

José Antonio Parrón Quesada

Estudio de las proteínas con  
actividad antirrotavirus presentes  
en las fracciones y derivados  
lácteos para su utilización en  
productos funcionales

Departamento

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

Director/es

CALVO REBOLLAR, MIGUEL  
SANCHEZ PANIAGUA, MARIA LOURDES

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD  
ANTIRROTAVIRUS PRESENTES EN LAS  
FRACCIONES Y DERIVADOS LÁCTEOS PARA SU  
UTILIZACIÓN EN PRODUCTOS FUNCIONALES

Autor

José Antonio Parrón Quesada

Director/es

CALVO REBOLLAR, MIGUEL  
SANCHEZ PANIAGUA, MARIA LOURDES

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Producción Animal y Ciencia de los Alimentos

2018





**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad Zaragoza**



**Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos**

**Estudio de las proteínas con actividad antirrotavirus  
presentes en las fracciones y derivados lácteos para su  
utilización en productos funcionales**

Memoria presentada por

**José Antonio Parrón Quesada**

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Dirigida por:

**M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua**

**Miguel Calvo Rebollar**



La presente Tesis Doctoral está constituida por un compendio de trabajos de investigación previamente publicados en diversas revistas científicas de carácter internacional.

A continuación se presentan las referencias bibliográficas de los artículos mencionados anteriormente, en los que D. **José Antonio Parrón** figura como primer autor:

1. Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; María Dolores Pérez; Miguel Calvo; Jan Trige Rasmussen; Lourdes Sánchez. *International Dairy Journal*. 2016, 60, 78-85. DOI: 10.1016/j.idairyj.2016.02.030.
2. Antiroviral Activity of Bovine and Ovine Dairy Byproducts. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; María Dolores Pérez; Miguel Calvo; Jan Trige Rasmussen; Lourdes Sánchez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017, 65(21), 4280-4288. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01059.
3. Antiroviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; Sergio José Ramos; María Dolores Pérez; Zeynep Semen; Pedro Rubio; Miguel Calvo; Lourdes Sánchez. *Biometals*. 2018, 31(3), 343-355. DOI: 10.1007/s10534-018-0088-4.
4. Antiroviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; Ana Cristina Sánchez; María Dolores Pérez; Miguel Calvo; Susana López; Carlos Federico Arias; Lourdes Sánchez. *Journal of Functional Foods*. 2018, 44, 103-111. DOI: 10.1016/j.jff.2018.03.002.
5. Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; Sergio José Ramos; María Dolores Pérez; Miguel Calvo; Lourdes Sánchez. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2018, 47, 262-270. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.03.008.
6. Effect of high pressure treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine dairy by-products and bioactive milk proteins. José Antonio Parrón; Daniel Ripollés; Fanny Navarro; Sergio José Ramos; María Dolores Pérez; Miguel Calvo; Lourdes Sánchez. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2018, 48, 265-273. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.07.007.





**A Lucía**

**A Jorge**

**A mi familia**

*“Ut sementem feceris, ita metes”*

*“Según cómo siembres, así recogerás”*

Cicerón



## AGRADECIMIENTOS

Aunque soy consciente de que es imposible expresar en unos pocos párrafos mi gratitud a todas aquellas personas que, de una forma u otra, han contribuido a que este trabajo llegue a buen puerto, me propongo aquí dedicarles unas humildes líneas escritas de corazón.

En primer lugar es necesario agradecer sinceramente a mis directores de tesis, M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez y Miguel Calvo, por darme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación ‘Bioquímica de proteínas de la leche’ y de vivir la gran experiencia de realizar una Tesis Doctoral. Gracias Lourdes por confiar en mí desde el primer momento, por tu incansable apoyo, paciencia, disposición y cariño durante todos estos años.

Agradezco también a M<sup>a</sup> Dolores Pérez por acogerme en el grupo y por su siempre amable disposición para colaborar, ayudar y solventar dudas durante toda esta aventura.

A todos mis compañeros de laboratorio con los que he tenido la suerte de cruzarme durante estos años de investigación. Gracias Mercedes, Sey y Javi (*‘pequeño saolín’*) por aconsejarme y enseñarme en mis comienzos, y por ser mis maestros en el arte de la electroforesis con grasa de vacío y bien de azida sódica. Imposible olvidarme de otros muchos compañeros con los que he pasado grandes momentos y que han hecho mi día a día más alegre y llevadero: Cristina M., Mónica, Sara, Vega, Cristina H., Luis, Marta, Cori y Miriam. De manera especial quiero agradecer a Magalí (*‘Dra. Magalian’*), Ana e Isa por todos esos momentos mágicos que me habéis regalado, en cafés, cenas, viajes y cuchipandas varias, soportando los días en los que no estaba para bromas. Mil gracias Ripo (*‘el gran DRL’*), pues sin ti esta tesis no habría salido adelante. Muchas gracias DRL por haber sido un maravilloso compañero de laboratorio y por transmitirme a diario tu alegría, tu fuerza, tu optimismo y tu profesionalidad.

A todos los compañeros, al profesorado y al personal del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos por toda la ayuda y cariño brindados. Gracias Carmen por tus continuos ánimos y por tus sabios consejos de vida. Gracias Silvana por tu amabilidad y por tus sonrisas diarias. Gracias Inma y Presen por vuestra profesionalidad y atención. Gracias Susana Bayarri por tu valioso apoyo y cariño en mis principios como investigador, y por enseñarme cómo se valida un método analítico. Al personal de la planta piloto, Ana, Lourdes y Antonio, por el valioso asesoramiento y ayuda en el manejo de equipos y por liofilizar cientos de muestras sin perder la sonrisa.

Special thanks to Dr. Jan Trige Rasmussen from the Protein Chemistry Laboratory of Aarhus University (Denmark) for allowing me to enjoy a three-month research stay at his lab and for making me *‘believe in mucins’*. I also thank to Maria, Margit, Anni, Lise and Esben for teaching me several protein isolation techniques, for their valuable advises, for contributing to

the friendly environment and especially for making my stay in Aarhus a great experience. Thank you for providing me with valuable material (proteins and antisera) that I have employed in several experiments throughout the thesis.

Quiero agradecer al Dr. Carlos Arias y a la Dra. Susana López, del Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme realizar una estancia de investigación de tres meses en su grupo. Gracias a su vez a Ana Cristina, Marco, Gio, Lili, Rafa, Tomás, Pavel, Dania, Luis y otros tantos por su calurosa acogida, su amabilidad y su ayuda durante mi estancia en México. Gracias a Cory, a su encantadora familia y a Irene, por estar a mi lado y enseñarme algunos lugares y tradiciones de su país. Sin duda, mi aventura mexicana ha dejado una huella muy importante y positiva tanto a nivel profesional como personal.

Agradecer a Zeynep Semen (Ankara University) y a Pedro Rubio (Universidad de León) por cedernos amablemente la leche de camella y de cerda. I thank the companies Westland Milk Products, Tatura Nutritionals and Arla Foods Ingredients for donating the commercial dairy powders used in this study.

Finalmente quiero dar las gracias a mi querida familia. En primer lugar a mi madre, que es para mí un ejemplo constante de sacrificio y superación, y cuyo ánimo y amor han contribuido decisivamente en el éxito de este proyecto. A mi padre, que siempre me animó a seguir formándome y esforzándome y seguro estaría orgulloso de los logros alcanzados.

A mis hermanas Nines, Eva, Ana, Susa y Pailon, de manera muy especial, por haberme acompañado todo este tiempo y regalarme su alegría, optimismo, fuerza y amor desde que tengo uso de razón. Sois para mí un modelo de tenacidad y superación. A mis herman@s Elena, Nolo, Pato y Pinzi, y a los Srs. Bene, Víctor y Pitu, por animarme e interesarse por mis experimentos 'locos'. No puedo olvidarme de mis sobr@s Pececill, Usi, Miki, Moflis y Dirun. Gracias duendecillos por permitirme desconectar del trabajo diario y por vuestro infinito cariño.

A M<sup>a</sup> Jesús, Rosen, Víctor y Elena, gracias por estar siempre ahí con una sonrisa, por apoyarme y por haberos interesado por el estado de mis conejos y mis eternas celulicas.

A Lucía, la piedra angular de esta tesis y de mi vida. Mil gracias por tu infinita paciencia, por tus valiosos consejos, por tu apoyo y amor incondicionales, y por ser como eres. Gracias también por traer a este mundo a Jorge, nuestra '*pequeña gran revolución*'.

Por último, por no olvidarme de nadie, gracias al resto de familiares, amigos y compañeros a los que no he nombrado y que, en mayor o menor medida, os habéis preocupado y contribuido en la consecución de esta tesis.

Este trabajo ha podido ser realizado gracias a una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación (FPU-12/02765), incluyendo dos ayudas para estancias breves, y al proyecto de investigación CICYT AGL 2010-20835.



# Índice

---





## ÍNDICE

<b>RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN /SUMMARY AND JUSTIFICATION</b>	<b>- 1 -</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>- 7 -</b>
<b>1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b>	<b>- 13 -</b>
<b>1.1. Antecedentes</b>	<b>- 13 -</b>
<b>1.2. Objetivos</b>	<b>- 16 -</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>- 19 -</b>
<b>2.1. Origen y composición de la leche bovina</b>	<b>- 19 -</b>
<b>2.2. Proteínas de la leche bovina</b>	<b>- 23 -</b>
2.2.1. Caseínas	- 24 -
2.2.1.1. Características de las caseínas	- 24 -
2.2.1.2. Funciones de las caseínas	- 26 -
2.2.2. Proteínas del lactosuero	- 26 -
2.2.2.1. $\beta$ -lactoglobulina	- 27 -
2.2.2.2. $\alpha$ -lactalbúmina	- 28 -
2.2.2.3. Inmunoglobulinas	- 29 -
2.2.2.4. Fracción proteosa-peptona	- 30 -
2.2.2.5. Albúmina sérica	- 31 -
2.2.2.6. Lactoferrina	- 31 -
2.2.2.7. Lactoperoxidasa	- 33 -
2.2.2.8. Otras proteínas y péptidos del lactosuero	- 33 -
2.2.3. Péptidos bioactivos	- 34 -
<b>2.3. Membrana del glóbulo graso de la leche</b>	<b>- 36 -</b>
2.3.1. Origen	- 36 -
2.3.2. Composición	- 37 -
2.3.3. Estructura y función	- 39 -
2.3.4. Proteínas de la MFGM	- 41 -
2.3.4.1. Butirofilina	- 42 -
2.3.4.2. Lactadherina	- 43 -
2.3.4.3. Xantina oxidasa	- 44 -
2.3.4.4. Mucinas	- 46 -
2.3.4.5. Clúster de diferenciación 36	- 48 -
2.3.4.6. Componente 3 de la proteosa-peptona	- 48 -
2.3.4.7. Adipofilina	- 49 -
2.3.4.8. Otras proteínas de la MFGM	- 50 -

<b>2.4. Subproductos de la industria láctea</b>	<b>- 51 -</b>
2.4.1. Leche desnatada	- 54 -
2.4.2. Lactosuero y productos derivados del lactosuero	- 54 -
2.4.3. Mazada y butter serum	- 58 -
<b>2.5. Tratamientos tecnológicos en la industria láctea</b>	<b>- 61 -</b>
2.5.1. Tratamientos térmicos	- 63 -
2.5.2. Tratamientos no térmicos	- 66 -
2.5.2.1. Tratamiento por altas presiones hidrostáticas	- 69 -
<b>2.6. Leche humana</b>	<b>- 70 -</b>
2.6.1. Composición	- 70 -
2.6.2. Actividad biológica de las proteínas de la leche humana	- 73 -
2.6.3. Bancos de leche humana	- 75 -
2.6.4. Fórmulas infantiles	- 77 -
<b>2.7. Rotavirus</b>	<b>- 82 -</b>
2.7.1. Estructura	- 82 -
2.7.2. Clasificación	- 86 -
2.7.3. Infección y replicación	- 87 -
2.7.4. Cuadro clínico	- 90 -
2.7.5. Características epidemiológicas	- 93 -
2.7.6. Tratamiento, prevención y control de la infección	- 96 -
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>- 103 -</b>
<hr/>	
<b>3.1. Materiales</b>	<b>- 103 -</b>
3.1.1. Leche y calostro de diversas especies	- 103 -
3.1.2. Derivados lácteos y proteínas comerciales	- 103 -
3.1.3. Material para la obtención del lactosuero y fracciones derivadas de la nata	- 105 -
3.1.4. Material para las técnicas cromatográficas	- 105 -
3.1.5. Material para espectrofotometría	- 105 -
3.1.6. Material para el ensayo del BCA	- 106 -
3.1.7. Material para electroforesis	- 106 -
3.1.8. Material para las técnicas inmunoquímicas	- 106 -
3.1.9. Material para los ensayos con cultivos celulares	- 107 -
3.1.10. Material para los ensayos de actividad antirrotavirus	- 107 -
3.1.11. Material para los ensayos de tratamientos térmicos y de altas presiones	- 109 -
3.1.12. Material para los ensayos de degradación enzimática	- 109 -
3.1.13. Otros materiales	- 109 -

<b>3.2. Métodos</b>	<b>- 110 -</b>
3.2.1. Obtención de fracciones a partir de leche bovina	- 110 -
3.2.1.1. Obtención de lactosuero y caseínas bovinas	- 110 -
3.2.1.2. Obtención de mazada y butter serum bovinos	- 110 -
3.2.1.3. Obtención de una fracción enriquecida en MFGM bovina	- 111 -
3.2.2. Aislamiento de proteínas a partir de leche bovina	- 112 -
3.2.2.1. Aislamiento de inmunoglobulinas bovinas	- 113 -
3.2.2.2. Aislamiento de una fracción enriquecida en mucinas bovinas	- 114 -
3.2.2.3. Aislamiento de xantina oxidasa bovina	- 115 -
3.2.2.4. Aislamiento de lactadherina bovina	- 116 -
3.2.2.5. Aislamiento del componente 3 de la proteosa-peptona bovina	- 116 -
3.2.2.6. Saturación con hierro de lactoferrina bovina	- 117 -
3.2.3. Obtención de fracciones y proteínas a partir de leche ovina	- 118 -
3.2.3.1. Aislamiento de lactoferrina ovina	- 118 -
3.2.4. Obtención de fracciones y proteínas a partir de leche humana	- 119 -
3.2.4.1. Obtención de lactosuero y caseínas humanas	- 119 -
3.2.4.2. Fracción enriquecida en MFGM humana	- 119 -
3.2.4.3. Aislamiento de inmunoglobulinas A humanas	- 120 -
3.2.4.4. Aislamiento de $\alpha$ -lactalbúmina humana	- 120 -
3.2.4.5. Aislamiento de lisozima humana	- 120 -
3.2.4.6. Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina humana	- 120 -
3.2.5. Cuantificación de proteínas mediante el ensayo del BCA	- 122 -
3.2.6. Métodos electroforéticos	- 122 -
3.2.6.1. Preparación de geles de poliacrilamida	- 122 -
3.2.6.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS	- 123 -
3.2.6.3. Técnicas de tinción de los geles	- 123 -
3.2.7. Métodos inmunoquímicos	- 125 -
3.2.7.1. Obtención de antisueros frente a proteínas aisladas	- 125 -
3.2.7.2. Inmunodotting	- 126 -
3.2.7.3. Western-blotting	- 126 -
3.2.8. Cultivo celular	- 128 -
3.2.8.1. Siembra y mantenimiento del cultivo celular	- 128 -
3.2.8.2. Congelación y descongelación de células	- 129 -
3.2.8.3. Siembra en placas de microensayo	- 129 -
3.2.8.4. Ensayo de citotoxicidad	- 130 -
3.2.9. Rotavirus	- 130 -
3.2.9.1. Propagación de rotavirus en la línea celular MA104	- 130 -

3.2.9.2. Titulación de la suspensión de rotavirus	- 131 -
3.2.9.3. Purificación de rotavirus en gradiente de cloruro de cesio	- 133 -
3.2.9.4. Caracterización del ARN vírico	- 134 -
3.2.10. Ensayos de neutralización de la infección de las células MA104 por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas	- 134 -
3.2.10.1. Determinación mediante inmunofluorescencia indirecta	- 135 -
3.2.10.2. Validación del ensayo de neutralización mediante inmunofluorescencia	- 138 -
3.2.10.3. Determinación mediante inmunodetección con carbazol	- 141 -
3.2.10.4. Determinación mediante PCR a tiempo real para rotavirus humanos	- 142 -
3.2.11. Estudio del mecanismo de inhibición de la infección por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas	- 144 -
3.2.11.1. Ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula	- 146 -
3.2.11.2. Ensayo de inhibición post-unión rotavirus-célula	- 147 -
3.2.11.3. Ensayo de neutralización de cepas reagrupadas	- 147 -
3.2.11.4. Ensayo de bloqueo celular	- 148 -
3.2.12. Tratamiento térmico de fracciones y proteínas lácteas	- 148 -
3.2.13. Tratamiento de fracciones y proteínas lácteas por altas presiones hidrostáticas	- 150 -
3.2.14. Degradación enzimática de fracciones y proteínas lácteas	- 151 -
3.2.15. Análisis estadístico de los resultados	- 154 -

#### **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN - 157 -**

---

<b>4.1. Resultados publicados</b>	<b>- 157 -</b>
4.1.1. <b>Artículo 1.</b> Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey	- 159 -
4.1.2. <b>Artículo 2.</b> Antirotaviral activity of bovine and ovine dairy byproducts	- 169 -
4.1.3. <b>Artículo 3.</b> Antirotaviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments	- 181 -
4.1.4. <b>Artículo 4.</b> Antirotaviral activity of bovine milk components: extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism	- 197 -
4.1.5. <b>Artículo 5.</b> Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions	- 209 -
4.1.6. <b>Artículo 6.</b> Effect of high pressure treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine dairy by-products and bioactive proteins	- 221 -

<b>4.2. Resultados no publicados</b>	<b>- 232 -</b>
4.2.1. Neutralización de la infección de las células MA104 por rotavirus	- 232 -
4.2.1.1. Validación del ensayo de neutralización	- 232 -
4.2.1.2. Neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino	- 234 -
4.2.1.3. Neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus	- 252 -
4.2.1.4. Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus humano Wa mediante PCR a tiempo real	- 257 -
4.2.2. Mecanismos de inhibición de la infección por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas	- 259 -
4.2.2.1. Inhibición de la unión rotavirus-célula	- 259 -
4.2.2.2. Inhibición post-unión rotavirus-célula	- 261 -
4.2.2.3. Neutralización de cepas reagrupadas	- 263 -
4.2.2.4. Bloqueo celular	- 265 -
4.2.3. Efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas	- 266 -
4.2.3.1. Degradación enzimática del lactosuero y de las fracciones lácteas derivadas de la nata bovina y ovina	- 266 -
4.2.3.2. Degradación enzimática de la fracción PPT y de la PP3 bovinas y ovinas	- 273 -
4.2.3.3. Degradación enzimática de derivados lácteos comerciales	- 277 -
<b>5. DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>- 283 -</b>
<b>5.1. Actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas</b>	<b>- 283 -</b>
<b>5.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas</b>	<b>- 298 -</b>
<b>5.3. Efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas</b>	<b>- 311 -</b>
<b>6. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b>	<b>- 315 -</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>- 323 -</b>
<b>8. APÉNDICES</b>	<b>- 369 -</b>
<b>8.1. Apéndice 1. Características de las revistas</b>	<b>- 369 -</b>
<b>8.2. Apéndice 2. Contribución del doctorando</b>	<b>- 370 -</b>
<b>8.3. Apéndice 3. Renuncia de coautores no Doctores</b>	<b>- 371 -</b>



Resumen y justificación  
/Summary and justification

---





## **RESUMEN Y JUSTIFICACIÓN DE LOS TRABAJOS**

En los últimos años se ha generado un interés creciente por la investigación de diversos componentes bioactivos de la leche debido, principalmente, a su potencial uso como ingredientes en alimentos, puesto que pueden incrementar tanto el valor nutritivo como el valor funcional de los mismos, aportando efectos beneficiosos para la salud.

Los rotavirus son la principal causa de diarrea severa en neonatos y niños menores de 5 años, representando un serio problema de salud pública asociado a altas tasas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en los países en vías de desarrollo. A pesar de que la vacunación frente a rotavirus ha reducido la morbilidad y los costes de atención médica a nivel mundial, la dificultad asociada con la implementación de programas de vacunación en países en vías de desarrollo pone de manifiesto la necesidad de estrategias alternativas de protección frente a este tipo de agentes virales.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas derivadas de leche bovina, ovina y humana, así como de subproductos de la industria láctea. Para ello, se obtuvieron diferentes fracciones lácteas: lactosuero, mazada, butter serum y fracción enriquecida en membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM, milk fat globule membrane), así como diversos productos lácteos comerciales.

Las proteínas lácteas se aislaron, a partir de las fracciones anteriormente citadas, mediante técnicas cromatográficas como filtración en gel, intercambio iónico y afinidad. Se obtuvieron las inmunoglobulinas (Igs) y la lactoferrina (LF) de leche bovina, ovina y humana, dos proteínas del lactosuero con importantes funciones biológicas. Se aislaron, además, diversas proteínas de la MFGM: mucinas, xantina oxidasa (XOD), lactadherina (LDH) y componente 3 de la proteosa-peptona (PP3), a las que se han atribuido diferentes propiedades biológicas.

La actividad antirrotavirus de las fracciones, subproductos y proteínas lácteas bovinas, ovinas y humanas se determinó *in vitro* mediante un ensayo de neutralización de la infección de la línea de células epiteliales de riñón fetal de mono MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino, y detección por inmunofluorescencia indirecta. Este método se puso a punto y se validó en base a directrices internacionales, resultando ser específico, preciso (en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad) y robusto. Los resultados obtenidos, incluidos en los artículos 1, 2 y 5 del presente compendio, demostraron que la leche, independientemente del origen, es una valiosa fuente de compuestos con actividad antirrotavirus, siendo el lactosuero y dos de sus proteínas mayoritarias, Igs y LF, las que presentaron mayor capacidad neutralizante de la infección de las células por la cepa WC3. Las proteínas de la MFGM, LDH y XOD, exhibieron a su vez una actividad inhibitoria muy interesante y escasamente estudiada en trabajos previos.

El estudio de la actividad antirrotavirus mediada por las diferentes fracciones y proteínas lácteas se completó evaluando su capacidad neutralizante *in vitro* frente a cepas de rotavirus pertenecientes a diferentes serotipos y genotipos: las cepas bovinas UK, NCDV, B223 y WC3, la cepa humana Wa y la cepa de simio RRV. Tal y como se ha publicado en el artículo 4 de este compendio, se observaron diferentes patrones de neutralización entre las cepas sensibles al tratamiento con neuraminidasa (NA) (NCDV y RRV) y las cepas resistentes a la NA (WC3, UK, B223 y Wa) presentando, en general, las primeras una mayor susceptibilidad a la neutralización por parte de las diversas muestras lácteas. Esto podría indicar la gran influencia de la glicosilación de las proteínas lácteas y de la composición de las fracciones lácteas, en la actividad de éstas frente a los rotavirus.

Una vez comprobada la actividad antirrotavirus de las muestras lácteas, se estudiaron sus mecanismos de acción. Para ello, se llevaron a cabo ensayos de inhibición de la unión rotavirus-célula, ensayos de inhibición post-unión rotavirus-célula, ensayos de neutralización de cepas reagrupadas y ensayos de bloqueo celular. Los resultados parecen indicar que el mecanismo por el que la mayoría de las muestras lácteas neutralizan la infectividad de los rotavirus es combinado. De hecho, se evidenció la inhibición de la unión de los virus a las células por las fracciones y proteínas lácteas, que interaccionan mayoritariamente con la proteína VP4 situada en la cápside viral, y también la inhibición en etapas post-unión rotavirus-célula. Se descartó, en cambio, que las muestras lácteas interaccionaran con los receptores celulares para los virus.

Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes tratamientos tecnológicos, tales como los tratamientos térmicos y de altas presiones hidrostáticas, en la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas. En general, la pasteurización baja causó una mayor pérdida de actividad neutralizante que la pasteurización alta. Además, el tratamiento con altas presiones mostró resultados muy prometedores como alternativa al tratamiento térmico para mantener la actividad de las muestras, puesto que tuvo un efecto menor en la actividad neutralizante de fracciones y proteínas lácteas. Todas estas observaciones están publicadas en los artículos 1, 2, 3, 5 y 6 del presente compendio.

Por último, se estudió el efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas. De manera general, los hidrolizados presentaron una menor capacidad neutralizante que las correspondientes muestras sin degradar, excepto en el caso de los lactosueros, que la mantuvieron.

Las evidencias aportadas en este estudio sobre la capacidad antirrotavirus de múltiples fracciones y proteínas lácteas pueden contribuir a revalorizar los productos de los que se obtienen como potenciales fuentes de ingredientes para alimentos funcionales.

## **SUMMARY AND JUSTIFICATION**

During the last years, a growing interest in the research on several bioactive fractions and proteins from milk has arisen, due mainly to their potential use as food ingredients, since they are able to improve both the nutritional and functional value of foods, providing beneficial health effects.

Rotavirus is the leading cause of severe diarrhoea in neonates and children under five years, being a serious public health problem associated with high morbidity and mortality rates worldwide, particularly in developing countries. Even though vaccination against rotavirus has reduced morbidity and health-care costs globally, challenges as regards the implementation of vaccination programmes in developing countries highlight the need for alternative protection approaches against this kind of viral agents.

The main aim of this PhD thesis has been the study of the antirotaviral activity of several fractions and proteins from bovine, ovine and human milk, as well as of dairy by-products. For that purpose, diverse dairy fractions were obtained: whey, buttermilk, butter serum and a fraction enriched in milk fat globule membrane (MFGM) proteins, and various commercial dairy products were also obtained.

Milk proteins were isolated, from the aforementioned fractions, by means of chromatographic techniques, such as gel filtration, ion exchange and affinity chromatography. Thus, two whey proteins with important biological properties, immunoglobulins (Igs) and lactoferrin (LF), were obtained from bovine, ovine and human milk. Moreover, several MFGM proteins, such as mucins, xanthine oxidase (XOD), lactadherin (LDH) and component 3 of proteose peptone (PP3), which have been attributed to exert diverse biological functions, were also isolated.

The antirotaviral capacity of dairy by-products and fractions and proteins from bovine, ovine and human milk was studied *in vitro* through a neutralizing assay by measuring their capacity to inhibit the infection of African green monkey kidney MA104 cells by the bovine rotavirus WC3 strain, and further detection by indirect immunofluorescence. This assay was developed and validated according to international guidelines, verifying that it was specific, precise (under repeatability and reproducibility conditions), and robust. Results obtained, which are included in articles 1, 2 and 5 of this compendium, showed that milk, regardless of the origin, is a valuable source of bioactive compounds with activity against rotaviruses, being the whey and two of its main proteins, Igs and LF, those presenting the highest neutralizing capacity against WC3 strain. The MFGM proteins, LDH and XOD, also exhibited a very interesting inhibitory activity, scarcely studied in previous works.

The study of the antirotaviral activity of several milk fractions and proteins was completed by assessing their neutralizing capacity *in vitro* against rotaviral strains belonging to different serotypes and genotypes: the bovine strains UK, NCDV, B223 and WC3; the human strain Wa and the simian strain RRV. As published in the article 4 of this compendium, different neutralization patterns were observed between neuraminidase (NA) sensitive strains (NCDV and RRV) and NA resistant strains (WC3, UK, B223 and Wa). Thus, in general terms, NA sensitive strains were more susceptible to neutralization by milk samples. This fact may indicate the great influence of milk protein glycosylation, along with the composition of the dairy fractions, on their antirotaviral activity.

After verifying the antirotaviral capacity of milk samples, their action mechanisms were studied. For that purpose, different assays were performed: rotavirus-cell binding inhibition, rotavirus-cell post-binding inhibition, neutralization of reassortant strains, and cell blocking assays. The results seem to indicate that the way by which most of milk samples neutralize rotaviral infectivity is a combined mechanism. In fact, the ability of several milk fractions and proteins to inhibit the binding of rotavirus to cells was evidenced, mainly by means of interaction with the rotaviral capsid protein VP4, along with the inhibition activity at the rotavirus-cell post-binding steps. By contrast, the interaction of milk samples with rotaviral cell receptors was discarded.

Afterwards, the effect of diverse technological treatments, such as heat treatments and high hydrostatic pressure, on the antirotaviral activity of several milk fractions and proteins was also tested. In general, the low temperature-long time pasteurization led to higher neutralizing activity losses than the high temperature-short time pasteurization. Moreover, the high pressure treatment showed very promising results as an alternative to thermal treatment to better maintain the bioactivity of samples, since it exerted lower impact on the neutralizing activity of fractions and proteins. These observations have been published in articles 1, 2, 3, 5 and 6 of this compendium.

Finally, the influence of the enzymatic degradation on the antirotaviral activity of diverse milk fractions and proteins was also studied. Generally, the hydrolysates displayed lower capacity to neutralize rotavirus infectivity than the non-degraded counterparts, except in the case of whey that maintained such activity.

All the evidences provided by this study, as regards the antirotaviral capacity of several milk fractions and proteins, may contribute to revalorising the products from which they are obtained, as potential sources of ingredients for functional foods.

# Abreviaturas

---



## **ABREVIATURAS**

- ADPH:** adipofilina
- AEBLH:** Asociación Española de Bancos de Leche Humana
- AMF:** anhydrous milk fat (grasa láctea anhidra)
- ANOVA:** analysis of variance (análisis de varianza)
- ATCC:** American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
- BCA:** bicinchoninic acid test (test del ácido bicinconínico)
- BSA:** bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)
- BSSL:** bile salt-stimulated lipase (lipasa estimulada por sales biliares)
- BTN:** butirofilina
- CD36:** clúster de diferenciación 36
- CV:** coeficiente de variación
- DLPs:** double layered particles (partículas de doble capa)
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético
- EFSA:** European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
- ELISA:** enzyme linked immunosorbent assay (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas)
- EMBA:** European Milk Bank Association (Asociación Europea de Bancos de Leche)
- EMEM:** Eagle's minimum essential medium (medio mínimo esencial de Eagle)
- ESL:** extended shelf-life (larga vida útil)
- FABP:** fatty acid binding protein (proteína fijadora de ácidos grasos)
- FAO:** Food and Agricultural Organization (Organización para la Agricultura y la Alimentación)
- FBS:** foetal bovine serum (suero fetal bovino)
- FFU:** focus forming units (unidades formadoras de foco)
- FITC:** fluorescein isothiocyanate (isotiocianato de fluoresceína)
- GMP:** glicomacropéptido
- HHP:** high hydrostatic pressure (altas presiones hidrostáticas)
- HTST:** high-temperature short-time (pasteurización alta)
- IC<sub>50</sub>:** inhibitory concentration 50 (concentración inhibitoria 50)
- IgA:** inmunoglobulinas A
- IgG:** inmunoglobulinas G
- Igs:** inmunoglobulinas

**LDH:** lactadherina

**LF:** lactoferrina

**LPOX:** lactoperoxidasa

**LTLT:** low-temperature long-time (pasteurización baja)

**LYZ:** lisozima

**MEM:** minimum essential medium (medio mínimo esencial)

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

**MOI:** multiplicity of infection (multiplicidad de infección)

**MUCs:** mucinas

**NA:** neuraminidasa

**OECD:** Organisation for Economic Cooperation and Development (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos)

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

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

**PBS-T:** PBS conteniendo Tween-20 al 0,05%

**PCR:** polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

**PPT:** proteose-peptone (fracción proteosa-peptona)

**PP3:** proteose-peptone component 3 (componente 3 de la proteosa-peptona)

**PVDF:** polyvinylidene fluoride (fluoruro de polivinilideno)

**rhLF:** recombinant human lactoferrin (lactoferrina humana recombinante)

**SA:** serum albumin (albúmina sérica)

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

**TBS:** Tris buffered solution (tampón Tris, pH 7,4)

**TBS-T:** TBS conteniendo Tween-20 al 0,1%

**TCA:** trichloroacetic acid (ácido tricloroacético)

**TLPs:** triple layered particles (partículas de triple capa)

**UHT:** ultra high temperature (esterilización a temperatura ultra alta)

**WHO:** World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

**WPC:** whey protein concentrate (concentrado de proteínas del lactosuero)

**WPH:** whey protein hydrolysate (hidrolizado de proteínas del lactosuero)

**XOD:** xantina oxidasa



# 1. Antecedentes y objetivos



## **1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS**

### **1.1. Antecedentes**

Los rotavirus son la principal causa de diarrea severa en neonatos y niños menores de 5 años, además de un agente patógeno de importancia veterinaria que afecta al ganado bovino, ovino, porcino y avícola. A nivel mundial, la diarrea es una de las cinco causas principales de muerte entre todos los grupos de edad y la segunda causa de muerte en niños menores de 5 años (Marcotte y Hammarström, 2016). De hecho, 215.000 niños menores de 5 años murieron en el año 2013 a causa de infección por rotavirus, correspondiendo más del 85% de las muertes a las producidas en países en vías de desarrollo (Tate et al., 2016).

La gastroenteritis causada por rotavirus sigue siendo, a día de hoy, un serio problema de salud pública, con síntomas que van desde una diarrea leve hasta la deshidratación severa, con posibles complicaciones que incluyen el edema cerebral, el shock hipovolémico, el fallo renal e incluso, la muerte. La morbilidad y mortalidad asociada a la gastroenteritis causada por rotavirus representa un importante problema económico para la sanidad pública. Aunque este proceso aparece con independencia del estatus socioeconómico y las condiciones ambientales, las consecuencias son más graves en los países en vías de desarrollo (Kotloff et al., 2013).

