



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Caracterización de la actividad biológica de proteínas y péptidos derivados de subproductos lácteos

Characterization of the biological activity of proteins and peptides derived from dairy by-products

Autor/es

María Ubieto López

Director/es

M^a Lourdes Sánchez Paniagua
Inés Abad Chamorro

Facultad de Veterinaria

2019 / 2020

Agradecimientos

En primer lugar, agradecer especialmente a mi tutora M^a Lourdes Sánchez Paniagua por haberme acogido en el grupo de investigación, por su confianza y sus consejos para concluir este Trabajo Fin de Máster.

En segundo lugar, quiero expresar mi profunda gratitud a mi segunda tutora Inés Abad Chamorro, por enseñarme y explicarme todos los ensayos. Ha sido una experiencia muy constructiva realizar este trabajo a su lado. Su paciencia, empeño e implicación son dignas de mención. Mucha suerte en la continuación de tu tesis, seguro que logras todo lo que te propongas.

Además, agradezco enormemente a mis dos tutoras por las valiosas y constructivas sugerencias durante las revisiones que me han permitido aprender y mejorar la redacción de un trabajo científico.

En tercer lugar, a los miembros del grupo de investigación, especialmente a Miriam Esteban, Ana Tobajas, Dimitra Graikini y Alba Civera, por el buen ambiente de trabajo, ayudarme en todo lo necesario y resolver todas mis dudas.

Por último, a mi familia y mis amigos por su apoyo a lo largo de mis estudios. Entre ellos, destacar a mis amigos del Máster, Laura, Félix, Elisa, Paz y Alba, sin ellos este año tan atípico y complicado no hubiese sido lo mismo, muchas gracias.

Este Trabajo Fin de Máster se ha realizado gracias a la financiación del proyecto del Ministerio de Economía y Competitividad "Efecto de los tratamientos tecnológicos en la actividad de proteínas y fracciones lácteas en la funcionalidad intestinal: potencial para su aplicación en alimentos funcionales (LACTOFUN)" con referencia AGL2017-82987-R y al apoyo del grupo de investigación "El efecto del procesado tecnológico de los alimentos en las patologías digestivas y alérgicas (ALIPAT)" (A02_17R) reconocido por el Gobierno de Aragón desde 2018.

Índice:

1. Resumen/Abstract	1
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	4
3.1. Composición y estructura de la leche.....	4
3.2. Membrana del glóbulo graso (MFGM).....	5
3.3. Proteínas lácteas	7
3.3.1. Caseínas.....	7
3.3.2. Proteínas del lactosuero.....	9
3.3.2.1. Lactoferrina	10
3.3.2.2. Glicomacropéptido	12
3.3.3. Proteínas de la MFGM	14
3.3.3.1. Lactadherina	14
3.3.3.2. Mucinas	14
3.4. <i>Cronobacter sakazakii</i>	15
4. Objetivos	17
5. Materiales y métodos	18
5.1. Aislamiento de fracciones y proteínas lácteas.....	18
5.1.1. Obtención de fracciones lácteas	18
5.1.2. Aislamiento y purificación de la lactadherina.....	19
5.1.2.1. Aislamiento con solventes orgánicos	19
5.1.2.2. Aislamiento con Tritón X-114	19
5.1.2.3. Purificación con la columna de Sephacryl S-200.....	20
5.1.2.4. Purificación con la columna de Concanavalina A-Sepharose.....	20
5.1.3. Aislamiento y purificación del glicomacropéptido	21
5.2. Técnicas electroforéticas	23
5.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)	23
5.2.2. Tinción de los geles con azul de Coomassie	23
5.3. Western Blotting.....	23
5.4. Cultivo de <i>C. sakazakii</i>	24
5.5. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i>	25
5.6. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7	26
5.6.1. Descongelación de la línea celular	26
5.6.2. Mantenimiento del cultivo celular.....	27

5.6.3.	Cultivo de las células en placa	27
5.7.	Determinación de la citotoxicidad.....	27
5.8.	Ensayos de inhibición de la adhesión e internalización de <i>C. sakazakii</i>	28
5.9.	Expresión de receptores tipo Toll.....	29
5.9.1.	Extracción del RNA	30
5.9.2.	Obtención del cDNA	30
5.9.3.	PCR cuantitativa.....	31
5.10.	Análisis estadístico	31
6.	Resultados y discusión	32
6.1.	Aislamiento de la lactadherina	32
6.2.	Aislamiento del glicomacropéptido.....	34
6.3.	Ensayos de actividad antimicrobiana frente a <i>C. sakazakii</i>	35
6.3.1.	Actividad frente a <i>C. sakazakii</i> en fase exponencial	35
6.3.2.	Actividad frente a <i>C. sakazakii</i> en fase estacionaria	36
6.4.	Evaluación de la citotoxicidad de la lactoferrina	38
6.5.	Inhibición de la adhesión e internalización de <i>C. sakazakii</i> a las Caco-2/TC7.....	39
6.5.1.	Inhibición de la adhesión de <i>C. sakazakii</i> a las Caco-2/TC7	39
6.5.2.	Inhibición de la internalización de <i>C. sakazakii</i> a las Caco-2/TC7.....	40
6.6.	Expresión de receptores tipo Toll mediante RT-qPCR.....	42
7.	Conclusiones	44
8.	Referencias bibliográficas.....	44

1. Resumen/Abstract

La leche contiene compuestos que poseen propiedades bioactivas. Entre ellas, cabe destacar la actividad antimicrobiana de la lactoferrina, la lactadherina y el glicomacropéptido (GMP). El uso de estos compuestos como ingredientes en fórmulas infantiles es de gran interés, ya que podrían disminuir el riesgo de infección por *Cronobacter sakazakii*, un patógeno emergente que causa infecciones en neonatos prematuros.

El objetivo de este Trabajo Fin de Máster ha sido el aislamiento y caracterización de proteínas y péptidos bioactivos derivados de subproductos lácteos. Para ello, la lactadherina y el GMP se han aislado a partir de una fracción enriquecida en membrana del glóbulo graso y del lactosuero, respectivamente. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii* en fase exponencial y estacionaria. Asimismo, se ha analizado la viabilidad de las células Caco-2/TC7, como modelo de epitelio intestinal, la inhibición de la adhesión e internalización del patógeno a las células y la expresión de los receptores intestinales TLR2, TLR4 y TLR9.

El GMP, a las concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL, provoca una reducción del crecimiento de *C. sakazakii* en fase estacionaria tras 24 h de incubación. Por otro lado, la lactoferrina no afecta a la viabilidad de las células Caco-2/TC7. Además, a las concentraciones de 0,5; 1; 2 y 5 mg/mL, la lactoferrina parece inhibir la adhesión e internalización de *C. sakazakii* a las células y a 10 mg/mL, parece reducir la expresión de los receptores TLR4 y TLR9 con y sin patógeno. Estos resultados conducen a futuros estudios para comprender mejor la actividad antimicrobiana de las proteínas lácteas sobre *C. sakazakii*.

Milk contains compounds with bioactive properties. Among them, the antimicrobial activity of lactoferrin, lactadherin and glycomacropeptide (GMP) should be highlighted. The use of these compounds as an ingredient in infant formula has been a subject of major interest as they could decrease the risk of infection by *Cronobacter sakazakii*, an emerging pathogen causing infections in premature infants.

The aim of this Master's thesis has been the isolation and characterization of bioactive proteins and peptides, derived from dairy by-products. For this purpose, lactadherin and glycomacropeptide have been isolated from the milk fat globule membrane and whey, respectively. Antimicrobial activity has been evaluated against *C. sakazakii* in exponential and stationary phase. Likewise, the viability of Caco-2/TC7 cells, used as a model of intestinal epithelium, the inhibition of the adhesion and internalization of the pathogen to the cells and the expression of the TLR2, TLR4 and TLR9 intestinal receptors have been analyzed.

The GMP, at concentrations of 1.5 and 3 mg/mL, causes a reduction in the growth of *C. sakazakii* in the stationary phase after 24 h of incubation, probably due to its antimicrobial activity against this pathogen. On the other hand, lactoferrin does not affect the viability of Caco-2/TC7 cells. Furthermore, at concentrations of 0.5, 1, 2 and 5 mg/mL, lactoferrin seems to inhibit the adhesion and internalization of *C. sakazakii* to cells and at 10 mg/mL, it appears to reduce the expression of the TLR4 and TLR9 receptors with and without pathogen. These outcomes pave the way for further studies to improve the understanding of the antimicrobial activity of these milk proteins on *C. sakazakii*.

2. Abreviaturas

ADPH: adipophilin (adipofilina)

BCA: bicinchoninic acid (ácido bicinconínico)

BSA: bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)

BTN: butirofilina

CD36 o PAS IV: grupo de diferenciación 36

cDNA: complementary DNA (DNA complementario)

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EGF: epidermal growth factor (factor de crecimiento epidérmico)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

FABP: fatty acid binding protein (proteína fijadora de ácidos grasos)

FBS: fetal bovine serum (suero fetal bovino)

GMP: glicomacropéptido

Igs: inmunoglobulinas

LD o PAS 6/7: lactadherina

LF: lactoferrina

LPS: lipopolisacáridos

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

MUC1 o MUC15: mucina 1 o mucina 15

NEAA: non-essential amino acids (aminoácidos no esenciales)

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns (patrones moleculares asociados a patógenos)

PBS: phosphate-buffered saline (tampón fosfato salino)

PRRs: pattern-recognition receptors (receptores de reconocimiento de patrones)

qPCR: quantitative polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico)

TBS-T: Tris-buffered saline and Tween 20 (solución salina con tampón Tris y Tween 20)

TLRs: Toll-like receptors (receptores tipo Toll)

TSA: tryptic soy agar (agar tripticasa de soja)

TSB: tryptic soy broth (caldo tripticasa de soja)

UFC: unidades formadoras de colonias

XDH/XO: xantina deshidrogenasa/oxidasa

YE: yeast extract (extracto de levadura)

3. Introducción

3.1. Composición y estructura de la leche

La leche se define, por el Codex Alimentarius (1999), como la secreción mamaria normal de animales lecheros obtenida mediante uno o más ordeños sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo como leche líquida o al procesamiento. Según el Reglamento (CE) n° 853/2004, la leche cruda es la leche 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.

Todos los tipos de leche contienen agua como componente principal, lactosa, grasa, proteínas específicas, minerales, vitaminas, enzimas y otros compuestos minoritarios (Luisa, 1995). Por lo tanto, la leche contiene, de forma general, los nutrientes necesarios para el crecimiento y el desarrollo del neonato. Su composición varía entre las especies y razas, y también puede variar en función de la alimentación, la duración del período de secado y el tiempo transcurrido desde el parto (Tabla 1) (Gopal y Gill, 2000).

Tabla 1. Composición de la leche de algunas especies en g por 100 g de leche (Gantner *et al.*, 2015).

Leche	MS*	Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas	Energía**
Humana	10-13	2,1-4,0	0,9-1,9	6,3-7,0	0,2-0,3	270-209
Bovina	12-13	3,3-6,4	3,0-4,0	4,4-5,6	0,7-0,8	270-280
Búfala	16-17	5,3-15,0	2,7-4,7	3,2-4,9	0,8-0,9	420-480
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

*MS: *Materia seca total*. **Energía en kJ/100 g

Los componentes de la leche se encuentran en solución, como la lactosa, las proteínas del suero y las sales minerales; en emulsión, como los lípidos en forma de glóbulos grasos recubiertos de una membrana; o en suspensión coloidal, como las caseínas en forma de micelas, responsables del color blanco de la leche.

El **carbohidrato** principal de la leche es la lactosa, un disacárido compuesto por D-glucosa y D-galactosa. El contenido de lactosa en la leche bovina es de aproximadamente 4,8%. Existen dos isómeros de la lactosa, la α -lactosa y la β -lactosa, que se encuentran en una proporción 37,3:62,7 en la leche a 20 °C. La leche contiene otros carbohidratos como los monosacáridos, entre ellos la glucosa, fructosa y galactosa; oligosacáridos y grupos de glicanos unidos a proteínas y lípidos (Wong, 1988). Los oligosacáridos se dividen en dos clases: neutros, que no

contienen ningún residuo cargado, y ácidos, que contienen uno o más residuos de ácido siálico cargados negativamente (Gopal y Gill, 2000).

Los **lípidos** en la leche bovina representan del 3 al 6% y se encuentran en forma de glóbulos grasos emulsionados en la fase acuosa. Los glóbulos grasos contienen prácticamente toda la grasa de la leche y contienen un núcleo hidrofóbico compuesto principalmente por triglicéridos, que representan el 98% de los lípidos. Este núcleo está envuelto por una membrana conocida como la membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM, del nombre en inglés *Milk Fat Globule Membrane*), formada mayoritariamente de compuestos bipolares como fosfolípidos, glicoproteínas, colesterol y enzimas. El tamaño de los glóbulos grasos es variable y su diámetro oscila entre 1 y 20 μm , siendo 4 μm el diámetro medio (Lopez, 2011). Además, su gran superficie de 4,6 m^2/dl es accesible a las enzimas lipolíticas durante su paso por el tracto digestivo, facilitando la lipólisis de los triglicéridos y la absorción de los productos de la digestión (Jensen, 1996). Cabe destacar la importancia de los lípidos en las propiedades de la leche, como la hidrofobicidad, la densidad y las características de fusión. Además, los lípidos confieren a los productos lácteos, como la mantequilla, la leche entera en polvo y el queso, unas propiedades nutricionales, texturales y organolépticas distintivas (MacGibbon y Taylor, 2006).

Las **proteínas** están presentes, en la leche bovina, en una concentración de 30-35 g/L y se pueden dividir en tres grupos. Las proteínas mayoritarias son las caseínas, que representan aproximadamente un 80%, en segundo lugar están las proteínas del lactosuero y por último, en pequeña cantidad, están las proteínas de la MFGM que representan entre el 1 y 3% del total de proteínas lácteas (Fox y Mulvihill, 1982; Luisa, 1995; Walstra, 1999).

Los otros compuestos minoritarios de la leche engloban los **minerales** como el calcio, fósforo, magnesio, sodio, potasio, zinc y cloruro; las **vitaminas** como la vitamina A, vitamina B, vitamina B12, la riboflavina (B2), el ácido fólico (B9) y las vitaminas D, E y K; y las **enzimas**, siendo las más relevantes, la fosfatasa alcalina y la xantina oxidasa asociadas a la MFGM, la lipoproteína lipasa parcialmente asociada a las micelas de caseína, y la lactoperoxidasa y la catalasa que se encuentran en solución (Wong, 1988; Walstra *et al.*, 1999; Haug *et al.*, 2007).

3.2. Membrana del glóbulo graso (MFGM)

Los glóbulos grasos de la leche, secretados por las células epiteliales de la glándula mamaria, aportan triglicéridos, nutrientes y moléculas bioactivas al tracto gastrointestinal del neonato

(Lopez, 2011). El glóbulo graso se mantiene en emulsión por su fina y compleja membrana biológica, la MFGM, que envuelve un núcleo rico en triglicéridos apolares, que varían considerablemente en peso molecular y grado de insaturación. El tamaño del glóbulo graso, la composición y las propiedades de la MFGM varían entre los mamíferos dependiendo, por ejemplo, de la fisiología de la hembra y su dieta.

La MFGM posee una estructura en tres capas: la capa interna, compuesta por proteínas y lípidos polares del retículo endoplásmico; y la bicapa externa, formada por enzimas, proteínas, glicoproteínas y lípidos polares (Figura 1), originados en regiones especializadas de la membrana plasmática apical de las células epiteliales mamarias (Lopez, 2011). Los fosfolípidos son los lípidos mayoritarios y casi el 60% de todos ellos están asociados a la membrana. Los principales son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la esfingomiélin, que es un tipo de esfingolípido altamente bioactivo (Douëllou *et al.*, 2017).

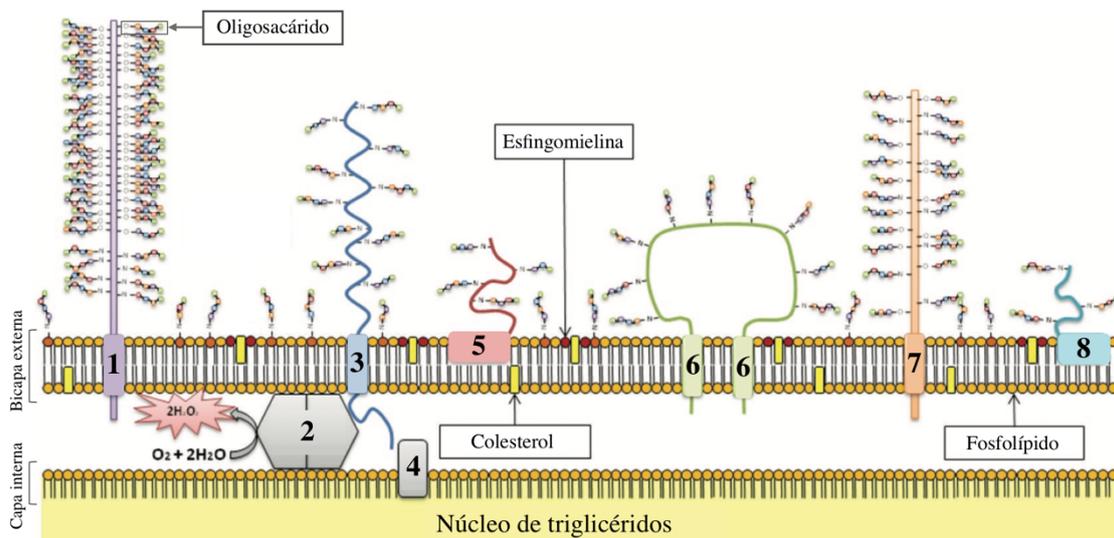


Figura 1. Estructura esquemática de la MFGM con la disposición de las principales proteínas y lípidos, adaptada de Douëllou *et al.* (2017). Las proteínas MUC1 (1), BTN (3), CD36 (6) y MUC15 (7) se encuentran en la bicapa lipídica externa. La XDH/XO (2) se sitúa entre la capa interna y la bicapa externa, y está estrechamente conectada con la proteína transmembranal BTN. La ADPH (4) se encuentra en la capa polar interna por su afinidad por los triglicéridos. Las proteínas PAS 6/7 (5) y PP3 (proteosa peptona 3) (8) están situadas en la zona exterior de la membrana. La mayor parte de los lípidos se encuentran en la membrana externa (Dewettinck *et al.*, 2008).

