



**Universidad**  
Zaragoza

Grado en Nutrición Humana y Dietética

## Trabajo Fin de Grado

Obtención y caracterización de proteínas de leche bovina con actividad antimicrobiana.

*Isolation and characterization of bovine milk proteins with antimicrobial activity.*

Autor/es

**Andrea Sangüesa Romera**

Director/es

M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Panigua. Área de Tecnología de los Alimentos

Fecha de presentación

17/09/2018

Facultad de Ciencias de la Salud y del Deporte

2018

## Resumen

La leche es un alimento muy completo nutricionalmente, la cual contiene compuestos activos con propiedades biológicas y tecnológicas. Entre ellos cabe destacar a proteínas que tienen carácter antimicrobiano frente a agentes patógenos, como son la lactoferrina y las inmunoglobulinas, presentes en el lactosuero, y la lactadherina y la mucina presentes en los glóbulos grasos de la leche. Dichas proteínas son de gran interés para su adición a las fórmulas infantiles con el fin de reducir el riesgo de infección por agentes patógenos, ayudando a regular la defensa intestinal del recién nacido. *Cronobacter sakazakii* es un patógeno emergente que preocupa a la industria de la alimentación, puesto que puede producir infecciones afectando a diferentes grupos de edad, desde niños prematuros hasta personas inmunodeprimidas. El objetivo de este trabajo de fin de grado ha sido el aislamiento y caracterización de las fracciones y proteínas lácteas, y en concreto, fracciones enriquecidas en lactoferrina, lactadherina y mucina. El aislamiento de las fracciones lácteas (mazada y lactosuero) se realizó a partir de leche cruda de vaca y la purificación de proteínas, como la mucina y lactadherina, a partir de mazada, y la lactoferrina a partir de lactosuero. Una vez obtenidas dichas fracciones enriquecidas, el objetivo principal propuesto de este trabajo ha sido la evaluación de la actividad antimicrobiana de la lactoferrina, mucina y lactadherina a diferentes concentraciones, a las 4 y 24 horas de incubación, frente al patógeno *C. sakazakii*. La reducción del crecimiento bacteriano fue diferente según los tiempos de incubación, reduciéndose en un 71,42% la actividad infecciosa del microorganismo a las 4 horas de incubación, en el caso de la lactoferrina. Observando de este modo, un mayor efecto de la actividad antimicrobiana de la lactoferrina a tiempos cortos de incubación con *C. sakazakii*.

# Índice:

<b>1. Abreviaturas</b>	1
<b>2. Introducción</b>	2
<b>2.1 Composición de la leche</b>	2
<b>2.2 Proteínas de la leche de vaca</b>	3
2.2.1 Caseínas	3
2.2.2 Proteínas del lactosuero	4
<b>2.3 Membrana del glóbulo graso (MFGM)</b>	6
2.3.1 Composición, función y estructura	6
2.3.2 Proteínas de MFGM	7
<b>2.4 <i>Cronobacter sakazakii</i></b>	8
<b>3. Objetivos</b>	10
<b>4. Materiales y métodos</b>	11
<b>4.1 Desnatado de leche cruda de vaca</b>	11
<b>4.2 Obtención del lactosuero</b>	11
<b>4.3 Obtención de la mazada</b>	11
<b>4.4 Obtención del butter serum</b>	12
<b>4.5 Aislamiento de fracciones y proteínas a partir de leche bovina</b>	12
4.5.1 Aislamiento de una fracción enriquecida en MFGM	12
4.5.2 Aislamiento de lactadherina	13
4.5.3 Aislamiento de lactoferrina	13
4.5.4 Aislamiento de mucina	14
<b>4.6 Técnicas electroforéticas</b>	15
4.6.1 Preparación de los geles de poliacrilamida	15
4.6.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	15
<b>4.7 Técnicas de tinción</b>	15
4.7.1 Tinción con azul de Coomassie	15
4.7.2 Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)	16
<b>4.8 Preparación de medios de cultivo</b>	16

4.9 Cultivo y conservación de <i>Cronobacter sakazakii</i>	17
4.10 Preparación de lactoferrina bovina nativa	17
4.11 Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i>	18
4.12 Determinación de la concentración de proteína, test BCA	18
4.13 Análisis estadístico de los resultados	19
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>20</b>
5.1 Aislamiento y caracterización de fracciones lácteas	20
5.2 Homogeneización de las fracciones	21
5.3 Aislamiento de lactadherina	22
5.4 Aislamiento de mucina	23
5.5 Aislamiento de lactoferrina	25
5.6 Ensayo de actividad antibacteriana frente a <i>C. sakazakii</i>	26
5.6.1 Actividad antibacteriana de lactoferrinas bovinas comerciales	26
5.6.2 Actividad antibacteriana de mucina y lactadherina	28
<b>6. Conclusiones</b>	<b>29</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>30</b>

# 1. Abreviaturas

**ANOVA:** analysis of variance (análisis de varianza)

**APS:** ammonium persulfate (persulfato amónico)

**BCA test:** bicinchoninic acid test (test del ácido bicinconínico)

**BSA:** bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)

**CM:** carboximetil

**EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético

**EGF:** epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)

**FL:** fosfolípidos

**Ig:** inmunoglobulina

**MFGM:** milk fat globule membrane (membrana del glóbulo de grasa de la leche)

**MUC1:** mucina-1

**MUC15:** mucina-15

**PAS:** periodic acid Schiff (ácido peryódico de Schiff)

**PBS:** phosphate buffered solution (tampón fosfato, pH 7,4)

**SDS:** sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis (electroforesis con SDS en gel de poliacrilamida)

**TEMED:** Tetramethylethylenediamine (tetrametiletildiamina)

**TSA:** tryptic soy agar (agar tripticasa de soja)

**TSB:** tryptic soy broth (caldo tripticasa de soja)

**UFC:** unidades formadoras de colonias

**YE:** yeast extract (extracto de levadura)

## 2. Introducción

### 2.1. Composición de la leche

Según el Codex Alimentarius (CODEX STAN 206-1999), la leche se define como la secreción mamaria normal de los animales de ordeño obtenidos a partir de uno o más ordeños sin adición ni extracción, destinados al consumo como leche líquida o para su posterior procesamiento. Asimismo, el Reglamento (CE) nº 853/2004 establece que la leche cruda es producida por la secreción de la glándula mamaria de animales de abasto que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40°C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente.

La leche es un alimento completo debido a una gran cantidad de macronutrientes y micronutrientes que la hacen ser esencial para la nutrición y desarrollo de las crías de los mamíferos. La composición de leche es similar en todos los mamíferos en lo que se refiere a los principales componentes: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales (Claeys et al. 2014). Sin embargo, la concentración de cada uno de ellos, varía según la especie, adaptándose a las necesidades del recién nacido, tal y como se muestra en la siguiente tabla. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Composición general de la leche de varias especies (Gantner 2015).

Leche	MST (g/100 g)	Grasa (g/100 g)	Proteína (g/100 g)	Lactosa (g/100 g)	Ceniza (g/100 g)	Energía (kJ/100 g)
Humana	10-13	2,1-4,0	0,9-1,9	6,3-7,0	0,2-0,3	270-209
Yegua	9-12	0,4-7,2	1,3-2,0	6,0-7,2	0,3-0,5	109-210
Mona	8-12	0,3-1,8	1,4-2,0	5,8-7,4	0,3-0,5	160-180
Búfala	16-17	5,3-15,0	2,7-4,7	3,2-4,9	0,8-0,9	420-480
Vaca	12-13	3,3-6,4	3,0-4,0	4,4-5,6	0,7-0,8	270-280
Cabra	12-16	3,0-7,2	3,0-5,2	3,2-4,5	0,7-0,9	280-290
Oveja	18-20	4,9-9,0	4,5-7,0	4,1-5,9	0,8-1,0	410-440

\* MST: *Materia seca total*

El principal **carbohidrato de la leche** es la lactosa, que comprende alrededor del 99% de los carbohidratos de la leche. Es un disacárido formado por glucosa y galactosa unidas entre sí, y se encuentra en una concentración de 49 g/L (Guetouache et al. 2014). En adición a la

lactosa, la leche contiene trazas de otros azúcares, incluyendo glucosa, fructosa, glucosaminas, y oligosacáridos, entre otros. Los oligosacáridos están divididos en dos tipos, ácidos y neutros y en el calostro bovino se encuentran en una proporción de aproximadamente 0,7 a 1,2 g/mL (McGrath et al. 2016).

Por otra parte, se encuentran las **proteínas de la leche**, que se clasifican en caseínas, las cuales son insolubles, proteínas del suero de la leche, las cuales son solubles, y las proteínas del glóbulo graso (Madureira et al. 2007). Todas ellas se desarrollarán en apartados posteriores.

La leche también está compuesta por **lípidos**, una de las principales fuentes de energía para los mamíferos recién nacidos durante sus primeros meses de vida. Están formados por pequeñas esferas denominadas glóbulos grasos, los cuales están rodeados por una membrana, llamada membrana del glóbulo graso o MFGM (milk fat globule membrane). La leche bovina contiene alrededor de 3,5 a 5% de lípidos totales, los cuales se encuentran como glóbulos emulsionados, y recubiertos con una membrana derivada de la célula epitelial secretora. Asimismo, se encuentran triacilgliceroles, presentes en el glóbulo graso, y fosfolípidos y esteroides en la membrana del glóbulo graso (Jensen, Ferris y Lammi-Keefe 1991).

## **2.2. Proteínas de la leche bovina**

### **2.2.1. Caseínas**

En la leche, se puede encontrar dos clases principales de proteínas, que se pueden separar en función de su solubilidad a pH 4,6 a 20°C. Bajo estas condiciones, una alta proporción de proteínas, llamadas caseínas, precipitan, mientras que las proteínas que permanecen solubles se conocen como proteínas séricas o del suero (Ginger y Grigor 1999). Las caseínas constituyen aproximadamente el 80% de las proteínas de la leche de vaca.

En la leche bovina se encuentran principalmente cuatro tipos de caseínas,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ . Las caseínas en la leche cruda se ensamblan en estructuras bastante únicas conocidas como micelas de caseína, que son entidades coloidales esencialmente esféricas que incluyen las cuatro especies de caseína, y se mantienen juntas y se estabilizan por propiedades fisicoquímicas únicas como interacciones hidrofóbicas e iónicas (Huppertz, Fox, y Kelly 2017).