Actualmente, existen en el mercado dos vacunas frente a rotavirus: RotaTeq® (RV5, Merck, West Point, PA, EE.UU.) y Rotarix® (RV1, GlaxoSmithKline, Rixensart, Bélgica), que han contribuido a reducir la incidencia de las afecciones relacionadas con los rotavirus en países desarrollados (Dennehy, 2008). La vacunación frente a rotavirus ha reducido la morbilidad y los costes de atención médica a nivel mundial. Sin embargo, la dificultad asociada con la implementación de programas de vacunación en países en vías de desarrollo, en relación a la accesibilidad y disponibilidad de vacunas (Babji y Kang, 2012), pone de manifiesto la necesidad de estrategias alternativas de protección frente a este tipo de agentes virales. Además, el hecho de que estas vacunas estén desaconsejadas para pacientes inmunodeprimidos (Gaspar et al., 2014), aumenta el interés de investigar en terapias alternativas basadas en compuestos funcionales naturales.

Es ampliamente reconocido que la lactancia materna es la manera óptima de proveer a los recién nacidos con los nutrientes esenciales para su crecimiento y desarrollo saludables, además de protegerles de un amplio espectro de agentes patógenos (Liu y Newburg, 2013; Peterson et al., 2013). A este respecto, diversos estudios han puesto de manifiesto el papel de la lactancia como factor de protección pasiva frente a la infección por rotavirus (Gianino et al., 2002; Tino De Franco et al., 2013). Si bien algunos estudios en esta línea proponen el uso de preparaciones a base de inmunoglobulinas (Igs) de calostro bovino (Inagaki et al., 2010b; Mainer et al., 1999), lamentablemente la producción a gran escala tanto de calostro bovino como de leche humana representa limitaciones prácticas obvias. Por todo ello, la necesidad de encontrar fuentes viables de agentes naturales con capacidad antirrotavirus es indudable.

En la literatura científica existen evidencias de componentes derivados de alimentos que poseen actividad antirrotavirus. De hecho, diversos extractos naturales, aceites esenciales y preparados vegetales han mostrado actividad *in vitro* e *in vivo* frente a rotavirus, habiendo sido identificados como componentes activos los polifenoles, ácidos fenólicos, taninos, pectinas, terpenos y flavonoides, entre otros (Rajiv et al., 2016). Además, diferentes compuestos presentes en el huevo han mostrado actividad antirrotavirus *in vitro* e *in vivo*. En este caso, la actividad se atribuyó tanto a la fracción enriquecida en oligosacáridos de la yema de huevo, como al ovomucoide y la ovoalbúmina de la clara (Koketsu et al., 1995; Yolken et al., 1987). Sin embargo, la mayoría de estudios en relación a la actividad antirrotavirus de componentes alimentarios están centrados en fracciones lácteas, tales como el lactosuero bovino concentrado (Bojsen et al., 2007; Kvistgaard et al., 2004; Pérez-Cano et al., 2008), la mazada bovina (Fuller et al., 2013) y la leche humana (Newburg et al., 1998; Yolken et al., 1992). La actividad neutralizante se ha relacionado con algunas glicoproteínas bioactivas presentes en el lactosuero y en la MFGM, como las Igs, la lactoferrina (LF), las mucinas (MUCs), la lactadherina (LDH) y el componente 3 de la proteosa-peptona (PP3) (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010a; Kvistgaard et al., 2004; Superti et al., 2001). A pesar de estas evidencias, todavía son muy escasos los estudios focalizados en la actividad antirrotavirus de fracciones y proteínas derivadas de leche de especies distintas a la bovina, así como aquellos que abordan los mecanismos de neutralización de la infección.

Algunas proteínas bioactivas pueden obtenerse a partir de diferentes subproductos de la industria láctea, como el lactosuero o la mazada. El lactosuero bovino es el principal subproducto de la industria quesera y constituye una buena fuente de proteínas de alto valor nutricional con interesantes propiedades funcionales (Blecker et al., 1997), como la  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA), la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), la albúmina sérica (SA, serum albumin), la LF, las Igs y la fracción proteosa-peptona (PPT) (Madureira et al., 2007). A nivel mundial se ha estimado una producción del orden de 23 millones de toneladas de queso en el año 2017

(OECD/FAO, 2016), generando una cantidad aproximada de 180 millones de toneladas de lactosuero (Mollea et al., 2013). Por otro lado, el suero de mantequilla o mazada es el principal subproducto que se libera durante el batido de la nata en el proceso de formación de mantequilla. A nivel mundial se ha estimado una producción del orden de 11 millones de toneladas de mantequilla en el año 2017 (OECD/FAO, 2016), que genera una cantidad equivalente de mazada (Morin et al., 2007). Tras la ruptura de los glóbulos de grasa durante el batido, los componentes solubles de la nata tales como la lactosa, las proteínas séricas y los minerales quedan en la mazada. Además de estos componentes, la mazada también está enriquecida en fragmentos de la MFGM, ricos en fosfolípidos y glicoproteínas (Morin et al., 2006). El estudio y evaluación de la actividad antirrotavirus de estos subproductos de la industria láctea puede contribuir a aportarles un valor añadido y mejorar las expectativas para su utilización en alimentos funcionales.

Con vistas a garantizar la calidad higiénica de la leche humana, en la actualidad los bancos de leche llevan a cabo un tratamiento de pasteurización a 62,5 °C durante 30 min (Arslanoglu et al., 2010). Los tratamientos térmicos también son empleados en la industria láctea como proceso tecnológico necesario para garantizar la calidad y seguridad microbiológica durante la vida útil de los productos (Holsinger et al., 1997). La pasteurización baja (63 °C durante 30 min) y la pasteurización alta (72 °C durante 15 s) son tratamientos térmicos habitualmente empleados en la industria láctea y quesera. Existen múltiples estudios que indican que los tratamientos térmicos aplicados a la leche, tanto a la leche humana como a la leche bovina, pueden provocar alteraciones en sus componentes afectando a su valor nutricional y biológico (Chevalier et al., 2009; Peila et al., 2017). Aunque la termorresistencia de diversas proteínas lácteas ha sido ampliamente estudiada (Lee y Sherbon, 2002; Mainer et al., 1997; Mayayo et al., 2016; Sánchez et al., 1992), poco se conoce acerca del efecto del tratamiento térmico sobre su capacidad antirrotavirus. Por lo tanto, el presente estudio es importante para conocer cuáles son los tratamientos térmicos más adecuados con el fin de mantener lo más intacta posible la bioactividad de las diversas fracciones y proteínas lácteas.

Por otro lado, el uso de altas presiones hidrostáticas (HHP, high hydrostatic pressure) en el procesado de alimentos ha adquirido gran importancia en la industria en los últimos años. Las HHP son capaces de inactivar ciertos microorganismos y enzimas responsables de la degradación de los alimentos (San Martín et al., 2002; Sarker et al., 2013). Además, dado que esta tecnología no usa calor, las propiedades nutricionales y sensoriales del alimento permanecen, teóricamente, inalteradas, aunque se han relacionado ciertos cambios producidos en la estructura de las proteínas con la presión aplicada (Huppertz et al., 2006; Meng et al., 2017). Esta tesis ha contribuido a poner de manifiesto la potencialidad de las HHP como

tecnología alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales, mediante el estudio del efecto de diferentes tratamientos de HHP en la actividad antirrotavirus de diversas muestras lácteas.

Para poder considerar el uso oral de cualquier ingrediente funcional, bien sea para alimentación humana o para uso veterinario, es necesario tener en cuenta su comportamiento *in vivo*. Diversos estudios han comprobado la resistencia de ciertas glicoproteínas, como las mucinas y la LDH, simulando la degradación enzimática gastrointestinal *in vitro* (Gallier et al., 2012; Hamosh et al., 1999). A pesar de ello, son muy escasas las referencias del efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas.

Por todo ello, es necesario realizar estudios que permitan sacar a la luz el potencial antirrotavirus de las diferentes fracciones y derivados lácteos, así como de sus proteínas mayoritarias. Estos estudios nos permitirán valorar su posible utilización como ingredientes funcionales en alimentos o productos especiales como las fórmulas infantiles, con el objetivo de prevenir o reducir el riesgo de contraer enfermedades ocasionadas por rotavirus.

## 1.2. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas derivadas de leche bovina, ovina y humana, así como de subproductos de la industria láctea. Asimismo, se ha analizado el efecto de algunos tratamientos tecnológicos (tratamientos térmicos y altas presiones) y enzimáticos sobre la integridad y actividad de las fracciones y proteínas lácteas. Se pretende así evaluar la potencialidad de estos productos como ingredientes para alimentos funcionales. Para la consecución de dichas metas, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Determinación de la actividad antirrotavirus de diversas fracciones, subproductos y proteínas lácteas bovinas y ovinas.
- Determinación de la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas humanas.
- Estudio de los mecanismos de inhibición mediada por fracciones y proteínas lácteas de la infección por rotavirus en células MA104.
- Evaluación del efecto de diferentes tratamientos térmicos en la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas.
- Evaluación del efecto de diferentes tratamientos de altas presiones hidrostáticas en la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas.
- Estudio del efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas.

## 2. Revisión bibliográfica

---





## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Esta revisión bibliográfica se centra en aquellos aspectos más relacionados con la Tesis Doctoral. Si bien la mayor parte de la información versa sobre leche bovina, se ha incluido un apartado de leche humana y se ha realizado alguna comparativa con la leche de otras especies.

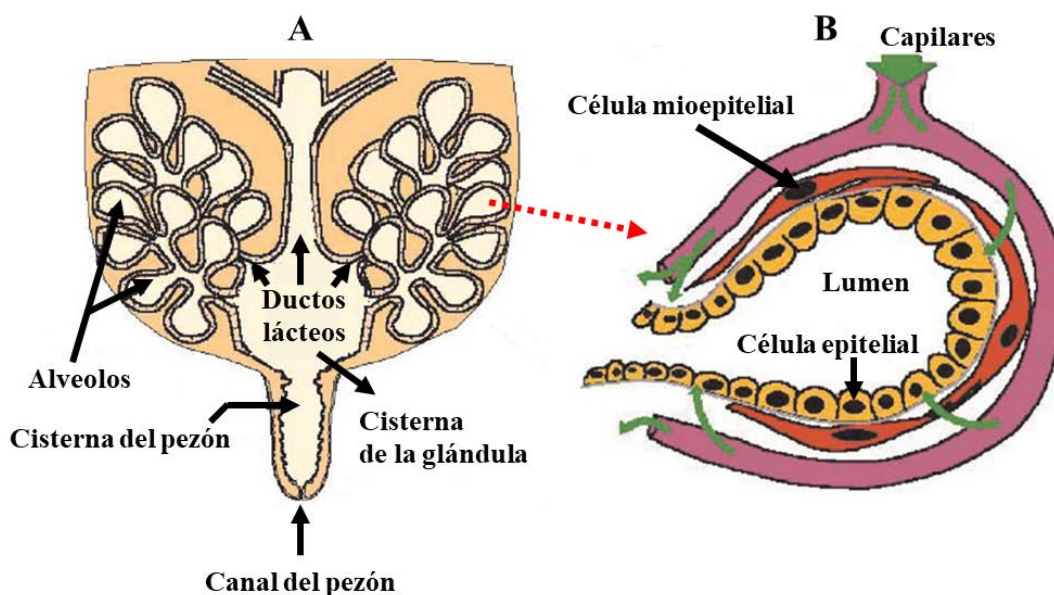
### 2.1. Origen y composición de la leche bovina

La leche es el fluido secretado por la glándula mamaria de las hembras de todas las especies de mamíferos, cuya principal función es servir de alimento a los recién nacidos y contribuir a su desarrollo. Supone el alimento nutricionalmente más completo y ajustado a los requerimientos del lactante de cada especie, y sus componentes participan en numerosas funciones fisiológicas (O'Mahony y Fox, 2014).

La leche de algunos mamíferos se emplea como alimento cotidiano para consumo humano, bien como tal o en forma de productos lácteos varios, especialmente la procedente de las vacas (aproximadamente el 84-88% de la producción mundial de leche), búfalas (11-13%), cabras y ovejas (2-4%), y camella (0,2%). Otras especies como, por ejemplo, el yak, reno, yegua o burra son significativas en determinadas regiones, pero representan menos del 0,1% de la producción mundial (Claeys et al., 2014; Patton, 2011). A este respecto, la denominación genérica de leche se refiere única y exclusivamente a la leche natural de vaca, entendiéndose por leche natural el producto íntegro, no alterado ni adulterado y sin calostros, procedente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas, tal como se define en el capítulo XV del Código Alimentario Español (BOE, 1967). Las leches producidas por las hembras de otros animales domésticos se designan indicando además el nombre de la especie correspondiente: leche de oveja, leche de cabra, etc.

La ubre de la vaca está constituida por cuatro glándulas mamarias o cuartos. Cada glándula mamaria opera independientemente y drena la leche por medio de su propio canal. La glándula mamaria está formada por millones de alveolos donde se sintetiza la leche, dispuestos tal y como se muestra en el esquema de Nickerson y Akers (2011) (**Figura 1**). Los alveolos son las

unidades funcionales de producción formadas por una capa de células epiteliales secretoras de leche, conectados mediante ductos a la cisterna de la glándula, donde se almacena la leche hasta que es secretada a través del canal del pezón (Nickerson y Akers, 2011). Los capilares sanguíneos y las células mioepiteliales (células similares a las musculares) rodean el alveolo. La irrigación sanguínea con pequeños capilares y vénulas aporta al alveolo los nutrientes necesarios para la síntesis de los componentes de la leche (lactosa, proteínas y lípidos), principalmente en el retículo endoplasmático (O'Mahony y Fox, 2014). La leche es secretada y acumulada en el lumen del alveolo entre los ordeños, y cuando las células mioepiteliales que recubren el alveolo se contraen, en respuesta a la acción de algunas hormonas, como la oxitocina y la prolactina, la leche es eyectada hacia la cisterna de la glándula.



**Figura 1.** (A) Esquema de una glándula mamaria bovina: alveolos, ductos, cisterna de la glándula y del pezón, y canal del pezón. (B) Sección transversal de un alveolo: células epiteliales y mioepiteliales, lumen y red capilar (Nickerson y Akers, 2011).

Los principales requerimientos nutricionales del mamífero neonato son: energía (suministrada por los lípidos, lactosa y proteínas lácteas), aminoácidos esenciales y no esenciales (suministrados por las proteínas lácteas), ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales y agua. Dichos requerimientos nutricionales varían entre especies, dependiendo del grado de madurez al nacer, el ritmo de crecimiento, las necesidades energéticas y las condiciones ambientales, entre otros aspectos. Esto explica las diferencias interespecie en la composición de las diferentes leches (Claeys et al., 2014; Skibiél et al., 2013). Además, dentro de cada especie hay variaciones en la composición de la leche debido a factores genéticos (raza, factores individuales,...), fisiológicos (periodo y número de lactación, gestación,...), ambientales (estación, localización,...) y nutricionales (Claeys et al., 2014; Walstra et al., 2006). Tal y como

se puede observar en la **Tabla 1**, las leches de los mamíferos contienen los mismos componentes principales, si bien el contenido de cada uno de ellos varía entre ellas.

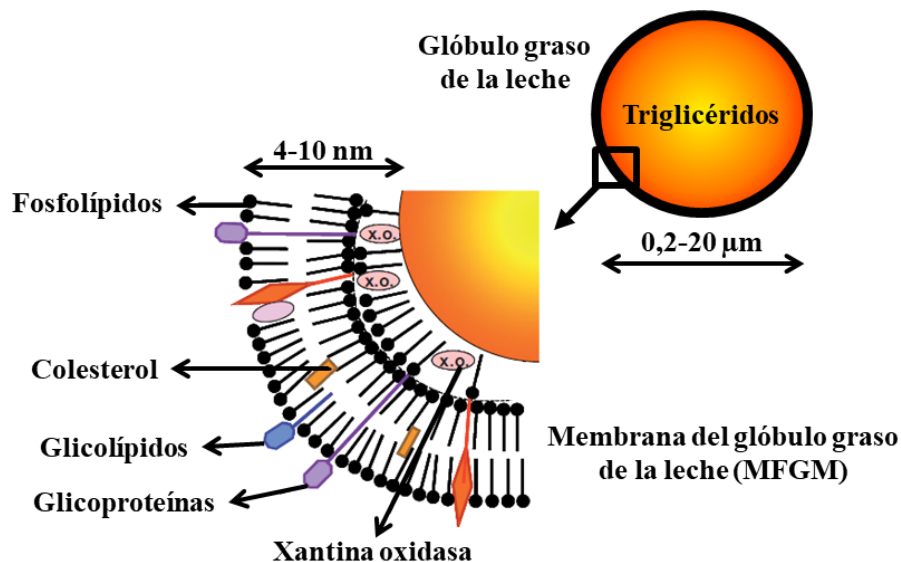
**Tabla 1.** Composición general de la leche definitiva de diversas especies de mamíferos (Aguinaga et al., 2011; Claeys et al., 2014; Park et al., 2010; Park y Haenlein, 2006; Sousa et al., 2014).

Origen	Componente (g/L)				
	Materia seca total	Proteínas	Lípidos	Lactosa	Cenizas
<b>Mujer</b>	107-129	9-19	21-40	63-70	2-3
<b>Yegua</b>	93-116	14-32	3-42	56-72	3-5
<b>Burra</b>	88-117	14-20	3-18	58-74	3-5
<b>Vaca</b>	118-130	30-39	33-54	44-56	7-8
<b>Oveja</b>	181-200	45-70	50-90	41-59	8-10
<b>Cabra</b>	119-163	30-52	30-72	32-50	7-9
<b>Búfala</b>	157-172	27-47	53-90	32-49	8-9
<b>Camella</b>	119-150	24-42	20-60	35-51	7-9
<b>Llama</b>	131	34-43	27-47	59-65	5-9
<b>Cerda</b>	180-206	36-59	55-77	50-63	9-11

Los lípidos de la leche constituyen la fuente principal de energía para el recién nacido. Su contenido en la leche muestra amplias diferencias interespecie, variando entre 3 y 90 g/L. Los lípidos de la leche se pueden agrupar en tres tipos: lípidos neutros (mono, di y triglicéridos), lípidos polares (principalmente fosfolípidos) y otros lípidos (ácidos grasos libres, esteroides, carotenoides y vitaminas liposolubles) (Jensen, 2002; O'Mahony y Fox, 2014). Los triglicéridos constituyen alrededor del 98% del total de lípidos de la leche y son responsables de las principales propiedades de la grasa láctea (hidrofobicidad, densidad, punto de fusión, etc.). Los fosfolípidos, compuestos principalmente por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina, constituyen alrededor del 0,8% del total de lípidos. Los esteroides suponen el 0,3% del total de lípidos, representando el colesterol el 95% del total de esteroides.

Los lípidos de la leche son secretados en forma de glóbulos grasos (Walstra et al., 2006), pequeñas estructuras esféricas que están rodeadas por la membrana del glóbulo graso (MFGM, milk fat globule membrane), tal y como se muestra en la **Figura 2**. Aproximadamente el 99%

de los lípidos de la leche está formando parte de los glóbulos grasos (Lopez, 2011). Como puede observarse, los triglicéridos se localizan en el interior del glóbulo graso, mientras que los fosfolípidos y los esteroides se localizan principalmente en la MFGM (MacGibbon y Taylor, 2006). En el apartado 2.3. del presente documento se detalla el origen y composición de los glóbulos grasos de la leche y de la MFGM.



**Figura 2.** Representación esquemática del glóbulo graso de la leche (Gassi et al., 2008).

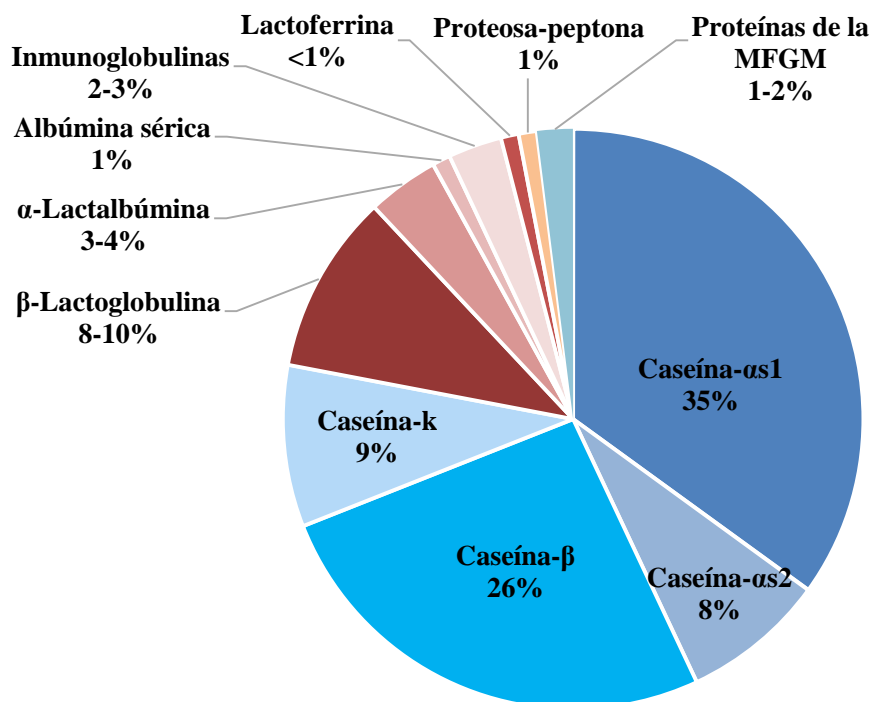
Los carbohidratos de la leche se pueden dividir en tres grandes grupos: lactosa, oligosacáridos y glicoconjugados (glicolípidos y glicoproteínas) (Gopal y Gill, 2000). El principal carbohidrato en la leche de la mayoría de especies es la lactosa, cuyo contenido varía entre 32-74 g/L. Ejerce dos importantes funciones en la leche, como fuente de energía para el neonato (suministra el 30% de las calorías en la leche de vaca) y como responsable del 50% de la presión osmótica de la leche (O'Mahony y Fox, 2014). Además de la lactosa, la leche posee sacáridos libres, principalmente oligosacáridos, cuya concentración, proporción y tipo varía ampliamente entre especies. Así, mientras que la leche humana contiene 130 oligosacáridos distintos, que suponen una concentración total de 15 g/L (Urashima et al., 2001), la leche de otras especies como la bovina, ovina, caprina y equina, presentan contenidos notablemente menores. De hecho, su concentración en la leche bovina madura es de aproximadamente 0,05 g/L, siendo de 0,7-1,2 g/L en el calostro (Tao et al., 2008). Los oligosacáridos presentan importantes funciones biológicas, incluyendo la prevención de la infección de los tractos intestinal y urinario mediante su acción como receptores “señuelo” de agentes patógenos, y su función como prebióticos, promoviendo el crecimiento de bacterias beneficiosas, como *Bifidobacterium bifidus* (Urashima et al., 2001). Además de lactosa y oligosacáridos, la leche

contiene pequeñas cantidades de monosacáridos y glicoconjugados, entre los que cabe destacar la caseína- $\kappa$  y las glicoproteínas altamente glicosiladas y glicolípidos presentes en la MFGM.

El contenido proteico de la leche varía entre 9-70 g/L dependiendo de la especie. Entre las proteínas de la leche se pueden diferenciar tres grandes grupos: proteínas del lactosuero, caseínas y proteínas de la MFGM, que suponen alrededor del 20, 78-80 y 1-2% del total de proteínas lácteas, respectivamente (Farkye y Shah, 2015). Numerosas funciones fisiológicas y biológicas de la leche están desempeñadas por proteínas y péptidos (O'Mahony y Fox, 2014).

## 2.2. Proteínas de la leche bovina

Las proteínas lácteas son una de las principales fuentes proteicas de la dieta, contribuyendo en aproximadamente un 19% a la ingesta proteica diaria media de un adulto europeo (EFSA, 2012), lo que pone de manifiesto su relevancia en la nutrición humana. Entre las proteínas de la leche de vaca se encuentran las caseínas, las proteínas del lactosuero y las proteínas de la MFGM (**Figura 3**) (Holland y Boland, 2014; Madureira et al., 2007).



**Figura 3.** Distribución de proteínas en la leche bovina, representada en porcentaje respecto al total de proteínas de la leche (Farkye y Shah, 2015).

## 2.2.1. Caseínas

### 2.2.1.1. Características de las caseínas

Las caseínas son fosfoproteínas que precipitan a un pH de 4,6 a 30 °C, ya que este pH coincide con su punto isoeléctrico, en el que las caseínas se encuentran en su estado de menor solubilidad debido a la reducción de las repulsiones intermoleculares. Son las proteínas mayoritarias de la leche de vaca, representando entre el 78-80% del total de proteínas de la leche, equivalente a un contenido de 27-34 g/L (Farkye y Shah, 2015). En la leche bovina existen principalmente cuatro tipos de caseínas:  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , cuya proporción es de 4:1:3,5:1,5 (Dalgleish, 2011), y cuyas principales características aparecen reflejadas en la **Tabla 2**.

Existen variaciones considerables en el contenido y características (estructura, fosforilación, glicosilación, etc.) de las caseínas de la leche de distintas especies (Holland y Boland, 2014). Así, aunque la leche de cabra y oveja contiene un 80-85% de caseínas (en relación al total de proteínas lácteas), en la leche humana representan sólo un 30-40% (Park y Haenlein, 2006). Las caseínas y otras proteínas lácteas son secretadas a la fase acuosa de la leche por exocitosis a partir de vesículas formadas en el aparato de Golgi de las células epiteliales de la glándula mamaria (Mather y Keenan, 1998).

**Tabla 2.** Características de las principales caseínas de la leche bovina (Farkye y Shah, 2015; Holland y Boland, 2014; O'Mahony y Fox, 2014).

Caseína	Contenido en leche		% Total caseínas	PM*	pI <sup>†</sup>	% Glicosilación
	% Total	g/L				
$\alpha_{s1}$	35	12-15	35-44	23,6	4,4-5,0	0
$\beta$	26	9-11	25-35	23,9	4,8-5,4	0
$\kappa$	9	3-4	12-15	19,0	3,7-5,5	60
$\alpha_{s2}$	8	3-4	9-10	25,1	5,2-5,4	0

\*PM: peso molecular (kDa); <sup>†</sup>pI: punto isoeléctrico.

La secuencia aminoacídica de las caseínas contiene un número inusual de residuos del aminoácido prolina. Como resultado, las caseínas son relativamente hidrofóbicas y carecen de una estructura secundaria y terciaria bien definida. Desde el punto de vista estructural, la

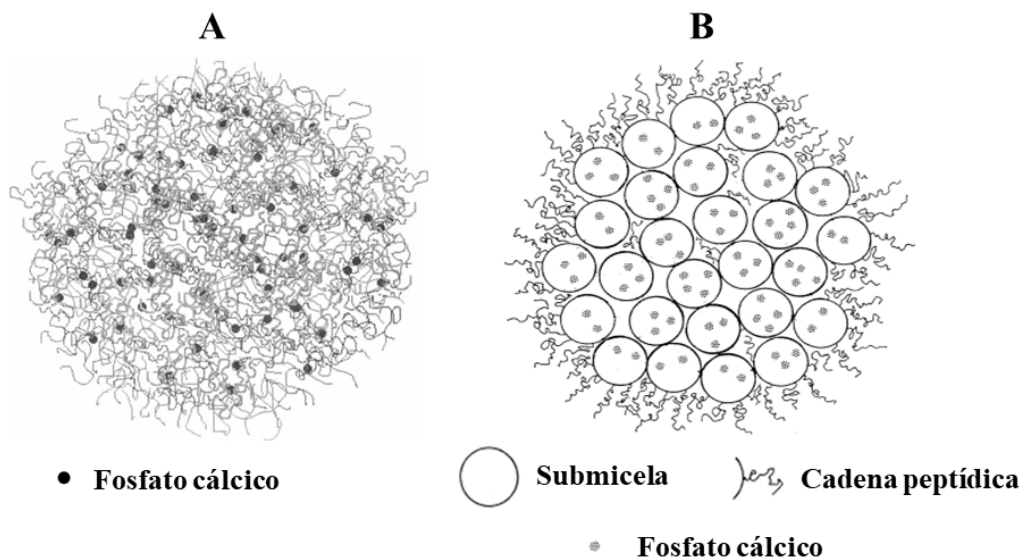
caseína- $\alpha_{s1}$  está formada por tres regiones hidrofóbicas y una zona muy polar en la que se encuentran todos los grupos fosfato menos uno (Restani et al., 2009; Swaisgood, 2003).

La caseína- $\beta$  es la más hidrofóbica de todas las caseínas con una estructura dividida en dos regiones, la que corresponde al extremo C-terminal que es particularmente hidrofóbica, y la que corresponde al extremo N-terminal, en la que se concentran los aminoácidos más hidrofílicos y todos los fosfatos unidos a residuos de serina (Kumosinski et al., 1993).

La caseína- $\alpha_{s2}$  es la más hidrofílica, con tres regiones de carga negativa, una de ellas en el extremo N-terminal. En la zona del extremo C-terminal se sitúan aminoácidos hidrofóbicos con carga neta positiva. Su estructura y sus propiedades físicas son extremadamente dependientes de la fuerza iónica y de la concentración de cationes como el calcio (Swaisgood, 2003).

La caseína- $\kappa$ , igual que la caseína- $\beta$ , posee zonas predominantemente hidrofílicas e hidrofóbicas, bien definidas y separadas (Holland y Boland, 2014). La caseína- $\kappa$  es hidrolizada fácilmente por la quimosina al pH de la leche, dando lugar al fragmento N-terminal denominado para- $\kappa$ -caseína, que es fundamentalmente hidrofóbico y que queda unido a las otras caseínas en la micela, y al fragmento C-terminal denominado glicomacropéptido, que posee glicanos en su estructura y que queda en solución debido a su carácter hidrofílico (Farrell et al., 2004). La caseína- $\kappa$  es de especial interés en la industria quesera, debido a que la para- $\kappa$ -caseína reacciona con el calcio generando paracaseinato de calcio. Durante la maduración del queso, y a partir de la para- $\kappa$ -caseína, se forma un tipo de macropéptidos denominados caseínas- $\gamma$ , responsables de las características reológicas y organolépticas de los quesos (Walstra et al., 2006).

En la leche, las caseínas se encuentran formando agregados coloidales, de 60-450 nm de tamaño, denominados micelas de caseína (**Figura 4**). Las micelas están constituidas principalmente por caseínas y fosfato cálcico coloidal, que es crucial en el mantenimiento de la estructura micelar (Walstra et al., 2006). Existen multitud de modelos diferentes para la estructura de la micela de caseína (Horne, 2014). Según el modelo más aceptado, las micelas están formadas por la agregación de partículas de menor tamaño (10-20 nm de diámetro) denominadas submicelas, unidas entre sí a través de puentes de fosfato cálcico y por interacciones hidrofóbicas. Las submicelas estarían formadas a partir de la interacción constante entre las caseínas- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$  mediante enlaces hidrofóbicos, ejerciendo la caseína- $\kappa$  un papel estabilizante (Farrell et al., 2004).



**Figura 4.** Esquema de la organización de las micelas de caseína. (A) Modelo que representa la micela de caseína como una matriz proteica homogénea conteniendo partículas de fosfato cálcico. (B) Modelo que propone que las micelas están formadas por submicelas unidas entre sí a través de puentes de fosfato cálcico y por interacciones hidrofóbicas (De Kruif y Holt, 2003; Walstra, 1999).

#### 2.2.1.2. Funciones de las caseínas

La principal función de las caseínas lácteas es nutrir al recién nacido, aportándole principalmente aminoácidos, calcio y fósforo. Además, la estructura de las micelas de caseína tiene un papel determinante en las propiedades físicas y reológicas de la leche y de los productos lácteos (como queso y yogurt), siendo también responsables de su estabilidad durante el tratamiento térmico y almacenamiento (Walstra et al., 2006).

A las caseínas se les han atribuido diversas funciones biológicas, asociadas en algunos casos a péptidos bioactivos generados tras la degradación enzimática (este aspecto se detalla en el apartado 2.2.3). Así, se les ha atribuido actividad antibacteriana (Lahov y Regelson, 1996), antivírica (Inagaki et al., 2014; Ng et al., 2015), antioxidante (Cervato et al., 1999), antimutágena (van Boekel et al., 1993), hipocolesterolémica (Chin-Dusting et al., 2006), saciante (Hall et al., 2003), antihipertensiva e inmunestimuladora (Korhonen y Pihlanto, 2006).

#### 2.2.2. Proteínas del lactosuero

El lactosuero está formado por un grupo de proteínas que permanecen solubles tras la precipitación ácida de las caseínas, a pH 4,6 (Farkye y Shah, 2015). La leche de vaca contiene



entre un 0,6-1% de proteínas séricas, que representan el 20% del total de proteínas lácteas, si bien su concentración depende de factores como el tipo de lactosuero (ácido o dulce), la fase de la lactación, la alimentación, la época del año y la especie (Edwards y Jameson, 2014).

Entre las proteínas mayoritarias del lactosuero se encuentran la  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG), la  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA), las inmunoglobulinas (Igs), la fracción proteosa-peptona (PPT) y la albúmina sérica (SA). El lactosuero contiene, además, lactoferrina (LF), lactoperoxidasa (LPOX) y otras proteínas minoritarias. En la **Tabla 3** se presenta el contenido y algunas características de las principales proteínas del lactosuero bovino.

**Tabla 3.** Características de las principales proteínas del lactosuero bovino (Farkye y Shah, 2015; O’Riordan et al., 2014; Ryan y Walsh, 2016; Yadav et al., 2015).