Las proteínas representan entre el 25 y el 70% de la masa de la MFGM. Poseen funciones de gran importancia para la actividad y la estimulación del crecimiento celular y confieren protección frente a patógenos intestinales. Las principales proteínas de la MFGM son glicoproteínas, algunas de ellas fuertemente glicosiladas, como la mucina 1 (MUC1), la mucina 15 (MUC15 o PAS III), la lactadherina (LD o PAS 6/7), la xantina deshidrogenasa/oxidasa (XDH/XO), el grupo de diferenciación 36 (CD36 o PAS IV) y la

butirofilina (BTN). Entre las proteínas no glicosiladas se encuentran la adipofilina (ADPH) y la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP). En la leche bovina, la BTN representa más del 40% y la XDH/XO el 12% del total de las proteínas de la MFGM (Mather, 2000; Riccio, 2004; Lopez, 2011; Douëllou *et al.*, 2017). Las proteínas y glicoproteínas están distribuidas heterogéneamente y de forma asimétrica a lo largo de la MFGM.

Las funciones principales de la MFGM son actuar como agente emulsionante natural, impidiendo la coalescencia de los glóbulos grasos en la leche y proteger a la grasa de la degradación enzimática, ocasionada principalmente por las lipasas. Los fosfolípidos y otras moléculas bioactivas de la MFGM han demostrado ser beneficiosas para la salud por sus actividades antibacterianas, antivirales y antitoxinas, y también pueden suponer una mejora en las características nutritivas de algunos productos lácteos (Ahn *et al.*, 2011; Lopez, 2011). Más concretamente, se ha observado que los oligosacáridos de la leche bovina y los glicoconjugados ligados a la MFGM inhiben la adhesión de los microorganismos enteropatógenos de origen alimentario a las células y tejidos intestinales (Douëllou *et al.*, 2017). Además, un estudio con crías de rata como modelo de estrés, concluyó que la administración de MFGM junto con prebióticos mejoraron la sensibilidad al dolor visceral y el deterioro cognitivo, causados por el estrés de la separación materna, que induce alteraciones a largo plazo en el comportamiento y en la neuroquímica del cerebro (Waworuntu *et al.*, 2017). También se ha demostrado que la MFGM juega un papel importante en el desarrollo cognitivo al aumentar la regulación de las proteínas implicadas en la función cerebral (Brink y Lønnerdal, 2018).

3.3. Proteínas lácteas

3.3.1. Caseínas

Las caseínas son fosfoproteínas hidrofóbicas que precipitan a un pH alrededor de 4,6. Estas proteínas son las mayoritarias en la leche, ya que representan alrededor del 80% (Fox y Mulvihill, 1982). Se encuentran en dispersión coloidal como micelas, compuestas por agua, caseínas (93% de su masa seca) y sales, entre las que destaca el calcio. El 65% del calcio total de la leche se encuentra asociado a las caseínas (Haug *et al.*, 2007; de Kruif *et al.*, 2012). La gran mayoría de los grupos hidrofóbicos de las caseínas están expuestos, formando enlaces que asocian las micelas entre ellas (Walstra *et al.*, 1999). El promedio del diámetro de las micelas de caseína en la leche bovina es de aproximadamente unos 200 nm. Las micelas de caseína son muy estables, pero precipitan por la acción de enzimas proteolíticas (cuajo animal

o coagulantes vegetales y microbianos) y por acidificación. Las micelas están compuestas por cuatro tipos de caseína individuales: α_{S1} -, α_{S2} -, β - y κ - caseína, en proporciones aproximadas de 4:1:3,5:1,5, respectivamente (Luisa, 1995; Dalgleish, 2011). En la leche bovina, la κ -caseína no es sensible al calcio, en cambio, las otras tres caseínas sí lo son y están altamente fosforiladas (Horne, 2006). La función biológica de las caseínas en la leche es transportar el calcio y el fosfato, y también formar un coágulo en el estómago para una digestión eficiente por el neonato (Haug *et al.*, 2007).

En los últimos años, se han propuesto diversos modelos de la estructura de la micela de caseína pero aún falta información sobre su estructura y propiedades (de Kruif *et al.*, 2012). Actualmente, los dos modelos principales son el modelo submicelar y el modelo de *nanocluster*. En el **modelo submicelar**, las caseínas α_{S1} , α_{S2} y β se agregan por medio de las partes hidrofóbicas en el interior de la submicela; mientras que la κ -caseína se localiza, principalmente, en la parte externa, quedando su parte más polar en contacto con el medio acuoso. De esta forma, las submicelas ricas en κ -caseína se sitúan en la superficie de la micela, y las pobres en esta proteína se localizan en el interior de la micela, unidas mediante la formación de puentes de fosfato de calcio. Las micelas se mantienen en suspensión en la leche por su carga externa negativa (Figura 2).

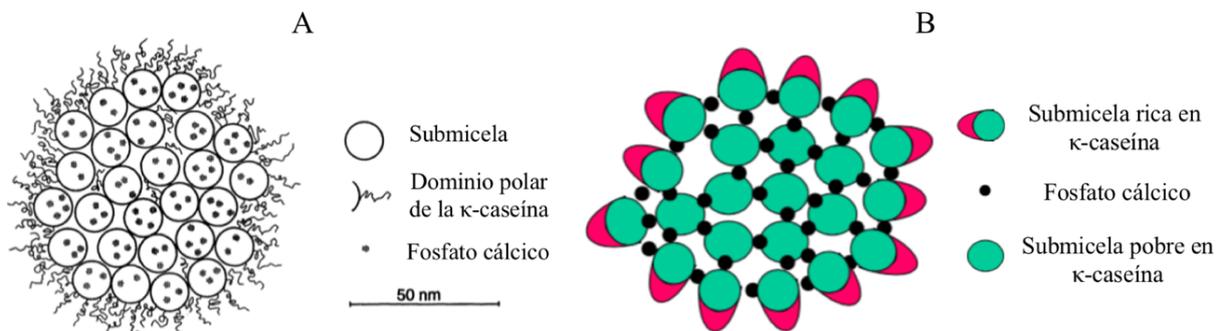


Figura 2. Esquemas de los modelos submicelares de las micelas de caseína propuestos por Walstra, 1999 (A) y Horne, 2006 (B).

En el **modelo de *nanocluster***, la micela de caseína es una matriz homogénea de caseínas. Este modelo se basa en la unión de las α -caseínas y β -caseínas a diferentes *nanoclusters* de fosfato de calcio por interacciones hidrofóbicas, actuando como puentes y formando una red tridimensional circular que facilita su extensión (Figura 3). La cadena de *nanoclusters* está rodeada por las regiones hidrofóbicas colgantes de las caseínas (Horne, 2006; de Kruif *et al.*, 2012).

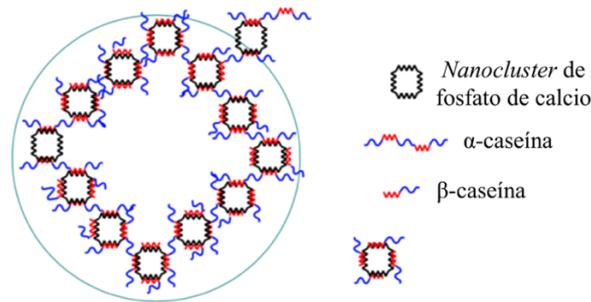


Figura 3. Esquema del modelo de *nanocluster* de las micelas de caseína (Horne, 2006).

3.3.2. Proteínas del lactosuero

El lactosuero contiene alrededor de un 20% de las proteínas de la leche, cerca del 8% de la materia grasa y el 95% de la lactosa, por lo que es una fuente importante de nutrientes (Torres *et al.*, 2009). El lactosuero es un subproducto de la fabricación del queso en la industria láctea, considerado durante mucho tiempo de poco valor. Su uso se destina a la alimentación animal y al desecado para su utilización como ingrediente en la industria alimentaria. Sin embargo, en los últimos años, ha aumentado el interés por algunas proteínas y péptidos bioactivos del lactosuero al tener beneficios para la salud y poder usarse como ingredientes en alimentos funcionales (Madureira *et al.*, 2007; Solak y Akin, 2012).

La mayoría de las proteínas del lactosuero suelen ser proteínas globulares más solubles en agua que las caseínas. Las principales proteínas son la β -lactoglobulina, la α -lactalbúmina, las inmunoglobulinas, la albúmina sérica bovina, la lactoferrina y la lactoperoxidasa (Walstra, 1999; Solak y Akin, 2012).

La **β -lactoglobulina** es la proteína mayoritaria del lactosuero, representando alrededor del 58% (p/p) del total de proteínas. Su estructura cuaternaria depende del pH y se presenta principalmente como un dímero estable. Las funciones de esta proteína son, principalmente, la transferencia de la inmunidad pasiva al recién nacido y la regulación del metabolismo del fósforo en la glándula mamaria. Además, suele unir pequeños ligandos hidrofóbicos, como el retinol y los ácidos grasos. Su contenido en aminoácidos es elevado, sobre todo en cisteína, importante para la síntesis de otros péptidos como el glutatión (Madureira *et al.*, 2007).

La **α -lactalbúmina** es la segunda proteína más abundante en el lactosuero, representando aproximadamente el 20% (p/p) del total de proteínas. Se sintetiza en la glándula mamaria de los rumiantes, al igual que la β -lactoglobulina. Esta proteína presenta zonas de su secuencia de aminoácidos homólogas a la de la lisozima. Su estructura globular se estabiliza mediante

cuatro enlaces disulfuro y actúa como coenzima para la biosíntesis de la lactosa (Madureira *et al.*, 2007).

Las **inmunoglobulinas** (Igs) están presentes en el lactosuero, pero también en los fluidos fisiológicos de todos los mamíferos. La mayoría de las Igs son anticuerpos sintetizados en respuesta a la estimulación de antígenos específicos. Las Igs de la leche varían mucho en cuanto a su concentración y composición, así, en el calostro el contenido de las Igs es muy elevado por su importante función inmunológica. Estas proteínas poseen dos cadenas polipeptídicas ligeras y dos cadenas pesadas. Las clases de Igs que destacan en la leche son: IgG, IgA e IgM. Las IgG, que representan hasta el 80% (p/p) de las Igs del lactosuero, se dividen en dos subclases, las IgG1 e IgG2 (Walstra *et al.*, 1999; Madureira *et al.*, 2007).

La **albúmina sérica bovina** (BSA, del nombre en inglés *Bovine Serum Albumin*) se encuentra en la leche por transferencia pasiva a partir del flujo sanguíneo. La BSA posee 17 puentes disulfuro intermoleculares y un grupo tiol, y puede unir ácidos grasos libres y otros lípidos. Una función importante que se le ha asociado es la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral (Madureira *et al.*, 2007).

La **lactoperoxidasa** (LP) está presente en varias secreciones de los animales como las lágrimas, saliva y leche. En la leche, esta peroxidasa es una de las enzimas más abundantes, aunque representa solamente alrededor del 1% de las proteínas totales del lactosuero. Además, ha demostrado tener capacidad antibacteriana en diversos estudios (Madureira *et al.*, 2007; Solak y Akin, 2012). Por consiguiente, en algunos países, la activación del sistema LP se utiliza para la conservación de la leche cuando no es posible su refrigeración por razones técnicas y/o económicas, y así poder reducir las pérdidas y aumentar su disponibilidad (FAO y OMS, 2005).

3.3.2.1. Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína monomérica, perteneciente a la familia de las transferrinas, con propiedades quelantes del hierro. Su peso molecular es de aproximadamente 80 kDa y se sintetiza en las células epiteliales glandulares y los neutrófilos maduros. Esta proteína puede estar presente en varios fluidos biológicos como la leche, la saliva, las lágrimas, las secreciones nasales e intestinales, y el jugo pancreático (Lønnerdal e Iyer, 1995). La LF está compuesta por una cadena simple de 696 aminoácidos que forma una estructura organizada en dos lóbulos homólogos que corresponden a las regiones terminales N- (amino) y C- (carboxilo), unidas por una corta hélice α . Cada lóbulo se subdivide en dos subdominios

de tamaño similar: N1, N2, C1 y C2, que permiten la unión al hierro en una hendidura entre los dos subdominios (Figura 4). Dos iones férricos (Fe^{3+}) pueden unirse covalentemente a la LF en presencia de dos iones de carbonato. Existen tres formas de LF según el nivel de saturación del hierro: apolactoferrina (libre de hierro), forma monoférrica (un ion Fe^{3+} unido a uno de los dos lóbulos) y hololactoferrina (un ion Fe^{3+} unido a cada uno de los lóbulos), esta última con un nivel de saturación entre el 76 y 100% (Wang *et al.*, 2019).

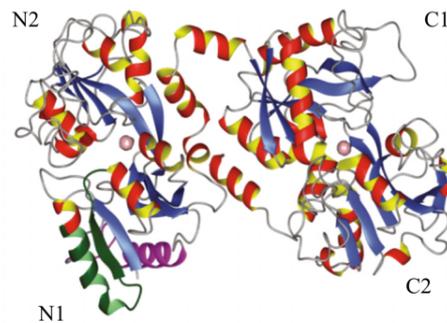


Figura 4. Estructura cristalina tridimensional de la LF bovina con los cuatro subdominios. El sitio de unión al ion férrico está representado por las dos esferas de color rosado, una en cada lóbulo de la proteína (Vogel, 2012).

Las propiedades principales de la LF son la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y anticarcinogénica. Diversos estudios han descrito la actividad antibacteriana de la LF frente a una amplia variedad de microorganismos, entre ellos, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Legionella pneumophila* y *Mycobacterium tuberculosis* (García-Montoya *et al.*, 2012). Esta proteína produce un efecto bacteriostático ya que, al unirse al hierro y retenerlo, priva a algunas bacterias de un nutriente esencial. Además, la LF ejerce un efecto bactericida en bacterias para las que no es estrictamente necesario el hierro, a través de una interacción directa entre la proteína y la bacteria. Esta proteína daña la membrana exterior de las bacterias Gram-negativas mediante la unión a los lipopolisacáridos (LPS) de la superficie de la bacteria, provocando la pérdida de la integridad de la membrana. Por otro lado, la LF se une a las moléculas aniónicas de la superficie celular de las bacterias Gram-positivas, reduciendo la carga negativa y facilitando el efecto de algunos compuestos antibacterianos (Farnaud y Evans, 2003; Wang *et al.*, 2019). La concentración de esta proteína varía según las especies y las etapas de lactancia. En el calostro los niveles de LF son más elevados, con una concentración de aproximadamente 0,8 mg/mL en el calostro bovino y con más de 5 mg/mL en el calostro humano (Wang *et al.*, 2019). En la leche bovina la concentración es más baja (0,02-0,35 mg/mL) que en la leche

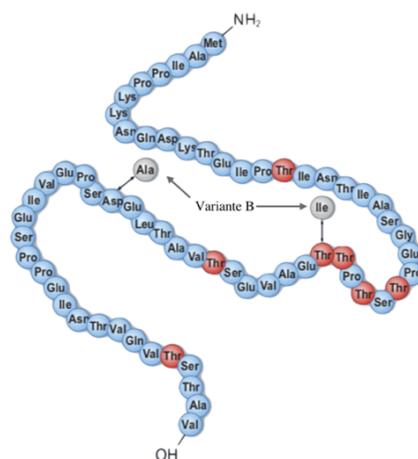
humana (~4 mg/mL), limitando así su actividad antibacteriana. También se le atribuyen a la LF actividades antifúngicas, antivirales y antiparasitarias (Madureira *et al.*, 2007).

La LF se ha propuesto como un factor que puede evitar la aparición de posibles precursores de tumores, pudiendo así proteger contra diferentes tipos de cáncer. Algunos estudios se han interesado en esta actividad anticarcinógena y han demostrado que la LF inhibe significativamente los cánceres de colon, esófago, pulmón y vejiga en ensayos realizados con animales de laboratorio (Solak y Akin, 2012). En cuanto a la utilización de la LF como un ingrediente alimentario, no fue aprobada hasta el año 2012 por la Comisión Europea, estableciendo los niveles máximos en diversos alimentos, entre ellos, las fórmulas para lactantes, caramelos y productos lácteos (Comisión Europea, 2012a, 2012b).

3.3.2.2. Glicomacropéptido

El glicomacropéptido (GMP), también llamado caseinmacropéptido, es un péptido rico en ácido siálico que se forma por la acción proteolítica de la quimosina del cuajo o de la pepsina sobre la κ -caseína, entre los aminoácidos Phe¹⁰⁵-Met¹⁰⁶, durante la fabricación del queso o durante el proceso de digestión gástrica, respectivamente. Los dos polipéptidos que se forman son la para- κ -caseína, que es hidrofóbica y ligeramente catiónica a pH 6,6, y el GMP, fuertemente polar, termoestable, con un peso molecular de aproximadamente 9 kDa y con un punto isoeléctrico entre 4 y 5, que varía debido a la heterogeneidad de la glicosilación y la fosforilación. Este péptido está compuesto por 64 aminoácidos de la región C-terminal (residuos 106-169) de la κ -caseína y posee dos principales variantes genéticas (Figura 5). El GMP es rico en aminoácidos como la prolina, glutamina, serina y treonina, pero es deficiente en aminoácidos aromáticos (Delfour *et al.*, 1965; Kawasaki *et al.*, 1992; Neelima *et al.*, 2013). Los sitios de fosforilación están localizados en los residuos de serina (Sawin *et al.*, 2015). El GMP se encuentra en concentraciones de 1,2-1,5 g/L en los sueros de quesería y constituye aproximadamente un 20-25% (p/p) de las proteínas totales del lactosuero (Moreno y López-Fandiño, 2009).

