



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

**Efecto de la seroalbúmina de leche en la actividad
de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis***

Tesis para obtener el grado de:

Maestro en Biotecnología

Presenta:

Christian Emmanuel Sarabia Leos

Director:

Dr. Mariano García Garibay

México, D.F., a 23 de noviembre de 2007.

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el **Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT** y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el **No. de Registro 0471-O**

Iztapalapa, D.F., a 23 de noviembre de 2007

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

**Efecto de la seroalbúmina de leche en la actividad de la β -galactosidasa de
*Kluyveromyces lactis***

Que presentó

Christian Emmanuel Sarabia Leos

Miembros del Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano García-Garibay
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Asesor: Dr. Agustín López Murguía Canales
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería,
Instituto de Biotecnología, UNAM

Asesor: M. en C. Lorena Gómez-Ruiz
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Jurado:

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Secretaria: Dra. Aracelia Tomasini Campocosio
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Vocal: Dr. Salvador Ramón Tello Solís
Departamento de Química, UAM-Iztapalapa

Vocal: Dra. Lilia Arely Prado Barragán
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

A Jesús, a mi Madre y a mi Esposa...

Agradecimientos

Al Dr. Francisco José Fernández Perrino, si hay alguien hay quien debo de agradecer es a ti Paco por todo el apoyo que me brindaste y por los atinados consejos que me diste para culminar esta etapa tan importante en mi vida, de ti aprendí no solo la forma de analizar mis resultados, sino aprendí la manera de hacer una amistad.

El presente trabajo de investigación fue realizado en el Departamento de Biotecnología en la Universidad Autónoma Metropolitana, bajo la dirección del Dr. Mariano García Garibay a quien quiero expresar mi más profundo agradecimiento y respeto.

Agradezco profundamente a los miembros del Jurado por el enorme apoyo que me brindaron para la culminación de mis estudios, así como a la Comisión de Posgrado de Biotecnología.

A la Dra. Edith Ponce, por la enorme disposición brindada y por el apoyo para revisar y darme los mejores consejos acerca de mi investigación.

A la Dra. Arely Prado, gracias por sus consejos y por la plena disposición que siempre me ofreció y por los consejos que me dio para mejorar técnicamente la redacción de mi tesis.

Al Dr. Salvador Tello, porque desde aquella ocasión en que Verónica y yo le pedimos un consejo, a mí me convenció que todo en esta vida es posible aún cuando parece que todo va mal, le quiero agradecer por su amistad y compañerismo en todo el tiempo que trabajamos juntos.

A la Dra. Araceli Tomasini porque si bien fue muy poco el tiempo en que tuvimos la oportunidad de analizar y revisar mis resultados, hasta la gente más sencilla sabe que es mejor dar tiempo con calidad, y estoy convencido que yo aproveché esa oportunidad brindada por usted.

Dedicatorias

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado y apoyado a lo largo de todos estos años...

A mi madre:

Gracias mamá por haberme dado la dicha de ser tu hijo,
esto es para ti madre y espero que te llene de orgullo
así como yo lo estoy de ser tu hijo.

Al amor de mi vida, a mi hermosa Lourdes:

Por la infinita paciencia que me brindaste en todo momento,
para culminar una de mis más grandes metas y
por permitirme ausentarme mucho del tiempo en el que merecía estar contigo,
Te Amo Gordita.

A mis hermanos:

Con quienes he compartido tantos años de vida
y por el cariño que nos profesamos.

A Julio Hernández (cócoro) y Noel Romero (chaparrito)

porque a lado de ustedes viví la etapa más hermosa de la vida,
gracias por esos momentos tan divertidos que compartí con ustedes
y por esas cenas tan llenas de gratitud que siempre compartíamos.

A la Dra. Judith Jiménez Guzmán

Por su eterna buena disposición,
traducida en amenas charlas, consejos sabios y el haber
puesto siempre parte de su valioso tiempo, gracias Judith.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Resumen | 1 |
| 2. Marco Teórico y Antecedentes | 3 |
| 2.1. Características generales de la leche | 3 |
| 2.1.1. Lactosa | 4 |
| 2.1.2. Proteínas de la leche | 4 |
| 2.1.2.1. Las caseínas | 5 |
| 2.1.2.2. Proteínas del suero | 8 |
| 2.1.2.2.1. β -lactoglobulina | 10 |
| 2.1.2.2.2. Seroalbúmina | 11 |
| 2.1.2.2.3. Estructura de la seroalbúmina | 11 |
| 2.2. β -galactosidasa | 15 |
| 2.2.1. Mecanismo de hidrólisis de la β -galactosidasa | 18 |
| 2.3. Efectos de los constituyentes del medio en la actividad de la β -galactosidasa | 19 |
| 2.3.1. Iones | 19 |
| 2.3.2. Efecto de las proteínas de leche | 20 |
| 2.4. Cromatografía por afinidad | 22 |
| 2.4.1. Principio de la cromatografía de afinidad | 22 |
| 3. Justificación | 23 |
| 4. Hipótesis | 24 |
| 5. Objetivos | 24 |
| 5.1. Objetivo general | 24 |
| 5.2. Objetivos específicos | 24 |
| 6. Metodología | 25 |
| 6.1. Plan de trabajo | 25 |
| 6.2. Muestras | 25 |
| 6.2.1. Preparación enzimática | 25 |
| 6.2.2. Purificación de BSA por isoelectroenfoque | 25 |
| 6.3. Análisis | 27 |
| 6.3.1. Determinación de la pureza y masa molecular de la BSA por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida | 27 |
| 6.3.2. Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry | 30 |
| 6.3.3. Determinación de proteína total por el método de Bradford | 31 |
| 6.3.4. Determinación de la actividad enzimática en presencia de BSA | 31 |
| 6.3.4.1. Mezclas de reacción | 32 |
| 6.3.5. Inmovilización de la BSA en el Eupergit | 33 |
| 6.3.5.1. Bloqueo de los grupos reactivos del Eupergit .. | 34 |
| 6.3.6. Prueba de afinidad entre la β -galactosidasa y la BSA inmovilizada | 34 |
| 6.3.7. Desorción de la lactasa con gradiente de pH | 36 |
| 6.3.8. Efecto del pH en la estabilidad de la β -galactosidasa | 36 |
| 6.3.9. Efecto de la OVA en la actividad de la β -galactosidasa ... | 37 |
| 7. Resultados y discusión | 38 |
| 7.1. Purificación de BSA por isoelectroenfoque | 38 |
| 7.2. Efecto de la BSA en la actividad de la β -galactosidasa | 39 |

| | |
|--|----|
| 7.3. Interacción de la BSA con la lactasa | 42 |
| 7.4. Actividad de enzimática en el Eupergit | 47 |
| 7.5. Estudio de la estabilidad en la β -galactosidasa por efecto de la BSA ... | 50 |
| 7.6. Efecto de la OVA en la actividad de la β -galactosidasa | 57 |
| 8. Conclusiones | 60 |
| 9. Perspectivas | 61 |
| 10. Bibliografía | 62 |

Efecto de la seroalbúmina de leche en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*

1. RESUMEN

La aplicación de la lactasa ó β -galactosidasa en la industria de lácteos se ha intensificado en los últimos años (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Ladero y col., 2000; Becerra y col., 2001). Existe un gran interés para la hidrólisis de la lactosa en suero ya que es un subproducto de la industria quesera y causa problemas ambientales debido a la alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Desde un punto de vista general, la hidrólisis de la lactosa provee de varias ventajas nutricionales, debido a que una parte de la población sufre de deficiencia de la lactasa, lo que ocasiona problemas relacionados con la intolerancia a la lactosa. Además, ofrece ventajas tecnológicas, ya que la glucosa y galactosa, monosacáridos que forman la lactosa, son más dulces y más solubles que la lactosa, con lo cual se abaten costos por las cantidades de azúcar utilizadas.

Varios reportes establecen que la presencia de algunas proteínas del suero de la leche en el medio de reacción puede aumentar la actividad de la lactasa (Mahoney y Adamchuck, 1980; Greenberg y col., 1985, Jiménez-Guzmán, 2003) pero no dan una explicación clara de tal efecto. Han sido pocos los estudios que se han llevado a cabo para tratar de explicar los mecanismos de activación de la lactasa con otras proteínas, entre ellas, las de la leche. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la seroalbúmina de leche (BSA) en la actividad de la lactasa de *Kluyveromyces lactis*, así como estudiar la interacción entre la enzima y la proteína para tratar de proponer un mecanismo por el cual se dé la activación.

En una primera etapa del proyecto se purificó la BSA de Sigma® por isoelectroenfoque. La pureza se comprobó por medio de electroforesis nativa y desnaturizante. La masa molecular relativa de la BSA fue de 66.2 kDa.

Posteriormente se probaron diferentes concentraciones de BSA purificada en los medios de reacción (0.1 a 10 mg/mL), la actividad de la lactasa aumentó en presencia de BSA en todas las concentraciones probadas, aún en aquellas menores a la concentración de esta proteína en la leche (0.4 mg/mL). No se encontró diferencia significativa en el efecto activador de soluciones entre las diferentes concentraciones de BSA utilizadas, sugiriendo que en las concentraciones estudiadas se da un efecto de saturación de la enzima, por parte de la BSA, probablemente a que la relación molar de BSA está en exceso con respecto a la lactasa en los medios de reacción: 1.5 mol de BSA por cada mol de lactasa.

Para comprobar si hay interacción entre la BSA y la lactasa, y determinar si esta unión es específica, se utilizó la cromatografía de afinidad, inmovilizando covalentemente la BSA en una resina comercial (Eupergit®). Se logró inmovilizar 0.092 μmol BSA/g de resina, misma que interaccionó con la lactasa en una relación molar de 0.1 mol de lactasa por cada mol de BSA inmovilizada. La actividad específica en el sobrenadante disminuyó significativamente respecto al control (resina bloqueada con glicina) demostrando que hay una interacción específica entre la enzima y la proteína de leche, lo cual podría estar relacionado con el efecto activador. Más aún, se comprobó a través de electroforesis nativa en gel de poliacrilamida que hubo disminución significativa en las bandas de 145 y 100 kDa, correspondientes a las subunidades de lactasa.

Se utilizaron gradientes de pH para intentar separar la lactasa de la BSA, sin embargo, con ninguno de los pHs probados (pHs 3 a 10) se logró la separación, sugiriendo que la interacción entre estas proteínas es fuerte y no depende solamente de interacciones electrostáticas. Más aún, al medir la actividad residual después de la exposición a diferentes pHs, se determinó que la presencia de la BSA tuvo un efecto estabilizador sobre la lactasa.

Con la finalidad de comparar la BSA con una proteína de origen no lácteo, se probó el efecto de la ovoalbúmina (OVA) sobre la actividad de la lactasa. La OVA se probó a las mismas concentraciones usadas para la BSA, sin embargo, a diferencia de ésta, la OVA aumentó la actividad de la β -galactosidasa de manera proporcional a su concentración sugiriendo que el mecanismo de activación podría ser diferente para las dos proteínas.

2. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

2.1 Características generales de la leche

Desde un punto de vista fisicoquímico, la leche es un producto muy complejo. Para comprender las transformaciones químicas que se producen en ella y en los productos lácteos durante los diversos tratamientos industriales, es imprescindible conocer su composición, siendo ésta objeto de estudio de muchos investigadores.

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

En la tabla 1 se muestra de forma resumida la composición de las principales leches empleadas por el hombre como alimento:

| Especie | Agua | ST* | SNG** | Grasa | Proteínas | Lactosa | Cenizas |
|---------|------|------|-------|-------|-----------|---------|---------|
| Vaca | 87.6 | 12.4 | 8.7 | 3.7 | 3.3 | 4.7 | 0.6 |
| Cabra | 87.0 | 13.0 | 8.5 | 4.5 | 3.3 | 4.6 | 0.6 |
| Borrega | 81.6 | 18.4 | 10.9 | 7.5 | 5.6 | 4.4 | 0.9 |
| Humana | 87.1 | 12.9 | 8.8 | 4.1 | 1.3 | 7.2 | 0.3 |

*ST = sólidos totales, **SNG = sólidos no grasos

Tabla 1. Composición química de las principales leches utilizadas para consumo humano (g/100 g) (García-Garibay y col., 1993).

Además de los componentes mencionados en la tabla 1, la leche también contiene otros microcomponentes, entre los principales están: vitaminas, iones metálicos, enzimas, y otros componentes minoritarios.

2.1.1 Lactosa

La lactosa es el carbohidrato más importante de la leche de casi todas las especies; de hecho, es propia de la leche. La lactosa se encuentra disuelta en la fase acuosa de la leche, en diferentes formas en equilibrio: alfa y beta, y formas anhidras e hidratadas. La forma β es la que se digiere con más facilidad; sin embargo, la forma más común en la leche comercial es la forma α hidratada (Astiasarán-Anchía y Martínez-Hernández, 1999).

Químicamente la lactosa es un disacárido formado por un monómero de D-glucosa y otro de D-galactosa unidos por un enlace β -1,4 glicosídico; es un azúcar reductor, la estructura hemiacetal da lugar a un equilibrio entre los dos anómeros α y β , que difieren en la configuración estérica del $-\text{OH}$ y $-\text{H}$ del C-1 (Alais, 1991; Astiasarán-Anchía y Martínez-Hernández, 1999). Es prácticamente el único carbohidrato presente en la leche, en la que se encuentra en una concentración de 4.7 a 5.2% en la leche de vaca, 6.5% en la leche humana y alrededor de 4.5% en leches de cabra y oveja (García-Garibay y col., 1993).

La lactosa es un azúcar reductor ya que posee un grupo carbonilo libre, los azúcares reductores, reducen el ion Cu^{2+} (color azul) a óxido cuproso Cu_2O de color café oscuro, y por lo tanto, se oxidan (Walstra y Jenness, 1987). Estas reacciones de oxidación se utilizan con frecuencia para la determinación cuantitativa de los azúcares reductores (reacción de Fehling).

2.1.2 Proteínas de la leche

Los compuestos nitrogenados de origen protéico y no protéico, constituyen la parte más compleja de la leche; tienen además, una gran importancia en los productos lácteos. La leche es un buen alimento debido a la alta calidad de sus proteínas, las cuales, para su estudio, se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con su estado de dispersión: las caseínas que representan el 80% del total y que precipitan a pH 4.6, y las proteínas del suero (lactosuero) que constituyen el 20% restante y que no precipitan con las caseínas a menos que previamente hayan sido desnaturalizadas por el calor u otros tratamientos (Riel, 1991).

En general, las proteínas de la leche se caracterizan por tener una elevada masa molecular comprendida entre 15 y 200 kDa, y por presentar un conjunto de propiedades que se derivan de su tamaño y su estructura peptídica. No son capaces de atravesar las membranas dializables y se precipitan fácilmente en solución por diversos reactivos, tales como el HCl o incluso, enzimas que fermentan la lactosa y acidifican el medio (ácido láctico), así como con

sales minerales en concentraciones elevadas (Alais, 1991).

A continuación se describirán los dos principales grupos de proteínas presentes en la leche (caseínas y proteínas del suero), refiriéndose específicamente al caso de la leche de vaca.

2.1.2.1 Las caseínas

El conocimiento de la micela de caseína tiene gran importancia práctica, ya que muchos de los tratamientos en tecnología modifican la estabilidad de las micelas en la leche.

Entre las principales propiedades de las caseínas se puede mencionar que son proteínas hidrofóbicas, ya que tienen un elevado número de residuos de prolina y pocos de cisteína (Walstra y col, 2001). Como quedan expuestos muchos grupos hidrofóbicos, se establecen fácilmente enlaces entre las moléculas. Por ello, las caseínas muestran gran cantidad de asociaciones, tanto en el interior de una misma molécula como entre ellas, formando las micelas de caseína (Walstra y Jenness, 1987; Walstra y col., 2001).

Las caseínas de la leche están en forma de fosfato-caseinato cálcico. Precipitan por acidificación a su punto isoeléctrico medio, pH 4.6. Estas caseínas tienen una masa molecular de 24 kDa, son puras y desmineralizadas. La caseína natural puede obtenerse por ultracentrifugación o por precipitación salina (NaCl a saturación). En la ultracentrifugación se puede observar que toda la caseína no se encuentra en estado de micelas sedimentables, existe una fracción soluble (5-10%) que aumenta con el descenso de la temperatura (Riel, 1991).

Los estudios basados en la movilidad molecular (cromatografía, electroforesis, filtración, ultracentrifugación) han puesto en evidencia la heterogeneidad de la caseína. Se han encontrado cinco tipos de caseínas: la caseína α_1 (23.6 kDa), la caseína α_2 (25.15 kDa), la caseína β (24 kDa), la caseína κ (19 kDa) y las caseínas γ , que son fracciones derivadas de las tres primeras (Riel, 1991).

Las caseínas α y β son sensibles al ion calcio, mientras que la caseína κ tienen un papel estabilizante de las micelas de caseína frente al ion calcio, esto se debe a que la caseína κ , en primer lugar, es más pequeña y además, está muy poco fosforilada, teniendo solamente un grupo fosfato libre. Esto hace que interaccione con el ión calcio mucho menos que las otras caseínas (α y β). Sin embargo, comparte con la caseína β la propiedad de tener zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas bien marcadas y separadas. Además se sabe que las caseínas α son las más ricas en fósforo y en grupos ácidos libres, siendo su punto

isoelectrico el más bajo (pH 4.1).

Las caseínas β son solubles a baja temperatura (2 °C). Contienen menos fósforo pero son más ricas en azufre que las caseínas α . Tienen su punto isoelectrico a pH 4.9. Las caseínas α pueden separarse de las caseínas β por su diferente solubilidad en urea (Alais, 1991).

Como ya se mencionó, existen diferentes tipos de caseínas: α_1 , α_2 , β y κ , además de algunos derivados formados por proteólisis de estas cadenas. La tabla 2 muestra los tipos de caseínas, su concentración en la leche, el porcentaje que representan en el total de las proteínas de la leche y algunas otras características importantes.

| Proteína | g/kg de leche | g/100 g de proteína | Aminoácidos | Características |
|----------------|---------------|---------------------|-------------|--------------------------|
| Caseína | 26 | 78.5 | | pI \approx 4.6 |
| α_1 -CN | 1.0 | 31 | 199 | Fosfoproteína |
| α_2 -CN | 2.6 | 8 | 207 | Algunas con -S-S- |
| β -CN | 9.3 | 28 | 209 | Fosfoproteína |
| κ -CN | 3.3 | 10 | 169 | Glicoproteína |
| γ -CN | 0.8 | 2.4 | | Parte de caseína β |

Tabla 2. Caseínas presentes en la leche de vaca (Walstra y col., 2001)

Caseína α_1

La caseína α_1 presenta la carga más alta y el menor contenido de fosfato. Su cadena polipeptídica está formada por dos regiones predominantemente hidrofóbicas (residuos 1-44 y 90-199) y por una zona polar (residuos 45-89) de alta polaridad. Todos los grupos fosfato, menos uno, están en el segmento 45-89 y los residuos de prolina se distribuyen a intervalos en los segmentos hidrofóbicos (Walstra y Jenness, 1987; Farrell y col., 2004).

Caseína α_2

Existen diversas variantes de esta proteína, las cuales difieren en el número de ésteres de fosfato, que oscila entre 10 y 14 por molécula. Las caseínas α_2 contienen dos residuos de cisteína (que forman puentes disulfuro) y ningún grupo carbohidratado. Por su alto contenido de fosfato, interaccionan fuertemente con el calcio (Walstra y col., 2001; Farrell y col., 2004).

Caseína β

Es la más hidrofóbica y contiene un gran número de residuos de prolina. Además, la carga está heterogéneamente distribuida, dividiendo la molécula en dos partes que presentan propiedades muy diferentes. Esto provoca que la caseína β tenga propiedades tensoactivas, con una parte hidrofílica cargada y una cola que es una larga cadena apolar. La asociación de esta proteína también es, de alguna forma, como la de un tensoactivo en cuanto a que se produce una concentración crítica en las micelas.

Las micelas (en un sentido fisicoquímico estricto) están formadas por 20 ó 30 moléculas, cuya asociación es muy dependiente de la temperatura y de la fuerza iónica. A temperaturas inferiores a 5 °C no se produce la asociación de la caseína β y la molécula permanece desplegada. En la leche, parte de la caseína se solubiliza a baja temperatura y, en consecuencia, la viscosidad de la leche aumenta. Estos cambios son reversibles pero muy lentamente (Walstra y col., 2001; Farrell y col., 2004).

