

**UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
IZTAPALAPA**

CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO DE LA
LECHE SOBRE LA ACTIVIDAD DE LACTASA**

TESIS

Que para obtener el grado académico de:

**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOTECNOLOGIA)**



**COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA**

Presenta:

Judith Jiménez Guzmán

JURADO:

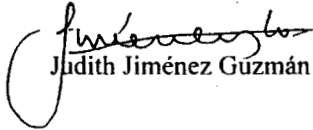
222256

Presidente: Dr. Agustín López-Munguía Canales
Vocal: M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz
Vocal: Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano
Vocal: M. en C. Alma Elizabeth Cruz Guerrero
Secretario: M. en C. José Mariano García Garibay

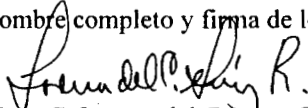
Sitio donde se desarrolló el tema:


DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

Nombre completo y firma del sustentante:


Judith Jiménez Guzmán

Nombre completo y firma de los asesores del tema:


M. en C. Lorena del Carmen Gómez Ruíz


M. en C. José Mariano García Garibay

A mis padres,

Con todo mi amor y agradecimiento.

Gracias por el ejemplo!

A mi familia,

Con amor, por su paciencia y apoyo

A Lorena y Mariano,

**Que han sabido ser mucho más que maestros: Amigos.
Con sincero agradecimiento.**

A mis compañeros del laboratorio,

Gracias por su apoyo y amistad

INDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCION	4
3. GENERALIDADES	7
3.1 Proteínas de la leche	8
3.2. Lactosa	13
3.3. Calcio	14
3.4. Cambios producidos en la leche por el tratamiento térmico	15
4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	18
4.1. Características de las β -galactosidasas	18
4.2. Efecto del tratamiento térmico del medio (leche, suero, o solución amortiguadora) sobre la actividad de lactasa.	19
4.2. Efecto de las proteínas sobre la actividad de lactasa	23
4.3. Efecto de los iones sobre sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa	24
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo General	26
5.2 Objetivos Particulares	26
6. METODOLOGÍA	27
6.1. Determinación de lactosa en leche	27
6.2. Determinación de actividad enzimática	29
6.3. Determinación de la proteína presente en las muestras	31
6.4. Determinación de grupos sulfhidrilo en el suero de leche	32
6.5. Evaluación del efecto de la temperatura del tratamiento térmico de la leche en la actividad de la β -galactosidasa	32
6.6. Determinación del efecto del calcio sobre la actividad de la enzima lactasa	33
6.7. Obtención del suero	33
6.8. Determinación del efecto del tratamiento térmico de las proteínas del suero en la actividad de la β -galactosidasa	33
6.9. Evaluación del grado de desnaturalización de las proteínas del suero por efecto del tratamiento térmico	34
6.10. Evaluación del efecto de grupos sulfhidrilo exógenos en el suero	36
6.11. Determinación del efecto del aumento de grupos sulfhidrilo en una solución amortiguadora sobre la actividad enzimática	37

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
7.1 Seguimiento de la cinética de la reacción de lactasa en leche bronca a 37 °C	38
7.2. Efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactasa	40
7.3. Efecto del calcio en la tasa de actividad de la enzima β -galactosidasa	44
7.4. Desnaturalización de las proteínas del suero por el tratamiento térmico	46
7.5. Efecto del tratamiento térmico del suero sobre la actividad de lactasa.	52
7.6. Efecto del tratamiento térmico del suero en el contenido de grupos sulfhidrilo reactivos	54
7.7. Efecto de la adición de grupos sulfhidrilo exógenos al suero	58
8. CONCLUSIONES	62
9. REFERENCIAS	64

1. RESUMEN

Algunos autores reportan que al precalentar leche y suero se induce un aumento en la actividad de β -galactosidasas neutras, aunque otros reportan no haberlo encontrado. El objetivo de este trabajo fue demostrar si existe algún efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactasa de *Kluyveromyces lactis*, e identificar los cambios en la leche responsables de tal efecto. Se dieron diferentes pretratamientos a leche y suero antes de hidrolizarlos a 37 °C, encontrándose un máximo de actividad entre 55 y 65 °C. Arriba de 75 °C la actividad disminuyó, aunque en todos los casos fue mayor que en el control. En suero la actividad disminuyó en leche entre 55 y 75 °C; a 85 °C aumentó significativamente. Dado que el calcio ha sido reportado como un ión inhibidor de la enzima, se evaluó la posibilidad de que la disminución del calcio por precipitación fuera la causa del cambio en la actividad enzimática. Por medio de patrones electroforéticos se demostró que la desnaturalización y/o precipitación de algunas proteínas está relacionada con el cambio en la actividad, sugiriendo que algunas proteínas desnaturalizadas son responsables del efecto. Además, se demostró que el aumento en la exposición de grupos sulfhidrilo reactivos debido a la desnaturalización de algunas proteínas del suero era responsable del aumento en la actividad, encontrándose un alto coeficiente de correlación (0.91) entre los grupos sulfhidrilo reactivos después de los tratamientos térmicos, y la tasa de actividad de lactasa.

2. INTRODUCCION

La lactosa es el principal constituyente de los sólidos de la leche, sin embargo, su utilización está limitada porque algunas de sus características fisicoquímicas representan inconvenientes para su consumo y transformación.

La lactosa es un disacárido que no puede asimilarse en su forma natural, es necesario hidrolizarla para poder asimilar los monómeros que se generan: glucosa y galactosa. La capacidad de producir la β -galactosidasa, enzima que lleva a cabo esta hidrólisis en el intestino delgado, se pierde a medida que el individuo crece, y cuando llega a la edad adulta es probable que haya perdido parcial o totalmente la actividad lactásica de su intestino. Esto provocará que cuando consuma lactosa, ya sea en leche o sus derivados, se presenten cuadros de flatulencia, dolor abdominal y/o diarrea (López, y col., 1996).

A pesar de que un sujeto tenga deficiencias de lactasa, los síntomas pueden o no presentarse, dependiendo de diversos factores como la cantidad de lactosa ingerida, el vehículo en el que se ingirió, y la naturaleza de la flora bacteriana del intestino grueso. Se ha definido como malabsorbedores a aquellos individuos sanos que aunque no hidrolizan (y por tanto no asimilan) la lactosa, no presentan síntomas al ingerirla. A aquellos sujetos que sí presenten síntomas, aún con concentraciones bajas de lactosa se les denomina intolerantes (Holsinger y Kligerman 1991; López y col., 1996; Palma y col., 1996).

En México, aproximadamente el 33 % de los adultos son malabsorbedores, y entre el 20 y el 31 % son intolerantes (Rosado y col., 1994 a y b). De acuerdo con estos datos, la mitad de la población adulta tiene algún tipo de deficiencia lactásica, y por lo tanto dificultad para digerir o utilizar adecuadamente los nutrimentos de la leche fresca y sus derivados.

Aunado a eso, en algunos casos una persona tolerante puede llegar a perder temporalmente la actividad lactásica del intestino principalmente por enfermedades que afecten a las mucosas intestinales, como la diarrea, y volverse intolerante, esto se denomina deficiencia secundaria de lactasa. La deficiencia secundaria de lactasa acarrea problemas nutricionales,

principalmente cuando se presenta en niños, puesto que la leche es el principal componente de su dieta y en algunos casos el único (Vega Franco, 1996).

Además de las inconveniencias fisiológicas de la lactosa, ésta puede generar problemas tecnológicos al transformar la leche en sus derivados. En algunos productos lácteos edulcorados el disacárido tiende a precipitar por su baja solubilidad, formando grumos y arenosidades, pues además tiene alta tendencia a cristalizar (García-Garibay y col, 1993.).

La baja solubilidad de la lactosa, así como su falta de sabor dulce y tendencia a la cristalización limitan la cantidad de sólidos no grasos que puede usarse en helados, leches concentradas, algunos quesos fundidos, y muchos otros productos. La hidrólisis de la lactosa en sus dos monosacáridos por la acción de la enzima β -galactosidasa, puede ser una forma de resolver estos problemas.

La hidrólisis enzimática de la lactosa para la elaboración de productos deslactosados ha sido extensamente estudiada desde diversos puntos de vista, como las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimas, efecto de algunos componentes de la leche sobre su actividad, etc.), sus usos y las fuentes de donde pueden ser obtenidas (García-Garibay y Gómez Ruíz, 1996).

El conocimiento de los factores que afectan la tasa de reacción es necesario en el desarrollo de los procesos en que se utiliza la enzima, pues ayuda a evitar condiciones que puedan retardar la reacción, y finalmente controlar los tiempos necesarios para llegar a una hidrólisis determinada.

El efecto que el tratamiento térmico de la leche tiene sobre la actividad de la β -galactosidasa ha sido poco estudiado, y los reportes que existen presentan resultados controvertidos. En 1950 Van Dam y col. sugirieron que al tratar con calor los productos que contengan lactosa podría aumentar la tasa de actividad de la enzima, aunque no propusieron ninguna explicación para ello.

Más adelante, Wendorff y col. (1970) compararon la actividad encontrada en una solución de lactosa con aquella obtenida en leche y suero con y sin tratamiento térmico, y observaron que en la leche y suero la actividad aumentaba por el tratamiento térmico, mientras que en la solución de lactosa no, por lo que sugirieron que el efecto podía deberse a la desnaturalización de

algún inhibidor termolábil, o a la precipitación de calcio (que funciona como inhibidor de la enzima), o bien a algún cambio en la estructura de las proteínas.

Por otro lado, Kosikowski y Wierzbicki (1973) no observaron diferencias significativas entre la actividad observada en leche con y sin tratamiento térmico después de 24 h. a 4 °C, cabe mencionar que sus experimentos no se enfocaban al estudio del efecto del tratamiento térmico, y no siguió la cinética de la reacción. Algunos autores (Mahoney y Adamchuck, 1980; Greenberg y col., 1985) no observaron ningún efecto al precalentar la leche, aunque sí al precalentar el suero; además descartaron la hipótesis del inhibidor termolábil y estudiaron el efecto de calentar soluciones con proteínas de origen no-lácteo, y en ese caso también observaron un aumento en la actividad enzimática (Greenberb y Mahoney, 1983), sugiriendo que el cambio observado en suero podría explicarse por un cambio en las proteínas.

A la fecha no se ha establecido cual es el efecto del precalentamiento de la leche sobre la actividad enzimática, ni si está relacionado con cambios en la estructura de las proteínas, o con la precipitación del calcio en forma de fosfato de calcio coloidal.

El propósito de este trabajo es determinar cuál es el efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de la β -galactosidasa, así como estudiar qué cambio se da en la leche, debido al tratamiento térmico, que produzca tal efecto. Para ello se trabajará con base en dos hipótesis, que son:

a) La desnaturalización de las proteínas de la leche aumenta el número de grupos sulfhidrilo expuestos, y de esta manera la actividad hidrolítica de lactasa.

B) Dado que el calcio es un inhibidor de la β -galactosidasa, si éste reacciona formando fosfato de calcio durante el calentamiento, la actividad de la enzima aumentará.

3. GENERALIDADES

COMPOSICION QUIMICA DE LA LECHE

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

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

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

Para entender los cambios que se llevan a cabo en la leche, y sus repercusiones tanto en la estabilidad, como en la carga y poder de oxidoreducción del sistema es necesario conocer la química de sus componentes, que se describe a continuación.

3.1 Proteínas de la leche

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

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

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

3.1.1. Caseínas

Aunque inicialmente se pensaba que la caseína era una sola proteína, actualmente se sabe que en realidad comprende a un grupo de aproximadamente 20 proteínas fosforadas, siendo las principales caseína α_{s1} (PM 23,600 Da, 42 % de las caseínas), caseína α_{s2} (PM 25,500 Da, 11 %), β -caseína (PM 24,000 Da, 31 %) y la κ -caseína (PM 19,000 Da 11 %), que se encuentran en proporciones de 40:10:35:12 respectivamente, y se denominan caseínas primarias. El resto de las caseínas se denominan menores, por que se originan a partir de la ruptura o hidrólisis (principalmente enzimática, por la acción de algunas proteasas propias de la leche) de las caseínas primarias. Estos polipéptidos incluyen a las γ -caseínas (γ^1 , γ^2 y γ^3), a la caseína λ (PM 30,650 Da), que se deriva de la caseína α_{s1} ; y a las proteosomas peptonas, que

anteriormente se consideraban como proteínas del suero pues son solubles a pH 4.6, sin embargo, provienen de la hidrólisis de las β -caseínas y por ello ahora se les considera parte de la caseína. Se han encontrado por lo menos otros 30 péptidos que aún no han sido completamente caracterizados e identificados. Estas últimas se consideran caseínas minoritarias, y comprenden el 5% del total de las caseínas (Fox, 1989; Riel, 1991).

Además de la variabilidad en la estructura de estas proteínas, en las proteínas primarias se da la microheterogeneidad, que puede deberse a variaciones en el grado de fosforilación, glicosilación, uniones de disulfuro, polimerización de aminoácidos, etc, que alguna vez llevaron a pensar que eran proteínas diferentes. Actualmente se ha demostrado que estas son variaciones genéticamente controladas (Fox, 1989).

Por tener diferentes estructuras, no todas las proteínas que se cuentan entre las caseínas son igualmente sensibles a los diferentes componentes del medio, por ejemplo, las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β son sensibles al ión calcio (Ca^{2+}), que disminuye su solubilidad y consecuentemente precipitan en su presencia; en cambio, las caseínas κ y λ son insensibles al Ca^{2+} , y juegan un papel importante en la estabilización de la micela de caseína frente al Ca^{2+} (Riel, 1991; Schmidt y Morris, 1984).