Figura 5. Esquema de la estructura primaria de dos variantes genéticas (A y B) del glicomacropéptido compuesto por 64 aminoácidos. Se indican los dos aminoácidos que diferirían en la variante B. Se muestran en rojo los sitios de glicosilación, en los residuos de treonina (Sawin *et al.*, 2015).



La composición del GMP es variable y depende del origen del lactosuero. Además, presenta un cambio en la conformación según la fuerza iónica, el pH y la presencia de otras moléculas. Diferentes cadenas de carbohidratos se unen al GMP, como el ácido siálico, generando diferentes formas glicosiladas, siendo catorce las identificadas (Neelima *et al.*, 2013). Según el nivel de glicosilación, el GMP se clasifica en dos fracciones: el glicopéptido glicosilado y fosforilado (gGMP), que representa el 50% del total de GMP, y el aglicopéptido no glicosilado pero fosforilado (aGMP) (Kreuz *et al.*, 2009). El peso molecular del aGMP es de aproximadamente 6,7 kDa y el de gGMP es de 7,5 kDa, pudiendo llegar hasta 9,6 kDa. El calentamiento de la leche o del lactosuero influye en el grado de glicosilación del GMP, disminuyendo con un calentamiento más intenso (Neelima *et al.*, 2013). Este péptido no posee una estructura secundaria y terciaria definida, no obstante, la estructura tridimensional muestra que el péptido tiene una fuerte carga negativa y tres pequeños dominios con carga positiva en el extremo N-terminal (Jauregui-Rincón *et al.*, 2019).

El GMP posee numerosas propiedades biológicas y funcionales, como la capacidad de emulsión, espumación y formación de gel, que lo convierten en un ingrediente de alto potencial en la industria alimentaria (El-Salam *et al.*, 1996; Neelima *et al.*, 2013). Este péptido bioactivo posee actividades antibacterianas, prebióticas, inhibitoras de la secreción gástrica, moduladoras de la secreción hormonal gástrica y del metabolismo, antitumorales e inmunomoduladoras. Algunas actividades biológicas se atribuyen a la estructura del péptido, principalmente a los carbohidratos unidos (Córdova-Dávalos *et al.*, 2019).

En los últimos años, se han producido numerosos casos de adulteración de la leche con suero de quesería para reducir su coste. Sin embargo, además de ser un fraude, esta adición afecta a la calidad del producto y, por lo tanto, a la industria láctea y a los consumidores. Para detectar este problema, el GMP se utiliza como marcador de la adulteración. En algunos estudios, se han utilizado anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido bovino (anti-GMPb) que mostraron reactividad también frente al GMP ovino, para determinar la adulteración de leche de oveja con lactosuero ovino (Vela *et al.*, 2012). La mayoría de los métodos utilizados para determinar la presencia de suero de quesería se basan en el uso de técnicas inmunológicas sensibles como el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del nombre en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) o el ensayo de flujo lateral, pero este último presenta el problema de los falsos positivos, pues hay que tener en cuenta que se puede producir proteólisis espontánea en la leche que puede dar lugar a péptidos similares al GMP (Neelima *et al.*, 2013).

3.3.3. Proteínas de la MFGM

3.3.3.1. Lactadherina

La lactadherina (LD) bovina pertenece a la familia de las glicoproteínas y está formada por dos variantes de glicosilación: PAS-6 de 52 kDa y PAS-7 de 47 kDa, que comparten un núcleo polipeptídico común. Esta proteína presenta una secuencia proteica de 427 aminoácidos y tiene una estructura compuesta por cuatro dominios funcionales: EGF1, EGF2, C1 y C2 (Figura 6). Los dos primeros dominios, situados en la región N-terminal, son similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF, del nombre en inglés *Epidermal Growth Factor*); mientras que los otros dos, en la región C-terminal, son homólogos a los factores de coagulación V y VIII. La LD es capaz de unirse a las membranas por dos mecanismos: por afinidad a las integrinas debido a la secuencia de adhesión celular Arg-Gly-Asp (RGD) del dominio EGF2, y por unión directa a los fosfolípidos (Andersen *et al.*, 1997).



Figura 6. Estructura de los cuatro dominios de la lactadherina bovina (Kamińska *et al.*, 2018).

Esta proteína multifuncional actúa en diversas interacciones celulares, procesos fisiológicos y patológicos como la fagocitosis, la angiogénesis, la remodelación de tejidos y la coagulación de la sangre. Por lo tanto, puede tener usos potenciales en el tratamiento de enfermedades (Kamińska *et al.*, 2018). Se ha demostrado la capacidad de inhibición de la LD humana frente a la infección por rotavirus, protegiendo así el tracto gastrointestinal de los mamíferos lactantes (Kvistgaard *et al.*, 2004; Parrón *et al.*, 2018). La LD también podría jugar un papel en la protección de los lechones neonatos contra *E. coli* enterotoxigénica (Shahriar *et al.*, 2006).

3.3.3.2. Mucinas

Las mucinas que destacan en la leche de varias especies, como la bovina, son MUC1, MUC15 y MUCX (Liu *et al.*, 2005). La MUC1, de peso molecular entre 160 y 200 kDa, es la mucina predominante en la leche bovina, con una concentración de 40 mg/L. Además, tiene una región N-terminal orientada hacia el exterior, un único dominio transmembrana y una corta cola entre la bicapa externa y la capa interna de la MFGM. Posee una región central muy glicosilada con un número variable de repeticiones en tándem de serina, treonina y prolina (STP) y regiones ricas en cisteína en la región C-terminal (Mather, 2000). La MUC1 forma parte del sistema de defensa inmune innato y participa en la inhibición de bacterias patógenas

(Keenan y Mather, 2006). Otra posible función de MUC1 es proporcionar protección en la superficie de la MFGM contra la degradación de proteasas (tripsina, quimotripsina y pepsina) (Patton *et al.*, 1995). Por otro lado, la MUC15 tiene un peso molecular de unos 95 kDa y, al igual que la MUC1, es una glicoproteína de tipo 1 con un extenso dominio exoplásmico y un dominio transmembrana; sin embargo, no presenta repeticiones en tándem (Keenan y Mather, 2006). Según Liu *et al.* (2005) la MUCX, de peso molecular superior a 200 kDa, probablemente posea estructuras de carbohidratos más complejas que la MUC1, otorgándole así la capacidad de unirse a un espectro más amplio de microorganismos patógenos.

3.4. *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter sakazakii, conocido anteriormente como *Enterobacter sakazakii*, es una bacteria perteneciente al género *Cronobacter* de la familia *Enterobacteriaceae* (Farmer *et al.*, 1980). El género está compuesto por siete especies: *C. sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. muytjensii*, *C. universalis* y *C. condimenti*, presentes en el medio ambiente y en el intestino humano y animal (Joseph *et al.*, 2012). El género *Cronobacter* está compuesto por bacilos Gram-negativos, oxidasa negativos, catalasa positivos, anaerobios facultativos, móviles, que no forman esporas y con un tamaño aproximado de 3 x 1 µm (Iversen *et al.*, 2007a).

La mayoría de las cepas de *C. sakazakii* crecen en un rango muy amplio de temperaturas, entre 6 y 47 °C, por lo tanto, este patógeno es capaz de crecer en refrigeración, aunque su temperatura óptima está comprendida entre 37 y 43 °C (Iversen *et al.*, 2004). *C. sakazakii* produce colonias de pigmentación amarilla en agar de soja tripticasa (TSA, del nombre en inglés *Trypticase Soy Agar*), cuya intensidad puede variar según la cepa y la temperatura de crecimiento. Las colonias pueden ser de dos tipos morfológicamente diferentes: colonias grandes y gomosas de borde ondulado, y colonias lisas con menos pigmento (Lehner y Stephan, 2004).

C. sakazakii es un patógeno oportunista transmitido principalmente por el consumo de alimentos en polvo, como las leches y las fórmulas infantiles. También se ha aislado en una amplia gama de alimentos y bebidas como quesos, huevos, productos cárnicos, pescados, frutos secos, galletas y verduras (Beuchat *et al.*, 2009). Este patógeno tiene mecanismos de supervivencia como la resistencia a la desecación y al estrés osmótico (Osaili y Forsythe, 2009). Además, algunas cepas de *C. sakazakii* han demostrado la capacidad de formar *biofilms* en superficies como el látex, silicio, acero inoxidable y policarbonatos. En la

industria alimentaria son de especial interés, ya que son posibles fuentes de contaminación de las materias primas o de las superficies en contacto con los alimentos (Iversen *et al.*, 2004).

Este patógeno puede causar infecciones como la enterocolitis necrotizante, la bacteriemia y la meningitis a cualquier edad, pero especialmente afecta a los neonatos prematuros y a las personas inmunodeprimidas (Lai, 2001; Iversen *et al.*, 2007b). La incidencia de la infección es baja pero se han notificado tasas de mortalidad altas, del 33 al 80%, y los que contraen la enfermedad pueden llegar a sufrir graves trastornos neurológicos (Kim *et al.*, 2010). La meningitis bacteriana es una enfermedad mortal sobre todo en recién nacidos, por lo que se han usado antibióticos contra *C. sakazakii*, como por ejemplo una combinación de ampicilina y gentamicina. La resistencia a los antibióticos, entre ellos la ampicilina, observada en algunas cepas de este patógeno es motivo de gran preocupación, y se ha sugerido que puede estar correlacionada con la tendencia general al aumento de la resistencia a los antibióticos entre las enterobacterias (Lehner y Stephan, 2004).

C. sakazakii se adhiere e invade las células epiteliales del intestino, causando lesiones intestinales y llegando así al sistema circulatorio. Las proteínas de la membrana externa OmpA y OmpX (Omp, del nombre en inglés *Outer Membrane Protein*) de esta bacteria, posiblemente estén implicadas en la invasión basolateral. *C. sakazakii* ha mostrado una mayor invasión de las células epiteliales Caco-2 en comparación con otras especies de *Cronobacter*. Esta línea celular presenta características morfológicas y funcionales de los enterocitos del intestino delgado humano después de su diferenciación en un periodo prolongado de cultivo (Kim *et al.*, 2010; Joseph *et al.*, 2012).

En la infección producida por bacterias que afectan al intestino se produce inflamación, importante para la protección del huésped, ya que conlleva una serie de procesos en cadena dirigidos a la destrucción de los patógenos. La inmunidad innata se activa rápidamente al reconocer las moléculas que son características del patógeno mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, del nombre en inglés *Pattern-Recognition Receptors*) de las células inmunes innatas. Estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, del nombre en inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) y son esenciales para la supervivencia del microorganismo. Los receptores tipo Toll (TLRs, del nombre en inglés *Toll-Like Receptors*) son glicoproteínas integrales de membrana tipo 1, de estructura trimodular que forman parte de los PRRs y que reconocen diversos PAMPs derivados de virus, bacterias patógenas, hongos patógenos y protozoos parásitos. El dominio N-terminal extracelular de estos receptores consiste en repeticiones ricas en leucina, y el

dominio C-terminal intracelular o dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR) es necesario para la interacción y el reclutamiento de diversas moléculas adaptadoras para activar la vía de señalización.

Entre los TLRs, destacan el TLR4 y el TLR2, que se localizan en la superficie de la célula, y el TLR9, que se expresa en vesículas intracelulares como el endosoma. El TLR4 detecta los LPS de las bacterias Gram-negativas, el TLR2 detecta el peptidoglicano de la pared celular de las bacterias Gram-positivas y el TLR9 reconoce el DNA genómico de bacterias, rico en sitios Citosina-Guanina (CpG) no metilados (Kumar *et al.*, 2009). Se ha observado que la leche contiene propiedades inhibitorias del TLR4, confiriendo así protección contra enfermedades inflamatorias, como la enterocolitis necrotizante (Hackam y Sodhi, 2018). Concretamente, son los componentes bioactivos de la leche que modulan la expresión de los TLRs, como las glicoproteínas, entre ellas la LF y la LD, los que atenúan la señalización del TLR4 (He *et al.*, 2016). Además, se ha demostrado la actividad antibacteriana de la LF bovina contra *C. sakazakii*, principalmente debida a la retención del hierro, y su resistencia frente a los tratamientos térmicos recomendados (≥ 70 °C), manteniendo así su actividad (Harouna *et al.*, 2015).

4. Objetivos

El **objetivo principal** de este Trabajo Fin de Máster ha sido la caracterización de la actividad biológica de proteínas y péptidos derivados de subproductos lácteos.

Este trabajo incluye los siguientes objetivos parciales:

1. Aislamiento y caracterización de la lactadherina, proteína de la MFGM, y del glicomacropéptido, péptido del lactosuero.
2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la lactadherina y del glicomacropéptido frente a *C. sakazakii* en fase exponencial y estacionaria.
3. Estudio de la citotoxicidad de la lactoferrina sobre la línea celular Caco-2/TC7.
4. Determinación del efecto de la lactoferrina y de las proteínas lácteas aisladas en la inhibición de la adhesión e internalización de *C. sakazakii* a la línea celular Caco-2/TC7.
5. Evaluación de la expresión de receptores intestinales tipo Toll: TLR2, TLR4 y TLR9, en la línea celular Caco-2/TC7 en el proceso de inhibición de la internalización de *C. sakazakii* por la lactoferrina.

5. Materiales y métodos

5.1. Aislamiento de fracciones y proteínas lácteas

5.1.1. Obtención de fracciones lácteas

La leche bovina cruda suministrada por la empresa Villacorona (El Burgo de Ebro, España) fue sometida a desnatado en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza, situada en la Facultad de Veterinaria. Para ello, tras realizar el control de calidad, la leche se calentó a 45-50 °C durante 30 min en una cuba quesera. Seguidamente, se obtuvo la nata mediante una centrífuga desnatadora modelo ARR-DES 125 (Suministros Químicos Arroyo, Santander, España). La leche desnatada fue sometida a un segundo proceso de desnatado para recuperar la mayor cantidad de nata.

La leche desnatada se calentó a 35 °C en la cuba quesera y se le añadió CaCl₂ al 30% (Laboratorios Arroyo, Santander, España) en una proporción 1:8.000 (v/v), distribuyéndolo homogéneamente por toda la leche. A continuación, se le añadió cuajo natural bovino (Laboratorios Arroyo), diluido 1:10 en agua destilada, en una proporción 1:15.000 (v/v) y se dejó incubar durante 1 h. Tras la coagulación de las caseínas, se realizó el corte de la cuajada con lira vertical y horizontal, obteniendo el **lactosuero**. Éste se filtró con una gasa quesera para eliminar los restos de cuajada y se congeló a -20 °C hasta su uso.

La **mazada** o suero de mantequilla (*buttermilk*) se obtuvo mediante agitación mecánica de la nata con una batidora Philips Cucina (Philips, Ámsterdam, Holanda). Este proceso se llevó a cabo hasta obtener los granos de mantequilla, como resultado de la aglomeración de los glóbulos grasos, tras la cual se produjo la inversión de fases y la liberación de la mazada. Los restos de grasa que pudieran quedar en el suero se eliminaron por filtración con gasas queseras. La mazada se conservó a -20 °C.

El **butterserum** se obtuvo a partir de los granos de mantequilla obtenidos de la agitación de la nata. Los granos de mantequilla se mezclaron y se fundieron en una estufa durante 25 min a 40 °C. Tras una centrifugación a 3.000 x g durante 15 min a 20 °C, se recogió la fase inferior o fracción acuosa, que correspondía a la mazada retenida en la mantequilla, denominada *butterserum*. En la fase superior se encontraba el aceite de mantequilla o *butteroil*, que se eliminó por decantación. El *butterserum* recogido se conservó a -20 °C.

5.1.2. Aislamiento y purificación de la lactadherina

5.1.2.1. Aislamiento con solventes orgánicos

Uno de los dos métodos utilizados para el aislamiento de la LD fue el descrito por Kim *et al.* (1992) con algunas modificaciones. Este procedimiento lo componen tres fases principales: la obtención de una fracción enriquecida en MFGM, la delipidación de la fracción enriquecida en MFGM y el procesado de la fracción de MFGM delipidada.

Para la obtención de la fracción enriquecida en MFGM, se mezclaron las fracciones de mazada y *butterserum* en una proporción 7:1 (v/v). La mezcla se ajustó a un pH de 4,8 con HCl 1 M y se dejó en agitación durante 30 min a 4 °C. Seguidamente, se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió con agua Milli-Q. Este precipitado obtenido correspondía con la fracción enriquecida en MFGM, cuyo pH se ajustó a 6,8 con NaOH 0,1 M.

La fracción enriquecida en MFGM se delipidó añadiendo una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v) en una proporción 9:1 (mezcla:muestra, v/v) y se incubó una noche en agitación a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se rompió la emulsión generada con un volumen de agua Milli-Q y se centrifugó a 3.400 x g durante 15 min a 10 °C. Se recuperó la fracción intermedia, entre el metanol y el cloroformo, y se le añadió un volumen de agua destilada. Posteriormente, se utilizó un rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Alemania) para eliminar los residuos de solventes orgánicos que pudieran quedar presentes en la fracción. La fracción de MFGM delipidada y sin residuos, se resuspendió en tampón NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 x g durante 1 h a 4 °C. El precipitado se resuspendió con el tampón Tris-HCl 0,1 M, KCl 1 M, pH 8,2, urea 5 M y benzamidina 0,2 mM, y se dejó en agitación durante 12 h a 4 °C. Al añadir este tampón, la membrana se disgrega y se inhiben las proteasas presentes en ella, facilitando la liberación de la LD. Por último, la mezcla se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se concentró con un dispositivo de ultrafiltración centrífuga de punto de corte de 10 kDa.