Caseína γ

La caseína γ es un producto de la degradación de la caseína β . Se corresponde en la mayor parte con los residuos de aminoácidos 29-209 de la secuencia de la caseína β , es decir, con su parte más hidrofóbica (Farrell y col., 2004). Esta caseína se hidroliza por acción enzimática de la plasmina, presente en la leche. La cantidad de caseínas γ puede variar ampliamente dependiendo de la frescura de la leche y de su temperatura de conservación (Walstra y col., 2001).

Caseína κ

La caseína κ es muy distinta al resto de las caseínas. Sólo contiene dos residuos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intermoleculares, debido a esto, la caseína κ se encuentra en la leche en forma de oligómeros que contienen 5-11 monómeros. Aproximadamente dos tercios de las moléculas contienen un grupo carbohidratado que está esterificado a una de las treoninas (131, 133, 135 ó 142) y tienen galactosamina, galactosa y uno o dos residuos de ácido N-acetil-neuramínico. Cada uno de estos grupos puede tener una o dos cargas y son bastante hidrofílicos.

El enlace peptídico entre los residuos 105 y 106 es rápidamente hidrolizado por la acción de las enzimas; cabe resaltar que hay una región cargada positivamente muy cerca de este enlace.

La caseína κ se asocia también fuertemente para formar micelas de más de 30 moléculas, entre las que se incluyen grupos carbohidratados protuberantes (Walstra y Jenness, 1987).

En la leche, las caseínas se asocian con el calcio, los fosfatos y otras especies iónicas para formar estructuras esféricas grandes (40-300 nm de diámetro), altamente porosas y solvatadas, denominadas micelas. Las micelas de caseína son las principales responsables de la estabilidad física de los productos lácteos durante el tratamiento térmico, la concentración y el almacenamiento. Su comportamiento es fundamental en las primeras fases de elaboración de queso (Schmidt y Morris, 1984). Las micelas determinan también las propiedades reológicas de los productos fermentados y concentrados (Walstra y col., 2001).

2.1.2.2 Proteínas del suero

Entre las proteínas del suero de leche bovina, los principales componentes son: β -lactoglobulina (β -lg), α -lactoalbúmina (α -la), seroalbúmina (BSA), inmunoglobulinas (IgG), lactoferrina (LF) y algunas enzimas propias de la leche. De estas proteínas, la β -lg y α -la están presentes en mayor concentración y probablemente son las más importantes en cuanto a propiedades fisicoquímicas de los productos de proteína de suero (Alais, 1991; Schimdt y Morris, 1984). En la figura 1 se muestra un gel de electroforesis en donde se observan las principales proteínas del suero de leche.

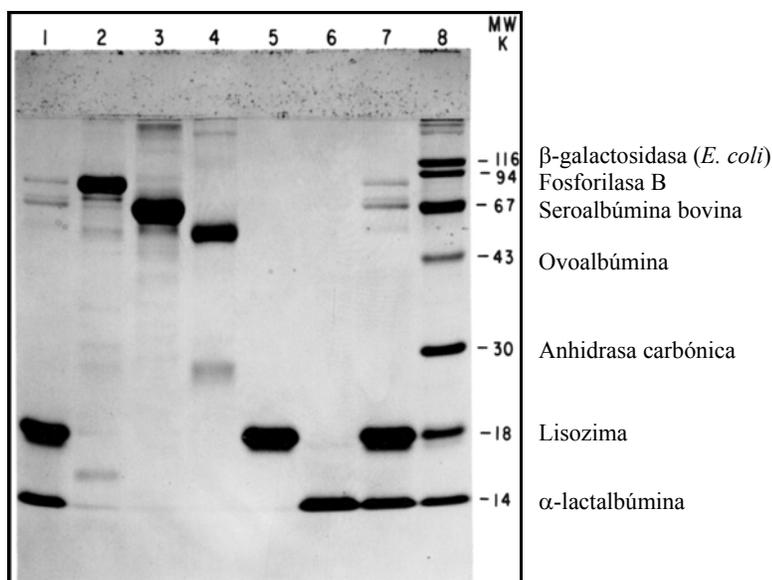


Figura 1. Electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) de suero dializado (pH 4.6) y de proteínas de suero puras. **Carriles:** 1 = suero dializado (pH 4.6); 2 = lactoferrina; 3 = BSA; 4 = IgG; 5 = β -LG; 6 = α -la; 7 = suero dializado (pH 4.6); 8 = estándar de proteínas de amplio rango Bio-Rad® (Basch y col., 1985).

Las proteínas del suero de la leche son compactas, globulares, con una masa molecular que varía entre 14 y 1,000 kDa y son solubles en un intervalo de pH muy amplio. En general son muy sensibles a temperaturas altas, y en menor grado al pH ácido, debido a que su mecanismo de estabilidad es por hidratación y no por carga eléctrica; son las primeras en desnaturizarse y su calentamiento libera grupos sulfhidrilo que reducen el potencial de oxidación-reducción de la leche (Fox y McSwweeney, 1998).

En la tabla 3 se muestran algunas de las funciones biológicas de las proteínas del suero así como la concentración en que están presentes en la leche de vaca (de Wit, 1998).

| Proteína del suero | Concentración (g/L leche) | Función biológica |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|
| β -Ig | 3.2 | Transportador de Vit. A |
| α -la | 1.2 | Síntesis de lactosa |
| BSA | 0.4 | Transporta ácidos grasos |
| IgG | 0.8 | Inmunidad pasiva |
| LF | 0.2 | Agente bacteriostático |
| LP | 0.03 | Agente antibacterial |
| Enzimas (>50) | 0.03 | Indicadores de salud |
| Proteosa-peptona | ≥ 1 | Actividad opioide |

LF= lactoferrina; LP = lactoperoxidasa

Tabla 3. Composición y funciones biológicas de las proteínas del suero en la leche de vaca (Riel, 1991).

2.1.2.2.1 β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina (β -lg) es la más importante de las proteínas del suero, es una proteína globular altamente estructurada. Su masa molecular es de 18 kDa, aunque en la literatura se reporta a veces el de 36 kDa, pues esta proteína tiende a formar estructura cuaternaria (dímeros) entre unidades iguales, entrecruzadas por dos puentes disulfuro. Cada monómero tiene un puente disulfuro y un sulfhidrilo intramolecular en forma de una cisteína y dos residuos de cistina. La β -lg provee aproximadamente el 90% de los grupos sulfhidrilo libres en la leche (Jiménez-Guzmán, 2003).

Estudios recientes a través de cristalografía de rayos X han servido para describir la estructura de la β -lg, en donde se ha señalado que tanto proteínas unidas al retinol como otras proteínas poseen una estructura muy parecida a ella, las cuales participan en el transporte de pequeñas sustancias hidrofóbicas (Jiménez-Pérez y col., 2000). Sawyer y col., (1999) definieron la estructura de la β -lg de una manera muy sencilla: es un barril β antiparalelo formado por ocho láminas β acomodadas en dos grupos de cuatro. En el C-terminal de la cadena polipeptídica hay una α -hélice de tres giros seguido de la novena lámina β que es antiparalela a la primera hebra y además está interactuando antiparalelamente con la misma hebra de la otra subunidad en el dímero.

Además, la β -lg es la principal portadora de grupos sulfhidrilos, que se modifican o separan en el curso de la desnaturalización y que intervienen en la formación del sabor a “cocido” de la leche sobrecalentada (Alais, 1991; Fox y McSweeney, 1998).

La función biológica de la β -lg no está totalmente clara, sin embargo, se piensa que es capaz de unirse al retinol, ácidos grasos y a otras sustancias hidrofóbicas, que podrían tratarse de vitaminas liposolubles, todo ello sugiere que la β -lg trabaja como molécula transportadora de este tipo de sustancias (Fox y McSweeney, 1998).

Existen probablemente tres variantes genéticas de la β -lg: A, B y C (Alais, 1991), pero sólo se conocen bien las dos primeras, cuyas diferencias son mínimas: la del tipo A posee un residuo suplementario de ácido aspártico (16 *versus* 15), lo que explica su mayor movilidad en la electroforesis, y de valina (10 *versus* 9), y un residuo menos de glicina (3 *versus* 4) y alanina (14 *versus* 15) que la β -lg B.

2.1.2.2.2 Seroalbúmina

La seroalbúmina bovina (BSA) es una de las proteínas de la leche más extensamente estudiadas. En mamíferos la seroalbúmina es sintetizada en el hígado y llega a la leche por las células secretoras; supone solamente el 1.2% aproximadamente de las proteínas lácteas totales (Brown y Shockley, 1982; Fox y McSweeney, 1998).

Es la mayor fracción de proteína que se encuentra en el plasma sanguíneo. El aislamiento, la purificación y las propiedades fisicoquímicas, así como la función biológica de la BSA ha sido estudiada por diversos autores (Foster, 1977; Rosenoer y col., 1977; Peters, 1985; Fox y McSweeney, 1998).

2.1.2.2.3 Estructura de la BSA

La información sobre la estructura de la BSA ha conducido a algunos resultados y discusiones contradictorios. Basado en gran parte en los experimentos hidrodinámicos, Hughes (1954), Squire y col. (1968), Wright y Thompson (1975), establecieron que la BSA parecía ser un elipsoide con dimensiones de $140 \times 40 \text{ \AA}$ (figura 2). Los experimentos llevados a cabo por Bendedouch y Chen (1983) y Feng y col., (1988) corroboraron éstas dimensiones. Brown y Shockley (1982), compilaron una gran variedad de datos y construyeron un modelo de la seroalbúmina que poseía la forma de un cigarro.

Brown (1975); Patterson y Geller (1977); estudiaron también la secuencia de aminoácidos y los patrones de los puentes disulfuro en la seroalbúmina bovina. La cadena simple de polipéptidos está entrecruzada por 17 puentes disulfuro para formar una serie de 9 bucles en la molécula. Todos los bucles formados por los puentes de Cys-Cys son dobles a excepción del primer bucle apareciendo ocho veces en la cadena.

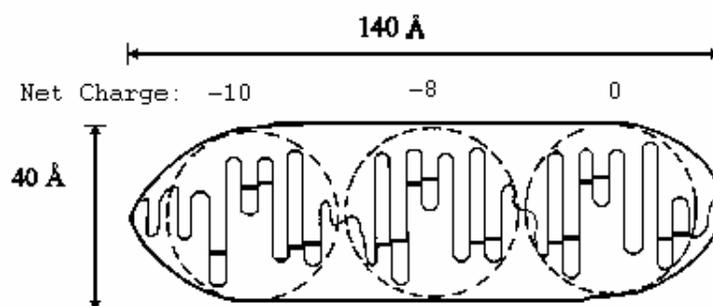


Figura 2. Percepción de la estructura de la seroalbúmina según Brown y Shockley (1982).

Sin embargo, estudios posteriores utilizando resonancia magnética nuclear (NMR, por sus siglas en inglés) han indicado que la estructura elipsoide de la BSA era improbable; Bos y col. (1989) propusieron una estructura en forma de corazón (figura 3). Esto también concuerda con los datos cristalográficos del patrón de difracción a través de rayos X obtenido por Carter y Ho (1994).

La molécula de seroalbúmina se compone de tres dominios homólogos (I, II, III) que están divididos en nueve bucles (L1-L9) unidos por 17 enlaces disulfuro; varios de los enlaces son de la variedad Cys doble (He y Carter, 1992), en la que los dos restos de Cys adyacentes de la secuencia forman puentes disulfuro con otros dos grupos. Los bucles en cada dominio se componen de una secuencia de bucles alternados: grande-pequeño-grande, que forman un triplete. Cada dominio alternadamente es el producto de dos subdominios (IA, IB, IIA, IIB, IIIA y IIIB) (figura 3). Cada uno de los dominios se puede dividir en 10 segmentos helicoidales, 1-6 para el subdominio A y 7-10 para el subdominio B (Bos y col., 1989; Carter y Ho, 1994).

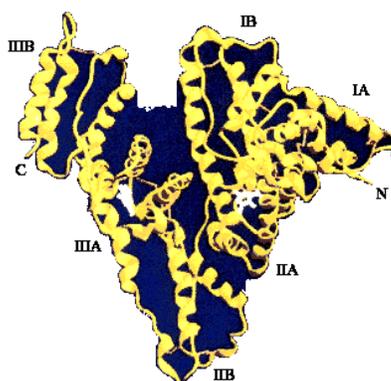


Figura 3. Modelo espacial de la seroalbúmina, en donde se muestran los dominios de la molécula: I, II y III; cada dominio es el producto de dos subdominios (IA, IB, etc.) (Bos y Col., 1989; Carter y Ho, 1994).

Otros estudios indicaban que la estructura secundaria de la BSA contenía aproximadamente del 50% al 68% de alfa hélice y de 16 a 18% de hoja beta (Reed y col., 1980). Por el contrario, Carter y Ho (1994) llevando a cabo estudios con cristalografía de rayos X, encontraron que no hay hoja beta en la estructura de la BSA nativa.

Por otra parte, Peters (1985) encontró que la BSA es muy resistente a la desnaturalización térmica, ya que observó resistencia a ésta cuando se sometió a calentamiento

a 60 °C durante 10 horas. Encontró también, que cuando a la BSA se le somete a tratamientos bajo condiciones de acidez alta (pH 1-2) la molécula es capaz de sufrir una elongación en la cadena polipeptídica; pudiendo regresar a su configuración nativa cuando el pH se aumentaba a 7.0. En este mismo estudio se encontró que a valores altos de pH (por ejemplo de 9 a 11) la proteína permanece relativamente sin desnaturalizarse, pero puede sufrir alguna desaminación y/o intercambio de puentes disulfuro.

Además, Peters (1985) encontró que bloqueando el sulfhidrilo libre de la Cys³⁴ de la BSA con cisteína, N-iodosuccinamida o glutatión se previene la aparición de mezclas de puentes disulfuro tal como ocurre cuando ésta proteína forma dímeros como estructura cuaternaria cuando se calienta. Por otro lado, Pedersen y Jacobsen (1980) encontraron que la Cys³⁴ es el residuo más reactivo en la BSA, al poseer un grupo sulfhidrilo expuesto. Todo esto sugiere que la región cercana a la Cys³⁴ muy probablemente está relacionada con la unión de la BSA con otros compuestos.

Los residuos que se encuentran distribuidos en la BSA contribuyen al carácter hidrofílico y a la alta solubilidad de la proteína. Foster (1977) demostró que titulando una solución de BSA, ésta sufre varios cambios conformacionales; en este estudio se demostró que cuando se titulaba una solución de BSA que se encontraba a pH neutro con HCl la curva de titulación mostraba una discontinuidad a un pH de 4 a 4.5, demostrando que en este valor de pH se encontraban totalmente cargados el 40 % de los grupos carboxilos. En ese mismo estudio, Foster demostró que este fenómeno coincidía con la aparición de una “forma rápida” (forma “F”, fast, por sus siglas en inglés) la cual migra más rápidamente en un gel de electroforesis cuando el pH bajaba hasta 3 ó 4 y se precipitaba más rápidamente con una solución de KCl 3 M. Durante la transición al estado de forma rápida se presenta un ligero descenso en la rotación óptica a 233 nm, lo cual corresponde al cambio en la conformación α -hélice de 55 % sin desnaturalizar a un 45 % cuando la proteína se titulaba. Se propuso como posible causa de que la aparición de la forma rápida en la molécula de BSA era la exposición de aproximadamente el 50 % de los grupos carboxilos y el 25 % de los grupos fenólicos. Cuando el pH de la solución de BSA se bajó a pH 4, la molécula se desenrolló completamente de su estructura secundaria (forma expandida “E”) y por lo tanto, la viscosidad intrínseca de la solución se incrementaba significativamente (figura 4).

Por lo tanto, se puede decir que la BSA sufre cambios conformacionales reversibles con los cambios en el pH del medio de reacción.

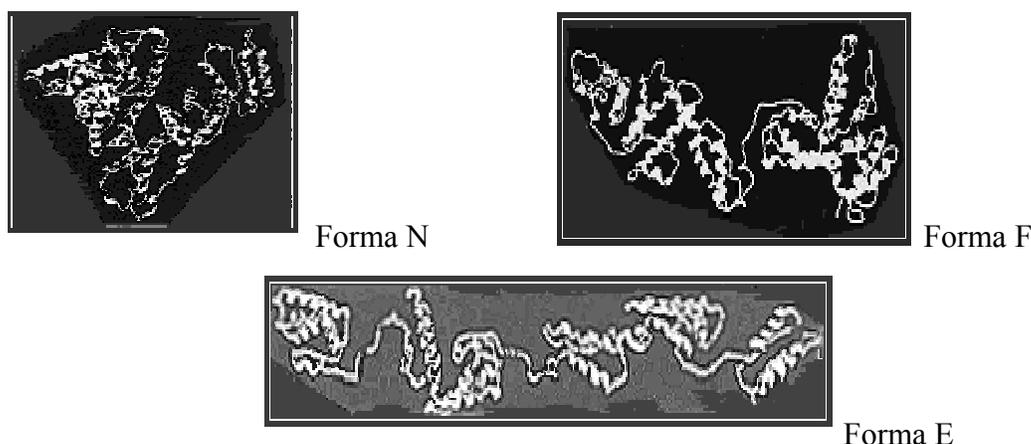


Figura 4. Relación de las formas conformacionales que se presentan en la molécula de seroalbúmina.

Se ha reportado que a pH 9 los cambios conformacionales en la BSA proporcionan una forma “B” (por “básico”), esto ocasiona la reducción de la estructura α hélice hasta un 48 %. Carter y Ho (1994) encontraron que cuando una solución de BSA se mantenía a pH 9 y 3 °C de temperatura durante tres o cuatro días aparecía otra forma isomérica la cual le nombraron forma “A”, por las siglas en inglés, aged (viejo o envejecido) acompañado de la disminución de la fuerza iónica del isómero formado. En la tabla 4 se mencionan los aminoácidos que conforman la estructura primaria de la BSA.

| | | | | | |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|
| | E <-----> | F <-----> | N <-----> | B <-----> | A |
| pH de transición: | 2.7 | 4.3 | 8 | 10 | |
| Nombre: | Expandido | Rápido | Normal | Básico | Viejo |
| % de α hélice: | 35 | 45 | 55 | 48 | 48 |

| Aminoácido (a.a.) | BSA a.a. | Aminoácido (a.a.) | BSA a.a. |
|-------------------|----------|-------------------|----------|
| Lisina | 60 | Alanina | 48 |
| Histidina | 16 | Cisteína | 35 |
| Arginina | 26 | Valina | 38 |
| Ácido aspártico | 41 | Metionina | 5 |
| Treonina | 34 | Isoleucina | 15 |
| Serina | 32 | Leucina | 65 |
| Ácido glutámico | 58 | Tirosina | 21 |
| Prolina | 28 | Fenilalanina | 30 |
| Glicina | 17 | Triptofano | 3 |

Tabla 4. Composición de aminoácidos de la BSA (Peters y Hawn, 1967; Brown, 1975; Reed y col., 1980; Hirayama y col., 1990)

2.2 β -galactosidasa

La lactasa o β -galactosidasa (β -D-galactosido galactohidrolasa, EC 3.2.1.23) es una enzima que cataliza la hidrólisis de la lactosa, dando como productos los monosacáridos D-glucosa y D-galactosa. La lactasa es una enzima intracelular producida por muchos microorganismos que usan lactosa como única fuente de energía (Becerra y col., 2001). La lactasa se utiliza para producir leche libre de lactosa para personas con intolerancia a este disacárido; además, facilita la elaboración de productos lácteos edulcorados donde el disacárido constituye un problema en virtud que tiende a precipitarse debido a su baja solubilidad; por otro lado, algunos quesos elaborados con leche hidrolizada maduran más rápidamente que los hechos con leche normal y también ayuda a reducir la cantidad de lactosa en el suero el cual causa serios problemas de contaminación ambiental debido a su alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) (Scrimshaw y Murray, 1988; Kim y col., 1997; Ladero y col., 2000). Asimismo, debido a que la lactosa hidrolizada tiene un mayor poder edulcorante, por los monosacáridos que la constituyen, su hidrólisis permite un ahorro en la cantidad de azúcar que deberá adicionarse a estos productos. Las β -galactosidasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son producidas por animales, plantas y microorganismos (bacterias, hongos y levaduras). De acuerdo a la fuente, sus propiedades difieren marcadamente. Para su utilización en la industria láctea, a nivel comercial, la enzima se extrae principalmente de hongos tales como *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*, y levaduras como *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* y *Candida kefir* (tabla 5) (Mahoney y Whitaker, 1978; Castillo, 1990; García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996).

| Fuente | pH óptimo | Temperatura óptima, °C |
|-----------------------------------|-----------|------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 3.0 – 4.0 | 55-60 |
| <i>Aspergillus oryzae</i> | 4.8 | 50-55 |
| <i>Escherichia coli</i> | 6.9 – 7.5 | 45 |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> | 6.5-7.3 | 35 |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> | 6.6 | 37 |
| <i>Candida kefir</i> | 6.2 | 45-47 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 7.1 | 55 |

Tabla 5. Características de las lactasas disponibles comercialmente estudiadas (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996)

Las lactasas de levaduras son las más utilizadas debido a su pH y temperatura de actividad; estas enzimas son intracelulares y para su obtención se requiere primeramente que la célula sea lisada. Por lo tanto, su grado de pureza resulta ser muy importante para evitar la presencia de contaminantes cuyos efectos en el producto sean diversos; los contaminantes de importancia particular son las proteasas, las cuales si se encuentran en la leche pueden causar en casos extremos la coagulación de la misma y la generación de sabores amargos. Por ello el proceso de extracción y purificación de esta enzima ha sido el objetivo de diversas investigaciones (Becerra y col., 1998; Mahoney y Whitaker, 1978; Dickson y col., 1979; Cavaille y Combes, 1995).