Todas las caseínas contienen grupos prostéticos formados por ésteres fosfóricos de la serina, y en algunos casos de la treonina. La razón por la que estas proteínas presentan diferente sensibilidad hacia el ión Ca^{2+} es que contienen un número diferente de grupos fosfato en sus moléculas. Aquellas proteínas que contengan un gran número de residuos de fosfoserina, como las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β , tenderán a unirse a cationes polivalentes, principalmente Ca^{2+} , lo que conlleva a la neutralización de sus cargas, y como se dijo al inicio de este capítulo, son las cargas las que mantienen a las proteínas en suspensión, por lo que al neutralizarse precipitan.

Las caseínas α_{s1} y α_{s2} son las que contienen mayor número de grupos fosfato (8 o 9 P para α_{s1} y 10 a 13 P para α_{s2}). La variación en el número de grupos fosfato hizo que en alguna época se les considerara proteínas diferentes: la α_{s1} con 9 P se denominaba α_{s0} , y la α_{s2} podía ser α_{s3} , α_{s4} o α_{s6} si presentaba 11, 12, o 13 grupos P. Actualmente se les denomina $\alpha_{s1\ 9P}$, $\alpha_{s2\ 11P}$, $\alpha_{s2\ 12P}$, y $\alpha_{s2\ 13P}$. La β -caseína contiene 5 grupos fosfato, aunque también existen

variantes genéticas que presentan 4. La κ -caseína contiene solamente 1 grupo fosfato (sus variantes contienen 2 o 3), lo que la hace altamente estable frente al ión Ca^{2+} , y es por esto que se encuentra en la parte exterior de la micela de caseína (Fox, 1989).

En general, todas las caseínas tienen pocos grupos sulfhidrilo (aproximadamente $\frac{1}{2}$ cisteína por molécula), pero estos grupos no se encuentran libres, sino formando enlaces de disulfuro intramoleculares, o bien con otra proteína (que en leche fresca es generalmente alguna de las caseínas), al unirse dos moléculas cualesquiera de caseína forman otras proteínas, por ejemplo, la caseína α_{s5} se forma a partir de la unión de la α_{s2} con la α_{s3} (Schmidt, y Morris, 1984; Fox, 1989).

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

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

3.1.2. Micela de caseína

En la leche, las caseínas se asocian con el calcio, los fosfatos y otras especies iónicas para formar estructuras esféricas grandes (40 -300 nm de diámetro), altamente porosas y solvatadas, denominadas micelas. Estas micelas de caseína están en equilibrio con la porción soluble de la leche (el suero) (Fox, 1989; Schmidt y Morris, 1984).

Las caseínas son anfólitos, presentan simultáneamente funciones ácidas y básicas. Al pH normal de la leche (6.6 - 6.8) están del lado alcalino de su punto isoeléctrico, y en consecuencia se comportan como ácidos. Las principales fuerzas de las que depende la estabilidad de la micela de caseína son las cargas eléctricas y su grado de hidratación (Schmidt, y Morris, 1984).

Las micelas de caseína consisten básicamente de proteínas (94%) y algunos iones y sales (6%), estos son principalmente fosfato de calcio, magnesio y citrato, y en conjunto se les denomina fosfato de calcio coloidal (Alais, 1991) En la leche, las micelas de caseína se encuentran altamente hidratadas, lo que ayuda a su solubilidad (Fox, 1989)

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

La κ -caseína interactúa con las otras caseínas a través de puentes de fosfato y citrato de calcio y magnesio, formando micelas termodinámicamente estables (Riel, 1991)

De los muchos modelos propuestos para la estructura de la micela de caseína, el más plausible consiste en subunidades de micela unidas entre sí al azar, que se orientan a un interior hidrofóbico y una superficie hidrofílica.

Las subunidades aparentemente forman agregados mayores de micelas a través de puentes de fosfato de calcio coloidal. Aproximadamente el 70% de la κ -caseína reside en la superficie de la micela, mientras que el 30% tiene una orientación hacia el interior. Las κ -caseínas en la superficie interactúan libremente con el solvente y previenen una agregación mayor de las caseínas α_{s1} , α_{s2} y β que se encuentran al interior de la micela y son altamente sensibles al Ca^{2+} (Schmidt, y Morris, 1984).

Las reacciones de gelificación que involucran a la caseína micelar son manifestaciones de la agregación de caseína mediada por el calcio. Por lo tanto, las condiciones que alteran a la superficie de la micela directamente (por ejemplo proteolisis) o que alteran el equilibrio estructural (tratamiento térmico, adición de calcio, disminución del pH) alteran la agregación y condiciones que llevan a la formación del gel (Fox, 1989; Schmidt y Morris, 1984).

3.1.3. Proteínas del suero:

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

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

La β -lactoglobulina es la más importante de las proteínas del suero. Su peso molecular es de 18,362 Da, aunque en la literatura se da a veces el de 36,000 Da, pues esta proteína tiende a formar estructura cuaternaria (dímeros) entre unidades iguales, entrecruzados por dos puentes de disulfuro. Cada monómero tiene un puente de disulfuro y un sulfhidrilo intramolecular en forma de dos residuos de cistina y uno de cisteína. La β -lactoglobulina provee aproximadamente el 90% de los grupos sulfhidrilo libres en la leche. La estructura secundaria y terciaria de la β -lactoglobulina, además de cercanía física de los grupos sulfhidrilo con los puentes de disulfuro en la estructura de la molécula, la convierten en la proteína de la leche más susceptible a la desnaturalización por calor, pues muy fácilmente puede darse un intercambio entre los grupos sulfhidrilo libres y los que participan en el enlace de disulfuro, desestabilizando a la molécula (Evans, y Gordon, 1980; Schmidt y Morris, 1984).

La α -lactalbúmina es una globulina compacta, casi esférica, y de una sola cadena (16,000 Da) que no contiene grupos sulfhidrilo. Los grupos disulfuro (4 por molécula) no están involucrados en el entrecruzamiento de las distintas cadenas. La α -lactoglobulina no se considera una proteína susceptible a la desnaturalización, pero si ésta llega a darse puede afectar de manera importante la funcionalidad del suero para los diferentes usos (Evans, y Gordon, 1980; Fox, 1989; Schmidt y Morris, 1984).

La albúmina sérica representa el 5 % de las proteínas del suero. Es una proteína de peso molecular 65,000 Da, y punto isoeléctrico de 4.7. Es especialmente rica en lisina y cistina y contiene ácido aspártico y alanina en posiciones terminales (Evans, y Gordon, 1980).

La desnaturalización del suero por calor es un proceso de dos fases, iniciando con un desdoblamiento reversible de la proteína que involucra la ruptura de los puentes de hidrógeno y enlaces hidrofóbicos; seguido de una desnaturalización irreversible y la agregación de las moléculas que se da a temperaturas más altas. Las reacciones irreversibles son de intercambio tiol-disulfuro. Se ha sugerido una tercera fase, que depende de la interacción del calcio y resulta en la formación de un agregado protéico mayor. La gelificación de las proteínas del suero puede describirse como la manifestación física de la desnaturalización inducida por el calentamiento de las proteínas cuando hay una alta concentración de las mismas (Hillier y col, 1979; Hillier y Lyster, 1979; Iametti, 1995; Parris y col., 1991).

3.2. Lactosa

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

La lactosa es un disacárido compuesto por α o β glucosa y β galactosa, dependiendo del tipo de glucosa que intervenga en la molécula, la lactosa tiene dos formas anoméricas (α o β), que tiene propiedades fisicoquímicas completamente diferentes (solubilidad, cristalización, refracción de la luz, etc.). Estas características fisicoquímicas pueden causar problemas tecnológicos en la

manufactura de los productos lácteos, o fisiológicos, cuando un malabsorbedor o intolerante consume este azúcar (García-Garibay y Gómez-Ruiz, 1996; Riel, 1991).

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

3.3. Calcio

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

El contenido total de Ca^{2+} de la leche es de 130 mg/100 g de leche, este valor es superior a la concentración de saturación en una solución acuosa, y el hecho de que no precipite en la leche se debe a que no todo el calcio presente se encuentra en solución. La mayor parte (67 %) se encuentra ligada a las caseínas, formando fosfocaseinato de calcio, el cual es importante por que ayuda a dar estabilidad a las micelas de caseína, pues se encuentra en las uniones de las submicelas. Este tipo de calcio no está en realidad disuelto en la fase acuosa, sino suspendido como parte de la micela de caseína, y por lo tanto no es ultrafiltrable (Alais, 1991; Badui, 1990).

El resto del Ca^{2+} se encuentra en la fracción ultrafiltrable de la leche, aunque no todo está en forma iónica: el 21.5 % del Ca^{2+} total de la leche se encuentra disperso formando sales como el citrato y fosfato calcio. El 11.5 % restante es el que se encuentra verdaderamente disuelto en el suero, y está

ionizado. Es este último el que se encuentra libre para reaccionar, y que podría afectar a la actividad de la enzima (Badui, 1990).

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

3.4. Cambios producidos en la leche por el tratamiento térmico

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

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

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

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

El calor altera el equilibrio salino de la leche. El calcio y fosfato coloidales tienen la tendencia de separarse de la micela de caseína y a precipitar en forma de fosfato tricálcico. Los tratamientos superiores a las temperaturas de pasteurización pueden coagular las albúminas y las globulinas. Los tratamientos térmicos aumentan la capacidad de retención de agua (CRA) de las proteínas en comparación con la CRA de la proteína a temperatura ambiente, probablemente por que los puntos reactivos de las cadenas polipeptídicas quedan más accesibles o debido a una mayor polimerización de las proteínas (Riel, 1991).

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

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

La liberación de grupos sulfhidrilos de la leche comienza a producirse cuando el tratamiento térmico es superior a 70 °C/30 min o a 75 °C/3 min.

Origina una disminución del potencial de óxido-reducción y el desarrollo de sabores a cocido. La susceptibilidad de la leche para la liberación de grupos sulfhidrilo varía con la raza y el individuo (Riel, 1991; Parris y col., 1991).

4. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

4.1. Características de las β -galactosidasas

A la fecha, se han realizado diversas investigaciones en relación a la hidrólisis enzimática de la lactosa, incluyendo las características que presentan las diferentes enzimas (pH y temperatura óptimas, efecto de algunos parámetros, etc.), su utilización, y las diferentes fuentes de donde se pueden obtener, que son: hongos como *Aspergillus oryzae* (Jackson y Jelen, 1989) o *Aspergillus niger* (Giacin y col., 1974); bacterias, como *Streptococcus thermophilus* (Chang y Mahoney, 1989; Greenberg y Mahoney, 1983 y 1984) y levaduras, entre las que se encuentran, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida Kefyr*, *Picchia jadinii* (Mahoney y Adamchuk., 1980; Guy y col., 1978; García-Garibay y col., 1993). Sin embargo, existen aún muchas incógnitas por resolver.

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

Con respecto a la enzima lactasa de *Kluyveromyces marxianus*, se han realizado estudios en cuanto a su estructura. Mahoney (1980b) propuso que esta proteína tiene 6 grupos sulfhidrilo, de los cuales depende en gran medida su capacidad hidrolítica, y que a medida que estos van desapareciendo o se van oxidando a enlaces de disulfuro, la actividad va disminuyendo, principalmente porque su modificación conlleva cambios en la estructura terciaria de la enzima. Estudios cinéticos con ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico) sugieren que ninguno de estos sulfhidrilos están en el sitio activo, pero su modificación resulta en una pérdida gradual de la actividad.

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

Desde hace varios años se reportó que al precalentar la leche (pasteurizarla) se podía aumentar la velocidad de hidrólisis de la lactosa. Estudios posteriores reportaron el efecto contrario, y trataron de relacionarlo con los cambios en los constituyentes del medio de la reacción, como son el ambiente iónico (minerales) o las proteínas, al tratamiento térmico de la misma (Sfortunato y Connors, 1958; Wendorf y col, 1970 Y 1971; Kosikowski y Wiezbicki, 1973; Guy y col., 1978; Mahoney y Adamchuk, 1980; Greenberg y Mahoney, 1983 y 1984)

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

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

Para ayudar a determinar qué fracciones de la leche eran las principales responsables de la variación en la hidrólisis de la lactosa en las leches precalentadas, Wendorf y col. (1970) realizaron otros experimentos poniendo por separado leche descremada, suero, y una solución al 5% de lactosa, los cuales fueron tratados de la misma manera que la leche en el experimento anterior. En la solución de lactosa no se observó ninguna variación entre los diferentes tratamientos térmicos, sin embargo, en la leche descremada y el suero sí se observaron diferencias notables.

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

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

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

Los resultados de Kosikowski y Wiezbicki (1973) difieren de los reportados por Wendorf y col. (1970 y 1971), pues ellos habían encontrado que al precalentar la leche se obtenía cerca de un 100% de aumento en la actividad y Kosikowski obtuvo solamente una diferencia del 5%, aunque se debe tomar en cuenta que los tiempos y temperatura de reacción utilizados por Kosikowski son de 24 h, a 4 °C, mientras que los que usó Wendorf son de 30 min, a 37 °C, por lo que es posible que si en algún momento hubo alguna diferencia en la velocidad de reacción en el caso de Kosikowski, ésta pudo no evidenciarse por el largo periodo de tiempo utilizado para la hidrólisis.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para poder definir el efecto que tienen las proteínas del suero en la activación de la enzima, y el por qué después de un tratamiento térmico este efecto aumenta, es necesario conocer los cambios que sufren dichas proteínas con el tratamiento térmico. Sobre este tema, Haiming Zhu y Srinivasan publicaron en 1994 un estudio sobre los cambios conformacionales inducidos por el calentamiento de las proteínas del suero.

Haiming y Srinivasan (1994) concluyeron que la magnitud de la desnaturalización e insolubilización de las proteínas del suero depende de la concentración de las mismas, la temperatura y el tiempo de calentamiento. Estos cambios se explicaron con más detalle en el capítulo 3.3. y 3.4.

