koltz, I. M., “Acylation with Dicarboxylic Acid Anhydrides”, *Methods Enzymol.*, 25 (1972), 531-536.

- Léonil, J., Mollé, D., Fauquant, J., Maubois, J. L., Pearce, R. J. and Bouhallab, S., "Characterization by Ionisation Mass Spectrometry of Lactosyl  $\beta$ -lactoglobulin conjugates Formed during Heat Treatment of Milk and Whey and Identification of one Lactose Binding Site," *J. Dairy Sci.*, 80 (1997), 2270-2281.
- López, P., Rosado, J. L., Palma, M., González, C. y Valencia, M., "Mala digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de la leche," *Rev. Invest. Clin.*, 48 (supl.) (1996), 15-22.
- Louquet, M. F., Bonjean-Linczowsky, Y., Keilling, J. y Wilde, R., *Leche y Productos lácteos Vaca-Oveja-Cabra*, traducción de Miguel Calvo Rebollar, Acribia, España (1991), 11-25, 53-56.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., *J. Biol. Chem.*, 193 (1951), 265.
- Mc Murry, J., *Química Orgánica*, Thomson Editores, México (2001), 1057.
- Morgan, F., Bouhallab, S., Henry, G., Maubois, J. L. y Léonil, J., "Lactolation of  $\beta$ -lactoglobulin Monitored by Electrospray Ionisation Mass Spectrometry," *Int. Dairy J.*, 8 (1998), 95-98.
- Morgan, F., Gwénaële, H., Le Graët, Y., Mollé, D., Léonil, J. y Bouhallab, S., "Resistance of  $\beta$ -lactoglobulin-bound Lactose to the HydroLysis by  $\beta$ -galactosidase," *Int. Dairy J.*, 9 (1999a), 813-816.
- Morgan, F., Mollé, D., Henry, G., Vénien, A., Léonil, J., Peltre, G., Levieux, D., Maubois, J. L. y Bouhallab, S., "Glycation of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin: effect on the Protein Structure", *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34 (1999b), 429, 435.



- Morgan, F., Vénien, A., Bouhallab, S., Mollé, D., Léonil, J., Peltre, G. y Levieux, D., "Modification of Bovine  $\beta$ -lactoglobulin by Glycation in a Powered State or in an Aqueous Solution: Immunochemical Characterization", *J. Agric. Food Chem.*, 47 (1999), 4543, 4548.
- Ortiz-Chao, P. A., "Estudio de la interacción de las proteínas del suero de leche con la  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* y su efecto en la actividad" (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México (2004), 48-80.
- Sawyer, L., Barlow, P. N., Boland, M. J., Creamer, L. K., Helen D., Edwards, P. J.B., Holt, C., Jameson, G. B., Kontopidis, G., Norris, G. E., Uhrínová, S. y Wu, S., "Milk protein structure- what can it tell the dairy industry?", *Int. Dairy J.*, 12 (2002a), 299-310.
- Sawyer, L., Barlow, P. N., Boland, M. J., Creamer, L. K., Helen D., Edwards, P. J.B., Holt, C., Jameson, G. B., Kontopidis, G., Norris, G. E., Uhrínová, S. y Wu, S., Erratum to: "Milk protein structure- what can it tell the dairy industry?", *Int. Dairy J.*, 12 (2002b), 709.
- Sawyer, L., Kontopidis, G., y Wu, S., " $\beta$ -Lactoglobulin -a three-dimensional perspective", *Int. J. Food Sci. Technol.*, 34 (1999), 409-418.
- Spreer, E., *Lactología Industrial. Leche Preparación y elaboración. Máquinas, Instalaciones y aparatos. Productos lácteos*, traducción de Oscar Dignoes Torres-Quevedo, Acribia, España (1991), 11-21.
- Varnam, A. H. and Sutherland, J. P., *Milk and milk Products Technology, Chemistry and Microbiology*, Chapman and Hall, Great Britain (1994), 1-10

- Walstra, P., Geurts, T. J., Noomen, A., Jellema, A., van Boekel, M. A. J. S., *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*, Acribia, España (2001) 39-43, 91-94, 109-114.
- Walstra, P., Jennes, J., *Química y Física Lactológica*, traducción de Prof. Dr. Bernabé Sanz Pérez, Acribia, España (1984), 84-105.