### 2.2.2. Proteínas del lactosuero

El lactosuero es el producto que se obtiene tras la separación de las caseínas en la elaboración del queso. El suero o las proteínas séricas son proteínas lácteas solubles que representan aproximadamente el 20% de las proteínas totales de la leche. La  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactalbúmina, proteosa peptona, albúmina sérica bovina e inmunoglobulinas en orden de abundancia, forman las proteínas de lactosuero bovino (Kilara y Vaghela 2017)

La  **$\beta$ -lactoglobulina** es la proteína más prevalente en el lactosuero bovino. Comprende el 10% de la proteína de leche total o aproximadamente el 58% de la proteína de suero de leche. La principal función de esta proteína es el transporte de moléculas hidrofóbicas, como el retinol, los ácidos grasos, la vitamina D o el colesterol (Madureira et al. 2007)

La  **$\alpha$ -lactalbúmina** es la segunda proteína más abundante del lactosuero y su concentración en la leche bovina varía entre 1,2 y 1,5 g/L. Su función principal en la glándula mamaria es la de modular la actividad del enzima galactosiltransferasa en la síntesis de lactosa (Permyakov y Berliner 2000).

La **albúmina sérica bovina** no se sintetiza en la glándula mamaria, sino que se filtra en la leche procedente del torrente sanguíneo. En el plasma sanguíneo, la albúmina es un portador de ácidos grasos libres, y tiene sitios de unión específicos para moléculas hidrófobas que también puede unir en la leche (Brown 1977).

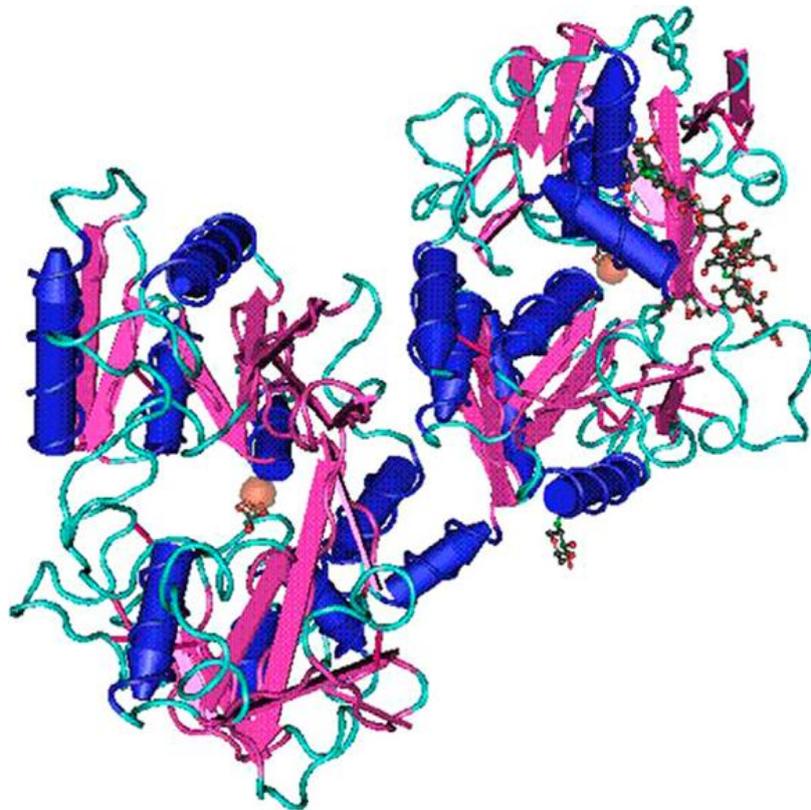
Las **inmunoglobulinas** comprenden al menos el 2% de la proteína de leche total. En la leche se encuentran cuatro tipos diferentes de inmunoglobulinas: IgG1, IgG2, IgA e IgM (Swaisgood 1982). Las inmunoglobulinas transfieren inmunidad cuando se suministran en el calostro, protección que dura en el recién nacido hasta que comienza a crear sus propios anticuerpos (Whitney 1997).

Dentro de las proteínas minoritarias del lactosuero se encuentra, entre otras, la lactoferrina, la cual es producida por las células epiteliales de la glándula mamaria. También se encuentra en las secreciones de las mucosas externas, como las lágrimas, la secreción vaginal, el semen, etc. Es una glicoproteína que pertenece a la familia de las transferrinas, por lo que une hierro y no es una proteína hemo.

La **lactoferrina bovina** tiene un peso molecular de 80 kDa y aproximadamente 700 aminoácidos con una alta homología entre especies. Está compuesta por una cadena polipeptídica, con oligosacáridos unidos covalentemente. Tiene dos lóbulos simétricos N-terminal y C-terminal, cada uno con dos subdominios entre los que se encuentra el sitio de unión para un átomo de hierro,  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , aunque también se ha observado la unión de los

iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Xn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Así mismo, estos dos lóbulos (N y C) están conectados por una región bisagra que tiene una estructura en alfa-hélice, proporcionándole a la molécula cierta flexibilidad (González-Chávez, Arévalo-Gallegos y Rascón-Cruz 2009) (Figura 1).

Debido a las características estructurales de la lactoferrina, está involucrada en diversas funciones fisiológicas, como la regulación de absorción de hierro en el intestino, la participación en la respuesta inmune, actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria, y de protección frente a la infección microbiana producida por un amplio espectro de bacterias, hongos, levaduras, virus y parásitos. La actividad antimicrobiana de la lactoferrina se debe principalmente a dos mecanismos, el primero es el secuestro de hierro en los sitios de infección, que priva al microorganismo de dicho nutriente, y crea así un efecto bacteriostático. El segundo mecanismo, es la interacción directa de la molécula de lactoferrina con la membrana bacteriana, desestabilizándola y creando un efecto bactericida (Adlerova, Bartoskova y Faldyna 2008).

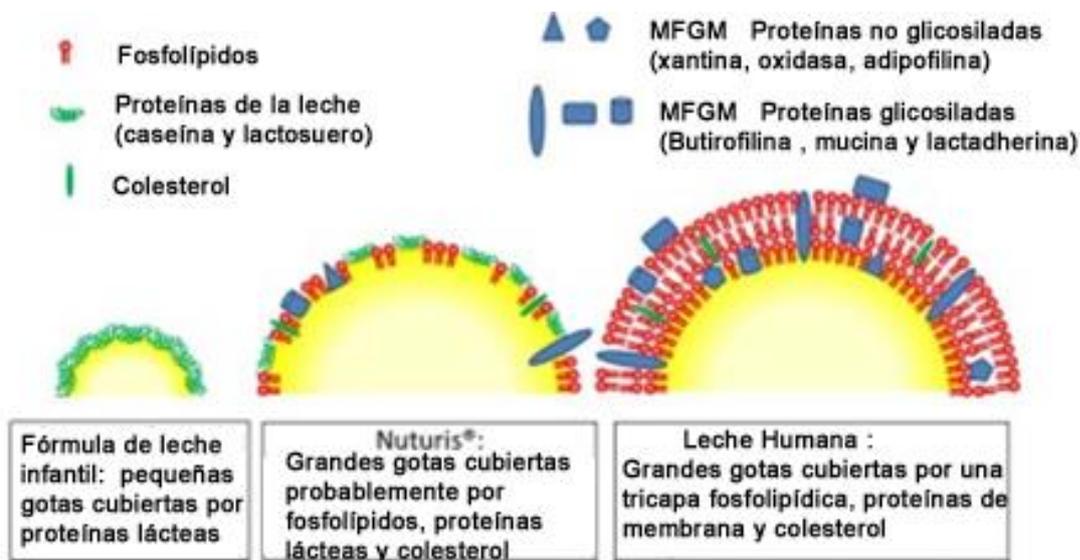


**Figura 1.** Estructura tridimensional de la lactoferrina bovina biférrica a una resolución de 2,8 Angstroms, donde se pueden observar los dos lóbulos y en el interior de cada uno un átomo de hierro representado en color rosado (González-Chávez, S.A. et al. 2009).

## 2.3. Membrana del glóbulo graso (MFGM)

### 2.3.1. Estructura y función

La membrana del glóbulo graso (MFGM) es uno de los componentes de la leche que se produce por la glándula mamaria y se libera a la leche en forma de vesículas. La MFGM rodea el glóbulo de grasa de la leche secretado por las células productoras de leche y tiene una estructura compleja que contiene diversos lípidos, como, por ejemplo, triacilglicéridos, fosfolípidos y colesterol, así como proteínas y otras macromoléculas (Gallier et al. 2015).



**Figura 2.** Distribución de los diferentes lípidos y proteínas presentes en la MFGM, en diferentes tipos de leches (Gallier et al. 2015).

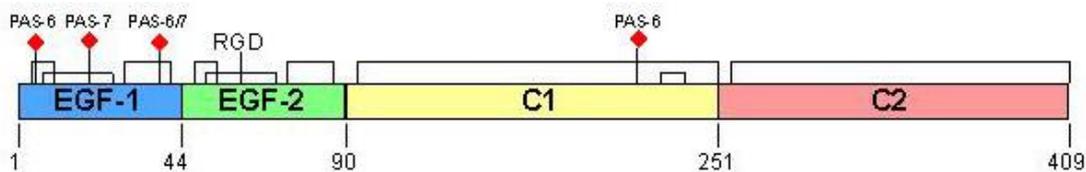
La MFGM se puede describir como un empaquetamiento heterogéneo de una membrana que envuelve una fase líquida, con una distribución asimétrica. El tamaño de los glóbulos grasos también es heterogéneo (0,1 – 10  $\mu\text{m}$ ) y dependiendo de ello, puede haber ciertas variaciones en su composición. Cuando el tamaño del glóbulo graso es menor, el contenido de ácidos grasos de cadena media aumenta y los ácidos grasos de cadena larga saturados disminuyen. Así mismo, en la membrana, disminuye el contenido de fosfatidilcolina y esfingomiélin (Lopez et al. 2011).

En la membrana del glóbulo graso o MFGM se encuentran diferentes proteínas glicosiladas: Muc1, Muc15, CD36, butirofilina y lactadherina, así como esfingolípidos glicosilados que no son digeridos en el intestino y ayudan al desarrollo del microbiota en los niños. Compiten entre ellos y actúan como sitios de unión para muchas bacterias, modificando su adherencia a la mucosa intestinal. También son sustratos a bacterias comensales, como las bifidobacterias (Sando et al. 2009).

Las proteínas y lípidos polares incluidos en los glóbulos grasos regulan las reacciones inflamatorias, debido a la modulación de las citoquinas en la presencia de activadores policlorados, previniendo así de infecciones, apoptosis y de la oxidación. Los compuestos glicosilados de los glóbulos grasos, así como los productos derivados de su hidrólisis, han mostrado actividades antibacterianas, antivirales y antitoxinas (Dewettinck et al. 2008).