Proteína	Contenido en leche		% Total lactosuero	PM*	pI <sup>†</sup>	% Glicosilación
	% Total	g/L				
<b><math>\beta</math>-LG</b>	8-10	3,2-4	40-58	18,3	5,3-5,5	0
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	3-4	1,2-1,5	11-25	14,1	4,2-4,5	3-10
<b>Total Igs</b>	2-3	0,5-1	8-10	150-1000	4,5-8,3	2,6-12
<b>IgG</b>	1,2-1,7	0,5-0,7	6,4-8	150-163	6,5-8,3	2,6-3,1
<b>IgM</b>	0,1	0,04-0,05	ND	900-1000	4,5-6,5	10-12
<b>IgA</b>	0,1-0,2	0,04-0,1	ND	385-430	4,5-6,5	6-10
<b>PPT</b>	1	0,5-3	10	4-28	ND	17 (PP3)
<b>SA</b>	1	0,1-0,6	5-10	66,4	5,1	0
<b>LF</b>	0,05-0,7	0,02-0,3	1-2	76,5-80	9,5-10	6,7-11,2
<b>LPOX</b>	0,02-0,07	0,01-0,03	0,5	77,5-78	9,0-10	6,4-11,5

\*PM: peso molecular (kDa); <sup>†</sup>pI: punto isoeléctrico; ND: no se han encontrado datos publicados.

### 2.2.2.1. $\beta$ -lactoglobulina

La  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG) es la proteína mayoritaria del lactosuero de los rumiantes, si bien no está presente en la leche humana. Se trata de una proteína globular que suele encontrarse formando dímeros de dos subunidades idénticas unidas de forma no covalente, estando cada monómero formado por 162 aminoácidos, un grupo sulfhidrilo y dos puentes disulfuro (O’Mahony y Fox, 2014), y una estructura característica en forma de barril aplanado

(Kontopidis et al., 2004). Su solubilidad es baja, y depende ampliamente del pH y de la fuerza iónica del medio (Hernández-Ledesma et al., 2011).

La  $\beta$ -LG supone una notable fuente de aminoácidos ricos en cisteína, importante para el desarrollo muscular del recién nacido (de Wit, 1998; Kontopidis et al., 2004). Además, dado que pertenece a la familia de las lipocalinas, entre las funciones biológicas descritas para esta proteína cabe destacar su capacidad de unión a moléculas hidrofóbicas. De hecho, se le ha atribuido la capacidad de unir y transportar lípidos, ácidos grasos, colesterol y vitaminas liposolubles, como la D y la A (Kushibiki et al., 2001; Madureira et al., 2007). Además, la  $\beta$ -LG facilita la digestión de los lípidos lácteos en los recién nacidos (Pérez y Calvo, 1995), participa en la transferencia de inmunidad pasiva y en el metabolismo del fósforo en la glándula mamaria (Le Maux et al., 2014), y posee actividad frente a algunos virus (Ng et al., 2015). La  $\beta$ -LG es, a su vez, fuente de péptidos bioactivos (Meisel, 2005), cuyas propiedades se incluyen en el apartado 2.2.3.

Aparte de las funciones biológicas, se le han atribuido diversas propiedades tecnológicas, como la mejora de las propiedades emulsionantes, la estabilidad, la viscosidad y la capacidad gelificante de los productos lácteos (Euston et al., 1999; Yadav et al., 2015).

#### **2.2.2.2. $\alpha$ -lactalbúmina**

La  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA) es la segunda proteína más abundante del lactosuero de la mayoría de los rumiantes, siendo la mayoritaria en el lactosuero humano (ver apartado 2.6.1). Se trata de una proteína globular pequeña compuesta por una única cadena polipeptídica de 123 aminoácidos, conteniendo ocho residuos de cisteína, cuatro de triptófano y una alta proporción de aminoácidos esenciales (Hernández-Ledesma et al., 2011; Markus et al., 2002). La estructura de la  $\alpha$ -LA está estabilizada por cuatro puentes disulfuro y por un ión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que une los dos dominios de la proteína: uno grande formado por hélices  $\alpha$  y otro pequeño formado por hojas  $\beta$  (Permyakov y Berliner, 2000; Pettersson-Kastberg et al., 2009). Además del ión  $\text{Ca}^{2+}$ , la  $\alpha$ -LA es capaz de unir otros cationes como  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , e incluso contiene sitios de unión de  $\text{Zn}^{2+}$  (Noyelle y Van Dael, 2002).

La  $\alpha$ -LA es una de las proteínas lácteas más estudiadas, puesto que posee propiedades que contribuyen significativamente a las características físicas, biológicas y nutricionales de la leche (Barbana y Pérez, 2011). Es sintetizada en la glándula mamaria durante la lactogénesis y participa activamente en la síntesis de lactosa modulando la actividad del enzima galactosiltransferasa (Permyakov y Berliner, 2000). La  $\alpha$ -LA tiene especial interés como nutracéutico y suplemento de fórmulas infantiles debido a su riqueza en los aminoácidos esenciales lisina, cisteína y triptófano, con beneficios para el desarrollo cognitivo, el estado de

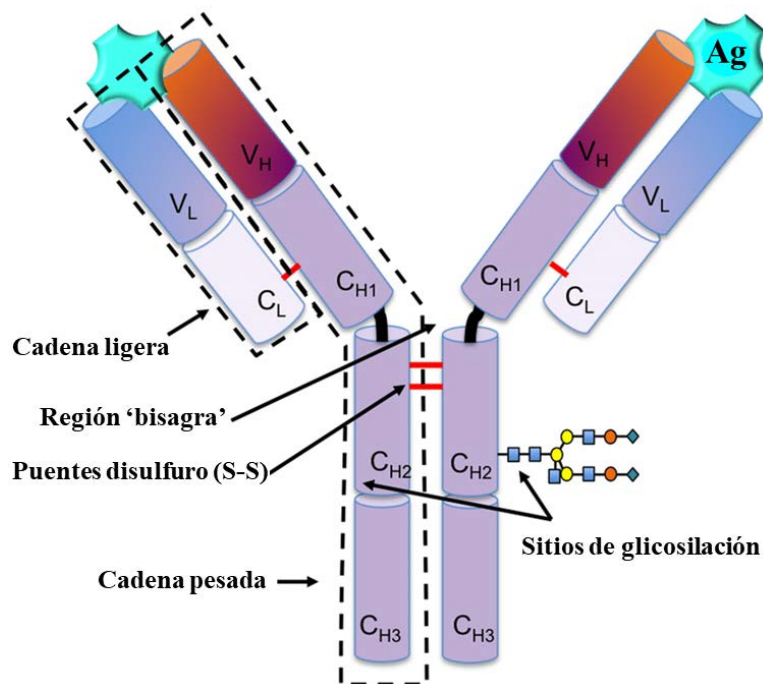
ánimo, el sistema inmunitario y la cicatrización (Heine et al., 1991; Stanciuc y Râpeanu, 2010). Además, también se le han atribuido otras funciones como actividad antitumoral (Pettersson-Kastberg et al., 2009; Rammer et al., 2010), antioxidante (Clausen et al., 2009) y antibacteriana (Stanciuc y Râpeanu, 2010). Por otro lado, los péptidos resultantes de la hidrólisis de la  $\alpha$ -LA poseen múltiples actividades biológicas (Meisel, 2005; Sedaghati et al., 2014) (apartado 2.2.3).

### 2.2.2.3. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Igs) constituyen un grupo complejo de proteínas producidas por los linfocitos B, que se encuentran en el suero sanguíneo y en la mayoría de secreciones de los mamíferos (El-Loly, 2007; Korhonen et al., 2000). El contenido de Igs es muy elevado en el calostro (4-50 g/L), descendiendo rápidamente a las 24-48 h postparto hasta una concentración de 0,5-1 g/L en la leche definitiva bovina (Stelwagen et al., 2009). Las Igs se dividen básicamente en 3 tipos: IgG, IgA e IgM, siendo la primera la predominante en la leche bovina, representando un 80% (p/p) del total (de Wit, 1998; Madureira et al., 2007).

En términos de estructura, las Igs pueden presentarse en forma monomérica (IgG) o polimérica (IgA e IgM) (Mollea et al., 2013). El monómero consiste en dos cadenas ligeras (25 kDa) y dos cadenas pesadas (50-70 kDa) idénticas entre sí, unidas mediante puentes disulfuro (Edwards y Jameson, 2014; Korhonen et al., 2000). Tal y como se muestra en la **Figura 5**, las cadenas ligeras presentan una región variable ( $V_L$ ) y una región constante ( $C_L$ ), mientras que las cadenas pesadas contienen una región variable ( $V_H$ ) unida a tres regiones constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Los dos sitios de unión a los antígenos (Ag) están formados por la parte N-terminal de una cadena ligera y una cadena pesada. Solo la cadena pesada está glicosilada (Murphy et al., 2016).

La principal función de las Igs es la transferencia de inmunidad pasiva al recién nacido, protegiéndolo de numerosas enfermedades (Mollea et al., 2013; Yadav et al., 2015). En los rumiantes la inmunidad pasiva se transfiere por vía calostrual, a diferencia de los humanos, que la recibimos por vía placentaria. La inmunización de vacas con diversos patógenos (bacterias y virus) ha permitido obtener calostros con altos niveles de inmunoglobulinas específicas frente a los antígenos inoculados (Hurley y Theil, 2011; Madureira et al., 2007), y su uso en estrategias terapéuticas (Sarker et al., 1998). Las Igs presentan también otras actividades, como la capacidad de aglutinación de bacterias, neutralización de toxinas, inactivación de virus, opsonización y actividad hipocolesterolemica (El-Loly, 2007; Krissansen, 2007).



**Figura 5.** Estructura de una molécula de IgG (Murphy et al., 2016).

#### 2.2.2.4. Fracción proteosa-peptona

La fracción proteosa-peptona (PPT) se define como la fracción proteica de la leche que resiste y permanece soluble tras un tratamiento térmico de 95 °C durante 20 min en condiciones ácidas (pH 4,6-4,7) (Innocente et al., 2011). La fracción PPT está formada por al menos 38 componentes, una mezcla compleja de glicoproteínas, fosfoproteínas y péptidos, que se pueden dividir en dos grupos. En el primer grupo se incluyen los componentes 5, 8-lento y 8-rápido, derivados de la caseína- $\beta$  tras proteólisis por enzimas endógenas de la leche, principalmente plasmina (Krissansen, 2007). El segundo grupo comprende diferentes glicoproteínas y componentes hidrofóbicos, siendo el componente 3 (PP3, proteose-peptone component 3) o lactoforina, el mayoritario (Innocente et al., 1998). Dado que la PP3 parece derivar de la MFGM (Sørensen et al., 1997), se incluye una revisión más detallada en el apartado 2.3.4.6.

Se sabe que la fracción PPT tiene actividad prebiótica para la bacteria láctica *Bifidobacterium animalis*, con importancia en los productos lácteos fermentados (Etienne et al., 1994; Sørensen y Petersen, 1993). Además, se ha demostrado la capacidad de las glicoproteínas de la fracción PPT bovina para unirse a enterotoxinas (Shida et al., 1994). No obstante, el mayor interés se deriva de las propiedades tensoactivas que se le han atribuido a dicha fracción. Así, diversos estudios han demostrado que sus propiedades como emulsificante (Innocente et al., 1999; Karamoko et al., 2016) y espumante (Buccioni et al., 2013; Karamoko et al., 2013) hacen que esta fracción tenga interés como ingrediente funcional en productos que requieren de una

emulsión o una espuma estable, como es el caso de los helados (Innocente et al., 2002) o de la nata recombinada (Vanderghem et al., 2007).

#### **2.2.2.5. Albúmina sérica**

La albúmina sérica (SA, serum albumin) representa el 5-6% del total de proteínas del lactosuero bovino, porcentaje similar al que existe en el lactosuero humano (Madureira et al., 2007). Es sintetizada en el hígado y transferida a la leche vía torrente sanguíneo, donde se encuentra en concentración similar a la de la leche. Está formada por una única cadena polipeptídica de 528 aminoácidos, con 35 residuos de cisteína, un grupo tiol libre y 17 puentes disulfuro (Huang et al., 2004).

En el plasma sanguíneo, la SA contribuye casi al 80% de la presión osmótica coloidal. Además, gracias a su tamaño y estructura, presenta la capacidad de unirse reversiblemente y transportar diversas moléculas en el torrente sanguíneo, como lípidos, ácidos grasos, aminoácidos, bilirrubina, hormonas, fármacos y algunos iones como el zinc o el cobre (Huang et al., 2004; Majorek et al., 2012). Por otro lado, la SA constituye una importante fuente de aminoácidos esenciales con relevancia nutricional (Mollea et al., 2013). Además, se le han atribuido otras funciones biológicas como la de inhibir el crecimiento de células tumorales (Wu et al., 2017), tener actividad antioxidante (Li et al., 2014; Wang et al., 2007) y ser fuente de péptidos bioactivos (Meisel, 2005) (ver apartado 2.2.3).

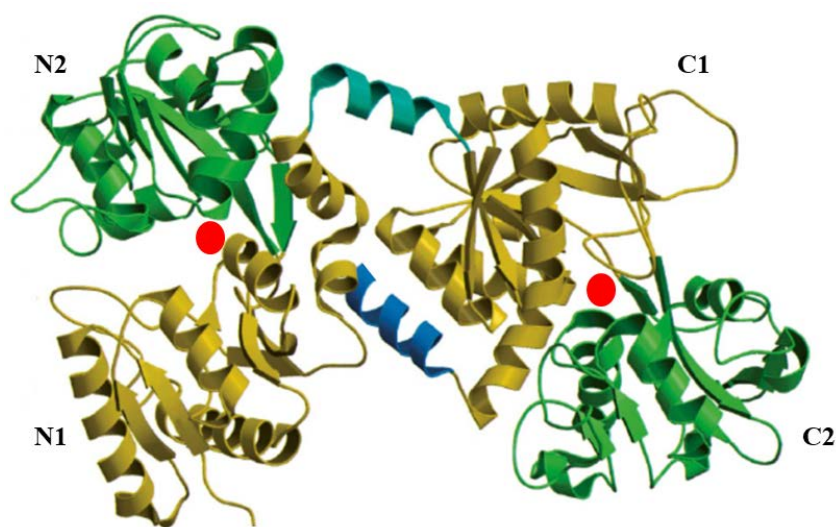
#### **2.2.2.6. Lactoferrina**

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína de la familia de las transferrinas, que tienen la capacidad de unir, de forma reversible, dos átomos de ión férrico (Mayeur et al., 2016). La LF es producida por las células epiteliales de las mucosas en numerosas especies de mamíferos, incluyendo el ser humano, la vaca, la oveja, el camello y el cerdo. Se encuentra en secreciones mucosas como las lágrimas, la saliva, los fluidos vaginales, el semen, el jugo pancreático, las secreciones nasales y bronquiales, la placenta, el calostro y la leche (García-Montoya et al., 2012). La concentración de LF depende del periodo de lactación, siendo en el calostro bovino de alrededor de 1 g/L, y en la leche definitiva de 0,02-0,3 g/L (Sánchez et al., 1988).

La LF está formada por una cadena polipeptídica simple de 700 aminoácidos, conteniendo de 2 a 5 sitios de glicosilación según la especie (Wei et al., 2000). Su estructura está organizada en dos lóbulos, el lóbulo N (extremo N-terminal) y el lóbulo C (extremo C-terminal), cada uno dividido en dos dominios (Bokkhim et al., 2013; Mayeur et al., 2016). Como puede observarse en la **Figura 6**, cada lóbulo presenta un sitio de unión para el hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), localizado en una

hendidura entre los dos dominios (Vogel, 2012). A pesar de las diferencias en lo que respecta a grado y tipo de glicosilación, existe gran homología entre las LFs de distintas especies (González-Chávez et al., 2009).

La LF es la proteína del lactosuero más interesante desde el punto de vista biomédico, debido a las numerosas propiedades biológicas que se le atribuyen, tanto *in vitro* como *in vivo* (García-Montoya et al., 2012), motivo por el cual en países asiáticos, como Japón, se ha utilizado desde los años 90 del siglo pasado como ingrediente funcional en determinados productos como leches infantiles, yogures y bebidas. En Europa, sin embargo, no fue hasta el año 2012 cuando se autorizó su uso en alimentos y se establecieron los niveles permitidos (Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE, 2012). Entre las actividades biológicas que posee la LF, destaca su capacidad antimicrobiana frente a una gran variedad de microorganismos, entre ellos bacterias, virus, hongos y parásitos (Giansanti et al., 2016; Rosa et al., 2017).



**Figura 6.** Estructura cristalina de la LF bovina. El lóbulo N (izquierda) y el lóbulo C (derecha) están divididos en cuatro dominios: N1, N2, C1 y C2. Las esferas de color rojo representan los iones férricos en sus sitios de unión (Rosa et al., 2017).

La actividad antibacteriana ha sido evidenciada tanto frente a bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (Del Olmo et al., 2012; Harouna et al., 2015; Ripollés et al., 2015) y se atribuye principalmente a dos mecanismos. Por un lado, bacteriostático, por su capacidad para secuestrar el hierro, que es un nutriente esencial para el desarrollo bacteriano y, por otro lado, bactericida, debido a su capacidad de interactuar con componentes de la pared bacteriana, desestabilizándola y afectando a su viabilidad (González-Chávez et al., 2009). La LF posee también actividad antivírica demostrada frente a virus con y sin envoltura, como el citomegalovirus, herpes, VIH, hepatitis B, gripe y rotavirus. Si bien en este caso, los mecanismos de acción son menos claros y están más relacionados con la interacción de la LF

con las células hospedadoras o el virus, que con la quelación del hierro (Berlutti et al., 2011; Ng et al., 2015). A la LF también se le han atribuido propiedades antitumorales, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, probióticas y de proliferación celular (Cornish et al., 2004; Wakabayashi et al., 2006), algunas de las cuales se asocian a los péptidos bioactivos generados tras su hidrólisis (Bruni et al., 2016) (ver apartado 2.2.3).

#### **2.2.2.7. Lactoperoxidasa**

La lactoperoxidasa (LPOX) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las peroxidases, y está presente en multitud de secreciones como lágrimas, saliva y leche. Consiste en un cadena polipeptídica simple de 612 aminoácidos que contiene 15 residuos de cisteína (Watanabe et al., 2000).

La LPOX es parte importante del mecanismo natural de defensa de los mamíferos, que proporciona protección frente a microorganismos y virus (Hernández-Ledesma et al., 2011). El sistema de defensa ocurre de manera natural en la leche y está compuesto por la LPOX, el anión tiocianato y el peróxido de hidrógeno. La LPOX cataliza la oxidación del tiocianato por el peróxido, generándose productos intermedios con un amplio espectro de efectos antimicrobianos frente a bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas), virus y hongos, con aplicación en la industria láctea para la conservación de queso y yogurt (Seifu et al., 2005; Touch et al., 2004). Por otra parte, se ha demostrado que la LPOX actúa también regulando la expresión de genes relacionados con el metabolismo, la inmunidad, la apoptosis y el desarrollo de las células epiteliales intestinales (Mollea et al., 2013; Wakabayashi et al., 2007).

#### **2.2.2.8. Otras proteínas y péptidos del lactosuero**

Otra proteína minoritaria importante del lactosuero es la lisozima (LYZ). Se trata de una molécula compuesta por una cadena polipeptídica de 130 aminoácidos (14 kDa) que se encuentra ampliamente distribuida en los fluidos corporales, como las lágrimas, saliva, sangre y leche de prácticamente todos los mamíferos. Su concentración varía en función de diversos factores como la etapa de lactancia, la nutrición, la salud, la estación y la especie, presentando la leche de los rumiantes niveles bajos de esta proteína (0,05-0,2 mg/L), en comparación con la leche humana (200-400 mg/L) (Benkerroum, 2008). Se ha demostrado que la LYZ tiene actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana, mayoritariamente frente a bacterias Gram-positivas, en las que causa la ruptura del enlace  $\beta$ -(1,4) entre el ácido N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina del peptidoglicano de su pared celular (Ibrahim et al., 2002).

Aunque el glicomacropéptido (GMP), también conocido como caseinomacropéptido, no es un componente natural del lactosuero, pasa a formar parte del mismo tras liberarse de la caseína- $\kappa$ . El GMP es un polipéptido de 64 aminoácidos (6,8 kDa) que forma parte de la caseína- $\kappa$  de la leche y que se libera al lactosuero durante la elaboración de queso, por acción de enzimas coagulantes como la quimosina (Yadav et al., 2015). La ausencia de residuos de fenilalanina, triptófano, tirosina, histidina, arginina y cisteína en la molécula de GMP, así como su riqueza en valina e isoleucina, convierten a esta proteína en un ingrediente muy valioso para pacientes con problemas hepáticos y/o fenilketonuria (Krissansen, 2007). Además, se ha demostrado que el GMP es capaz de interactuar con toxinas, virus y bacterias por medio de su región glicosilada (alrededor del 60%), previniendo su unión a células (Thomä-Worringer et al., 2006). También se le ha atribuido actividad inmunomoduladora, prebiótica y de protección frente a la caries dental (Hernández-Ledesma et al., 2011).

### 2.2.3. Péptidos bioactivos

La leche es considerada como uno de los alimentos con mayor número de proteínas capaces de generar péptidos activos, que son fragmentos que ejercen una influencia positiva en las funciones corporales, con un beneficio final para la salud (Yadav et al., 2015). Los péptidos con actividad biológica, inactivos en la proteína nativa, pueden ser liberados por acción de enzimas proteolíticas gastrointestinales o enzimas de determinados microorganismos o plantas, y su actividad depende de la secuencia aminoacídica y tamaño, que varía de 2 a 20 residuos (Korhonen, 2009).

Los péptidos procedentes de proteínas lácteas pueden actuar *in vitro* e *in vivo* en los sistemas cardiovascular, nervioso, gastrointestinal e inmune, en los que ejercen diferentes actividades, entre las que destacan la actividad antibacteriana, antivírica, antioxidante, antihipertensiva y opioide (López-Expósito y Recio, 2008; Park y Nam, 2015). En la **Tabla 4** se muestran los principales péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas y sus funciones biológicas más relevantes.

Actualmente, se están empleando diferentes tecnologías, principalmente ultrafiltración y nanofiltración, en la producción de estos péptidos a escala industrial para su utilización en alimentos funcionales. De hecho, ya existen en el mercado algunos productos que contienen péptidos de origen lácteo, entre los que se incluyen bebidas, productos de confitería y chicles (Korhonen y Pihlanto, 2006).



**Tabla 4.** Origen, secuencia y actividad biológica de los péptidos derivados de proteínas lácteas más relevantes (Brandelli et al., 2015; Korhonen y Pihlanto, 2006; López-Expósito y Recio, 2008; Yadav et al., 2015).

Origen	Fragmentos	Bioactividad
<b>Caseína-<math>\alpha</math>1</b>	f(1-23) ( <b>Isracidina</b> ), f(99-109)	Antibacteriana
	f(23-34), f(142-147), f(157-164), f(194-199)	Antihipertensiva
	f(144-149)	Antioxidante
	f(144-148), f(144-149)	Opioide
<b>Caseína-<math>\alpha</math>2</b>	f(165-203) ( <b>Casocidina-I</b> ), f(183-207), f(164-179)	Antibacteriana
	f(25-32), f(81-89), f(92-98), f(174-181), f(182-184)	Antihipertensiva
	f(1-32)	Inmunomoduladora
<b>Caseína-<math>\beta</math></b>	f(47-51), f(108-113), f(177-183), f(193-198)	Antihipertensiva
	f(98-105), f(169-176), f(170-176), f(177-183)	Antioxidante
	f(1-28), f(193-209)	Inmunomoduladora
<b>Caseína-<math>\kappa</math></b>	f(1-3), f(17-21), f(22-24), f(18-24), f(30-32), f(146-149)	Antibacteriana
	f(18-24), f(28-30), f(25-34), f(35-41)	Antihipertensiva
	f(106-116)	Antitrombótica
<b><math>\beta</math>-LG</b>	f(15-20), f(78-83), f(25-40), f(92-100)	Antibacteriana
	f(142-148), f(78-80) ( <b><math>\beta</math>-lactosina</b> )	Antihipertensiva
	f(58-61), f(95-101)	Antioxidante
	f(71-75), f(146-149) ( <b><math>\beta</math>-lactotensina</b> )	Hipocolesterolémica
	f(102-105) ( <b><math>\beta</math>-lactorfina</b> )	Opioide
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	f(1-5), f(17-31)S-S(109-114), f(61-68)S-S(78-80)	Antibacteriana
	f(50-53) ( <b><math>\alpha</math>-lactorfina</b> ), f(105-110)	Antihipertensiva
	f(101-104), f(115-118)	Antioxidante
	f(50-53)	Opioide
<b>SA</b>	f(208-216) ( <b>Albutensina A</b> ), f(221-222)	Antihipertensiva
	f(208-216)	Contracción íleon
	f(399-404) ( <b>Serorfina</b> )	Opioide
<b>LF</b>	f(17-41) ( <b>Lactoferricina</b> ), f(268-284) ( <b>Lactoferrampina</b> )	Antibacteriana
	f(1-13), f(17-38), f(1-16)S-S(45-48)	Anticancerígena
	f(17-41), f(268-284)	Antifúngica
	f(133-136), f(232-280), f(266-270)	Antihipertensiva
	f(17-41)	Antiparasitaria
	f(17-41)	Antivírica

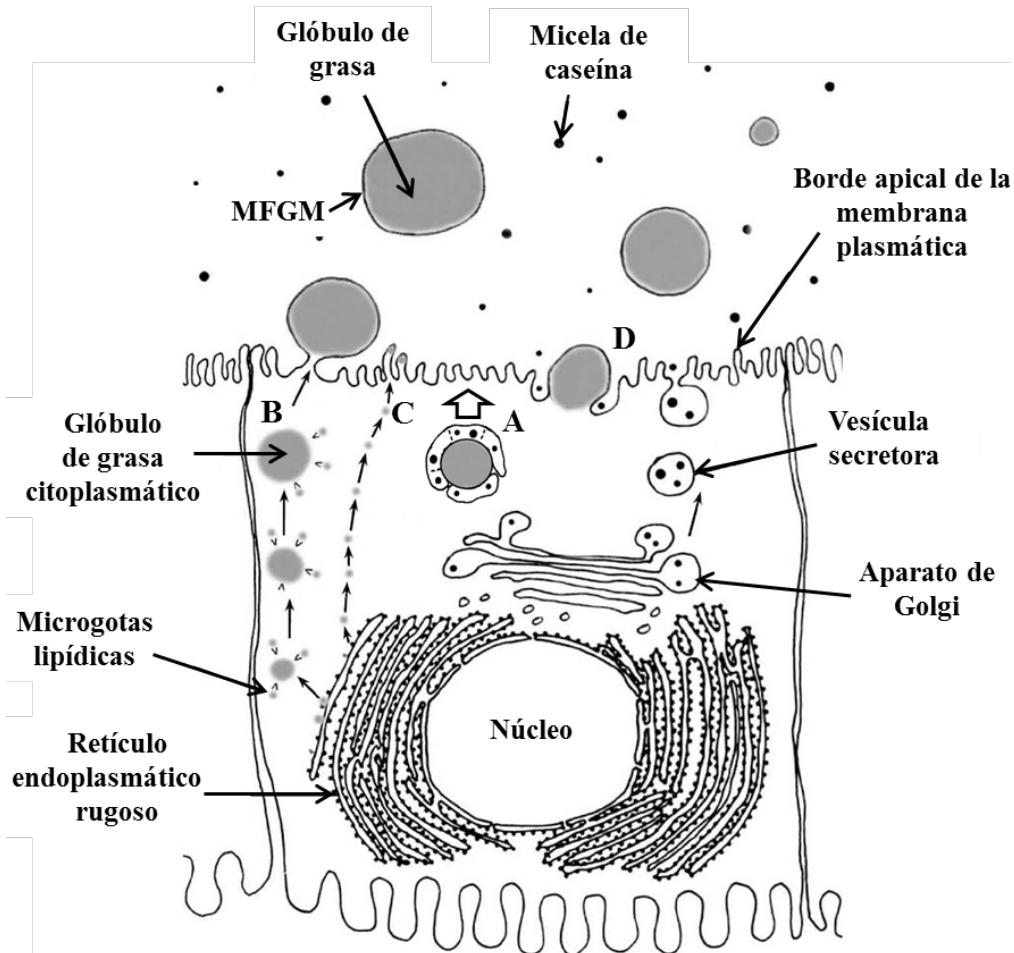
## 2.3. Membrana del glóbulo graso de la leche

La membrana del glóbulo graso de la leche (MFGM, milk fat globule membrane) rodea los glóbulos de grasa, permitiendo su dispersión en la fase acuosa de la leche. La MFGM es secretada por las células epiteliales de la glándula mamaria y consiste en una mezcla compleja de glicoproteínas, enzimas, lípidos neutros y lípidos polares (Fong et al., 2007). A continuación se incluye una revisión del origen, composición, estructura y principales funciones de la MFGM.

### 2.3.1. Origen

La naturaleza de la MFGM se entiende si atendemos al origen y secreción de los glóbulos grasos en las células epiteliales de la glándula mamaria. El núcleo de los glóbulos grasos está compuesto por triglicéridos sintetizados en el retículo endoplasmático rugoso de las células epiteliales de la glándula mamaria. Cuando los triglicéridos son liberados al citoplasma celular en forma de microgotas lipídicas (diámetro 0,5-2  $\mu\text{m}$ ), estas quedan recubiertas de una monocapa de lípidos polares y proteínas procedentes de la membrana del retículo endoplasmático rugoso. Una vez en el citoplasma, las microgotas lipídicas van creciendo mediante la fusión con otras microgotas, dando lugar a glóbulos grasos citoplasmáticos de hasta 8  $\mu\text{m}$  de diámetro (Hintze et al., 2011; Lopez, 2011).

Se han propuesto tres mecanismos diferentes para la secreción de los glóbulos grasos desde el citoplasma de las células epiteliales de la glándula mamaria, incluidos en el esquema realizado por Mather y Keenan (1998) (**Figura 7**). En el primer mecanismo (A) la liberación de los glóbulos grasos ocurriría por exocitosis mediante vesículas intracitoplasmáticas formadas tanto por glóbulos grasos como por micelas de caseína. El segundo mecanismo consistiría en la envoltura de los glóbulos de grasa citoplasmáticos (B) o de las microgotas lipídicas (C) por parte de la membrana plasmática de la célula, y su posterior secreción al exterior ya envueltos por parte de esta membrana. El tercer mecanismo de secreción (D) sería una combinación de los dos anteriores (Mather y Keenan, 1998). Estudios recientes han revelado la presencia de ciertos componentes tanto en la MFGM como en la membrana plasmática de las células de la glándula mamaria, que apuntan al segundo mecanismo como el más probable (Gallier et al., 2014; Lopez, 2011). Así, como resultado de este mecanismo, los glóbulos de grasa se recubren con tres capas que conforman la MFGM (2-6% del total de la masa del glóbulo): una monocapa compuesta por lípidos polares y proteínas originarias del retículo endoplasmático, una capa proteínica densa y una bicapa lipídica originaria del borde apical de la membrana plasmática de las células de la glándula mamaria (Hintze et al., 2011).



**Figura 7.** Mecanismos de secreción de los glóbulos grasos por las células epiteliales de la glándula mamaria (Mather y Keenan, 1998).

### 2.3.2. Composición

La composición general de la MFGM de la leche de vaca se muestra en la **Tabla 5**. Las proteínas de la MFGM representan del 22 al 70% del total de sus componentes y alrededor del 1-2% del total de proteínas de la leche (Riccio, 2004). Se han descrito alrededor de 120 proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 12 y 280 kDa, a las que se atribuyen importantes funciones biológicas (Mather, 2000). Entre las proteínas más abundantes de la MFGM, algunas son glicoproteínas como la butirofilina (BTN o PAS5), la lactadherina (LDH o PAS6/7), la mucina 1 (MUC1 o PAS1), la mucina 15 (MUC15 o PAS3), el clúster de diferenciación 36 (CD36 o PAS4) y el componente 3 de la proteosa-peptona (PP3 o lactoforina). El nombre 'PAS' dado a las glicoproteínas se debe a que reaccionan con el reactivo PAS (periodic acid Schiff) debido a su glicosilación. En general, las proteínas de la MFGM bovina contienen predominantemente O-glicanos mono y di-sialilados, y N-glicanos ricos en manosa (O'Riordan et al., 2014; Wilson et al., 2008). La adipofilina (ADPH), la xantina oxidasa (XOD)

y la proteína fijadora de ácidos grasos (FABP, fatty acid binding protein) son, en cambio, proteínas no glicosiladas (Dewettinck et al., 2008; Rasmussen, 2009; Ross et al., 2015). Las principales características de las proteínas de la MFGM se describen en el apartado 2.3.4.

**Tabla 5.** Composición general de la membrana del glóbulo graso de la leche de vaca (El-Loly, 2011; Fong et al., 2007; Jiménez-Flores y Brisson, 2008; Walstra et al., 2006).

<b>Componente</b>	<b>% (p/p) MFGM</b>
<b>Proteínas*</b>	22-70
<b>Lípidos</b>	71,8
<b>Fosfolípidos</b>	25
<b>Cerebrósidos</b>	3
<b>Colesterol</b>	2
<b>Lípidos de la MFGM</b>	<b>% (p/p) total lípidos</b>
<b>Triglicéridos</b>	56-62
<b>Diglicéridos</b>	2,1-9
<b>Monoglicéridos</b>	0,4
<b>Ácidos grasos libres</b>	0,6-6
<b>Fosfolípidos</b>	25-40
<b>Esteroles</b>	0,2-2
<b>Hidrocarburos</b>	1,2
<b>Lípidos polares de la MFGM</b>	<b>% (p/p) total lípidos polares</b>
<b>Fosfatidilcolina</b>	27-36
<b>Fosfatidiletanolamina</b>	22-36
<b>Esfingomiélinea</b>	19,9-35
<b>Fosfatidilinositol</b>	7,1-11
<b>Fosfatidilserina</b>	4-5
<b>Lactosilcerebrósido</b>	3,4
<b>Lisofosfatidilcolina</b>	2
<b>Lisofosfatidiletanolamina</b>	1

\*El porcentaje de las principales proteínas de MFGM se especifica en el apartado 2.3.4.