5.1.2.2. Aislamiento con Tritón X-114

El segundo método que se aplicó para el aislamiento de la LD fue el descrito por Taylor *et al.* (1997) con algunas modificaciones. Una vez aislada la fracción enriquecida en MFGM, tal y como se ha descrito en el apartado anterior, se lavó con tampón fosfato salino (PBS) compuesto por KH_2PO_4 1,5 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4, y se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se realizaron dos lavados más

y se adicionaron 5 volúmenes de PBS al precipitado, que se resuspendió y agitó fuertemente en un agitador magnético durante 15 min. La muestra se sonicó durante 30 min en el baño de ultrasonidos Ultrasons de 50 Hz (J.P Selecta, Barcelona, España) y se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4 °C. El precipitado obtenido se resuspendió en PBS al 2,5% de Tritón X-114 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.). La muestra se sometió de nuevo a ultrasonidos durante 30 min y se incubó en agitación durante una noche a 4 °C. Al día siguiente, la muestra se incubó durante 1 h a 37 °C y se centrifugó a 40.000 x g durante 30 min a 4 °C. Tras la centrifugación, se obtuvieron tres fases en la muestra: el precipitado, la fase acuosa superior, y la fase detergente intermedia. Ésta última se recogió, se lavó con 5 volúmenes de PBS saturado con Tritón X-114 al 15,5% y se centrifugó a 5.000 x g durante 30 min a 25 °C. El sobrenadante se concentró en una célula de ultrafiltración (Amicon INC., Beverly, MA, EE.UU.) con un punto de corte de 30 kDa. Al concentrado se le añadieron 4 volúmenes de acetona a -20 °C, se homogeneizó con vórtex y se incubó durante una noche a -80 °C. Tras la incubación, se centrifugó a 18.000 x g durante 10 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado al aire libre, para eliminar toda la acetona, aproximadamente durante 30 min. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en 500 µL de PBS, obteniendo así una fracción enriquecida en LD.

5.1.2.3. Purificación con la columna de Sephacryl S-200

Las fracciones enriquecidas en LD se purificaron mediante cromatografía de filtración en gel. Antes de su uso, la columna de Sephacryl S-200 (3 x 36 cm) se equilibró con el tampón Tris-HCl y urea 5 M, utilizado anteriormente. Se añadió la muestra concentrada (1,2 mL aproximadamente) a un flujo de 0,2 mL/min, recogiendo fracciones de 1,6 mL. La absorbancia de las fracciones obtenidas se determinó a 280 nm en un espectrofotómetro modelo 6505 UV/Vis (Jenway, Stone, Reino Unido).

Los valores de absorbancia de las fracciones de la cromatografía se representaron gráficamente y las correspondientes al pico que contenía la LD, como se comprobó por electroforesis, se mezclaron, se dializaron frente a PBS y se concentraron con un dispositivo de ultrafiltración de punto de corte de 10 kDa mediante centrifugación.

5.1.2.4. Purificación con la columna de Concanavalina A-Sepharose

Tras la cromatografía de filtración en gel y para conseguir un grado de purificación mayor, las muestras de LD obtenidas se sometieron a una cromatografía de afinidad con la lectina Concanavalina A. La fracción se dializó frente al tampón de unión Tris-HCl 20 mM, pH 7,4

que contenía NaCl 0,5 M, MnCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1 mM, con un dispositivo de ultrafiltración de punto de corte de 10 kDa mediante centrifugación. Se utilizó la columna HiTrap Concanavalina A-Sepharose 4B de 1 mL (0,7 x 2,5 cm) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) y el equipo ÄKTA start (GE Healthcare) con el programa UNICORN start v1.1. En primer lugar, se ajustó el flujo a 1 mL/min y se equilibró la columna con 8 mL de agua destilada filtrada con 0,22 µm, seguidos de otros 8 mL de tampón de unión filtrado. Seguidamente, se aplicó la muestra a la columna y se dejó recircular durante 1 h a un flujo de 0,5 mL/min. Tras este periodo de tiempo, la columna se lavó con 10 mL del mismo tampón de unión a un flujo de 1 mL/min para eliminar las proteínas que no se habían unido a la columna. Posteriormente, se llevó a cabo la elución de la LD retenida en la columna mediante la aplicación de 30 mL de tampón de elución Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 con un gradiente de 0 a 0,5 M de metyl- α -D-manopiranosido. Durante la elución se recogieron fracciones de 1 mL de volumen, cuya absorbancia se determinó a 280 nm. Tras la elución, se lavó la columna para su almacenamiento a 4 °C con 10 mL de tampón acetato de sodio 0,1 M, pH 6 que contenía NaCl 1 M, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y etanol al 20%, previamente filtrado.

Las absorbancias de las fracciones eluidas se representaron gráficamente, y las correspondientes al pico que contenía la LD se mezclaron, se dializaron frente a agua destilada y se concentraron como se ha descrito anteriormente. Todas las fracciones aisladas y purificadas se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) para verificar la presencia de LD. La concentración de proteína de las fracciones obtenidas se determinó con el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el kit BCA Protein Assay de Pierce (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

5.1.3. Aislamiento y purificación del glicomacropéptido

El método empleado para la obtención del GMP se basó en la precipitación de las proteínas de un lactosuero obtenido por coagulación enzimática, mediante acidificación y tratamiento térmico siguiendo los procedimientos de Martín-Diana *et al.* (2001) y Abd El-Salam (2006). El lactosuero se acidificó lentamente con HCl 0,1 N hasta obtener un pH de 4,5. A continuación, se aplicó un tratamiento térmico al lactosuero de 90 °C durante 1 h en un baño termostático, con el objetivo de coagular las proteínas presentes en el lactosuero y así separarlas de los péptidos, más termorresistentes, como es el caso del GMP. Se dejó atemperar el lactosuero antes de realizar una centrifugación a 5.000 x g durante 15 min a 4 °C,

tras la cual se obtuvo el sobrenadante, que se filtró con papel de filtro para eliminar restos de proteínas precipitadas.

Posteriormente, se procedió al aislamiento del GMP por cromatografía de intercambio iónico, siguiendo la metodología descrita por Kawasaki *et al.* (1994) con algunas modificaciones. La cromatografía de intercambio aniónico permite la unión del GMP a los grupos amino del gel cargados positivamente y la exclusión de las proteínas cargadas positivamente. En primer lugar, el lactosuero filtrado se ajustó a pH 3 con HCl 1 N, se mezcló con el gel DEAE-Sephadex A-50 (Sigma-Aldrich) en una proporción 1:2 (v/v) y se dejó en agitación suave durante 2 h a 4 °C. La mezcla se pasó a un embudo sinterizado acoplado a un matraz kitasato y una trompa de vacío por agua para separar, mediante filtración, la fracción no retenida o excluida. Se realizaron seis lavados al gel, cada uno con un volumen de agua Milli-Q igual al de la muestra. Después, se añadió el mismo volumen de solución NaCl 1 M al gel, que se dejó en agitación durante 2 h a 4 °C con el objetivo de eluir el GMP unido a la matriz. Tras la agitación, se filtró la mezcla de gel con NaCl en el embudo sinterizado y se recogió la fracción filtrada. El gel se lavó con seis volúmenes de NaCl 1 M, guardando las fracciones que se obtenían de cada elución y midiendo su absorbancia a 280 nm. Posteriormente, se lavó el gel con varios volúmenes de agua Milli-Q y se conservó a 4 °C con el 10% de azida sódica hasta su siguiente uso.

La solución salina enriquecida en GMP (generalmente de la primera elución y el primer lavado) se concentró con una célula de ultrafiltración de 3 kDa, hasta tener una concentración cinco veces superior a la inicial. Después, la muestra se lavó y dializó frente a PBS mediante centrifugaciones a 7.500 x g durante 20 min a 4 °C con una membrana de punto de corte de 3 kDa.

La presencia de GMP se detectó mediante el kit comercial STICK cGMP donado por la empresa Operon. S.A. (Cuarte de Huerva, España), siguiendo el protocolo del fabricante. Este test inmunocromatográfico es rápido y sensible, ya que permite la detección de GMP a una concentración del 1% en leche. Adicionalmente, las muestras se analizaron mediante electroforesis con SDS y la tinción con azul de Coomassie para comprobar la presencia de GMP y se determinó su concentración mediante BCA.

5.2. Técnicas electroforéticas

5.2.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

Para esta técnica se utilizaron geles comerciales Mini-Protean 4-20% con 15 pocillos y el equipo Mini-Protean Tetra Cell, ambos de la marca Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras a analizar se diluyeron en una relación 1:1 (v/v) con un tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, 20% de glicerol, 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol y 10% de 2-mercaptoetanol. Se hirvieron durante 5 min y se cargaron en los pocillos del gel. Como referencia, se empleó el patrón de pesos moleculares PageRuler Prestained Protein Ladder (GE Healthcare). Al gel se le aplicó un voltaje de 180 V utilizando el equipo Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Estocolmo, Suecia).

5.2.2. Tinción de los geles con azul de Coomassie

Después de la electroforesis, se utilizó el colorante azul de Coomassie, preparado con 0,65 g/L de Azul de Coomassie Blue R (Serva, Heidelberg, Alemania), metanol, ácido acético, glicerol y agua destilada (30:10:10:50, v/v/v/v), para la tinción de las proteínas. Se incubó el gel en agitación durante 1 h en la solución de azul de Coomassie. Tras la incubación, se retiró el colorante y se añadió la solución de decoloración compuesta por metanol, ácido acético, glicerina y agua destilada (25:8:2:65, v/v/v/v). El gel se incubó en agitación con esta solución hasta ver únicamente teñidas las bandas de proteínas y péptidos. A continuación, el gel se escaneó con el equipo ImageScanner III (GE Healthcare) y el programa LabScan v6.0 para analizar los resultados obtenidos.

5.3. Western Blotting

La detección de proteínas mediante anticuerpos específicos en las muestras se comprobó mediante la técnica de Western Blotting. Para ello, se utilizaron un antisuero primario policlonal anti-lactadherina bovina obtenido en conejo, en el caso de querer identificar LD; y un policlonal anti-lactoferrina bovina obtenido en conejo para comprobar la presencia de LF, ambos obtenidos previamente en el grupo de investigación según el procedimiento descrito por Sánchez *et al.* (1992). Como antisuero secundario se utilizó uno compuesto por anticuerpos anti-IgG de conejo obtenidos en cabra conjugados con peroxidasa (Sigma-Aldrich). Como controles positivos de la presencia de LD y LF se emplearon una fracción de LD pura previamente obtenida en el grupo de investigación y la LF comercial de Tatura Nutritionals (Morrinsville, Nueva Zelanda), respectivamente.

Una vez realizada la electroforesis, como se ha descrito en el apartado anterior, se procedió a la transferencia de las proteínas mediante el equipo TE 70 ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Bioscience, Little Chalfont, Reino Unido). El equipo de transferencia se montó en el siguiente orden: (1) base del equipo de transferencia, con el polo positivo, (2) un papel Whatman 3 MM humedecido en tampón I, compuesto por Tris 0,3 M, pH 10,4 y metanol al 10%, (3) dos papeles Whatman 3 MM humedecidos en tampón II, compuesto por Tris 0,025 M, pH 10,4 y metanol al 10%, (4) membrana de PVDF activada en metanol durante 10 s y aclarada en el tampón II, (5) gel de electroforesis, (6) tres papeles Whatman 3 MM humedecidos en tampón III, compuesto por Tris 0,025 M, glicina 40 mM, SDS al 0,1%, pH 9,4 y metanol al 20%, (7) tapa del equipo de transferencia, con el polo negativo. Se aplicó una corriente de 80 mA durante 1 h con el equipo Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia).

Tras la transferencia, se incubó la membrana en el tampón Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,4, y Tween 20 (TBS-T) al 2% durante 3 min. Seguidamente, se lavó la membrana tres veces durante 5 min, cada una con TBS-T al 0,1%. Posteriormente, la membrana se incubó con 4 mL del antisuero primario obtenido en conejo, diluido 1/50 en TBS-T al 0,1%, durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente y en agitación, condiciones que se utilizaron en el resto de las etapas. Tras la incubación, se lavó la membrana cinco veces durante 5 min con TBS-T al 0,1%. Después, se procedió a la incubación con 4 mL del antisuero secundario, diluido 1/1.000 en TBS-T al 0,1%, durante 1 h y 30 min, tras lo cual se lavó la membrana cinco veces con TBS-T al 0,1%. La membrana se reveló añadiendo el sustrato de la peroxidasa, compuesto por 4-cloro-1-naftol al 0,06%, metanol al 20% y H₂O₂ al 0,1% en PBS. Tras la aparición de color se detuvo la reacción enzimática lavando la membrana con abundante agua Milli-Q.

5.4. Cultivo de *C. sakazakii*

Los ensayos de actividad antibacteriana de las proteínas lácteas se realizaron sobre la cepa de *C. sakazakii* CECT 853, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España). Para los ensayos, se partió de un depósito de la cepa en el que el microorganismo se encontraba fijado en crioperlas contenidas en crioviales a -80 °C.

El cultivo de *C. sakazakii* se llevó a cabo transfiriendo una crioperla a 10 mL de caldo tripticasa de soja (TSB) (Merck, Darmstad, Alemania) suplementado con 0,6% (v/v) de extracto de levadura (YE) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Tras 24 h de incubación a 37 °C, se realizó una siembra por agotamiento en placa de TSA (Merck) suplementado con

YE al 0,6%, para obtener colonias aisladas. Se incubó la placa a 37 °C durante 24 h y se guardó a 4 °C.

El cultivo y los ensayos con *C. sakazakii* se realizaron en un ambiente de esterilidad en una campana de flujo laminar modelo PV-30/70 marca Telstar (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.).

5.5. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*

Se realizaron dos tipos de ensayos antimicrobianos frente a *C. sakazakii*: (1) con la bacteria en fase exponencial o (2) en fase estacionaria de crecimiento. Con estos ensayos se estudió la actividad antimicrobiana de la LD y el GMP frente a esta bacteria. Para ello, se incubó una colonia aislada de *C. sakazakii* en 10 mL de TSB con YE al 0,6% a 37 °C durante 8 h para los ensayos con la bacteria en fase exponencial o durante 18-20 h para los ensayos en fase estacionaria. La suspensión bacteriana obtenida, de concentración 10^8 ufc/mL en fase exponencial o 10^9 ufc/mL en fase estacionaria, se agitó con vórtex y se centrifugó a 5.000 x g durante 10 min. Se resuspendió el precipitado con 10 mL de agua de peptona al 1% y se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona para obtener una suspensión bacteriana con una concentración aproximada de 10^5 ufc/mL.

Por un lado, las concentraciones finales de LD utilizadas para los ensayos en fase exponencial y en fase estacionaria fueron de 1 y 2 mg/mL y de 0,25; 0,5 y 1 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, las concentraciones finales de GMP para los dos tipos de ensayo fueron de 1,5 y 3 mg/mL. Como control positivo para los ensayos, se empleó la LF comercial de Tatura Nutritionals a una concentración de 5 y/o 2,5 mg/mL, ya que su acción antimicrobiana frente a *C. sakazakii* ya ha sido comprobada previamente por el grupo de investigación. Para su preparación se pesaron 200 mg de LF y se diluyeron en 10 mL de agua destilada. Posteriormente, se esterilizó la solución con filtros de 0,22 µm de Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) de baja unión a proteínas. Tras la filtración, se determinó la concentración real de LF midiendo la absorbancia a 280 nm de la solución diluida 1:10 en agua mili-Q y a partir de su coeficiente de extinción ($E_{280}^{1\%} = 1,27$ mL/cm/g). Todas las muestras se prepararon en agua de peptona. Las muestras de proteína, aisladas como se indica en el apartado 5.1., se homogenizaron y se pasaron por un filtro de 0,22 µm para esterilizarlas. En una placa de 96 pocillos estéril, se añadieron 100 µL/pocillo de la suspensión de *C. sakazakii* obtenida y 100 µL/pocillo de las muestras de proteína. En los pocillos incluidos

como control negativo se añadieron 100 μ L de agua de peptona a la suspensión bacteriana. Todas las muestras se analizaron por duplicado. La placa se incubó a 37 °C durante 24 h.

De manera adicional, en los ensayos para evaluar la actividad antimicrobiana del GMP con la bacteria en fase estacionaria, se determinó el crecimiento bacteriano mediante la medida de la turbidez a 620 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS (Labsystem, Helsinki, Finlandia). La primera lectura se efectuó tras realizar la mezcla de las muestras y la suspensión bacteriana y a lo largo de la incubación se realizaron lecturas cada hora durante las 4 primeras horas y sucesivamente a las 6, 8 y 24 h.

Tras la incubación a las 4 y 24 h, se tomaron alícuotas de 50 μ L de los pocillos y se realizaron diluciones seriadas 1/10 en agua de peptona. A las 4 h, se sembraron las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} en placas de TSA mediante la técnica de siembra en superficie con la ayuda de un asa de Digiralski. A las 24 h, se sembraron las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} . Tras la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C, se procedió al recuento de las colonias.