Se ha reportado que las lactasas de levaduras *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis* tienen su pH óptimo cerca de la neutralidad y actúan a temperaturas moderadas; las condiciones óptimas son pH 7.0 y 35 °C; inactivándose por encima de los 40 °C (Dickson y col., 1979; Cavaille y Combes, 1995; García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Kim y col., 1997; Tello-Solís y col., 2005). Las lactasas fúngicas de cepas de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* actúan en medio ácido (pH 4.5) y a temperatura elevada (50 a 60 °C); encontrándose relativa termoestabilidad entre ellas: ya que se ha encontrado que este grupo de enzimas es capaz de hidrolizar la lactosa en condiciones cercanas a la pasteurización (Alais, 1991).

Mahoney y Whitaker (1978) reportaron que las lactasas destinadas para la hidrólisis de la lactosa en la leche por las propiedades que presentan, principalmente por su pH óptimo, son las de levaduras. En ese mismo estudio se aisló una lactasa de *Kluyveromyces fragilis* por isoelectroenfoco y se encontró que la proteína poseía una masa molecular de 201 kDa.

Dickson y col. (1979) purificaron una lactasa de la cepa Y1140 de *Kluyveromyces lactis* encontrando, a través de electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida, una proteína cuya masa molecular fue de 135 kDa. Encontraron también que la enzima requiere de iones sodio y manganeso para que se dé la mayor actividad de lactasa; por otro lado, los parámetros cinéticos encontrados fueron: $K_m = 12$ a 17 mM y de 1.6 mM para la lactosa y el o-nitrofenil- β -D-galactósido respectivamente.

Greenberg y Mahoney (1982) caracterizaron una lactasa de *Streptococcus thermophilus*, ellos reportan una masa molecular de 530 kDa, el cual determinaron a través de cromatografía de filtración en gel, pero no reportan si se trata de un dímero o un tetrámero. También reportan que la actividad máxima se observó a pH 7.1 en presencia de iones potasio

y manganeso lo cual concuerda con lo que habían obtenido Dickson y col. (1979). Los valores de K_m que reportan para el o-nitrofenil- β -galactopiranosido (ONPG) y la lactosa son 0.98 mM y 6.9 mM, respectivamente. Además, se encontró un efecto de inhibición competitiva el cual es ocasionado por la galactosa, la K_i en este caso resultó de 6.9 mM. La temperatura a la cual observaron la mayor actividad enzimática fue a 37 °C.

Becerra y col. (1998), lograron purificar una lactasa de una preparación comercial Maxilact LX 5000, por cromatografía por filtración en gel y reportaron que la masa aproximada de la lactasa estaba entre 130 y 440 kDa teniendo la mayor actividad la fracción de 240 kDa, lo cual sugería que la forma activa de la β -galactosidasa es un dímero. Sin embargo, observaron en el gel de electroforesis 4 bandas principales de 483, 385, 240 y 146 kDa aproximadamente, explicando que esto se debe a diversas formas de agregación de la enzima. Becerra y col. (1998) concluyen que tanto la forma dimérica como la tetramérica son activas y la preponderancia de una de las formas es dependiente de las condiciones del ensayo.

Cavaille y Combes (1995), trabajando con el mismo preparado comercial de lactasa (Maxilact LX 5000), reportaron que la lactasa es un dímero de 200 kDa compuesta de dos subunidades de masas moleculares idénticas. Además, determinaron que esta lactasa es un glicoproteína con 45% (p/p) de carbohidrato. En este mismo trabajo se reportó la estabilidad de la enzima en contra de la desnaturalización térmica y se encontró que la lactasa de *K. lactis* es inestable por encima de su temperatura óptima, 35-40 °C, pero presentó actividad a 4 °C.

Por otro lado, Tello-Solís y col. (2005) purificaron la lactasa del Maxilact LX5000 a través de cromatografía por filtración en gel y por cromatografía de intercambio iónico, encontrándose a través de electroforesis desnaturalizante que la lactasa de *K. lactis* es un dímero cuyos monómeros son de 125.4 y 95.3 kDa, respectivamente. Algunos autores (Dickson, 1979; Cavaille y Combes, 1995) sugieren que las discrepancias en cuanto al número y masas moleculares de las subunidades de la lactasa de *K. lactis* se debe principalmente al grado de glicosilación, el cual, a su vez, varía con las condiciones de ensayo.

2.2.1 Mecanismo de hidrólisis de la β -galactosidasa

La hidrólisis enzimática del enlace glicosídico en la lactosa se lleva a cabo vía una catálisis ácida que requiere de dos residuos principales, un donador de protones y un nucleófilo/base. El mecanismo de la hidrólisis de la lactosa fue descrito por Wallenfels y Malhorta (1960) quienes utilizaron la lactasa de *E. coli* como modelo. El mecanismo de reacción propuesto fue que dos residuos: cistina e histidina, actúan como donador de protones y nucleófilo, respectivamente, durante la hidrólisis de la lactosa.

Este mecanismo ha sido estudiado por varios autores (Nizizawa y Hashimoto, 1970; Nijipels, 1981; Presnosil y col., 1987). Sin embargo, recientemente (Zhou y Chen, 2001) han reportado que las β -galactosidasas de origen microbiano poseen dos residuos de ácido glutámico (Glu⁴⁸² y Glu⁵⁵¹) como donadores de protones y como base nucleófilo al mismo tiempo en la reacción de hidrólisis de la lactosa (tabla 6).

| Origen de la enzima | <i>K. lactis</i> | <i>E. coli</i> | <i>E. coli</i> (subunidad) | <i>A. niger</i> |
|---------------------|--------------------|--------------------|----------------------------|--------------------|
| Masa molecular (Da) | 117618 | 116351 | 118016 | 119160 |
| Residuos (a.a.) | 1025 | 1023 | 1031 | 1006 |
| Donador de protón | Glu ⁴⁸² | Glu ⁴⁶¹ | Glu ⁴⁴⁹ | Glu ²⁰⁰ |
| Nucleófilo/base | Glu ⁵⁵¹ | Glu ⁵³⁷ | Glu ⁵¹² | Glu ²⁹⁸ |

Tabla 6. Sitio activo y algunas propiedades de la β -galactosidasa de varias fuentes microbianas (Zhou y Chen, 2001).

El mecanismo de reacción se muestra en la figura 5. La primera etapa es la formación del complejo enzima-galactósido y simultáneamente la liberación de la molécula de glucosa. En el segundo paso, el complejo enzima-galactósido se transfiere a un aceptor que contiene un grupo hidroxilo (Zhou y Chen, 2001). Mientras que el agua al ser más competitiva para ser un aceptor que la galactosa, se forma la galactosa y se libera del sitio activo.

Por otro lado, en una solución con alta concentración de lactosa, el disacárido es más propenso para actuar como aceptor, uniéndose con el complejo de enzima-galactosa para formar oligosacáridos.

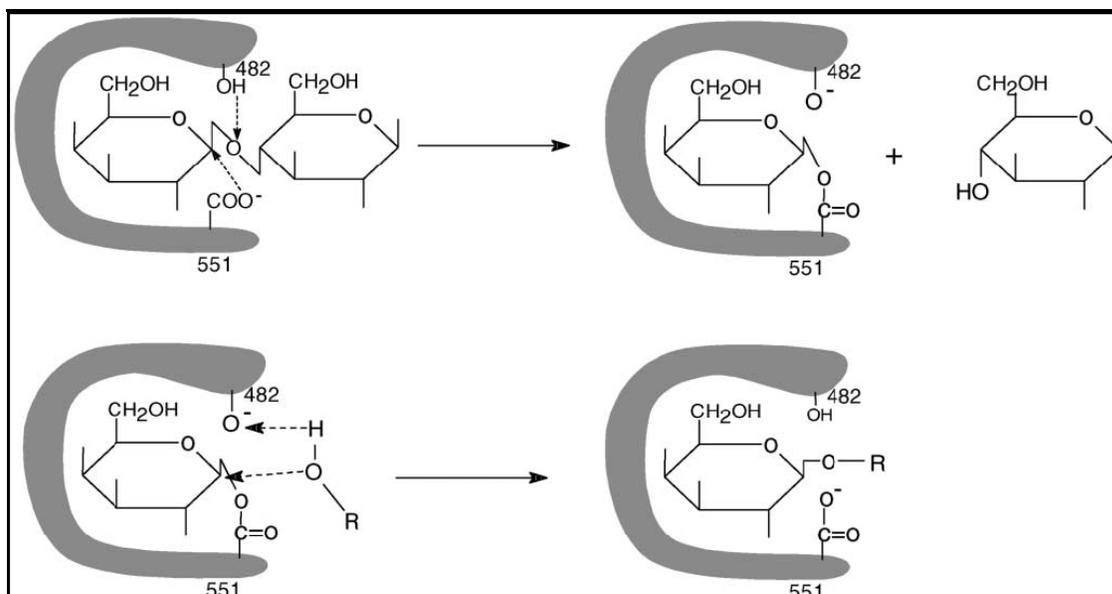


Figura 5. Mecanismo esquemático de la hidrólisis de la lactosa por la β -galactosidasa de *K. lactis*.

2.3 Efectos de los constituyentes del medio sobre la actividad de la β -galactosidasa

2.3.1 Iones

Mahoney y Adamchuck (1980) reportaron que la actividad de la lactasa en leche y suero está controlada por el ambiente iónico; ellos encontraron que la mayor actividad se presenta en presencia de iones magnesio y potasio. Llevando a cabo experimentos en donde se midió la actividad en suero y leche descremada, encontraron que la actividad fue mayor en el suero que en la leche descremada, sugiriendo que estas diferencias se debían muy probablemente al ambiente iónico del medio de reacción. Esto explicaba de cierta forma que algunos de los constituyentes de la leche tenían un efecto activador y otros presentaban un efecto contrario, tales como el sodio y calcio.

Dickson y col. (1979) reportan que dentro de los factores iónicos que requiere la lactasa de *Kluyveromyces lactis* para su actividad se encuentra el fosfato; además, reportan que iones como el K^+ , Mg^{2+} y Mn^{2+} activan a la lactasa. Por otra parte, Kim y col. (1997) reportan que la activación de la lactasa por la adición de Mg^{2+} y Mn^{2+} es diferente y está en función de la concentración del sustrato (ONPG) y del pH utilizado.

Por otra parte, Jurado y col. (2004), trabajando con dos lactasas de distinta fuente: Lactozym 3000L HP-G y Maxilact L/2000, derivadas de cepas de *Kluyveromyces marxianus* y *Kluyveromyces lactis*, respectivamente, encontraron que el comportamiento de la actividad fue

similar, mientras que en presencia de Mg^{2+} , NH_4^+ y K^+ la enzima aumentó su actividad; con el Na^+ y Ca^{2+} se inhibió, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente en otros trabajos (Dickson y col., 1979; Mahoney y Adamchuk, 1980; Kim y col., 1997).

2.3.2 Efecto de las proteínas de leche en la actividad de la lactasa

Jiménez-Guzmán (2003) observó que la sola presencia de β -lg y BSA en los medios de reacción aumentaba significativamente la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Sin embargo, no nos explica completamente el mecanismo que provoca dicho aumento, en el caso de la BSA, ni da evidencia de que se esté llevando a cabo una interacción molecular que sea responsable del efecto activador en la enzima.

Mahoney y Adamchuk (1980) reportaron el efecto de algunas fracciones proteicas de la leche en la actividad de la lactasa, tal como se muestra en la tabla 7.

| Fración protéica y concentración (mg/mL) | Sin Mn^{2+} | Con Mn^{2+} 0.1 mM |
|---|---------------------------------|--|
| Control | 100 | 720 \pm 15 |
| Leche descremada (35) | 451 \pm 8 | 812 \pm 16 |
| Caseína (28) | 658 \pm 10 | 840 \pm 12 |
| Suero (6.4) | 560 \pm 12 | 777 \pm 13 |
| Suero a 85 °C (1.4) | 490 \pm 11 | 720 \pm 10 |
| α -la (0.8) | 288 \pm 15 | 685 \pm 15 |
| β -lg (3.0) | 253 \pm 16 | 692 \pm 8 |
| BSA (5.0) | 434 \pm 13 | - |
| Ovoalbúmina (5.0) | 510 \pm 14 | - |

Tabla 7. Actividad relativa de algunas proteínas de leche sobre la actividad de la lactasa de *Kluyveromyces lactis* (Mahoney y Adamchuk, 1980).

Comparando las actividades relativas con respecto al control (actividad medida en solución reguladora), Mahoney y Adamchuk (1980) encontraron que en presencia de iones Mn^{2+} todas las fracciones proteicas aumentan la actividad varias veces. En presencia de caseína se observó el mayor incremento en la activación; incluso la activación con esta

proteína fue mayor que en leche descremada. De acuerdo con estos resultados, la presencia de algunas proteínas del suero, entre ellas la BSA, resultaron ser igualmente efectivas a pesar de estar en mucha menor concentración. Esta diferencia sugiere que algunas proteínas tienen un efecto activador mayor en la lactasa por el simple hecho de tener una mayor afinidad por la enzima. Por otro lado, la α -la resultó menos efectiva como activador comparada con la fracción de suero a pesar de que ésta es una de las principales proteínas presentes en él. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jiménez-Guzmán (2003) en donde se reporta que la α -la no presentó ningún efecto activador. Sin embargo, los resultados reportados por Mahoney y Adamchuk (1980) son muy controversiales, ya que no existe ninguna correlación entre las concentraciones de proteína utilizada en cada fracción y no dan información acerca de la manera en que se llevaron a cabo las determinaciones de actividad.

Muy recientemente Jiménez-Guzmán y col. (2006) reportaron que la actividad de la lactasa de *K. lactis* aumentaba significativamente en presencia de BSA, demostrando que la actividad aumentaba más de tres veces en el medio de reacción comparada con la actividad medida en solución reguladora de fosfatos (control), sin embargo, no explica cual es el mecanismo por el cual pudiera darse dicho aumento, en el caso muy particular de esta proteína.

La estabilidad de la lactasa ha sido un tema ampliamente estudiado. Greenberg y col. (1985) encontraron que la estabilidad de la lactasa de *Streptococcus thermophilus* a 55 °C se incrementó 7 veces en presencia de lactosa, 2 veces con galactosa y 1.5 veces con glucosa, mientras que con maltosa no observaron ningún efecto. También encontraron que en ausencia de lactosa la enzima resultó ser menos estable en leche que en suero de leche.

Mahoney y Wilder (1989), trabajando con la lactasa de *Escherichia coli* reportan que la estabilidad térmica de la enzima está relacionada con varias fracciones proteicas presentes en la leche, reportan diferencias principalmente con las proteínas del suero. Ellos describen que la seroalbúmina, los caseinatos y la ovoalbúmina estabilizan a la lactasa más de 170 veces en comparación, cuando se prueba la estabilidad térmica en leche bajo las mismas concentraciones de proteína, y concluyen que la seroalbúmina es una proteína que estabiliza fuertemente a la lactasa en contra de la desnaturalización térmica, comparada con otras fracciones proteicas.

2.4 Cromatografía por afinidad

Se trata de un tipo especial de cromatografía de adsorción sólido-líquido en la que la sustancia de naturaleza bioquímica (anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos, lectinas y otras moléculas) denominadas ligandos de afinidad y enlazados químicamente en soportes sólidos adecuados, retienen a los solutos (analitos), también de naturaleza bioquímica, de manera reversible y selectiva. Las separaciones se basan en el acoplamiento “llave-cerradura” típico de la biología molecular (Affinity Chromatography, Principles and Methods Pharmacia Biotech. Boletín Técnico, 2001).

2.4.1 Principio de la cromatografía de afinidad

El principio de la cromatografía de afinidad se basa en la interacción bio-específica más que en la fuerza iónica. Una separación exitosa requiere que un ligando bioespecífico esté disponible para que pueda unirse covalentemente con un medio de soporte, la matriz.

La cromatografía de afinidad permite la separación de mezclas proteicas por su afinidad o capacidad de unión a un determinado ligando (Donald, 2001). En este caso, las proteínas que se retienen en la columna son aquellas que se unen específicamente a un ligando que previamente se ha unido covalentemente a la matriz de la columna (Affinity Chromatography, Principles and Methods Pharmacia Biotech. Boletín Técnico, 2001).

La cromatografía de afinidad se basa en la interacción bioespecífica entre las proteínas, por lo que permite evaluar la facilidad con la que una proteína se une a otra por la que tiene afinidad (figura 6).

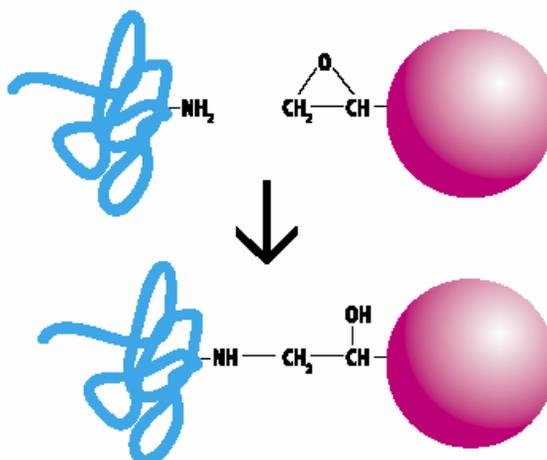


Figura 6. Mecanismo de inmovilización covalente de una proteína a través de grupos amino en el Eupergit®

3. JUSTIFICACIÓN

La bio-conversión de la lactosa juega un papel importante en un síndrome llamado intolerancia a la lactosa. La intolerancia a la lactosa es la incapacidad de digerir cantidades significativas de lactosa a causa de la deficiencia en la enzima β -galactosidasa en la pared intestinal del hombre. La ausencia de lactasa en el tracto digestivo produce síntomas de molestia, dolor e inclusive diarrea. Cerca de 50 millones de adultos norteamericanos son intolerantes a la lactosa; incluyendo en esta lista a la mayoría de afroamericanos, norteamericanos nativos, México americanos y personas de origen asiático (The American Gastroenterological Association, 2000). En México, se ha encontrado que la mala digestión de la lactosa en el centro y en el sur del país es de hasta 33% en los adultos, en tanto que en el norte del país es de tan sólo 16% (Terrés-Speziale y Casas-Torres, 2002). Sin embargo, existe evidencia de que en promedio 11% de la población mexicana presenta problemas digestivos al ingerir menos de un vaso de leche, por lo que elimina o disminuye el consumo de este producto en su dieta.

Para resolver este problema se han desarrollado varios métodos para hidrolizar la lactosa de la leche antes de su consumo (Scrimshaw y Murray, 1988). Desde esta perspectiva, la hidrólisis enzimática de la lactosa llevada a cabo por la β -galactosidasa tiene una aplicación biotecnológicamente difundida y en crecimiento en el campo de la salud, y sobre todo de la industria alimentaria. Las ventajas que se han encontrado por la hidrólisis de la lactosa han impulsado estudios acerca de los diferentes factores que influyen en la hidrólisis, como son la fuerza iónica del medio, la temperatura y el pH de almacenamiento o de la reacción, o bien, la presencia de moléculas o iones que en el medio de reacción pueden llegar a interactuar con la lactasa para aumentar o inhibir su actividad.