### 2.3.2. Proteínas de MFGM

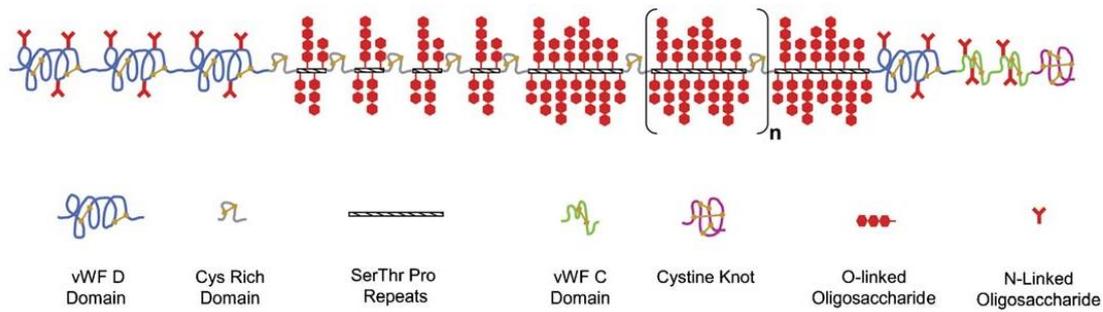
La **lactadherina** es una glicoproteína multifuncional pequeña, compuesta por dos variantes de glicosilación, PAS-6/7 de 53 a 66 kDa presente en la membrana del glóbulo graso. La lactadherina bovina tiene una estructura de dominio de EGF1, EGF2, C1 y C2, donde EGF indica la homología con el dominio del factor de crecimiento epidérmico. Diferentes estudios demuestran que la lactadherina puede actuar como un enlace entre dos superficies uniéndose a los receptores a través de su extremo N-terminal, y a fosfolípidos a través de su extremo C-terminal (Andersen et al. 1997; Andersen et al. 2000).



**Figura 3.** Representación de la estructura de la lactadherina bovina (Hvarregaard et al. 1996).

En la glándula mamaria, la lactadherina es importante para la secreción de los glóbulos grasos de la leche y la eliminación de estos durante la regresión. También, se ha demostrado que la lactadherina tiene actividad atenuante frente a rotavirus y *Escherichia coli* enterotóxica. (Rasmussen et al. 2009, Raymond et al. 2009).

La **mucina** es una glicoproteína extracelular, altamente glicosilada, que está formada por varios tipos, MUC15, MUC1 y MUCX, y tiene un peso molecular que varía de 95 a 200 kDa. El núcleo de la proteína que constituye el 20% del total de la masa molecular, está organizado en distintas regiones. En primer lugar, una región glicosilada central, compuesta por repeticiones en tándem de serina, treonina y prolina (STP). En segundo lugar, ubicados en los terminales N y C, se encuentran proteínas globulares con alta glicosilación en el extremo N-terminal, y regiones ricas en cisteína en el extremo C-terminal, que favorecen la formación de enlaces y favorecen la formación de multímeros (Bansil y Turner, 2016).



**Figura 4.** Estructura de mucina, organizada con los distintos dominios (Bansil y Turner, 2006).

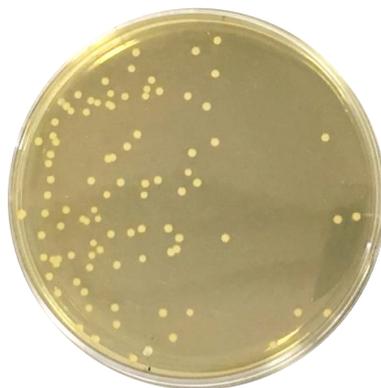
Las mucinas tienen distintas funciones entre las que cabe destacar, su capacidad antimicrobiana frente a microorganismos, desempeñando también un gran papel en la respuesta inmune innata (Kutta et al. 2008).

#### 2.4. *Cronobacter sakazakii*

*C. sakazakii* es un bacilo Gram negativo, el cual pertenece al género *Cronobacter* de la familia de las Enterobacteriaceae. Dentro del género de *Cronobacter* se encuentran diferentes especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. muytjensii*, *C. dublinensis*, *C. universalis* y *C. condimentii* (Joseph et al. 2012).

Es una bacteria móvil, anaerobia facultativa, no formadora de esporas, con flagelos móviles y su tamaño es aproximadamente de 1-3  $\mu\text{m}$ . Es capaz de crecer en un amplio rango de temperaturas, de entre 6 a 47°C, siendo su temperatura óptima de 39°C (Iversen y Forsythe 2003). Asimismo, tiene una gran resistencia a bajas actividades de agua ( $a_w$ ) con un rango de 0,30 a 0,83. Todas estas características le confieren a este patógeno la capacidad de crecer en un gran número de alimentos (Lin y Beuchat 2007).

Las colonias obtenidas en un agar de tripticasa de soja son amarillentas, de consistencia viscosa y lisas. (Figura 5)



**Figura 5.** Colonias aisladas de *Cronobacter sakazakii* en agar de tripticasa de soja.

*Cronobacter sakazakii* es un conocido patógeno oportunista, implicado en diversas enfermedades que amenazan la vida de los seres humanos, como la enterocolitis necrosante, la meningitis, la septicemia y la neumonía, afectando a una amplia gama de edades, pero con un alto riesgo en los recién nacidos prematuros, niños inmunodeprimidos y en neonatos (Joseph et al. 2012). Dicho patógeno se pone en contacto con los humanos a través de la exposición a los alimentos y al medio ambiente. Es transmitido por alimentos, como las fórmulas en polvo para lactantes, fórmulas de continuación, carne, etc. (Song et al. 2018).

El reservorio primario de *Cronobacter sakazakii* es desconocido, pero hay indicios de que estos patógenos podrían ser de origen animal o vegetal. En la industria alimentaria es un peligro emergente debido a su capacidad para resistir condiciones ambientales extremas. Es una preocupación particularmente importante para la industria de las fórmulas de leche infantiles (Yan y Gurtler 2014)

### 3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de fin de grado es la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las proteínas lácteas lactoferrina, una proteína del lactosuero; y lactadherina y mucina, dos glicoproteínas de la membrana del glóbulo graso, frente al patógeno *Cronobacter sakazakii*. Para alcanzar este objetivo, se han desarrollado una serie de objetivos secundarios:

- Obtención y caracterización de lactosuero y mazada de la leche de vaca utilizando diferentes procedimientos.
- Aislamiento por técnicas cromatográficas y caracterización de proteínas bioactivas de la leche: lactoferrina, mucina y lactadherina.
- Cultivo de *Cronobacter sakazakii* y puesta a punto de un ensayo de actividad antibacteriana.
- Evaluación de la actividad antibacteriana de las proteínas lactoferrina, mucina y lactadherina frente a *Cronobacter sakazakii*.
- Comparación de la actividad antibacteriana de dos lactoferrinas bovinas comerciales.

## **4. Métodos**

### **4.1. Desnatado de leche cruda de vaca**

La leche cruda de vaca procedente de la empresa Villacorona (El Burgo de Ebro, España) fue atemperada en una cuba quesera a 50°C y posteriormente, se procedió al desnatado con la centrífuga desnatadora ARR-DES 125 de Suministros Químicos Arroyo (Santander, España), logrando separar la grasa de la leche. La leche desnatada se sometió a un segundo desnatado para recuperar la mayor cantidad de grasa.

Para calcular el porcentaje de la nata obtenida, se utilizó el método Gerber, mediante el cual a partir de ácido sulfúrico y alcohol isoamílico se logra la digestión de las caseínas y la rotura del glóbulo graso, produciendo dos fases diferenciadas. El volumen de grasa se determinó utilizando un butirómetro, estimando así el contenido graso de la nata, tras la corrección realizada según la dilución aplicada a la nata.

Posteriormente, se procedió a homogeneizar la mitad del volumen obtenido de nata a una presión de 250 bares en una sola fase, con un homogeneizador Niro Soavi SP47 (Italia). Esta tecnología reduce y homogeneiza el tamaño de los glóbulos grasos presentes en el producto lácteo, en este caso la nata. El objetivo de aplicar la homogeneización era valorar los posibles cambios que podía producir este proceso respecto a las proteínas de la MFGM, comparando la nata homogeneizada con la nata sin homogeneizar.

### **4.2. Obtención del lactosuero**

La leche desnatada se guardó en refrigeración hasta su calentamiento en una cuba quesera a 35°C, a la que se le adicionó 2,8 mL de cloruro cálcico (Laboratorios Arroyo, Santander, España) para aumentar los niveles de calcio y 1,33 mL de cuajo natural (Laboratorios Arroyo) que produjo la coagulación de las caseínas de la leche. Después de 1 hora se obtuvo la cuajada, que se cortó mediante liras de corte en horizontal y vertical para una mayor obtención del lactosuero retenido en dicha cuajada. Se vació la cuba quesera y se filtró el lactosuero con ayuda de una tela de quesería y un escurridor, eliminando así cualquier resto de cuajada. El lactosuero se congeló a -20°C hasta su uso.

### **4.3. Obtención de la mazada**

A partir de las natas homogeneizada y no homogeneizada obtenidas como se ha indicado anteriormente, se procedió a la obtención de la mazada.

A la nata se le añadió PBS, compuesto por fosfato potásico 1,5 mM, fosfato sódico 8 mM, cloruro potásico 3 mM, cloruro de sodio 0,14 mM, pH 7,4, al que se añadió ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM. Al batir dicha nata a la máxima potencia en una batidora Philips Cucina (Ámsterdam, Holanda), se produjo una inversión de fases, obteniendo así la mazada y la mantequilla. Con la ayuda de gasas de queso que retuvieron los granos de mantequilla, se obtuvo la fase acuosa o mazada retenida en el interior de dicha mantequilla, que llamaremos buttermilk.

Este proceso se realizó de forma separada para la mazada homogeneizada y la no homogeneizada, para una posterior comprobación de las proteínas presentes en cada una de ellas.

#### **4.4. Obtención de butterserum**

La mantequilla procedente de nata homogeneizada y no homogeneizada obtenida anteriormente se calentó en una estufa térmica durante 25 minutos a 50°C. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 4000 x g a 4°C, obteniendo así dos fases diferenciadas. Por una parte, la fase acuosa o el butter serum que se encontraba en la fase inferior, mientras que la parte superior estaba formada por aceite de mantequilla en estado sólido. Se obtuvo el butter serum con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y se congeló a -20°C.

#### **4.5. Aislamiento de fracciones y proteínas a partir de leche bovina**

##### **4.5.1. Aislamiento de una fracción enriquecida en MFGM**

Para el aislamiento de la fracción enriquecida en las proteínas de la membrana del glóbulo graso, se partió de leche bovina cruda, y se desnató dos veces con una centrífuga desnatadora, obteniendo la nata.

La nata se batió hasta la formación de mantequilla, obteniendo la mazada y el butter serum, como se ha indicado anteriormente.

La mazada no lavada y el butter serum se mezclaron en una proporción 7:1, se acidificó el pH hasta 4,8 con HCl 1 M y se agitó durante 30 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugó a 4000 x g durante 30 minutos a 4°C. El precipitado que se obtuvo se resuspendió con agua mili-Q hasta que se disolvió por completo y se reajustó el pH hasta 6,8 con NaOH 1 M, considerándolo la fracción enriquecida en MFGM.