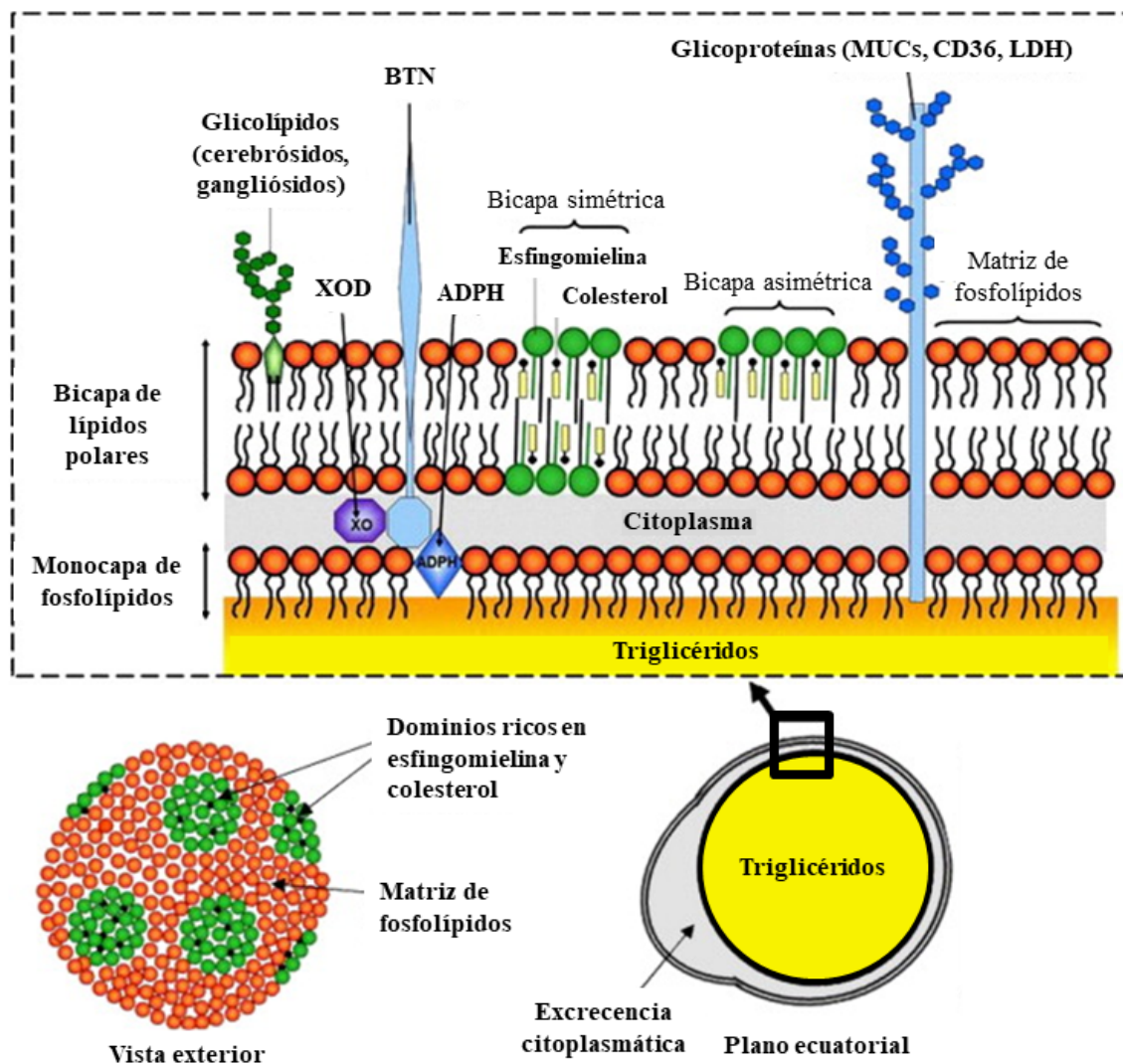
En cuanto a la composición lipídica de la MFGM, cabe destacar que los triglicéridos son la fracción principal, representando entre un 56-62% del total de lípidos de la membrana. Se localizan principalmente en el núcleo de los glóbulos grasos (Jensen, 2002), aunque algunos permanecen unidos a la membrana y contribuyen a su estabilidad, dada la elevada proporción de ácidos grasos saturados (Fong et al., 2007). Los lípidos polares de la MFGM incluyen los fosfolípidos y los esfingolípidos. Los fosfolípidos representan alrededor del 25-40 del total de lípidos de la MFGM. Los lípidos polares que se encuentran en mayor concentración en la MFGM son la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (fosfolípidos), y la esfingomielina (esfingolípido) (Dewettinck et al., 2008). Las interacciones que establecen estos lípidos con las proteínas de la membrana y con los esteroides determinan la estructura, fluidez y estabilidad de la MFGM (Smoczyński et al., 2012). La MFGM contiene también pequeñas cantidades de glicolípidos neutros (cerebrósidos) y ácidos (gangliósidos), esteroides (representando el colesterol alrededor del 90%) y carotenos (Hintze et al., 2011; Smoczyński et al., 2012).

La MFGM contiene también diversos tipos de glúcidos, entre los que destacan la glucosa, la galactosa, la N-acetilglucosamina, la N-acetilgalactosamina, la manosa, la fucosa y el ácido siálico, que pueden presentarse unidos a proteínas (formando glicoproteínas) o a lípidos (formando glicolípidos) (Ross et al., 2015).

### 2.3.3. Estructura y función

Según el esquema realizado por Lopez (2011) (**Figura 8**), la MFGM está formada por tres capas. La más interna es una monocapa compuesta principalmente por fosfolípidos, cuyas colas hidrofóbicas están en contacto con el núcleo de triglicéridos del glóbulo graso, y proteínas originarias del retículo endoplasmático. La más externa es una bicapa lipídica originaria de la membrana plasmática de las células de la glándula mamaria, formada básicamente por lípidos polares (fosfolípidos y esfingolípidos), colesterol, glicolípidos y glicoproteínas. El espacio entre la capa interna y externa es el citoplasma proteico electrodenso (Bourlieu y Michalski, 2015).

En la bicapa lipídica de la MFGM se pueden distinguir dominios rígidos ricos en esfingomielina y colesterol (formando una bicapa simétrica o asimétrica), que no presentan ni proteínas ni glicolípidos, rodeados por una matriz de fosfolípidos con glicoproteínas y glicolípidos distribuidos heterogéneamente en forma de parches o redes (Lopez, 2011). De acuerdo a su disposición en la membrana, las proteínas pueden ser internas, transmembrana o estar débilmente unidas a ella (Smoczyński et al., 2012).



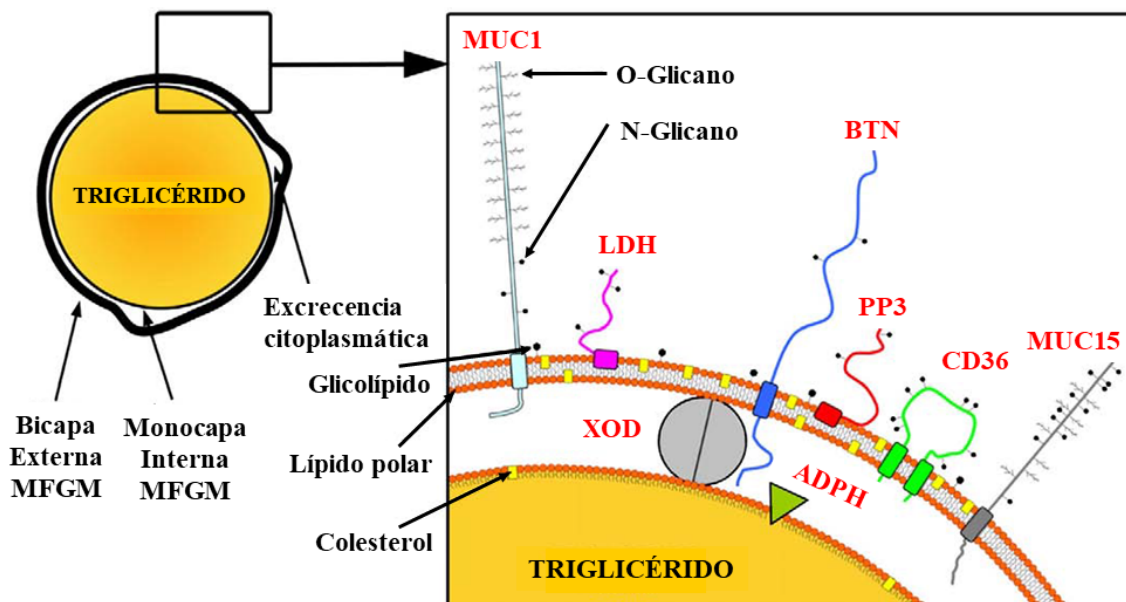
**Figura 8.** Estructura de la membrana del glóbulo graso de la leche (Lopez, 2011).

Durante los últimos años se han acumulado multitud de evidencias sobre el potencial nutraceutico de la MFGM. Además de actuar como emulsificante natural solubilizando moléculas hidrofóbicas como los triglicéridos (que aportan una gran cantidad de energía al recién nacido), la MFGM contiene componentes con reconocidos beneficios para la salud humana (Dewettinck et al., 2008; Mather y Keenan, 1998). Entre ellos destacan las glicoproteínas, los glicolípidos y los oligosacáridos. Los glicanos que componen las glicoproteínas y los glicolípidos, localizados en la parte exterior de la MFGM (glicocálix), pueden actuar de señuelo para diferentes virus y bacterias, impidiendo así la infección celular (Gallier et al., 2014; Guri et al., 2012; Ross et al., 2015). A los fosfolípidos de la MFGM se les han atribuido diversas funciones, como una actividad anticancerígena en el colon e inhibitoria frente a patógenos intestinales (Hintze et al., 2011; Jiménez-Flores y Brisson, 2008; Spitsberg, 2005). La MFGM, debido a su composición, presenta propiedades funcionales con potencial

aplicación en la industria, por ejemplo como emulsionante en alimentos (Dewettinck et al., 2008; Phan et al., 2013) o en alimentación infantil, para incrementar los beneficios funcionales de las fórmulas y favorecer la emulsificación de las grasas que contienen (Burling y Graverholt, 2008; Vestman et al., 2013).

### 2.3.4. Proteínas de la MFGM

Las proteínas de la MFGM representan alrededor del 1-2% del total de proteínas de la leche bovina (Riccio, 2004). Como puede observarse en el esquema realizado por Dewettinck et al. (2008) (**Figura 9**), las proteínas están distribuidas de manera asimétrica, pudiendo ser periféricas, integrales o establecer una interacción débil con la membrana. La XOD se localiza en la capa proteica electrodensa, en contacto con la BTN y la ADPH, esta última situada en la monocapa de fosfolípidos que rodea al núcleo del glóbulo graso, debido a su alta afinidad por los triglicéridos. La BTN, la MUC1, la MUC15 y la CD36 son proteínas integrales (transmembrana), con un dominio anclado en la bicapa lipídica, una región dentro de la membrana y una región externa glicosilada. La LDH y la PP3 se localizan en la parte externa de la MFGM, estableciendo una débil interacción con ella. La localización de las proteínas de la MFGM condiciona la forma y complejidad de su aislamiento, siendo, en general, difíciles de aislar por su alta hidrofobicidad y su baja concentración (Dewettinck et al., 2008).



**Figura 9.** Disposición de las principales proteínas de la MFGM (Dewettinck et al., 2008).

Las principales características de las proteínas de la MFGM bovina aparecen reflejadas en la **Tabla 6**. Existen diferencias en el tipo y proporción de dichas proteínas en la leche de

distintas especies (Cebo y Martin, 2012; Fong et al., 2007; Mather, 2000). Además, muchas de estas proteínas presentan variantes o isoformas con diferente grado de glicosilación (Ross et al., 2015; Smoczyński et al., 2012).

**Tabla 6.** Características principales de las proteínas de la MFGM bovina (Bojsen et al., 2007; Dewettinck et al., 2008; O’Riordan et al., 2014; Rasmussen, 2009; Ross et al., 2015; Ye et al., 2002).

Proteína	Contenido en leche		% Total proteínas MFGM	PM*	pI <sup>†</sup>	% Glicosilación
	% (p/p)	g/L				
<b>BTN</b>	ND	ND	20-43	64-67	5,3	4-6
<b>LDH</b>	0,3	ND	17-22	47-51	6-6,6	12,6-27,1
<b>XOD</b>	0,1-0,3	ND	11,2-20	145-155	7,8	0
<b>MUC15</b>	0,08	ND	1,5-4,5	94-100	< 4,5	65-67
<b>MUC1</b>	0,02	ND	1,2	160-200	< 4,5	57-65
<b>CD36</b>	ND	ND	2-5	76-78	< 7	24
<b>PP3</b>	ND	0,2-0,3	ND	28	6,3	17
<b>ADPH</b>	ND	ND	2	52	7,5-7,8	0
<b>FABP</b>	ND	ND	ND	12-15	5-5,5	0

\*PM: peso molecular (kDa); <sup>†</sup>pI: punto isoelectrico; ND: no se han encontrado datos publicados.

Aunque su función y concentración en la leche no están todavía bien determinadas, a algunas de las proteínas de la MFGM se les han atribuido numerosas funciones biológicas como actividad antibacteriana, antivírica o participación en la secreción de los glóbulos grasos por las células epiteliales de la glándula mamaria (Gallier et al., 2014). A continuación se revisan las principales proteínas de la MFGM, haciendo hincapié en sus características y funciones propuestas más relevantes.

#### 2.3.4.1. Butirofilina

La butirofilina (BTN) es la glicoproteína mayoritaria de la MFGM y se sintetiza en las células epiteliales de la glándula mamaria durante la lactación (Mather, 2000). Se trata de una



proteína ácida e hidrofóbica de 526 aminoácidos (Ishii et al., 1995) que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, conteniendo dos dominios típicos de inmunoglobulina estabilizados por un puente disulfuro y una cola citoplasmática (Robenek et al., 2006).

Tal y como se ha comentado anteriormente, la BTN se considera una proteína integral o transmembrana (**Figura 9**). Se puede distinguir una región externa o extraglobular glicosilada que contiene los dos dominios típicos de las inmunoglobulinas, un dominio anclado a la bicapa lipídica y una región intraglobular constituida por la cola citoplasmática (Ogg et al., 1996). Debido a su localización en la MFGM, el aislamiento de BTN es muy complicado, no pudiendo ser extraída ni siquiera con agentes caotrópicos o detergentes (Singh, 2006). La BTN bovina contiene tres sitios de N-glicosilación, dos en la parte extraglobular y otro en la parte intraglobular, pero no presenta O-glicosilación (Ross et al., 2015).

En lo que respecta a sus funciones biológicas, cabe destacar que la BTN forma un complejo con la XOD y con la ADPH mediante la formación de enlaces disulfuro. Dicho complejo podría ejercer un papel determinante en la formación de la MFGM y en la secreción de los glóbulos grasos por las células epiteliales mamarias, estando implicado en la unión del glóbulo graso citoplasmático a la membrana plasmática apical de la célula (Mather y Keenan, 1998). Por otra parte, aunque no hay evidencias de actividad antimicrobiana para la BTN y se desconoce la función de sus glicanos, a la proteína bovina se le ha asociado con la protección y mejora de los síntomas de encefalomiелitis vírica en ratones (modelo animal para esclerosis múltiple) (Mañá et al., 2004).

#### **2.3.4.2. Lactadherina**

La lactadherina (LDH o PAS6/7) es la segunda glicoproteína más abundante de la MFGM, tras la BTN (Quaranta et al., 2001). Esta proteína es sintetizada por las células epiteliales de la glándula mamaria y caracterizada originalmente como una proteína de la MFGM, aunque también es expresada en otros epitelios, como el endotelio y el endometrio (Rasmussen, 2009; Silvestre et al., 2005). A diferencia de la BTN, la LDH está débilmente unida a la MFGM, por lo que puede extraerse fácilmente con soluciones salinas (Kim et al., 1992).

La LDH bovina consiste en dos variantes, conocidas como PAS6 y PAS7, con pesos moleculares de 50 y 47 kDa, respectivamente. Estas variantes comparten el mismo núcleo polipeptídico (409 aminoácidos), pero difieren en su glicosilación (Hvarregaard et al., 1996; Kim et al., 1992). De hecho, la PAS6 contiene un 7,1% de carbohidatos en su estructura, presentando dos sitios de N-glicosilación y uno de O-glicosilación, mientras que la PAS7 posee un 5,5% de carbohidatos y sólo un sitio de N-glicosilación. Los glicanos presentes en ambas variantes son similares, predominando la fucosa, el ácido siálico, la N-acetilgalactosamina y la

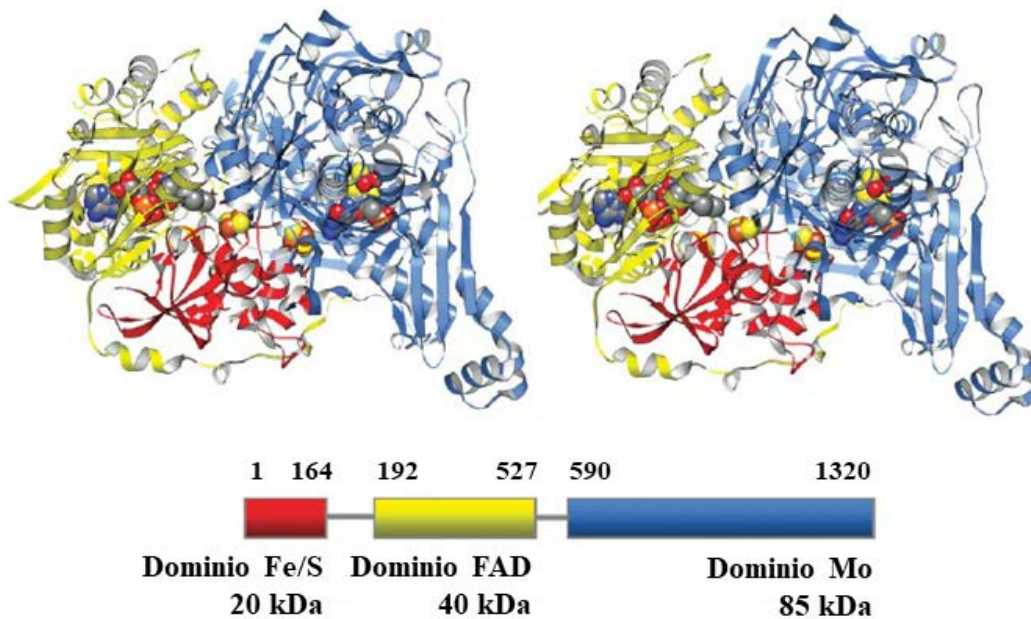
manosa (Hvarregaard et al., 1996; Seok et al., 2001). Estructuralmente, la LDH bovina está compuesta por dos dominios N-terminales que son homólogos al factor de crecimiento epidérmico y dos dominios C-terminales homólogos a los factores de coagulación V y VIII de unión a fosfolípidos (Hvarregaard et al., 1996; Silvestre et al., 2005). Se han observado notables diferencias entre especies en lo que respecta a la estructura de la molécula de la LDH (Cebo y Martin, 2012), así como al contenido y tipo de glicosilación (Picariello et al., 2008). Se ha comprobado que los glicanos de la LDH bovina y humana ejercen un papel protector de la cadena peptídica en el ambiente ácido del estómago, aunque esta protección disminuye durante la digestión intestinal (Le et al., 2012).

A la LDH se le han atribuido numerosas funciones biológicas. Se ha sugerido que esta proteína facilita la morfogénesis de la glándula mamaria (Ensslin y Shur, 2007) y participa en la secreción de los glóbulos grasos y la síntesis de la MFGM (Oshima et al., 2002). Diversos estudios han demostrado *in vitro* e *in vivo* que la LDH posee la capacidad de actuar como coadyuvante de la fagocitosis de células apoptóticas, gracias a su capacidad de interacción con receptores celulares como las integrinas y la fosfatidilserina (Andersen et al., 2000; Otzen et al., 2012). Además, se han encontrado evidencias de que la LDH tiene actividad antirrotavirus asociada a su glicosilación (Inagaki et al., 2010a; Kvistgaard et al., 2004), ejerce una protección frente a la adhesión de bacterias patógenas en el sistema gastrointestinal (Shahriar et al., 2006), y presenta actividad anticoagulante y reguladora de la hemostasis (Shi et al., 2008).

#### **2.3.4.3. Xantina oxidasa**

La xantina oxidasa (XOD) es un enzima redox que ha sido identificada en la leche de diferentes especies de mamíferos, incluidas la humana, bovina, ovina, caprina, equina y de camélidos (Ross et al., 2015). La XOD es la principal enzima de los glóbulos grasos, representando entre el 11-20% del total de proteínas de la MFGM (Mather et al., 1980). La posición de la XOD en la MFGM es periférica, por lo que los lavados con soluciones de detergentes no iónicos o con soluciones salinas pueden liberar hasta un 60% del enzima (Robenek et al., 2006).

La XOD bovina es un homodímero de aproximadamente 300 kDa, cuyas subunidades están compuestas por 1320 aminoácidos (145-155 kDa). Según se muestra en la **Figura 10**, cada subunidad se compone de tres dominios: un dominio N-terminal con dos centros ferrosulfurados (Fe/S), un dominio central que contiene la coenzima flavín-adenín dinucleótido (FAD) y un dominio C-terminal que contiene un átomo de molibdeno como cofactor (Harrison, 2006; Romão, 2009). La XOD humana, en cambio, carece de molibdeno y contiene uno o ningún centro Fe/S (Godber et al., 2005).



**Figura 10.** Estructura cristalina de la xantina oxidasa de leche bovina. Se muestran los tres dominios característicos: en color rojo el dominio N-terminal ferrosulfurado (Fe/S); en amarillo el dominio central que contiene la coenzima flavín-adenín dinucleótido (FAD); y en azul el dominio C-terminal con molibdeno (Mo) (Romão, 2009).

La XOD existe en la célula como dos formas interconvertibles, la xantina oxidasa (XO), que reduce el oxígeno molecular con generación de superóxido y degradación de purina, y la xantina deshidrogenasa (XDH), que reduce el  $\text{NAD}^+$  sin generación de especies reactivas de oxígeno (Chen et al., 2012). La XDH es la forma mayoritaria en las células, y puede convertirse en XO mediante proteólisis, de forma irreversible, o por oxidación de los residuos sulfhidrilo, de forma reversible (Enroth et al., 2000).

La glicosilación de la XOD es un aspecto todavía poco claro y que varía entre especies. Así, aunque la XOD bovina se considera una proteína no glicosilada (Mather, 2000), la proteína humana presenta N-glicosilación (Picariello et al., 2008), y la de cabra muestra O-glicosilación conteniendo ácido siálico (Cebo et al., 2010).

Entre las funciones biológicas de la XOD se incluye su papel estructural y funcional en la secreción de los glóbulos grasos y en la formación de la MFGM en las células epiteliales mamarias, mediante el complejo formado con la BTN y la ADPH (Mather y Keenan, 1998). No obstante, las principales funciones atribuidas a este enzima derivan de su actividad catalítica, en concreto de la oxidación de hipoxantina a xantina y a ácido úrico, proceso en el que se generan especies reactivas del oxígeno (ROS, reactive oxygen species) como peróxido de hidrógeno, anión superóxido y óxido nítrico (Harrison, 2006). De hecho, hay diversas evidencias de la actividad antibacteriana de los ROS derivados de la XOD bovina y humana (Hancock et al.,

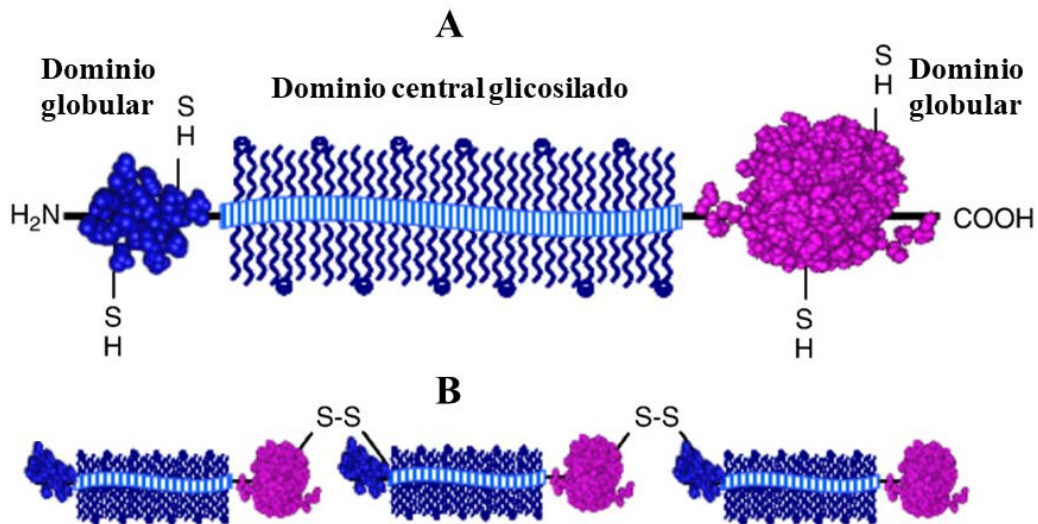
2002; Martin et al., 2004; Stevens et al., 2000). Por otra parte, la XOD ejerce una acción antimicrobiana indirecta al generar peróxido de hidrógeno que utiliza la LPOX para la oxidación del tiocianato a hipotiocianato, compuesto que posee actividad antimicrobiana (Björck y Claesson, 1979; Harrison, 2006).

#### **2.3.4.4. Mucinas**

Las mucinas son proteínas integrales de membrana (Jonckheere et al., 2013), filamentosas y altamente glicosiladas (50-90% del peso molecular son carbohidratos), que se encuentran en muchas células epiteliales actuando como barrera física frente a las agresiones externas (Pallesen et al., 2002).

En su estructura contienen un número variable de dominios repetidos en tándem que son ricos en los aminoácidos serina, treonina y prolina. Los grupos hidroxilo de la serina y la treonina funcionan como sitios de glicosilación, mientras la prolina confiere rigidez a la estructura de la proteína, facilitando su externalización desde la superficie celular (Moran et al., 2011). En la **Figura 11** se incluye el esquema de la estructura general y asociación multimérica de las mucinas realizado por Coles et al. (2010), que varía entre especies (Huott et al., 1995). Las mucinas asociadas a membranas suelen presentarse en forma de monómeros formados por un dominio central, densamente glicosilado, flanqueado por dominios globulares que contienen cisteína y participan en interacciones inter e intramoleculares mediante puentes disulfuro. Los monómeros de mucina secretados por las células suelen agruparse en forma de multímeros unidos linealmente mediante puentes disulfuro (Coles et al., 2010).

Las principales mucinas identificadas en la MFGM bovina son la mucina 1 (MUC1), la mucina 15 (MUC15) y la mucina X (MUCX) (Liu et al., 2005; Pallesen et al., 2007, 2001). Todas ellas proceden de la membrana apical de las células epiteliales mamarias y son componentes integrales de la MFGM, si bien la MUCX está débilmente unida a ella y tiende a aparecer como componente minoritario del lactosuero (Liu et al., 2005). Tanto la MUC1 como la MUC15 presentan estructuras con un dominio anclado en la membrana, una región N-terminal extracelular ampliamente glicosilada (mayoritariamente O-glicosilación) y una región C-terminal intracelular citoplasmática (Pallesen et al., 2002). La MUC1 está formada por unos 558 aminoácidos (160-200 kDa) y contiene entre 57-65% de glicosilación, con el ácido siálico, la galactosa, la manosa y la N-acetilgalactosamina como los azúcares mayoritarios. La MUC15 presenta 307 aminoácidos (94-100 kDa) y un 65-67% de glicosilación, siendo la N-acetilglucosamina, la N-acetilgalactosamina y el ácido siálico los azúcares predominantes (Pallesen et al., 2007, 2002, 2001). Existen diferencias interespecie en el tipo y grado de glicosilación (Ross et al., 2015; Wilson et al., 2008).



**Figura 11.** Estructura de (A) un monómero de mucina mostrando el dominio lineal central glicosilado flanqueado por los dominios globulares y (B) un multímero de mucina compuesta por subunidades unidas linealmente mediante puentes disulfuro (S-S) (Coles et al., 2010).

La actividad protectora de las mucinas frente a infecciones causadas por diversos patógenos ha sido ampliamente documentada y mayoritariamente atribuida a su elevado grado de glicosilación. Así, a la MUC1 se le ha relacionado con la capacidad para inhibir la adhesión bacteriana a células epiteliales bucales (Schroten et al., 1992) e intestinales (Liu et al., 2012; Parker et al., 2010; Sando et al., 2009). De manera similar, a la MUC1 también se le ha atribuido actividad frente a diversos virus, como los rotavirus (Kvistgaard et al., 2004; Yolken et al., 1992), el virus de Norwalk (Ruvoën-Clouet et al., 2006) y el VIH (Saeland et al., 2009). La mayoría de los estudios se han realizado *in vitro*, por lo que los resultados obtenidos se deberían confirmar en ensayos *in vivo* para conocer el efecto real que podrían tener las mucinas en la prevención de ciertas infecciones (Ross et al., 2015). Por otra parte, en lo que respecta a las funciones biológicas de la MUC15, existen muy pocos estudios hasta la fecha, y estos apuntan a una actividad protectora frente a microorganismos en la superficie de las células epiteliales (Pallesen et al., 2002). Debido a las propiedades biológicas y físico-químicas que presentan las mucinas, actualmente se está planteando su utilización para crear nuevos biomateriales. De hecho, se está estudiando la interacción de las mucinas con moléculas bioactivas y su potencial uso como biomateriales para la administración de fármacos y también su aplicación en la ingeniería de tejidos (Sandberg et al., 2009; Svensson y Arnebrant, 2010).

La densa glicosilación de las mucinas les confiere una fuerte higroscopicidad creando en torno a su estructura una fase acuosa extremadamente viscosa que protege la cadena polipeptídica de la degradación (Pallesen et al., 2007). De hecho, se ha comprobado que la

glicosilación de la MUC1 bovina y humana las hace resistentes a la digestión gastrointestinal (Le et al., 2012).

#### **2.3.4.5. Clúster de diferenciación 36**

El clúster de diferenciación 36 (CD36) es una glicoproteína integral de la MFGM que se ha encontrado en leche humana, bovina, ovina, caprina, equina y de camélidos (Ross et al., 2015). Además de en las células epiteliales de la glándula mamaria, se ha encontrado en células endoteliales, monocitos, plaquetas, adipocitos y otras líneas celulares (Greenwalt et al., 1992).

La estructura de la CD36 está formada por 471 aminoácidos (76-78 kDa), diferenciándose dos dominios transmembrana, dos cadenas intracelulares con cuatro grupos sulfhidrilo, y una larga cadena en el exterior de la MFGM con ocho sitios de N-glicosilación (Rasmussen et al., 1998). La CD36 bovina contiene aproximadamente un 24% de glicosilación (Berglund et al., 1996a), con manosa y N-acetilgalactosamina como los azúcares mayoritarios (Nakata et al., 1993). Tal y como sucede con otras proteínas de la MFGM, el alto grado de glicosilación parece conferirle cierto grado de resistencia a la proteólisis (Greenwalt et al., 1992).

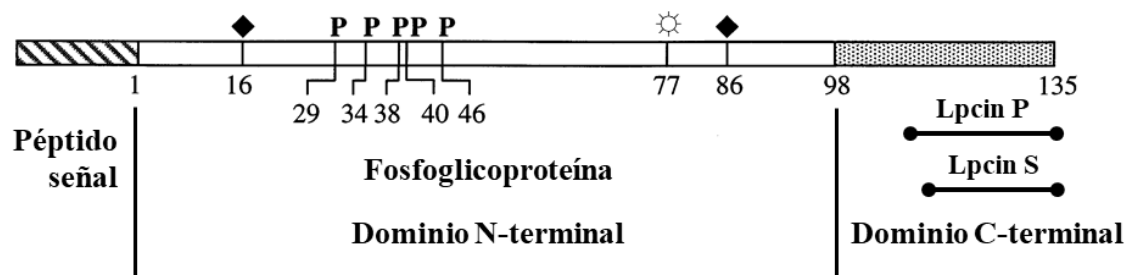
Aunque se desconoce la función biológica de los azúcares que componen la CD36 (Ross et al., 2015), esta proteína se asocia con el transporte de ácidos grasos, la activación de las plaquetas y la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos (Greenwalt et al., 1992). Además, la CD36 parece participar, junto con la LDH, en el desarrollo del sistema inmune intestinal del recién nacido (Yabe et al., 2003).

#### **2.3.4.6. Componente 3 de la proteosa-peptona**

El componente 3 de la proteosa-peptona (PP3 o lactoforina) es una fosfoglicoproteína derivada de la fracción proteosa-peptona de la leche (de la que representa un 25%), si bien todavía existe el debate de si también deriva de la MFGM, como inicialmente se pensaba (Coddeville et al., 1998). A este respecto, se ha observado que la PP3 está presente tanto en la MFGM como en el lactosuero bovino, lo que se ha atribuido a un débil anclaje de la proteína en la membrana, por lo que se libera con facilidad y se solubiliza en el suero (Sørensen et al., 1997). En esta línea, Fong et al. (2007) lanzaron la hipótesis de que la PP3 bovina podría adsorberse a la MFGM durante el procesado. La PP3 ha sido identificada en la leche bovina, ovina, caprina y de camélidos, expresándose exclusivamente en el tejido mamario (Pedersen et al., 2012b), aunque no se ha detectado en la leche humana (Sørensen et al., 1997).