5.6. Cultivo de la línea celular Caco-2/TC7

5.6.1. Descongelación de la línea celular

La línea celular utilizada para los diferentes ensayos fue la línea de carcinoma de colon humano Caco-2 clon TC7. Esta línea fue donada por el Área de Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. La descongelación de la línea celular, mantenida para su conservación en nitrógeno líquido, se realizó introduciendo un criotubo en agua a temperatura ambiente. Inmediatamente tras su descongelación, se le añadió 1 mL de medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 20% (v/v), L-glutamina 2 mM y penicilina-estreptomicina (100 unidades/mL y 100 μ g/mL, respectivamente) y aminoácidos no esenciales (NEAA), todos ellos al 1% (v/v). Tras añadir el medio DMEM completo, las células se resuspendieron suavemente en el criotubo y se llevaron a un tubo falcon con 30 mL de DMEM completo, previamente atemperado a 37 °C, que se sometió a una centrifugación a 1.000 x g durante 8 min. El precipitado celular obtenido se resuspendió en 4 mL de medio completo y se traspasó a un frasco de 25 cm² con sistema de venteo (TPP, Trasadingen, Suiza) que contenía 6 mL de medio completo. El frasco se mantuvo en un incubador termostatzado (Heraeus, Hanau, Alemania) a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad con 95% de aire y 5% de CO₂. Durante todos los ensayos con la línea celular, se trabajó con

material estéril y en un ambiente estéril en una campana de flujo laminar Telstar Bio II Advance (ThermoFisher Scientific).

5.6.2. Mantenimiento del cultivo celular

Para el mantenimiento de las células adherentes Caco-2/TC7, se eliminó el medio del frasco y se realizó un lavado con PBS estéril. Seguidamente, las células se tripsinizaron con 0,5 mL de una solución de tripsina al 0,025% y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 0,02% (Biological Industries), incubando la placa durante 5 min a 37 °C. Se añadieron 2 mL de DMEM completo a las células desprendidas para inhibir la acción de la tripsina, y se resuspendieron suavemente para disgregarlas. A continuación, se tomó un volumen de 10 µL para el recuento de las células en una cámara de Thoma en un microscopio invertido TMS (Nikon, Tokio, Japón) para determinar así el volumen necesario de la suspensión celular para sembrar una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm². Tras la siembra de las células con DMEM completo, se incubó el frasco de 25 cm² en el incubador como se ha indicado anteriormente.

5.6.3. Cultivo de las células en placa

El cultivo de las células Caco-2/TC7 en placas de ensayo se realizó siguiendo el procedimiento explicado en el apartado anterior. Tras el recuento de células, se determinó el volumen necesario de la suspensión y de DMEM completo, según fuera la placa de 24 o 96 pocillos, para obtener una densidad aproximada de $1,4 \times 10^4$ células/cm². Se sembraron volúmenes de 1 mL/pocillo en la placa de 24 pocillos y 200 µL/pocillo en la placa de 96 pocillos. Las placas se mantuvieron en el incubador a 37 °C y se les cambió el medio de cultivo aproximadamente cada 3-4 días. A los 15 días de crecimiento, se utilizaron las placas para realizar los diferentes ensayos, habiendo alcanzado las células en ese momento la diferenciación en enterocitos.

5.7. Determinación de la citotoxicidad

Las placas de 96 pocillos con las células Caco-2/TC7 diferenciadas en el día 15 de crecimiento, se emplearon para determinar la citotoxicidad de la LF sobre la línea celular. Las células se incubaron, durante 24 h, con soluciones de LF comercial de Tatura Nutritionals a diferentes concentraciones (0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL), cada una por triplicado, en un volumen de 200 µL/pocillo y disueltas en DMEM completo. Transcurrida la incubación, se eliminó el medio de los pocillos y se efectuó un lavado con 200 µL/pocillo de PBS estéril. Se adicionaron 200 µL/pocillo de medio básico, compuesto por DMEM con 1% de L-glutamina

y 1% de NEAA, y se incubó la placa durante 2 h a 37 °C. Tras la incubación, se lavaron de nuevo los pocillos y se añadieron 50 µL/pocillo de las concentraciones de LF utilizadas anteriormente preparadas en DMEM básico. Como control positivo de citotoxicidad se empleó H₂O₂ 50 mM, y como control negativo, DMEM básico. Se incubó la placa durante 1 h a 37 °C. Se lavaron los pocillos y se añadieron 200 µL/pocillo de medio básico y 20 µL del reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) del kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El MTS permite determinar el número de células viables, ya que este reactivo es biorreducido por enzimas deshidrogenasas de las células metabólicamente activas, dependientes del NADPH, en el colorante formazan, soluble en el medio de cultivo. Tras 2 h de incubación de la placa a 37 °C, se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector de placas ELISA Multiskan MS, siendo la intensidad del color directamente proporcional a la cantidad de células viables.

5.8. Ensayos de inhibición de la adhesión e internalización de *C. sakazakii*

En este caso, se realizaron dos tipos de ensayo. Por un lado, los ensayos de inhibición de la adhesión, en los que se analizó el efecto de las proteínas lácteas tanto en la adhesión como en la internalización de *C. sakazakii* a las células y, por otro lado, los ensayos de internalización, en los que únicamente se evaluó el efecto de las proteínas en la internalización de la bacteria en las células. Para ello, se emplearon placas de 24 pocillos con las células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15 días para su diferenciación. Estos ensayos se llevaron a cabo por duplicado para cada muestra. En primer lugar, las células se incubaron durante 24 h con diferentes concentraciones (0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL) de LF comercial en DMEM completo. Transcurrida la incubación, se eliminó el medio de los pocillos y se efectuó un lavado con 2 mL/pocillo de PBS estéril. Se adicionaron 2 mL/pocillo de medio básico y se incubó la placa durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, se lavaron los pocillos con 2 mL/pocillo de PBS. Se adicionaron 150 µL/pocillo de las muestras presentadas en la Tabla 2, preparadas previamente en medio DMEM básico. En los pocillos control se añadieron 150 µL/pocillo de medio básico, tras lo cual se incubó la placa durante 1 h a 37 °C.

Después, se eliminó el medio de todos los pocillos y se realizó un lavado con 2 mL/pocillo de PBS. En cada pocillo, se añadieron 150 µL de DMEM básico y 50 µL de la suspensión de *C. sakazakii* a 10⁵ ufc/mL. La placa se incubó durante 4 h a 37 °C.

Tabla 2. Muestras evaluadas en los ensayos de inhibición de la adhesión e internalización de *C. sakazakii* en la línea celular Caco-2/TC7.

Inhibición de la adhesión	Inhibición de la internalización	Concentraciones (mg/mL)
LF	LF	0,5; 1; 2; 5 y 10*
	GMP	1 y 2
	LD	1 y 1,95
	LF + GMP	LF 2 + GMP 2
		LF 5 + GMP 2
Fórmulas lácteas F1** y F2***	Fórmulas lácteas F1 y F2	F1: dilución 1/140 F2: dilución 1/170

*A cada pocillo se le adicionó la misma concentración con la que se había incubado previamente 24 h.

Compuesta por 3,4 g de lactosuero liofilizado disuelto en 50 mL de agua Milli-Q, LF a 175 mg/mL y un precipitado de MFGM obtenido de 50 mL de mazada. *Compuesta por 50 mL de mazada, LF a 175 mg/mL y un precipitado de MFGM obtenido de 50 mL de mazada.

La suspensión de *C. sakazakii* se obtuvo a partir de la siembra de una colonia aislada, en medio TSB durante 18-20 h a 37 °C. Tras la incubación, se efectuó una centrifugación de la suspensión bacteriana a 5.000 x g durante 10 min a 10 °C y el precipitado se resuspendió en 10 mL de PBS estéril. Este proceso se repitió dos veces. Tras la tercera centrifugación, se resuspendió el precipitado en 500 µL de agua de peptona. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en agua de peptona y la última en medio DMEM básico para obtener una suspensión bacteriana con una concentración de 10⁵ ufc/mL.

Tras la incubación de 4 h con la suspensión bacteriana, en los ensayos de internalización se efectuó un lavado con 2 mL/pocillo de PBS, se adicionaron 200 µL/pocillo de gentamicina a una concentración de 150 µg/mL y la placa se incubó durante 2 h a 37 °C para inactivar las bacterias que no se habían internalizado en las células. En los ensayos de adhesión no se añadió gentamicina para contabilizar tanto las bacterias adheridas como las internalizadas. En ambos casos, tras un lavado con 2 mL/pocillo de PBS, se adicionaron 200 µL/pocillo de tripsina y se incubó la placa a 37 °C durante 15 min para disgregar y permeabilizar las células, liberando así las bacterias internalizadas o adheridas e internalizadas. Finalmente, se procedió a la siembra de las suspensiones procedentes de cada pocillo en placas de TSA. Se realizaron las diluciones necesarias en agua de peptona para el recuento óptimo de las colonias tras la incubación de las placas durante 24 h a 37 °C.

5.9. Expresión de receptores tipo Toll

Las placas de 24 pocillos con las células Caco-2/TC7 diferenciadas en el día 15 de crecimiento también se emplearon para analizar la expresión de los receptores intestinales

TLR2, TLR4 y TLR9. Los pocillos seleccionados siguieron el mismo procedimiento que el utilizado en el ensayo de inhibición de la adhesión de *C. sakazakii*. Este ensayo se realizó por duplicado para las siguientes muestras: dos pocillos con 0,5 y 10 mg/mL de LF, dos pocillos con 0,5 y 10 mg/mL de LF y *C. sakazakii*, un control negativo sin LF ni *C. sakazakii* y varios controles positivos, uno sin LF y con *C. sakazakii*, y dos pocillos con 30 y 60 µg/mL de LPS de *E. coli* 0111:B4 (Sigma-Aldrich). Se utilizó la LF comercial de Tatua Nutritionals disuelta en DMEM básico. En primer lugar, se extrajo el RNA de las células, a partir del cual se obtuvo su DNA complementario (cDNA) mediante la acción de la retrotranscriptasa inversa (RT) y, finalmente, se amplificó el cDNA obtenido con la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

5.9.1. Extracción del RNA

La extracción del RNA se llevó a cabo con el kit RNeasy de QIAGEN (Venlo, Países Bajos). Tras la incubación de 2 h con gentamicina y el lavado con 2 mL/pocillo, como en el ensayo de inhibición de la adhesión bacteriana, las células se lisaron con una mezcla de 350 µL de tampón *RNeasy Lysis Buffer* o RLT con 10 µL de 2-mercaptoetanol por pocillo. Se traspasó el contenido de cada pocillo a un vial eppendorf de 0,5 mL que se homogeneizó en un vórtex durante 1 min. Se transfirieron los volúmenes a las columnas del kit RNeasy y se les añadieron 350 µL de etanol al 70%. Las muestras se centrifugaron a 11.000 x g durante 15 s, descartando el eluido. A cada columna, se le adicionaron 700 µL del tampón *RNeasy Wash* o RW1 y se centrifugaron de nuevo a 11.000 x g durante 15 s, descartando el eluido. Luego, se adicionaron 500 µL del tampón RPE y se centrifugó a 11.000 x g durante 15 s. Se descartó el eluido, se volvió a adicionar el mismo volumen del tampón RPE y se centrifugó a 11.000 x g durante 2 min. Tras descartar el eluido, se centrifugó a 13.000 x g durante 1 min para secar completamente la columna. Cada columna se traspasó a un nuevo eppendorf de 1,5 mL, se adicionaron 40 µL de agua libre de RNAsas y se centrifugó a 11.000 x g durante 1 min. El RNA eluido se guardó a -80 °C hasta su uso.

5.9.2. Obtención del cDNA

El cDNA se obtuvo del RNA mensajero (mRNA) de las células utilizando el kit qScript cDNA SuperMix (QuantaBio, Beverly, MA, EE.UU.). En primer lugar, se determinó la cantidad de mRNA de cada muestra en ng/µL con el espectrofotómetro Nanodrop (ThermoFisher Scientific), a partir de la cual se calculó el volumen necesario a diluir con agua libre de RNAsas/DNAsas para obtener 1 µg de mRNA en un volumen final de 16 µL. A este

volumen se le añadieron 4 μ L de qScript cDNA SuperMix. A continuación, las muestras se llevaron a un termociclador modelo Alpha Unit Block Assembly for DNA Engine Systems (Bio-Rad) y se incubaron en un ciclo de 25 °C durante 5 min, 42 °C durante 30 min y 85 °C durante 5 min. Las muestras de cDNA obtenido se conservaron a -20 °C hasta su uso.

5.9.3. PCR cuantitativa

El cDNA obtenido se amplificó con una PCR cuantitativa (qPCR) teniendo en cuenta la expresión de cinco genes de interés: TLR2, TLR4, TLR9, GADPH y HPRT1. Los dos últimos son genes de control o *housekeeping*. Primeramente, se preparó un mix que contenía 0,5 μ L de los *primers forward* y *reverse* correspondientes al gen, 10 μ L de SYBR Green (ThermoFisher Scientific) y 7 μ L de agua libre de RNasas, por muestra. En una placa de 48 pocillos se añadieron, por pocillo, 18 μ L de esta mezcla y 2 μ L de la muestra de DNA diluida 1/5 en agua libre de RNasas o 2 μ L de agua libre de RNasas en el caso de los blancos. La placa se introdujo en un equipo de qPCR Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.).

Los ciclos umbrales (Ct) obtenidos se analizaron estadísticamente restando a los Ct de cada muestra, correspondientes a la amplificación de los genes TLR2, TLR4 y TLR9, la media de los valores Ct correspondientes a los genes *housekeeping*. A este valor se le restó la media de los valores del control negativo (células sin muestras de proteína ni bacterias). Finalmente, el resultado se expresó gráficamente en relación a los valores de Ct del control negativo.

5.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el programa estadístico GraphPad Prism v8.1.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). En primer lugar, se comprobó la normalidad de los datos con el test de Saphiro-Wilk. Para comparar las medias de tres o más grupos no emparejados, se realizó un análisis de varianza (ANOVA del nombre en inglés *analysis of variance*), se verificó la homocedasticidad con el test de Brown-Forsythe y se utilizó la prueba de Dunnett como test de comparación múltiple. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test no paramétrico Kruskal-Wallis y el test de Dunn como test de comparación múltiple. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor $p \leq 0,05$ y se indican, a lo largo del trabajo, por asteriscos en las gráficas.

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento de la lactadherina

La lactadherina se aisló a partir de leche bovina siguiendo dos métodos: con solventes orgánicos o con Tritón X-114. Por un lado, la LD aislada con el primer método, siguiendo el protocolo descrito por Kim *et al.* (1992), se sometió a una purificación mediante cromatografía de Sephacryl S-200 High Resolution. El perfil cromatográfico obtenido presenta dos picos pequeños y un pico de mayor absorbancia (Figura 7A). La LD se eluyó en mayor proporción en el último de ellos, apreciándose en la electroforesis las dos variantes de glicosilación PAS-6/7, con pesos moleculares de 52 y 47 kDa, respectivamente (Figura 7B). La filtración en gel permite eliminar gran parte de las proteínas contaminantes como se puede observar en la electroforesis de las fracciones de los dos picos pequeños; sin embargo, al no lograr excluir todas ellas en su totalidad, a esta fracción purificada se le denominó fracción enriquecida en LD (Kim *et al.*, 1992).

La presencia de esta proteína en la fracción enriquecida se comprobó mediante la técnica de Western Blotting. Se observó una banda a la altura del control positivo, para el que se empleó una fracción de LD pura previamente obtenida en el grupo de investigación, confirmando así la identidad de la lactadherina (Figura 8C).

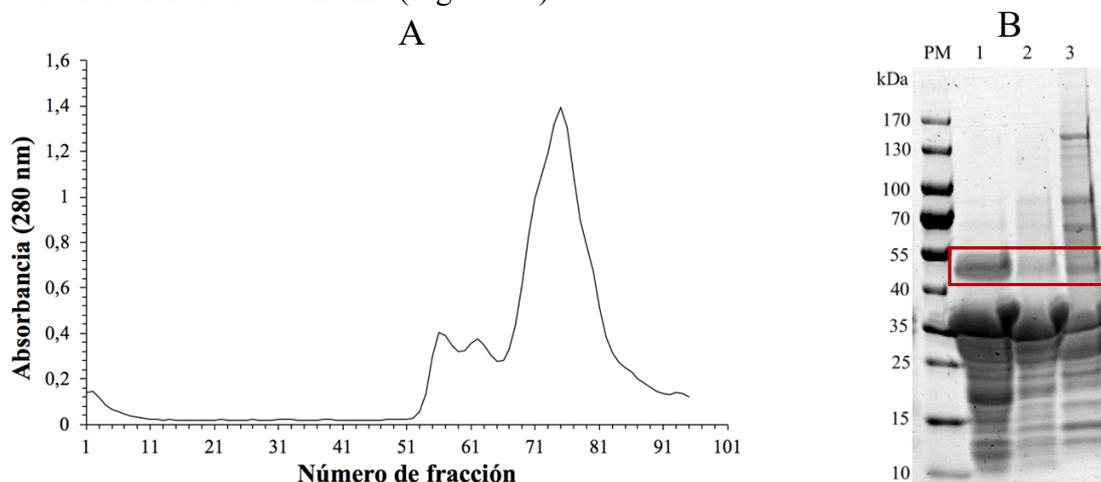


Figura 7. (A) Perfil de la cromatografía en Sephacryl S-200 High Resolution de la fracción de lactadherina obtenida del aislamiento por solventes orgánicos a partir de la membrana del glóbulo graso. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 1,6 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones de la cromatografía teñida con azul de Coomassie: (1) fracciones 76-84, (2) fracciones 66-75, (3) fracciones 54-65. PM: marcador de pesos moleculares. Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.

Por otro lado, una vez aislada la fracción enriquecida en MFGM, se realizó el segundo método de aislamiento de LD en el que se empleó Tritón X-114 siguiendo el protocolo de

Taylor *et al.* (1997). En comparación con los resultados obtenidos mediante filtración en gel, este aislamiento eliminó más proteínas contaminantes. Sin embargo, en la electroforesis, a parte de la LD, se evidencia una banda de peso molecular próximo a 80 kDa que probablemente corresponda a la LF (Figura 8A). Se realizó la técnica de Western blotting para comprobar su presencia. Se utilizó como control positivo la LF comercial de Tatua Nutritionals. En la Figura 8B se observa una banda a la misma altura que el control positivo, confirmando la presencia de esta proteína en la fracción enriquecida en LD obtenida del aislamiento con Tritón X-114.