#### **4.5.2. Aislamiento de lactadherina**

El protocolo de aislamiento de lactadherina fue descrito por Kim et al. (1992) y se siguió realizando algunas modificaciones.

La fracción enriquecida en MFGM obtenida como se ha descrito anteriormente, se delipidó con 9 volúmenes de una mezcla de cloroformo y metanol en la proporción 2:1 y se incubó durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Se formó un precipitado que se agitó en el vortex y se añadió 1 volumen de agua mili-Q para romper la emulsión centrifugando la mezcla a 3400 x g durante 15 minutos a 10°C. Tras dicha centrifugación, se recuperó la fracción intermedia entre el metanol, que se encuentra en la parte superior, y el cloroformo, que se encuentra en la parte inferior. Se añadió 1 volumen de agua destilada y se procedió a la eliminación de los solventes orgánicos con ayuda de un rotavapor Laborota 4000 de Heidolph (Schwabach, Alemania).

Seguidamente, la MFGM se resuspendió con NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 x g durante 1 hora a 4°C. Después de la centrifugación, el precipitado obtenido se disolvió en un tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, el cual contenía urea 5 M, KCl 1 M y benzamidina 0,2 mM, como inhibidor de proteasas. Se centrifugó a 40.000 x g durante 30 minutos a 4°C, y se concentró el sobrenadante obtenido mediante dispositivos de ultrafiltración centrífuga de punto de corte de 10 kDa.

La cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel se utilizó para la purificación de la lactadherina previamente obtenida. Se empaquetó la columna de Sephacryl S-200 (3 x 36 cm) y se equilibró con un tampón compuesto por Tris-HCl 0,1 M, KCl 1 M, urea 5 M, y benzamidina 0,2 mM. Se añadió un volumen de muestra concentrada de aproximadamente 1,2 ml a un flujo de 0,2 ml/min, y se recogió un volumen de 1,6 ml por fracción.

La absorbancia de las fracciones obtenidas se determinó a 280 nm en un espectrofotómetro modelo 6505 UV/Vis de Jenway (Stone, Reino Unido). Por último, las fracciones enriquecidas en lactadherina, obtenidas en la cromatografía, se mezclaron y concentraron mediante dispositivos de ultrafiltración centrífuga (Amicon INC., Beverly, MA, EE. UU.) de punto de corte de 10 kDa. Posteriormente, se analizaron mediante electroforesis en SDS.

#### **4.5.3. Aislamiento de lactoferrina**

Se descongeló el lactosuero obtenido como se ha descrito anteriormente y conservado a -20°C, se midió el pH y se ajustó a 6,8.

El lactosuero se dializó en una membrana de diálisis de punto de corte de 12 a 14 kDa Cellu.Sep® de Amicon (Houston, TX, EE.UU.), frente a un tampón compuesto por Tris-HCl

0,015 M, pH 6,8, haciéndose tres cambios de tampón durante 24 h. El suero dializado se incubó con el gel CM-Sepharose equilibrado con el tampón Tris-HCl 0,015 M, pH 6,8, y se dejó una noche en agitación suave, para la unión de las proteínas al intercambiador iónico. Posteriormente, el gel CM-Sepharose se lavó en un embudo sinterizado con el tampón Tris-HCl 0,015 M, pH 6,8 para eliminar las proteínas no unidas, hasta que la absorbancia a 280 nm fue inferior a 0,02.

A continuación, se empaquetó el gel en una columna de 3 x 42 cm y se procedió a la elución de las proteínas retenidas en la misma, primero con 30 mL de tampón Tris-HCl 0,015 M, pH 6,8, con NaCl 0,2 M, y segundo con 30 ml de tampón Tris-HCl 0,015 M, pH 6,8, con NaCl 0,5 M. La elución se realizó con un flujo de 1 ml/min, y las fracciones que se recogieron fueron de 2 ml.

Para concluir, se midió la absorbancia de dichas fracciones a 280 nm, y las fracciones en las que la absorbancia fue alta, se unieron y se procedió a concentrarlas con una célula de ultrafiltración y una membrana de 10 kDa. Posteriormente se analizaron mediante técnicas electroforéticas, citadas más adelante.

#### **4.5.4. Aislamiento de mucina**

El aislamiento de mucina se desarrolló siguiendo el protocolo de Gallier et al. (2012) y Le et al. (2012).

Se partió de mazada conservada a -20°C tras su obtención. En un tubo falcon de 50 mL se prepararon las muestras a degradar enzimáticamente, adicionando 1,54 ml de mazada sin lavar y 18,46 ml de ácido fórmico al 5%, obteniendo así 20 ml de volumen final, con un pH inferior a 2.

A continuación, se procedió al tratamiento con pepsina gástrica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU), enzima encargada de la hidrólisis de las proteínas, la cual se añadió en una proporción 0,4:100 (p/p). Se incubó a 37°C durante 2 horas en agitación suave y pasado este tiempo se inactivó la pepsina ajustando el pH a 7 con NaOH 4 M. Posteriormente, se eliminaron los péptidos utilizando un equipo de ultrafiltración (Amicon INC., Beverly, MA, EE. UU) con una membrana de 30 kDa, obteniendo 2 ml de proteína concentrada.

Las muestras obtenidas se aplicaron siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001) en un volumen de 1,5 mL a una columna de Sepharose CL-2B (90 x 1 cm), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, con NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM y 0,02% de azida sódica. Las fracciones recogidas fueron de 3 mL a un flujo de 0,5 mL/min, determinándose su absorbancia a 280 nm. Las fracciones se caracterizaron por electroforesis, como se describe más adelante.

## **4.6. Técnicas electroforéticas**

### **4.6.1. Preparación de geles de poliacrilamida**

Los geles de poliacrilamida son elaborados a partir de dos tipos de geles de diferente concentración, el primero *resolving* gel al 10% y el segundo, *stacking* gel al 7%.

Para la elaboración del *resolving* gel, se mezclaron 3,3 mL de una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 4,1 mL de agua mili-Q, 2,5 mL del tampón compuesto por Tris- HCl 1,5 M, pH 8,8, y por último, 100 µL de SDS al 10% (p/v).

Antes de cargar el gel en los vidrios, se añadieron 5 µL de TEMED, el cual cataliza la polimerización de la acrilamida, y 50 µL de APS (persulfato amónico) al 10%. Se vertieron 4,5 mL entre los cristales, y posteriormente se añadieron 300 µL de 2 metil-2 butanol para cubrir el gel y evitar su deshidratación. Se dejó solidificar el gel durante 1 hora, se eliminó el alcohol, se lavó la superficie del gel 3 veces con agua mili-Q y se secó con papel Whatmann 3 MM.

A continuación, se preparó el *stacking* gel con una concentración 3-4% inferior al porcentaje del *running* gel, en este caso, al 7%. Se añadieron 1,15 mL de una solución de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 2,55 mL de agua mili-Q, 1,25 mL del tampón compuesto por Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, y, por último, 50 µL de SDS al 10% (p/v). Antes de cargar el gel en los vidrios, se añadieron 5 µL de TEMED y 50 µL de APS (persulfato amónico) al 10%.

### **4.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS**

En primer lugar, las muestras se diluyeron ½ (v/v) en un tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol, 20% de glicerol y 10% de 2-mercaptoetanol y se calentaron durante 5 minutos a 95°C para su desnaturalización. Posteriormente, las muestras se cargaron en los pocillos del gel de poliacrilamida y la electroforesis se desarrolló aplicando un voltaje de 180 V en un equipo Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EE.UU.)

## **4.7. Técnicas de tinción**

Dependiendo del tipo de proteínas presentes en la muestra, se utilizaron dos tipos de tinciones diferentes.

### **4.7.1. Tinción con azul de Coomassie**

Tras realizar la electroforesis, el gel de poliacrilamida se cubrió con colorante azul de Coomassie, compuesto por 0,65 g de Coomassie Blue R, 300 mL de metanol, 100 mL de

ácido acético, 100 mL de glicerol y 500 mL de agua destilada, y se dejó en agitación suave durante 1 hora. A continuación, se retiró el colorante y se añadió el decolorante compuesto por 250 mL de metanol, 80 mL de ácido acético, 20 mL de glicerina y 650 mL de agua destilada. Se dejó en agitación durante 1 hora y se retiró. Por último, se cubrió el gel con el mismo decolorante y se dejó hasta que las zonas en las que no había proteína quedaron incoloras.

#### **4.7.2. Tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS)**

La tinción con ácido peryódico de Schiff se utilizó para la visualización de las glicoproteínas.

Primero, el gel se cubrió con 50 mL de una solución de fijación constituida por ácido acético, metanol y agua destilada (10:35:55, v/v/v) y se mantuvo durante toda una noche a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, se retiró dicha solución y se añadió una solución de peryodato preparada con 0,35 g de ácido peryódico en 50 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v) y se incubó en agitación durante 1 h. Tras la incubación, se lavó el gel 2 veces con agua mili-Q y se añadieron 50 mL de una solución de metabisulfito, compuesta por 0,2 g de metabisulfito sódico en 100 mL de ácido acético glacial al 5% (v/v) hasta que el gel adquirió un color amarillento. Posteriormente, se retiraron los 50 mL de dicha solución y se añadieron otros 50 mL para decolorar el gel, en agitación suave durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el reactivo de Schiff y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 horas en agitación. Para decolorarlo, se añadieron 50 mL de la misma solución de fijación utilizada anteriormente, dos veces con una incubación de 7 minutos cada una, en agitación suave. Para finalizar, se le añadió al gel un tampón de decoloración compuesto por ácido acético y agua destilada (1:9) y se mantuvo durante 7 minutos.

#### **4.8. Preparación de medios de cultivo**

El caldo de tripticasa de soja (TSB, del inglés 'tryptic soy broth') de Merck (Darmstadt, Alemania), se utiliza para enriquecer a las colonias de bacterias y favorecer su crecimiento. Se pesaron 30 g en 1 L de agua destilada, se homogenizó y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El agar tripticasa de soja (TSA, del inglés 'tryptic soy agar') de Merck, solidifica a temperatura ambiente. Se pesaron 40 g en 1 L de agua destilada, se llevó a ebullición y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El agua de peptona de Merck se utiliza para realizar diluciones. Se pesaron 10 g en 1 L de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. El extracto de levadura (YE, del inglés 'yeast extract') de Oxoid (Basingstoke, Reino Unido), utilizado para favorecer un crecimiento más rápido del microorganismo, se añadió a los medios al 0,6% (p/v).

#### **4.9. Cultivo y conservación de *C. sakazakii***

La cepa bacteriana procede de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España): *C. sakazakii* CECT 858 (equivalente a la cepa ATCC 29544).