La PP3 está constituida por 135 aminoácidos (28 kDa), sin contar la secuencia señal (Pedersen et al., 2012a). En la estructura primaria de la PP3 bovina se distinguen dos dominios

(Figura 12). El dominio N-terminal, cargado negativamente, contiene cinco sitios de fosforilación, dos sitios de O-glicosilación y un sitio de N-glicosilación. El dominio C-terminal posee carga positiva, carácter anfipático, estructura en hélice  $\alpha$  y es susceptible de proteólisis, dando lugar a diversos péptidos. De hecho, la PP3 puede ser degradada por acción de la enzima plasmina (endógena de la leche) resultando en un glicopéptido de 16-18 kDa (residuos 54-135) llamado lactoforina 18. Además, la proteólisis con tripsina de la PP3 da lugar a un péptido de 26 residuos (110-135) llamado Lpcin P, y se ha obtenido un péptido sintético de 23 residuos (113-135) denominado lactoforicina (Lpcin S) (Campagna et al., 2001; Pedersen et al., 2012a). Por otra parte, diversos estudios apuntan a diferencias interespecie de la PP3 en lo que a glicosilación se refiere (Lister et al., 1998; Ross et al., 2015).



**Figura 12.** Estructura primaria de la PP3 bovina. Los sitios de fosforilación, O-glicosilación y N-glicosilación se indican con la P,  $\blacklozenge$  y  $\odot$ , respectivamente (Campagna et al., 2001).

Entre las funciones biológicas que se han atribuido a la PP3 cabe destacar su capacidad para inhibir la actividad de la lipoprotein-lipasa de la leche (Girardet et al., 1993), protegiendo así al glóbulo graso de la lipólisis espontánea (Sørensen et al., 1997). Además, la lactoforicina derivada del dominio C-terminal de la PP3 bovina ha demostrado actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Campagna et al., 2004; Pedersen et al., 2012a), así como efecto prebiótico sobre *Bifidobacterium animalis* (Etienne et al., 1994). La PP3 bovina es capaz de inhibir la replicación del rotavirus humano (Inagaki et al., 2010a). Además, se ha indicado que algunos fragmentos C-terminales de la PP3 presentan actividad inmunomoduladora (Sugahara et al., 2005). Entre sus propiedades tecnológicas, cabe destacar su gran capacidad emulsificante y espumante (Innocente et al., 2011, 1999, 1998).

### 2.3.4.7. Adipofilina

La adipofilina (ADPH) es una proteína que se encuentra en la superficie de los glóbulos grasos (Bickel et al., 2009; Jiang y Serrero, 1992), localizada en la monocapa lipídica interna de la MFGM en contacto con el núcleo de triglicéridos del glóbulo graso (Nielsen et al., 1999). Se ha encontrado en numerosos tipos de células que contienen lípidos, incluyendo hepatocitos,

adipocitos, células musculares y células epiteliales de la glándula mamaria, tanto en desarrollo como en estado maduro (Brasaemle et al., 1997; Heid et al., 1998).

La ADPH está formada por 450 aminoácidos (52 kDa) y no se han detectado carbohidratos en su estructura (Ricchio, 2004). Diversos estudios genéticos han mostrado que la ADPH está íntimamente relacionada con una familia de proteínas con capacidad para unirse a lípidos, que incluyen las perilipinas y la proteína TIP47 (tail-interacting protein). De hecho, comparten un mismo dominio N-terminal, que se ha denominado dominio PAT (perilipina, ADPH, TIP47). En su estructura se distingue, además, una zona de hélices anfipáticas y una hendidura hidrofóbica de 14 aminoácidos altamente conservada al final del dominio C-terminal (Lu et al., 2001; Miura et al., 2002).

Se ha propuesto que la ADPH participa en la formación de los glóbulos grasos, en la captación y transporte de ácidos grasos y triglicéridos, y en la secreción de los lípidos de la leche (Gao y Serrero, 1999; Mather y Keenan, 1998; McManaman et al., 2003). Se le ha atribuido la capacidad de unión y acumulación de lípidos neutros (Heid et al., 1996; Listenberger et al., 2007; Shi et al., 2015), que se ha asociado a la síntesis de la MFGM y los glóbulos grasos (Brasaemle et al., 1997; Wang et al., 2003), procesos en los que podría participar junto con la BTN y la XOD (Mather y Keenan, 1998). Sin embargo, se necesitan más evidencias acerca de las propiedades estructurales y bioquímicas involucradas en la asociación de la ADPH con los glóbulos grasos, y de cómo desempeña sus funciones biológicas.

#### **2.3.4.8. Otras proteínas de la MFGM**

La proteína fijadora de ácidos grasos (FABP, fatty acid binding protein) es una proteína minoritaria de la MFGM, de 12-15 kDa y no glicosilada. En la membrana, la FABP interacciona con la proteína CD36 formando un complejo o asociación (Spitsberg et al., 1995), que se ha relacionado con el transporte de ácidos grasos, con la regulación del metabolismo de los lípidos y con el crecimiento de las microgotas lipídicas en el citoplasma (Rasmussen et al., 1998; Zimmerman y Veerkamp, 2002). La FABP parece, además, participar en la proliferación y diferenciación celular en la glándula mamaria (Spitsberg y Gorewit, 2002), y en la inhibición del crecimiento de algunas líneas celulares tumorales (Spitsberg, 2005; Whanger, 2004).

Otras proteínas que podemos encontrar en la MFGM son la BRCA1 y BRCA2 (breast cancer type 1 and 2 susceptibility proteins), a las que se atribuye protección frente al cáncer de mama (Daniels et al., 2004; Vissac et al., 2002). Además, se han identificado inhibidores de  $\beta$ -glucuronidasa, asociados con una actividad de protección frente al cáncer de colon (Ito et al., 1993); inhibidores de *Helicobacter pylori*, responsable de infecciones gástricas (Wang et al., 2001); fosfoproteínas, que suponen una fuente de fósforo y calcio (Spitsberg, 2005); y algunas

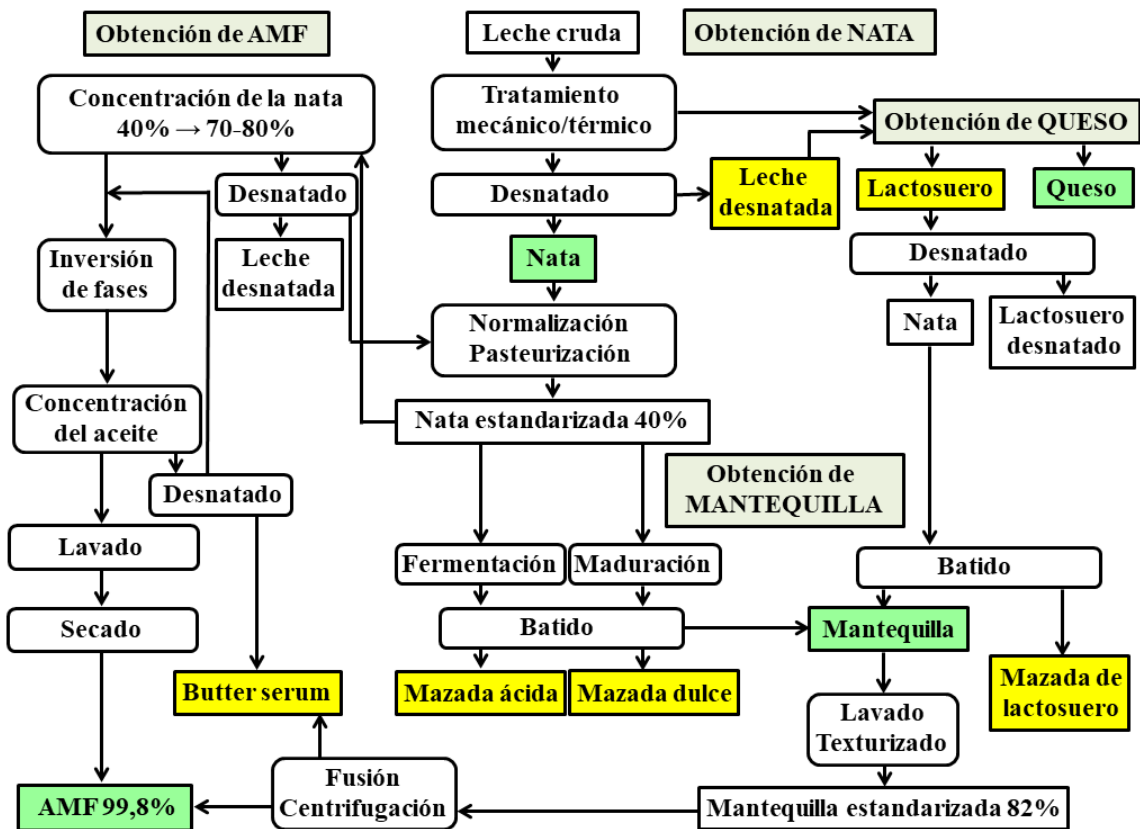


enzimas y proteínas débilmente unidas a la MFGM, cuya función todavía se desconoce (Dewettinck et al., 2008).

## 2.4. Subproductos de la industria láctea

En la actualidad, la industria láctea lleva a cabo la transformación de leche cruda para la obtención de una gran variedad de productos. Estos productos lácteos pueden diferenciarse en los siguientes grupos: bebidas lácteas líquidas (suponen alrededor del 40% del total de productos lácteos producidos a nivel mundial), queso (35%), mantequilla (30%), productos lácteos en polvo (15%), leches concentradas (2%), productos lácteos fermentados (2%), y el resto distribuido en otros productos como nata, helados, fracciones ricas en proteína, leches de fórmula y lactosa (O'Mahony y Fox, 2014). En Europa, en el año 2016 se procesó el 96,8% de la leche producida (aproximadamente 152 millones de toneladas). Del total, un 37% se destinó a producción de queso, el 30% a elaboración de mantequilla, 13% a nata, 11% a leche líquida para consumo directo, 4% a leche ácida, 3% a productos en polvo y 2% a otros productos. El 3,2% restante es leche no procesada, destinada a alimentación animal, a la agroindustria, o desechada (Eurostat, 2017).

Durante el procesado de los productos lácteos se generan inevitablemente subproductos derivados. Los problemas económicos asociados al almacenamiento y gestión de los subproductos lácteos, así como la legislación existente en materia de responsabilidad medioambiental, ha fomentado el aprovechamiento de los subproductos industriales, que se ha convertido en los últimos años en una actividad de gran importancia económica (Schuck, 2014). En la **Figura 13** se esquematizan los procesos de obtención de nata, mantequilla, queso y grasa láctea anhidra o AMF (del inglés, anhydrous milk fat), resaltando los subproductos derivados de los mismos: leche desnatada, mazada, lactosuero y butter serum (mazada que queda retenida en la mantequilla), respectivamente.



**Figura 13.** Esquema de la generación de los principales subproductos derivados de los procesos de obtención de nata, mantequilla, queso y grasa láctea anhidra (AMF). Los subproductos de interés se resaltan en amarillo (Vanderghem et al., 2010).

El procesado de los productos lácteos es una importante fuente de subproductos, que en la actualidad se mantiene al alza dada la tasa de incremento en la producción de leche, de aproximadamente 2,8% cada año (Slavov, 2017). En la **Tabla 7** se incluye la producción mundial de los principales productos y derivados lácteos bovinos y ovinos.

Entre los subproductos de la industria láctea cabe destacar, por volumen de producción, la leche desnatada, el lactosuero y la mazada. La leche desnatada es el producto que se obtiene tras la etapa de desnatado de la leche entera, y su producción mundial rondó los 124 millones de toneladas como promedio entre 2013-2015 (FAOSTAT, 2018). El lactosuero es el principal subproducto de la industria quesera. A nivel mundial se estima una producción del orden de 24 millones de toneladas de queso para el año 2020 (OECD/FAO, 2016), que generará una cantidad aproximada de 180-218 millones de toneladas de lactosuero (Božanić et al., 2014; Mollea et al., 2013). El suero de mantequilla o mazada es el principal subproducto que se libera durante el batido de la nata en el proceso de formación de mantequilla. A nivel mundial se estima una producción del orden de 6,5 millones de toneladas de mantequilla para el año 2020 (OECD/FAO, 2016), que generará una cantidad equivalente de mazada (Morin et al., 2007).

**Tabla 7.** Producción mundial (millones de toneladas) de los principales productos y derivados lácteos bovinos y ovinos (FAOSTAT, 2018; OECD/FAO, 2016).

<b>Producto/derivado</b>	<b>Promedio 2013-15</b>
<b>Leche entera</b>	659,1*
<b>Leche desnatada</b>	124,5
<b>Queso</b>	22,2
<b>Lactosuero</b>	173-199 <sup>†</sup>
<b>Nata</b>	3,3
<b>Mantequilla</b>	5,0
<b>Mazada</b>	5,0 <sup>†</sup>
<b>AMF</b>	0,2
<b>Productos en polvo</b>	<b>Promedio 2013-15</b>
<b>Leche entera</b>	3,5
<b>Leche desnatada</b>	3,6
<b>Lactosuero</b>	2,6
<b>Mazada</b>	0,1
<b>Productos ovinos</b>	<b>Promedio 2013-15</b>
<b>Leche entera</b>	10,3*
<b>Queso</b>	0,69
<b>Lactosuero</b>	5,4-6,2 <sup>†</sup>
<b>Mantequilla y AMF</b>	0,06

\*Dato del año 2016; <sup>†</sup>Estimación (Božanić et al., 2014; Mollea et al., 2013; Morin et al., 2007).

Los productos lácteos en forma líquida son muy perecederos, por ello en las últimas décadas se han desarrollado tecnologías, como la atomización, que reducen su contenido acuoso convirtiéndolos en productos en polvo, facilitando así su almacenamiento y transporte, y evitando el crecimiento de microorganismos, lo que aumenta su vida útil (Sharma et al., 2012). Los atomizadores han evolucionado en diseño y en aplicaciones, por lo que el tipo de productos lácteos en polvo que se pueden producir hoy en día es muy variado, incluyendo la leche entera, la leche desnatada, el lactosuero, los concentrados y aislados de proteínas del lactosuero, la mazada, el butter serum, las leches de fórmula, los caseinatos, etc. (Schuck et al., 2016). En la **Tabla 7** se incluye la producción mundial de los principales productos lácteos en polvo, que ha ido creciendo en los últimos años y se estima que siga la misma tendencia en el futuro próximo.

A continuación, se incluye una revisión más detallada de los principales subproductos de la industria láctea, atendiendo a su composición general, a sus principales propiedades biológicas y funcionales, y a sus aplicaciones industriales más relevantes.

#### **2.4.1. Leche desnatada**

La leche desnatada es el producto que se obtiene tras el desnatado de la leche entera y presenta una composición aproximada de 3,4-3,7% (p/p) de proteínas, 0,1-0,2% de lípidos, 4,4-4,7% de lactosa, y 0,9% de minerales (Vanderghem et al., 2010).

Además de su consumo directo como líquido, parte de la leche desnatada producida anualmente se transforma y comercializa en polvo. De hecho, se estima que la producción mundial de leche desnatada en polvo será de 4,6 millones de toneladas en el año 2020 (OECD/FAO, 2016). La leche desnatada en polvo se usa como ingrediente en la elaboración de numerosos productos alimenticios como quesos, yogurt, postres lácteos, productos cárnicos, productos de panadería y repostería, y bebidas (Kelly et al., 2013), dado que contribuye a la mejora de sus propiedades nutricionales, reológicas, texturales y organolépticas (Augustin y Clarke, 2008; El-Samragy et al., 1993; Marafon et al., 2011). Además, debido al aporte de proteínas, vitaminas hidrosolubles y minerales como calcio, sodio, potasio, fósforo y magnesio, la leche desnatada en polvo se emplea como ingrediente en las leches de fórmula infantiles (Guo y Ahmad, 2014b).

Además de las propiedades tecnológicas, se ha demostrado que la leche desnatada en polvo y sus hidrolizados presentan actividad antibacteriana, antioxidante, antihipertensiva e inmunomoduladora (Cui et al., 2011; Ha et al., 2015; Ripollés et al., 2016, 2017).

#### **2.4.2. Lactosuero y productos derivados del lactosuero**

El lactosuero es el subproducto de la industria quesera que se obtiene tras la separación de la cuajada que contiene las caseínas precipitadas. En función del procedimiento de obtención se distinguen dos tipos de lactosuero, ácido y dulce, que presentan diferente composición. El lactosuero ácido ( $\text{pH} < 4,6$ ) se obtiene mediante la precipitación de las caseínas utilizando ácidos orgánicos o fermentos lácticos. El lactosuero dulce ( $\text{pH} 6-6,6$ ) se obtiene mediante coagulación de las caseínas con enzimas coagulantes como la quimosina (Jelen, 2003; Mollea et al., 2013). En cuanto a composición, cabe destacar que el lactosuero obtenido por coagulación enzimática presenta mayor contenido de lípidos, proteínas y lactosa, y menos minerales que el obtenido por precipitación ácida (**Tabla 8**).

Independientemente del tipo de lactosuero, este constituye una buena fuente de proteínas de alto valor nutricional, siendo el contenido en el lactosuero bovino de 6-10 g/L. Las proteínas mayoritarias del lactosuero bovino son la  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, Igs, fracción PPT, SA y LF (Madureira et al., 2007), si bien la proporción de las proteínas varía entre los tipos de lactosuero. De hecho, en torno al 20% del total de proteínas del lactosuero dulce está constituido por el glicomacropéptido o caseinomacropéptido, que aunque no es un componente natural de la leche, pasa a formar parte del mismo tras liberarse de la caseína- $\kappa$  debido a la acción de la quimosina (Panesar et al., 2007; Yadav et al., 2015). El lactosuero contiene, además, la mayoría de la lactosa de la leche, minerales como el calcio, fósforo, magnesio, sodio y zinc, y vitaminas hidrosolubles como la riboflavina, tiamina, piridoxina, cianocobalamina, ácido ascórbico, niacina, biotina y ácido fólico (O'Mahony y Fox, 2014). El lactosuero ovino presenta un mayor contenido proteico y casi el doble de lípidos que el bovino (Haenlein y Wendorff, 2006). El perfil lipídico de la leche ovina presenta mayor porcentaje de triglicéridos de cadena media y es más saturado que el de la leche bovina (Balthazar et al., 2017; Revilla et al., 2017).

**Tabla 8.** Composición (g/L) de los lactosueros ácido y dulce (Haenlein y Wendorff, 2006; Hernández-Ledesma et al., 2011; Jelen, 2003; Yadav et al., 2015).

Componentes	Lactosuero bovino		Lactosuero ovino
	Ácido	Dulce	Dulce
<b>Sólidos totales</b>	63-70	63-70	75
<b>Lactosa</b>	44-46	45-52	52
<b>Proteínas</b>	6-8	6-10	8,5-10,5
<b>Lípidos</b>	0,4	3,6-5	8,2
<b>Cenizas</b>	8	5	4,3
<b>Calcio</b>	1,2-1,6	0,4-0,6	ND
<b>Cloruro</b>	1,1	1,1	ND
<b>Fosfato</b>	2-4,5	1-3	ND
<b>Lactato</b>	6,4	2	ND

ND: no se han encontrado datos publicados.

El lactosuero tiene una gran importancia en la industria láctea debido a los grandes volúmenes producidos a nivel mundial y al hecho de que gran parte de esa producción

(alrededor del 50%) se elimina como efluente sin tratamiento previo (Slavov, 2017), con los problemas medioambientales que ello conlleva (Cortés-Sánchez et al., 2015; Sundarraj et al., 2018). Con el objeto de minimizar dichos problemas y en busca de una revalorización del lactosuero, desde hace años se vienen buscando alternativas de uso para este subproducto. Entre otros usos, el lactosuero se destina a alimentación humana, alimentación animal, como fertilizante y para su bioconversión en productos con valor añadido, como bioetanol, bioplásticos, levaduras, surfactantes, etc., gracias a su alto contenido en lactosa que sirve de combustible para los diversos procesos biotecnológicos (Ryan y Walsh, 2016).

Alrededor del 50% del lactosuero producido a nivel mundial es tratado y transformado en la industria alimentaria en diferentes productos para alimentación humana y animal. Aproximadamente, la mitad de esta cantidad se emplea directamente en su forma líquida, un 30% como lactosuero en polvo, un 15% como lactosa y productos derivados, y el resto (5%) como concentrados de proteína de lactosuero o WPC (whey protein concentrate), aislados de proteína de lactosuero o WPI (whey protein isolate), o hidrolizados de proteína de lactosuero o WPH (whey protein hydrolysate) (Spalatel, 2012). Se ha descrito su uso en productos lácteos como quesos, yogures o helados, productos cárnicos, productos de panadería y repostería, así como en zumos de frutas y otras bebidas como cerveza, vino o champán, y fórmulas infantiles (Kelly et al., 2013).

La utilización de los derivados del lactosuero como ingredientes alimentarios se debe tanto a sus propiedades tecnológicas con funciones emulsificantes, espumantes y gelificantes, como a sus propiedades organolépticas y nutricionales (Božanić et al., 2014; Królczyk et al., 2016). El lactosuero está adquiriendo una gran popularidad como suplemento proteico de la dieta. Además, se plantea su uso en productos especiales debido a las múltiples funciones biológicas que se le atribuyen, como la actividad antibacteriana, antivírica, inmunomoduladora, antihipertensiva, antioxidante, antitumoral e hipolipidémica, entre otras (Hernández-Ledesma et al., 2011; Marshall, 2004; Yadav et al., 2015).

En la actualidad, la ultrafiltración, la diafiltración, la microfiltración, la ósmosis inversa y las técnicas de intercambio iónico aplicadas al procesado del lactosuero, son procedimientos habituales en la industria láctea. Estas técnicas permiten aislar y concentrar la fracción proteica del suero sin pérdidas significativas de sus propiedades funcionales y reduciendo su contenido salino (Mollea et al., 2013; Pouliot, 2008). Los principales productos que contienen proteínas del lactosuero en alta concentración son los WPC y WPI, cuya composición general se muestra en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Composición general (% p/p) de los concentrados (WPC) y los aislados (WPI) de proteína del lactosuero (Coppola et al., 2014; Jelen, 2003; Morr y Ha, 1993; Svanborg et al., 2015; Yadav et al., 2015).

Componentes	WPC	WPC (de leche desnatada)	WPC (de mazada)	WPI
<b>Sólidos totales</b>	94-96	94,5	94,5	94,5-98
<b>Proteínas totales</b>	34-82	88,4	82,1	88-92
<b>Caseínas</b>	0-0,9	10,9	4,2	ND
<b>Proteínas del lactosuero</b>	ND	75,1	72,7	ND
<b><math>\beta</math>-LG</b>	40,4-77	ND	ND	67,6-74,8
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	14,5-24,8	ND	ND	8,3-17,5
<b>Igs</b>	3,8-15,4	ND	ND	5,9-7,5
<b>SA</b>	5,8-19,6	ND	ND	7,2-10,9
<b>Lactosa</b>	4-52	1,7	0,2	0,4-1
<b>Lípidos totales</b>	3-7	0,1	1,5	0,4-0,7
<b>Fosfolípidos</b>	0,8-1,5	0,02	0,2	0,1-0,3
<b>Cenizas</b>	2,5-8	ND	ND	1,4-2,1
<b>Sodio</b>	0,1-1,7	0,1	0,08	0,3-0,4
<b>Potasio</b>	0,07-0,5	0,3	0,2	0,1-0,2
<b>Calcio</b>	0,2-1	0,6	0,6	0,2
<b>Magnesio</b>	0,02-0,4	0,06	0,2	0,02-0,03
<b>Fósforo</b>	0,2-1,3	0,3	0,3	0,05

ND: no se han encontrado datos publicados.

Tradicionalmente, los WPC se han obtenido mediante ultrafiltración y diafiltración del lactosuero de quesería, conteniendo entre un 34 y un 82% de proteína, con la  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, SA y GMP como componentes mayoritarios (Coppola et al., 2014). Los WPC pueden obtenerse también a partir de leche desnatada y mazada, mediante una o dos etapas de microfiltración seguidas de ultrafiltración y diafiltración (Svanborg et al., 2015). Tal y como se refleja en la **Tabla 9**, el WPC procedente de leche desnatada contiene menor cantidad de lípidos, mayor contenido proteico (principalmente caseínas), y mayor contenido en lactosa que el obtenido a partir de la mazada. A diferencia del WPC tradicional, los procedentes de leche desnatada y mazada no contienen GMP porque no ha habido acción enzimática sobre la caseína- $\kappa$  (Coppola et al., 2014). Los WPI se obtienen mediante técnicas de intercambio iónico y contienen una

mayor concentración de proteína (superior al 88-90%), y menos lactosa y minerales, que los WPC (Evans et al., 2010; Morr y Ha, 1993).

Numerosos estudios atribuyen propiedades tecnológicas a los WPC y WPI, tales como capacidad espumante, emulsificante, gelificante o viscosizante, por lo que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria (Królczyk et al., 2016; Svanborg et al., 2015). Debido a su contenido en proteínas bioactivas, los WPC y WPI han mostrado también actividad antibacteriana, antirrotavirus, inmunomoduladora, antioxidante y antihipertensiva (Bojsen et al., 2007; Mann et al., 2015; McEvoy et al., 2016).

Los hidrolizados de proteína de lactosuero (WPH) son preparados proteicos en los que la proteína intacta es sometida a un proceso de degradación enzimática, similar al que tiene lugar de manera natural en el sistema gastrointestinal, obteniéndose fragmentos peptídicos pequeños y/o aminoácidos libres. Los WPH presentan interesantes propiedades nutricionales, funcionales y biológicas (Spalatelu, 2012). De hecho, diversos estudios han demostrado que los péptidos se digieren y absorben más rápida y fácilmente que las proteínas intactas, lo que supone un beneficio para personas con problemas digestivos y también ha promovido su uso como suplemento para atletas y culturistas (Tiengou et al., 2006). Los WPH causan menos alergias e intolerancias en comparación con las proteínas intactas de la leche de vaca, por lo que su uso en alimentación infantil ha experimentado un notable crecimiento en los últimos años, que se prevé que continúe hasta 2020 (Meier et al., 2016). La hidrólisis enzimática de las proteínas del lactosuero incrementa su solubilidad en agua y mejora algunas de sus propiedades tecnológicas, como la capacidad emulsificante (Gauthier et al., 1993), aunque conviene controlar el grado de hidrólisis para evitar la formación de péptidos amargos (Jeevanthi et al., 2015).

### **2.4.3. Mazada y butter serum**

La mazada y el butter serum se han considerado, durante años, subproductos de la industria láctea, derivados concretamente del procesado de la grasa láctea, con escaso valor comercial (Vanderghem et al., 2010). Sin embargo, en los últimos años estos productos han suscitado gran interés y están revalorizándose debido a los numerosos estudios que apuntan a su potencial nutricional y tecnológico, atribuido en gran parte a sus componentes derivados de la MFGM (Gallier et al., 2014).

La mazada es la fase acuosa liberada en el proceso de formación de mantequilla tras el batido de la nata (Rombaut et al., 2006), siendo el principal subproducto de la industria mantequera (Vanderghem et al., 2010). Según el origen de la nata se distinguen tres tipos de mazada: dulce, ácida y de lactosuero. La mazada dulce proviene del batido de la nata obtenida tras el desnatado de la leche sin ningún tipo de fermentación, presentando un pH de 6,5-6,6. La



mazada ácida, en cambio, se obtiene cuando se parte de nata fermentada con bacterias lácticas y, por tanto, presenta un pH ácido de alrededor de 5,4. La mazada de lactosuero deriva de la elaboración de mantequilla a partir de la nata remanente en el mismo (Sodini et al., 2006).

La composición general de los tres tipos de mazada se detalla en la **Tabla 10**. La mazada contiene los componentes solubles de la nata, tales como lactosa, minerales y proteínas, tanto caseínas como proteínas del lactosuero. Además de estos componentes, la mazada también está enriquecida en fragmentos de la MFGM (< 5% de sólidos totales), ricos en fosfolípidos y glicoproteínas, que se desprenden de los glóbulos grasos durante el proceso de batido (Morin et al., 2006, 2007; Spitsberg, 2005). En cuanto a las diferencias de composición entre los tipos de mazadas, cabe destacar que la mazada de lactosuero presenta los valores más bajos de proteína debido a la ausencia de las caseínas (Vanderghem et al., 2010). La distribución de proteínas en la mazada bovina dulce se ha estimado en: 58% caseínas, 23% proteínas del lactosuero y 19% proteínas de la MFGM (Britten et al., 2008). De manera similar al lactosuero, la mazada ovina presenta un mayor contenido proteico que la bovina (Hamad et al., 2016).

**Tabla 10.** Composición (% p/p) de los diferentes tipos de mazada (Britten et al., 2008; Hamad et al., 2016; Morin et al., 2006; Rombaut et al., 2006; Sodini et al., 2006).

Componentes	Mazada bovina					Mazada ovina dulce
	Dulce		Ácida	De lactosuero		
	% P*	% ST <sup>†</sup>	% ST	% P	% ST	% P
<b>Sólidos totales</b>	6,7-12			7,6		7,8
<b>Lactosa</b>	3,6-6,7	48,1-57,2	43,7	4	52,1-63,4	ND
<b>Proteínas</b>	2,4-3,5	25-36,5	27,8	1	13,2-14,1	5,1
<b>Lípidos</b>	0,5-1,5	4,6-14,5	22,3	2,2	15,5-28,9	0,7
<b>Cenizas</b>	0,6-0,8	5,6-8,4	6,2	0,4	5,8-7,0	0,6

\*P: % (p/p) en producto; <sup>†</sup>ST: % (p/p) en sólidos totales; ND: no se han encontrado datos publicados.

Aproximadamente, entre el 6,5-7% del total de leche producida mundialmente se destina a la obtención de mantequilla, lo que genera alrededor de 5 millones de toneladas de mazada/año como subproducto (Kumar et al., 2015). Entre los usos de la mazada se encuentran, actualmente, el consumo directo (muy extendido en India y países de Oriente Medio, aunque

escaso en Europa), la alimentación animal y su uso como ingrediente en la industria alimentaria (Vanderghem et al., 2010). La utilización de la mazada como ingrediente en alimentación humana está cobrando importancia en los últimos años debido a la variedad de propiedades que se le atribuyen, tanto nutricionales como biológicas y tecnológicas. De hecho, se ha descrito que la mazada es una excelente fuente de potasio, fósforo, vitamina B12, riboflavina, proteínas y calcio (Conway et al., 2014). Diversos estudios han demostrado que la mazada también presenta actividad antioxidante (Conway et al., 2013; Ripollés et al., 2016), antibacteriana (Ripollés et al., 2017; Sprong et al., 2012), antirrotavirus (Fuller et al., 2013), anticancerígena (Larsson et al., 2018) y antihipertensiva (Conway et al., 2014), asociadas a componentes de la MFGM, como fosfolípidos y glicoproteínas.

Además de las funciones nutricionales y biológicas, la mazada posee diversas propiedades tecnológicas, mayoritariamente asociadas al contenido de proteínas y fosfolípidos, como la capacidad emulsificante y texturizante, el aumento de la estabilidad térmica, la mejora de la capacidad de retención de agua, y el aporte de aroma y flavor característicos (Vanderghem et al., 2010). Todas estas propiedades han fomentado su uso en la industria panadera y pastelera, en la de zumos y bebidas de frutas, y en la industria láctea en la elaboración de yogurt, quesos y postres lácteos (Kumar et al., 2015; Madenci y Bilgiçli, 2014).

El butter serum es un subproducto derivado del proceso de obtención de la grasa láctea anhidra o AMF (anhydrous milk fat). La AMF puede obtenerse mediante dos procedimientos (**Figura 13**). En el primer procedimiento, la mantequilla estandarizada al 82% de grasa se funde y centrifuga, separándose la AMF (99,8% de grasa) y una fase acuosa considerada como butter serum. El segundo método consiste en concentrar la nata desde un 40 a un 70-80% de grasa mediante centrifugación, seguido de una inversión de fases y otra centrifugación, separando la AMF y el butter serum (Vanderghem et al., 2010). Tal y como se muestra en la **Tabla 11**, el butter serum presenta una composición bastante similar a la mazada dulce, aunque su contenido en lípidos, principalmente lípidos polares de la MFGM, es mayor en el primero (Rombaut et al., 2006).

La AMF es uno de los productos lácteos más consumidos en la India (Siwach et al., 2016), denominado ghee, con una producción mundial de aproximadamente 0,2 millones de toneladas anuales (FAOSTAT, 2018); no se han encontrado referencias acerca de la cantidad de butter serum producida. La mayoría de las propiedades, tanto tecnológicas como biológicas, descritas para la mazada podrían ser aplicadas para el butter serum debido a su composición similar, con especial atención a su contenido proteico y a su elevada cantidad de fosfolípidos (Gassi et al., 2016; Vanderghem et al., 2010).

**Tabla 11.** Composición (% p/p en producto) del butter serum bovino (Britten et al., 2008; Rombaut et al., 2006).

<b>Componentes</b>	<b>% (p/p)</b>
<b>Sólidos totales</b>	10,9
<b>Lactosa</b>	3-4
<b>Proteínas</b>	3,6
<b>Lípidos</b>	2,6-3,7
<b>Lípidos polares</b>	0,9-1,2

## 2.5. Tratamientos tecnológicos en la industria láctea

El Reglamento (CE) 853/2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, define leche cruda como la leche producida por la secreción de la glándula mamaria de animales de abasto que no haya sido calentada a más de 40 °C, ni sometida a un tratamiento equivalente (DOUE, 2004).