Por otro lado, existen varias razones para estudiar las interacciones que se presentan entre las proteínas de la leche, entre las cuales se pueden citar: la adquisición del conocimiento acerca de la estructura de las proteínas, la optimización del uso de sus constituyentes y el mejoramiento de la calidad de los productos, así como la reducción de costos y nuevas aplicaciones de las mismas.

4. HIPÓTESIS

Existen interacciones específicas entre la seroalbúmina de la leche y la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*, que podrían estar relacionadas con el aumento en la actividad enzimática, lo que se traduciría en un aumento en la velocidad de hidrólisis de la lactosa.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la BSA sobre la actividad de la lactasa de *Kluyveromyces lactis*, así como estudiar la interacción entre la enzima y la proteína para tratar de proponer un mecanismo por el cual se dé dicho efecto.

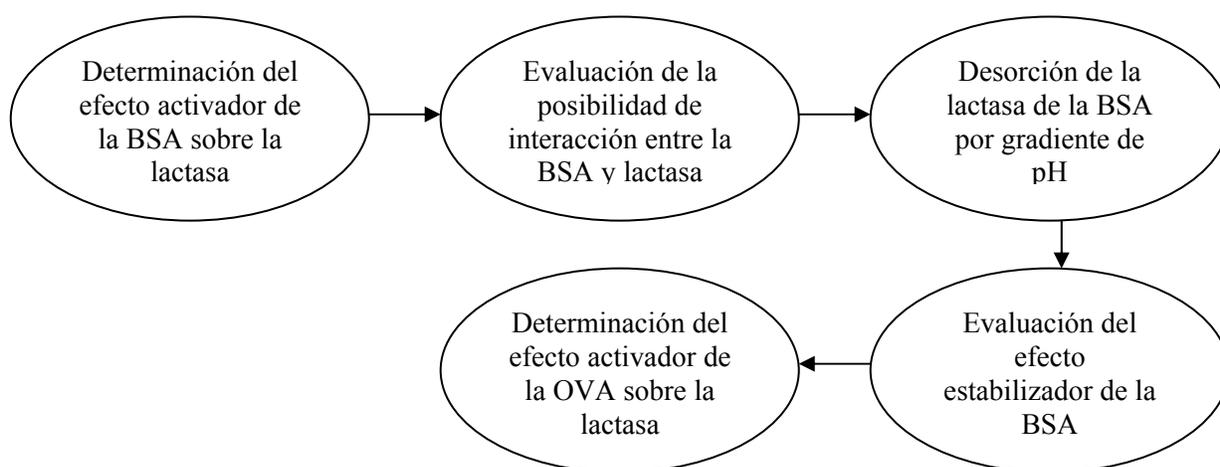
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Con el fin de cumplir el objetivo general antes planteado se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Purificar la seroalbúmina (BSA) de Sigma® por isoelectroenfoco y determinar la pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida.
2. Estudiar el efecto activador de la BSA sobre la β -galactosidasa, probando diferentes concentraciones de la proteína del suero previamente purificada.
3. Investigar el tipo de interacción que se presenta entre la BSA y la lactasa responsable del efecto activador a través de cromatografía de afinidad.
4. Comprobar el efecto protector de la BSA sobre la actividad de la lactasa en contra de los efectos causados por el pH de los medios de reacción.
5. Estudiar el efecto activador de la ovoalbúmina (OVA) sobre la lactasa, probando diferentes concentraciones de proteína.

6. METODOLOGÍA

6.1 PLAN DE TRABAJO



6.2 MUESTRAS

6.2.1 Preparación enzimática

Se utilizó como fuente de lactasa un preparado comercial Maxilact LX5000 (Gist Brocades, Delft, Holanda). Se hicieron diluciones de 1:1000 de la solución enzimática en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0, para las determinaciones de actividad en presencia de seroalbúmina (BSA) y ovoalbúmina (OVA), respectivamente, así como para medir el efecto estabilizador de la BSA sobre la lactasa diluida en diferentes pHs.

6.2.2 Purificación de BSA por isoelectroenfoque

La purificación por isoelectroenfoque se utiliza en una amplia gama de proteínas. La bioactividad se mantiene debido a que las proteínas se encuentran en solución y conservan su estructura nativa conformacional. Esta técnica se ha utilizado para la purificación de anticuerpos, antígenos y enzimas ya que se conserva su actividad biológica (Ayala y col., 1998).

Cuando una proteína se somete a electroforesis a través de un gradiente de pH establecido, las proteínas migran hasta que alcanzan el pH en donde la carga neta de la proteína es cero; en este punto las proteínas dejan de migrar y se dice que la proteína se encuentra en su punto isoeléctrico o pI.

Los anfolitos son moléculas pequeñas cargadas que se usan para establecer el gradiente de pH cuando se hace pasar un voltaje. Cuando un voltaje es aplicado al sistema formado por un anfolito y proteínas todos los componentes tienden a migrar hasta alcanzar sus respectivos pI's.

Reactivos

1. Electrolito del ánodo (ácido fosfórico 0.1 M), H₃PO₄ 85.6% (J. T. Baker) almacenado a 4 °C.
2. Electrolito del cátodo (hidróxido de sodio 0.1 M), NaOH (J. T. Baker) almacenado a 4 °C.
3. Anfolito Bio-Lyte 4/6, 40% sólidos (Bio-Rad, Hercules, CA), almacenado a 4 °C

Procedimiento

1. Se armó el equipo Rotofor® Cell de acuerdo al instructivo del proveedor (Bio Rad, Hercules, CA).
2. Se preparó la cámara de enfoque, de acuerdo al manual de operación, lavando primero con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N y después de lavar perfectamente la cámara se corrió durante 5 minutos a 5 W constantes con agua desionizada para remover los posibles contaminantes residuales en la membrana central antes de la adición de la muestra que se iba a correr (BSA comercial).
3. Se inyectó la muestra de BSA (Sigma Chemical Co St. Louis, MO) (10 mg/mL), anfolito (pH 4 a 6) a una concentración de 2% y el resto fue agua desionizada para tener un volumen total de la muestra de 55 mL.

Una vez terminada la corrida del Rotofor® (aproximadamente 5 horas), se determinó concentración de proteína por Lowry y el pH a todas las fracciones; después, se eliminó el anfolito a través de ultrafiltración con membranas de corte de 30 kDa. Posteriormente la proteína concentrada se resuspendió en solución reguladora de fosfatos y se almacenó a 4 °C. La pureza de las fracciones obtenidas de BSA se comprobó por electroforesis nativa para comprobar que la BSA ya no tenía otros contaminantes.

6.3 ANÁLISIS

6.3.1 Determinación de la pureza y masa molecular de la BSA por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Para determinar la pureza de las muestras de BSA purificadas por isoelectroenfoque, se empleó la electroforesis. Esta técnica se basa en la migración de proteínas o de cualquier otra molécula con carga bajo la influencia de un campo eléctrico. Estas moléculas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos $-$ y $+$), en dependencia de una combinación de su carga, masa molecular y estructura dimensional de las mismas.

Reactivos:

- 1. Solución de acrilamida/bis-acrilamida al 30% de concentración total, 2.67% es aportado por la bis-acrilamida y el resto por la acrilamida (Solución madre T = 30%, C = 2.67%)**

Se pesaron los siguientes reactivos y se disolvieron en 90 mL de agua desionizada

Acrilamida 29.2 g

Bis-acrilamida 0.8 g

Se aforó a 100 mL con agua desionizada.

- 2. Solución reguladora Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8**

Tris (hidroximetil) amino metano 18.15 g

Se disolvió en 80 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 8.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

- 3. Solución reguladora Tris-HCl 0.05 M, pH 6.8**

Tris (hidroximetil) amino metano 6.0 g

Se disolvió en 60 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 6.8 con HCl 6 N y por último se aforó a 100 mL con agua desionizada.

- 4. Solución de dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%**

Dodecil sulfato de sodio 0.1 g

Se aforó a 1 mL con agua desionizada y se guardó a 0 °C.

- 5. Solución de persulfato de amonio al 10%**

Persulfato de amonio 0.1 g

Solución reguladora Tris-HCl pH 8.8 y 6.8 1 mL

Nota: Esta solución se preparó inmediatamente antes de usarse en un vial limpio.

6. Solución reguladora para la muestra

| | |
|--|---------|
| Agua desionizada | 0.95 mL |
| Solución reguladora Tris-HCl 0.05 M pH 6.8 | 0.25 mL |
| Glicerol | 0.20 mL |
| SDS 10% | 0.40 mL |
| Azúl de bromofenol 1% | 0.10 mL |

7. Solución reguladora electrodo Tris-Glicina-SDS pH 8.3 (solución reguladora de corrida) (5X):

| | |
|----------------------------------|--------|
| Tris (hidroximetil) amino metano | 4.5 g |
| Glicina | 21.6 g |
| SDS | 1.5 g |

Se ajustó el pH a 8.3 con HCl y se aforó a 300 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4 °C.

8. Solución desteñidora ácido acético (7%)-metanol (10%)

| | |
|---------------|-------|
| Metanol | 20 mL |
| Ácido acético | 14 mL |

Se aforó la solución a 200 mL con agua desionizada. Se almacenó a 4 °C.

9. Marcador de masa molecular: SDS-PAGE estándar de alto intervalo (Bio Rad, Hercules, CA), almacenado a 0 °C.

En las tablas 8 y 9 se menciona la proporción de reactivos expresados en mililitros que deben emplearse para la preparación del gel de separación (T = 7.5%) y de concentración (T = 4%) utilizados para la preparación de las placas de electroforesis.

| Gel de separación | | T = 7.5% |
|---|--|-----------------|
| Solución madre (30%) | | 2 mL |
| Solución reguladora Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | | 6 mL |
| Solución de SDS 10% | | 80 µL |
| Persulfato de amonio 10% | | 40 µL |
| TEMED | | 4 µL |
| Total | | ≈ 8.1 mL |

Tabla 8. Relación de soluciones que se requieren para la preparación del gel de separación en condiciones desnaturizantes con una concentración de acrilamida de 7.5%.

| Gel de concentración | T = 4 % |
|---|----------------------------------|
| Solución madre (30%) | 0.53 mL |
| Solución reguladora Tris-HCl 1.5 M pH 6.8 | 3.47 mL |
| Solución de SDS 10% | 40 μ L |
| Persulfato de amonio 10% | 20 μ L |
| TEMED | 2 μ L |
| Total | \approx 4 mL |

Tabla 9. Relación de soluciones que se requieren para la preparación del gel de concentración en condiciones desnaturizantes con una concentración de 4%.

Procedimiento:

1. Se armó el equipo de electroforesis Mini-PROTEAN III cell de acuerdo al manual de operación del proveedor (Bio Rad, Hercules, CA)
2. Se preparó el gel de separación de acuerdo a los volúmenes que se señalan en la tabla 8, se desaireó durante 15 minutos con agitación suave. El tiempo de polimerización para que se formara el gel fue de 1 hora aproximadamente.
3. Se preparó el gel de concentración, agregando los volúmenes que se indican en la tabla 9 y se desaireó durante 15 minutos con agitación suave, una vez que se adicionó esta última solución, se colocaron los peines para que se formaran los 10 carriles de cada placa.
4. Una vez listo el gel, se instaló el equipo para correr las muestras, la solución reguladora que se utilizó para correr las muestras se preparó disolviendo 60 mL de la solución reguladora Tris-Glicina-SDS pH 8.3 en 240 mL de agua desionizada.

Preparación de las muestras

Las muestras se prepararon mezclando 40 μ L de la muestra a analizar y 20 μ L de la solución reguladora para la muestra. Se pusieron 20 μ L de cada muestra en cada uno de los carriles del gel y en cada gel se utilizó un estándar de masa molecular como referencia.

1. Las muestras se corrieron a 200 V hasta que el frente de las bandas llegaron casi al final del gel de separación, una hora aproximadamente a 4°C.
2. Una vez que se terminaron de correr las muestras, se fijaron las proteínas en una solución de ácido acético al 7.5%, aproximadamente 40 minutos.
3. Se hizo la tinción de las proteínas en el gel con Sypro Orange® (Bio Rad, Hercules CA).

6.3.2 Determinación de la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

Este método se basa en la presencia de aminoácidos aromáticos en la proteína, además, se obtiene una respuesta lineal (0 a 500 $\mu\text{g}_{\text{proteína}}/\text{mL}$) debido a que el color desarrollado depende directamente del complejo formado por los enlaces peptídicos de la proteína con el ión Cu^{2+} . Para aumentar la sensibilidad de la reacción del biuret, el complejo proteína- Cu^{2+} se hace reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul, con un máximo de absorción a 590 nm. Esta coloración se atribuye a la reducción del ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a azul de heteropolimolibdeno de composición no definida, por medio de los residuos tirosilos, triptofanilos, y en menor grado, cisteinilos e histidilos de las proteínas que forman el complejo con el Cu^{2+} .

Reactivos:

1. BSA 96-99% de pureza (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) almacenada a 4 °C.
2. Reactivo A: Carbonato de sodio 2% en hidróxido de sodio 0.1 M
3. Reactivo de cobre 1% en agua destilada.
4. Reactivo C: Tartrato de sodio y potasio 2% en agua destilada.
5. Solución de trabajo: Se preparó mezclando 50 volúmenes del reactivo A, más 1 volumen del reactivo B y 1 volumen del reactivo C.
6. Fenol-Folin de Ciocalteu: se disolvió (1:1) en agua destilada inmediatamente antes de utilizarse.

Procedimiento:

1. Se colocaron 5 mL de la solución de trabajo en tubos de vidrio limpios y perfectamente identificados, se les agregó 1 mL de la muestra problema y se agitaron.
2. Los tubos se dejaron reposar 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se agregaron 0.5 mL del reactivo de Fenol-Folin de Ciocalteu y se agitaron nuevamente.
3. Se dejó reposar durante 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente.
4. Se leyó absorbencia a longitud de onda de 590 nm contra un blanco, en donde 1 mL de muestra se sustituyó por 1 mL de agua destilada.

5. Se preparó una curva patrón de BSA de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$ obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{BSA } [\mu\text{g/mL}] = (\text{Abs}_{590\text{nm}} - 0.0813) / 0.0019$$

$$r^2 = 0.9870$$

6.3.3 Determinación de la concentración de proteína total por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Este método involucra la unión del colorante azul brillante de Coomassie G-250 con las proteínas, provocando un cambio en el máximo de absorción a 595 nm. Se presentan dos formas coloridas, azul y rojo. El color rojo pasa a azul cuando el colorante se une a la proteína y éste es proporcional a la concentración de proteína presente en la muestra (Bradford, 1976). Su intervalo de sensibilidad es de 0-20 $\mu\text{g/mL}$.

Reactivos

- 1 BSA 96-99% de pureza (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO), almacenada a 4 °C.
- 2 Reactivo de Bradford: Protein Assay, Dye Reagent Concentrate (Bio Rad, Hercules, CA) almacenado a 4 °C.

Procedimiento

1. Se tomaron 800 μL de muestra y se colocaron en tubos de ensaye limpios y perfectamente identificados.
2. Se adicionaron 200 μL del reactivo de Bradford y se agitó perfectamente, registrando el tiempo exacto de la adición.
3. Las muestras se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente y se midió absorbencia a $\lambda = 595$ nm contra un “blanco” en donde el volumen de la muestra se sustituyó por agua desionizada. Las absorbencias se interpolaron en una curva patrón de seroalbúmina de 0 – 20 $\mu\text{g}_{\text{BSA}}/\text{mL}$, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\text{BSA } (\mu\text{g/mL}) = (\text{Abs}_{595\text{nm}} - 0.07883) / 0.03594$$

$$r^2 = 0.9920$$

6.3.4 Determinación de la actividad enzimática en presencia de BSA

Para medir el efecto activador de la BSA en la actividad de la lactasa reportado por varios autores (Mahoney y Adamchuk, 1980; Jiménez-Guzmán y col., 2006) la actividad enzimática se midió por la liberación de o-nitro-fenol (ONP) en los medios de reacción a partir de la hidrólisis del o-nitro-fenol- β -D-galactósido (ONPG) (Greenberg y col., 1985). El

mecanismo de hidrólisis del ONPG es similar al de la hidrólisis de la lactosa y entre las ventajas de usar este pseudosustrato para medir actividad de lactasa se encuentran:

1. La velocidad de reacción es rápida.
2. Presenta buena estabilidad en solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.0.
3. La técnica es relativamente fácil.

Se utilizó como sustrato una solución de ONPG 0.034 M (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) preparada en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 y almacenada en refrigeración a 4 °C.

6.3.4.1 Mezclas de reacción

Para la preparación de las mezclas de reacción se prepararon soluciones de BSA previamente purificadas de 0.1 hasta 10 mg proteína/mL, en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0; 2.7 mL de cada una de las soluciones se atemperaron aproximadamente 10 minutos en un baño a temperatura constante a 37 °C en presencia de 0.1 mL de la solución de lactasa. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado. En el caso en donde se probó el efecto de la OVA en la actividad de la lactasa se probaron las mismas concentraciones usadas para la BSA y se llevó a cabo la determinación de la misma forma. En ambos casos se realizó un análisis de varianza con un nivel de significancia de 0.05.

Reactivos:

1. Solución de ONPG $C_{12}H_{15}NO_8$ (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) 0.034 M en solución reguladora de fosfatos 0.05M, pH 7.0 almacenado en frasco ámbar a 4 °C.
2. Solución de Maxilact LX5000 (Gist Brocades, Delft, Holanda) preparada en una relación 1:1000 en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0.
3. Soluciones de BSA de 1 a 10 mg/mL (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 almacenadas a 4 °C.
4. Soluciones de OVA de 1 a 10 mg/mL (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, USA) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 almacenadas a 4 °C.

Procedimiento:

Se atemperaron 2.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH 7.0 en el caso del control, y las diferentes soluciones de BSA en tubos de ensaye limpios en un baño de temperatura controlada a 37 °C durante 10 minutos antes de empezar con la reacción. Las

reacciones se llevaron directamente en el espectrofotómetro utilizando una celda de temperatura controlada para mantener la temperatura a 37 °C. En una celda de vidrio de 3 mL se colocaron 0.2 mL de ONPG y se agregaron los 2.7 mL de la solución amortiguadora de fosfatos y/o las soluciones de BSA, inmediatamente después se agregó 0.1 mL de la solución de enzima (1:1000). Se registró la absorbencia a 410 nm cada 30 segundos durante 3 minutos, tiempo que duró la reacción.

Los valores de absorbencia obtenidos se extrapolaron en una curva patrón de ONP con un intervalo de 0.5 a 2.5 $\mu\text{mol}_{\text{ONP}}/\text{mL}$ la ecuación de la curva patrón para calcular la concentración de ONP presente fue:

$$\text{ONP } (\mu\text{mol}/\text{mL}) = (\text{Abs}_{410\text{nm}} - 0.0321) / 0.4371$$
$$r^2 = 0.9832$$

La velocidad inicial de la reacción (V_0) se determinó en la parte lineal de los datos de producción de ONP contra el tiempo. La unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de ONPG por minuto a 37 °C y pH 7.0. La actividad específica (A.E.) se determinó dividiendo las U.E. entre la concentración de proteína de las soluciones.

6.3.5 Inmovilización de la BSA en el Eupergit®

Se utilizó el principio de la cromatografía de afinidad para llevar a cabo el estudio de la interacción entre la BSA y la lactasa; para ello, se inmovilizó covalentemente la BSA a una resina comercial: Eupergit® (Röhm GmbH & Co., Darmstadt, Germany). Como solución compleja de proteína con lactasa se utilizó el Maxilact LX5000 (Gist Brocades), cuya composición se determinó previamente por electroforesis mostrando que es una mezcla de 8 proteínas, de las cuales 3 muestran actividad de lactasa (Jiménez-Guzmán, 2003).

El Eupergit® es una resina precargada compuesta por un copolímero de metacrilamida y dos monómeros que contienen grupos oxirano, los cuales reaccionan con los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas; de esta manera se inmovilizan covalentemente las proteínas a la resina.