En primer lugar, se abrió el vial con el cultivo liofilizado en condiciones de máxima asepsia, y se resuspendió la cepa liofilizada mediante la adición de 0,3 mL de TSB (con 0,6% de YE. Se debe conseguir una rehidratación completa, utilizando una pipeta Pasteur estéril aspirando y expulsando la suspensión suavemente, evitando la formación de burbujas de aire.

A continuación, se sembró la suspensión con asa de siembra por agotamiento en TSA con 0,6% de YE y se incubó a 37°C durante 24 h.

Una vez conseguidas colonias aisladas en cultivo puro se recogieron mediante un asa de siembra y se inocularon en crioviales para la conservación en congelación. Se cerraron los viales y se agitaron suavemente invirtiendo el vial 4 o 5 veces para emulsionar el microorganismo, sin agitar vigorosamente. Una vez conseguida una emulsión total, el microorganismo se fijará a los anillos porosos. Se abrieron de nuevo los crioviales y se retiró el exceso de líquido mediante una pipeta Pasteur estéril hasta que los anillos estuvieran prácticamente secos. A continuación, se cerraron de nuevo los crioviales inoculados y se almacenaron a -70°C, constituyendo el stock de referencia.

#### **4.10. Preparación de lactoferrina bovina nativa**

Se utilizó lactoferrina bovina nativa comercial amablemente donadas por Tatura Nutritionals (Morrinsville, Nueva Zelanda) y Armor Proteines VitalArmor (Saint-Brice-en-Cogles, Francia).

Se pesaron 40 mg de lactoferrina en 2 mL de agua destilada. Posteriormente, se esterilizó la solución de proteína con filtros Millipore de tamaño de poro de 0,22 µm.

Para determinar la concentración exacta de lactoferrina tras la filtración se, cogieron 990 µL de agua mili-Q y 10 µL de la proteína filtrada estéril, se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 280 nm. A continuación, se calculó la concentración de lactoferrina a partir de su coeficiente de extinción ( $E_{1\%}^{280}$ ) de 1,27 mL/cm/g.

#### **4.11. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *Cronobacter sakazakii***

A partir de la lactoferrina bovina nativa preparada, se realizaron soluciones de diferentes concentraciones de la proteína a ensayar: 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL con PBS. De mucina se preparó una solución de concentración 0,1 mg/mL, y de lactadherina 1 mg/mL.

Se partió de una colonia de *C. sakazakii* incubada en 10 mL de TSB. Se cogieron 100  $\mu$ L, se llevaron a 10 mL de PBS y se realizaron dos diluciones en tubos de PBS con 9 mL con una concentración final de  $10^4$  UFC/mL.

En el ensayo antibacteriano, se añadieron 100  $\mu$ L de suspensión de *C. sakazakii* y 100  $\mu$ L de solución de proteína (lactoferrina a 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL, mucina 0,1 mg/mL y lactadherina 1 mg/mL) por pocillo en PBS, en placas de 96 pocillos. Se incluyeron pocillos control en los que solo se añadió PBS y suspensión bacteriana. Todas las muestras se incluyeron por duplicado y se hicieron dos series de muestras para la extracción a dos tiempos de incubación.

Se incubó durante 24 horas a 37°C, y se tomaron alícuotas de 100  $\mu$ L a las 4 y 24 h para la lactoferrina y a las 4 h para mucina y lactadherina. A las 4 horas, se hicieron diluciones, a partir de las muestras contenidas en los pocillos, hasta la  $10^{-2}$  por duplicado, y se sembraron 50  $\mu$ L de las dos últimas diluciones en una placa de TSA dividida en dos, por duplicado. Una vez sembradas las placas se dejaron incubar durante 24 horas a 37°C y se realizó el recuento de las colonias.

En el caso de la lactoferrina, a las 24 horas, a partir de las muestras con las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/ml se hicieron diluciones seriadas por duplicado hasta la  $10^{-3}$ , y se sembraron 50  $\mu$ L de las dos últimas diluciones en una placa de TSA dividida en dos, por duplicado. Pasadas las 24 h a 37°C se realizó el recuento de las colonias.

#### **4.12. Determinación de la concentración de proteína, test BCA**

La concentración de proteína se determinó mediante el método del ácido bicinonínico (BCA). Para ello, se prepararon estándares de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de concentraciones entre 2 y 125 mg/mL. Después, se añadieron 25  $\mu$ L de los estándares y de las muestras, por duplicado, en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se añadió reactivo BCA en una cantidad de 200  $\mu$ L por pocillo. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (LabSystem, Helsinki, Finlandia). La concentración de proteína en las muestras se determinó por interpolación en la recta de calibrado obtenida con los patrones de BSA.

#### **4.13. Análisis estadístico de los resultados:**

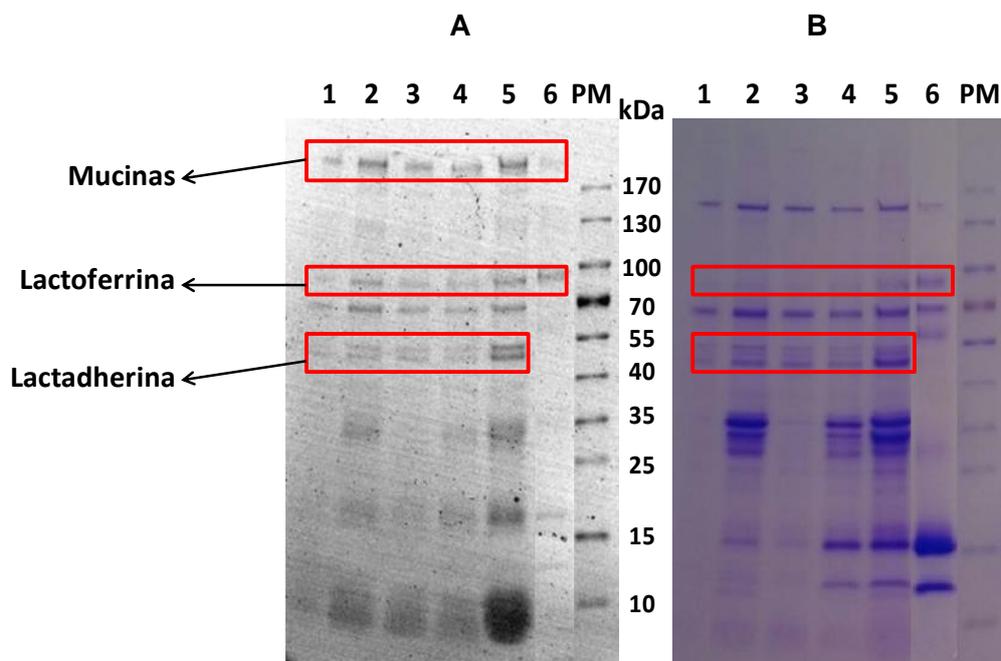
El análisis de resultados de los resultados en este Trabajo Fin de Grado se ha realizado utilizando el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU).

La normalidad de los datos se comprobó con la prueba de Kolmogorv-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test de Man-Whitney, determinando que todos los datos obtenidos no se debían al azar. Para comprobar si las diferencias entre las medias eran significativas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA, del término en inglés 'analysis of variance') con una prueba posterior que permitiera determinar qué medias difieren entre sí. Por último, se utilizó la prueba de post hoc de Tukey y se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor  $p \leq 0,05$ . Para indicar las diferencias significativas, se han utilizado asteriscos (\*) en las gráficas de los resultados.

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Aislamiento y caracterización de las fracciones lácteas

En la figura 6, se muestra el análisis electroforético de la MFGM lavada y no lavada, el buttermilk lavado y no lavado, el butter serum y el lactosuero de leche bovina, concentrado 2 veces por procedimientos anteriormente descritos. Se señala en la electroforesis la localización de las proteínas de interés para nuestro estudio, la mucina, lactoferrina y lactadherina con pesos moleculares de 180-200, 80 y 45 kDa, respectivamente.



**Figura 6.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) del aislamiento de las fracciones lácteas teñidas con PAS (A) y azul de Coomassie (B). PM: Marcador de pesos moleculares. MFGM lavada (1), MFGM no lavada (2), buttermilk lavado (3), buttermilk no lavado (4), butter serum (5) y lactosuero (6). Las bandas correspondientes a las mucinas, lactadherina y lactoferrina aparecen recuadradas en rojo.

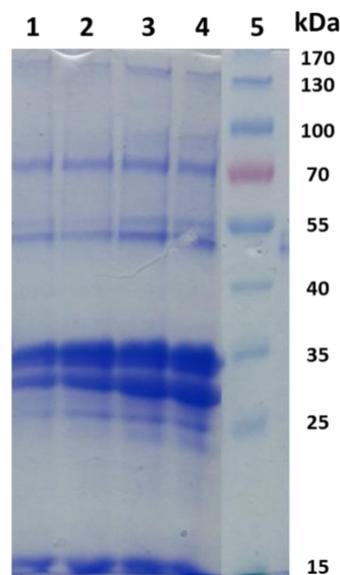
Como se puede observar en la electroforesis de la figura 6, existen diferencias en la composición de las proteínas de las diferentes fracciones, teniendo en cuenta el proceso de extracción de estas. En primer lugar, el proceso de lavado de la MFGM y buttermilk reduce el número de proteínas del lactosuero. Por otro lado, el proceso de desnatado y coagulación de caseínas en el procesado del lactosuero, reducen la concentración de MFGM y aumentan la concentración de lactoferrina, así como de otras proteínas solubles del lactosuero (Vanderghem et al. 2010).

Tal y como se muestra en la figura 6, las mucinas solo se pueden detectar mediante la tinción con PAS, debido a que son glicoproteínas con un elevado grado de glicosilación. Asimismo,

la lactadherina aparece en sus dos formas glicosiladas PAS 6 y 7, con pesos moleculares de 50 y 47 kDa, respectivamente. Se puede observar su ausencia en el lactosuero, lo cual puede ser debido a la eliminación de la MFGM durante el desnatado de la leche, o al someter dicha leche a un calentamiento durante la coagulación de caseínas y haberse agregado a las proteínas más pequeñas presentes en el lactosuero (Singh 2006).

## 5.2. Homogeneización de las fracciones

En la figura 7, se muestra la concentración de proteínas a partir de buttermilk y butter serum procedentes de nata homogeneizada y no homogeneizada. El proceso de homogeneización se realizó a 250 bares en una sola fase. La obtención de butter serum y buttermilk se realizó a partir de la mantequilla procedente de 1 L de nata homogeneizada y no homogeneizada, a través de los procesos citados anteriormente.