4.2. Efecto de las proteínas sobre la actividad de lactasa

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

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

En 1984, Greenberg y Mahoney estudiaron el efecto combinado de las proteínas y los iones, encontrando que las proteínas de la leche por sí solas aumentan ligeramente la actividad, pero aminoran el efecto del ambiente iónico de la leche y el suero, induciendo así un aumento en la tasa de hidrólisis.

Yeh y col. (1990) comprobaron que al combinar varios factores (iones, proteínas y precalentamiento), como el calentar una mezcla de iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , y K^+ la actividad enzimática se inhibía; y también que a pesar de que aquella mezcla presentó capacidad inhibitoria, al agregar caseína o proteínas del suero, tal efecto disminuye, posiblemente debido al efecto enmascarador de las proteínas hacia los iones metálicos.

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

4.3. Efecto de los iones sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa

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

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

Los resultados obtenidos varían en magnitud dependiendo del tipo de solución en que la enzima reaccione, pero no en el tipo de efecto (inhibidor o activador) del ión sobre la tasa de reacción. Estos resultados se resumen en la tabla 4.1:

Tabla 4.1 Efecto de los diferentes iones sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa de diferentes fuentes.

FUENTE	ACTIVADOR	INHIBIDOR	AUTOR
HONGO		Ca ²⁺	Giacin y col, 1994.
		Mg ²⁺ Proteínas de alto y bajo peso molecular.	Giacin y col., 1974
LACTASAS NEUTRAS	Na ⁺ , Mn ²⁺		Dickson y col., 1979
	K ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺	Ca ²⁺ , Na ⁺	Guy y col., 1978.
	Mn ²⁺ , K ⁺	Na ⁺	Mahoney y Whitaker 1977 Mahoney y Adamchuk 1980
	Mn ²⁺ , Co ²⁺		Chen y Tsen, 1992.
	Mn ²⁺		Tonyi Agebabi y col., 1992.

Es así, como después de muchas investigaciones ha quedado establecido que tanto en solución acuosa como en leche, los iones Mg²⁺, Mn²⁺ y K⁺ son activadores de la reacción de hidrólisis y que el Ca²⁺ es un inhibidor; respecto al sodio, existe todavía la controversia iniciada por Dickson y col (1979) y Guy y col. en 1978.

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

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar cuál es el efecto en la leche al someterla a un tratamiento térmico, que induce un aumento en la actividad hidrolítica de la enzima β -galactosidasa

5.2 Objetivos Particulares

5.2.1. Determinar cuál es el efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de la enzima β -galactosidasa

5.2.2. Determinar el efecto de la inactivación del calcio soluble al quelarlo con E.D.T.A. sobre la actividad de la β -galactosidasa.

5.2.3. Determinar si el aumento en la actividad hidrolítica se debe a un cambio en las proteínas del suero o a las caseínas.

5.2.4. Estudiar la relación entre el aumento en la actividad de lactasa y el grado de desnaturalización de las proteínas del suero.

5.2.5. Estudiar la relación entre la exposición de grupos sulfhidrilo reactivos debida al tratamiento térmico de la leche y el cambio en la actividad enzimática.

5.2.6. Estudiar el efecto de grupos sulfhidrilo exógenos (cisteína y β -mercaptoetanol) sobre la actividad enzimática en suero y solución amortiguadora.

6. METODOLOGÍA

Para el proyecto se utilizó leche bronca (a la que se dieron diferentes tratamientos), que se obtuvo de una sola vaca perteneciente al Rancho Buena Vista, en Zumpango del Río, Edo de México.

Durante todo el proyecto se centrifugó en una centrífuga Beckman modelo J2-M1, y se leyeron las absorbancias de las diferentes pruebas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A.

6.1. Determinación de lactosa en leche

La lactosa de las muestras se determinó en leche sin hidrolizar, midiendo azúcares reductores por el método del ácido dinitro-salicílico (DNS). Debido al rango de detección de lactosa del método fue necesario diluir las muestras.

6.1.1. Técnica de determinación de lactosa, precipitando las proteínas con BaOH 0.3 M y ZnSO₄ 0.3 M

- En un tubo de ensaye se colocó 1 ml de leche o suero y 1 ml de agua destilada.
- Se tomó una alícuota de 0.2 ml del tubo anterior y se diluyó en 1.8 ml de agua.
- Defecado: Se agregó 1 ml de BaOH 0.3 M (Sigma). Se agitó.
Se agregó 1 ml de ZnSO₄ 0.3 M (Sigma). Se agitó.
- Se centrifugó a 10,000 r.p.m. para separar el precipitado.
- Se tomó 1 ml de sobrenadante y se agregó a 1 ml de solución de DNS (Sigma).
- Se llevó a ebullición por 5 minutos.
- Se enfrió.
- Se agregaron 10 ml de agua. Se dejó reposar 15 minutos.
- Se leyó a $\lambda = 540$ nm.

Durante la segunda etapa del proyecto, la precipitación de las proteínas presentes en la muestra se hizo con TCA (ácido tricloroacético, Baker), de la siguiente forma:

6.1.2. Técnica de determinación de lactosa, precipitando las proteínas con TCA (10%)

- Se tomó 1 ml de leche (o suero)
- Se agregó 1 ml de TCA al 10%
- Se centrifugó a 10,000 r.p.m. para separar el precipitado.
- Se tomó 1 ml de sobrenadante y se diluyó 1:50 en agua destilada
- Se agregó a 1 ml de esta solución 1 ml de DNS
- Se llevó a ebullición por 5 minutos.
- Se enfrió.
- Se agregaron 10 ml de agua. Se dejó reposar 15 minutos.
- Se leyó a $\lambda = 540 \text{ nm}$.

La curva patrón se realizó suponiendo una concentración de lactosa aproximadamente igual a la de la leche entera, y con base en el límite de detección del método (1.998 mg de lactosa/ml) se decidió diluir a la leche 1:2

TUBO	LACTOSA (mg/ml)	Abs método 6.1.2 ($\lambda = 540 \text{ nm}$)	Abs método 6.1.3 ($\lambda = 540 \text{ nm}$)
1	8	0.099	0.016
2	16	0.158	0.114
3	24	0.217	0.183
4	32	0.274	0.233
5	40	0.345	0.324

La ecuación de la curva para el método 6.1.2. fue:

$$L(\text{mg/ml}) = (\text{Abs}_{\lambda,540} - 0.0405)/0.0079 \quad r = 0.9881$$

La ecuación de la curva para el método 6.1.3. fue:

$$L(\text{mg/ml}) = (\text{Abs}_{\lambda,540} + 0.0537)/0.0076 \quad r = 0.9983$$

6.2. Determinación de actividad enzimática

La actividad enzimática se midió determinando el aumento de glucosa liberada por la hidrólisis de la lactosa.

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

Se utilizó una solución enzimática de 0.1 ml de Maxilact LX-5000 (Gist-Brocades) en 0.9 ml de solución amortiguadora 0.1 M de fosfatos pH 6.6

Se tomaron muestras a los 3, 6, y 10 minutos y la reacción se detuvo agregando BaOH 0.3 M (Sigma) y ZnSO₄ 0.3 M (Sigma) o bien 1 ml de TCA al 10 % para precipitar las proteínas.

La determinación de glucosa se hizo por dos métodos:

- Método de Glucosa-Oxidasa (PGO) (SIGMA), que emplea las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa y como compuesto colorido a la o-dianisidina.
- Método de Glucosa-Oxidasa (GOD-PAP) (SPINREACT Co.), que emplea las enzimas glucosa oxidasa y peroxidasa, y como compuesto colorido a la 4-aminofenazona.

6.2.1. Método PGO (SIGMA)

* Reactivos:

- Preparación enzimática: Se disolvió el contenido de una cápsula en 100 ml de agua destilada.

- Solución de o-dianisidina: Se disolvió el contenido de un vial en 20 ml de agua destilada.

- Solución de trabajo: Se mezcló la cantidad preparación enzimática con la solución de o-dianisidina (1.6 ml de colorante/100 ml de preparación enzimática).

*** Técnica:**

- Se tomaron 0.2 ml de muestra y se diluyeron en 1.8 ml de agua destilada.

Precipitación de las proteínas:

- Se agregó 1 ml de BaOH 0.3 M. Se agitó.
- Se agregó 1 ml de ZnSO₄ 0.3 M. Se agitó.
- Se centrifugó a 10,000 r.p.m.
- Se tomaron 0.5 ml del sobrenadante.
- Se agregaron 5 ml de la solución de trabajo.
- Se incubó 30 minutos a 37 °C.
- Se leyó a $\lambda = 435 \text{ nm}$.

La curva patrón se preparó utilizando una solución de 1 mg/ml de glucosa que se diluyó a diferentes concentraciones (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1.0 mg/ml) para cubrir un intervalo de 0 a 1 mg/ml, de acuerdo con la sensibilidad del método.

6.2.2. Método GOD-PAP (SPINREACT Co.)

*** Reactivos:**

- Solución de trabajo: Disolver el contenido de un vial en 250 ml de solución de 4-aminofenazona.

*** Técnica**

- Se tomaron 0.2 ml de muestra y se diluyeron en 1.8 ml de agua destilada.

Precipitación de las proteínas:

- Se agregó 1 ml de BaOH 0.3 M . Se agitó.
- Se agregó 1 ml de ZnSO₄ 0.3 M. Se agitó.
- Se centrifugó a 10,000 r.p.m.
- Se tomaron 30 µl del sobrenadante.
- Se agregaron 3 ml de solución de trabajo.
- Se incubó 30 minutos a 37 °C.
- Se leyó a $\lambda = 505$ nm.

La concentración de glucosa en las muestras se calculó comparando la absorbancia de la muestra con la absorbancia presentada por un estándar de glucosa de 1.0 mg/ml, como lo indica el proveedor.

6.3. Determinación de la proteína presente en las muestras

Se utilizó la técnica de Lowry:

* Reactivos:

- a) Na₂CO₃ (J.T. Baker) al 2% en NaOH (J.T. Baker) 0.1N
- b) CuSO₄ (J.T. Baker) al 1% en H₂O
- c) Tartrato de Na y K (J.T. Baker) al 2% en H₂O
- d) Reactivo de Folin Cciocalteu (Sigma) 1:1 en agua.

* Técnica:

- Se mezclaron 50 volúmenes de a) +1 volumen de b) + 1 volumen de c)
- Se tomaron 5 ml de esta solución y se les agregó 1 ml de muestra.
- Se dejaron reposar 10 min en la obscuridad
- Se agregaron 0.5 ml de d)
- Se dejó reposar 30 min en la obscuridad
- Se leyó a $\lambda = 590$ nm

La curva patrón se preparó una solución de 500 mg/ml de seroalbúmina que se diluyó a diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400, y 500 mg/ml) para cubrir un intervalo de 0 a 500 mg/ml.

6.4. Determinación de grupos sulfhidrilo en el suero de leche

Para la determinación de grupos sulfhidrilo se utilizó la reacción de Ellman, y se midió el nitrobenzoato (TNB⁻) liberado por la reacción del grupo tiol con el ácido 5-5'-Dinitrobenzoico (DTNB o reactivo de Ellman, Sigma).

6.4.1. Técnica:

- Se ajustó el pH del suero de leche a 8.0 con NaOH 1 N
- Se agregó una solución de reactivo de Ellman (4 mg/ml en buffer de fosfatos pH 8.0). Se agregó 1 ml de esta solución por cada 7 ml de suero.
- Se dejó reposar los tubos durante 15 min para permitir que se llevara a cabo la reacción.
- Se centrifugó a 19,000 r.p.m. durante 30 min para precipitar la proteína.
- El sobrenadante se filtró a través de un filtro Milipore de 0.45 μm .
- Se leyeron los tubos a $\lambda = 412 \text{ nm}$.

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

$$A = \xi bc$$

6.5. Evaluación del efecto de la temperatura del tratamiento térmico de la leche en la actividad de la β -galactosidasa

La leche bronca se dividió en 6 lotes y a cada uno se le dio un pre-tratamiento térmico diferente durante media hora: 55, 65, 75, 85 y 90 °C.

Cada uno de los lotes, así como un control (sin tratamiento térmico previo) se sometió a la hidrólisis de lactosa midiendo la actividad de β -galactosidasa por el método explicado anteriormente.

6.6. Determinación del efecto del calcio sobre la actividad de la enzima lactasa

Previo a la hidrólisis se adicionó 0.015 % de la sal disódica del E.D.T.A. (Etilendiamintetraacetato de sodio, J.T. Baker, concentración equivalente a la de calcio soluble en la leche) a una leche que había sido previamente calentada a 85 °C durante media hora y a una leche sin tratamiento térmico previo (control). Se agitó y posteriormente se les midió la actividad de β -galactosidasa como se especificó anteriormente.

6.7. Obtención del suero

Se calentó la leche bronca a 37 °C y entonces se agregó una preparación de quimosina (Cuamex), 10 gotas de preparación/ l de leche. Se agitó la leche para distribuir la enzima uniformemente y se dejó actuar durante aproximadamente 1 h. (Hasta la obtención de un gel firme).

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

6.8. Determinación del efecto del tratamiento térmico de las proteínas del suero en la actividad de la β -galactosidasa

Para estudiar el efecto del calentamiento, el suero se separó en 5 lotes, y cada uno se sometió a una temperatura diferente durante 30 min:

Lote 1	55 °C
Lote 2	65 °C
Lote 3	75 °C
Lote 4	85 °C

Se midió la actividad que presentaba la enzima β -galactosidasa en muestras de suero con los diferentes tratamientos térmicos arriba mencionados y en un control (sin tratamiento térmico).