Como ligando se utilizó a la BSA, la carga total del ligando se calculó en 20 mg proteína/g_{Eupergit®}. Se preparó una solución de 2 mg BSA/mL en solución reguladora de fosfatos 0.05 M a pH 7.0. Se agregaron 10 mL de la solución de BSA a 0.2857 g de Eupergit® en base

seca. Se utilizó un control sin ligando en donde únicamente se pesó la misma cantidad de Eupergit® pero en presencia de 10 mL de la solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 7.0.

Se puso a interactuar el Eupergit® en presencia del ligando (BSA), al mismo tiempo se corrió el control, incubándose durante 26 horas a temperatura ambiente a 150 r.p.m., pasado ese tiempo la resina se filtró y se lavó dos veces con agua destilada, una vez con NaCl 1 M y finalmente una vez con solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0.

Para calcular el porcentaje de la BSA que había sido inmovilizada en la resina, al filtrado se le determinó la concentración de proteína por la técnica de Lowry así como también a la solución inicial de BSA (2 mg/mL) por diferencia entre la proteína que había originalmente y la que se no se unió (inmovilizó) en la resina.

6.3.5.1 Bloqueo de los grupos reactivos del Eupergit

Una vez que la BSA se inmovilizó, se bloquearon los grupos que todavía quedaran reactivos en la resina con glicina (Bio Rad, Hercules, CA) para evitar que al interactuar el Maxilact LX 5000 con el ligándola BSA y/o control quedaran unidas otras proteínas que no fueran precisamente la lactasa.

El bloqueo se hizo preparando una solución de glicina 0.05 M en solución reguladora de fosfatos 0.05 M y pH 7.0, esta solución se usó en una proporción de 0.3 g glicina/gEupergit®, ésta se incubó durante 16 horas a temperatura ambiente y con agitación constante. En el caso del control, también se bloquearon los grupos reactivos de la resina con glicina con la misma proporción que se usó en el ligando.

Posteriormente, la resina cargada con el ligando y el control se filtraron y se lavaron dos veces con agua destilada, una vez con NaCl 1 M y finalmente una vez con solución reguladora de fosfatos 0.05 M y pH 7.0.

Tanto la BSA inmovilizada como el control, se mantuvieron almacenados en solución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 7.0 a 4 °C para posteriormente llevar a cabo las pruebas de afinidad y así poder evaluar el nivel de interacción entre la BSA y la lactasa.

6.3.6 Pruebas de afinidad entre la β -galactosidasa y la BSA inmovilizada

Para poder evaluar la interacción entre la lactasa y la BSA se hizo interactuar esta última con una solución de Maxilact LX5000 (Gist Brocades, Delft, Holanda). Las pruebas de

afinidad se llevaron a cabo colocando 0.333 g de la resina con BSA y control. Se probó una relación molar de 0.1 moles de β -galactosidasa por mol de BSA_{inmovilizada} en la resina.

Procedimiento

1. Se filtró la resina cargada con BSA y el control que se encontraban almacenadas en solución reguladora de fosfatos 0.05 M y pH 7.0 a través de papel Whatman No. 4.
2. Se pesó 0.333 g de resina (ligando y control) en viales limpios perfectamente identificados; se prepararon 3 viales para el ligando y 3 viales para el control.
3. Se preparó una solución de Maxilact LX 5000 en solución reguladora de fosfatos 0.05 M y pH 7.0 como fuente de lactasa de acuerdo al número de moles de BSA inmovilizadas y también de acuerdo a la concentración de proteína presente en el Maxilact LX5000 (70 mg/mL).
4. Se agregaron 5 mL de la solución de Maxilact LX 5000 (Gist Brocades, Delft, Holanda) a cada uno de los viales, los cuales se incubaron con los ligandos durante 60 minutos a temperatura ambiente con agitación constante a 250 r.p.m., posteriormente se separó el sobrenadante de la resina por centrifugación (5000 rpm).
5. A los sobrenadantes (SNs) se les midió actividad por hidrólisis de ONPG así como concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976), todo ello para comprobar si se presentaban cambios en la solución inicial de lactasa.
6. Finalmente, se determinaron las actividades específicas de los SNs para evaluar el nivel de interacción que se presenta entre la BSA y la lactasa. Para ello, una unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar un μ mol de ONPG por un minuto a 37 °C y pH 7.0.

Para tener el análisis completo de las U.E. que interactuaron con el ligando y las que permanecieron en solución, se determinó la actividad de la lactasa que había quedado inmovilizada en la resina. Para ello toda la resina se empaquetó en un tubo de vidrio el cual se introdujo en un baño a 37 °C y se hizo recircular ONPG 0.034 M a través de él durante 30 min. A intervalos de 10 minutos se midió el ONP liberado por la reacción y se hizo el balance completo de U.E. de lactasa antes y después de interactuar con la BSA inmovilizada.

6.3.7 Desorción de la lactasa con gradiente de pH

Para desorber la lactasa y probar si el tipo de interacción que se da entre la BSA y la lactasa es a través de cargas, se hizo un gradiente de pH de 3 a 10 enfrentando la resina con cada uno de los pH's durante 60 minutos. Esto se llevó a cabo con la misma cantidad de resina en donde previamente se había determinado actividad, posteriormente se midió actividad en la solución enfrentada y nuevamente en la resina inmediatamente después de cada intento de separar la enzima de la BSA.

Procedimiento

1. Se colocó toda la resina (0.333 g) después de incubarse con la solución de Maxilact LX5000, tanto la que tenía el ligando como el control, en viales limpios y perfectamente marcados.
2. Se agregaron 5 mL de cada una de las soluciones reguladoras de distinto pH y se dejaron interactuar durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Cabe señalar que cada una de las soluciones reguladoras de diferente pH se prepararon a una concentración 0.05 M.
 - pH 3, 4 y 5, se prepararon con ácido cítrico y citrato de potasio.
 - pH 6 y 7, se prepararon con fosfato de potasio mono y dibásico.
 - pH 8, 9 y 10, se prepararon con TRIS Base y se ajustó a cada pH con HCl 1 N.
3. Posteriormente, los viales se centrifugaron y a los sobrenadantes se les determinó concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976) y actividad enzimática con ONPG en solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0.
4. La resina se lavó tres veces con solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 y finalmente se midió actividad de lactasa para ver en que valor de pH se logra desorber a la lactasa de la BSA inmovilizada.

6.3.8 Efecto del pH en la estabilidad de la β -galactosidasa

Para determinar el efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima, así como para probar el efecto que ejerce la BSA sobre la lactasa contra los cambios por pH en los medios de reacción se realizaron experimentos en donde una solución de Maxilact LX5000 (1:1000) se incubó en las mismas soluciones reguladoras de distintos pH's durante 1 hora a temperatura ambiente y a agitación constante; posteriormente se determinó su actividad utilizando ONPG como sustrato ajustando a pH 7.0 cada uno de los medios de reacción.

Para tener un análisis completo del efecto del pH sobre la actividad de la lactasa, se determinó nuevamente la actividad de la enzima en las mismas soluciones reguladoras pero en presencia de BSA (0.3 mg/mL) en las mezclas de reacción. Esto se llevó a cabo incubando la lactasa en cada una de las soluciones de distinto pH con la BSA presente en la misma concentración. Se calculó la actividad relativa obtenida en los diferentes pHs midiendo actividad a 37 °C y pH 7.0 utilizando el ONPG como sustrato.

6.3.9 Efecto de la OVA en la actividad de la β -galactosidasa

Con la finalidad de comparar a la BSA con una proteína de origen no lácteo se probó el efecto de la ovoalbúmina (OVA) sobre la actividad de la lactasa. La OVA se probó a las mismas concentraciones usadas para la BSA; la actividad se determinó directamente en el espectrofotómetro a 37 °C; se hicieron triplicados para cada una de las concentraciones de OVA probadas. La solución enzimática se preparó diluyendo el Maxilact LX5000 (1:1000) en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0, las mezclas de reacción se atemperaron a 37 °C en un baño de temperatura controlada 15 minutos antes de que empezara la reacción.

La medición de la actividad se llevó a cabo siguiendo el aumento de ONP en el medio durante 3 minutos por la hidrólisis de ONPG 0.034 M, pH 7.0 y los valores de absorbencia obtenidos se compararon con la curva patrón de ONP anteriormente descrita (6.3.4.1.).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Purificación de la BSA por isoelectroenfoque (IEF)

La primera parte del proyecto consistió en purificar por IEF a la seroalbúmina de Sigma®. Después de seis corridas en el Rotofor® en donde se intentó purificar a la (BSA) comercial, se juntaron 10 fracciones de BSA (tabla 10) a las cuales se les midió pH y concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). A estas muestras posteriormente se les eliminaron los anfolitos por medio de ultrafiltración con membranas de corte de 30 kDa.

| Fracción | pH | mg _{BSA} /mL |
|----------|------|-----------------------|
| 10 | 4.50 | 9 |
| 11 | 4.66 | 9 |
| 12 | 4.80 | 9 |
| 13 | 4.89 | 10 |
| 14 | 4.98 | 9 |
| 15 | 5.04 | 11 |
| 16 | 5.35 | 10 |
| 17 | 5.44 | 10 |
| 18 | 5.73 | 5 |
| 19 | 6.30 | 4 |
| 20 | 6.63 | 5 |

Tabla 10. Concentración de proteína (BSA) y pH de las fracciones obtenidas en la purificación de BSA Sigma® por IEF usando un anfolito de rango de pH (4 a 6).

Para comprobar la pureza de la BSA se realizó una electroforesis nativa en gel de acrilamida (figura 7) en las muestras cuyo pH se encontraba cercano al punto isoeléctrico (pI) reportado para la BSA (pI = 4.7). Al observar la placa de electroforesis se encontró que la fracción de pI 4.8 ya no poseía el resto de los contaminantes que originalmente poseía la muestra comercial (carril 9), se calculó la masa molecular de la muestra comparándola contra un estándar de masas moleculares conocidas y se encontró que ésta fracción poseía una masa molecular de 66.2 kDa, que es muy parecido a la masa molecular que diversos autores reportan para la BSA, 66.5 kDa (Basch y col., 1985; de Wit, 1998; Fox y McSweeney, 1998). La muestra con BSA pura se almacenó a 4 °C para posteriormente usarse en las pruebas de actividad.

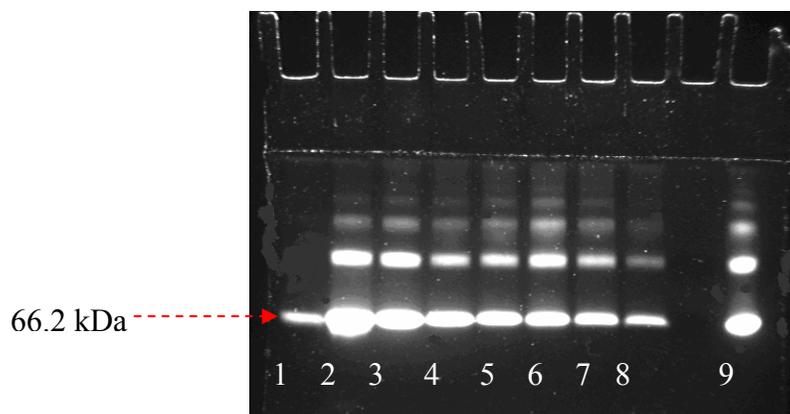


Figura 7. Electroforesis nativa de las fracciones de BSA purificadas por IEF, carriles (pH's): 1.- (4.8), 2.- (4.89), 3.- (4.98), 4.- (5.04), 5.- (5.35), 6.- (5.44), 7.- (5.73), 8.- (6.30), 9.- BSA comercial (1 mg/mL).

7.2 Efecto de la BSA en la actividad de la β -galactosidasa

Como una primera aproximación para medir el efecto de la BSA sobre la actividad de la lactasa, se probaron diferentes concentraciones de esta proteína (desde 1 hasta 10 $\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{mL}$); como fuente de lactasa, se utilizó una dilución del Maxilact LX5000 (1:1000) preparada en solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0, esta concentración de enzima se utilizó en todas las concentraciones de BSA probadas para la determinación del efecto activador. Se encontró un aumento significativo ($\alpha < 0.05$) en la actividad con todas las concentraciones probadas con respecto al control, en donde la actividad se midió únicamente en la solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 sin proteína (0 $\text{mg}_{\text{BSA}}/\text{mL}$) utilizando ONPG en una concentración 0.034 M como sustrato (figura 8). Los resultados demostraron que la sola presencia de la BSA en el medio de reacción aumentó más de 200 % la actividad de la enzima. Sin embargo, al realizar un análisis de varianza entre cada una de las concentraciones probadas para ver cual era la concentración mínima requerida de BSA para que se presente dicho efecto, no se encontró diferencia significativa, lo que sugiere que con estas concentraciones estamos en un nivel de saturación de la enzima. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Mahoney y Adamchuk (1980), en donde se probó la BSA como activador en una concentración de 5 mg/mL en el medio de reacción y la actividad aumentó en un 330%; sin embargo, a pesar de que en este estudio se probaron otras fracciones proteicas presentes en la leche a diferentes concentraciones, no se da una explicación clara acerca del por qué se probó esa concentración de BSA que pudiera explicar el efecto de esta proteína de suero sobre la actividad de la enzima. Por otro lado, en nuestro estudio se llevó a

cabo una cinética probando diferentes concentraciones de BSA para con ello tratar de explicar más detalladamente el papel de la BSA sobre la activación de la lactasa.

Al igual que en nuestro estudio, Mahoney y Adamchuk (1980) reportan un fuerte efecto activador de la BSA sobre la lactasa de *K. lactis*, alrededor de 330 %, superior a la actividad medida en solución amortiguadora de fosfatos sin proteína; sin embargo, ellos no reportan cual es la concentración de lactasa utilizada que interacciona con la BSA. Esto sugiere que la sola presencia de la proteína activa a la lactasa fuertemente.

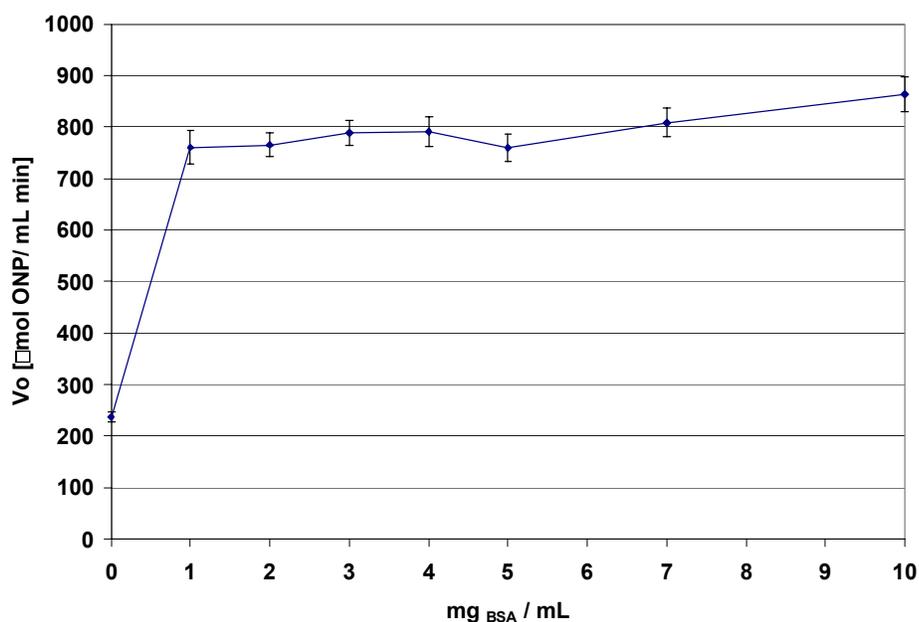


Figura 8. Actividad de la lactasa en presencia de BSA (1 a 10 mg/mL) a pH 7.0 y 37 °C. La velocidad inicial (V_0) se calculó midiendo la concentración de ONP generados por la hidrólisis de ONPG producidos por minuto. La concentración de enzima se estableció en base a la misma dilución de Maxilact LX5000 antes probada (1:1000).

Para analizar con más detalle el efecto activador de la BSA en la lactasa, se probaron concentraciones de BSA menores a 1 mg/mL en las mezclas de reacción, estableciéndose la misma concentración de lactasa utilizada anteriormente de Maxilact LX5000 (1:1000). En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos a partir de una cinética obtenida con un barrido de concentraciones desde 0.1 a 1 mg BSA/mL.

Al llevar cabo un análisis estadístico de los resultados la actividad observada en solución en todas las concentraciones de BSA probadas nuevamente fueron significativamente mayores ($\alpha = 0.00001$) que la actividad obtenida en solución amortiguadora de fosfato 0.05 M,

pH 7.0 usada como control (0 mg_{BSA}/mL); incluso, cuando se probaron concentraciones de BSA menores que el contenido normal en la leche (0.4 mg_{BSA}/mL) la actividad fue 350 % mayor comparada con la actividad en la solución sin BSA, esto demuestra que la sola presencia de la BSA en el medio de reacción activa fuertemente a la lactasa. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Jiménez-Guzmán y col., (2006) en donde se probó a la BSA en el medio de reacción y se encontró que la sola presencia de la proteína activó más de tres veces a la lactasa. Al calcular la relación molar de la BSA con respecto a la lactasa en los medios de reacción se encontró que con la mínima concentración probada de BSA (0.1 mg_{BSA}/mL) se tiene una relación de 1.5 moles de BSA por cada mol de lactasa en el medio de reacción, lo que sugiere que tal vez para poder observar un efecto más claro del papel de la BSA en la actividad de la lactasa se tenga que probar con relaciones molares aún más pequeñas; por ejemplo, probar una relación mol a mol. Esto adquiere sentido ya que si se parte de que ambas proteínas tienen masas moleculares muy grandes y además, se llega fácilmente al máximo efecto activador, no es posible observar el efecto de la concentración de la BSA sobre la lactasa en el intervalo de concentraciones de BSA probadas.

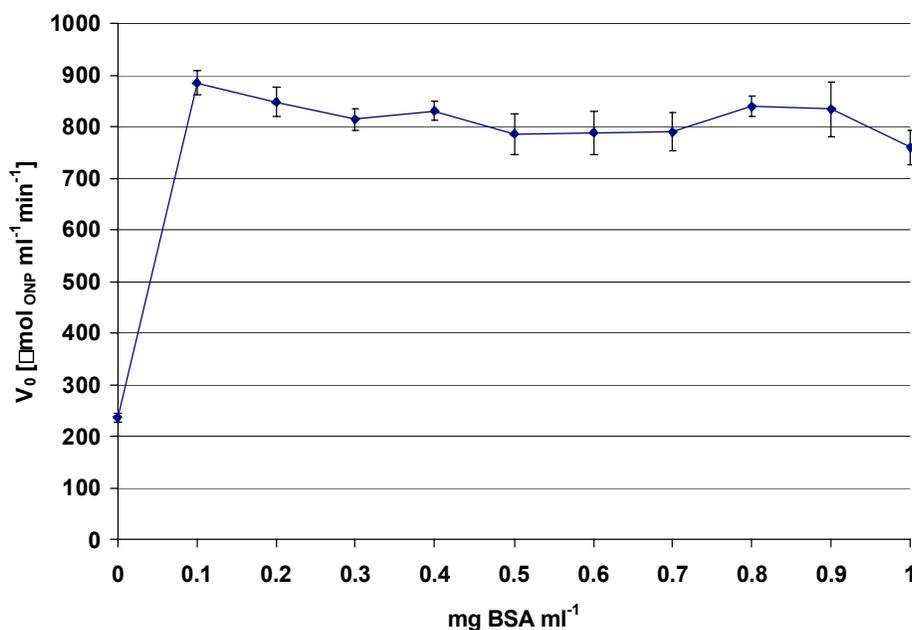


Figura 9. Actividad de la lactasa (1:1000) medida por hidrólisis de ONPG probando diferentes concentraciones de BSA (0.1 a 1 mg/mL) a pH 7.0 y 37 °C.

7.3 Interacción de la BSA con la lactasa

Se ha reportado que algunas enzimas se activan cuando se les unen otras proteínas (Mahoney y Adamchuk, 1980; Jiménez-Guzmán, 2003) logrando, por una parte, que se modifique de algún modo su estructura terciaria, y por otro lado, que el sitio activo quede más expuesto para que se lleve a cabo de una manera más rápida la catálisis de su sustrato.