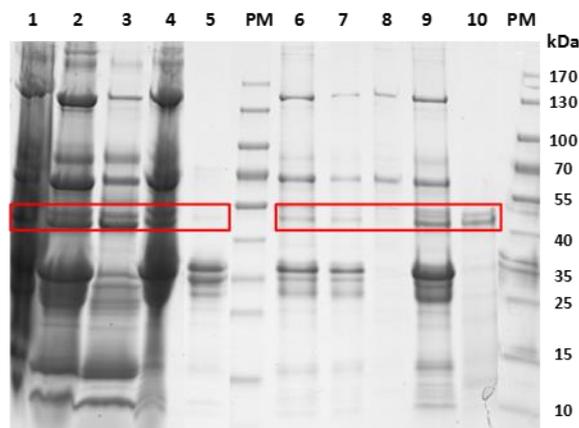
**Figura 7.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) de buttermilk y butter serum procedentes de nata homogeneizada y no homogeneizada, y tras tinción con azul de Coomassie. Buttermilk homogeneizado (1), buttermilk no homogeneizado (2), butter serum homogeneizado (3), butter serum no homogeneizado (4).

Tal y como se muestra en la figura 7, en las fracciones homogeneizadas, la concentración de proteínas se reduce ligeramente, debido a que el proceso de homogeneización afecta a los glóbulos grasos presentes en la nata, reduciendo así el tamaño del glóbulo graso y, por lo tanto, disminuyendo así las proteínas presentes en él. Produce cambios en la obtención y en la estructura de las proteínas, principalmente debido al estrés mecánico aplicado (Pimentel et al. 2017).

### 5.3. Aislamiento de lactadherina

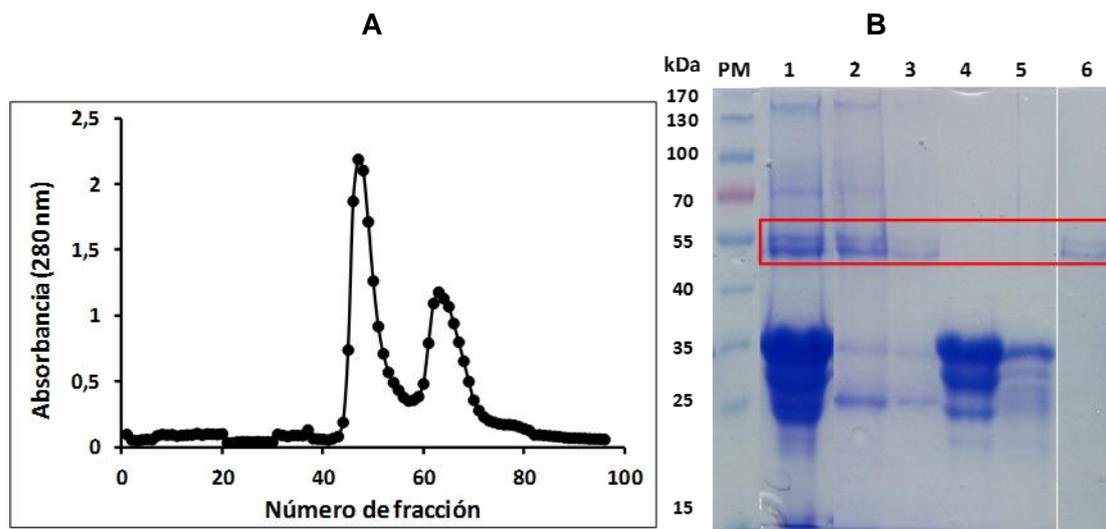
La lactadherina se aisló a partir de leche bovina siguiendo el protocolo de Kim et al. (1992). En la siguiente figura, se muestran las distintas etapas del aislamiento de lactadherina. En primer lugar, se obtuvo la fracción enriquecida en MFGM y delipidada. A continuación, se fraccionó mediante dos centrifugaciones con NaCl, y el precipitado resultante se volvió a centrifugar con un tampón de urea y KCl, todo ello con el fin de liberar la lactadherina de la membrana.

Al principio, el ensayo se realizó con butter serum y buttermilk lavado y no lavado, y se observó que la concentración de lactadherina era superior en el no lavado, por lo que se abandonó dicho procedimiento, y se realizaron todos los aislamientos siguientes con butter serum y buttermilk no lavado.



**Figura 8.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) del aislamiento de lactadherina en las fracciones de MFGM, tras tinción con azul de Coomassie, obtenidas de la mezcla de butter serum con buttermilk no lavado. PM: Marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), buttermilk (2), sobrenadante y precipitado obtenidos durante el proceso de extracción de la MFGM (3 y 4), sobrenadante y precipitado tras la centrifugación de la suspensión en NaCl (5 y 6), sobrenadante y precipitado tras la centrifugación de la suspensión en urea y KCl (7 y 8), sobrenadante en la suspensión en urea y KCl concentrado x 2 (9) y fracción de lactadherina aislada previamente en el grupo (10). Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.

El sobrenadante obtenido tras la centrifugación del precipitado con el tampón de urea y KCl se aplicó a una columna de Sephacryl S- 200, obteniendo el perfil cromatográfico que se muestra en la siguiente figura.

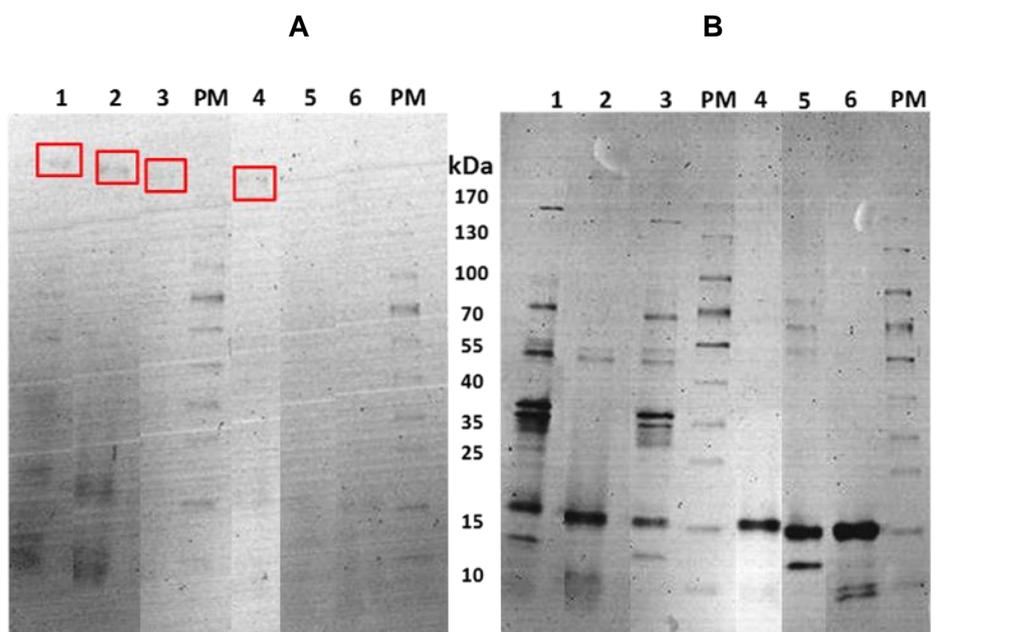


**Figura 9.** (A) Perfil cromatográfico en Sephacryl S-200 High Resolution de la fracción concentrada del aislamiento de lactadherina obtenido de la mezcla de butter serum con buttermilk procedentes de nata no lavada. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 1,2 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) de las fracciones de la cromatografía, tras tinción con azul de Coomassie. PM: marcador de pesos moleculares. Fracción aplicada a la columna concentrada (1), fracción 47 (2), fracción 51 (3), fracción 63 (4), fracción 69 (5) y fracción de lactadherina purificada (6). Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.

La cromatografía de Sephacryl S- 200 High Resolution presenta dos picos, en los que la lactadherina eluyó principalmente en el primero de ellos, tal y como se muestra en la electroforesis. Aunque el aislamiento y la filtración en gel permiten eliminar una gran parte de proteínas contaminantes, se observa en la figura 9B que no se logró por completo su eliminación. Por lo tanto, a esta fracción de lactadherina se le denomina enriquecida debido a que presenta pequeñas cantidades de otras proteínas (Kim et al. 1992).

#### 5.4. Aislamiento de mucina

El aislamiento de mucina se logró siguiendo el protocolo de Gallier et al. (2012) y Le et al. (2012). Las fracciones de butter serum y buttermilk procedentes de nata no lavada presentaron una concentración mayor en mucina, por lo que se decidió escoger para la cromatografía de filtración en gel la fracción de butter serum, debido a que tuvo un mayor rendimiento de extracción.

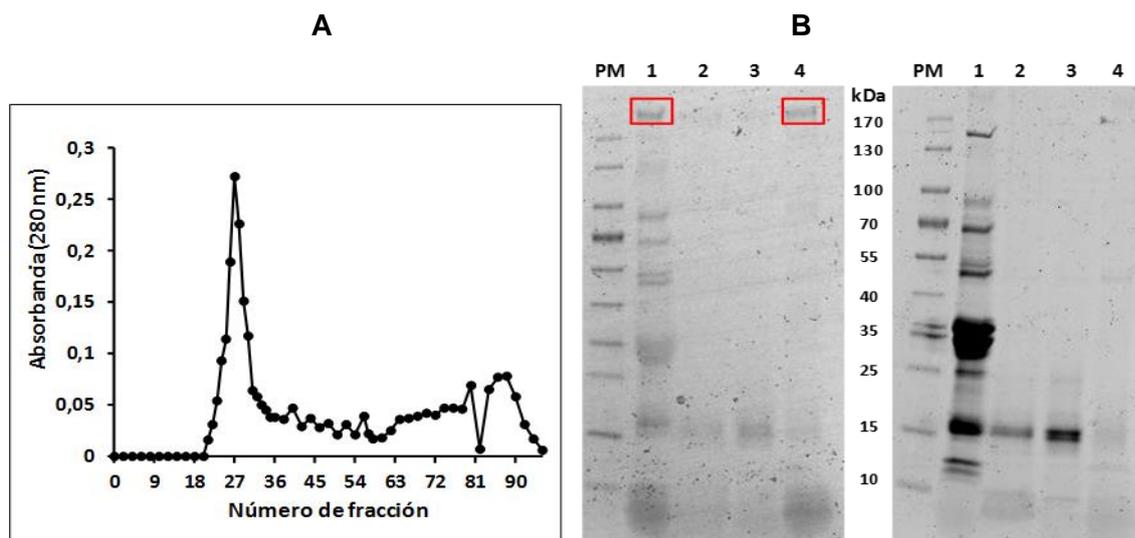


**Figura 10.** SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) del aislamiento de mucinas en diferentes fracciones lácteas tras tinción con PAS (A) y azul de Coomassie (B). PM: Marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), butter serum hidrolizado y concentrado x 2 (2), buttermilk no lavado (3), buttermilk no lavado hidrolizado y concentrado x 2 (4), lactosuero (5) y lactosuero hidrolizado y concentrado x 2 (6). Las bandas correspondientes a las mucinas aparecen recuadradas en rojo.