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

La evaluación se llevó a cabo a través de electroforesis no desnaturalizante. Se ha comprobado que por este método se pueden ver cambios hasta de un solo residuo de aminoácido, al comparar los coeficientes de corrida (Rf) obtenidos para cada banda. Debido a que se deseaba determinar el peso molecular de las proteínas presentes en el suero, se llevaron a cabo electroforesis en geles con diferente contenido de acrilamida y bisacrilamida (que se define como “% de T”), que fue de 5 a 15 %. Todos los geles tuvieron una relación de bisacrilamida/acrilamida (que se define como “C”) de 5% en el gel de separación.

6.9.1. Preparación de reactivos:

Los geles se prepararon usando el sistema descrito por Goldenberg (1990) para electroforesis en condiciones no desnaturalizantes.

- Gel de Separación: Se preparó una solución patrón con 14.25 % de acrilamida y 0.75 % de bisacrilamida (T = 15 % y c = 5 %) en solución amortiguadora 0.375 M de tris-base, pH 8.8 y a partir de ésta se hicieron las diluciones correspondientes para obtener la “T” deseada. Para polimerizarlo se agregó persulfato de amonio al 10 % (50 μ l/10 ml de gel) y N,N',N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (0.1 ml/100 ml de gel).

- Gel de Concentración: Se preparó una solución con 2.5 % de acrilamida y 0.625 % de bisacrilamida (T=3.125% y c=25) en solución amortiguadora 0.125 M de tris-base, pH 6.8. Para polimerizarlo se agregó persulfato de amonio al 10 % (50 μ l/10 ml de gel) y TEMED (0.1 ml/100 ml de gel).

- Solución amortiguadora del electrodo (corrida): Se preparó con 3.6 g de tris-base y 17.28 g de glicina, se diluyó a 6 l. El pH se ajustó a 8.3 con HCl 1N.

La muestra se diluyó 1 volumen de muestra y 0.5 volúmenes de solución de glicerol (25 %), azul de bromofenol (0.1 %) y agua (74.9%) .

6.9.2. Corrida de las muestras

Se empleó una cámara de electroforesis mini-PROTEAN II cell (Bio Rad). Los geles fueron soportados en placas de vidrio de 10 x 7 cm, se emplearon separadores de 0.75 mm y un peine del mismo espesor. Para el corrimiento electroforético se empleó una fuente de poder Bio-Rad Power/Pac 300.

La electroforesis se realizó a voltaje constante de 200 v, hasta que el colorante azul de bromofenol alcanzó la parte final del gel (aproximadamente 45 min)

Una vez realizado el corrimiento electroforético se fijaron y tiñeron las proteínas del gel sumergiéndolo en una solución fijadora de azul de Coomassie (0.25 %) en una mezcla de agua-metanol-acido acético al 50-40-10 %v/v durante 30 min.

Posteriormente se colocaron los geles en una solución desteñidora de ácido acético-metanol-agua al 10-40-50 % v/v, de manera que se pudieran identificar las bandas correspondientes a las diferentes proteínas.

Para la determinación del peso molecular de los componentes de la muestra se corrió junto con ésta un marcador estándar:

* Patrón (Biorad):

Miosina (músculo de conejo)	PM	205,000 daltones
β -galactosidasa (<i>E.coli</i>)		116,000 daltones
Fosforilasa (músculo de conejo)		97,400 daltones
Albúmina bovina		66,000 daltones
Albúmina de huevo		45,000 daltones
Anhidrasa carbónica (eritrocitos)		29,000 daltones

6.10. Evaluación del efecto de grupos sulfhidrilo exógenos en el suero

Para medir el efecto de grupos sulfhidrilo exógenos se agregaron grupos sulfhidrilo (-SH) reactivos al suero en forma de β -mercaptoetanol o de cisteína. Después se midió la actividad de la enzima en los diferentes lotes de suero y se compararon los datos obtenidos en el suero con tratamiento térmico.

El suero se separó en 20 lotes, y a cada uno se le agregó una cantidad diferente de β -mercaptoetanol (β -ME) o cisteína para simular el aumento de grupos -SH obtenido con los tratamientos térmicos (se utilizaron los datos de -SH obtenidos con el tratamiento térmico del suero para definir las concentraciones de -SH que se utilizarían):

Tabla 6.10.1. Cantidad de β -mercaptoetanol o cisteína agregados al suero

Concentración de grupos sulfhidrilo (μ M)	μ l β -mercaptoetanol/100 ml suero	mg cisteína/100 ml suero
Control	0	0.00
100	0.70	1.21
150	1.06	1.82
200	1.41	2.42
250	1.76	3.03
300	2.11	3.63
350	2.46	4.24
400	2.82	4.84
450	3.17	5.45
500	3.52	6.05

6.11. Determinación del efecto del aumento de grupos sulfhidrilo en una solución amortiguadora sobre la actividad enzimática

Debido a que el sodio es un inhibidor de la reacción, para estas pruebas se usaron soluciones amortiguadoras de fosfatos monobásico y dibásico de potasio, que favorece la reacción. Se agregó lactosa en polvo (SIGMA) a la solución amortiguadora de tal forma que la concentración final fuera 5 % (similar a la encontrada en leche).

La solución amortiguadora se separó en lotes de 100 ml y a cada uno se le agregó una cantidad diferente de β -mercaptoetanol o de cisteína (según el experimento) en concentraciones entre 100 y 500 μ M.

Se midió la actividad enzimática en cada uno de los lotes y se comparó con la obtenida en suero con tratamiento térmico y en suero con grupos -SH exógenos.

Tabla 6.11.1 Cantidad de β -mercaptoetanol o cisteína agregados a la solución amortiguadora

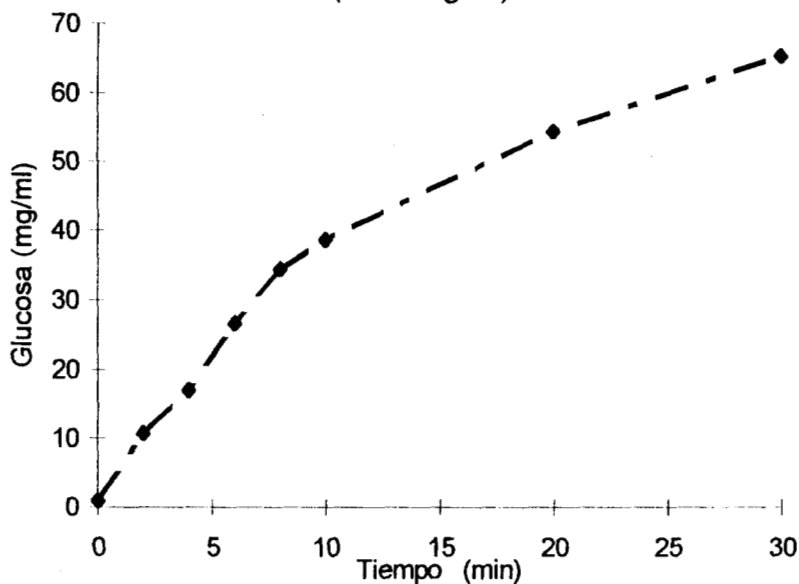
Concentración de grupos sulfhidrilo (μ M)	μ l β -Mercaptoetanol/100 ml solución amortiguadora	mg cisteína/100 ml solución amortiguadora
Control	0	0.00
100	0.70	1.21
150	1.06	1.82
200	1.41	2.42
250	1.76	3.03
300	2.11	3.63
350	2.46	4.24
400	2.82	4.84
450	3.17	5.45
500	3.52	6.05

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Seguimiento de la cinética de la reacción de lactasa en leche bronca a 37 °C

Para determinar el tiempo que debería seguirse la reacción y establecer la metodología para obtener la velocidad inicial de la enzima en los experimentos siguientes, se muestreo una reacción durante 30 minutos, analizando los primeros minutos de la misma con mayor detenimiento. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 1.

Fig. 7.1. Cinética de reacción en leche bronca (PGO Sigma)



Para asegurar que la reacción enzimática se encuentra todavía en la etapa de velocidad inicial, es necesario que los puntos en los que ésta se mida formen parte de una recta. Al aplicar una regresión lineal simple a los resultados anteriores se observó que hasta los 10 primeros minutos se tenía una $r = 0.9949$, con velocidad inicial (V_0) de 3.850 (mg/ml.min), a los 20 minutos el coeficiente de correlación era $r = 0.9591$, con V_0 de 0.2647 (mg/ml.min) y a los 30 minutos se tenía una r de 0.9548, y una V_0 de 0.25178 (mg/ml.min) (figura 7.1.).

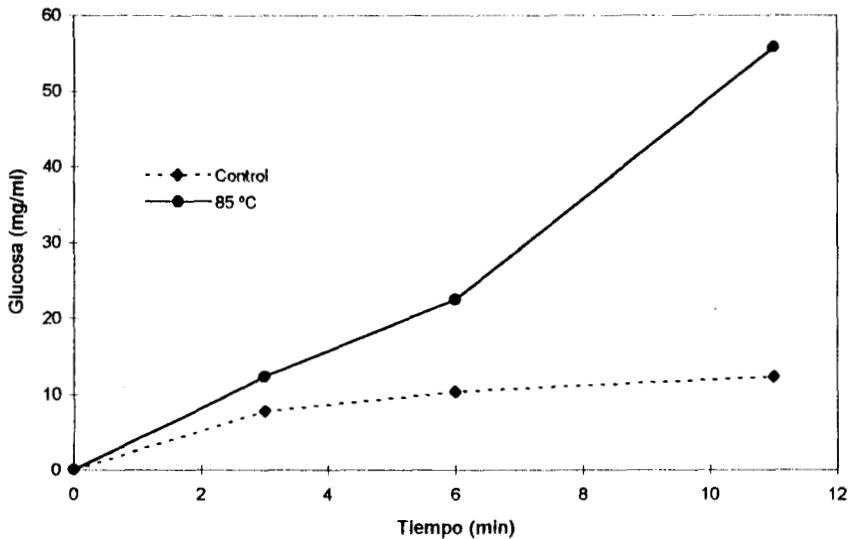
Estos resultados sugieren que durante los 10 primeros minutos de la reacción, ésta se encuentra en la fase de velocidad inicial; después de este tiempo la curva de reacción comienza a inclinarse. Es por ello que en los experimentos siguientes la reacción se evaluó solo durante los 10 primeros minutos.

7.2. Efecto del tratamiento térmico de la leche sobre la actividad de lactasa

Con el fin de comprobar el efecto del tratamiento térmico en la actividad enzimática se pretrataron varios lotes de leche bronca a diferentes temperaturas, que oscilaron entre los 55 y 85 °C, durante 30 minutos.

Para ver si las diferencias de actividad entre los tratamientos eran detectables con este método, se hizo una comparación entre las leches sin tratamiento térmico (control) y con pretratamiento de 85 °C obteniéndose los resultados mostrados en la figura 7.2.

Fig. 7.2 Comparación de actividad en leche bronca y leche pretratada a 85 °C, 30 min



Al calcular las velocidades iniciales de los datos anteriores se obtuvieron los siguientes valores: $V_{O_{control}} = 1.041 \text{ mg/ml.min}$, y $V_{O_{85^{\circ}\text{C}}} = 5.036 \text{ mg/ml.min}$ esto refleja un aumento de casi 5 veces en la tasa de reacción (figura 7.2.), lo que demuestra que es posible ver los cambios en la velocidad inicial de la reacción, y por ello se prosiguió a hacer un análisis más a fondo de los cambios en la actividad enzimática debidos al tratamiento térmico de la leche.

Al hacer pruebas con leche proveniente de diferentes lotes se observaron diferencias muy grandes en la cantidad de lactosa hidrolizada (i.e. una gran variabilidad en los lotes), aún cuando la leche hubiera sido sometida al mismo tratamiento térmico y durante el mismo tiempo.

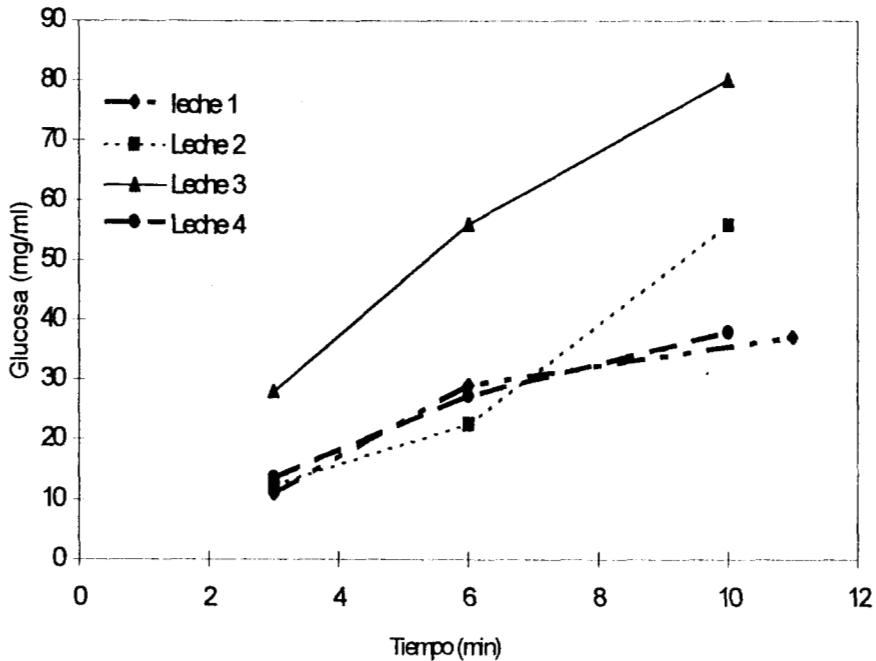
Estas diferencias pueden deberse a cambios en la composición de la leche; que puede variar tanto por la alimentación, como por la etapa del ciclo de lactación, la exposición del animal al sol, etc.

Los cambios observados en la actividad, por ejemplo, se muestran en la tabla 7.1. y en la figura 7.3.