Para comprobar si existía interacción entre la BSA y la lactasa de *K. lactis* se utilizó la cromatografía de afinidad inmovilizando la BSA en un soporte comercial preactivado: Eupergit®. Para establecer si la BSA tiene afinidad por la β -galactosidasa se utilizó a la primera como ligando y como fuente de lactasa Maxilact LX5000, que es una mezcla de 8 proteínas 3 de las cuales presentan actividad de lactasa. Además, se preparó un control en el que la BSA se sustituyó por glicina en la resina (figura 10). Como el Maxilact LX5000 es una mezcla de lactasa con otras proteínas, por lo tanto, es lógico suponer que puede haber algunas proteínas que tengan más afinidad por el ligando que otras, entre ellas la lactasa.

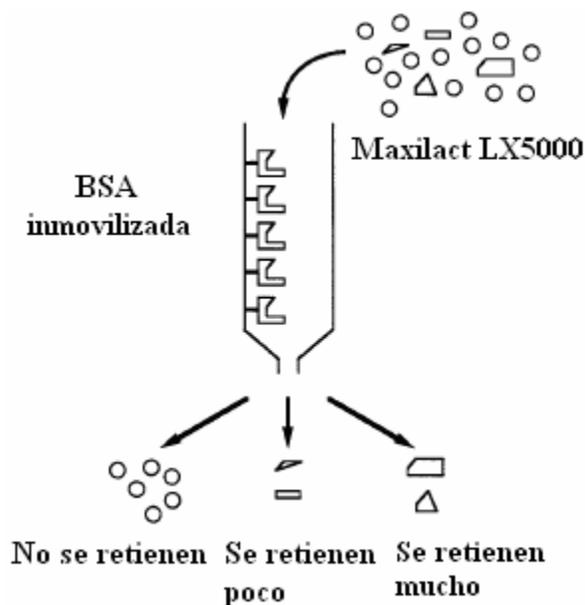


Figura 10. Esquema en donde se muestra que en la solución inicial de lactasa posee proteínas que presentan distintos perfiles de afinidad por el ligando (BSA) de interés.

Para el cálculo del rendimiento de la inmovilización de la BSA, se midió, en primer lugar, el contenido de proteína de la solución inicial de proteína antes de inmovilizarla a la resina (Eupergit®) y posteriormente, se midió la concentración de BSA en el filtrado después de la inmovilización (tabla 11). Para comprobar que la BSA se unía covalentemente a la resina

y que ésta no se separara del Eupergit®, se midió también el contenido de proteína del filtrado obtenido después de bloquear los grupos que aún hubieran quedado reactivos del Eupergit® con glicina.

| Proteína | Concentración (mg/mL) |
|-------------------------------|-----------------------|
| BSA_{inicial} | 1.76 ± 0.03 |
| BSA_{filtrado} | 1.38 ± 0.05 |

Tabla 11. Concentración en la solución de proteína del ligando (BSA) antes de interactuar con la resina y en el filtrado después de la inmovilización en el Eupergit®.

En el caso en donde se determinó la concentración de BSA del filtrado después de bloquear la resina con la glicina, no se detectó proteína, lo cual indica que la concentración de BSA inicial se quedó completamente inmovilizada en el Eupergit®.

El cálculo del rendimiento de la inmovilización de BSA se hizo empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de inmovilización} = \frac{\text{masa proteína}_{\text{inicio}} - \text{masa proteína}_{\text{final}}}{\text{masa proteína}_{\text{inicio}}} \times 100$$

$$\text{BSA inmovilizada} = \frac{17.6 \text{ mg} - 11.5 \text{ mg}}{17.6 \text{ mg}} \times 100 = 34.66 \%$$

Se logró inmovilizar aproximadamente el 35% de la BSA inicial (figura 11), lo cual corresponde a 0.092 μmol de BSA/g Eupergit®; este valor se calculó a partir de la cantidad de proteína que se había pegado y la masa molecular reportada para la BSA (66.2 kDa) (Basch y col., 1985; Farrell y col., 2004). También se tomó en cuenta el volumen de la solución inicial (10 mL) y el volumen del filtrado después de inmovilizar (8.33 mL) para calcular la cantidad en masa que había de proteína en cada caso. Todas las determinaciones de proteína se llevaron a cabo por triplicado, los valores utilizados con lo que se hicieron los cálculos son el promedio de todos los valores obtenidos en cada caso. Dado que estos resultados fueron reproducibles durante varios intentos por inmovilizar la BSA en la resina, es posible asumir que se saturaron todos los grupos expuestos del Eupergit® con la proteína.

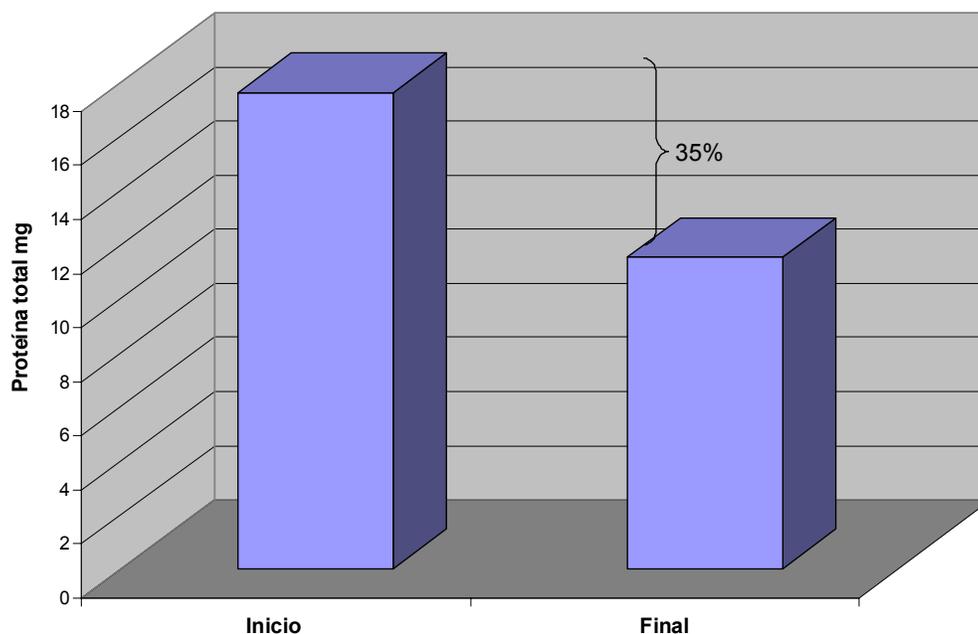


Figura 11. Concentración de BSA inmovilizada en el Eupergit®.

Una vez calculadas las moles del ligando que se lograron inmovilizar, se hicieron las pruebas de afinidad entre la lactasa y la BSA inmovilizada calculadas para ponerse a interactuar por cada gramo de resina.

Se pusieron a interactuar 0.333 g de resina (con BSA) y control (resina bloqueada con glicina) con una solución de Maxilact LX5000 (inicial) preparada a una concentración tal que se tuvieran presentes 0.1 moles de β -galactosidasa (β -Gal) por cada mol de BSA inmovilizada en la resina. Esta concentración de enzima se estableció en base a los estudios realizados por Jiménez-Guzmán (2003) en donde se probó relaciones molares de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 y 3 moles de β -galactosidasa por cada mol de proteína inmovilizada, y encontró que cuando la lactasa se agregó en exceso a las moles de proteína del suero inmovilizada, la disminución en la actividad no fue significativa, debido probablemente a que la proteína inmovilizada no es suficiente para ligar a la lactasa. También reportó que este tipo de comportamiento se observó para todas las concentraciones molares arriba de 1. En nuestro estudio, se partió suponiendo que toda la concentración de proteína en el Maxilact LX5000 corresponde principalmente a lactasa; además, se comprobó que la relación de 0.1 mol de lactasa por cada mol de BSA inmovilizada es donde se observan los cambios más significativos con respecto a la actividad. Para poder calcular la cantidad que se iba a agregar de la enzima se determinó previamente la

concentración de proteína del Maxilact LX 5000 (70.54 mg/mL) por el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

Al determinar la concentración de proteína en las soluciones de lactasa después de la cromatografía, tanto en la resina con BSA inmovilizada como en el control, se observó una disminución significativa en el contenido de ésta, indicando que parte de la proteína presente en el Maxilact LX5000 se retuvo en la resina con BSA y en el control; al medir la actividad enzimática (V_0) en las mismas soluciones, se encontró que en éstas también disminuyó la actividad después de interactuar con cada ligando 23% y 7%, respectivamente (tabla 12).

| Solución | V_0 μ mol ONP/mL min | mg proteína |
|----------|-------------------------------|-------------|
| Inicial | 0.0069 | 0.087 |
| Control | 0.0064 | 0.083 |
| BSA | 0.0053 | 0.080 |

Tabla 12. Contenido de proteína y actividad de lactasa en la solución de Maxilact LX 5000 antes y después de la cromatografía de afinidad. **Inicial** = solución de Maxilact LX5000 antes de la cromatografía de afinidad; **Control** = solución de Maxilact LX5000 después de interactuar en la resina bloqueada con glicina; **BSA** = solución de Maxilact LX5000 después de interactuar con la resina con BSA inmovilizada.

Dado que la actividad enzimática y concentración de proteína disminuyeron tanto en el control como con la BSA_{inmovilizada}, se calculó la actividad específica (A.E.) en las soluciones de lactasa después de la cromatografía de afinidad para saber si las proteínas de la solución inicial de Maxilact LX5000 que estaban siendo retenidas en la resina correspondían específicamente a lactasa y por lo tanto presentara una afinidad por la BSA.

Al calcular la A.E. se encontró que en el caso del control ésta no disminuye significativamente ($\alpha > 0.05$), lo que indica que a pesar de que en el Maxilact LX5000 hay proteínas que se están uniendo en la resina bloqueada con glicina, éstas no necesariamente se unen de forma selectiva, si no más bien, hay un proceso de adsorción y no es una interacción específica. Por el contrario, cuando se calculó la A.E. en la solución sobrenadante cuando el ligando fue la BSA inmovilizada, se encontró que hay una disminución significativa ($\alpha < 0.05$) con respecto a la A.E. del control. Esto sugiere que la enzima está interactuando con la BSA inmovilizada en la resina (figura 12).

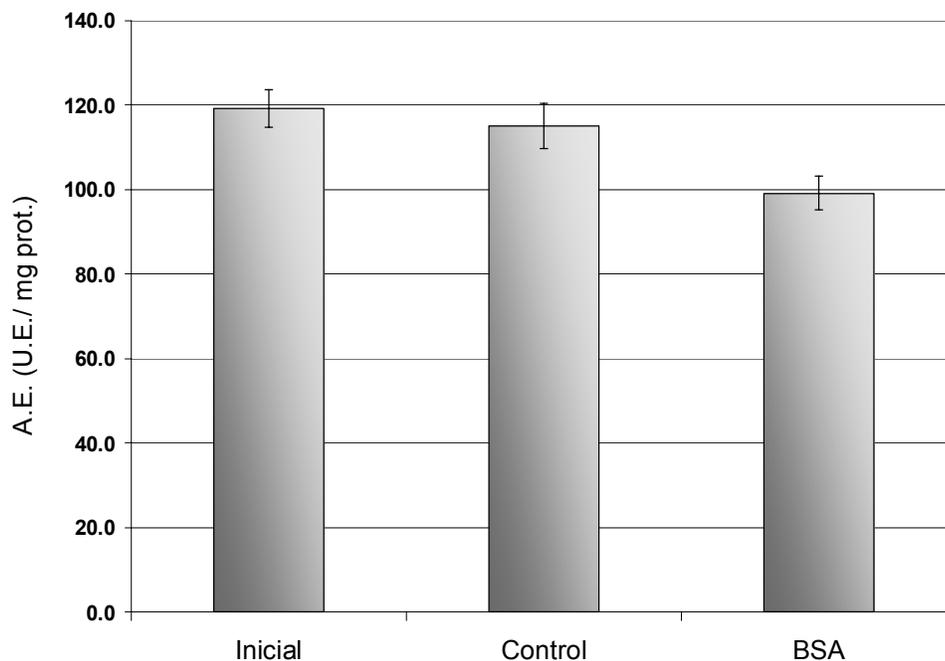


Figura 12. Actividad específica de las soluciones (0.1 mol lactasa/mol BSA) antes y después de la cromatografía de afinidad.

Por otro lado, se realizó electroforesis desnaturalizante de las soluciones después de la cromatografía de afinidad (sobrenadantes) para comprobar si la composición de proteína de la solución inicial de lactasa cambiaba debido a la afinidad específica de la enzima con la BSA (figura 13), como lo sugería el cambio en la actividad específica.

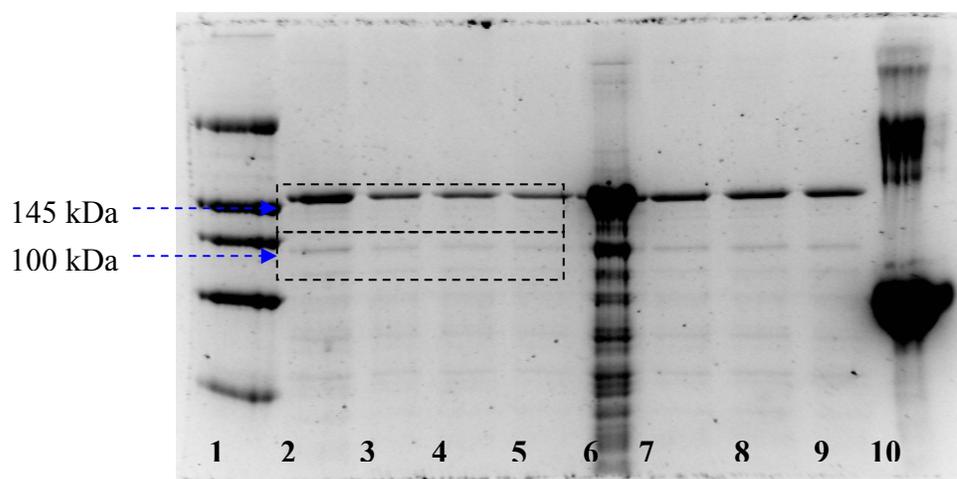


Figura 13. Proteínas presentes en las soluciones antes y después de eluir en una columna de cromatografía de afinidad. Carriles: 1. Estándar de pesos moleculares, 2. Solución inicial de lactasa, 3. Sobrenadante control, 4 y 5. Sobrenadante de BSA, 6. Maxilact 1:50, 7. Sobrenadante control, 8 y 9 Sobrenadante de BSA, 10. BSA comercial (1 mg/mL).

En la figura 13 se observó que en los sobrenadantes obtenidos cuando se usó la BSA como ligando (carriles 4 y 5) existe una disminución en cuanto a la concentración en las bandas correspondientes a los monómeros de la β -galactosidasa de *K. lactis*, 100 y 145 kDa, respectivamente, las cuales son muy cercanas a la masa molecular reportada por varios autores (Mahoney y Whitaker, 1978; Dickson y col., 1979; Cavaille y Combes, 1995, Tello-Solís y col., 2005). Por otro lado, cuando se analizó la concentración en las mismas bandas en el control (carril 3) con respecto a la solución inicial de enzima (carril 2), no se observan cambios significativos en cuanto a la disminución en la intensidad de las bandas de lactasa, estas mediciones se llevaron a cabo midiendo la absorbencia de las bandas de 100 y 145 kDa a través de un Gel-Doc® de Bio-Rad con interface a la computadora, el análisis se hizo con el programa Molecular Analyst. Con todo esto finalmente se comprobó que la lactasa tiene afinidad por la BSA inmovilizada en el Eupergit®.

7.4 Actividad enzimática en la resina (Eupergit®)

Para tener un balance completo acerca de las U.E. de lactasa que se pusieron a interactuar con la BSA inmovilizada antes y después de la cromatografía de afinidad, se midió también la actividad de lactasa en la resina a través de un sistema en el cual se puso a recircular ONPG a través del soporte después de que la lactasa interactuó con el ligando tal y como se explicó en la metodología.

Ahora bien, para descartar el hecho de que el substrato *per se* estuviera siendo hidrolizado a 37 °C en la resina, se hizo recircular éste a través de la resina bloqueada con glicina (control) y se encontró que en la resina bloqueada con glicina hay una pequeña actividad de lactasa (0.00483 U.E. equivalentes de lactasa), esto se debe muy probablemente al hecho de recircularse en el baño de temperatura controlada.

Al determinar la actividad de lactasa en la resina recirculando ONPG a través del Eupergit® con la BSA inmovilizada, después de la cromatografía de afinidad, se encontró que las U.E. producidas fueron 0.074 U.E. (tabla 13), esto nos habla de que efectivamente una parte de la enzima de la solución inicial de lactasa está siendo retenida por la BSA; sin embargo, al comparar las U.E. de lactasa originales (100.56 U.E.) con las que salieron en el sobrenadante (85.42 U.E.) o se quedaron en la resina (0.074 U.E.), se puede observar que un 15% de las U.E. que debieron de haberse retenido en la BSA (≈ 15 U.E.) no corresponden a

las que se midieron (0.074 U.E.), lo que sugiere que la lactasa de algún modo sufre una desestabilización o inactivación al interactuar con la BSA en la resina o simplemente, por diluirse en la solución reguladora de fosfatos; también puede darse el caso de que no necesariamente la lactasa al unirse con la BSA quede espacialmente disponible con el sitio activo expuesto para hidrolizar el sustrato; esto puede explicarse si se tiene en cuenta que Mahoney y Whitaker (1978) observaron al microscopio electrónico que la lactasa de *K. fragilis* formaba agregaciones de 10 subunidades, es decir, de 5 moléculas de enzima; por lo tanto, es válido suponer que la enzima tiende a unirse a otras moléculas de lactasa y darse el caso de una adsorción. Finalmente, pudiera ser que la pérdida en la actividad en la resina sea debida a que la lactasa en solución pierda actividad debido al periodo (1 hora) en el que interactúa con la resina; a este respecto, Cavaille y Combes (1995) encontraron que el Maxilact LX5000 presentó inestabilidad al diluirse en solución reguladora de fosfatos, ya que al medir la vida media de la enzima encontraron que ésta fue de 146 minutos a 40 °C. En nuestro estudio todas las diluciones del Maxilact LX5000 se hicieron en solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0.

| | U.E. |
|---------------------|-------------|
| Inicial | 100.56 |
| Sobrenadante | 85.42 |
| Resina | 0.074 |

$$\text{U.E. Inicial} = \text{U.E. Sobrenadante} + \text{U.E. Resina}$$

Tabla 13. Balance total de U.E. de lactasa después de la cromatografía de afinidad, las U.E. corresponden a la actividad en $\mu\text{mol ONP}$ producidas en un minuto que duró la reacción a 37 °C y pH 7.0.

Hasta este momento el tipo de enlace que se pudiera estar dando entre ambas proteínas es aún incierto, para determinar si la interacción que se presenta entre ambas es a través de cargas eléctricas se hicieron varios intentos para desorber la enzima a través de gradiente de pH, desde pH 3 hasta pH 10, pero en ningún caso se logró separar la enzima, sugiriendo que el enlace que se forma entre la β -galactosidasa y la BSA es fuerte (unión covalente) o no depende de cargas.

Después de los intentos de separar la lactasa de la BSA inmovilizada a través del gradiente de pH, la resina se lavó, con cada uno de los pH probados, con solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 y se le determinó actividad a 37 °C recirculando la solución de ONPG 0.034 M, pH 7.0 a través de ella para medir actividad de lactasa y verificar si la enzima seguía inmovilizada y con actividad (figura 14).

Por otra parte, tampoco fue posible observar actividad (alrededor de 3 horas) ni proteína (medida por el método de Bradford) en las soluciones reguladoras de distinto pH después de que se incubaron alrededor de 1 hora en la resina cargada con la lactasa, esto se debe a que la lactasa no se separó de la BSA por el tipo de interacción que se presenta; cabe señalar que cada una de las soluciones reguladoras se ajustaron a pH 7.0 para determinar actividad. Además, al medir la actividad de lactasa y concentración de proteína en las soluciones de lavado tampoco se observó ningún cambio en ambos casos; sugiriendo que a menos de que hubiera quedado parte de la enzima adsorbida en la resina con la BSA o que haya formado agregados de lactasa, ésta no se separó con ninguno de los pHs probados.