La fracción de butter serum se aplicó a una columna de Sepharose CL-2B siguiendo el protocolo de Kodama y Kimura (2001) en un volumen de 1,5 mL, obteniendo el perfil cromatográfico que se muestra a continuación (figura 11 A). En la cromatografía se puede observar la presencia de un pico, el cual corresponde a la fracción de mucinas. Y seguido de ello, hay una pequeña cola en la que aparecen varios picos. Según Bansil y Turner (2006), la mucina presenta unas características, debido a su glicosilación, que la hacen difícil de aislar, por su elevada capacidad de formar geles debido a su viscosidad.

En la electroforesis (figura 11 B) se puede observar la presencia de proteínas presentes de un peso molecular inferior a la mucina en la fracción purificada, pudiendo ser consecuencia de que la mucina haya liberado algunos fragmentos de bajo peso molecular con glicanos unidos, puesto que dichas bandas se tiñen con PAS y apenas se tiñen con azul de Coomassie (Holden et al. 1971).

En este trabajo de fin de grado se ha logrado el aislamiento de la mucina con un alto grado de pureza.



**Figura 11.** (A) Perfil cromatográfico en Sepharose CL-2B de la fracción concentrada del hidrolizado de butter serum con pepsina bovina. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 3 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones teñidas con PAS (izquierda) y azul de Coomassie (derecha). PM: marcador de pesos moleculares. Butter serum (1), hidrolizado de butter serum (2), fracción 86 (3) y fracción 27 (4). Las bandas correspondientes a las mucinas aparecen recuadradas en rojo.

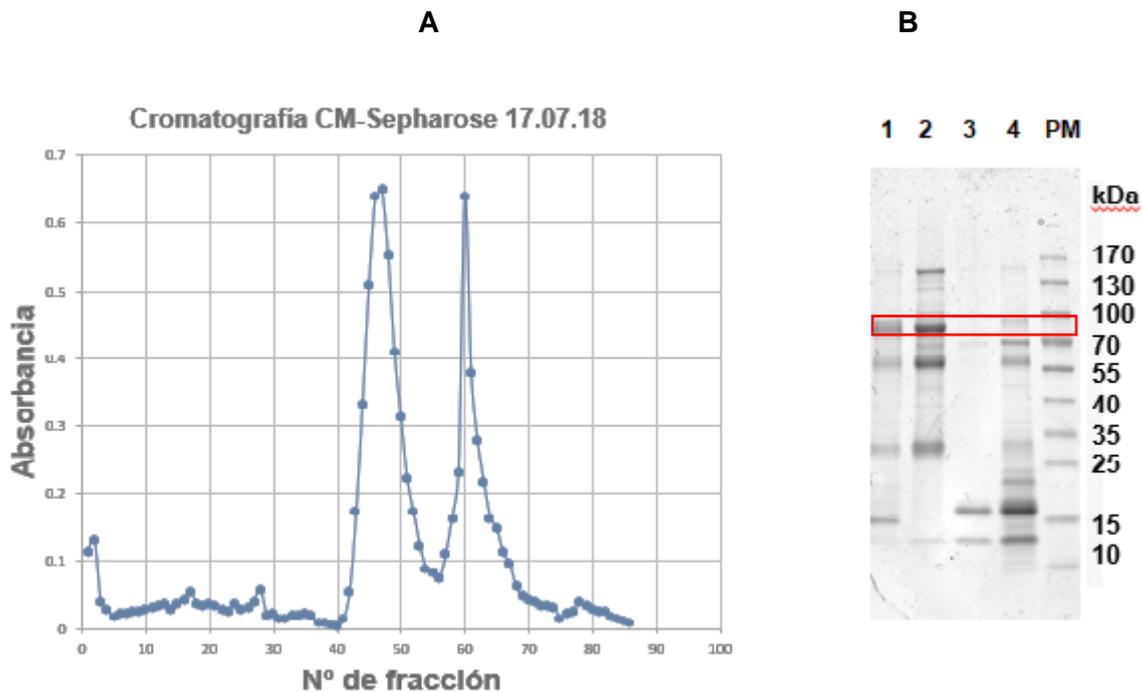
## 5.5. Aislamiento de lactoferrina

Para el aislamiento de lactoferrina, se partió de lactosuero bovino concentrado. Tras dializar el lactosuero durante 24 horas, se incubó con el gel CM-Sepharose una noche en una proporción 1:1 (v/v). Posteriormente, el gel se lavó con un tampón Tris- HCl, y se recogió el primer excluido. Una vez que la absorbancia fue inferior a 0,02, se empaquetó la columna y se eluyó la proteína con 30 mL de un tampón NaCl 0,2 M y 30 mL del mismo tampón con NaCl 0,5 M.

Las proteínas del lactosuero excluidas que no reaccionaron con el intercambiador iónico fueron eliminadas con el lavado del gel. En la cromatografía (figura 12 A), se aprecian dos picos diferenciados entre sí. El primero es atribuible a la lactoperoxidasa, y el segundo a la fracción enriquecida de lactoferrina (Moradian 2014). Al utilizar una concentración salina menor, las proteínas con carácter ácido o básico débil eluyen. La lactoferrina al ser una proteína muy básica necesitó una concentración salina mayor, de 0,5 M para su elución, localizándose en el segundo pico mostrado en el perfil cromatográfico de acuerdo con otros autores (Adlerova, Bartoskova y Faldyna 2008).

En la electroforesis (figura 12 B) se observa la presencia de lactoferrina en el lactosuero, en el excluido del lactosuero, y en las fracciones concentradas del segundo pico. A esta fracción

de lactoferrina se le denomina enriquecida, debido a que hay algunas proteínas contaminantes.

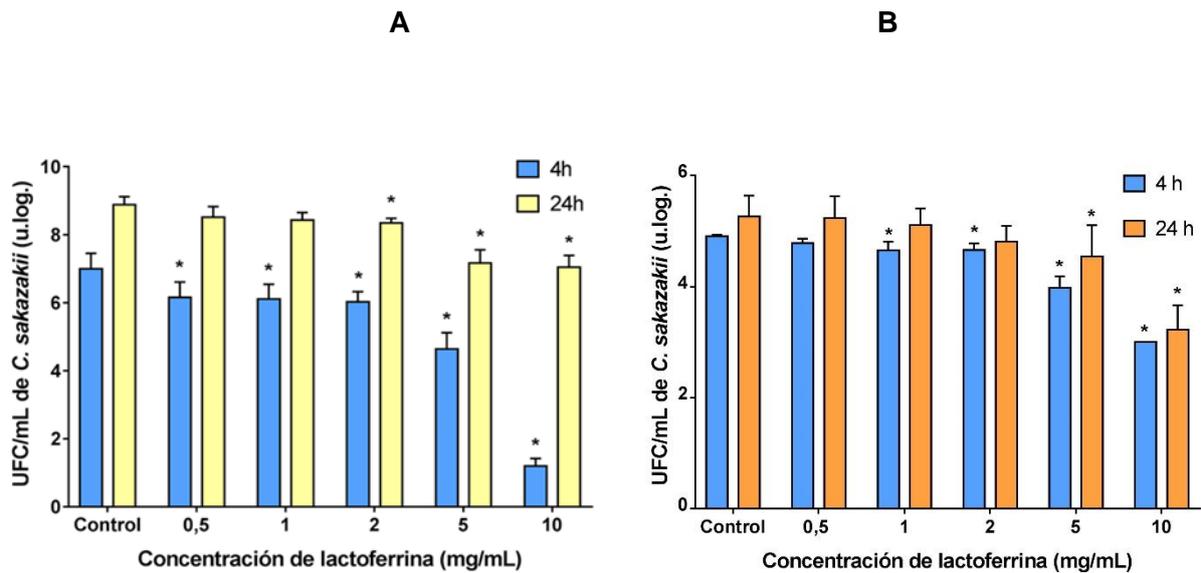


**Figura 12.** (A) Perfil cromatográfico en CM-Sepharose de la fracción concentrada de lactosuero bovino. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 2 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (7-10%) de las fracciones, teñidas con azul de Coomassie. PM: marcador de pesos moleculares. Lactosuero bovino (1), excluido de la cromatografía (2), fracciones 43–55 concentradas (3), fracciones 57–69 concentradas (4). La banda correspondiente a la lactoferrina aparece recuadrada en rojo.

## 5.6. Ensayo de actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*

### 5.6.1. Actividad antibacteriana de lactoferrinas bovinas comerciales

El ensayo para la actividad antibacteriana de la lactoferrina bovina nativa se llevó a cabo utilizando las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL de lactoferrina bovina de dos orígenes comerciales, frente a 4 u. log. de *C. sakazakii* de concentración inicial y un control, en ausencia de lactoferrina. De este modo, se halló la concentración de *C. sakazakii* a las 4 y 24 horas de incubación para evaluar cómo había influido la presencia de lactoferrina en el crecimiento de las bacterias (Figura 13).

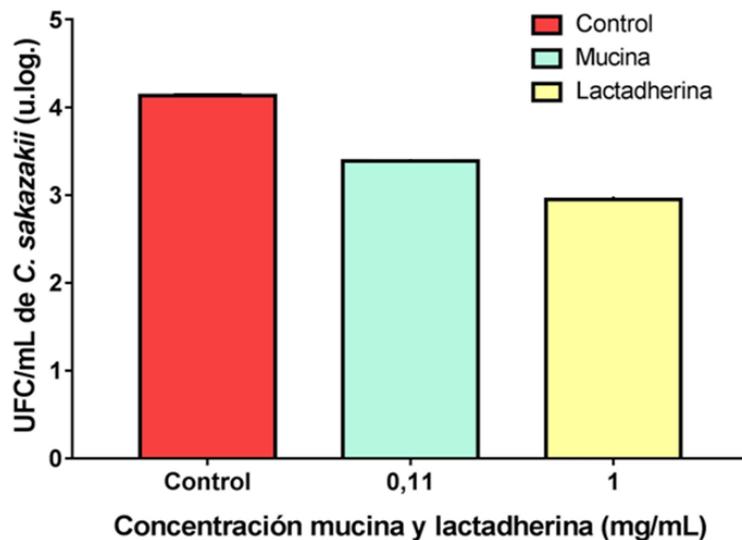


**Figura 13.** Ensayo de actividad antibacteriana de lactoferrina comercial bovina de Tatua Nutritionals, a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL con respecto a la concentración de *C. sakazakii* expresada en unidades logarítmicas a las 4 h (•) y a las 24 h (◐) (A). Ensayo de actividad antimicrobiana de lactoferrina comercial de Armor VitalArmor, a las concentraciones de 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL con respecto a la concentración de *C. sakazakii* expresada en unidades logarítmicas a las 4 h (•) y a las 24 h (◐) (B). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (\* $p < 0,001$ ).