El consumo mundial de leche cruda ha descendido considerablemente en los últimos 30 años. De hecho, en el Reino Unido supone menos del 0,1% del consumo total de leche líquida, e incluso está prohibida su venta para consumo directo en países como Escocia y Australia (Deeth y Lewis, 2017a). El principal motivo de este control es que el consumo de leche cruda se ha asociado con la aparición de brotes alimentarios (Claeys et al., 2013; Maldonado et al., 2014). Esto se debe a que la leche es un excelente medio de crecimiento para muchos microorganismos, tanto alterantes como patógenos, debido a su alto contenido en agua, su abundancia de nutrientes y su pH cercano a la neutralidad (6,6-6,8) (Motarjemi et al., 2014).

En los países industrializados, la leche y los productos lácteos están involucrados en el 1-5% del total de brotes alimentarios, con el 39,1, 53,1 y 7,8% atribuido a la leche, al queso y a otros productos lácteos, respectivamente. En el 67,2% de los casos, el brote se asoció al empleo de leche cruda como materia prima (De Buyser et al., 2001; EFSA, 2016a). En los Estados Unidos, se estima que la leche cruda, consumida por el 3,2% de la población, y el queso procedente de leche cruda, consumido por el 1,6%, causan el 96% de los brotes asociados a productos lácteos (que suponen < 1% del total de brotes en la actualidad) (Costard et al., 2017). A pesar de la falta de datos, en países en vías de desarrollo la prevalencia de brotes asociados al consumo de productos lácteos se estima que es mayor, debido a las limitadas infraestructuras de producción y a los sistemas de refrigeración deficientes (Motarjemi et al., 2014).

Los principales microorganismos patógenos causantes de brotes alimentarios asociados al consumo directo de leche cruda o a productos lácteos elaborados con leche cruda son *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* verotoxigénico, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico, *Yersinia enterocolitica*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetii* y *Cronobacter sakazakii*, éste último asociado únicamente a leches de fórmula (Claeys et al., 2013; Oliver et al., 2009; Stessl y Hein, 2010). Estos brotes se caracterizan por cuadros de diarrea, vómitos, náuseas y fiebre, aunque pueden desembocar en cuadros más graves como el síndrome de Guillain-Barré (*Campylobacter* spp.), síndrome hemolítico urémico (*E. coli* O157:H7), meningitis-encefalitis (*Cronobacter sakazakii*), artritis (*Brucella* spp.) o incluso la muerte (Claeys et al., 2013). La contaminación de la leche cruda con los microorganismos puede ocurrir de forma endógena, desde el sistema sanguíneo o en la propia glándula mamaria, o de forma exógena, durante o después del ordeño (desde la piel de la ubre, pezones, suelo, heces, ordeñador, ambiente), durante el transporte de la leche, en la propia industria transformadora e incluso tras el tratamiento de higienización (desde los equipos, conducciones, ambiente) (Nag, 2010; Verraes et al., 2015). Las buenas prácticas en la industria y los tratamientos tecnológicos aplicados a la leche han ayudado a incrementar su seguridad desde un punto de vista sanitario, reduciendo el número de brotes alimentarios (EFSA, 2015; Motarjemi et al., 2014).

Los tratamientos tecnológicos empleados en la industria alimentaria pueden clasificarse en térmicos y no térmicos. Los tratamientos térmicos son el método habitual de higienización de la leche y los productos lácteos (Considine et al., 2007), cuyos objetivos principales son garantizar su seguridad sanitaria, evitando la presencia de microorganismos patógenos y sus toxinas, y prolongar su estabilidad y vida útil evitando la acción de los distintos agentes de alteración, principalmente microorganismos y enzimas (Deeth y Lewis, 2017a, 2017b).

Sin embargo, debido a que los tratamientos térmicos pueden modificar el valor nutritivo, biológico y organoléptico de la leche y de los productos lácteos (O'Connell y Fox, 2003; Singh, 2004), en los últimos años se está incrementando el interés y estudio de tecnologías no térmicas de conservación de alimentos, como alternativa a los tratamientos térmicos empleados en la industria láctea (Evrendilek, 2014).

A continuación se revisan los principales tratamientos tecnológicos empleados en la industria láctea, tanto térmicos como no térmicos.

### 2.5.1. Tratamientos térmicos

Entre los tratamientos térmicos empleados en la industria láctea destacan, en orden creciente de intensidad, la termización, la pasteurización, el procesado de larga vida útil y la esterilización, cuyas condiciones y efectos se incluyen en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Tratamientos térmicos usualmente empleados en la industria láctea: condiciones y efectos (Deeth y Lewis, 2017a; O'Connell y Fox, 2003).

Tratamiento térmico	Condiciones de temperatura / tiempo	Efectos sobre bacterias y enzimas
<b>Termización</b>	57-68 °C / 5-20 s	Mata la mayoría de bacterias no formadoras de esporas responsables del deterioro de los productos. No inactiva enzimas lácteas ni bacterianas.
<b>Pasteurización</b> <b>LTLT<sup>1</sup></b> <b>HTST<sup>2</sup></b>	63-65 °C / 30 min 72-82 °C / 15-30 s*	Mata bacterias responsables del deterioro y patógenos no formadores de esporas. Inactiva algunas enzimas lácteas pero no las enzimas bacterianas.
<b>Procesado ESL<sup>3</sup></b>	123-127 °C / < 1-5 s También se realiza como tratamiento combinado (tecnología no térmica + pasteurización)	Mata todas las bacterias no formadoras de esporas y la mayoría de esporas. Inactiva las enzimas lácteas pero no las enzimas bacterianas.
<b>Esterilización</b> <b>UHT<sup>4</sup></b>	138-145 °C / 1-10 s	Mata todas las bacterias no formadoras de esporas y todas las esporas, excepto las más termorresistentes. Inactiva las enzimas lácteas pero no todas las enzimas bacterianas.
<b>Esterilización en envase</b>	115-120 °C / 10-30 min	Mata todas las bacterias no formadoras de esporas y todas las esporas, excepto las más termorresistentes. Inactiva todas las enzimas.

<sup>1</sup>LTLT, low-temperature long-time, pasteurización baja.

<sup>2</sup>HTST, high-temperature short-time, pasteurización alta.

<sup>3</sup>ESL, extended shelf-life, larga vida útil.

<sup>4</sup>UHT, ultra high temperature, esterilización a temperatura ultra alta.

\*72 °C / 15 s son las condiciones mínimas reguladas en la mayoría de países.

La termización se aplica a la leche cruda con objeto de reducir el número de microorganismos presentes en la misma (normalmente entre 3-4 ciclos logarítmicos) y aunque

no la hace apta para el consumo humano directo, permite un almacenamiento más prolongado antes de someterla a la elaboración de queso o de otros derivados lácteos. La intensidad de este tratamiento, inferior al de pasteurización, mantiene mejor las características organolépticas de la leche y de los productos lácteos derivados (Giaccone et al., 2016; Rukke et al., 2011).

Los tratamientos de pasteurización más utilizados son la pasteurización baja (LTLT, low-temperature long-time) y la pasteurización alta (HTST, high-temperature short-time). La pasteurización permite reducir el número de microorganismos patógenos presentes en la leche a un nivel en el que no constituyan un riesgo para la salud. Las condiciones de la pasteurización (**Tabla 12**) se diseñaron para inactivar las bacterias patógenas, no formadoras de esporas, más termorresistentes, como *Mycobacterium tuberculosis* y *Coxiella burnetii*, logrando al menos 5 ciclos logarítmicos de reducción (Cerf y Condron, 2006). Se logra, así, una notable reducción de las poblaciones de patógenos en la leche cruda, a excepción de bacterias formadoras de esporas como *Bacillus cereus*, que presenta algunas cepas toxigénicas (Juffs y Deeth, 2007). Además, la pasteurización no es capaz de destruir las esporas y toxinas microbianas, ni algunas enzimas bacterianas (proteasas y lipasas) presentes en la leche antes del tratamiento térmico, lo que limita su vida útil.

Aparte de los microorganismos patógenos, los microorganismos alterantes de la leche son de especial importancia en la industria láctea, debido a que causan el deterioro de los productos y reducen su vida útil. El deterioro es causado por la acción de enzimas como las proteasas, peptidasas, lipasas, glicosidasas y oxidasas producidas por los microorganismos, si bien algunas se encuentran de manera natural en la leche. Estas enzimas degradan las proteínas, los lípidos y la lactosa, generando sabores extraños y alteraciones físico-químicas en la leche y los productos derivados (Motarjemi et al., 2014). La pasteurización elimina bacterias e inactiva algunas enzimas lácteas (fosfatasa alcalina y lipasas, pero no lactoperoxidasa) responsables del deterioro, lo que permite prolongar la duración de la leche, si se mantiene en refrigeración, hasta 8-10 días. Aunque este tratamiento provoca cambios físico-químicos y organolépticos en la leche mínimos, sí se ha descrito la pérdida de vitaminas e incluso un cierto grado de desnaturalización de las proteínas, con una posible repercusión en sus propiedades biológicas y funcionales (Deeth y Lewis, 2017a; Lewis, 2010).

El procesado de larga vida útil (ESL, extended shelf-life) es un tratamiento de intensidad intermedia entre la pasteurización y la esterilización. La leche ESL se ha definido como aquella que ha recibido un tratamiento capaz de reducir la carga microbiana en mayor grado que una pasteurización estándar, y se ha envasado en condiciones extremadamente higiénicas, por lo que presenta una vida útil prolongada en refrigeración (> 30 días) (Rysstad y Kolstad, 2006). Aunque en la mayoría de países no existen unas condiciones establecidas para el tratamiento ESL de la leche, este oscila entre 123-127 °C durante < 1-5 s. Estados Unidos supone una

excepción, donde la leche ESL se denomina leche ultrapasteurizada y ha sido tratada a  $\geq 138$  °C durante  $\geq 2$  s. Con este tratamiento se obtiene una leche de alta calidad microbiológica, sin bacterias vegetativas ni esporas de bacterias psicrofólicas, y de muy buenas características organolépticas, al minimizarse la desnaturalización de sus componentes (Deeth, 2017). Aunque el procedimiento más utilizado para obtener leche ESL es el tratamiento térmico, existen diversas alternativas en las que se combina un tratamiento térmico de HTST con otros métodos como la microfiltración con membranas de tamaño de poro 0,8-1,4  $\mu\text{m}$  (Schmidt et al., 2012), el uso de agentes antibacterianos como la nisina (Wirjantoro et al., 2001), o el empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje (Sepulveda et al., 2005).

Por otra parte, se encuentran los tratamientos de esterilización, entre los que destacan el tratamiento de esterilización a ultra-alta temperatura (UHT, ultra high temperature) y la esterilización en envase, que emplean temperaturas superiores a los 115 °C. Estos son los tratamientos más intensos aplicados en la industria láctea (ver condiciones en **Tabla 12**) y garantizan la inactivación de las bacterias patógenas y alterantes, además de sus toxinas y esporos, excepto los más termorresistentes. Los esporos de *Clostridium botulinum* o de *Bacillus cereus*, así como las toxinas de *S. aureus* se eliminan con tratamientos de esterilización (Claeys et al., 2013; Verraes et al., 2015). Por otra parte, el tratamiento UHT es capaz de inactivar todas las enzimas lácteas y la mayoría de las enzimas bacterianas; mientras que la esterilización en envase, más intensa que la UHT, inactiva todas las enzimas. Por ello, los productos esterilizados pueden conservarse durante varios meses a temperatura ambiente si se han envasado asépticamente (Deeth, 2010; Deeth y Lewis, 2017a).

Múltiples estudios han demostrado que los tratamientos térmicos pueden provocar, en función de su intensidad, cambios físico-químicos en la leche y productos lácteos, disminuyendo su valor nutritivo y alterando sus características organolépticas y funcionales (Deeth y Lewis, 2017c). De hecho, como consecuencia del tratamiento térmico las proteínas lácteas pueden experimentar cambios estructurales y de composición, como desdoblamiento, desnaturalización o agregación (Chevalier et al., 2009; Morin et al., 2007). Las tres reacciones de mayor relevancia son la desnaturalización de las proteínas del lactosuero, las interacciones de estas con otras proteínas (principalmente con las caseínas y con las proteínas de la MFGM), y la disociación de las micelas de caseína. De estos tres procesos dependerán las características físico-químicas y la estabilidad de la leche, así como las propiedades funcionales de los productos lácteos derivados (Anema, 2014; Considine et al., 2007; Rynne et al., 2004).

Así, el tratamiento de pasteurización de la leche entera o de la nata es capaz de alterar de manera considerable la composición de la MFGM, influenciando sus propiedades funcionales, entre ellas su capacidad emulsionante (Singh, 2006). El tratamiento térmico asociado al proceso de secado por atomización, para la obtención de leche y productos lácteos en polvo, también

induce cambios físico-químicos en los mismos, disminuyendo la disponibilidad de nutrientes por pérdida de vitaminas, reducción del contenido de lisina y desnaturalización de proteínas del lactosuero, entre otros (Borad et al., 2017; Schuck, 2014). Diversos estudios han demostrado que el tratamiento térmico induce la pérdida de actividad biológica de algunos componentes de la leche bovina, como la LF o las Igs (Franco et al., 2018; Mainer et al., 1999).

### **2.5.2. Tratamientos no térmicos**

Las tecnologías no térmicas se han desarrollado principalmente como alternativa o complemento a los tratamientos térmicos, con el fin de obtener productos microbiológicamente seguros y estables, con mejores características nutricionales y organolépticas, gracias a la reducción del daño térmico. Entre los tratamientos no térmicos más estudiados cabe distinguir la microfiltración, las altas presiones o HHP (high hydrostatic pressure), los pulsos eléctricos de alto voltaje o PEAV, las técnicas de centrifugación, el empleo de radiaciones UV y la inyección de CO<sub>2</sub> (Deeth y Lewis, 2017b), cuyas principales ventajas y limitaciones se resumen en la **Tabla 13**.

La microfiltración es una tecnología que se ha empleado durante los últimos años en la industria láctea en aplicaciones que incluyen el pretratamiento de la leche destinada a la elaboración de queso, para eliminar *Clostridium tyrobutyricum* y prevenir la generación de gas durante la maduración del queso, y la producción de concentrados de proteínas lácteas y leche ESL (Gésan-Guiziou, 2010; Saboya y Maubois, 2000). La leche ESL se procesa mediante un sistema que combina la microfiltración (el uso de membranas con tamaño de poro de 0,8-1,4 µm) con un tratamiento térmico HTST, obteniéndose un producto estable a temperatura ambiente durante 4-7 semanas a 4 °C (Deeth y Lewis, 2017b; Zhang et al., 2016).

La tecnología de HHP está bien implantada en industrias alimentarias como la cárnica, hortofrutícola, de bebidas y de comidas preparadas, y en los últimos años está adquiriendo importancia en la industria láctea (Deeth y Lewis, 2017b).

El tratamiento con PEAV se puede definir como la aplicación intermitente de campos eléctricos de alta intensidad (1-40 kV/cm) y corta duración (µs) a un alimento colocado entre dos electrodos (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010b). Este tratamiento causa la electroporación irreversible de las formas vegetativas de bacterias, levaduras y mohos, que puede provocar su inactivación a temperaturas inferiores a las que se utilizan en el procesado térmico convencional. Sus principales limitaciones derivan de la imposibilidad de su aplicación en productos sólidos, por la elevada potencia eléctrica requerida y la dificultad de procesado en continuo (Deeth y Lewis, 2017b; Evrendilek, 2014). El tratamiento de la leche con PEAV (35



kV/cm durante 11,5  $\mu$ s a 65 °C) tras una pasteurización HTST permite prolongar su vida útil hasta 60 días a 4 °C (Sepulveda et al., 2005).

**Tabla 13.** Tratamientos no térmicos aplicados en la industria láctea: ventajas y limitaciones (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010a, 2010b; Deeth y Lewis, 2017b; Gésan-Guiziu, 2010; Huppertz, 2010).

Tratamiento no térmico	Ventajas	Limitaciones
<b>Microfiltración</b>	Proceso continuo. Elimina bacterias, esporas y células somáticas a temperaturas medias (30-50 °C). No afecta al color, flavor ni valor nutritivo.	La reducción bacteriana es insuficiente para obtener productos de larga vida útil. El producto final necesita pasteurizarse.
<b>Altas presiones</b>	Inactiva un amplio rango de bacterias y enzimas. No afecta al color, flavor ni valor nutritivo. Válido para productos o ingredientes termolábiles.	No es un proceso continuo. La destrucción de esporas ocurre sólo bajo condiciones muy severas: presión muy alta con calor. No destruye bacterias barotolerantes. Dificultad de procesado de grandes volúmenes.
<b>Pulsos eléctricos</b>	Proceso continuo. Inactiva un amplio rango de bacterias y algunas enzimas. Puede emplearse para producir leche ESL combinado con tratamiento térmico.	No destruye esporos bacterianos. Dificultad de adaptarlo a procesos industriales.
<b>Bactofugación</b>	Proceso continuo. Reduce el contenido de esporas hasta en 2 ciclos log y las bacterias totales 1 ciclo log.	La reducción bacteriana es insuficiente para considerarlo un procedimiento equivalente a pasteurización o esterilización.
<b>Radiación UV</b>	Proceso continuo. Elimina la mayoría de bacterias y esporas. Energía eficiente.	La efectividad se reduce ampliamente con la opacidad y turbidez. Provoca sabores extraños a causa de procesos oxidativos.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Puede ser proceso continuo añadiéndolo por inyección a la leche a presión $\leq 0,1$ MPa. Inhibe el crecimiento bacteriano y alarga varios días la vida útil de la leche cruda y pasteurizada.	No mata bacterias. A concentración $\sim 12$ mM, el CO <sub>2</sub> modifica el sabor de la leche. Suele requerir su eliminación final.

La bactofugación es un proceso empleado para eliminar bacterias y células somáticas de la leche mediante centrifugación a 9.000 g, a una temperatura de 55-60 °C (Gésan-Guiziu, 2010). Se consigue así reducir la carga microbiana total de la leche entre 1-2 ciclos logarítmicos. Este procedimiento se ha usado ampliamente en la industria quesera, dado que elimina alrededor del 98% de los esporos anaerobios de *Clostridium tyrobutyricum* y *butyricum*, principales bacterias

responsables de la hinchazón tardía en quesos (Stack y Sillen, 1998). La bactofugación también elimina alrededor del 90-95% de esporos aerobios y puede emplearse como pretratamiento de la leche destinada a la elaboración de productos lácteos en polvo, y para reducir el nivel de *Cronobacter sakazakii* en la preparación de fórmulas infantiles. Además, en combinación con una pasteurización HTST y un envasado final aséptico, permite obtener leche ESL con una vida útil prolongada (Deeth y Lewis, 2017b).

La irradiación de alimentos con luz ultravioleta (UV) (200-280 nm) es efectiva en la eliminación de la mayoría de microorganismos, bacterias y esporas, por lo que se ha usado desde hace años para la descontaminación del aire, superficies de envases y equipos y agua, y ha sido aprobado en Estados Unidos como método de pasteurización de zumos de fruta (Koutchma, 2009). Asimismo, la irradiación de leche con luz UV está aprobada en Europa como método de pasteurización, y considerada segura para la población general, excepto para niños menores de 1 año (EFSA, 2016b). Diversos estudios han mostrado que el tratamiento de la leche con UV a 1,5 kJ/L causa la reducción de 3 ciclos log de bacterias totales, aerobias, levaduras, mohos, coliformes y psicrótrofos (Cilliers et al., 2014; Reinemann et al., 2006) e incluso un incremento significativo del contenido de vitamina D por conversión del 7-dehidrocolesterol (Cappozzo et al., 2015). El principal inconveniente del tratamiento con luz UV es la generación de sabores desagradables a causa de procesos oxidativos que se producen cuando se aplican tratamientos de la leche superiores a 1 kJ/L (Reinemann et al., 2006). Otra de sus potenciales aplicaciones es el tratamiento del lactosuero de quesería, antes de su uso en la obtención de WPC o WPI. Con el tratamiento UV se reduce la desnaturalización de proteínas del lactosuero, en comparación con el tratamiento térmico, manteniendo el mismo efecto bactericida (Kristo et al., 2012). En combinación con la pasteurización térmica, el tratamiento UV consigue prolongar la vida útil de la leche hasta 12-21 días (Cappozzo et al., 2015).

El dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a  $\leq 1$  atmósfera (1 bar, 0,1 MPa) es un agente antimicrobiano muy efectivo frente a bacterias, especialmente Gram-negativas. Su uso es particularmente relevante en la calidad y vida útil de la leche UHT, participando en la reducción del crecimiento de bacterias psicrótrofas, como *Pseudomonas* spp., y la producción de proteasas y lipasas termorresistentes, causantes de amargor, rancidez y gelificación de la leche (Hotchkiss et al., 2006; Vianna et al., 2012). La adición de CO<sub>2</sub> (1,8-3,1 mM final) a la leche pasteurizada también causa un incremento de su vida útil, hasta 14 días a 6 °C (Hotchkiss et al., 1999).

A pesar de que los tratamientos no térmicos presentan ciertas ventajas en relación a los tratamientos térmicos, estos últimos, y especialmente la pasteurización, están firmemente establecidos y aceptados en la industria láctea como procesos capaces de producir alimentos seguros, nutritivos y de calidad, en grandes volúmenes y a bajo coste. Si a esto añadimos la normativa legal a la que hay que atenerse, se comprende que a día de hoy los tratamientos no

térmicos no son capaces de competir con los térmicos en el procesado de la leche y los productos lácteos (Deeth y Lewis, 2017b).

### 2.5.2.1. Tratamiento por altas presiones hidrostáticas

El tratamiento con HHP implica la aplicación de presiones comprendidas entre 100 y 900 MPa durante 1-30 min, aunque a nivel industrial no se aplican presiones superiores a 600 MPa debido a su ineficiencia energética. Como principal ventaja destaca su capacidad para inactivar la mayoría de células vegetativas, patógenas y alterantes, proporcionando alimentos microbiológicamente seguros y estables, con una mínima pérdida de nutrientes y escasos cambios de flavor y color, en comparación con los tratamientos térmicos (Chawla et al., 2011; Huppertz, 2010).

Entre los principales inconvenientes de las HHP cabe destacar que la destrucción de esporos bacterianos ocurre sólo bajo condiciones muy severas de presión, con generación de calor. De hecho, ni siquiera tratamientos severos como 980-1.000 MPa durante 40 min a 50 °C, o 580 MPa durante 120 min a 5-10 °C, son capaces de inactivar esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* (Sarker et al., 2013). Por otra parte, la mayoría de enzimas endógenas de la leche, como la plasmina, fosfatasa alcalina, LPOX, XOD y lipasa, son bastante barorresistentes (hasta 400 MPa) (Huppertz, 2010). Este hecho obliga a considerar medidas adicionales o complementarias, como el tratamiento térmico, para asegurar la inactivación enzimática y evitar, así, problemas como la lipólisis en leche, yogurt y helados, o la gelificación de productos lácteos UHT (Walstra et al., 2006).

La aplicación de las HHP a la leche fue citada por primera vez por Hite (1899), que consiguió una reducción de 5-6 log de ufc/mL de bacterias totales de la leche tras 680 MPa durante 10 min a 27 °C. El tratamiento suele aplicarse por lotes, en volúmenes de hasta 400 L, lo que limita su aplicación en la industria láctea, que precisa de sistemas continuos para procesado de grandes volúmenes de leche (Chawla et al., 2011; Goyal et al., 2013).

El tratamiento de la leche a 586 MPa durante 3-5 min a 55 °C sería equivalente al tratamiento térmico ESL, permitiendo prolongar la vida útil de la leche más de 45 días en refrigeración (Tovar-Hernández et al., 2005). El tratamiento de la leche a 400 MPa durante 10 min o a 600 MPa durante 3 min, a 20 °C, permite obtener una leche con una calidad microbiológica similar a la de una pasteurización HTST y prolongar su vida útil hasta 10 días almacenada a 10 °C. Asimismo, con un tratamiento combinado de HHP (600 MPa durante 3 min) y pasteurización térmica HTST, higiénicamente equivalente a la esterilización térmica UHT, se logra una leche estable de mayor calidad organoléptica y nutricional que la esterilizada solo térmicamente (Mújica-Paz et al., 2011; Ramírez et al., 2009).

En los últimos años ha crecido el interés en las aplicaciones potenciales de las HHP en el tratamiento de la leche y los productos lácteos. De hecho, diversos estudios han indicado que las HHP afectan a la estructura de las proteínas lácteas y al equilibrio mineral, lo que puede mejorar las propiedades de coagulación de la leche (Trujillo et al., 2002). En la leche, los tratamientos de HHP superiores a 200 MPa producen la desintegración de las micelas de caseína en partículas de caseína de menor tamaño, con un descenso de la turbidez y aumento de la viscosidad de la leche (Huppertz, 2010; López-Fandiño, 2006). Además, la presión induce la disociación del fosfato de calcio coloidal y la desnaturalización de las proteínas del lactosuero, lo que puede cambiar y, en algunos casos mejorar, las propiedades tecnológicas de la leche y productos derivados. Las proteínas mayoritarias del lactosuero,  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA, se desnaturalizan tras tratamientos  $> 100$  ó  $> 400$  MPa, respectivamente. La mayor parte de la  $\beta$ -LG desnaturalizada forma agregados con las micelas de caseína de la leche, aunque parte permanece en el lactosuero o se adsorbe a la MFGM, al igual que la  $\alpha$ -LA desnaturalizada (Considine et al., 2007; Huppertz et al., 2006). Estos cambios se han aprovechado en el desarrollo de productos lácteos, como nata, yogurt y queso, con nuevas texturas y mayor calidad sensorial y nutricional, y con una vida útil más larga (Trujillo et al., 2002).

Aunque existen diversos estudios acerca del efecto de las HHP en el contenido y estructura de las proteínas lácteas, la mayoría de ellos se centran en la especie bovina y en las proteínas mayoritarias, fundamentalmente las caseínas y las proteínas del lactosuero (Mazri et al., 2012, 2011). Por el contrario, existen muy pocos estudios sobre el efecto que las HHP tienen sobre las propiedades biológicas de las proteínas lácteas (Franco et al., 2018, 2013), así como sobre proteínas minoritarias como las de la MFGM.

## **2.6. Leche humana**

### **2.6.1. Composición**

La leche humana es el alimento ideal para el recién nacido, proporcionándole la energía y los nutrientes necesarios para un crecimiento y desarrollo óptimo y saludable. Además, la leche humana aporta otros beneficios, ya que contiene compuestos con importantes actividades biológicas y fisiológicas que participan en el funcionamiento del tracto gastrointestinal, en el sistema inmunitario, en el sistema circulatorio o en el desarrollo neurológico del neonato (Blewett et al., 2008; Newburg et al., 2005), así como en la defensa frente a agentes patógenos (Ladomenou et al., 2010). De hecho, la Organización Mundial de la Salud recomienda la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida, introduciendo entonces la alimentación complementaria a la lactancia hasta los 2 años o más (Kramer y Kakuma, 2012).

La producción de leche humana es estimulada por cambios hormonales en el segundo y tercer trimestres del embarazo. La composición de la leche varía a lo largo de la lactación según las necesidades evolutivas del lactante. Se distinguen tres productos: calostro, leche de transición y leche madura, cuya composición general se incluye en la **Tabla 14**.

Inmediatamente tras el nacimiento, y hasta los 2-3 días postparto, se secreta el calostro. Este se produce en pequeñas cantidades (40-50 mL/día) y posee un elevado contenido en proteínas defensivas, especialmente Igs, LF y LYZ, minerales y vitaminas liposolubles (A, E y K). El calostro confiere al lactante una importante protección inmunitaria frente a los microorganismos ambientales y aporta factores de crecimiento epidérmicos que preparan el intestino para la absorción de nutrientes (Lønnerdal, 2016). Tras 4-5 días postparto, la leche empieza a producirse en mayor cantidad (300-800 mL/día) y cambia a un estado de transición que se mantiene hasta las 2-3 semanas. A partir de entonces la leche se considera madura o definitiva, dado que no cambia significativamente su composición durante el resto de la lactación (Morgan, 2006; OMS, 2009). Tal y como puede observarse en la **Tabla 14**, la leche madura contiene menos proteína y más lípidos y carbohidratos que el calostro y la leche de transición. El valor energético de la leche madura es de unas 65-70 kcal por 100 mL, debido principalmente al contenido de lípidos y lactosa (Ballard y Morrow, 2013; Guo, 2014).

**Tabla 14.** Composición (% p/v) de la leche humana en tres estadios de lactación: calostro, leche de transición y leche madura (Ballard y Morrow, 2013; Guo, 2014; Sousa et al., 2014).

Componente	Calostro	Leche de transición	Leche madura
<b>Sólidos totales</b>	11,5-11,8	11,3-12,6	11,4-12,9
<b>Proteínas</b>	1,3-2	1,2-1,5	0,9-1,3
<b>Caseínas</b>	ND	ND	0,3-0,4
<b>Proteínas del lactosuero</b>	ND	ND	0,6-0,7
<b>Lípidos</b>	2,6-3,4	3,2-3,7	3-4,2
<b>Lactosa</b>	6,6-6,7	6,6-6,9	6,7-7,8
<b>Oligosacáridos</b>	ND	ND	1
<b>Cenizas</b>	0,1	0,2	0,2

ND: no se han encontrado datos publicados.

La composición de la leche humana está influenciada por múltiples factores, genéticos, fisiológicos, el periodo de lactación, los hábitos alimentarios e incluso la contaminación

ambiental, todos ellos responsables de las diferencias entre individuos (Sousa et al., 2014; Wojcik et al., 2009).

En la leche humana, las proteínas mayoritarias son las caseínas y las proteínas del lactosuero, que suponen aproximadamente el 30-40% y el 60-70% de las proteínas totales, respectivamente. Tal y como se muestra en la **Tabla 15**, las proteínas mayoritarias del lactosuero humano son la  $\alpha$ -LA, la LF, las Igs, la LYZ, la SA y la lipasa estimulada por sales biliarias o BSSL (bile salt-stimulated lipase) (Guo, 2014).

**Tabla 15.** Concentración de las principales proteínas de la leche humana madura (Guo, 2014; Liu y Newburg, 2013; Shi et al., 2011).

<b>Caseínas</b>	<b>Contenido en leche (g/L)</b>	<b>% Total caseínas</b>
<b><math>\beta</math></b>	0,8-4,6	85
<b><math>\kappa</math></b>	0,1-4,6	15
<b>Proteínas del lactosuero</b>	<b>Contenido en leche (g/L)</b>	<b>% Total proteínas del lactosuero</b>
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	0,6-2,4	26
<b>LF</b>	1-2	26
<b>Igs:</b>		
<b>IgA</b>	0,2-1	16
<b>IgG</b>	0,2	ND
<b>IgM</b>	0,08	ND
<b>LYZ</b>	0,2-0,4	10
<b>SA</b>	0,2	10
<b>BSSL</b>	0,1-0,2	ND
<b>Proteínas de la MFGM</b>	<b>Contenido en leche (g/L)</b>	<b>% Total proteínas de la MFGM</b>
<b>MUCs</b>	0,07-0,7	ND
<b>LDH</b>	0,09	ND
<b>BTN</b>	0,04	ND

ND: no se han encontrado datos publicados.

Las proteínas de la MFGM, incluyendo las MUCs, la LDH y la BTN, representan menos del 5% del total de proteínas de la leche humana (Peterson et al., 2013). Si bien las principales características y propiedades de las proteínas lácteas se han descrito con anterioridad en los

apartados 2.2 y 2.3 del presente documento, en el punto 2.6.2 se ha incluido una breve revisión de la actividad biológica de las proteínas de la leche humana.

La grasa es el componente de mayor variabilidad en la leche humana y se caracteriza por su alto contenido en los ácidos palmítico y oleico. El contenido en ácidos grasos poliinsaturados depende fundamentalmente de la dieta materna (Ballard y Morrow, 2013). El mecanismo de secreción de los lípidos de la leche en forma de glóbulos de grasa rodeados por la MFGM, así como las propiedades físico-químicas, nutricionales e inmunológicas atribuidas, se mantiene entre especies, incluida la humana (García y Innis, 2013).

Los carbohidratos de la leche humana favorecen el crecimiento de la microbiota bifidogénica y actúan como receptores de agentes patógenos, previniendo el ataque de éstos a la mucosa intestinal. Aunque el principal azúcar de la leche es la lactosa, contiene también alrededor de 1 g de oligosacáridos/100 mL (Morgan, 2006).

Por otra parte, la leche humana contiene gran cantidad de micronutrientes cuya composición depende de la dieta y de las reservas corporales de la madre. Entre ellos destacan las vitaminas A, B1, B2, B6, B12 y los minerales calcio y fósforo (Ballard y Morrow, 2013).

### **2.6.2. Actividad biológica de las proteínas de la leche humana**

Aunque inicialmente se pensaba que la leche humana solamente aportaba nutrientes al recién nacido, en la actualidad está ampliamente aceptado que incluye además un amplio espectro de componentes bioactivos, responsables de múltiples beneficios para el lactante (Hendricks y Guo, 2014). En particular, la fracción proteica de la leche humana desempeña un papel importante en su bioactividad (Lönnerdal, 2016). En la **Tabla 16** se incluye un resumen de la actividad biológica exhibida por las principales proteínas de la leche humana.

