

Interacción de la β -galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* con proteínas de leche

Mariano García-Garibay, Judith Jiménez-Guzmán, Lorena Gómez-Ruiz, Gabriela Rodríguez-Serrano, Alma E. Cruz-Guerrero, Agustín López-Munguía², Elizabeth Del Moral-Ramírez, Carmen Pérez-Monroy, Salvador Tello-Solís¹, Christian Sarabia-Leos

Departamento de Biotecnología y ¹Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa;

²Instituto de Biotecnología, UNAM. Tel: 5804-4720 Fax: 5804-4712 E-mail: jmgg@xanum.uam.mx

Palabras clave: β -galactosidasa, docking molecular, succinilación, lactosilación

Introducción. Desde 1958 se descubrió que el tratamiento térmico de la leche, previo a la hidrólisis de la lactosa, aumenta la actividad de la lactasa. Esto fue estudiado y corroborado en la mayoría de los casos en leche y en suero en los años 1970s por varios grupos de investigadores. Para explicar el fenómeno se habían planteado varias posibles explicaciones, como que el efecto se debe a la destrucción de un inhibidor termolábil, o a un cambio en el equilibrio salino de la leche, o bien, a la desnaturalización térmica de las proteínas; sin embargo, ninguna de estas hipótesis pudo ser demostrada.

Resultados y discusión.

En una primera etapa del proyecto, se comprobó que el calentamiento de la leche sí produce un aumento en la actividad de la lactasa. El calentamiento del suero, por otro lado, causó una disminución de la actividad entre 55 y 75°C, pero un aumento de la misma al calentarlo a 85°C. Se observó que la β -lactoglobulina (β -lg) sufre cambios conformacionales fuertes a las temperaturas probadas y debido a esto expone y/o libera grupos SH al medio. Al determinar la concentración de SH en el suero y correlacionarla con el cambio en la actividad de la enzima, se comprobó que éstos son capaces de aumentar la actividad de la lactasa.

Por otro lado, al comparar los patrones de actividad obtenidos en suero y permeado de suero calentado se observó que existen diferencias significativas entre los dos substratos, sugiriendo que además del efecto activador de los sulfhidrilos, se producen efectos adicionales por las proteínas del suero. Se determinó entonces que la sola presencia de β -lg y seroalbúmina (sin calentamiento) en el medio de reacción son capaces de aumentar la tasa de hidrólisis de lactosa, y que durante el calentamiento (independientemente de la temperatura) en presencia de lactosa, la β -lg se glicosila, perdiendo con ello su capacidad activadora.

Utilizando β -lg o β -lactoglobulina lactosilada como ligando en cromatografía de afinidad se determinó que la β -galactosidasa se une fuertemente a la β -lg. Este podría ser el mecanismo por el cual se da la activación de la enzima. Se determinó también que cuando la β -lg se lactosila disminuye su capacidad de unirse a la enzima, lo que se traduce en la disminución de su capacidad activadora. Algunos de los grupos más reactivos de la β -lg son los ϵ -NH₂ siendo el de la lisina 47 el más expuesto, de acuerdo a reportes de otros grupos relacionados con la lactosilación de ésta proteína.

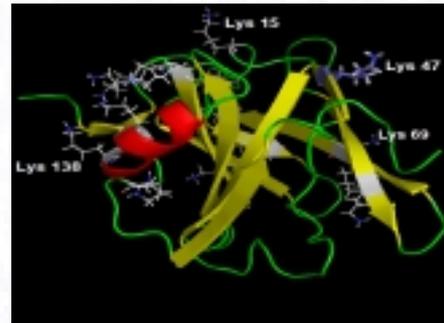


Fig. 1. Modelo tridimensional de la β -lg dibujada con el programa PyMOL, De Lano Scientific LLC, 2007. Se muestran los grupos amino más susceptibles de reaccionar.

Modificaciones en el pH de interacción entre la β -lg o β -lactoglobulina lactosilada con la enzima sustentan también la hipótesis de que la interacción se da a partir de los grupos amino de la β -lg. Evidencias adicionales obtenidas bloqueando las lisinas de esta proteína con anhídrido succínico demuestran que estos aminoácidos están involucrados en la activación de la enzima.

A pesar de que reportes previos de los trabajos de lactosilación apuntaban a la lisina 46 como la más reactiva, el docking molecular mostró que el sitio de unión de más baja energía, y por lo tanto el más probable de interacción es el grupo amino de la lisina 138 de la β -lg; esto implica en principio que puede haber más de un grupo amino con alta reactividad, y por lo tanto, varios posibles puntos de unión con la enzima.

Experimentos adicionales de cromatografía de afinidad usando seroalbúmina como ligando, demostraron también que existe una interacción entre esta proteína y la enzima, sin embargo, el mecanismo de activación podría ser distinto al de la β -lg.

Bibliografía.

1. Judith Jiménez-Guzmán, Alma E. Cruz-Guerrero, Gabriela Rodríguez-Serrano, Agustín López-Munguía, Lorena Gómez-Ruiz and Mariano García-Garibay. Enhancement of Lactase Activity in Milk by Reactive Sulfhydryl Groups Induced by Heat Treatment. *Journal of Dairy Science* 85(10), 2497-2502 (2002).
2. Judith Jiménez-Guzmán, Christian Sarabia-Leos, Alma Cruz-Guerrero, Gabriela Rodríguez-Serrano, Agustín López-Munguía, Lorena Gómez-Ruiz and Mariano García-Garibay. Interaction between β -lactoglobulin and lactase and its effect on enzymatic activity. *International Dairy Journal*. 16(10), 1169-1173, (2006).