En la figura 14 claramente se puede observar que efectivamente existe un efecto desactivador en la resina debido al pH; al realizar un análisis estadístico, se encontró que hay diferencia significativa ($\alpha < 0.05$) entre la actividad inicial (0.074 U.E.) y la actividad después de incubarse con cada uno de los pHs, incluso, al incubar la resina cargada con la lactasa a pH 7.0, pH reportado como óptimo, hubo una pérdida en la actividad alrededor del 50 %. Por otra parte los resultados muestran que la lactasa es más vulnerable a pHs ácidos, ya que fueron los pH de 3 hasta 6 los que tuvieron un mayor efecto desactivador en la enzima, inactivándola aproximadamente en un 80%. Por otra parte, cuando se probaron el resto de las soluciones reguladoras (pH 8, 9 y 10), el efecto desactivador también fue significativamente menor ($\alpha < 0.05$) que la actividad inicial, pero fue menos la desactivación con estos pH probados. Esto sugiere, por una parte que la enzima es más sensible a pH ácidos (pH 3, 4, 6 y 6) que a básicos (pH 8, 9 y 10), y por otro lado, nos indica que la BSA que logra interaccionar con la lactasa BSA establece un papel “protector” en contra de los efectos causados por el pH, ya que si bien la actividad disminuyó en cada caso, se logra retener cierta actividad muy probablemente a la presencia de la BSA inmovilizada.

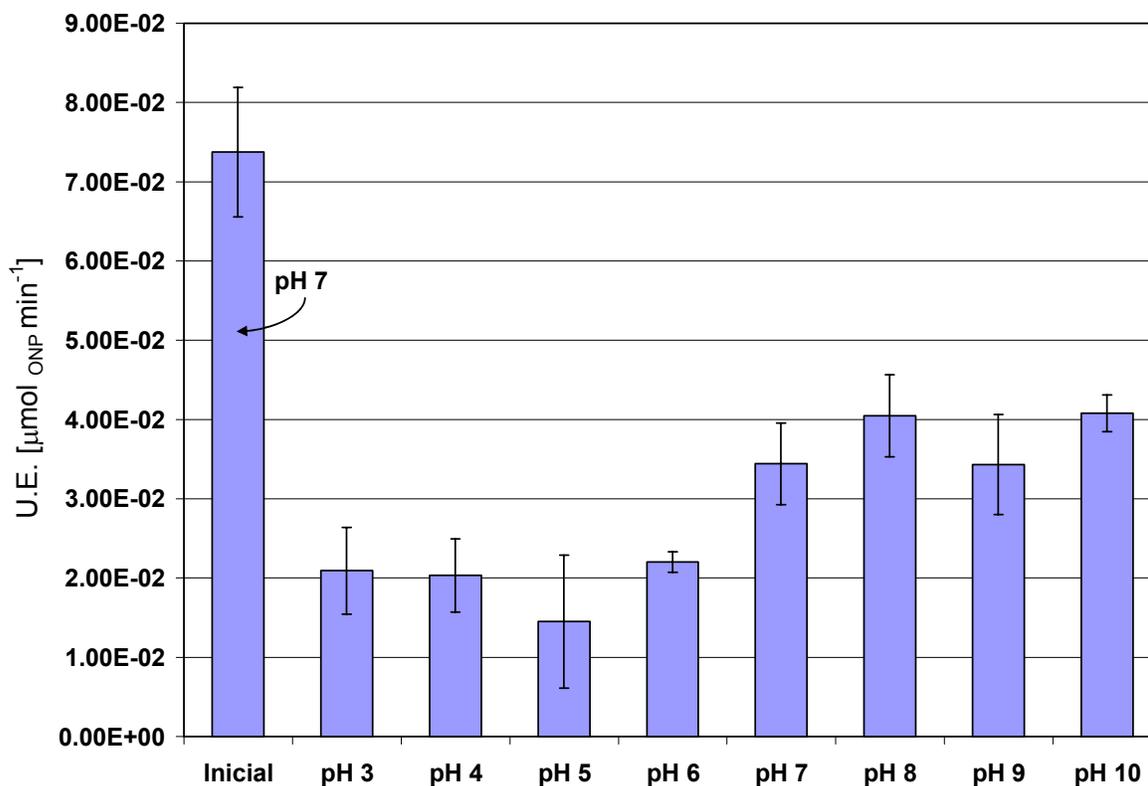


Figura 14. Actividad de lactasa en la resina con BSA inmovilizada después de que se incubó con las soluciones reguladoras a los distintos pH. La columna con BSA es la que inicialmente tenía 0.074 U.E. que son las que se ligaron después de la cromatografía de afinidad.

7.5 Estudio de estabilidad de la β -galactosidasa por efecto de la BSA

Para probar que la BSA inmovilizada en la resina juega un papel “protector” en contra de los efectos causados por el pH, se hicieron experimentos en donde se incubó la lactasa en cada uno de los pHs probados para desorberla (pH 3 a 10). Esto se realizó incubando la enzima durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante; inmediatamente se midió actividad residual ajustando a pH 7.0 cada una de las mezclas de reacción. Posteriormente, se incubó la lactasa en las mismas soluciones reguladoras pero en presencia de 0.3 mg/mL de BSA; esta concentración se estableció en base a que en esa concentración se encuentra la BSA en la leche de vaca. Después de 1 hora de incubación nuevamente se midió la actividad residual, ajustando cada una de las mezclas de reacción a pH 7.0.

Como se puede apreciar en la tabla 14, la enzima resultó muy inestable en casi todos los pHs probados, incluso en el pH que se reporta como óptimo para esta enzima (Dickson y col., 1979; Greenberg y Mahoney, 1982; Voget y col., 1994), pH 7.0, existe un 29% de

actividad que se pierde únicamente por incubarse en la solución amortiguadora de fosfatos en las condiciones antes descritas. Estos resultados sugieren que la actividad encontrada en la resina después de los intentos por separarla pudiera deberse a la inactivación que sufre la enzima por el simple hecho de diluirse en la solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M a los diferentes pHs (Voget y col., 1994).

| Actividad de lactasa antes y después de disolver la enzima en cada pH | | | |
|---|-------------|---------------------|--------------------|
| pH probado | U.E. inicio | U.E. después de 1 h | Actividad Residual |
| pH 3 | 0 | 0 | 0 |
| pH 4 | 0 | 0 | 0 |
| pH 5 | 2.2 | 0 | 0 |
| pH 6 | 11.2 | 0 | 0 |
| pH 7 | 23 | 16.2 | 71% |
| pH 8 | 28.5 | 14.4 | 51% |
| pH 9 | 9.3 | 0.21 | 2.2% |
| pH 10 | 4.7 | 0 | 0 |

Tabla 14. Efecto del pH en la actividad de la lactasa antes y después de incubarse en cada una de las soluciones reguladoras con distinto pH. Todas las actividades se determinaron a pH 7.0 y 37 °C usando ONPG como sustrato.

Dickson y col., (1979) estudiando el pH óptimo para la actividad de la β -galactosidasa de *K. lactis* encontraron que en solución amortiguadora de fosfatos la enzima tiene un pH óptimo entre 7.0 y 7.5, con un máximo de 7.25; además se reporta que la actividad cae rápidamente debajo de pH 6.9 y encima de 7.5. Por otra parte, Tello-Solís y col. (2005), trabajando con la lactasa de *Kluyveromyces lactis*, reportaron que a pH por debajo de 5.5 y por arriba de 8.5 existe agregación de la proteína, lo que indica cambios conformacionales de la enzima, lo cual se reflejó como pérdida en la actividad enzimática; además, ellos reportan que el pH óptimo de la lactasa fue de 7.5. Esto nos sugiere que el pH desestabiliza a la lactasa debido a cambios conformacionales y por otra parte, que al interactuar con la BSA, este cambio conformacional es menor debido a que la BSA estabiliza a la enzima en contra de los efectos causados por el pH.

Más aún, Cavaille y Combes (1995) trabajando con el Maxilact LX5000 encontraron que la vida media de la enzima diluída en solución reguladora de fosfatos fue de 146 minutos a 40 °C, y sobre todo al hacer las mismas mediciones pero en agua desionizada (sin iones Mg^{2+} , K^{+}), ésta fue de 3.7 y 1.6 minutos respectivamente, lo que indica que esta enzima es muy inestable y entre otros factores depende de las condiciones en las que se trabaje y por consiguiente, los resultados en cuanto a la activación que se observaron están influenciados por este fenómeno.

De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 15, al comparar la actividad residual obtenida entre la actividad inicial medida a pH 7.0 y las soluciones reguladoras de distinto pH (pH 3 a 10) en donde se incubó la lactasa 1 hora a temperatura ambiente, claramente se puede apreciar un fuerte efecto desactivador sobre la lactasa con todas las soluciones reguladoras; incluso, este efecto se observó en la solución reguladora de pH 7.0, pH en donde se midió la actividad inicial, esta pérdida en la actividad de la enzima, se puede deber al efecto mismo del pH. Por otra parte, al recircular una solución de ONPG 0.034 M a través de la resina para determinar actividad, en donde se intentó desorber a la lactasa con las mismas soluciones reguladoras de distinto pH (pH 3 a 10), se observó que también hubo una pérdida en la actividad de lactasa; sin embargo, una parte de la actividad se logra retener en la resina y muy probablemente se debe a la presencia de la BSA inmovilizada. La actividad residual en la resina se calculó tomando como referencia la actividad que originalmente se obtuvo después de la cromatografía de afinidad (0.074 U.E.) y la actividad que se midió al recircular el substrato (ONPG) a través de la misma.

| Actividad residual (%) después de incubar 1 hora a la lactasa en diferentes pHs | | |
|--|--------------------|---------------------|
| pH | En solución | En la resina |
| pH 3 | 0 | 28% |
| pH 4 | 0 | 28% |
| pH 5 | 0 | 20% |
| pH 6 | 0 | 28% |
| pH 7 | 70% | 47% |
| pH 8 | 51% | 55% |
| pH 9 | 2.2% | 47% |
| pH 10 | 0 | 56% |

Tabla 15. Comparación de actividad residual de la lactasa incubada en diferentes soluciones reguladoras tanto en solución como en el Eupergit®. Todas las mediciones se hicieron a pH 7.0 y 37 °C usando ONPG como sustrato.

Para evaluar el papel protector que desempeña la BSA contra los efectos del pH en solución, se incubó la lactasa en cada una de las soluciones reguladoras (pH 3 a 10) en presencia de BSA, la concentración en los medios de incubación fue de 0.3 mg/mL (tabla 16), esta concentración se estableció en base a la cantidad de BSA presente en la leche.

Una vez que se adicionaron las soluciones de lactasa y BSA, respectivamente, en las soluciones reguladoras con diferente pH, inmediatamente se determinó la actividad (U.E. inicio) usando como sustrato una solución de ONPG 0.034 M que previamente se atemperó a las condiciones óptimas de la enzima, 37 °C y pH 7.0.

Después de 1 hora a temperatura ambiente y con agitación constante, se tomó un volumen de muestra de cada una de las mezclas de reacción y se les midió actividad de lactasa con las condiciones óptimas de la enzima, 37 °C y pH 7.0 (tabla 16).

| Actividad de lactasa incubando la enzima en soluciones con diferente pH y en presencia de 0.3 mg_{BSA} / mL | | | |
|--|-------------------|----------------------------|-------------------------------|
| pH | U.E.inicio | U.E. después de 1 h | Actividad residual (%) |
| pH 3 | 0 | 0 | 0 |
| pH 4 | 29 | 0 | 0 |
| pH 5 | 173 | 60 | 35 |
| pH 6 | 297 | 252 | 85 |
| pH 7 | 447 | 457* | 100 |
| pH 8 | 425 | 407 | 96 |
| pH 9 | 421 | 331 | 79 |
| pH 10 | 247 | 145 | 59 |

Tabla 16. Efecto del pH en la actividad de la lactasa. Todas las mezclas de reacción se prepararon con 0.3 mg_{BSA} / mL Las determinaciones de actividad, tanto al inicio como después de 1 hora, se hicieron a pH 7.0 usando ONPG como substrato *Diferencia no significativa ($\alpha < 0.05$) con respecto a la U.E: al inicio.

Como se puede apreciar en los resultados de la tabla 16, la BSA juega un papel estabilizador importante en la lactasa en contra de los efectos causados por el pH. A pH 3.0 no fue posible observar actividad al inicio, lo que indica que a este valor extremo de acidez la enzima se desactiva completamente, aún en presencia de BSA. A pH 4.0 fue posible observar actividad al inicio pero después de incubarse 1 hora la actividad se perdió completamente. A partir de pH 5, es en donde se aprecia un efecto estabilizador de la BSA, ya que después de que se incubó la lactasa con la BSA durante 1 hora se retuvieron 60 U.E. que equivale a 35% de la actividad residual. Entre los pH de 6.0 a pH 9.0 el efecto estabilizador de la BSA se vuelve más apreciable, ya que en todos los casos la actividad residual se mantuvo entre 80 y 100 %. En su pH óptimo (pH 7.0), la actividad se conservó al 100 %, lo que sugiere por una parte, que la BSA se une de alguna forma a la enzima para evitar que la proteína sufra cambios conformacionales que provocan que la actividad no se pierda, y por otro lado, se comprueba nuevamente que los cambios sufridos por los valores de pH más alcalinos son menos agresivos en contra de la desactivación que los pH ácidos.

Finalmente, para establecer cual es el efecto que desempeña la BSA sobre la lactasa tanto en la resina como en solución después de interactuar a distintos pHs se hizo una tabla (tabla 17) en donde se muestra el perfil de actividad residual en cada uno de los sistemas que

se utilizó en nuestro estudio. Claramente se puede apreciar que la BSA tanto en solución como en la resina realiza un papel protector importante ya que parte de la actividad residual se logra recuperar después de que la enzima se somete a pHs en donde la enzima ya no es activa en un sistema sin BSA.

| Comparación de actividad residual retenida (%) | | | |
|---|----------------------------|----------------------------|--|
| pH | En solución sin BSA | En solución con BSA | En la resina con BSA_{inmovilizada} |
| pH 3 | 0 | 0 | 28 |
| pH 4 | 0 | 0 | 28 |
| pH 5 | 0 | 35 | 20 |
| pH 6 | 0 | 85 | 28 |
| pH 7 | 70 | 100 | 47 |
| pH 8 | 51 | 96 | 55 |
| pH 9 | 2 | 79 | 47 |
| pH 10 | 0 | 59 | 56 |

Tabla 17. Efecto de la BSA en la estabilidad de la lactasa en tres sistemas distintos a diferentes pHs. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado

Concluyendo, la enzima tuvo una actividad muy baja a pH ácido (pH 3, 4 y 5) y pHs alcalinos (pH 9 y 10). Esto se debe principalmente al hecho de que el punto isoeléctrico reportado de la enzima es 5.42 (Zhou y Chen, 2001). De acuerdo a estos autores, la β -galactosidasa tiene en su sitio activo grupos carboxilos protonados y ionizados, por lo que existe una dependencia entre la carga de la enzima y los cambios en el pH del medio de reacción. Tello-Solís y col. (2007), trabajando con la misma β -galactosidasa que en nuestro estudio, reportaron que el comportamiento de la actividad de lactasa en relación al pH varía de dos formas; en primer lugar, la acidez, probada con pHs por debajo de 7.0 (pHs de 5.5 a 6.5), la lactasa sufre cambios conformacionales locales, los cuales no fue posible detectar por dicroísmo circular; pero ocasionaron que la actividad cayera rápidamente; en segundo lugar, en presencia de pHs (7.5 a 8.0), los cambios estructurales incrementaron el contenido de estructura α -hélice, lo que favoreció la interacción del substrato con la enzima, por otra parte

también reportan que a pH 8.5 se presentó agregación de la enzima y la actividad se pierde, lo que pudiera explicar porque la actividad cuando se probaron los pHs 8, 9 y 10 la actividad disminuye significativamente o incluso se pierde.

Kim y col. (1997) reportan que la actividad de la lactasa medida con ONPG depende del pH debido a la influencia de iones divalentes (Mg^{2+}) y sugieren que el grupo activo de la enzima se encuentra protonado a diferentes pHs.

Chang y Mahoney (1995) estudiando la termoestabilidad de la lactasa de *Streptococcus thermophilus* encontraron que la BSA estabilizó a la lactasa uniéndose a las subunidades de la enzima formadas durante el calentamiento. Sin embargo, a pesar de que en este estudio no se propone ningún mecanismo de **interacción** ó **estabilización**, es importante señalar que reportaron una relación entre la vida media de la enzima y la hidrofobicidad superficial, ya que el calentamiento de la enzima y la BSA juntas causó una pérdida en la hidrofobicidad superficial, ya que cuando se midió el efecto del calentamiento en la hidrofobicidad superficial relativa de la lactasa y la BSA, la BSA perdió 25% midiendo la intensidad de fluorescencia relativa; además, cuando la BSA y la lactasa se mezclaron sin calentar, la hidrofobicidad superficial de la mezcla fue principalmente equivalente a la suma de las hidrofobicidades de las dos proteína. Sin embargo, después de calentar, la hidrofobicidad superficial de la mezcla (BSA + lactasa) fue esencialmente la equivalente a la que dio la BSA solamente y fue significativamente menor que la suma de los dos componentes. Esto indica que las superficies hidrofóbicas en la lactasa parcialmente desnaturalizada interactuó con la BSA. Por otro lado, Chang y Mahoney (1995) obtuvieron correlaciones significantes entre la estabilidad y los valores de hidrofobicidad superficial, sugiriendo que la estabilización ocurre a través de interacciones hidrofóbicas. Más aún, Chothia y Janin (1975) demostraron que una interacción específica requiere no solo de áreas hidrofóbicas en la superficie de las proteínas, si no que además, las superficies deben ser complementarias una con otra. La complementariedad en las superficies permite la formación de puentes de hidrógeno de la misma forma como las proteínas se unen con el agua.

7.6 Efecto de la ovoalbúmina en la actividad de la β -galactosidasa

Para comparar el efecto activador de la BSA se probó con una proteína de origen no lácteo, la ovoalbúmina (OVA), cuya masa molecular es de 45 kDa y $pI = 4.5$. Se determinó el efecto activador en solución en la lactasa de *K. lactis*. Se probaron concentraciones de OVA que iban de 1 a 10 $\text{mg}_{\text{proteína}} / \text{mL}$ (Figura 15). La concentración de lactasa empleada fue la misma que se utilizó en las mediciones con la seroalbúmina, una dilución del Maxilact LX5000 1:1000 en solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0.

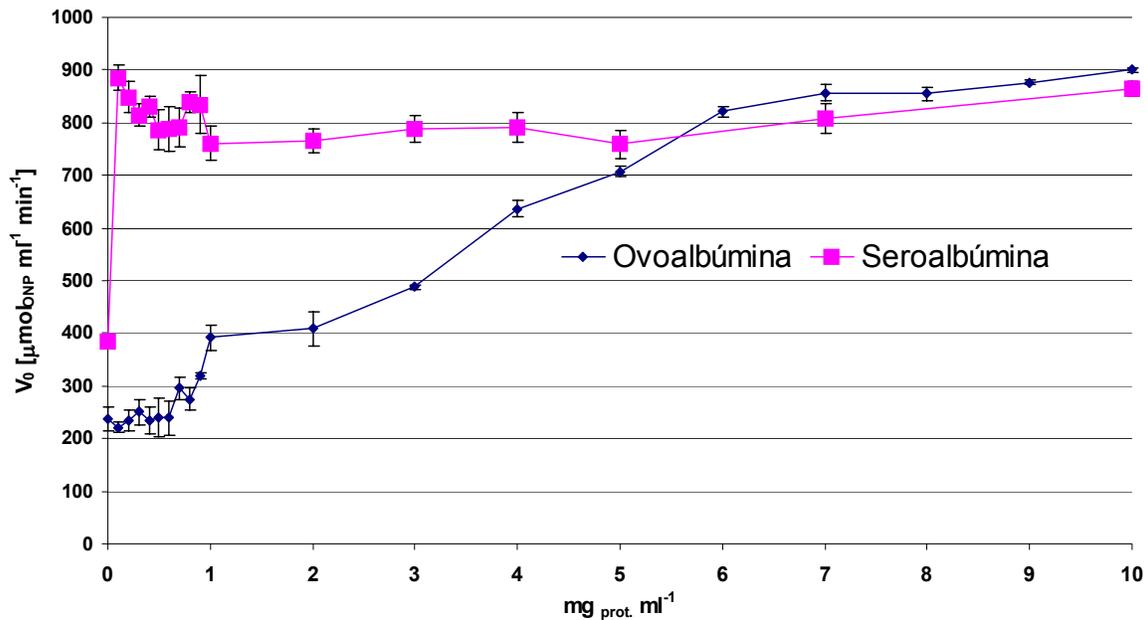


Figura 15. Efecto de la ovoalbúmina (OVA) en la actividad de la lactasa; probando concentraciones de 1 a 10 $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{mL}$ a pH 7.0, la línea superior muestra la actividad por efecto de la seroalbúmina (BSA) y la inferior el efecto de la OVA en la actividad de la lactasa. En ambos casos se determinó actividad por hidrólisis de ONPG a 37 °C, pH 7.0. Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

Como se puede apreciar en la figura 15, la OVA tiene un mecanismo de activación diferente respecto a la activación por BSA, mientras que en el caso de la primera el efecto está directamente relacionado con la concentración de proteína empleada, en la segunda no hubo diferencia significativa ($\alpha > 0.05$) en las concentraciones de proteína probadas. En ambos casos la concentración de lactasa fue constante para todas las concentraciones de OVA utilizadas: una dilución de Maxilact LX5000 (1:1000) preparada en solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH, 7.0. La actividad presentada en presencia de OVA sugiere que se llega a la saturación cuando se probó concentraciones arriba de 6 mg/mL . Sin embargo, se probaron

concentraciones menores a 1 mg/mL para tener un análisis más detallado acerca del efecto de la OVA en la actividad de la lactasa.