A las 4 horas, el recuento de *C. sakazakii* a las concentraciones de lactoferrina a 0,5, 1, 2, 5 y 10 mg/mL disminuyó significativamente frente al control, reduciéndose en 5 u.log. a la concentración de 10 mg/mL de lactoferrina, tal y como se muestra en la figura 13A. Así, queda comprobado el efecto antibacteriano de la lactoferrina. A las 24 horas, se puede observar una disminución de la actividad antibacteriana de la lactoferrina a las concentraciones de 5 y 10 mg/mL. Según Harouna et al. (2015), el tiempo de incubación de *C. sakazakii* y la concentración reducen la actividad antibacteriana de la lactoferrina, lo que podría deberse a que con el tiempo la bacteria desarrolla algún tipo de mecanismo de defensa.

Comparando las lactoferrinas de ambas casas comerciales, se observa que la lactoferrina procedente de Tatua Nutritionals (figura 13 A) tiene una mayor actividad antimicrobiana, reduciendo 5 u. log de *C. sakazakii* a la concentración de 10 mg/mL, mientras que la lactoferrina procedente de Armor VitalArmor produce una reducción antimicrobiana de 2 u. log de *C. sakazakii* a la misma concentración. Por lo que, la utilización de lactoferrina Tatua tendrá una mayor eficacia como componente antibacteriano.

### 5.6.2. Actividad antibacteriana de mucina y lactadherina



**Figura 14.** Ensayo de actividad antibacteriana de mucinas (•) y lactadherina (•) a las concentraciones de 0,11 y 1 mg/mL, respectivamente, expresados en u.log. a las 4 h.

Tal y como se muestra en la figura 14, la lactadherina y la mucina reducen el crecimiento de *Cronobacter sakazakii*. Hemos de considerar estos resultados como preliminares, pues debido a la dificultad de aislar las fracciones enriquecidas en estas proteínas en una elevada cantidad, no se pudieron repetir los experimentos. Actualmente, no existen estudios en los que la actividad antibacteriana de dichas proteínas quede demostrada, pero sí que está confirmado que tienen efecto inhibitorio frente a la adhesión de diferentes patógenos. Según Struijs et al. (2013), las glicoproteínas de la membrana de los glóbulos grasos de la leche (MFGM) tienen efectos ventajosos, principalmente relacionados con la prevención de la adhesión bacteriana a la pared gastrointestinal.

Sería interesante continuar la investigación en la actividad antimicrobiana de la lactadherina y mucina para poder establecer una relación entre la concentración de estas en fracciones lácteas y su actividad inhibitoria frente a patógenos.

## 6. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado han permitido llegar a diferentes conclusiones:

1. El lactosuero bovino es un excelente derivado lácteo para el aislamiento y caracterización de lactoferrina, consiguiendo así una fracción enriquecida de esta proteína potencialmente bioactiva.
2. La mazada o buttermilk y el butter serum procedentes de la leche de vaca constituyen una materia prima de gran valor para la obtención de fracciones enriquecidas en lactadherina y mucina.
3. La homogeneización de la nata reduce la concentración de proteínas bioactivas presentes en la membrana del glóbulo graso como la lactadherina y la mucina.
4. La lactoferrina bovina nativa tiene capacidad antibacteriana frente al patógeno *C. sakazakii*, desde la concentración de 0,5 mg/mL, produciendo una reducción significativa a la concentración de 10 mg/mL.
5. El efecto antibacteriano de la lactoferrina es superior a las 4 h que a las 24 h de incubación a las concentraciones de 5 y 10 mg/mL de lactoferrina, por lo que se deduce que la bacteria desarrolla algún mecanismo para contrarrestar dicho efecto.
6. La lactadherina y mucinas de la membrana del glóbulo graso bovino tienen un potencial antibacteriano de gran interés frente a *C. sakazakii*, como indican los resultados preliminares obtenidos en este trabajo, aunque es necesario realizar futuras investigaciones para su confirmación.

## 7. Bibliografía

Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 457-468.

Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., Petersen, T.E. (1997). Bovine PAS 6/7 binds  $\alpha V\beta 5$  integrin and anionic phospholipids through two domains. *Biochemistry*, 36, 5441-5446.

Andersen, M.H., Graversen, H., Fedosov, S.N., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T. (2000). Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry*, 39, 6200-6206.

Bansil, R., Turner, B.S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 164-170.

Brown, J.R. (1977). Albumin: Structure, Function and Uses Serum Albumin: Amino Acid Sequence Supported (in Part) by NIH Grant HD 02899. Pergamon Press Inc.

Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L. (2014). Consumption of Raw or Heated Milk from Different Species: An Evaluation of the Nutritional and Potential Health Benefits. *Food Control*, 42, 188–201.

Codex Alimentarius. (1999). Norma del Codex para el uso de términos lecheros (CODEX STAN 206-1999).

Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Camp, J.V. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18, 436-457.

Gallier, S., Singh, H. (2012). Behavior of almond oil bodies during in vitro gastric and intestinal digestion. *Food and Function*, 3, 547–555.

Gallier, S., Vockingb, K., Post, J.A., Van De Heijninga, B., Actona, D., Van Der Beekc, E.M., Baalen, T.V. (2015). A Novel Infant Milk Formula Concept: Mimicking the Human Milk Fat Globule Structure. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136, 329–39.

Gantner, V. (2015). The Overall and Fat Composition of Milk of Various Species. *Mljekarstvo*, 65, 223–31.

Ginger, M.R., Grigor, M.R. (1999). Comparative Aspects of Milk Caseins. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 124, 133–45.

- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 1-8.
- Guetouache, M., Guessas, B., Medjekal, S. (2014). Composition and Nutritional Value of Raw Milk. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2, 115–22.
- Harouna, S., Carramiñana, J. J., Navarro, F., Pérez, M. D., Calvo, M., Sánchez, L. (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment. *Food Control*, 47, 520-525.
- Holden, K.G., Yim, N.C.F., Griggs, L.J., Weisbach, J.A. (1971). Gel electrophoresis of mucous glycoproteins. I. Effect of gel porosity. *Biochemistry*, 10, 3105-3109.
- Huppertz, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2017). Proteins in Food Processing: Second Edition The Caseins: Structure, Stability, and Functionality. Second Edition (Elsevier).
- Hvarregaard, J., Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., Petersen, T.E. (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *European Journal of Biochemistry*, 240, 628-636.
- Iversen, C., Forsythe, S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, 14, 443-454.
- Jensen, R.G., Ferris, A.M., Lammi-Keefe, C.J. (1991). The Composition of Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 74, 3228–43.
- Joseph, S., Sonbol, H., Hariri, S., Desai, P., McClelland, M., Forsythe, S.J. (2012). Diversity of the *Cronobacter* Genus as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 3031–39.
- Kilara, A., Vaghela, M.N. (2017). Proteins in Food Processing: Second Edition Whey Proteins. Pp: 94-126. Second Edition (Elsevier).
- Kim, D.H., Kanno, C., Mizokami, Y. (1992). Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1122, 203-211.
- Kodama, Y., Kimura, N. (2004). Inhibitor of *Helicobacter pylori* colonization. Ghen Corporation. Número de patente: 6235709.
- Kutta, H., Willer, A., Steven, P., Bräuer, L., Tsokos, M., Paulsen, F. (2008). Distribution of Mucins and Antimicrobial Substances Lysozyme and Lactoferrin in the Laryngeal Subglottic Region. *Journal of Anatomy*, 213, 473–81.

Le, T.T., Van de Wiele, T., Do, T.N.H., Debyser, G., Struijs, K., Devreese, B., Dewettinck, K., Van Camp, J. (2012). Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, 95, 2307-2318.

Li Chun, L., Beuchat, L.R. (2007). Survival of *Enterobacter Sakazakii* in Infant Cereal as Affected by Composition, Water Activity, and Temperature. *Food Microbiology* 24, 767–77.

Lopez, C., Briard-Bion, V., Ménard, O., Beaucher, E., Rousseau, F., Fauquant, J., Leconte, N., Robert, B. (2011). Fat Globules Selected from Whole Milk According to Their Size: Different Compositions and Structure of the Biomembrane, Revealing Sphingomyelin-Rich Domains. *Food Chemistry*, 125, 355–68.

Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X. (2007). Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*, 40, 1197-1211.

McGrath, B.A., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Kelly, A.L. (2016). Composition and Properties of Bovine Colostrum: A Review. *Dairy Science and Technology*, 96, 133–58.

Moradian, F. (2014). Lactoferrin, Isolation, Purification and Antimicrobial Effects. *Journal of Medical and Bioengineering*, 3, 203–6.

Permyakov, E.A., Berliner, L.J. (2000).  $\alpha$ -lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*, 473, 269-274.

Pimentel, T.C., Antunes, A.E.C., Zacarchenco, P.B., Cortez, M.A.S., Bogsan, C.S.B., Oliveira, M.N., Esmerino, E.A., Silvia, M.C., Cruz, A.G. (2017). Yogurt in Health and Disease Prevention Brazilian Yogurt-like Products. Pp: 331-351. (Elsevier Inc.)

Rasmussen, J. T. (2009), Bioactivity of milk fat globule membrane proteins, *Aust. J. Dairy Technol.* 64, 63-67.

Raymond, A., Ensslin, M.A., and Shur, B.D. (2009), SED1/MFG-E8: a bi-motif protein that orchestrates diverse cellular interactions. *J. Cell. Biochem.* 106, 957-966.

Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (DO núm. 139, de 30 de abril de 2004).

Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S., Tellam, R.L. (2009). Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *Journal of Dairy Science*, 92, 5276-5291.

Singh, H. (2006). The milk fat globule membrane-A biophysical system for food applications. *Current opinion in colloid & interface science*, 11, 154-163.

Song, X., Teng, H., Chen, L., Kim, M. (2018). *Cronobacter* Species in Powdered Infant Formula and Their Detection Methods. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 38, 376–90.

Struijs, K., Van de Wiele, T., Le, T.T., Debyser, G., Dewenttinck, K., Devreese, B., Camps, J.V. (2013). Milk Fat Globule Membrane Glycoproteins Prevent Adhesion of the Colonic Microbiota and Result in Increased Bacterial Butyrate Production. *International Dairy Journal*, 32, 99–109.

Swaisgood, H.E., (1982). Chemistry of milk proteins. In: Fox, P.F. (Ed.), *Developments in Dairy Chemistry. Proteins*, vol. 1. Elsevier Applied Science Publ., London, pp. 63–110.

Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14, 485-500.

Vanderghem, C., Francis, F., Danthine, S., Deroanne, C., Paquot, M., De Pauw, E., Blecker, C. (2011). Study on the susceptibility of the bovine milk fat globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins. *International Dairy Journal*, 21, 312-318.

Whitney, R. (1977). Milk proteins. In: Graham, H.D. (Ed.), *Food Colloids*. AVI Publ, Westport, CT, pp. 66–151.

Yan, X., Gurtler, J. B. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition. Cronobacter (Enterobacter) Sakazakii*. pp: 528-532. Second Edition. (Elsevier).