Tabla 7.1. Comparación de actividad en leche de diferentes lotes tratada a 85°C

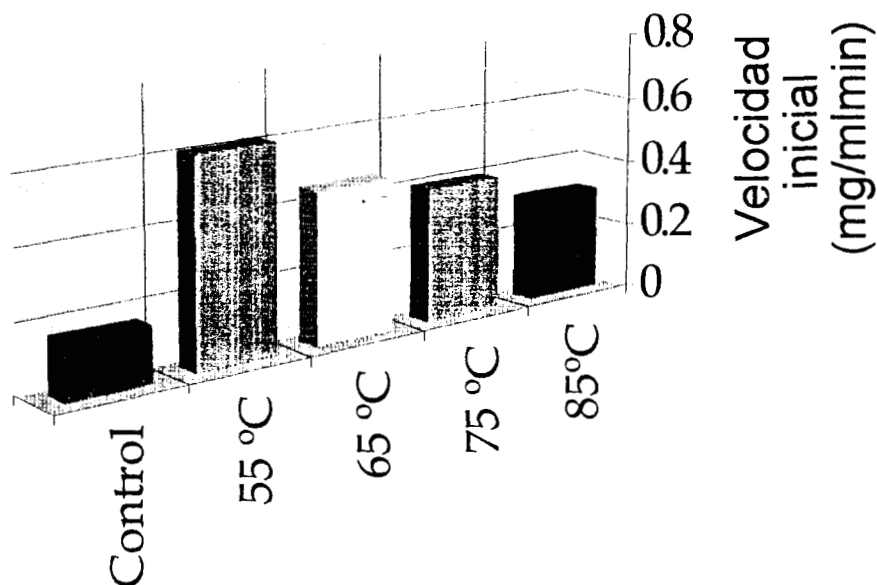
	LECHE 1 Glucosa (mg/ml)	LECHE 2 Glucosa (mg/ml)	LECHE 3 Glucosa (mg/ml)	LECHE 4 Glucosa (mg/ml)
V_o (mg/ml.min)	3.079	6.318	7.371	3.433

Fig. 7.3. Comparación de actividad en leche de diferentes lotes pretratada a 85 °C durante 30 min



Finalmente, se realizó un análisis más fino del efecto de la temperatura del tratamiento térmico sobre la actividad enzimática. Para ello se pretrató la leche (de un solo lote) a cuatro diferentes temperaturas (55, 65, 75 y 85 °C) durante 30 minutos, y se midió la actividad que presentaba la enzima en cada temperatura, comparándola con la actividad determinada en una leche sin tratamiento térmico (control); la figura 7.4. muestra los resultados obtenidos:

Fig. 7.4. Comparación de velocidades iniciales obtenidas en leche con diferentes pretratamientos térmicos



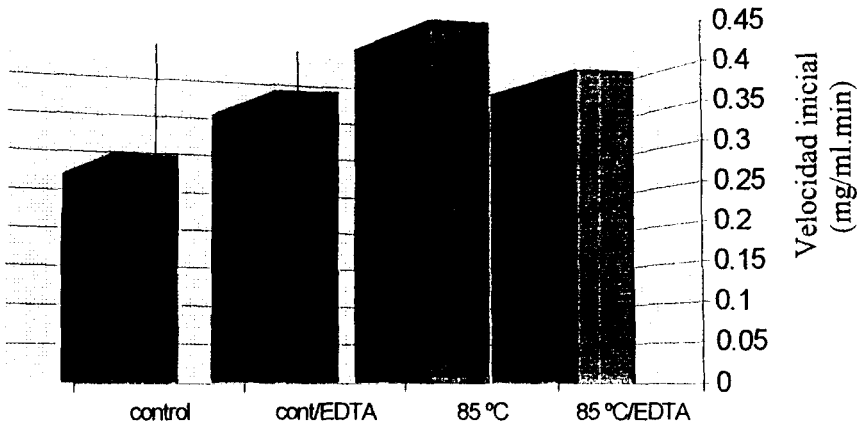
Al analizar los resultados anteriores se observa que en el rango de temperaturas probadas la actividad presenta un “máximo” que se da entre 55 y 65 °C (no hay diferencia significativa entre estos dos tratamientos) y a partir de este punto comienza a disminuir (figura 7.4.), sin embargo, aún a 85 °C la actividad detectada es significativamente más alta que aquella encontrada en la leche sin tratamiento térmico.

Un análisis estadístico (análisis de varianzas y prueba de Tukey), demostró que todos los tratamientos elevan significativamente ($\alpha = 0.0001$) la actividad respecto a aquella medida en la leche control; las actividades encontradas en las leches pretratadas a 55 y 65 °C no difieren entre sí de manera significativa, sin embargo, sí difieren significativamente tanto del resto de los tratamientos como del control.

7.3. Efecto del calcio en la tasa de actividad de la enzima β -galactosidasa

Para comprobar si el aumento en la actividad de lactasa se debe a la precipitación del calcio (ión que inhibe a la enzima) en forma de fosfato de calcio coloidal, se comparó la tasa de reacción obtenida para leches pretratadas a 85 °C y sin tratamiento térmico, ambas con y sin EDTA como quelante del calcio. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.5.

Fig. 7.5. Efecto del calcio sobre la actividad de la β -galactosidasa



En los resultados anteriores se observa que al quelar el calcio en una leche sin tratamiento térmico, la velocidad inicial (V_0) de la reacción enzimática aumenta de manera significativa (29.62 %, $\alpha=0.036$) (figura 7.5.), probablemente debido a la eliminación del inhibidor iónico. Sin embargo, este aumento es mucho menor al obtenido en leche pretratada a 85 °C (68.02%, $\alpha=0.0059$), lo que sugiere que el aumento en la actividad no se modifica únicamente por la presencia o ausencia del calcio, sino que existe algún otro factor (probablemente en las proteínas) que tiene efecto significativo sobre la tasa de reacción.

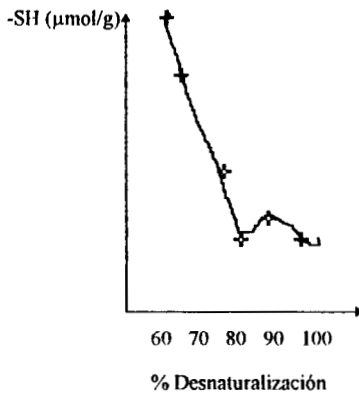
Cuando se agregó EDTA a leche pretratada a 85 °C la velocidad inicial disminuyó significativamente ($\alpha=0.0232$) respecto a la presentada en leche pretratada a 85 °C. Esto podría deberse a algún efecto inhibitor del EDTA sobre la tasa de reacción, pues este compuesto se agregó considerando la misma concentración de calcio iónico soluble que en una leche sin tratamiento térmico (0.015 %), y ya que el calcio precipita al formar fosfato de calcio coloidal por el calor, el EDTA agregado pudo quedar libre y ejercer algún efecto inhibitorio sobre la enzima.

7.4. Desnaturalización de las proteínas del suero por el tratamiento térmico

El hecho de que se presente un “máximo” de actividad al precalentar la leche entre 55 y 65 °C, y de que la magnitud del cambio en la velocidad inicial de la reacción no pueda atribuirse por completo a la precipitación del calcio como fosfato de calcio coloidal, podría indicar que el aumento de la actividad se debe al aumento en la exposición de los grupos sulfhidrido (-SH) de las proteínas del suero, puesto que al desnaturalizarse por el tratamiento térmico se van abriendo y los van exponiendo (Parnell-Clunies y col. , 1988; Singh y Fox, 1987).

Haque y Kinsella (1987 a y b); Haque y col. (1987), reportaron que tratamientos térmicos a temperaturas altas producen una reacción entre los grupos -SH reactivos de la β -lactoglobulina y la κ -caseína, formando puentes de disulfuro entre éstas y ligando de esta forma a los grupos -SH reactivos (esta reacción se conoce como “forewarming”). En 1988, Parnell-Clunies, y col. demostraron que la magnitud en la que se da esta reacción depende principalmente del tiempo que se expone la leche al calor: a pesar de que ésta sea expuesta a temperaturas altas, si el tiempo es corto se formarán pocos puentes de disulfuro entre las proteínas.

Parnell-Clunies y col. (1988) también reportaron que la concentración de grupos sulfhidrido reactivos cambia dependiendo de la desnaturalización de las proteínas:



Tomada de Parnell-Clunies y col. 1988

En los experimentos realizados se dio un tratamiento térmico largo (30 min), por lo que se promovió la reacción de “forewarming”, lo que implica que partir de 65 °C los grupos -SH comienzan a reaccionar y a formar puentes de disulfuro, por lo que ya no están disponibles para aumentar la actividad de la enzima. El comportamiento de la actividad respecto al tratamiento térmico es muy similar al reportado por Parnell-Clunies y col. 1988 para el cambio en los grupos sulfhidrilo, lo que podría indicar que el cambio en la actividad está relacionado con los grupos -SH expuestos.

Con el fin de evaluar si la desnaturalización de las proteínas del suero y la consecuente exposición de grupos sulfhidrilo reactivos están relacionados con el cambio en la velocidad inicial de la lactasa al pretratar la leche, se separó el suero de una leche bronca (sin ninguna clase de tratamiento), y después se le dieron diferentes tratamientos térmicos (55, 65, 75 y 85 °C). En este suero pretratado se midieron el grado de desnaturalización de las proteínas, la actividad que presentaba la enzima β -galactosidasa en función del tratamiento térmico, y los grupos sulfhidrilo reactivos presentes en él y se compararon con los obtenidos para un suero control (sin tratamiento térmico).

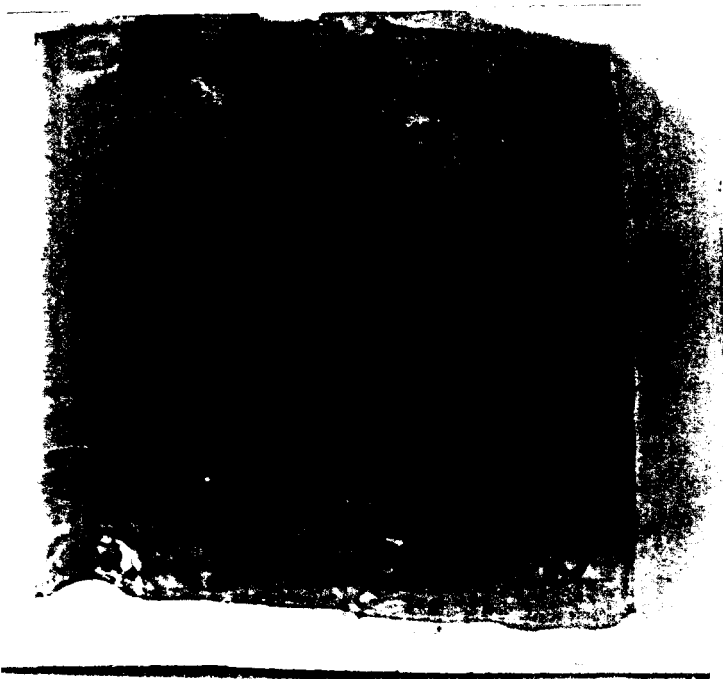
La desnaturalización de las proteínas del suero se midió por el cambio en el coeficiente de corrida (Rf) de las bandas características de las diferentes proteínas, además, se relacionó también con el cambio en la intensidad de las bandas e incluso la desaparición de algunas de ellas.

Las proteínas del suero son de bajo peso molecular, por lo que en los geles con % T alto no se pudieron separar bien las diferentes bandas. Para identificar las proteínas presentes en las diferentes bandas se utilizó el método descrito por Hames (Hames, 1981), en el que se relacionan los Rf's de proteínas patron de peso molecular conocido con el contenido de acrilamida y bisacrilamida del gel (%T), y se obtiene una recta en la que se extrapola la pendiente obtenida al relacionar el Rf de las bandas problema con el % T del gel. De acuerdo con esta recta se identificó claramente a las proteínas del suero, como se muestra en la figura 7.6.

El gel en el que se logró la mejor separación de las proteínas fue el de T=10%, y con este tamaño de poro pudo observarse claramente como las bandas correspondientes a la β -lactoglobulina (PM 18,000 Da) perdían intensidad, lo que indica que su concentración disminuía, ya sea por precipitación o desnaturalización de la proteína; además de la aparición de otras bandas correspondientes a pesos moleculares más bajos conforme la intensidad del tratamiento térmico aumentaba (Figura 7.6.).

En la Figura 7.6. Se muestran los patrones electroforéticos obtenidos para suero con diferentes tratamientos térmicos y un control (sin tratamiento térmico).

Fig. 7.6. Patrones electroforéticos de suero con diferentes tratamientos térmicos



En la figura 7.6 se muestran los patrones electroforéticos obtenidos para suero con diferentes tratamientos térmicos: carril 1: 55 °C; 2: 65 °C; 3: 75 °C; 4: 85 °C; y 5: control. Se observa que la banda correspondiente a la β -lactoglobulina B (señalada por la flecha) disminuye en intensidad (concentración) conforme aumenta la temperatura del tratamiento térmico, en algunos casos dicha banda desapareció por completo. También se observa la aparición de bandas de pesos moleculares pequeños al aumentar el tratamiento térmico

La electroforesis nativa o no desnaturizante es una herramienta para comprobar los cambios conformacionales que sufren las proteínas, puesto que en este tipo de electroforesis, las moléculas corren por su configuración espacial, su carga y solubilidad en la fase móvil, la cual se modifica con los cambios en los residuos cargados.

Dado que se sabe que la β -lactoglobulina es una de las proteínas más termolábiles del suero, la más abundante en esta fracción de la leche, y que además es la que aporta la mayor cantidad de grupos sulfhidrilo reactivos (Patrick y Swaisgood, 1976; Carbonaro y col., 1996; Parnell-Clunies y col., 1988; Jametti y col., 1995; Parris, y col., 1991)., se observaron con especial atención los cambios en el coeficiente de corrida (Rf) de esta proteína.