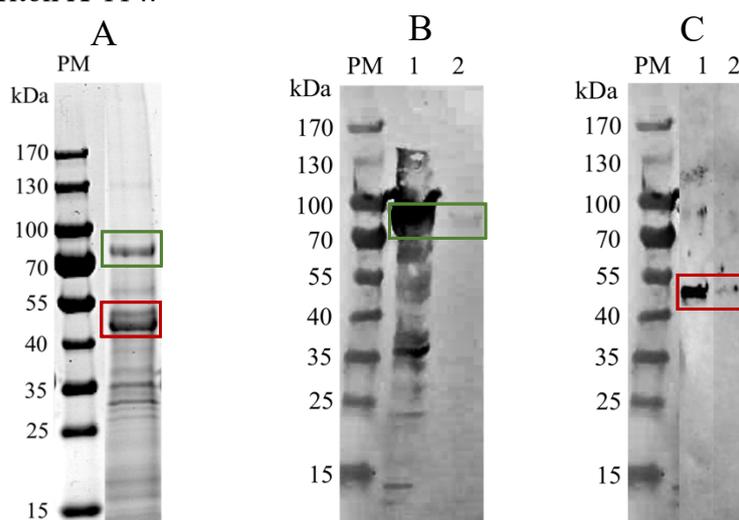


Figura 8. (A) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de la fracción enriquecida en LD, obtenida del aislamiento con Tritón X-114, teñida con azul de Coomassie. (B) Western blotting con el antisuero primario policlonal anti-lactoferrina bovina obtenido en conejo: (1) LF comercial Tatua Nutritionals y (2) fracción de LD concentrada del aislamiento con Tritón X-114. (C) Western blotting con el antisuero primario policlonal anti-lactadherina bovina obtenido en conejo: (1) fracción de LD pura y (2) fracción de LD purificada con Sephacryl S-200 High Resolution. PM: marcador de pesos moleculares. Las bandas correspondientes a la LF y la LD aparecen recuadradas en verde y rojo, respectivamente.

Tras la filtración en gel, y para conseguir un grado de purificación mayor, las fracciones enriquecidas en LD se sometieron a una cromatografía de afinidad de Concanavalina A-Sepharose para obtener una fracción más pura. La cromatografía dio lugar a un primer pico y a un segundo pico de menor absorbancia (Figura 9A). Como se puede observar en la electroforesis, la mayor proporción de LD se eluyó en el primer pico. Se consiguió una fracción con un alto grado de pureza, con gran parte de las proteínas contaminantes eliminadas en la fracción excluida de la cromatografía (Figura 9B).

También se purificó la fracción enriquecida en LD obtenida del aislamiento con Tritón X-114. En este caso, los resultados no fueron satisfactorios, debido a la ausencia de la banda correspondiente a la LD en la electroforesis de las fracciones de los picos evidenciados en el

perfil cromatográfico. Esto podría deberse a la pérdida de la proteína en la columna de afinidad, ya que cuando se dializó frente al tampón de unión, se formó un precipitado que podría corresponder a la lactadherina desnaturalizada.

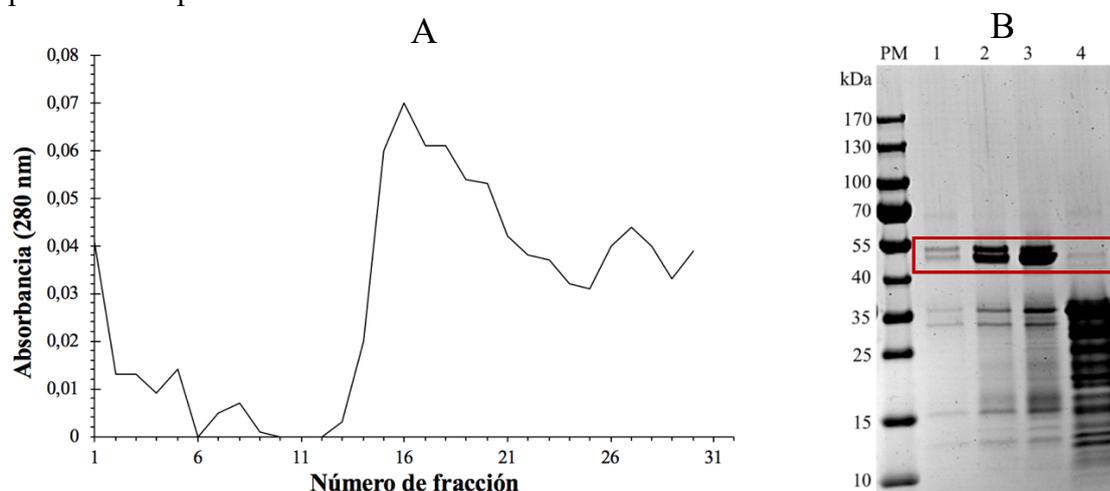


Figura 9. (A) Perfil de la cromatografía en Concanavalina A-Sepharose de la fracción enriquecida en lactadherina obtenida de la cromatografía en Sephacryl S-200 High Resolution. Las fracciones eluidas en la cromatografía fueron de 1 mL. (B) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones de la cromatografía, teñida con azul de Coomassie: (1) fracciones 25-30, (2) fracciones 18-24, (3) fracciones 14-17, (4) fracción excluida del proceso de purificación. PM: marcador de pesos moleculares. Las bandas correspondientes a la lactadherina aparecen recuadradas en rojo.

Por lo tanto, el aislamiento de la LD a partir de MFGM delipidada con solventes orgánicos y su purificación mediante filtración en gel, seguida de la cromatografía de afinidad fue el procedimiento que mostró la mayor eficacia en la obtención de una fracción con un alto grado de pureza. Parrón *et al.* (2018) purificaron proteínas lácteas a partir de leche bovina, entre ellas la LD siguiendo un procedimiento similar y obteniendo también un alto grado de pureza y demostrando su actividad antirotaviral. Así, la LD podría incluirse en alimentos funcionales, tras ser aislada a partir de subproductos lácteos, lo que incrementaría su valorización.

6.2. Aislamiento del glicomacropéptido

En primer lugar, el GMP se aisló a partir de lactosuero bovino siguiendo los procedimientos de Martín-Diana *et al.* (2001) y Abd El-Salam (2006). Tras acidificar el lactosuero a pH 4,5 y someterlo a tratamiento térmico a 90 °C durante 1 h, se realizó una cromatografía de intercambio aniónico con DEAE-Sephadex A-50, siguiendo la metodología descrita por Kawasaki *et al.* (1994). En la electroforesis, se aprecian varias bandas que posiblemente correspondan a las diferentes formas agregadas del GMP (Figura 10A). Por lo tanto, el GMP se eluyó en su mayoría en la primera fracción y escasamente en los dos lavados posteriores.

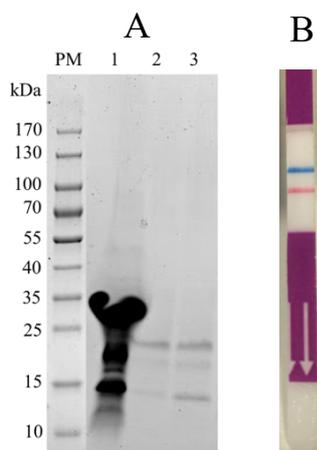


Figura 10. (A) SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones eluidas con NaCl 1 M, del aislamiento del glicomacropéptido, teñida con azul de Coomassie: (1) fracción eluida y concentrada, (2) fracción del primer lavado y (3) fracción del segundo lavado. (B) Test inmunocromatográfico del kit comercial STICK cGMP de Operon. S.A. con la línea control y la línea resultado en azul y rojo, respectivamente.

Se ha descrito previamente que los monómeros de GMP a un pH de 4,5 pueden agruparse dando lugar a polímeros como dímeros, trímeros y tetrámeros (Kawasaki *et al.*, 1994; Farías *et al.*, 2010). Las bandas en torno a los 15 kDa podrían ser dímeros del GMP y la amplia banda irregular próxima a 25 kDa podría ser un trímero. La banda entre 10 y 15 kDa probablemente corresponda a un dímero formado por dos monómeros de aproximadamente 7 kDa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los estudios realizados por Farías *et al.* (2010) y Rojas y Torres (2013), en los que se apreciaron diferentes bandas (~15 kDa y ~25 kDa) correspondientes a las formas agregadas del GMP.

De manera adicional, se comprobó la presencia de este péptido en la fracción eluida y concentrada mediante un análisis inmunocromatográfico utilizando el kit comercial STICK cGMP. Como se observa en la Figura 10B, el test mostró un resultado positivo.

6.3. Ensayos de actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii*

El efecto de las proteínas lácteas aisladas frente a *C. sakazakii* fue estudiado teniendo en cuenta la influencia de la fase de crecimiento y el tiempo de incubación de la bacteria. Para ello, se realizaron ensayos con la suspensión de *C. sakazakii* en fase exponencial y en fase estacionaria con recuentos a las 4 y/o 24 h.

6.3.1. Actividad frente a *C. sakazakii* en fase exponencial

La actividad antimicrobiana del GMP a 1,5 y 3 mg/mL y de la LD a 1 y 2 mg/mL fue evaluada frente a una suspensión de *C. sakazakii* en fase exponencial a una concentración final de 5 u.log. La LF comercial se utilizó como control positivo ya que su actividad antimicrobiana frente a esta bacteria ha sido comprobada previamente en el grupo de investigación. La actividad antimicrobiana se determinó mediante el recuento de colonias tras 4 y 24 h de incubación con las proteínas lácteas a cada una de las concentraciones citadas.

En este primer ensayo, la LF a 2,5 y 5 mg/mL, utilizada como control positivo, produjo una disminución de los recuentos de *C. sakazakii* incubado durante 4 h y únicamente para la concentración más alta a las 24 h. Los recuentos de *C. sakazakii* incubado tanto con GMP como con LD no muestran diferencias significativas con respecto al control a las 4 ni a las 24 h (Figura 11). Por lo tanto, no se apreció su acción antimicrobiana frente a esta bacteria en fase exponencial. Aunque algunos estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas de la LD, además de su actividad antiviral, se requiere más investigación sobre sus propiedades (Shahriar *et al.*, 2006).

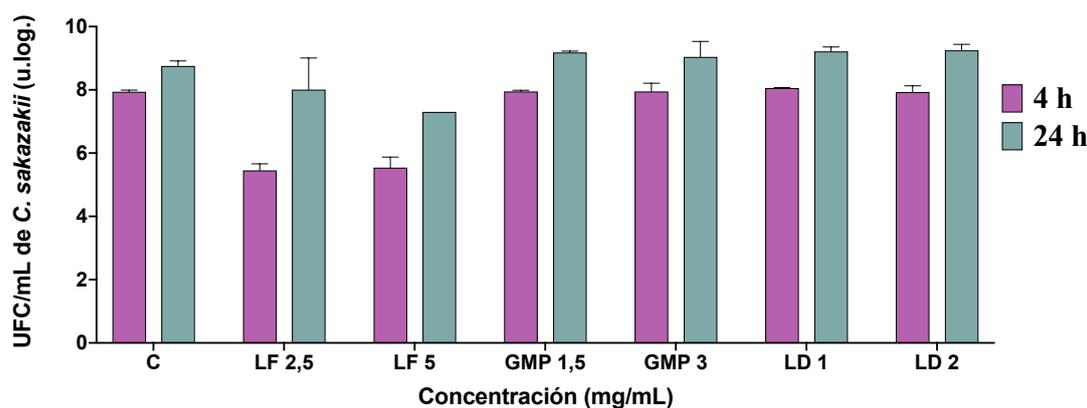


Figura 11. Ensayo de actividad antimicrobiana de LF a 2,5 y 5 mg/mL, GMP a 1,5 y 3 mg/mL y LD a 1 y 2 mg/mL frente a *C. sakazakii* en fase exponencial, expresado en unidades logarítmicas de UFC/mL a las 4 y 24 h. C: control. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en un experimento (n = 2).

En cualquier caso, los resultados obtenidos no se pueden confirmar debido al escaso número de experimentos realizados y a la dificultad de obtener estas proteínas con un alto grado de pureza en una cantidad elevada.

6.3.2. Actividad frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria

La actividad antimicrobiana de la LD a las concentraciones de 0,25; 0,5 y 1 mg/mL (Figura 12A) y del GMP a 1,5 y 3 mg/mL (Figura 12B) fue evaluada frente a una suspensión de *C. sakazakii* en fase estacionaria a una concentración final de 5 u.log incluyendo controles sin proteína y con LF comercial. Se determinó el efecto antimicrobiano mediante un recuento de colonias a las 4 y 24 h para la LD y a las 24 h de incubación para el GMP.

En el caso de la LD no se observó un efecto antibacteriano, únicamente se apreciaron diferencias significativas para la concentración de 0,5 mg/mL a las 4 h en comparación con el control, mostrando un ligero aumento en el crecimiento de la bacteria (Figura 12A). Sin embargo, sí se observa una reducción significativa de *C. sakazakii* en presencia de LF a las 4 y 24 h. Estos resultados son similares a los obtenidos con la suspensión bacteriana en fase

exponencial; no obstante, al tener un número bajo de ensayos sería necesario confirmar estos resultados en más ensayos.

En el caso del GMP, los recuentos de *C. sakazakii* a las 24 h muestran una reducción significativa para las concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL de aproximadamente 2 u.log. con respecto al control (Figura 12B). Aunque la LF a las concentraciones de 2,5 y 5 mg/mL causa una reducción más importante de los recuentos del patógeno, se puede apreciar un efecto antimicrobiano significativo también para el GMP.

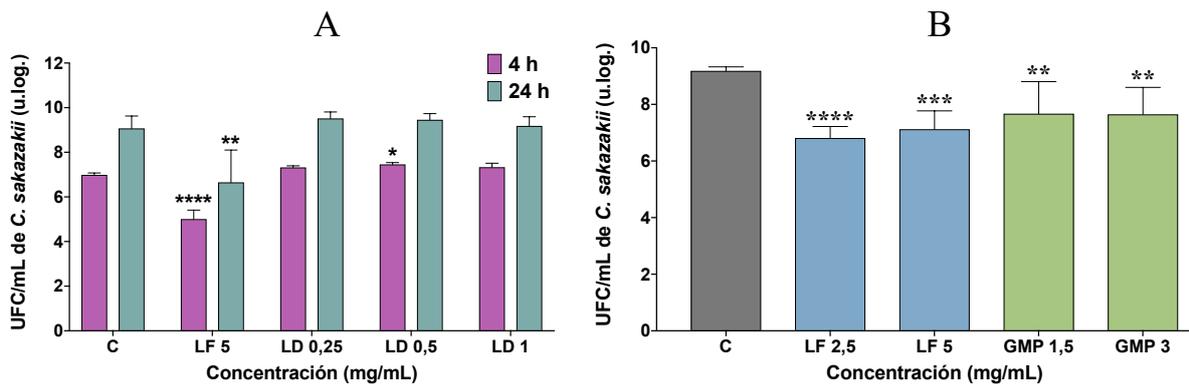


Figura 12. (A) Ensayo de actividad antimicrobiana de LF a 5 mg/mL y de LD a 0,25; 0,5 y 1 mg/mL frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria, expresado en unidades logarítmicas de UFC/mL a las 4 y 24 h. C: control. Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas en dos experimentos independientes (n ≤ 4). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (*p< 0,03, ***p<0,0002 y ****p<0,0001). (B) Ensayo de actividad antimicrobiana de LF a 2,5 y 5 mg/mL y del GMP a 1,5 y 3 mg/mL frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria, expresado en unidades logarítmicas de UFC/mL a las 24 h. C: control. Los valores representan la media ± desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos independientes (n ≤ 6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (**p< 0,01, ***p<0,0002 y ****p<0,0001).

Estos ensayos no mostraron diferencias en función de la fase de crecimiento de *C. sakazakii*, únicamente en los ensayos con GMP y la suspensión bacteriana en fase estacionaria, realizados en este caso con un número más alto de experimentos. Por consiguiente, los resultados obtenidos en los ensayos de la actividad antimicrobiana del GMP frente a *C. sakazakii* son prometedores. Según Moreno y López-Fandiño (2009), la estructura de este péptido influye en su actividad funcional basada en las interacciones con componentes celulares, concretamente debido a su contenido y estructura de los oligosacáridos.

De manera paralela, se determinó el crecimiento bacteriano mediante medida de la absorbancia a 620 nm en los ensayos de la actividad antimicrobiana del GMP a lo largo de la incubación. Se observan diferencias significativas entre las medidas de la turbidez respecto al control sin proteína a las 6, 8 y 24 h de incubación de *C. sakazakii* con LF y a las 8 y 24 h de incubación con GMP (Figura 13). La disminución de la turbidez en comparación con el

control, tras la incubación del patógeno con estas proteínas lácteas, indica un menor crecimiento microbiano. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el recuento de *C. sakazakii* tras 24 h de incubación con LF y GMP (Figura 12B), lo que permite corroborar la actividad antimicrobiana de ambas proteínas.