Uno de los mecanismos de protección atribuidos a la leche humana está asociado a su contenido en compuestos glicoconjugados, principalmente oligosacáridos (Kunz et al., 2014) y glicoproteínas (Liu y Newburg, 2013). Estos grupos glicosilados pueden actuar como receptores señuelo, dificultando la unión de agentes patógenos, como bacterias, virus y levaduras, a la superficie celular y la posterior infección (Peterson et al., 2013). Esta actividad protectora reduce el riesgo de procesos como enterocolitis, gastroenteritis, infecciones respiratorias y enfermedades de base inmunológica, entre otros. Se ha demostrado, además, que algunas proteínas de la leche humana promueven el crecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal, facilitan la digestión y absorción de nutrientes como el hierro, el calcio y la vitamina B12, y proporcionan protección inmunitaria frente a antígenos específicos (Lönnerdal, 2016).

**Tabla 16.** Actividad biológica de las principales proteínas de la leche humana (Ballard y Morrow, 2013; Hendricks y Guo, 2014; Liu y Newburg, 2013; Lönnerdal, 2016).

<b>Proteína</b>	<b>Actividad biológica</b>
<b>LF</b>	Bacteriostática; bactericida; antivírica; antifúngica; inmunomoduladora; diferenciación y proliferación celular; antioxidante.
<b><math>\alpha</math>-LA</b>	Prebiótica; antibacteriana; antivírica; inmunoestimuladora; absorción de hierro y zinc; biosíntesis de lactosa.
<b>IgA</b>	Transferencia de inmunidad; anticuerpos frente a bacterias y virus.
<b>LYZ</b>	Actividad antibacteriana.
<b>BSSL</b>	Hidrólisis de triglicéridos; absorción de grasa; actividad antibacteriana, antivírica y antiprotozoica.
<b>Caseína-<math>\beta</math></b>	Actividad opioide; absorción de calcio; antibacteriana.
<b>Caseína-<math>\kappa</math></b>	Actividad antibacteriana y prebiótica.
<b>MUCs</b>	Actividad antibacteriana y antivírica.
<b>LDH</b>	Actividad antibacteriana, antivírica y antiinflamatoria.
<b>BTN</b>	Formación de la MFGM.

Entre las proteínas bioactivas de la leche humana se incluyen también diversos factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformante alfa, y el factor de crecimiento similar a la insulina. Estos factores estimulan la proliferación de células intestinales y la formación de la barrera mucosa en el recién nacido (Donovan y Odle, 1994; Kobata et al., 2008).

A pesar del potencial de la leche humana como fuente de proteínas bioactivas, su purificación a partir de leche presenta problemas importantes de seguridad, ya que puede haber contaminación con patógenos humanos, y de limitación en la fuente de obtención (Wakabayashi et al., 2006). Así, en los últimos años se han realizado importantes investigaciones para la producción de proteínas como la lactoferrina o la lisozima en varios sistemas biológicos, incluyendo vacas y ratones transgénicos, células de riñón de hámster, células de insecto, baculovirus, cultivos fúngicos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus awamori*, y plantas como el tabaco, el maíz y el arroz (Conesa et al., 2010a), algunas de ellas de uso comercial.

En la mayoría de estudios se ha observado que la estructura de la lactoferrina humana recombinante (rhLF) es prácticamente idéntica a la de la LF nativa de leche humana, aunque existen algunas diferencias en cuanto al tipo y grado de glicosilación (Baker y Baker, 2004; Conesa et al., 2010; Samyn-Petit et al., 2001). Además, la rhLF mantiene las actividades



biológicas propias de la LF humana nativa, como la capacidad de unir hierro y la actividad antimicrobiana (Conesa et al., 2009; Ward et al., 1995). Por otra parte, se ha observado que la resistencia a la digestión enzimática y al tratamiento térmico, así como el comportamiento frente a distintos pHs, son similares entre la rhLF y la LF nativa obtenida de leche humana (Nandi et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

### 2.6.3. Bancos de leche humana

Un banco de leche es el centro sanitario establecido para la recogida de leche humana en el que se procesa, almacena y distribuye, con todas las garantías sanitarias, a los pacientes que la precisen (AEBLH, 2018; Baumer, 2004).

Tal y como se ha comentado anteriormente, la leche humana es el mejor alimento para el recién nacido, ya que aporta los nutrientes que necesita para un crecimiento y desarrollo saludables, además de reforzar el sistema inmunológico y protegerle de numerosas enfermedades. A pesar de esto, y aún siendo especialmente beneficiosa para los recién nacidos prematuros, con bajo peso al nacimiento o con ciertas enfermedades, no todos los lactantes pueden recibir la leche de sus madres, ya sea porque no producen leche suficiente, por incompatibilidad laboral, por enfermedad, por estar recibiendo tratamiento farmacológico, o por fallecimiento. En estos casos, la leche de banco supone la mejor alternativa para los lactantes, con preferencia frente a las leches de fórmula, al menos durante los primeros 6 meses de vida, según recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2009).

El objetivo de los bancos de leche es asegurar la alimentación con leche humana de todos los bebés prematuros o recién nacidos que la necesiten por prescripción médica y que no pueden ser amamantados por su propia madre. Puede ser donante de leche materna, de forma altruista, cualquier mujer que goce de buena salud, que haya sido madre hace menos de seis meses y esté lactando. Las indicaciones más comunes para prescribir leche de banco son nutricionales (prematuridad, síndrome de malabsorción, errores metabólicos y nutrición posquirúrgica), terapéuticas (enfermedades infecciosas, inmunodeficiencias, trasplante de órganos, enfermedades crónicas) y/o preventivas (enterocolitis crónica necrotizante, alergia a proteínas de la leche de vaca, terapia inmunosupresora) (AEBLH, 2018; Guo y Ahmad, 2014b).

Los bancos de leche han estado operativos en Europa desde 1909. A pesar de que su popularidad y uso disminuyó durante los años 80, coincidiendo con la emergencia del VIH y el desarrollo de fórmulas para alimentación infantil, en la actualidad se encuentran extendidos por todo el mundo, con una tendencia creciente en interés, inversión y creación de nuevos bancos (Guo y Ahmad, 2014b). De hecho, tal y como puede observarse en la **Figura 14**, existen en la actualidad 225 bancos de leche activos en Europa, y 16 están en proceso de creación (EMBA,

2018). En España existen actualmente 10 bancos de leche activos, más uno en proceso de creación, en los que más de 1.550 madres donaron, en el año 2016, más de 7.400 L de leche, de los que se beneficiaron 2.281 neonatos, en su mayoría prematuros de muy bajo peso, en 43 hospitales (AEBLH, 2018).



**Figura 14.** Bancos de leche materna en Europa: distribución por países (EMBA, 2018).

La extracción, recogida, conservación y tratamiento de la leche debe seguir unas estrictas guías internacionales de actuación para garantizar una adecuada seguridad sanitaria y microbiológica, así como una calidad nutricional óptima (Moltó-Puigmartí et al., 2011). Así, las donantes reciben un extractor manual, envases de recogida estériles, etiquetas identificativas y un manual de instrucciones para realizar correctamente el proceso. La leche se almacena en congelación hasta su envío al banco, que debe realizarse en un plazo máximo de 15 días desde su obtención (AEBLH, 2018). En el banco, la leche recibida se mantiene congelada hasta su pasteurización, normalmente a 62,5 °C durante 30 min (equivalente a la pasteurización LTLT), que garantiza la calidad higiénica de la leche (Arslanoglu et al., 2010). Una vez pasteurizada, la leche se conserva en congelación debidamente etiquetada hasta su envío a los hospitales, donde se administrará bajo prescripción médica a los bebés que la necesiten (Tully et al., 2001; Updegrave, 2005). Durante el procesado y almacenamiento de la leche se realizan controles de su calidad nutricional (Leaf y Winterson, 2009).

Si bien el proceso de pasteurización elimina los microorganismos patógenos de la leche, como virus y bacterias, diversos estudios han demostrado que también puede reducir el contenido de macronutrientes de la leche y alterar su adecuación a las necesidades específicas de los niños prematuros (Modi, 2006; Tully et al., 2001). De hecho, se ha descrito una pérdida del 3,9% de proteína, y del 5,5% de lípidos de la leche, sin efecto en la concentración de lactosa (Vieira et al., 2011). La pasteurización afecta también a diversos componentes nutricionales e inmunológicos de la leche humana, aunque muchas enzimas, hormonas y factores de crecimiento permanecen intactos o se alteran mínimamente (Koenig et al., 2005). Diversos estudios han demostrado, en cambio, que el tratamiento térmico induce la pérdida de algunos componentes de la leche humana, como las Igs, LF y LYZ, tanto en términos de concentración (Peila et al., 2016) como de actividad biológica (Chantry et al., 2011; Conesa et al., 2009; Silvestre et al., 2008).

Como consecuencia de ello, en los últimos años está creciendo el interés en desarrollar métodos alternativos para la higienización de la leche humana, capaces de garantizar la calidad sanitaria manteniendo una mayor calidad nutricional y el potencial bioactivo. Así, diversos estudios han apuntado al uso del tratamiento térmico HTST o al empleo de HHP (Giribaldi et al., 2016; Mayayo et al., 2016; Peila et al., 2017).

#### **2.6.4. Fórmulas infantiles**

La fórmula infantil se define como un alimento adecuado para sustituir parcial o totalmente a la leche humana, cubriendo los requerimientos nutricionales del lactante (Koletzko et al., 2005). Aunque la leche materna es el alimento óptimo para la nutrición y desarrollo del recién nacido hasta los 6 meses, en muchas ocasiones la madre no puede o no quiere dar lactancia. En estos casos, y a excepción de aquellos en los que se prescribe la administración de leche humana de bancos, normalmente se suele emplear la lactancia artificial mediante fórmulas infantiles, que pueden ser de diversos tipos (Guo y Ahmad, 2014c). En la **Tabla 17** se incluyen los componentes y usos de los principales tipos de fórmulas infantiles.

**Tabla 17.** Componentes y usos de los principales tipos de fórmulas infantiles (Guo y Ahmad, 2014c; Lemale, 2014; Packard, 1982).

<b>Fórmulas</b>	<b>Componentes principales</b>	<b>Usos</b>
<b>Basada en leche de vaca</b>	La leche de vaca se enriquece en proteínas del lactosuero > 22% (p/p). Suplementación con lactosa, aceites vegetales y otros minerales.	Opción más adecuada y habitual para la mayoría de niños.
<b>Basada en soja</b>	La soja es la única fuente proteica. No contiene lactosa. Jarabe de glucosa como principal carbohidrato. Grasa de origen vegetal. Adición de L-metionina, hierro y zinc.	Niños con galactosemia e intolerancia a la lactosa. Alergia a las proteínas de la leche de vaca. Dietas sin proteínas animales por razones religiosas o éticas.
<b>Hipoalergénica</b>	Los hidrolizados de proteínas (aminoácidos libres) suponen la única fuente de proteína.	Niños con alergias a proteínas leche de vaca.
<b>Sin lactosa</b>	Basada en leche de vaca. Sustitución de lactosa por maltodextrina.	Niños con galactosemia e intolerancia a la lactosa.
<b>Otras</b>	Fórmulas antirregurgitación/antirreflujo: empleo de agentes espesantes como almidón y gomas. Fórmulas para niños con infrapeso: mayor contenido calórico y mineral. Fórmulas para niños con problemas cardiacos y/o digestivos: inclusión de grasas y/o proteínas degradadas, o exclusión de determinados componentes.	Niños con reflujo, infrapeso, irritabilidad, problemas digestivos, etc.

Se distinguen fórmulas infantiles de iniciación (leche maternizada), destinadas a la nutrición del lactante durante los 6 primeros meses de vida, y fórmulas de continuación, de 6 a 12 meses. Dichas fórmulas presentan una composición que suele estar basada en la leche de vaca, suplementada para asemejarse lo más posible a la leche materna (Dalmau et al., 2015). Además, en los últimos años las fórmulas han evolucionado para evitar trastornos digestivos del lactante o para prevenir la aparición de enfermedades. De hecho, cada fórmula puede prescribirse en función del estado fisiológico del lactante o del efecto preventivo buscado (Lemale, 2014).

Así, algunas fórmulas tienen indicaciones médicas reconocidas, como las fórmulas pre-espesadas en caso de reflujo gastroesofágico (Vandenplas et al., 2009); las fórmulas sin o pobres en lactosa en caso de diarrea grave (Brown et al., 1994); las fórmulas hipoalergénicas, que contienen proteínas parcialmente hidrolizadas, si existen antecedentes atópicos familiares (Agostoni et al., 2008; von Berg et al., 2007); las fórmulas de proteínas extensamente

hidrolizadas en caso de alergia a las proteínas de leche de vaca, con aparición de manifestaciones clínicas debidas a una respuesta inmunológica anormal (Saarinen et al., 1999); fórmulas con proteína aislada de soja y sin lactosa, destinadas a niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca, intolerancia a la lactosa, galactosemia y dietas vegetarianas (Bhatia y Greer, 2008); fórmulas que contengan probióticos, prebióticos o fermentos lácticos en caso de estreñimiento o cólicos (Braegger et al., 2011); y fórmulas ricas en caseína en los lactantes insaciables (Guo y Ahmad, 2014a; Lemale, 2014).

La composición de las fórmulas infantiles, tanto maternizadas como de continuación y especiales, deben cumplir con las recomendaciones de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (Koletzko et al., 2005), así como del Reglamento (UE) 2016/127 de la Comisión en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como a los requisitos de información sobre los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad (DOUE, 2016). Los fabricantes tienen que ceñirse a la normativa europea, no pudiendo variar la proporción de los constituyentes de las preparaciones infantiles. En la **Tabla 18** se muestra la composición media de los principales tipos de fórmulas infantiles.

La mayoría de las leches de fórmula infantiles son fabricadas a partir de leche de vaca, y las cantidades y proporciones de los macronutrientes, minerales, vitaminas y aporte energético se ajustan, lo mejor posible, en base a la composición media de la leche materna.

Las proteínas presentes mayoritariamente en estas preparaciones infantiles son las caseínas y las proteínas del lactosuero (Guo y Ahmad, 2014c). Las leches infantiles deben contener las mismas cantidades de cada aminoácido esencial y de algunos aminoácidos semiesenciales que las proteínas de la leche materna, para un mismo valor energético. El enriquecimiento en proteínas solubles aporta una mayor digestibilidad a la leche y permite tener heces más blandas (Dalmau et al., 2015). Aparte de las caseínas y proteínas del lactosuero, en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de la MFGM como ingrediente en las fórmulas infantiles, debido a su composición en fosfolípidos y glicoproteínas. Estos componentes participan en el desarrollo cerebral y mejoran la función cognitiva de los bebés, entre otras funciones (Ross et al., 2015). Así, por ejemplo, el Lacprodan® MFGM-10 es un concentrado de proteínas del lactosuero enriquecido en MFGM, utilizado en fórmulas infantiles y en nutrición clínica puesto que presenta una alta concentración de proteínas y lípidos bioactivos. De hecho, se ha demostrado que este producto es capaz de inhibir la infección por rotavirus de células intestinales humanas en cultivo (Kvistgaard et al., 2004) y de ejercer un papel como prebiótico para *Lactobacillus gasseri* en niños (Vestman et al., 2013).

**Tabla 18.** Composición (por 100 mL de leche) de los principales tipos de leche infantil de fórmula (Bhatia y Greer, 2008; Guo y Ahmad, 2014c; Jardí et al., 2015; Koletzko et al., 2005; Lemale, 2014; Reche et al., 2010).

Componente	Basada en leche de vaca		Basada en soja	Hipoalergénica
	Inicio	Continuación		
<b>Energía (Kcal)</b>	66-70	63-70	67	68-71
<b>Proteínas (g)</b>	1,2-1,6	1,3-1,8	1,6-1,9	1,7-2
<b>Caseínas (%)</b>	30-60	40-83	0	ND
<b>Proteínas del lactosuero (%)</b>	40-70	17-60	0	ND
<b>Lípidos (g)</b>	3,1-3,7	2,7-3,6	3,4-3,6	3,1-3,6
<b>Ác. linoleico (g)</b>	0,3-0,6	0,3-0,7	0,5	0,4-0,7
<b>Ác. linolénico (mg)</b>	46-101	48-101	65	60-90
<b>Carbohidratos (g)</b>	7-8,8	7,4-9,3	6,9-7,4	7,9-8,3
<b>Lactosa (%)</b>	40-100	40-100	0	ND
<b>Maltodextrina (%)</b>	0-60	0-60	ND	6,3-8,3
<b>Minerales (mg)</b>				
<b>Sodio</b>	16-32	16-34	20	26-38
<b>Potasio</b>	53-92	50-83	65	60-93
<b>Calcio</b>	43-70	29-50	50	63-83
<b>Fósforo</b>	23-53	0,7-1,4	30	35-51
<b>Hierro</b>	0,7-0,9	ND	0,8	0,8-1,1
<b>Vitaminas</b>				
<b>Retinol (µg)</b>	58-81	59-81	70	63-65
<b>Vitamina D (µg)</b>	0,6-1,7	0,6-2,1	1,2	1,1-1,7
<b>Vitamina C (mg)</b>	7,1-13	7-14	9,1	7-7,3
<b>Ácido fólico (µg)</b>	5,5-14	1,4-2,3	10	5,6-15
<b>Tiamina (µg)</b>	40-70	50-120	60	70-80
<b>Riboflavina (µg)</b>	80-170	40-120	90	80-120
<b>Vitamina B12 (µg)</b>	0,1-0,2	0,5-1,5	0,1	0,3

ND: no se han encontrado datos publicados.

Las fórmulas infantiles están constituidas esencialmente por grasas vegetales, ácido linoleico y ácido linolénico, que son precursores de la familia de los omega-3 y omega-6, con papeles destacados en el desarrollo del sistema nervioso central, el funcionamiento de la retina y la transmisión de información al cerebro del bebé (Campoy et al., 2012; Mendonca et al., 2017). Además, tienen una composición mixta de glúcidos de alrededor de un 75% de lactosa y un 25% de dextrina-maltosa. Algunas leches sólo contienen lactosa, lo que las asemeja a la composición de la leche materna. Una parte de la lactosa no se digiere y experimenta una fermentación con formación de ácidos orgánicos que pueden mejorar el tránsito intestinal en los lactantes, pero también favorecen la distensión y los cólicos (Tamayo et al., 1997).

Tal y como se muestra en la **Tabla 18**, la composición de las fórmulas de continuación difiere muy poco de la de las fórmulas de inicio, por lo que algunas marcas fabrican fórmulas únicas de 0-12 meses (Jardí et al., 2015). Las fórmulas de continuación suelen presentar mayor cantidad de glúcidos y proteínas, menor contenido en lípidos, calcio y fósforo, y deben estar suplementadas con hierro. Además, la proporción caseína/proteínas solubles es más elevada (Lemale, 2014).

En las fórmulas a base de soja, el componente proteico se obtiene de la proteína purificada de la soja, la cual es tratada posteriormente con calor para reducir la actividad de los inhibidores de tripsina y hemaglutininas. Son fórmulas de origen vegetal y, por lo tanto, no contienen lactosa, sino polímeros de glucosa. Estas fórmulas deben ser suplementadas con metionina y L-carnitina, componentes de los que la soja carece, y enriquecidas con hierro y zinc, debido a su baja biodisponibilidad por el alto contenido en fitatos quelantes (Bhatia y Greer, 2008; Leung y Otley, 2009).

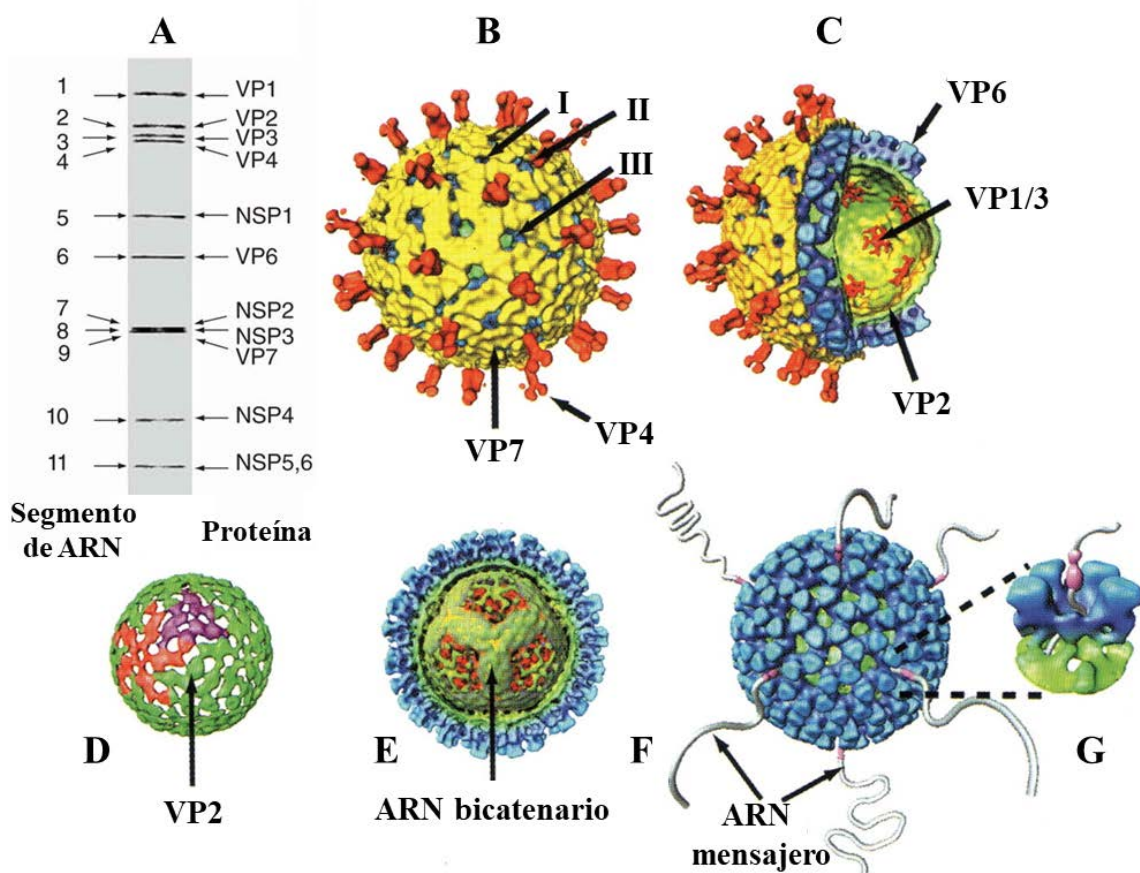
En las fórmulas hipoalergénicas, las proteínas de la leche (caseína, proteínas del suero, o ambas) o de origen diferente (como proteína de soja o arroz), son tratadas con calor e hidrólisis enzimática, y posteriormente ultrafiltradas, obteniendo así una mezcla de oligopéptidos y aminoácidos. Además, habitualmente se sustituye la lactosa por maltodextrina o polímeros de glucosa y se suplementan con taurina y L-carnitina (Host y Halcken, 2004; Reche et al., 2010).

Las fórmulas infantiles pueden presentarse como productos en polvo, como líquidos concentrados o en preparaciones listas para su uso. En todos los casos, las fórmulas se obtienen mezclando los diversos componentes, con posterior homogeneización y pasteurización. En función del formato, se incluye una etapa final de concentración, secado por atomización (pulverización) o esterilización. Se sabe que estos procesos pueden desencadenar interacciones y/o redistribución de componentes de las fórmulas (Hendricks y Guo, 2014b). Así, diversos estudios han descrito que los tratamientos térmicos durante el procesado de fórmulas infantiles inducen interacciones entre las caseínas y las proteínas del lactosuero (Dalgleish, 1990; Hines y Foegeding, 1993). Estas interacciones se han asociado con la redistribución de nutrientes, como nitrógeno o minerales asociados a las caseínas, y la consiguiente pérdida de propiedades nutritivas y funcionales de las fórmulas (Clydesdale et al., 1991), lo que es especialmente relevante teniendo en cuenta los altos estándares demandados para estos productos.

## 2.7. Rotavirus

### 2.7.1. Estructura

Los rotavirus pertenecen a la familia Reoviridae, y se caracterizan por tener una cápside multicapa icosaédrica y sin envoltura, que mide 65-75 nm de diámetro. Tal y como puede observarse en el esquema realizado por Matthijnsens y Desselberger (2012) (**Figura 15**), las partículas de rotavirus están formadas por una triple capa de proteínas que rodean el genoma viral, que está compuesto por 11 segmentos de ARN bicatenario. A estas partículas se les denomina partículas de triple capa (TLPs, triple layered particles) (Estes y Greenberg, 2013).



**Figura 15.** Representación esquemática de la estructura de la partícula de rotavirus (Matthijnsens y Desselberger, 2012). La explicación a las imágenes A-G se incluye en el texto.



Los diferentes segmentos de ARN codifican las 6 proteínas estructurales (VP1-VP6), que forman la triple capa de las partículas víricas, y las 6 proteínas no estructurales (NSP1-NSP6), que son esenciales para la replicación de los virus.

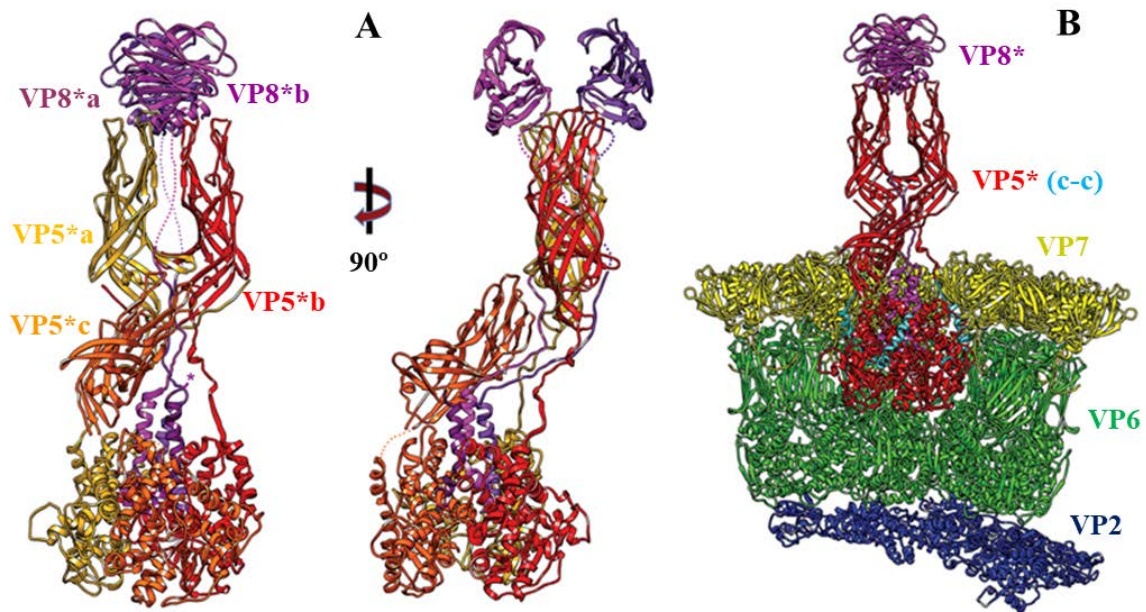
En la **Figura 15-A** se representa una electroforesis en la que se muestra a la izquierda los segmentos de ARN viral numerados según su migración en el gel, frente a las proteínas que codifican, en la parte derecha. Los genes 7, 8 y 9 tienen un tamaño similar, por lo que aparecen casi solapados en el gel. El gen 11 codifica la síntesis de las proteínas no estructurales NSP5 y NSP6 (Harrison y Dormitzer, 2016).

La capa externa de las TLPs (**Figura 15-B**) está compuesta por 780 trímeros de la glicoproteína VP7 (en amarillo), que forman una superficie uniforme sobre la que sobresalen 120 trímeros de la proteína VP4 (en rojo), a modo de espigas (Estes y Greenberg, 2013; Pesavento et al., 2006). Repartidos por la cápside existen tres tipos de canales acuosos, marcados como I, II y III, cuya función biológica se asocia con el transporte de los metabolitos necesarios para la transcripción del ARN viral, así como con la salida de ARN transcrito para los procesos de replicación subsiguientes (Estes y Cohen, 1989).

La capa intermedia está compuesta por 780 trímeros de la proteína VP6 (en azul), mientras que la capa interna la forman 120 dímeros de la proteína VP2 (en verde) (**Figura 15-C**) (Mathieu et al., 2001). Las proteínas VP1 y VP3 están unidas, formando el complejo de transcripción enzimática (VP1/3, en rojo), que tiene forma estrellada y se localiza en la capa interna de VP2 debajo de los canales I (**Figuras 15-C y 15-D**) (McClain et al., 2010). Las partículas de doble capa (DLPs, double layered particles) han perdido la cápside viral pero conservan la capa intermedia de VP6 y la interna que protege el material genético (**Figura 15-E**). Las DLPs son partículas transcripcionalmente activas. Una de las vías de salida propuestas para el ARN mensajero viral es a través de las capas interna e intermedia por los canales tipo I (**Figuras 15-F y 15-G**) (Zhang et al., 2015).

Las dos proteínas de la cápside viral, VP4 y VP7, son responsables de la interacción inicial de las partículas víricas con los receptores celulares y de su posterior entrada en la célula (López y Arias, 2004). La infectividad de los rotavirus depende y aumenta con el tratamiento del virus con tripsina. Así, se ha demostrado que el tratamiento proteolítico se localiza específicamente en la proteína VP4 de la cápside, causando una modificación consistente en la diferenciación estructural de dos dominios polipeptídicos, VP5\* y VP8\* (Arias et al., 1996).

En la **Figura 16** se puede observar la estructura de la proteína VP4, representada por Settembre et al. (2011). El dominio N-terminal VP8\* (en magenta) contiene dos fragmentos (a y b); mientras que el dominio C-terminal VP5\* está formado por tres fragmentos, a (en amarillo), b (en rojo) y c (en naranja), unidos por una triple cadena en forma de espiral (c-c, en cian) (Harrison y Dormitzer, 2016). La proteína VP4 está encajada en la cápside externa formada por la VP7 y contacta con los trímeros de VP6 de la capa intermedia (Settembre et al., 2011).



**Figura 16.** (A) Estructura de la proteína VP4 y sus dominios VP5\* y VP8\*. (B) Vista transversal de una TLP. La proteína VP4 contacta con las proteínas VP6 y VP7 (Settembre et al., 2011).

Las características y funciones principales de las proteínas estructurales y no estructurales de los rotavirus se incluyen en la **Tabla 19**.

**Tabla 19.** Características y funciones principales de las proteínas estructurales (VP) y no estructurales (NSP) de los rotavirus (Estes y Greenberg, 2013; Pesavento et al., 2006).

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Peso molecular (kDa)</b>	<b>Localización capa (copias/virión)</b>	<b>Función</b>
<b>1</b>	VP1	125	Interna (12)	ARN polimerasa, unión de ARN, interacción con VP2 y VP3
<b>2</b>	VP2	95	Interna (120)	Unión de ARN, interacción con VP1
<b>3</b>	VP3	88	Interna (12)	Guanilil y metil transferasa, unión de ARN, interacción con VP1
<b>4</b>	VP4 (VP5*+VP8*)	85 (58+27)	Externa (120)	Hemaglutinina, antígeno de neutralización (P-tipo), virulencia, infectividad, unión celular
<b>5</b>	NSP1	53	No estructural	Unión de ARN, antagonista de la respuesta a interferones
<b>6</b>	VP6	45	Intermedia (780)	Trímero hidrofóbico, antígeno de grupo y subgrupo
<b>7</b>	NSP3	34	No estructural	Translación de ARNm, unión de ARN
<b>8</b>	NSP2	35	No estructural	Replicación y empaquetado del genoma, constituyente principal del viroplasma, NTPasa, unión de ARN, interacciona con NSP5
<b>9</b>	VP7	34	Externa (780)	Glicoproteína integral del retículo endoplasmático rugoso, antígeno de neutralización (G-tipo), unión del Ca <sup>++</sup>
<b>10</b>	NSP4	20	No estructural	Glicoproteína integral del retículo endoplasmático rugoso, papel en morfogénesis, enterotoxina viral
<b>11</b>	NSP5	26	No estructural	Constituyente del viroplasma, NTPasa, unión de ARN, interacciona con NSP2, proteína quinasa
<b>11</b>	NSP6	11	No estructural	Constituyente del viroplasma, interacciona con NSP5

### 2.7.2. Clasificación

Los rotavirus presentan tres importantes especificidades antigénicas, lo que permite clasificarlos en grupos, subgrupos y serotipos (Bányai y Pitzer, 2016). En base a la especificidad conferida principalmente por la proteína VP6, los rotavirus se clasifican en ocho grupos, de la A a la H. Los rotavirus asociados a las infecciones en seres humanos y otros mamíferos se encuadran mayoritariamente en el grupo A, por lo que el estudio y desarrollo de vacunas se ha dirigido principalmente a este grupo (Matthijnssens et al., 2012; Mihalov-Kovács et al., 2015). La especificidad de subgrupo también está determinada por la proteína VP6 y se ha usado para caracterizar las propiedades antigénicas de diversas cepas de rotavirus en estudios epidemiológicos. La mayoría de rotavirus implicados en infecciones a seres humanos pertenecen a los subgrupos I o II (Hoshino y Zapikian, 2000).

La diferenciación de serotipos está determinada por las proteínas de la cápsida externa, VP4 y VP7, que presentan epítomos específicos responsables de producir una respuesta antigénica específica (anticuerpos neutralizantes), en ensayos de neutralización (Greenberg et al., 1983). En base a estas especificidades, se emplea una nomenclatura dual para designar a las diferentes cepas de rotavirus. Así, las variantes antigénicas de la VP7 se designan con la letra G (puesto que la VP7 es una glicoproteína) seguida de un número (p. ej. G1). Las variantes antigénicas de la VP4 se distinguen con una P (puesto que la VP4 es sensible a las proteasas) seguida de un número (p. ej. P1) (Estes y Greenberg, 2013).