Coincidiendo con lo reportado por Parnell-Clunies y col. (1988), el patrón electroforético de la β -lactoglobulina (Figura 7.6.) fue el que cambió más, observándose que la desnaturalización inicia aproximadamente a 65 °C y es casi completa después de un tratamiento de 85 °C durante 30 min (la banda prácticamente desaparece, lo que indica que la proteína cambió totalmente su estructura terciaria y/o sus cargas).

Los resultados obtenidos con los diferentes porcentajes de T para la banda correspondiente a la β -lactoglobulina se muestran en la tabla 7.2:

Tabla 7.2. Coeficientes de corrida a diferentes % de T en el gel

TRATAMIENTO	Rf T = 15 %	Rf T = 12.5 %	Rf T = 10 %
Control	0.5116	0.725	0.641
55 °C	0.4878	0.8158	0.725
65 °C	0.525	0.8158	0.756
75 °C	0.5	0.8333	0.75
85 °C	***	***	***

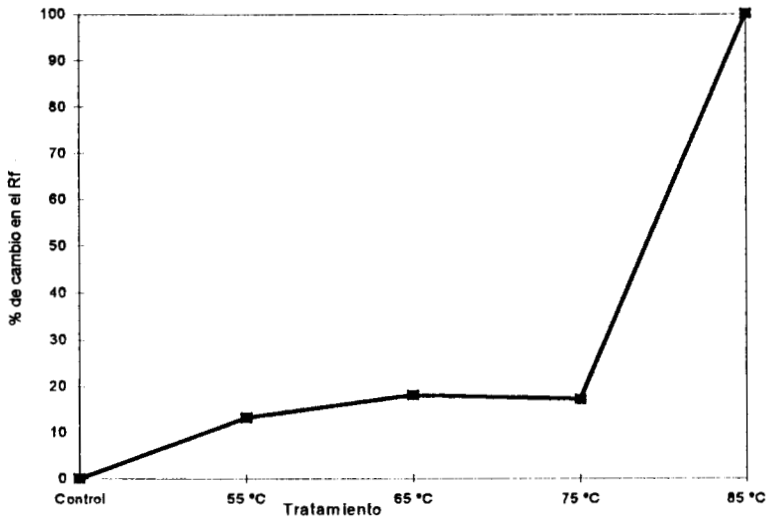
*** No se observó la banda, lo que indica que la proteína se desnaturizó totalmente.

La electroforesis nativa puede indicar que hay un cambio en al menos uno de los residuos de aminoácidos (cambios de cargas, rompimientos de enlaces, etc), y/o un cambio en la estructura terciaria; y a pesar de que no se puede saber cuál es, sí se puede determinar que existe, e incluso puede darse un valor aproximado de su intensidad al calcular la magnitud del cambio en el Rf que se debe al tratamiento térmico. Esto se logró con la siguiente formula:

$$\% \text{ cambio} = [(Rf_{\text{control}} - Rf_{\text{tratamiento}}) / Rf_{\text{control}}] \times 100$$

Al observar el cambio en el Rf de las bandas (figura 7.6., tabla 7.2), respecto al tratamiento térmico de las muestras, se puede tener una idea de cómo se van desnaturalizando las proteínas. En el caso de las muestras de suero con diferentes tratamientos térmicos, se consideró el porcentaje de cambio en el Rf para ver la desnaturalización. La figura 7.7. muestra el grado de desnaturalización (como % de cambio en el Rf) de la β -lactoglobulina, proteína más abundante del suero, y cuyo patrón electroforético fue el que más cambió por el tratamiento térmico. Los datos que se muestran son los obtenidos para el gel con T = 10 %, porque fue aquel en el que se obtuvo la mejor separación de las bandas.

Fig.7.7. Desnaturalización de la β -lactoglobulina B (expresado como % de cambio en el Rf)



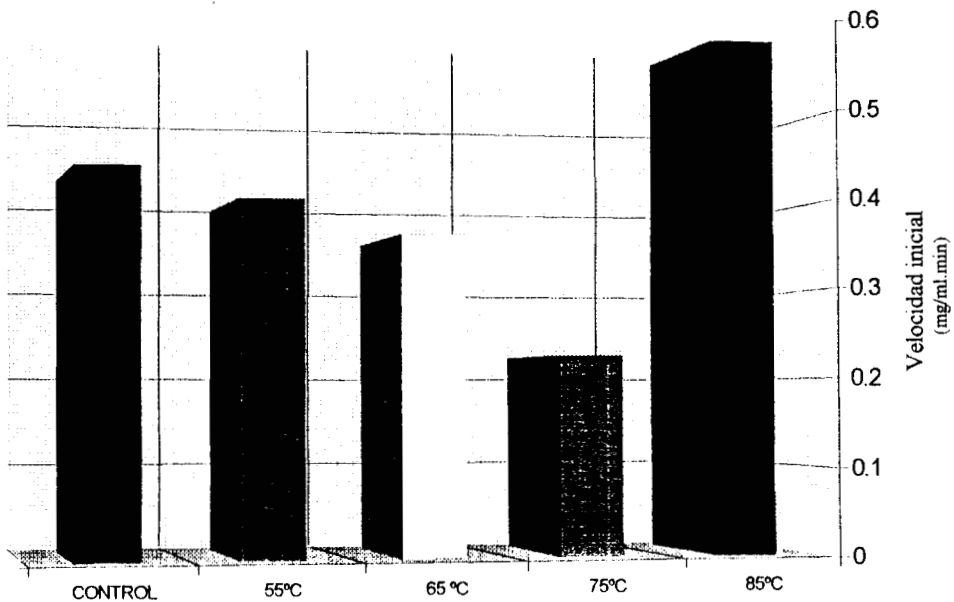
A pesar de que no es posible definir exactamente de qué manera se está desnaturizando la proteína, se observa que entre 55 y 75 °C hay una desnaturización parcial, y a 85 °C la desnaturización es prácticamente completa.

222256

7.5. Efecto del tratamiento térmico del suero sobre la actividad de lactasa.

Una vez establecida la técnica de determinación del grado de desnaturalización de las proteínas se procedió a medir la actividad enzimática en las muestras de suero pretratadas a diferentes temperaturas. La figura 7.8. muestra los resultados obtenidos:

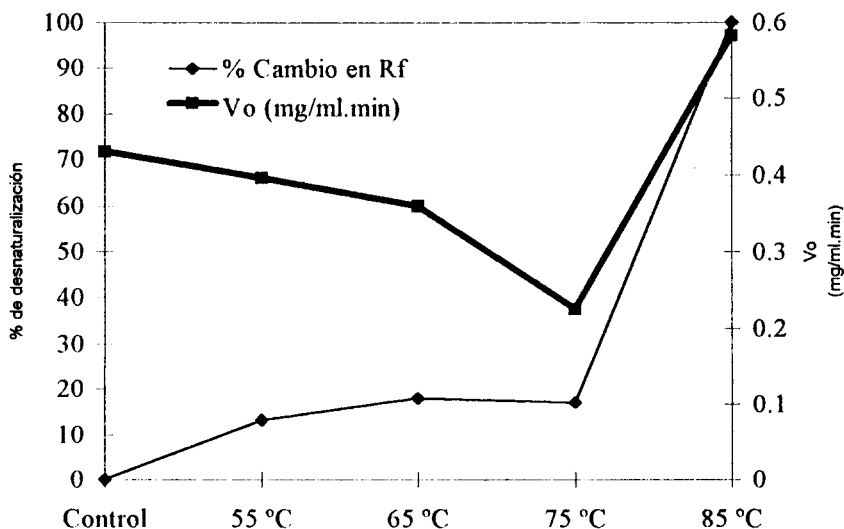
Fig. 7.8. Comparación de velocidades iniciales obtenidas en suero con diferentes pretratamientos térmicos



En los resultados anteriores se observa que la velocidad inicial de la reacción tiende a disminuir paulatinamente (figura 7.8.), aunque no de manera significativa, con los tratamientos entre 55 y 65 °C, conforme aumenta la temperatura; al pretratar el suero a 75 °C se observa un descenso significativo en la actividad enzimática, y finalmente a 85 °C la tasa de reacción aumenta de manera significativa (35.40 %, $\alpha=0.0503$), este punto concuerda con la temperatura a la cual desaparecía la banda de la β -lactoglobulina en los patrones de electroforesis nativa, lo cual podría indicar que el cambio en la actividad se debe a la desnaturalización de esta proteína.

Al comparar el cambio observado en la actividad del suero con el cambio en el Rf de las manchas de β -lactoglobulina (Figura 7.9.), se observa una gran similitud entre los dos patrones: mientras el cambio en el Rf es mínimo, el cambio en la actividad enzimática también lo es. Se analizaron estos datos con una prueba de correlación de Pearson, obteniéndose un coeficiente de correlación $r = 0.7126$, lo que confirma que existe una relación entre el grado de desnaturalización de las proteínas y la actividad enzimática.

Fig. 7.9. Comparación del grado de desnaturalización de las proteínas del suero con la actividad enzimática



7.6. Efecto del tratamiento térmico del suero en el contenido de grupos sulfhidrilo reactivos

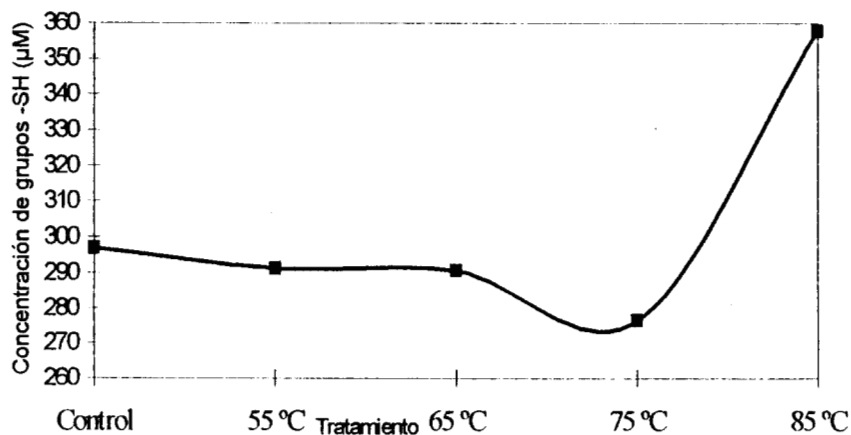
Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores apoyan la hipótesis de que el cambio en la velocidad enzimática podría deberse a la exposición de grupos sulfhidrilo reactivos (-SH).

Con el fin de demostrar si efectivamente la concentración de estos grupos varía con el tratamiento térmico, se midió la concentración de -SH en las muestras de suero pretratadas.

La concentración de grupos -SH reactivos se calculó utilizando la reacción de Ellman, ya que no se aplicó ningún agente desnaturizante en la determinación, el coeficiente de extinción molar que se utilizó fue $\xi = 14,150$ l/Mcm, que es el del ión TNB libre, liberado por la reacción de los grupos -SH reactivos con el DTNB (Patrick y Swaisgood, 1976; Britten y col., 1994; Taylor y Richardson, 1980; Parnell Clunies y col., 1988).

Las concentraciones de -SH encontradas en los diferentes sueros se muestran en la figura 7.10.:

Fig. 7.10. Contenido de Grupos Sulfhidrilo Reactivos en Suero con Diferentes Pretratamientos Térmicos



El contenido de grupos -SH reactivos en los sueros pretratados a diferentes temperaturas disminuye conforme aumenta la intensidad del tratamiento térmico, y finalmente aumenta significativamente cuando el tratamiento es muy severo (85°C, 30 min), como se observa en la figura 7.10.

Como ya se ha mencionado, la β -lactoglobulina es la proteína del suero que aporta la mayor cantidad de grupos -SH, por lo que es posible que el cambio en el contenido de grupos -SH reactivos se deba a la desnaturalización de la misma.

Cabe mencionar que cuando la proteína se desnatura gradualmente busca la conformación energéticamente más estable, por lo que puede llegar a esconder algunos grupos reactivos a pesar de haberse desnaturalizado. Sin embargo, cuando el tratamiento es muy fuerte (85 °C 30 min), la proteína se desnatura completamente y expone los grupos que antes estuvieron físicamente ocultos.

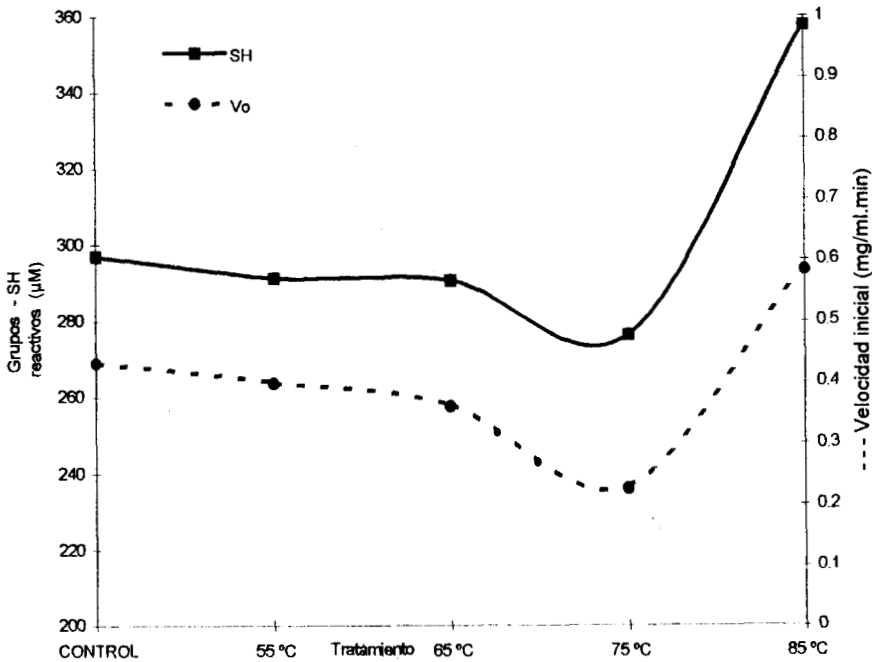
A pesar de que existen diversos estudios sobre el cambio en el contenido de grupos sulfhidrilo reactivos debido a la desnaturalización de la β -lactoglobulina por el tratamiento térmico (Parnell-Clunies y col., 1988; Parris y col., 1991; Singh y Fox, 1987), estos fueron realizados dando tratamiento térmico en leche entera y separando después el suero, por lo que se presentaba la reacción de "forewarming" y los datos obtenidos en este experimento no son comparables con los estudios ya existentes.