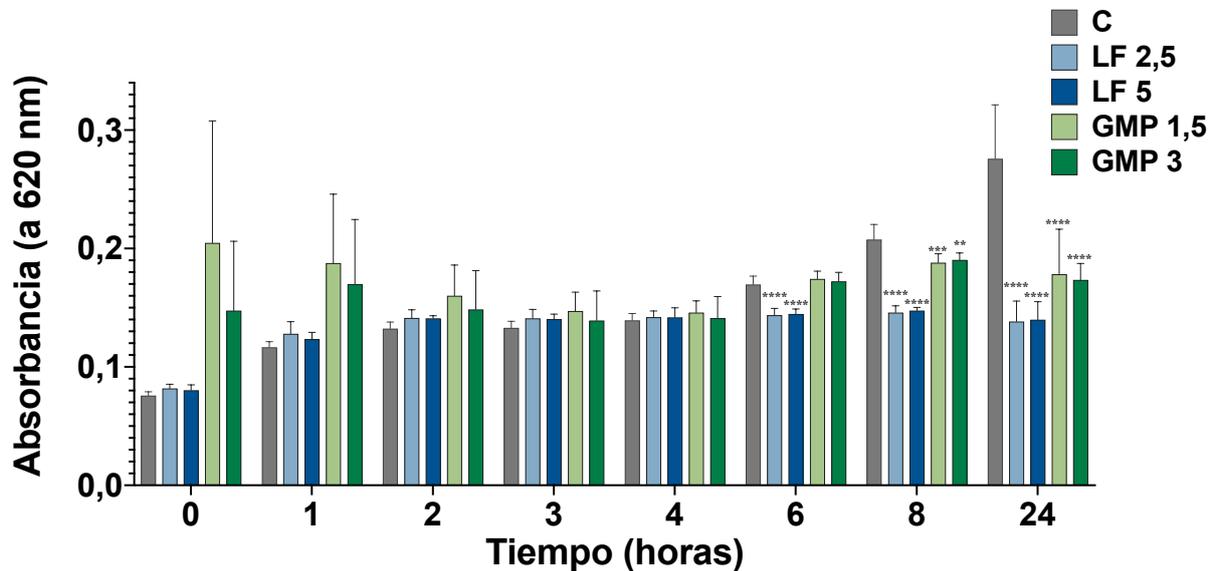


Figura 13. Crecimiento bacteriano en el ensayo de actividad antimicrobiana de la LF a 2,5 y 5 mg/mL y del GMP a 1,5 y 3 mg/mL frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria mediante la medida de la turbidez a 620 nm. C: control. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos independientes ($n \leq 6$). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ y **** $p \leq 0,0001$).

6.4. Evaluación de la citotoxicidad de la lactoferrina

La citotoxicidad celular se determinó mediante la técnica de MTS en las células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15 días e incubadas durante 24 h con las mismas concentraciones de LF comercial utilizadas en el ensayo: 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL. Se comparó la viabilidad de las células tratadas con LF y de las células tratadas con H_2O_2 50 mM (control positivo de citotoxicidad), con las células sin tratar (control negativo).

La adición de LF a diferentes concentraciones no pareció afectar la viabilidad de las células Caco-2/TC7 (Figura 14). Aunque se aprecia una leve disminución para la concentración de 10 mg/mL, no se muestran diferencias significativas respecto al control negativo. Esta disminución de la viabilidad puede estar relacionada con las propiedades anticancerígenas de la LF provocando un leve efecto citotóxico en esta línea celular (Solak y Akin, 2012). Estos resultados se ven apoyados por los de Ma *et al.* (2013), que encontraron que la viabilidad de las células Caco-2 *in vitro* se redujo tras su exposición con LF y nanoliposomas de LF a las concentraciones de 1, 5 y 10 mg/mL durante 24, 36 y 48 h.

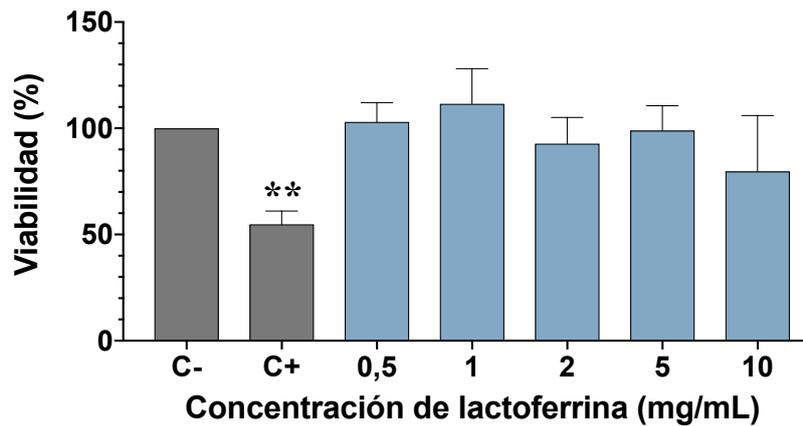


Figura 14. Determinación de la citotoxicidad de la LF a 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL en las células Caco-2/TC7. C-: control negativo de células sin proteína, C+: control positivo con peróxido de hidrógeno 50 mM. Los valores de absorbancia a 492 nm están expresados como porcentaje respecto al control negativo y representan la media \pm desviación estándar de tres réplicas en dos experimentos independientes (n = 6). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control negativo (**p<0,002).

6.5. Inhibición de la adhesión e internalización de *C. sakazakii* a las Caco-2/TC7

6.5.1. Inhibición de la adhesión de *C. sakazakii* a las Caco-2/TC7

Los ensayos de inhibición de la adhesión para evaluar el efecto de las proteínas lácteas tanto en la adhesión como en la internalización de *C. sakazakii* a las células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15 días, se llevaron a cabo con las concentraciones de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL de LF comercial, con las fórmulas F1 y F2 e incluyendo un control sin LF. Las células tratadas con LF fueron previamente incubadas durante 24 h con las concentraciones correspondientes. Las células se incubaron con una concentración inicial del patógeno de 5 u.log durante 4 h.

Por un lado, la LF a las concentraciones de 0,5; 1 y 2 mg/mL produjo una leve inhibición de la adhesión bacteriana, pero sin presentar diferencias significativas respecto al control (Figura 15). La mayor reducción fue de aproximadamente un 20% para la concentración de 5 mg/mL de LF con respecto al control. Sin embargo, se aprecia un aumento con la concentración de 10 mg/mL de LF al comparar con la concentración de 5 mg/mL. Por otro lado, la fórmula F1 produjo una reducción del 10% y la F2 una disminución por debajo del 10%, ambas sin diferencias significativas respecto al control.

Ripollés *et al.* (2017) demostraron el efecto inhibitorio de algunos componentes lácteos, procedentes principalmente de la mazada y del *butterserum*, sobre la adhesión de *C. sakazakii* a las células Caco-2/TC7. Por otra parte, Quintero-Villegas *et al.* (2014) corroboran los resultados obtenidos ya que demuestran que la LF es una proteína inhibitoria de la adhesión

de *C. sakazakii* a las células epiteliales intestinales, mediante su unión a los LPS de la superficie de la bacteria.

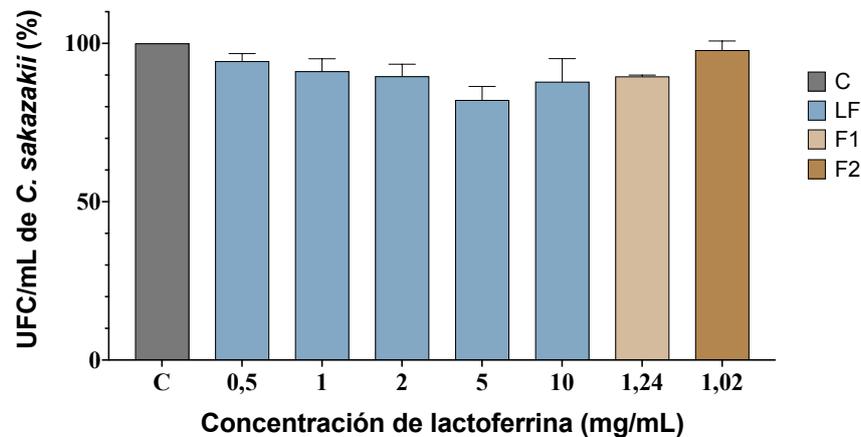


Figura 15. Efecto de la LF a 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL y de las fórmulas F1 y F2 con una concentración de LF de 1,24 y 1,02 mg/mL, respectivamente, en la inhibición de la adhesión bacteriana a la línea celular Caco-2/TC7. C: control. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control (UFC/mL) y representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en un ensayo (n = 2).

Debido al bajo número de ensayos realizados no se puede afirmar el efecto de la LF y de las fórmulas. No obstante, estos resultados muestran que la LF podría ejercer una actividad inhibitoria contra la adhesión e internalización de *C. sakazakii*. Por consiguiente, en los siguientes ensayos se evaluó únicamente la internalización del patógeno a las células.

6.5.2. Inhibición de la internalización de *C. sakazakii* a las Caco-2/TC7

Los ensayos de inhibición de la internalización de *C. sakazakii* a las células Caco-2/TC7 cultivadas durante 15 días, se llevaron a cabo con las concentraciones de 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL de LF comercial (Figura 16), con GMP a 1 y 2 mg/mL, con LD a 1 y 1,95 mg/mL, con una mezcla de GMP y LF, con las fórmulas F1 y F2 (Tabla 3) e incluyendo un control sin proteína. Para los ensayos con LF, las células fueron previamente incubadas durante 24 h con las concentraciones correspondientes de la proteína. Las células se incubaron con una concentración inicial del patógeno de 5 u.log durante 4 h.

En el caso de la LF, las concentraciones de 0,5; 1; 2 y 5 mg/mL produjeron una ligera inhibición de la adhesión bacteriana, con un leve aumento para la última concentración (Figura 16). Sin embargo, no presentaron diferencias significativas respecto al control. Según Valenti y Antonini (2005), la LF, tanto en su forma apo como saturada de hierro, posee una actividad inhibitoria de la internalización de algunas bacterias y podría modular la entrada del patógeno en las células al internalizarse en el núcleo de la célula huésped.

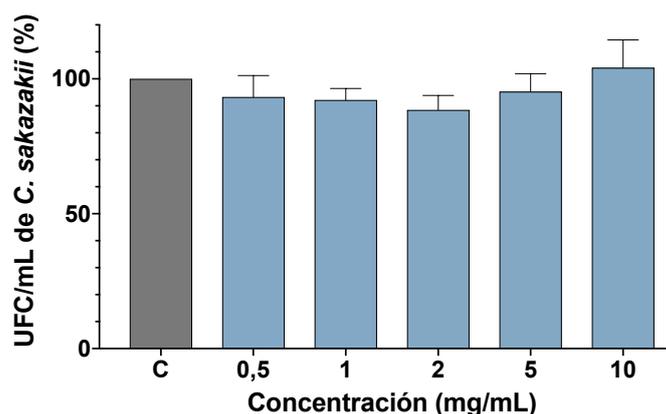


Figura 16. Efecto de la LF a 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/mL en la inhibición de la internalización bacteriana a la línea celular Caco-2/TC7. C: control. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control (UFC/mL) y representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en tres experimentos independientes (n = 6).

Los resultados obtenidos se compararon a los obtenidos en el Trabajo Fin de Máster de Sangüesa (2019). La incubación previa durante 24 h con LF parece reducir la actividad inhibitoria de esta proteína contra la internalización microbiana; entonces es probable que su actividad disminuya al aumentar su concentración y el tiempo de incubación. Además, no se evidencian diferencias entre los ensayos de inhibición de la adhesión, en los que se analizó el efecto de las proteínas lácteas tanto en la adhesión como en la internalización de *C. sakazakii*, y los ensayos de internalización en los que únicamente se evaluó el efecto de las proteínas en la internalización de la bacteria en las células (Figuras 15 y 16).

En el caso del GMP, las concentraciones de 1 y 2 mg/mL no inhibieron la internalización bacteriana, posiblemente por la baja concentración empleada (Tabla 3).

Tabla 3. Valores obtenidos en el ensayo de inhibición de la internalización bacteriana de proteínas lácteas a la línea celular Caco-2/TC7. Los valores se expresan como porcentaje respecto al control (UFC/mL) y representan la media de dos réplicas en un experimento (n \leq 2).

Muestras	Concentración (mg/mL)	UFC/mL de <i>C. sakazakii</i> (%)
GMP	1	100,30
	2	116,69
LD	1	111,64
	1,95	141,49
LF + GMP	LF: 2 + GMP: 2	101,13
	LF: 5 + GMP: 2	98,17
F1	LF: 1,24	86,20
F2	LF: 1,02	86,01

La LD mostró resultados similares; aunque destaca un aumento en el recuento de *C. sakazakii* respecto al control como también se había observado en los ensayos antibacterianos. Además, en presencia de las dos mezclas de GMP y LF no se apreció una reducción notable con

respecto al control. Las fórmulas F1 y F2 produjeron una leve inhibición de la adhesión bacteriana, debido probablemente a la presencia de LF en su formulación. Sin embargo, solo se pudieron realizar dos ensayos con estas proteínas lácteas y las dos fórmulas, por lo que deberían repetirse estos ensayos para llegar a resultados concluyentes.

Varios estudios han mostrado resultados que despiertan interés en el GMP por sus propiedades biológicas y fisiológicas, como su capacidad de inhibir la adhesión bacteriana y viral (Fariás *et al.*, 2010). Córdova-Dávalos *et al.* (2019) exponen la capacidad del GMP para unirse a bacterias patógenas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC O157), reduciendo de esta forma su adhesión a las células Caco-2. Por otro lado, Shahriar *et al.* (2006) y Novakovic *et al.* (2015) demostraron que la LD de leche porcina reducía la adhesión de *E. coli* F4ac-positiva a los enterocitos intestinales *in vitro*. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre la actividad de estos componentes lácteos en la inhibición de la adhesión bacteriana.

6.6. Expresión de receptores tipo Toll mediante RT-qPCR

La expresión de los receptores intestinales TLR2, TLR4 y TLR9 se analizó en células Caco-2/TC7 tratadas con 0,5 y 10 mg/mL de LF comercial e infectadas con *C. sakazakii* a una concentración inicial de 5 u.log. Las células fueron previamente incubadas durante 24 h con las concentraciones correspondientes de LF. Se incluyeron cuatro controles: con 0,5 y 10 mg/mL de LF sin el patógeno y con 30 y 60 µg/mL de LPS sin proteína y sin el patógeno. Se comenzó el ensayo extrayendo el mRNA de las células para obtener el cDNA mediante la retrotranscriptasa inversa y finalmente el cDNA obtenido se amplificó por PCR cuantitativa.

La Figura 17 muestra la expresión de los tres receptores tipo Toll en las diferentes condiciones estudiadas. De forma general, no se observan diferencias significativas entre las muestras y el control por el número limitado de ensayos y las altas desviaciones encontradas, seguramente, por la propia dificultad del procedimiento de este ensayo en la etapa de extracción del mRNA de las células.

Por un lado, se aprecia un aumento de la expresión de receptores TLR2 a la concentración de 0,5 mg/mL de LF. Igualmente, al añadir 10 mg/mL de esta proteína e infectar las células con *C. sakazakii*, su expresión parece incrementar considerablemente; sin embargo, se aprecia una disminución de la expresión a dicha concentración en ausencia del patógeno. Por otro lado, la LF en ambas concentraciones parece reducir la expresión de receptores TLR4. Se observan los mismos resultados en la expresión de receptores TLR9, a excepción de las células sin infectar con LF a una concentración de 0,5 mg/mL, que muestran un ligero aumento en la

expresión. De esta manera, la LF a 10 mg/mL parece reducir la expresión de receptores TLR4 y TLR9, sin efecto notable en la expresión de receptores TLR2.

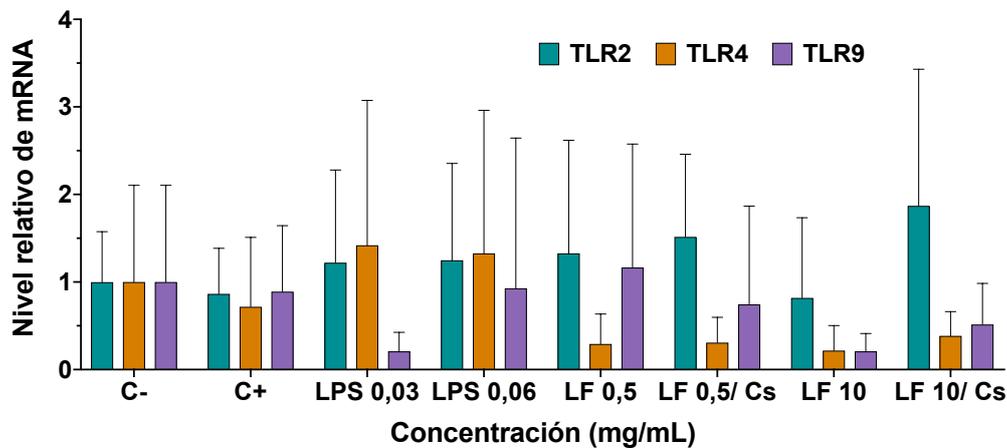


Figura 17. Expresión de receptores intestinales TLR2, TLR4 y TLR9 en células Caco-2/TC7 tras la incubación con LF a 0,5 y 10 mg/mL. C: control negativo de células sin proteína y sin patógeno; C+: control positivo de células tratadas únicamente con el patógeno; LPS 0,03: adición de 30 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; LPS 0,06: adición de 60 $\mu\text{g/mL}$ de LPS; LF 0,5: 0,5 mg/mL de LF; LF 0,5/ Cs: 0,5 mg/mL de LF y *C. sakazakii*; LF 10: 10 mg/mL de LF; LF 10/ Cs: 10 mg/mL de LF y *C. sakazakii*. La expresión de receptores se expresa en nivel relativo de mRNA. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes ($n = 4$).

De acuerdo con nuestros resultados, otros estudios han mostrado que la LF es capaz de modular la expresión de los receptores TLR4 reduciendo su señalización (He *et al.*, 2016). Según Buey *et al.* (2020), esta proteína alteró la expresión de los receptores TLR4 provocando una fuerte disminución de su expresión mediante la interacción con las células presentadoras de antígenos. Tal y como se observa en la Figura 17, estos autores tampoco observaron el efecto de la LF en la expresión de receptores TLR2, únicamente un aumento no significativo en los receptores TLR9 causado por la adición de LF a 0,5 mg/mL, que podría contribuir en los efectos antiinflamatorios.