Se prepararon soluciones de OVA de 0.1 a 1 mg/mL en solución reguladora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 (figura 16). Como sustrato se utilizó una solución de ONPG 0.034M, pH 7.0, la actividad se determinó a 37 °C directamente en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm. El efecto activador de la OVA sobre la lactasa se presentó a partir de 0.7 mg/mL, este aumento en la actividad fue significativamente mayor ($\alpha = 0.000289$) con respecto a la actividad medida en la solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 (0 mg_{OVA}/mL).

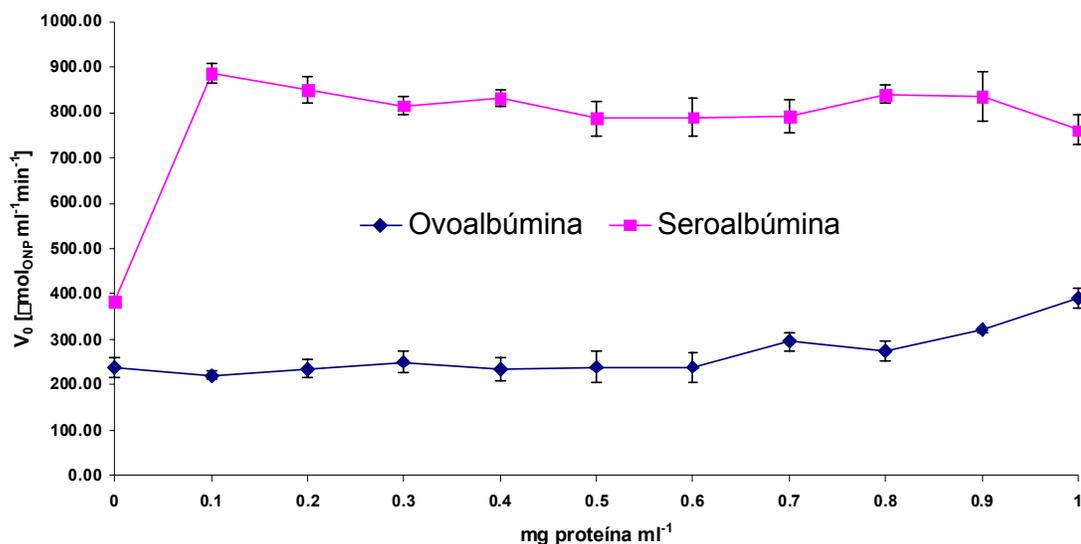


Figura 16. Actividad de lactasa en presencia de OVA y BSA con concentraciones de proteína de 0.1 a 1 mg/mL. Todas las determinaciones se llevaron a 37 °C cabo por triplicado usando ONPG como sustrato.

Mahoney y Adamchuk (1980), también probaron a la OVA en la activación de la lactasa; en una concentración de 5 mg/mL de proteína la actividad relativa fue 410 % mayor con respecto a la actividad medida en solución reguladora sin proteína; sin embargo, no dan mayor explicación acerca de la concentración probada y tampoco proponen ningún mecanismo que explique el aumento en la actividad. Además, en este mismo estudio no se da ninguna explicación de porque se prueba esa concentración de proteína y tampoco se hace ningún otro tipo de análisis con respecto a las características de ambas proteínas. Por otra parte el aumento en la actividad en presencia de OVA sugiere que la activación puede ser un efecto debido a la interacción específica con la lactasa a través de grupos específicos en la superficies de ambas proteínas, que pueden ir desde interacciones hidrofóbicas, hasta interacciones más

específicas (unión covalente). Sin embargo, esto requiere de estudios más profundos para deducir el tipo de interacción que se presenta entre ambas proteínas. Además, se requiere de un conocimiento estructural más detallado de este tipo de proteínas (globulares) ya que en cuanto a la estabilidad de las proteínas se sabe que las diversas influencias no covalentes a las que se hallan sometidas las proteínas –interacciones electrostáticas (tanto de atracción como de repulsión), enlaces por puentes de hidrógeno (los intramoleculares y con el agua) y las fuerzas hidrofóbicas- poseen cada una magnitudes de energía que pueden alcanzar hasta millares de kilojoules por mol en el conjunto de una molécula de proteína.

8. CONCLUSIONES

Como resultado de la investigación realizada se ha llegado a las siguientes conclusiones:

La BSA tuvo un fuerte efecto activador sobre la lactasa de *Kluyveromyces lactis*.

Existe una afinidad específica entre la BSA y la lactasa la cual se comprobó a través de la cromatografía de afinidad y ésta pudiera ser una forma por la cual se da dicha activación.

La actividad enzimática es dependiente de la conformación nativa de la enzima, por lo tanto, la lactasa tiene su máxima actividad en torno a un pH de 7.0 en la reacción de hidrólisis con ONPG. A valores de pH entre 4 y 9 la BSA protege a la lactasa de la desnaturalización y por consiguiente evita la pérdida de su actividad catalítica interactuando en la superficie de la enzima y evitando cambios conformacionales de la lactasa. Además, se comprobó que la lactasa de *Kluyveromyces lactis* resulta muy inestable, ya que cuando se diluyó en solución reguladora de fosfatos 0.05 M a pH 7.0, después de 1 hora a temperatura ambiente, la lactasa perdió el 30% de su actividad inicial.

El aumento de la actividad enzimática con respecto a la de OVA sugiere que está directamente relacionada con la concentración de proteína usada. Los mecanismos de activación de la BSA y la OVA son distintos, mientras que para la BSA el mecanismo podría deberse a un efecto de estabilización, con la OVA el mecanismo por el cual se da el aumento en la actividad es dependiente de la concentración, por lo tanto, sugiere un efecto distinto a la sola estabilización de la enzima. Un tipo de interacción responsable del acoplamiento proteína-proteína para desempeñar funciones específicas es a través de interacciones hidrofóbicas; sin embargo, debe tenerse presente que en el enlace hidrofóbico no se origina a través de interacciones específicas como las que habitualmente se asocian al término “enlace”.

9. PERSPECTIVAS

En esta investigación se demostró el efecto activador que tiene la BSA sobre la lactasa; sin embargo, debido a la complejidad y a la variedad de los efectos que se presentan solamente se exploraron con más detalle el efecto particular de la BSA. Es por ella que un análisis utilizando técnicas más sensibles para estudiar el mismo efecto a través de dicroísmo circular determinado posibles cambios estructurales que se presenten y el tipo de interacciones que se establecen entre la enzima y la proteína.

Además podría utilizarse la electroforesis nativa junto con la filtración en gel, para determinar las masas moleculares de los péptidos que se forman cuando interactúan la BSA y la OVA con la β -galactosidasa.

Por otra parte, se podría estudiar el papel que desempeñan los grupos amino en la BSA y la OVA para descartar la posibilidad de que la interacción sea a través de este tipo de mecanismo ya sea lactosilando o bloqueando los grupos amino más expuestos en ambas proteínas.

Finalmente, se podría determinar que otros componentes están presentes en las mezcla de reacción, es decir, determinar a través de espectrofotometría de masas o infrarojo que tipos de compuestos están presentes en las proteínas utilizadas y descartar que estos no sean responsables del efecto activador, tales como, iones o algunos otros metales que pudieran activar a la lactasa.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Affinity Chromatography, Principles and Methods. 2001. *Pharmacia Biotechnology Boletín Técnico*.
- Alais, C., (1991) Cap. VI. Prótidos, caseína y fenómeno de la coagulación en ciencia de la leche, principios de Técnica lechera, edit. CECSA, México, D.F.
- Astiasarán-Anchía, I., Martínez-Hernández, A. (1999). Alimentos: Composición y Propiedades. McGraw-Hill Interamericana. España, pág(s) 75-90.
- Ayala, A., Parrado, J., Machado, A. (1998). Use of Rotofor Preparative Isoelectrofocusing Cell in Protein Purification Procedure. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 69: 11-16.
- Basch, J.J., Douglass, F.W.Jr., Prochino, L.G., Holsinger, V.H., and Farrell, H.M.Jr. (1985). Quantitation of caseins and whey proteins of processed milks and whey proteins of processed milks and proteins concentrates, application of gel electrophoresis, and comparison with Harland-Ashworth procedure. *Journal of Dairy Science* 68:23-31.
- Becerra, M., Cerdán, E., González-Siso, M.I. (1998) Micro-scale purification of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* reveals that dimeric and tetrameric forms are active. *Biotechnology Techniques*, 12(3): 253-256.
- Becerra, M., Baroli, B., Fadda, A.M., Blanco Méndez, J., González Siso, M.I. (2001). Lactose bioconversion by calcium-alginate immobilization of *Kluyveromyces lactis* cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 506-512.
- Bendedouch, D., Chen, S.H. (1983) Structure and Interparticle Interactions of Bovine Serum Albumin in solution Studied by Small-Angle Neutron Scattering. *Journal of Physical Chemistry*, 87: 1473-1477.
- Bos, O.J.M., Labro, J.F.A., Fischer, M.J.E., Witling, J., and Janssen, L.H.M. (1989) The molecular mechanism of the Neutral-to-Base Transition of Human Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 953-959.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brown, J.R. (1975) Structure of Bovine Serum Albumin. *Fed. Proc. Am. Soc. Exp. Biol.* 34; 591.
- Brown, J.R. y Shockley, P. (1982). In “Lipid-Protein Interactions” (Editores: Jost, P., Griffith, O.H.), Vol 1, pp. 25-68, Wiley, New York.
- Carter, D.C. y Ho, J.X. (1994) Structure of Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45; 153-203.
- Castillo, F.J. (1990). Lactose metabolism by yeast. Editores: Verachtert, H. and De Mot, R. *Yeast biotechnology and biocatalysis*. New York: Marcel Dekker, pp. 297-320.
- Cavaille, D. y Combes, D. (1995) Characterization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Applied Biochemistry*. 22: 55-64.
- Chang, B.S. y Mahoney, R.R. (1989) Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*. *Journal of Dairy Research*, 56:117-127.
- Chang, B.S. y Mahoney, R.R. (1995) Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: evidence for hydrophobic interactions. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 22, 203-214.
- Chothia, C. y Janin, J. (1975) Principles of protein-protein recognition. *Nature* 256, 705-708.
- de Wit, J.N. (1998) Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science*, 81:597-608.
- Dickson, R., Dickson, L., y Markin, J. (1979) Purification and Properties of an Inducible β -Galactosidase Isolated from the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Bacteriology*, 137 (1): 51-61.
- Donald, J. W. (2001). Quantitative affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (49): 99-121.

- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F. and Swaisgood, H.E. (2004). Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*, 87:1641-1674.
- Feng, L., Hu, C.Z., Andrade, J.D. (1988). Scanning Tunneling microscopic Images of Adsorbed Serum Albumin on Highly Oriented Pyrolytic Graphite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 126: 650-653.
- Foster, J.F. (1977) In Albumin Structure, Function and Uses (Editores: Rosenoer, V.M., Oratz, M. and Rothschild, M.A.) pp. 53-84. Pergamon, Oxford.
- Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (1998) Dairy Chemistry and Biochemistry. First edition, editores Blackie Academic and Professional Press, Chapman and Hall.
- García-Garibay, M. y Gómez-Ruiz, L. (1996). Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos. *Revista de Investigación Clínica.*, 48 (supl.) 51-61.
- García-Garibay, M., Revah, S., Gómez.Ruiz, L. (1993). Productos lácteos en Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa, México, pág(s) 153-223.
- Greenberg, N.A. y Mahoney, R.R. (1982). Production and Characterization of β -Galactosidase from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Food Science*, 47: 1824-1835.
- Greenberg, N.A.; Wilder, T.; Mahoney, R.R. (1985). Studies on the termoestabilidad (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey. *Journal of Dairy Research*, 52, 439-449.
- He, X.M. y Carter, D.C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358: 209-214.
- Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., and Fukuhara, K. I. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and FRIT-FAB LC/MS. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 173, 639-646.
- Hughes, W.L. (1954). In "The Proteins" (Editores: Neurath, H. and Biley, K.), Vol. 2b, pp. 663-755. Academic Press, New York.

- Jiménez-Guzmán, J. (2003). Influencia de las proteínas de leche y su tratamiento térmico en la actividad de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G.M., López-Munguía, A., Gómez-Ruiz, L. García-Garibay, M. (2006). Interaction between β -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. *International Dairy Journal*, (16):1169-1173.
- Jiménez-Pérez, S., Morales, F.J., Romero, C. 2000. "Characterization of industrial processed milk by analysis of heat induced changes". *International Journal of Food Science and Technology*; 35 (2): 193-200.
- Jurado, E., Camacho, F., Luzón, G., Vicaria, J.M. (2004). Kinetic models of activity for β -galactosidasas: influence of pH, ionic concentration and temperature. *Enzyme and Microbial Technology*, 34: 33-40.
- Kim, S.H., Lim, K.P., Kim, H.S. (1997) Differences in the Hydrolysis of Lactose and Other Substrates by β -D-Galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Dairy Science*, 80:2264-2269.
- Ladero, M., Santos, A., García-Ochoa, F. (2000) Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 27: 583-592.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.
- Mahoney, R.R. y Adamchuk, C. (1980) Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis*, *Journal of Food Science*. 45: 962-964.
- Mahoney, R.R. y Wilder, T. (1989). Stabilization of Lactase (*Escherichia coli*) by Milk Components and Related Components. *Journal of Food Science* 54(4) 899-901.
- Mahoney, R.R. y Whitaker J.R. (1978) Purification and Physicochemical properties of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Journal of Food Science*, 43: 584-591.

- Morrisey, P.A., Mulvihill, D.M., and O'neill, E.M. (1991) In developments in Food Proteins-5. Editor B.J.F. Hudson. Elsevier Applied Science, London, p.195.
- Nijpels, H.H. (1981) Lactases and their applications, in: Editores Birch, G.G., Blakebrough, H., Parker, K.J., Enzyme and Food Processing, Applied Science Publishers, London, pp. 89–104.
- Nizizawa, K. y Hashimoto, Y. in: W. Pigman, (Ed.), The Carbohydrates, Academic Press, New York, 1970, p. 241.
- Patterson, J.E., Geller, D.M. (1977). Bovine microsomal albumin: Amino terminal sequence of bovine proalbumin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 74:1220-1226.
- Peters, T., Jr. (1985). Serum Albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 37: 161-245.
- Peters, T., Jr. y Hawn, C. (1967). Isolation of Two Large Peptide Fragments from the Amino-and-Carboxyl-terminal Positions of Bovine Serum Albumin. *Journal of Biological Chemistry*; 242: 1566-1573.
- Pedersen, K. O. y Jacobsen, J. (1980). Reactivity of the Thiol Group in Human and Bovine Albumin at pH 3-9, as measured by Exchange with 2,2'-Dithiodipyridine. *European Journal of Biochemistry*,106; 291-295.
- Presnosil, J.P., Stuker, E., Borne, J.R. (1987) Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose. Part I. State of art, *Biotechnology and Bioengineering*, 30: 1019-1025.
- Reed, R.G., Putnam, F.W., Peters, T. Jr. (1980). Sequence of residues 400-403 of bovine serum albumin. *Biochemical Journal*, 191: 867-868.
- Riel, R. (1991), Cap. 1: Composición y estructura de la leche, Ciencia y Tecnología de la leche, Editor Amiot, J., Edit. Acribia, Zaragoza, España.
- Rosenoer, V.M., Oratz, M., Rothschild, M.A. (1977). Albumin, Structure Function and Uses. Pergamon Press, Oxford.
- Santos, A., Ladero, M., García-Ochoa, F. (1998). Kinetic modeling of lactose hydrolysis by a β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 22: 558-567.

- Sawyer, L., Kontopidis, G., Wu, S. (1999). β -Lactoglobulin a three-dimensional perspective. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 409-418.
- Schimdt, R.H. y Morris, H.A. (1984). Gelation properties of milk proteins, soy proteins and blended proteins systems, *Food Technology*, 38: 85-93.
- Scrimshaw, N.S. y Murray, E.B. (1988). The acceptability of milk and milk products in populations with high prevalence of lactose intolerance. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48: 1083-1159.
- Squire, P.G., Moser, P., and O’Konski, C.T. (1968). The hydrodynamic Properties of Bovine Serum Albumin monomer and Dimer. *Biochemistry*, 7:4261-4272.
- Tello-Solís, S.R., Jiménez-Guzmán, J., Sarabia-Leos, C., Gómez-Ruíz, L., Cruz-Guerrero, A.E., Rodríguez-Serrano, G.M. y García-Garibay M. (2005). Determination of secondary structure of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase by circular dichroism and its structure-activity relationship as a function of the pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (26), 10200 -10204.
- The American Gastroenterological Association home (2000) internet page: www.gastro.org/lactose.html
- Terrés-Speziale, A.M. y Casas-Torres, L. (2002). Enfermedad diarreica e intolerancia a la lactosa en México. *Revista Médica IMSS*; 40 (4):329-341.
- Voget, C.E., Flores, M.V., Faloci, M.M., Ertola, R.J.J. (1994). Effects of the Ionic Environment on the Stability of *Kluyveromyces lactis* β -galactosidase. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie-Food Science and Technology*, 27: 324-330.
- Wallenfels, K y Malhorta, O.P. (1960). Beta-galactosidase, in: P.D. Boyer (Ed.), *The Enzymes*, Academic Press, New York.
- Walstra P. y Jenness, R. (1987). *Química y Física lactológica*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, pág(s) 24-30, 90-100.
- Walstra, P., Geurts, T.J., Normen, A., Jellema, A., van Boekel, M. (2001). *Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos*. Ed. Acribia, S.A. España, pág(s) 39-50, 80-130.

- Wright, A.K., y Thompson, M.R. (1975). Hydrodynamic structure of Bovine Serum Albumin Determined by Transient Electric Birefringence. *Biophysical Journal*, 15: 137-141.
- Zhou, Q.Z.K. y Chen, X.D. (2001). Effects of temperature and pH on the catalytic activity of the immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemical Engineering Journal*, 9: 33–40.

Iztapalapa, D.F., a 23 de noviembre de 2007

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

**Efecto de la seroalbúmina de leche en la actividad de la β -galactosidasa de
*Kluyveromyces lactis***

Que presentó

Christian Emmanuel Sarabia Leos

Miembros del Comité Tutorial:

Director: Dr. Mariano García-Garibay
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Asesor: Dr. Agustín López Murguía Canales
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería,
Instituto de Biotecnología, UNAM

Asesor: M. en C. Lorena Gómez-Ruiz
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Jurado:

Presidenta: Dra. Edith Ponce Alquicira
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Secretaria: Dra. Aracelia Tomasini Campocoso
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa

Vocal: Dr. Salvador Ramón Tello Solís
Departamento de Química, UAM-Iztapalapa

Vocal: Dra. Lilia Arely Prado Barragán
Departamento de Biotecnología, UAM-Iztapalapa