Sin embargo, estos reportes (Parnell-Clunies y col., 1988; Parris y col., 1991) mencionan el hecho de que la β -lactoglobulina comienza a desnaturalizarse aproximadamente a 65 °C, y está totalmente desnaturalizada a 85 °C, y es a 65 °C cuando empieza a notarse un descenso significativo en los grupos sulfhidrilo determinados experimentalmente, y a 85 °C cuando este valor se dispara, lo que sugiere que el cambio en la concentración de -SH está relacionado con cambios conformacionales de la β -lactoglobulina. Esto también puede evidenciarse comparando los resultados de electroforesis con el cambio en el contenido de grupos -SH.

El comportamiento de la concentración de los grupos -SH reactivos es muy similar al de la velocidad inicial de la lactasa (figura 7.11.): a una disminución en la concentración de grupos -SH reactivos corresponde una disminución de la actividad.

En las temperaturas en las que se observa la concentración de grupos -SH más alta y baja se encuentran también los máximos y mínimos de la velocidad inicial de la reacción, esto sugiere que hay una relación directa entre el contenido de grupos -SH del suero y la tasa de hidrólisis de la lactosa. Los valores de V_0 se comparan con el contenido de grupos -SH en el suero en la figura 7.11.

Fig. 7.11. Comparación del contenido de grupos sulfhidrilo y la actividad obtenidos en suero con diferentes pretratamientos



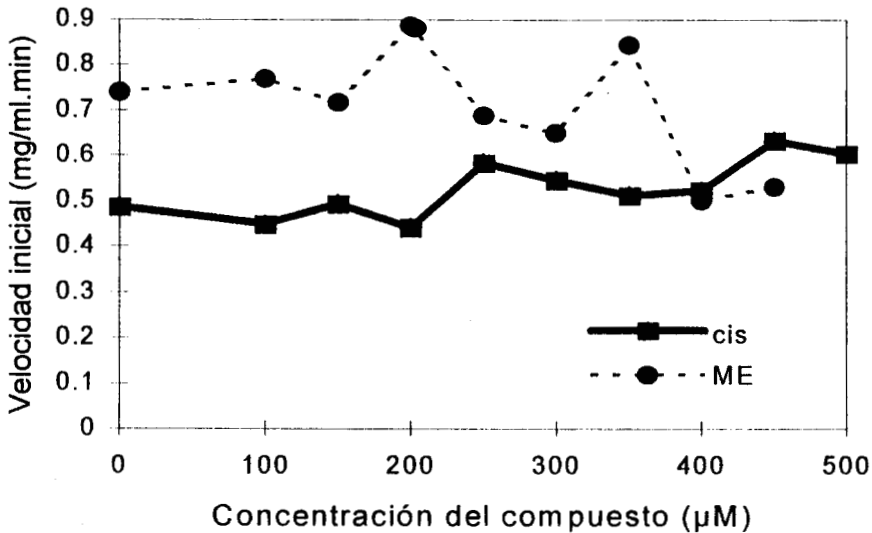
Al analizar los datos anteriores con una prueba de correlación de Pearson se obtuvo un coeficiente de $r = 0.9167$, es decir, el cambio en los grupos -SH explica el 91.67 % del cambio en la actividad enzimática, pudiendo inferir de esta forma que el cambio en la actividad se debe principalmente al cambio en los grupos -SH del suero (figura 7.11.).

7.7. Efecto de la adición de grupos sulfhidrilo exógenos al suero

Con la finalidad de verificar si el efecto del aumento en la exposición de grupos sulfhidrilo puede obtenerse al agregar grupos sulfhidrilo exógenos al medio, se seleccionaron dos compuestos que aportan grupos sulfhidrilo reactivos: la cisteína y el β -mercaptoetanol. Estos compuestos se agregaron al suero en un rango de concentraciones similar al obtenido con los tratamientos térmicos, es decir, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 μM de sulfhidrilo (cada molécula de estos compuesto aporta un grupo sulfhidrilo reactivo).

Los resultados obtenidos al determinar la actividad de lactasa en suero adicionado con sulfhidrilos se muestran en la figura 7.12.

Fig. 7.12. Velocidades iniciales obtenidas en suero adicionado con diferentes concentraciones de cisteína y β -mercaptoetanol.

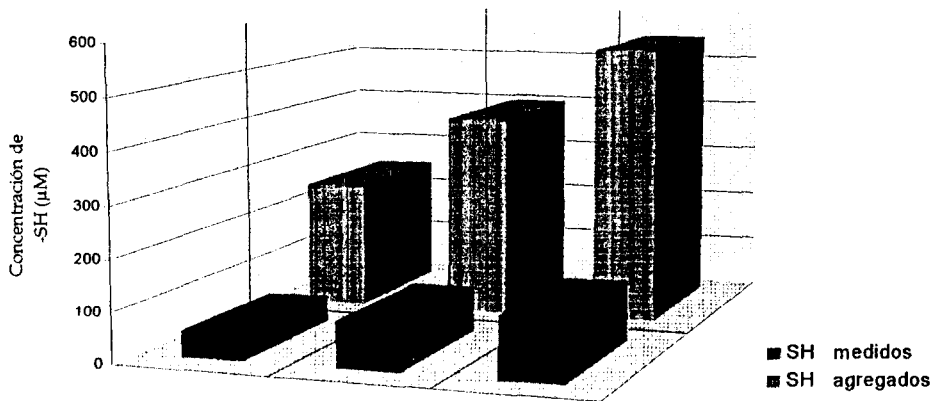


En la figura 7.12. se observa que cuando se agregan grupos sulfhidrilo reactivos a el suero de leche, no hay ningún aumento en la actividad, incluso, cuando se agrega β -mercaptoetanol la actividad tiene una ligera tendencia a disminuir. Esto podría deberse a que cuando se agregan grupos -SH reactivos, éstos reaccionan con los grupos -SH naturales en las proteínas del suero, formando puentes de disulfuro que no pueden activar a la enzima. De esta manera los grupos que aumentarían la actividad en un suero sin ningún tratamiento, se encuentran unidos a otros y así no pueden aumentar la actividad.

La diferencia en las actividades presentadas en suero con cisteína y suero con β -mercaptoetanol podrían deberse a que estos compuestos tienen diferente reactividad: el β -mercaptoetanol, por ser una molécula más pequeña (PM 78.13 g/mol) que la cisteína (PM 121 g/mol) tiene mayor facilidad para reaccionar con los grupos -SH de las proteínas y formar los puentes de disulfuro.

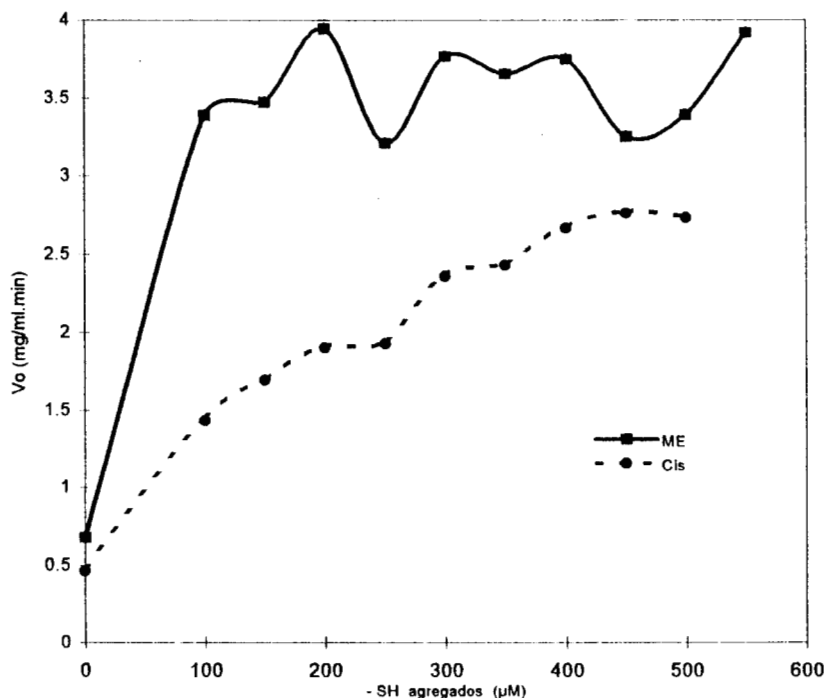
Al medir los grupos -SH reactivos en los sueros a los que se había agregado cisteína se observó que la concentración era significativamente menor a la que se había agregado (figura 7.13.), confirmando la hipótesis de que los grupos -SH agregados reaccionaron con los grupos -SH de las proteínas del suero.

Fig. 7.13. Comparación de grupos sulfhidrilo agregados (cisteína) y grupos sulfhidrilo medidos en suero



Para determinar si el efecto observado se debía a una interacción de los grupos agregados con las proteínas del suero, se agregaron los mismos compuestos y en las mismas concentraciones a una solución amortiguadora que no contenía proteínas y se midió la actividad de la enzima. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 7.14.

Fig. 7.14. Velocidades iniciales obtenidas en solución amortiguadora adicionada con β -mercaptoetanol o cisteína.

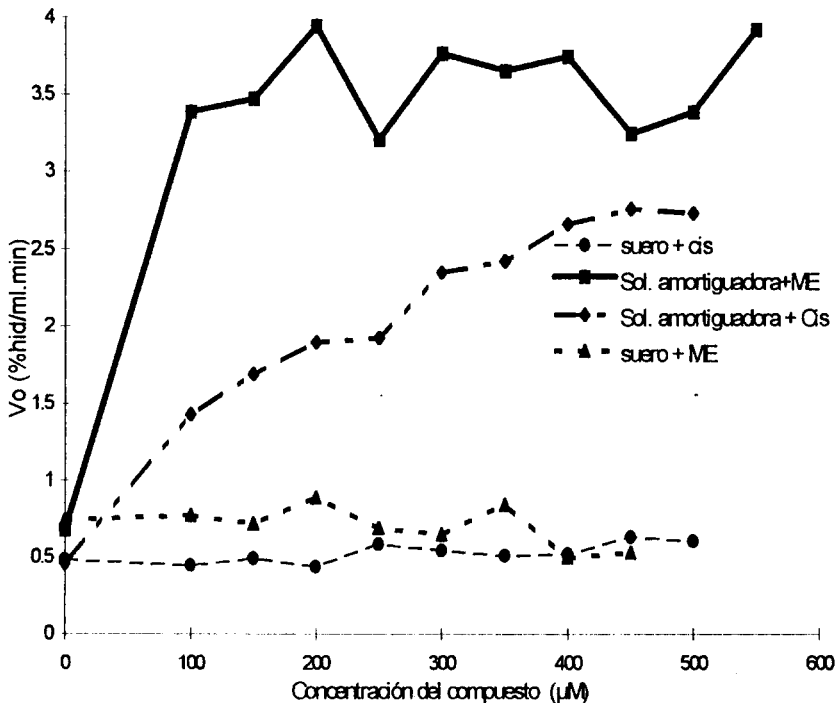


En estos casos se observó un claro aumento en la actividad altamente correlacionado con la concentración de los grupos sulfhidrilo agregada (figura 7.14.). Para el caso del β -mercaptoetanol la actividad aumentó más drásticamente que con la cisteína, lo que podría deberse a la alta reactividad del β -mercaptoetanol, en comparación con la cisteína.

Al comparar la actividad encontrada en suero adicionado con grupos -SH con aquella obtenida en una solución amortiguadora con la misma cantidad de grupos -SH (figura 7.15), es claro que en el medio sin proteína la actividad aumenta de manera directamente proporcional a la concentración de grupos -SH.

En el suero, en cambio, la actividad prácticamente no cambia, lo que puede explicarse por el hecho de que se encuentran presentes proteínas con grupos -SH disponibles que reaccionan con los grupos -SH exógenos formando puentes de disulfuro, y por lo tanto no son capaces de aumentar la actividad enzimática.

Fig. 7.15. Comparación de velocidades iniciales obtenidas en suero y solución amortiguadora con diferentes cantidades de grupos -SH exógenos agregadas.



8. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente proyecto puede concluirse que:

- Al quelar el calcio de la leche se observa un aumento en la actividad de lactasa, sin embargo, este no es comparable con el obtenido por el tratamiento térmico de la leche, por lo que se infiere que el calcio no es la razón principal del aumento en la tasa de reacción de la enzima cuando este alimento se somete al calentamiento.

- El tratamiento térmico de la leche previo a la hidrólisis aumenta la actividad de la enzima β -galactosidasa principalmente a temperaturas relativamente bajas (55 y 65 °C). Mientras que en suero el mayor aumento se observa con un pretratamiento de 85 °C durante 30 minutos.

- El cambio en la actividad observado en la leche puede explicarse por algún cambio en las propiedades del sistema, principalmente en la fase protéica, como la exposición de grupos sulfhidrilo antes de que se presente la reacción de "forewarming" que se da entre los grupos -SH de la β -lactoglobulina y la κ -caseína cuando la leche se calienta a temperaturas mayores a 65 °C.