La expresión de receptores TLR2 y TLR4 parece aumentar tras la adición de LPS bacteriano a 30 y 60 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, la expresión de los receptores TLR9 disminuye sobre todo en presencia de LPS a 30 $\mu\text{g/mL}$ ya que su función es reconocer el DNA genómico de bacterias y no el LPS (Kumar *et al.*, 2009). El LPS es una endotoxina de la pared de algunas bacterias Gram negativas que desempeña una función en la activación del sistema inmune. La elevada expresión de los receptores TLR2 y TLR4 con ambas concentraciones de LPS se relaciona con la respuesta defensiva de las células frente a agentes patógenos (Caroff *et al.*, 2002). Sin embargo, no se aprecia un gran incremento en la expresión de ambos receptores tras la incubación con *C. sakazakii*, probablemente asociado a la concentración del patógeno y a un tiempo de incubación insuficiente.

7. Conclusiones

Los objetivos establecidos al comienzo de este Trabajo Fin de Máster y los resultados obtenidos sugieren las siguientes conclusiones:

1. Las fracciones de mazada o *buttermilk* y *butterserum* procedentes de leche bovina son una fuente de gran valor para la obtención de fracciones enriquecidas en lactadherina.
2. El aislamiento con solventes orgánicos es más efectivo que el método con Tritón X-114 tras purificar la lactadherina mediante filtración en gel y cromatografía de afinidad.
3. El lactosuero bovino es un subproducto de gran interés para aislar el glicomacropéptido mediante precipitación térmica y cromatografía de intercambio aniónico.
4. La lactadherina no parece presentar actividad antimicrobiana frente a *C. sakazakii* en fase exponencial y estacionaria.
5. El glicomacropéptido a las concentraciones de 1,5 y 3 mg/mL presenta efecto antimicrobiano frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria, reduciendo su crecimiento tras 24 h de incubación.
6. La viabilidad de las células Caco-2/TC7 no se ve afectada al incubarlas 24 h con lactoferrina hasta una concentración de 10 mg/mL.
7. La lactoferrina, a las concentraciones de 0,5; 1; 2 y 5 mg/mL, tiene un cierto efecto inhibitorio en la adhesión e internalización de *C. sakazakii* a las células Caco-2/TC7. Además, es probable que esta actividad inhibitoria disminuya al aumentar su concentración y el tiempo de incubación.
8. La lactoferrina a 10 mg/mL influye en la expresión de los receptores TLR4 y TLR9 en las células Caco-2/TC7 con y sin *C. sakazakii*; mientras que la expresión de los TLR2 aumenta en células infectadas con el patógeno.

8. Referencias bibliográficas

Abd El-Salam, M.H. (2006). Separation of Casein Glycomacropéptide from Whey: Methods of potential industrial Application. *International Journal of Dairy Science*, 1, pp. 93-99.

Ahn, Y.J., Ganesan, P. y Kwak, H.S. (2011). Composition, Structure, and Bioactive Components in Milk Fat Globule Membrane. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31, pp. 1-8.

Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T. y Petersen, T.E. (1997). Bovine PAS-6/7 Binds RVβ5 Integrin and Anionic Phospholipids through Two Domains. *Biochemistry*,

36, pp. 5441-5446.

Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L.C., Ryu, J.H. y Richards, G.M. (2009). *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp. 204-213.

Brink, L.R. y Lönnnerdal, B. (2018). The role of milk fat globule membranes in behavior and cognitive function using a suckling rat pup supplementation model. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 58, pp. 131-137.

Buey, B., Bellés, A., Latorre, E., Abad, I., Pérez, M.D., Grasa, L., Mesonero, J.E. y Sánchez, L. (2020). Comparative effect of bovine buttermilk, whey, and lactoferrin on the innate immunity receptors and oxidative status of intestinal epithelial cells. *Biochemistry and Cell Biology*, pp. 23.

Caroff, M., Karibian, D., Cavaillon, J.M. y Haeffner-Cavaillon, N. (2002). Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. *Microbes and Infection*, 4, pp. 915-926.

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

Comisión Europea (2012a). Decisión de la Comisión, de 22 de noviembre de 2012, por la que se autoriza la introducción en el mercado de la lactoferrina bovina como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (FrieslandCampina). Diario oficial de la Unión Europea, L327, 52-54, 27.11.2012.

Comisión Europea (2012b). Decisión de la Comisión, de 22 de noviembre de 2012, por la que se autoriza la introducción en el mercado de la lactoferrina bovina como nuevo ingrediente alimentario con arreglo al Reglamento (CE) n° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo (Morinaga). Diario oficial de la Unión Europea, L327, 46-48, 27.11.2012.

Córdova-Dávalos, L., Jiménez, M. y Salinas, E. (2019). Glycomacropptide Bioactivity and Health: A Review Highlighting Action Mechanisms and Signaling Pathways. *Nutrients*, 11, pp. 598.

Dalgleish, D.G. (2011). On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. *Soft Matter*, 7, pp. 2265-2272.

Delfour, A., Jollès, J., Alais, C. y Jollès, P. (1965). Caseino-glycopeptides: Characterization of a methionine residue and of the N-terminal sequence. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 19, pp. 452-455.

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

Douëllou, T., Montel, M.C. y Thevenot Sergentet, D. (2017). Invited review: Anti-adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane-

associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. *Journal of Dairy Science*, 100, pp. 3348-3359.

El-Salam, M.H.A., El-Shibiny, S. y Buchheim, W. (1996). Characteristics and potential uses of the casein macropeptide. *International Dairy Journal*, 6, pp. 327-341.

FAO y OMS (2005). *Benefits and potential risks of the lactoperoxidase system of raw milk preservation. Report of an FAO/WHO technical meeting.* Roma, Italia: Food & Agriculture Organization.

Fariás, M.E., Martínez, M.J. y Pilosof, A.M.R. (2010). Casein glycomacropeptide pH-dependent self-assembly and cold gelation. *International Dairy Journal*, 20, pp. 79-88.

Farmer, J.J., Asbury, M.A. y Brenner, D.J. (1980). *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “*Enterobacteriaceae*” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, pp. 569-584.

Farnaud, S. y Evans, R.W. (2003). Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40, pp. 395-405.

Fox, P.F. y Mulvihill, D.M. (1982). Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties. *Journal of Dairy Research*, 49, pp. 679-693.

Gantner, V., Mijić, P., Baban, M., Škrčić, Z. y Turalija, A. (2015). The overall and fat composition of milk of various species. *Mljekarstvo*, 65, pp. 223-231.

García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S. y Rascón-Cruz, Q. (2012). Lactoferrin a multiple bioactive protein: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820, pp. 226-236.

Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000). Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *British Journal of Nutrition*, 84, pp. 69-74.

Hackam, D.J. y Sodhi, C.P. (2018). Toll-Like Receptor–Mediated Intestinal Inflammatory Imbalance in the Pathogenesis of Necrotizing Enterocolitis. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 6, pp. 229-238.

Harouna, S., Carramiñana, J.J., Navarro, F., Pérez, M.D., Calvo, M. y 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, pp. 520-525.

Haug, A., Høstmark, A.T. y Harstad, O.M. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Disease*, 6, pp. 25.

He, Y., Lawlor, N.T. y Newburg, D.S. (2016). Human Milk Components Modulate Toll-Like Receptor–Mediated Inflammation. *Advances in Nutrition*, 7, pp. 102-111.

Horne, D.S. (2006). Casein micelle structure: Models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, pp. 148-153.

Iversen, C., Lane, M. y Forsythe, S.J. (2004). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38, pp. 378-382.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. y Joosten, H. (2007a). The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonicus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evolutionary Biology*, 7, pp. 64.

Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R. y Joosten, H. (2007b). Identification of “*Cronobacter*” spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Journal of Clinical Microbiology*, 45, pp. 3814-3816.

Jauregui-Rincón, J., Salinas-Miralles, E., Chávez-Vela, N. y Jiménez-Vargas, M. (2019). *Glycomacropeptide: Biological Activities and Uses*. En: Gigli, I. (Ed.), *Whey - Biological Properties and Alternative Uses*. La Pampa, Argentina: IntechOpen.

Jensen, R.G. (1996). The lipids in human milk. *Progress in Lipid Research*, 35, pp. 53-92.

Joseph, S. et al. (2012). Comparative Analysis of Genome Sequences Covering the Seven *Cronobacter* Species. *PLOS ONE*, 7, pp. 13.

Kamińska, A., Enguita, F.J. y Stępień, E.Ł. (2018). Lactadherin: An unappreciated haemostasis regulator and potential therapeutic agent. *Vascular Pharmacology*, 101, pp. 21-28.

Kawasaki, K., Dosako, U., Shimatani, S. y Idota, K. (1994). *EE.UU. Patente N°: 5280107*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Kawasaki, Y., Isoda, H., Tanimoto, M., Dosako, S., Idota, T. y Ahiko, K. (1992). Inhibition by Lactoferrin and κ -Casein Glycomacropeptide of Binding of *Cholera* Toxin to its Receptor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56, pp. 195-198.

Keenan, T.W. y Mather, I.H. (2006). *Intracellular Origin of Milk Fat Globules and the Nature of the Milk Fat Globule Membrane*. En: Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 137-171). Boston, MA, EE.UU.: Springer.

Kim, D.H., Kanno, C. y Mizokami, Y. (1992). Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1122, pp. 203-211.

Kim, K., Kim, K.P., Choi, J., Lim, J.A., Lee, J., Hwang, S. y Ryu, S. (2010). Outer Membrane Proteins A (OmpA) and X (OmpX) Are Essential for Basolateral Invasion of *Cronobacter sakazakii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, pp. 5188-5198.

Kreuß, M., Strixner, T. y Kulozik, U. (2009). The effect of glycosylation on the interfacial properties of bovine caseinomacropeptide. *Food Hydrocolloids*, 23, pp. 1818-1826.

de Kruif, C.G., Huppertz, T., Urban, V.S. y Petukhov, A.V. (2012). Casein micelles and their internal structure. *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172, pp. 36-52.

Kumar, H., Kawai, T. y Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity.

Biochemical and Biophysical Research Communications, 388, pp. 621-625.

Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Arias, C.F., López, S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W. y Rasmussen, J.T. (2004). Inhibitory Effects of Human and Bovine Milk Constituents on Rotavirus Infections. *Journal of Dairy Science*, 87, pp. 4088-4096.

Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* Infections among Neonates, Infants, Children, and Adults. *Medicine*, 80, pp. 113-122.

Lehner, A. y Stephan, R. (2004). Microbiological, Epidemiological, and Food Safety Aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection*, 67, pp. 2850-2857.

Liu, C., Erickson, A.K. y Henning, D.R. (2005). Distribution and Carbohydrate Structures of High Molecular Weight Glycoproteins, MUC1 and MUCX, in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 88, pp. 4288-4294.

Lønnerdal, B. e Iyer, S. (1995). Lactoferrin: Molecular structure and biological function. *Annual Review of Nutrition*, 15, pp. 93-110.

Lopez, C. (2011). Milk fat globules enveloped by their biological membrane: Unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16, pp. 391-404.

Luisa, B.G. (1995). *Handbook of Milk Composition*. Jensen, R.G. (Ed.). California, CA, EE.UU.: Elsevier, Inc.

Ma, J., Guan, R., Shen, H., Lu, F., Xiao, C., Liu, M. y Kang, T. (2013). Comparison of anticancer activity between lactoferrin nanoliposome and lactoferrin in Caco-2 cells *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 59, pp. 72-77.

MacGibbon, A.K.H. y Taylor, M.W. (2006). *Composition and Structure of Bovine Milk Lipids*. En: Fox, P.F. y McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids* (pp. 1-42). Boston, MA, EE.UU.: Springer.

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

Martín-Diana, A., Fraga, M. y Fontecha, J. (2001). Isolation and characterisation of caseinmacropeptide from bovine, ovine, and caprine cheese whey. *European Food Research and Technology*, 214, pp. 282-286.

Mather, I.H. (2000). A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane. *Journal of Dairy Science*, 83, pp. 203-247.

Moreno, F.J. y López-Fandiño, R. (2009). *Estructura y funcionalidad del glicomacropéptido bovino*. En: Fontecha, J., Recio, I. y Pilosof, A.M.R. (Eds.), *Funcionalidad de Componentes Lácteos* (pp. 223-249). Madrid, España: CSIC.

Neelima, Sharma, R., Rajput, Y.S. y Mann, B. (2013). Chemical and functional properties of glycomacropeptide (GMP) and its role in the detection of cheese whey adulteration in milk: a review. *Dairy Science & Technology*, 93, pp. 21-43.

Novakovic, P., Charavaryamath, C., Moshynskyy, I., Lockerbie, B., Kaushik, R.S., Loewen, M.E., Kidney, B.A., Stuart, C. y Simko, E. (2015). Evaluation of inhibition of F4ac positive *Escherichia coli* attachment with xanthine dehydrogenase, butyrophilin, lactadherin and fatty acid binding protein. *BMC Veterinary Research*, 11, pp. 238.

Osaili, T. y Forsythe, S. (2009). Desiccation resistance and persistence of *Cronobacter* species in infant formula. *International Journal of Food Microbiology*, 136, pp. 214-220.

Parrón, J.A., Ripollés, D., Sánchez, A.C., Pérez, M.D., Calvo, M., López, S., Arias, C.F. y Sánchez, L. (2018). Antitrotaviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. *Journal of Functional Foods*, 44, pp. 103-111.

Patton, S., Gendler, S.J. y Spicer, A.P. (1995). The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1241, pp. 407-423.

Quintero-Villegas, M.I., Wittke, A. y Hutkins, R. (2014). Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Lactoferrin. *Current Microbiology*, 69, pp. 574-579.

Reglamento (CE) nº 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. Diario Oficial de la Unión Europea, L 139, de 30 de abril de 2004.

Riccio, P. (2004). The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends in Food Science & Technology*, 15, pp. 458-461.

Ripollés, D., Harouna, S., Parrón, J.A., Arenales, I., Calvo, M., Pérez, M.D. y Sánchez, L. (2017). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* Adhesion to Caco-2 Cells by Commercial Dairy Powders and Raw Buttermilk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, pp. 1043-1050.

Rojas, E. y Torres, G. (2013). Isolation and recovery of glycomacropeptide from milk whey by means of thermal treatment. *Food Science and Technology*, 33, pp. 14-20.

Sánchez, L., Peiró, J.M., Castillo, H., Perez, M.D., Ena, J.M. y Calvo, M. (1992). Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *Journal of Food Science*, 57, 873-879.

Sangüesa, A. (2019). Evaluación de la actividad antimicrobiana de fracciones y proteínas de leche bovina frente a *Cronobacter sakazakii*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.

Sawin, E.A., De Wolfe, T.J., Aktas, B., Stroup, B.M., Murali, S.G., Steele, J.L. y Ney, D.M. (2015). Glycomacropeptide is a prebiotic that reduces *Desulfovibrio* bacteria, increases cecal short-chain fatty acids, and is anti-inflammatory in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309, pp. G590-G601.

Shahriar, F., Ngeleka, M., Gordon, J.R. y Simko, E. (2006). Identification by mass

spectroscopy of F4ac-fimbrial-binding proteins in porcine milk and characterization of lactadherin as an inhibitor of F4ac-positive *Escherichia coli* attachment to intestinal villi *in vitro*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30, pp. 723-734.

Solak, B.B. y Akin, N. (2012). Health Benefits of Whey Protein: A Review. *Journal of Food Science and Engineering*, 2, pp. 129-137.

Taylor, M.R., Couto, J.R., Scallan, C.D., Ceriani, R.L. y Peterson, J.A. (1997). Lactadherin (Formerly BA46), a Membrane-Associated Glycoprotein Expressed in Human Milk and Breast Carcinomas, Promotes Arg-Gly-Asp (RGD)-Dependent Cell Adhesion. *DNA and Cell Biology*, 16, pp. 861-869.

Torres, P., Mammarella, E.J., Regenhardt, S.A., Batista-Viera, F. y Rubiolo, A.C. (2009). Hidrólisis enzimática de lactosa en leche y permeados de lactosuero con beta-galactosidasa (*Bacillus circulans*) inmovilizada en resinas acrílicas entrampadas en una matriz de alginato. En: Fontecha, J., Recio, I. y Pilosof, A.M.R. (Eds.), *Funcionalidad de Componentes Lácteos* (pp. 1-24). Madrid, España: CSIC.

Valenti, P. y Antonini, G. (2005). Lactoferrin: Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, pp. 2576-2587.

Vela, N.A.C., Miralles, E.S., Rincón, J.J. y Rosas, F.B. (2012). Reactividad de anticuerpos policlonales anti-glicomacropéptido de suero de quesería bovino frente al glicomacropéptido de suero de quesería de oveja. *Investigación y Ciencia*, 54, pp. 12-16.

Vogel, H.J. (2012). Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochemistry and Cell Biology*, 90, pp. 233-244.

Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A. y Boekel, M.A.J.S. van (1999). *Dairy Technology: Principles of Milk. Properties and Processes*. Fennema, O.W., Karel, M., Sanderson, G.W., Tannenbaum, S.R., Walstra, P. y Whitaker, J.R. (Eds.). New York, NY, EE.UU.: Marcel Dekker, Inc.

Wang, B., Timilsena, Y.P., Blanch, E. y Adhikari, B. (2019). Lactoferrin: Structure, function, denaturation and digestion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, pp. 580-596.

Waworuntu, R.V., Neufeld, K.A.M., O'Mahony, S.M., Pusceddu, M., Berg, B.M., Dinan, T.G. y Cryan, J.F. (2017). A Combination of Milk Fat Globule Membrane and Prebiotics Modulate Pain Hypersensitivity and Cognitive Responses to Maternal Separation Stress. *The FASEB Journal*, 31, pp. 448.5-448.5.

Wong, N.P. (1988). *Fundamentals of Dairy Chemistry*. Jenness, R., Keeney, M. y Marth, E.H. (Eds.). Boston, MA, EE.UU.: Springer.