## L. APÉNDICE

Concentración de proteína soluble por el método de Lowry-Espectrofotometría visible (590 nm), según Lowry y col. (1951).

Fundamento:

El método de Lowry se basa en la formación de un complejo (cobre-proteína) en medio alcalino y la reducción del reactivo de Folin por éste; el producto final es cuantificable espectrofotométricamente.

Muestras:

- Preparación comercial Maxilact LX 5000® (Gist Brocades, Suecia)

Reactivos:

- Solución de carbonato de sodio,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (J. T. Baker, México) 2% en hidróxido de sodio, NaOH de uso industrial (Reasol, México) 0.1 N en agua destilada (Reactivo A)
- Solución de sulfato de cobre,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (J. T. Baker, México) 1% (p/V) en agua destilada (Reactivo B)
- Tartrato de sodio y potasio,  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (J. T. Baker) al 2% (p/V) en agua destilada (Reactivo C)
- Reactivo de Folin, Fenol Folin Cicalteu (Hycel, México) 1:1 con agua destilada (Reactivo D)

Equipo:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japón)
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$ .

Procedimiento:

1. Mezclar 50 mL del reactivo A con 1 mL del reactivo B y 1 mL del reactivo C.
  2. Tomar 5 mL de la mezcla anterior y colocarlos en un tubo de ensayo.
  3. Agregar 1 mL de la preparación comercial Maxilact LX 5000®.
  4. Dejar reposando en la oscuridad durante 10 min.
  5. Agregar 0.5 mL del reactivo D.
  6. Dejar reposando en la oscuridad durante 30 min.
  7. Leer absorbancia a 590 nm.
- Calcular concentración de proteína presente con ayuda de la ecuación obtenida a partir de la curva patrón que se preparó en un intervalo de 0-500  $\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}$ .

$$SA(\mu\text{g}_{\text{SA}}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{590\text{nm}} - 0.0402) / 0.0017$$

$$R = 0.9972$$

Concentración de proteína soluble por el método de Bradford-Espectrofotometría visible (595 nm), según Bradford (1976).

Fundamento:

Se basa en el acoplamiento del colorante azul de Coomassie G-250 con la proteína y la formación de un complejo cuantificable colorimétricamente por la relación directa entre el desarrollo de color y la concentración de proteína.

Muestras:

- Derivados succinilados de la de  $\beta$ -lactoglobulina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) conservados en congelación a  $-8^{\circ}\text{C}$ .

Reactivos:

- $\beta$ -lactoglobulina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), almacenada en refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Reactivo de Bradford: Protein Assay, Dye Reagent Concentrate (Bio Rad, Hercules, CA, EUA), almacenado a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Equipo:

- Espectrofotómetro Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Japón).
- Micropipetas de 0.5-10  $\mu\text{L}$ , 5-40  $\mu\text{L}$ , 40-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ .

## Procedimiento:

1. Tomar 800  $\mu\text{L}$  de los derivados succinilados y colocarlos en un tubo de ensayo.
  2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford, agitar.
  3. Dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
  4. Vaciar el contenido del tubo a una celda de vidrio y leer la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.
- Calcular concentración de proteína presente con ayuda de ecuación obtenida a partir de la curva patrón que se preparó en un intervalo de 0-30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

$$\beta\text{-Lg}(\mu\text{g } \beta\text{-Lg} / \text{mL}) = (\text{Abs}_{595\text{nm}} - 0.0077) / 0.0114$$

$$R = 0.9815$$