- El cambio en la actividad de la enzima β -galactosidasa al pretratar el suero está altamente correlacionado a la exposición de grupos sulfhidrilo y a la desnaturalización y/o precipitación de algunas proteínas (principalmente la β -lactoglobulina), como se demuestra en los patrones electroforéticos obtenidos en gel no desnaturalizante.

- Al desnaturalizarse gradualmente, las proteínas adoptan la conformación energéticamente más estable, y ésta puede esconder a algunos grupos reactivos (particularmente grupos -SH reactivos) y de esta forma no aumentar la tasa de reacción.

- Al desnaturalizarse completamente por un tratamiento térmico drástico, la proteína expone sus grupos -SH, aumentando de esta forma la actividad enzimática.

- El comportamiento de la actividad está estrechamente ligado a el contenido de grupos -SH reactivos presentes en el suero, y varía en forma proporcional a estos.

- Al agregar grupos -SH exógenos al suero estos reaccionan con los grupos presentes en la β -lactoglobulina formándose puentes de disulfuro, los cuales no poseen la capacidad de aumentar la actividad enzimática.

- Al agregar grupos -SH exógenos (cisteína o β -mercaptoetanol) a una solución amortiguadora, la actividad de la β -galactosidasa aumentará de manera proporcional a la concentración de grupos -SH agregados, hasta llegar a un cierto límite, posiblemente por la saturación de la enzima.

9. REFERENCIAS

- Alais, C., 1991, **Ciencia de la leche, principios de Técnica lechera**, edit. CECSA, México, D.F.
- Badui, D. S., 1990, **Química de los Alimentos**, edit. Alahmbra-Universitaria, México, D.F.
- Britten, M., Giroux, H.J. y Gaudin, V., 1994, **Effect of pH during heat processing of partially hydrolyzed whey protein**, J. Dairy Sci., 77, 676-684.
- Byeong S, Mahoney R., 1989, **Purification and thermostability of β -galactosidase from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus***, J. Dairy Res., 56, 117-127.
- Carbonaro, M., Bonomi, F., Iametti, S. y Carnovale, E., 1996, **Modifications in disulfide reactivity of milk induced by different pasteurization conditions**, J. Food Sci., 61 (3), 495-499,509.
- Chang, B.S. y Mahoney R.R., 1989, **Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from an autolytic strain of *Streptococcus salivarius subsp thermophilus***, J. Dairy Res., 56, 117-127.
- Chen J.Y, Tsen H. Y., 1991, **Effect of milk and milk constituents on heat stability of lactase from *Saccharomyces lactis***, J. Chinese Agric. Chem. Soc., 29(4), 456-464.
- 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
- Elfagm, A.A. y Wheelock, J.V., 1978, **Heat interaction between α -lactalbumin, β -lactoglobulin and casein in bovine milk**, J. Dairy Sci., 61, 159-163.
- Evans, M.T.A. and Gordon, J.F., 1980, **Cap. 2: Whey Proteins**, en Applied Protein Chemistri, editor Grant, R.A., Applied Science Publishers, Essex, U.K.
- Fox, P.F., 1989, **Cap. 1: The Milk Protein System**, en Developments in Dairy Chemistry-4, editor Fox, P.F., ed. Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- García-Garibay M., Gómez-Ruiz L., Revah Moissev S., 1993, **Cap. 9: Biotecnología de productos lácteos**, en Biotecnología Alimentaria, editores: García-Gariby Mariano, Quintero Ramírez Rodolfo y López Munguía Agustín, Limusa, México, D.F.

- García-Garibay, M., Gómez.-Ruíz, L., 1996, **Usos de β -galactosidasas microbianas para reducir el contenido de lactosa en leche y productos lácteos**, Rev. Invest. Clin., Suplemento 48, 51-61.
- Giacin, J.R., Jakubowski, J., Leeder, J.G. y Kleyn, D.H., 1974, **Characterization of lactase immobilization on collagen: conversion of whey lactose by soluble and immobilized lactase**, J. Food Sci., 39, 751-754.
- Goldenberg, D.P., 1990, **Cap 10. Analysis of protein conformation by bel electrophoresis**, en Protein structure: A practical approach, editor: Creighton, T.E., IRL Press, Oxford, U.K.
- Green M.L., Scott, K.J., Anderson, M., Griffin, M.C.A., y Glover, F.A., 1984, **Chemical characterization of milk concentrated by ultrafiltration**, J. Dairy Res., 51, 267-278.
- Greenberg N.A., Mahoney R.R., 1983, **Effect of milk constituents on the activity and stability of lactase of *Streptococcus thermophilus***, Proceedings of the 6th International Congress of Food Science and Technology, 2, 34-35.
- Greenberg N.A., Mahoney R.R., 1984, **The activity of lactase *Streptococcus thermophilus* in milk and whey**, Food Chemistry, 15(4), 307-313.
- Greenberg, N.A., Wilder, T., y Mahoney, R.R., 1985, **Studies on thermostability of lactase (*Streptococcus thermophilus*) in milk and sweet whey.**, J. Dairy Res., 52, 439.
- Guy E.J. y Bingham, E. W., 1978, **Properties of β -galactosidasas of *Saccharomyces lactis* in milk and milk products**, J. Dairy Sci., 61, 147-151.
- Haiming Zhu y Srnivasan Damodaran, 1994, **Heat induced conformational changes in whey protein isolate and its relation to foaming properties**, J. Agric. Food Chem., 42 (4), 846-855.
- Hames, B.D., y Rickwood, D., 1981, **Gel electrophoresis of proteins: A practical approach**, edit. IRL press, England, 1-86, 189-217.
- Haque Z. y Kinsella, J.E., 1987 a), **Interaction between κ -casein and β -lactoglobulin: Effect of calcium.**, Agric. Biol. Chem., 51 (7), 1997-1998.
- Haque, Z. y Kinsella, J.E., 1987 b), **Heat-induced changes in the hydrophobicity of κ -casein and β -lactoglobulin**, Agric. Biol. Chem., 51 (8), 2245-2247.
- Haque, Z., Kristjansson, M.M. y Kinsella, J.E., 1987, **Interactions between κ -casein and β -lactoglobulin: Effects of anions on covalent stabilization of the complex**, Agric. Biol. Chem., 51 (7), 1799-1803.
- Hazumoto Hashizume y Tetsuo Sato, 1988, **Gel forming characteristics of milk proteins. 2. Roles of sulfhydryl groups and disulfide bonds.**, J. Dairy Sci., 71, 1447-1454.

- Hillier, R.M. y Lyster R.L.J., 1979 a), **Whey protein denaturation in heated milk and cheese whey**, J. Dairy Res., 46, 95-102.
- Hillier, R.M., Lyster, R.L.J. y Cheeseman, G.C., 1979 b), **Thermal denaturation of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in cheese whey: effect of total solids concentration and pH**, J. Dairy Res., 46, 103-111.
- Holsinger V.H. y Kligerman, A.E., 1991, **Applications of lactase in dairy foods and other foods containing lactose.**, Food Technol., January, 92-95.
- Iametti, S., Cairoli, S., De Gregori, B. y Bonomi, F., 1995, **Modifications of high-order structures upon heating of β -lactoglobulin: dependence on the protein concentration.**, J. Agric. Food Chem., 43, 53-58.
- Jackson, E.H. y Jelen, P., 1989, **Comparison of acid and neutral lactases fo batch hydrolysis of lactose in whey**, Milchwissenschaft, 44 (9), 544-546.
- Jelen, P. y Buchheim, W., 1984, **Stability of whey protein upon heating in acidic conditions**, Milchwissenschaft, 39 (4), 215-218.
- Kinsella, J.E., Whitehead, D.M., Brady, J. And Bringe, N.A., 1989, **Cap. 2: Milk Proteins: Possible Relationships of Structure and Function**, Developments in Dairy Chemistry-4, editor Fox, P.F., Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- Kosikowski F. y Wiezbicki L., 1973, **Lactose hydrolysis of raw and pasteurized milks by *Saccharomyces lactis* lactase**, Journal of Dairy Science, 56 (1), 146-148.
- López, P., Rosado, J.L., Palma, M., González, C., Valencia, M., 1996, **Malá digestión de lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de la leche**, Rev. Invest. Clin, Suplemento 48, 15-22.
- Ludescher, R.D., 1990, **Molecular dynamics of food proteins: experimental techniques and observations.**, Trends Food Sci. Technol., December, 145-149.
- Mahoney R.R. y Adamchuk C., 1980, **Effect of milk constituents on the hydrolysis of lactose by lactase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Sci., 45, 962-968.
- Mahoney R.R., 1980, **Number and nature of the sulphhydryl groups of β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***, J. Food Biochem., 4, 189-199.
- Morr, C.V., 1987, **Effect of HTST Pasteurization of milk, cheese whey and cheese whey UF retentate upon the composition, physicochemical and functional properties of whey protein concentrates**, J. Food Sci., 52 (2), 312-316.

- Sfortunato, T y Connors, W.M., 1958, **Conversion of lactose to glucose and galactose with a minimum production of oligosaccharides**, U.S. patent No. 2,826,502
- Shimada, K. y Cheftel, J.C., 1988, **Texture characteristics, protein solubility, and sulfhydryl group/disulfide bond contents of heat induced gels of whey protein isolate**, J. Agric. Food Chem., 36, 1018-1025.
- Singh Harjinder, 1994, **Cross-linking of milk proteins on heating concentrated milk at 120 °C**, Int. Dairy J., 477-489.
- Singh, H. y Fox, P.F., 1987, **Heat stability of milk: role of β -lactoglobulin in the pH dependen dissociation of micellar κ -casein**, J. Dairy Res., 54, 509-521.
- Taylor, M.J. y Richardson, T., 1980, **Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups**, J. Dairy Sci., 63, 1783-1795.
- Tonyi A., Rouleau D., y Mayer R., 1987, **The effects of whey cations on the kinetic parameters of a model for the enzymic hydrolysis of lactose**, J. Chem. Tech. Biotechnol., 37, 153-168.
- Van Dam, B., Revallier-Warfemins, y Van Dam-Schermerhorn, 1950, **Preparation of lactase from *Saccharomyces fragilis***, Neth Milk Dairy J., 4, 96.
- Vega Franco, L., 1996, **Deficiencia secundaria de lactasa en niños y sus implicaciones epidemiológicas**, Rev Invest. Clin., Suplemento 48, 33-46.
- Wendorf W. L. , Amundson C.C., y Olson N.F., 1970, **The effect of heat treatment of milk upon the hydrolyzability of lactose by the Enzyme lactase**, J. Milk Food Technol., 22 (9), 377-379.
- Wendorff, W.L., Amundsen, C.H., Olson, N.F., y Garver, J. C., 1971, **Use of yeast β -galactosidase in milk and milk products**, J. Milk Food Technol., 34 (6), 294

- Mulvihill, D.M. and Fox, P.F., 1989, **Cap. 4: Physico-Chemical and Functional Properties of Milk Proteins**, en *Developments in Dairy Chemistry-4*, editor Fox, P.F., ed. Elsevier Science Publishing Co., INC, Essex, U.K.
- Nötzold, H., Schlegel, B., Breiffeld, D. y Freimuth, U., 1977, **Zur alkalibehandlung von Proteinen. 1. Mitt. Das Verhalten der Sulfhydryl und Disulfidgruppen in alkalibehandeltem β -Lactoglobulin und α -Lactalbumin**, *Nahrung*, 21 (8), 697-704.
- Palma, M., Rosado, J.L., López, P., González, C., Valencia, M., 1996, **Intolerancia a la lactosa. Su definición, su prevalencia en México y sus implicaciones en el consumo de leche**, *Rev. Invest. Clin. Suplemento* 48, 25-31.
- Park, K.H. y Lund, D.B., 1984, **Calorimetric study of thermal denaturation of β -lactoglobulin**, *J. Dairy Sci*, 67, 1699-1706.
- Parnell-Clunies, E., Kakuda, Y., Irvine, D., Mulleh, D., 1988, Heat-induced protein changes in milk processed by vat and continuous heating systems, *J. Dairy Sci*, 71, 1472-1483.
- Parris, N., Purcell, J.M. y Ptashkin, S.M., 1991, **Thermal denaturation of whey proteins in skim Milk**, *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2167-2170.
- Patrick, P.S., y Swaisgood, H.E., 1976, **Sulfhydryl and disulfide groups in skim milk as affected by direct ultra high temperature heating and subsequent storage**, *J. Dairy Sci.*, 59 (4), 594-560.
- Pivarnik L y Rand A., 1992, **Assay conditions effect on β -galactosidase activity from *Kluyveromyces lactis***, *J. Food Sci.*, 57(4).
- Reed, G., 1966, **Enzymes in food processing**, p. 98, Academic press, N.Y.
- Riel, R., 1991, **Cap. 1: Composición y estructura de la leche**, en *Ciencia y Tecnología de la Leche*, editor: Amiot, J. Acribia, Zaragoza, España.
- Rosado, J.L., González, C., Valencia M.E., López, P., Palma, M., López, B., 1994 a) **Lactose maldigestion and milk intolerance: a study in rural and urban México using physiological doses of milk**, *J. Nutr.*, 124, 1051-1059.
- Rosado, J.L., López, P., Palma, M., 1994 b), **Mala digestión e intolerancia a la lactosa en adultos mexicanos. Importancia de evaluarlas con dosis habituales de leche**, *Rev Invest. Clin.* 46, 203-208.
- Schmidt, K. y Mc Neill, V., 1993, **Effect of heat treatments on the functional properties of caseinate and whey protein isolate solutions**, *Milchwissenschaft*, 48 (1), pp. 3-6.
- Schmidt, R.H. y Morris, H.A., 1984, **Gelation properties of milk proteins, soy proteins, and blended protein systems**, *Food Technol.*, Mayo, 85-93.