El hecho de que las características antigénicas de los serotipos G y P se corresponda con determinadas secuencias aminoacídicas, ha permitido introducir un sistema de genotipado (robusto sólo para los rotavirus del grupo A), que complementa al serotipado en la clasificación de los rotavirus (Matthijnssens et al., 2008). En el caso de la VP7, la correspondencia entre serotipo y genotipo es idéntica, por lo que se mantiene sólo la nomenclatura del serotipo (p. ej. G1). En cambio, en el caso de la VP4, se han observado discrepancias entre serotipo y genotipo, lo que ha obligado a adaptar la forma de designarlos. Así, el serotipo se nombra como una P seguida de un número y, a continuación, el genotipo se designa con un número entre corchetes (p. ej. P3[9]) (Estes y Greenberg, 2013; Hoshino y Zapikian, 2000).

Hasta la fecha, se han descrito 27 genotipos G y 37 genotipos P distintos en seres humanos y animales (Trojnar et al., 2013). La mayoría de rotavirus que provocan gastroenteritis en humanos pertenecen a los genotipos G1P[8] (38% del total), G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], y G12P[8] (Bányai et al., 2012; Dóro et al., 2014). Con respecto a los rotavirus bovinos, se han encontrado al menos 9 genotipos G (G1-4, 6-8, 10, 11) y 3 genotipos P (P1, P5 y P11), si bien los más predominantes son G6, G10, P[5] y P[11], siendo G6P[11] la combinación más

frecuente (Alkan et al., 2010; Suocheng et al., 2013). No se han observado diferencias en la severidad de las infecciones provocadas por genotipos diferentes (Bányai et al., 2012).

### **2.7.3. Infección y replicación**

Los rotavirus infectan de manera muy específica los enterocitos maduros del epitelio vellosos del intestino delgado (Bishop, 2009), causando un daño severo en las microvellosidades y provocando malabsorción y pérdida de fluidos (Navarro et al., 2016). La entrada de los rotavirus en las células epiteliales es un proceso multietapa en el que están involucradas las dos proteínas de la cápside externa del virus, VP4 y VP7, y múltiples componentes de la superficie celular, incluyendo glicanos, ácidos siálicos, integrinas, la proteína de choque térmico 70 (hsc70), antígenos de grupo histo-sanguíneo o HBGAs (histo-blood group antigens) y algunos gangliósidos, que actúan como receptores celulares en la unión del virus a la célula y en etapas posteriores de la infección (Isa et al., 2008, 2006; Martínez et al., 2013).

La unión del rotavirus a la célula es una etapa crítica en la infección. Diversos estudios han evidenciado que las cepas de rotavirus difieren en su afinidad por los glicanos de la superficie celular, especialmente por los receptores que contienen ácido siálico (Arias et al., 2016; Prasad et al., 2014; Yu y Blanchard, 2014). La unión a la célula, y su posterior infección, mediada por algunas cepas de rotavirus animales, se reduce significativamente tras eliminar el ácido siálico de la superficie celular mediante tratamiento con neuraminidasa (NA), por lo que se clasifican como cepas sensibles a NA. En cambio, otras cepas de rotavirus animales y la mayoría de cepas humanas se clasifican como cepas resistentes a NA, puesto que su unión a las células y su infectividad no se ven afectadas por el tratamiento con NA (Arias et al., 2016).

La infectividad de los rotavirus se incrementa tras exponerse a la acción de proteasas intestinales, principalmente tripsina, que provocan un cambio conformacional en la proteína VP4, exponiendo sus dominios funcionales N-terminal VP8\* y C-terminal VP5\*, que permanecen unidos al virus (Rodríguez et al., 2014) y favorecen su penetración en la célula (Arias et al., 1996; Rodríguez et al., 2014).

El dominio VP8\*, localizado en la parte superior o cabeza de la proteína viral VP4, es el que más varía entre las estructuras proteicas de las diferentes cepas de rotavirus (Coulson, 2015). Interviene en la interacción inicial entre la partícula viral y la célula, uniéndose a glicanos de la superficie celular, como ácidos siálicos terminales e internos, gangliósidos y HBGAs. La VP8\* está también implicada en la apertura de las uniones estrechas intercelulares, lo que facilita el acceso de los rotavirus a los receptores celulares (Torres-Flores et al., 2015).

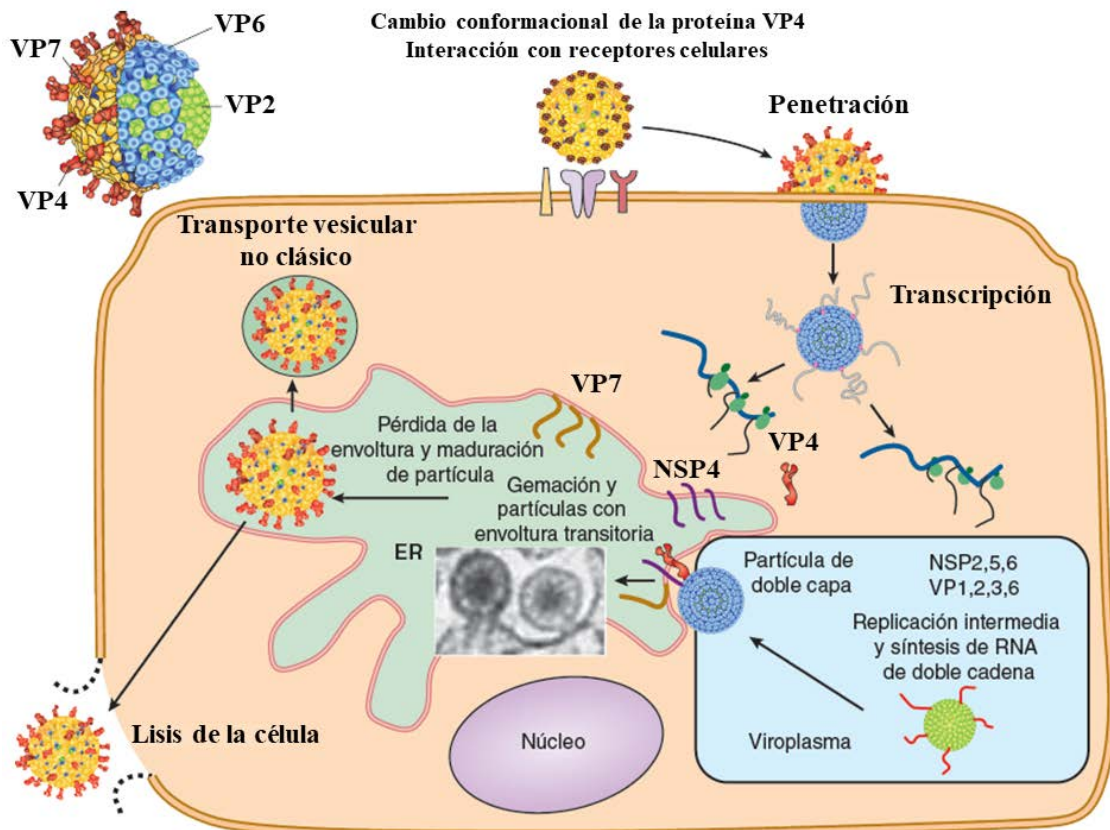
El dominio VP5\* y la proteína VP7 intervienen, en cambio, en interacciones posteriores de la partícula viral con diversas moléculas de la superficie celular (López y Arias, 2004; Zárate et al., 2000b). Así, la VP5\*, que conforma la mayoría del cuerpo o parte central, y del pie o parte inferior de la proteína VP4, expone un dominio hidrofóbico importante en la fase de penetración en la membrana de la célula hospedadora (Abdelhakim et al., 2014). Muchos rotavirus usan la VP5\* para unirse a la integrina  $\alpha 2\beta 1$  de la superficie celular y facilitar la infección (Graham et al., 2006). Por otra parte, la proteína VP7 participa en la entrada del virus a la célula mediante interacción con las integrinas  $\alpha x\beta 2$  y  $\alpha v\beta 3$  (Graham et al., 2003; Guerrero et al., 2000a), si bien en algunos tipos de células también están implicadas las integrinas  $\alpha 4\beta 1/7$  (Coulson et al., 1997; Graham et al., 2005).

Los microdominios lipídicos de la membrana celular, así como la proteína hsc70, parecen participar también en el complejo proceso de entrada de los rotavirus en la célula, posiblemente mediante su interacción con las integrinas y los receptores glicosilados (Fleming et al., 2014; Guerrero et al., 2000b; Isa et al., 2004). A pesar de estas observaciones, el papel de los receptores celulares en la infección por rotavirus no se conoce con precisión. De hecho, todavía se desconoce cuáles son los receptores necesarios para que se produzca una infección eficiente, si los receptores interactúan con los mismos sitios de los dominios VP8\* y VP5\* virales, o cuál es la causa de la divergencia entre cepas, en lo que respecta a su afinidad por los glicanos (Coulson, 2015).

En la **Figura 17** se muestra el esquema del ciclo de replicación del rotavirus, realizado por Champoux et al. (2010). Tal y como puede observarse, la replicación eficiente requiere la fragmentación proteolítica de la proteína VP4 de la cápside externa del virus, que ocurre en el tracto gastrointestinal, provocando un cambio conformacional que favorece su unión a los receptores celulares. Tras esta interacción inicial del rotavirus con los receptores celulares, la partícula vírica completa (TLP) pierde la cápside externa (VP7 y VP4), dando lugar a una subpartícula vírica de doble capa (DLP) que se internaliza en el citoplasma celular bien por penetración directa o por endocitosis dependiente de la concentración de calcio (Isa et al., 2008; Pando et al., 2002). Las diferentes cepas de rotavirus penetran en las células mediante vías endocíticas diversas. Así, la cepa de simio RRV se internaliza mediante endocitosis dependiente de dinamina y de la presencia de colesterol en la superficie celular, mientras que la penetración de otras cepas como la humana Wa o la bovina UK ocurre por endocitosis mediada por clatrina (Arias et al., 2016; Gutiérrez et al., 2010).

La DLP no es infectiva pero sí es transcripcionalmente activa (Settembre et al., 2011). Una vez en el citoplasma celular, la DLP dirige la transcripción y síntesis del nuevo genoma viral, con 11 segmentos de ARN bicatenario. Estos son traducidos, produciendo proteínas que influyen los procesos de la célula hospedadora, dirigen la formación de los viroplasmos, y

asisten en la replicación del genoma viral y en el ensamblaje de las nuevas partículas víricas (Navarro et al., 2016).

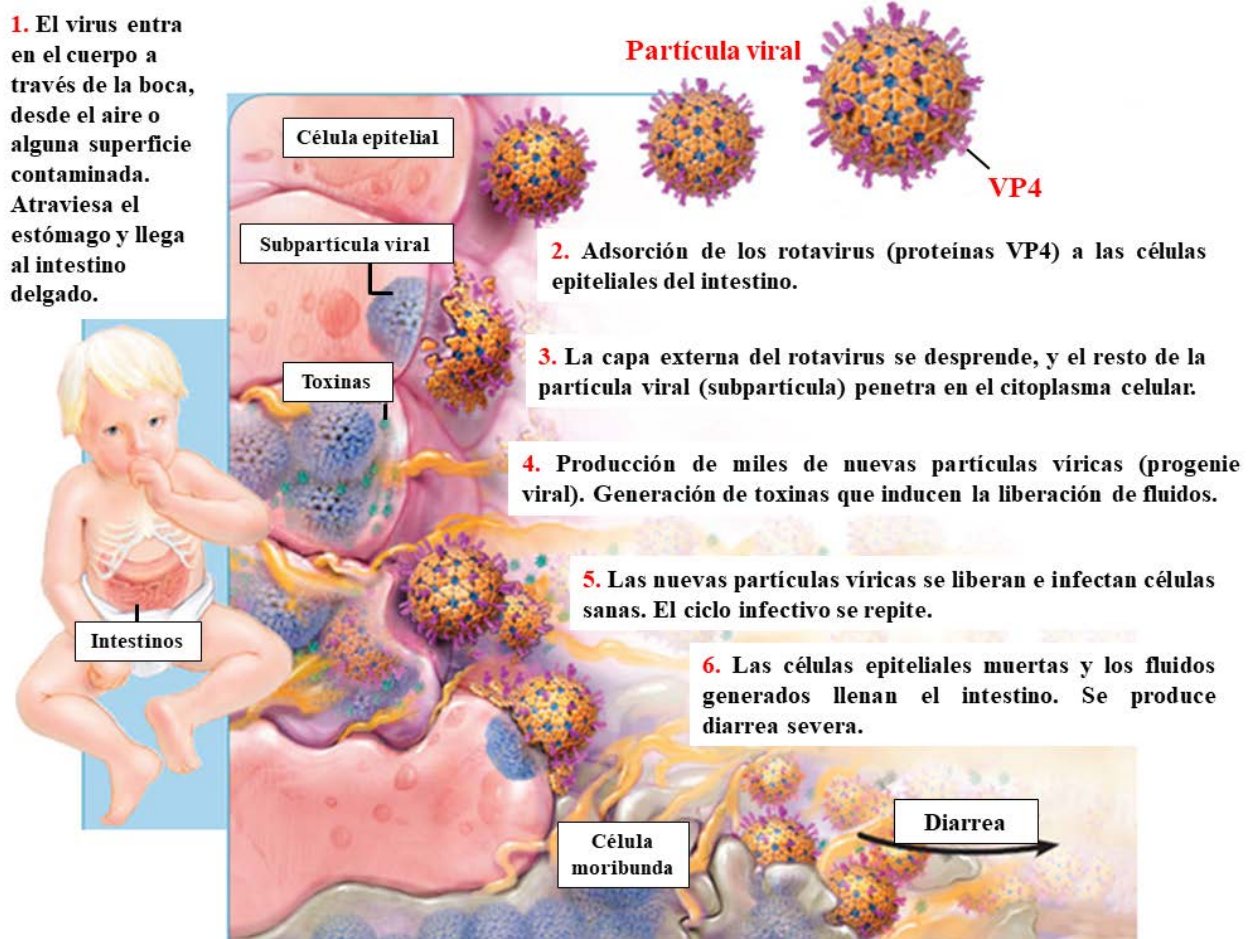


**Figura 17.** Esquema del ciclo de replicación del rotavirus (Champoux et al., 2010).

Los viroplasmos son estructuras especializadas que se localizan en el citoplasma celular y requieren componentes lipídicos para su formación, además de la participación esencial de las dos proteínas no estructurales NSP2 y NSP5 (Eichwald et al., 2012). En el viroplasma, los ARNs virales interactúan con la proteína VP1 (polimerasa viral) y con la VP3 (ARN transferasa), y tiene lugar su ensamblaje y la síntesis de ARN bicatenario. Posteriormente, la proteína VP2 conforma la envoltura del núcleo, encerrando al complejo de VP1-VP3-ARN. Todavía en el viroplasma, los nuevos núcleos interactúan con la proteína VP6 formando las DLPs, que migran hacia el retículo endoplasmático debido a la afinidad de la VP6 hacia la proteína transmembrana NSP4. La formación de la partícula de triple capa (TLP) se completa en el retículo endoplasmático. Aquí, las DLPs adquieren una envoltura transitoria durante la gemación y unen las proteínas de la cápside VP4 y VP7. Por último, las TLPs son liberadas del retículo endoplasmático mediante transporte vesicular no clásico y abandonan la célula por lisis (Champoux et al., 2010; Estes y Greenberg, 2013).

### 2.7.4. Cuadro clínico

Tal y como puede observarse en el esquema realizado por Glass (2006) (**Figura 18**), el rotavirus entra en el cuerpo a través de la boca, desde el aire o alguna superficie contaminada. El virus se trasmite por vía fecal-oral a través de las heces de las personas infectadas antes y después de que presenten síntomas de la enfermedad, cuyo periodo de incubación es de menos de 48 h (Uhnoo et al., 1986). Diversos estudios han demostrado que los rotavirus permanecen viables en superficies de vidrio, plástico y acero inoxidable durante más de 10 días a temperatura ambiente (Ansari et al., 1991), localizándose también en picaportes de aseos, objetos domésticos, juguetes y manos (Akhter et al., 1995). Además, se han asociado múltiples brotes de gastroenteritis causada por rotavirus al consumo de agua contaminada, y algunos se han atribuido al consumo de alimentos como lechuga o frutas contaminadas (O'Mahony et al., 2000).



**Figura 18.** Esquema del ciclo infeccioso del rotavirus (Glass, 2006).

Los rotavirus son una de las principales causas de gastroenteritis severas, caracterizadas por la aparición repentina de vómitos, diarreas acuosas que por lo general no contienen moco,



sangre o pus, y que perduran durante 3-8 días, y que conllevan en muchos casos una deshidratación (Uhnou et al., 1986). Con frecuencia también se presenta fiebre, dolor o espasmo abdominal y pérdida de apetito. Entre los signos de la deshidratación se incluyen sed, irritabilidad, inquietud, apatía, somnolencia, ojos hundidos, sequedad de la boca, garganta, lengua y piel, mareos, y la reducción de la cantidad de orina y de lágrimas al llorar (en bebés y niños deshidratados). Las principales complicaciones son producto de la deshidratación grave, asociada en ocasiones con hipernatremia, edema cerebral, shock hipovolémico, fallo renal e incluso muerte, en particular en lactantes muy pequeños y desnutridos (Bishop, 2009; Hagbom y Svensson, 2016).

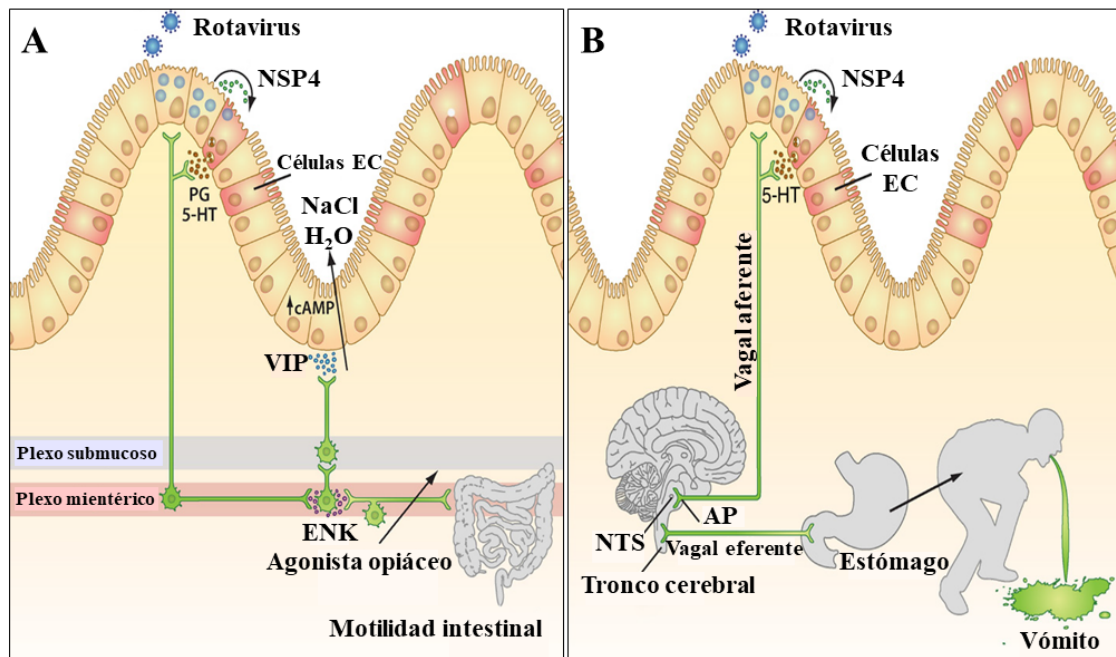
La infección por rotavirus puede ser asintomática o sintomática, en función de factores relacionados con el virus y con el huésped. El factor más relevante relacionado con el huésped es la edad, que determina las consecuencias de la infección. De hecho, la infección en neonatos rara vez es sintomática, gracias a la protección transferida transplacentariamente por los anticuerpos maternos (Ray et al., 2007). La disminución de los niveles de estos anticuerpos coincide con la edad de máxima susceptibilidad de los niños a la gastroenteritis severa inducida por los rotavirus, entre 3 meses y 2 años. Por otra parte, aunque los rotavirus pueden infectar a adultos, los síntomas suelen estar atenuados debido a una probable inmunización en la infancia. Aún así, los síntomas severos podrían darse en caso de infección con cepas de rotavirus inusuales o a dosis muy elevadas (Greenberg y Estes, 2009).

En la actualidad, la morbilidad y mortalidad causada por la gastroenteritis asociada a los rotavirus representa un problema importante de salud pública y económico a nivel mundial, si bien las consecuencias son más severas en el caso de los países en vías de desarrollo, donde la alimentación y la atención médica presentan deficiencias (Kotloff et al., 2013).

Los rotavirus se replican en los enterocitos del intestino delgado, principalmente en el duodeno y yeyuno proximal, causando la destrucción (con acortamiento) de las microvellosidades, resultando en una disminución de la superficie de absorción en el intestino delgado y una reducción de la producción de enzimas, como las disacaridasas. El resultado neto es un estado transitorio de malabsorción, con una transformación defectuosa de grasas y azúcares en el intestino delgado, cuya integridad histológica y funcional puede requerir de 3 a 8 semanas de recuperación (Greenberg y Estes, 2009).

Diversos estudios han mostrado que los rotavirus estimulan la secreción de serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) en las células enterocromafines (EC) y activan estructuras en el sistema nervioso central involucradas en los procesos de náusea y vómito, sugiriendo que el sistema nervioso entérico, y los estímulos vagales aferentes, participan en la producción de diarrea y vómito inducida por rotavirus (Hagbom y Svensson, 2016). En la **Figura 19** se

incluyen los modelos esquemáticos de los mecanismos de inducción de motilidad intestinal, diarrea y vómito mediados por rotavirus, diseñados por Hagbom y Svensson (2016).



**Figura 19.** Modelo esquemático del mecanismo de inducción de (A) motilidad intestinal y diarrea; y (B) vómito, tras infección por rotavirus (Hagbom y Svensson, 2016).

Aunque todavía se desconoce el producto específico del gen asociado con la virulencia del rotavirus, ciertas evidencias sugieren que la proteína no estructural NSP4 se comporta como una enterotoxina. Como modelo de la inducción de motilidad intestinal y de la secreción de electrolitos y agua (diarrea) tras la infección con rotavirus, se ha propuesto que la proteína NSP4 interacciona inicialmente con las células EC (**Figura 19-A**). Esto provoca un incremento de la secreción de serotonina (5-HT) y prostaglandinas (PG), que estimulan los receptores específicos en los nervios aferentes induciendo la diarrea (Hagbom et al., 2011). Los nervios aferentes activan el plexo mientérico, incrementando la motilidad intestinal (Istrate et al., 2014).

Como también puede observarse en la **Figura 19-A**, la estimulación nerviosa por la 5-HT induce la secreción de péptidos intestinales vasoactivos (VIP) desde la parte terminal de los nervios adyacente a las células epiteliales. Los VIP son hormonas que estimulan la secreción e inhiben la absorción de sodio, cloro, potasio y agua en el intestino delgado, e incrementan la motilidad intestinal a través de la secreción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) (Furness, 2006). La motilidad intestinal y la diarrea pueden atenuarse empleando agonistas opiáceos, como las encefalinas (ENK), que reducen el nivel de cAMP, previniendo así la secreción de fluidos (Hagbom y Svensson, 2016).

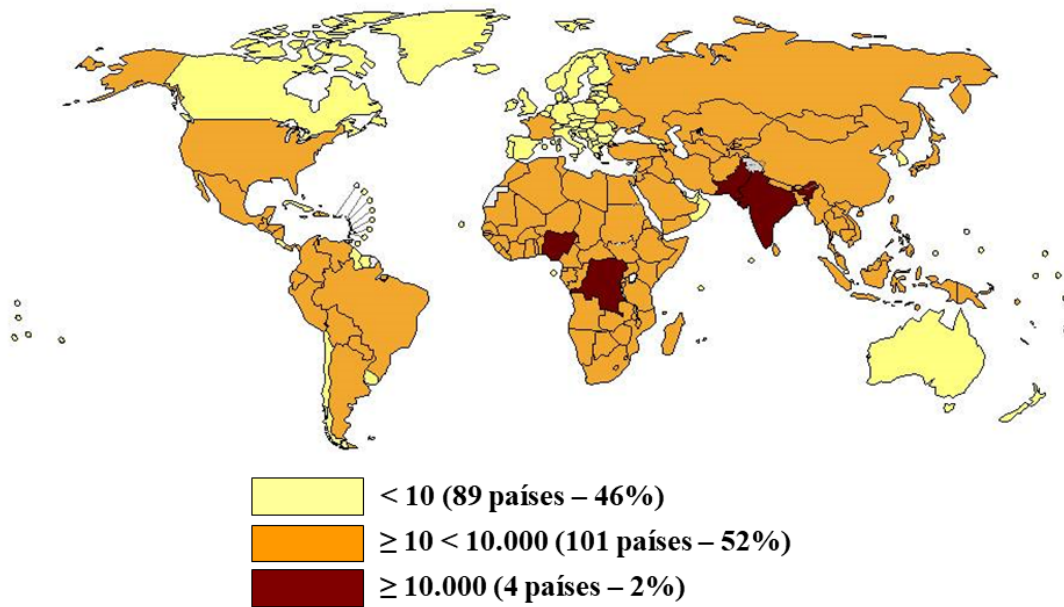
En la **Figura 19-B** se muestra el mecanismo propuesto para la inducción de emesis o vómito tras la infección por rotavirus. La emesis está controlada por el centro del vómito, que se localiza en la médula oblonga (bulbo raquídeo) del tronco encefálico. El centro del vómito lo componen la formación reticular, los núcleos del tracto solitario (NTS) y el área postrema (AP), y puede recibir señales de estimulación de varios orígenes (Hagbom y Svensson, 2016). Así, en el tracto gastrointestinal, los rotavirus (NSP4) activan receptores de las células EC, que responden secretando compuestos transmisores (5-HT) que pueden estimular los nervios vagales aferentes, que activan el centro del vómito (Hagbom et al., 2011). A través de los nervios vagales eferentes se estimula el reflejo de vómito en el estómago. Los antagonistas del receptor de 5-HT pueden emplearse para atenuar el vómito en niños con gastroenteritis aguda (DeCamp et al., 2008; Freedman et al., 2006).

El diagnóstico de la infección aguda por rotavirus se realiza, en general, por medio de la detección de las partículas virales en las heces durante la fase aguda de la enfermedad. Esto se puede lograr por examen directo de muestras en el microscopio electrónico o por medio de detección inmunológica del antígeno con técnicas inmunoquímicas o PCR (O'Mahony et al., 2000). Alternativamente, la infectividad de las partículas virales puede determinarse mediante ensayos con cultivos celulares (Wyatt et al., 1980), siendo la línea MA104 de células epiteliales de riñón de mono africano la más apropiada para la propagación de los rotavirus (Ward et al., 1984), si bien se ha conseguido propagar también en otras líneas (Pinto et al., 1995).

### 2.7.5. Características epidemiológicas

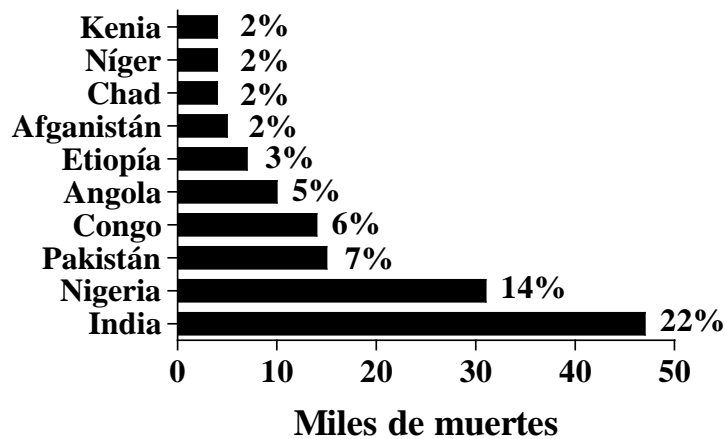
Los rotavirus se descubrieron por primera vez en 1973 por medio del examen con microscopio electrónico de muestras de biopsia duodenal de lactantes con diarrea. Desde entonces se han podido realizar estudios epidemiológicos que indican que la infección por rotavirus afecta a casi todos los niños del mundo. De hecho, a los 5 años la práctica totalidad de los niños habrá estado expuesta al virus, y más de una cuarta parte (en torno al 25%) habrá experimentado una infección sintomática (OMS, 2016).

Los rotavirus son los principales agentes etiológicos de diarrea severa en niños pequeños y recién nacidos, y la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años (Marcotte y Hammarström, 2016). De hecho, según estimaciones de la OMS, durante 2013 ocurrieron 215.000 muertes de niños menores de cinco años (3,4% del total de muertes) a causa de la infección por rotavirus (OMS, 2016). Tal y como puede observarse en la **Figura 20**, los cuatro países con mayor número de muertes (superior a 10.000) fueron, en orden decreciente, la India (22% del total), Nigeria (14%), Pakistán (7%) y la República Democrática del Congo (6%), que suman casi la mitad (49%) del total de muertes de niños causadas por rotavirus a nivel mundial.

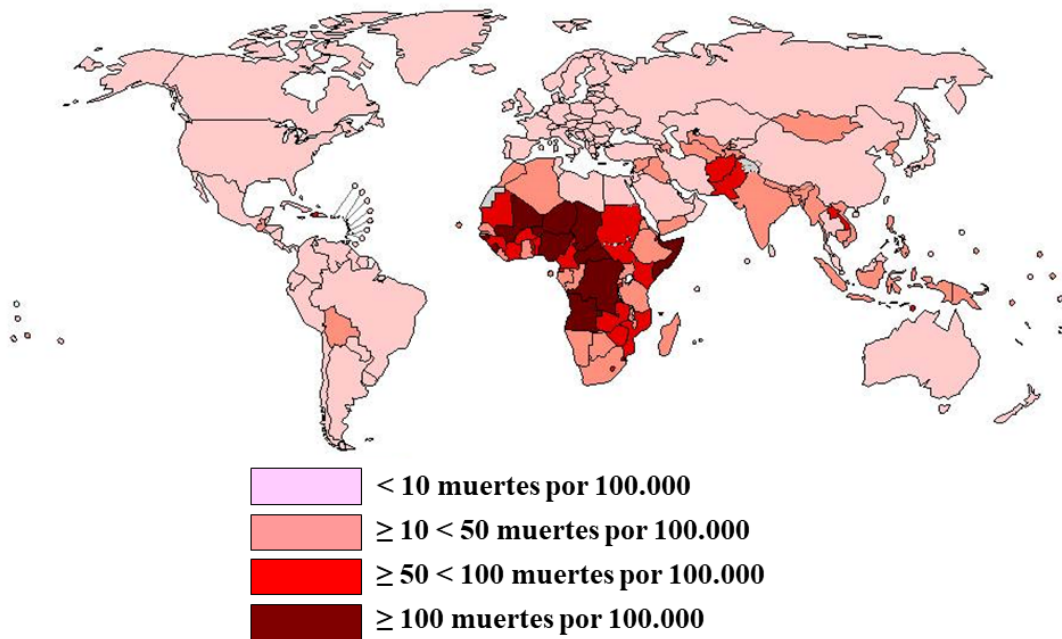


**Figura 20.** Mapa de estimación del número de muertes de niños menores de 5 años provocada por rotavirus en el año 2013 (OMS, 2016).

Otros países con elevada tasa de mortalidad infantil causada por rotavirus son Angola (5%), Etiopía (3%), Afganistán (2%), Chad (2%), Níger (2%) y Kenia (2%), como se indica en las **Figuras 21 y 22**.



**Figura 21.** Países con mayor número de muertes de niños menores de 5 años causadas por rotavirus en 2013. En las barras se muestra el porcentaje en relación al total de muertes causadas por rotavirus a nivel mundial (OMS, 2016).



**Figura 22.** Mapa de estimación del número de muertes de niños menores de 5 años por cada 100.000 habitantes provocada por rotavirus en el año 2013 (OMS, 2016).

En torno al 85% de las muertes de niños menores de 5 años causadas por rotavirus acontece en países en desarrollo, ocurriendo el 80% de estas en niños menores de un año (Kotloff et al., 2013; Tate et al., 2016). En los países desarrollados, la primera infección puede retrasarse a los 2-5 años de edad, si bien la mayoría (65%) ocurre antes del primer año de vida. En este caso, la tasa de mortalidad es menor que en los países pobres. De hecho, la OMS estimó que el número de muertes de niños menores de cinco años en Europa supuso en 2013, alrededor del 5% del total de muertes a causa de rotavirus (OMS, 2016), cifra similar a la estimada sólo para Angola.

A pesar de la baja mortalidad en los países industrializados, los rotavirus siguen siendo responsables de altas tasas de morbilidad y una de las principales causas de enfermedades graves y hospitalización en los primeros meses de vida (Das et al., 2014; Marcotte y Hammarström, 2016). De hecho, en Estados Unidos las infecciones por rotavirus son responsables de cerca de 3 millones de casos de diarrea y de 55.000 hospitalizaciones por diarrea y deshidratación en niños menores de 5 años cada año. Los brotes de la infección por rotavirus son más comunes durante los meses más fríos de invierno y de primavera, siendo particularmente problemáticos en las guarderías y los centros de preescolar, así como en los hospitales infantiles, dada su elevada contagiosidad (CDCP, 2018).

Como se ha comentado anteriormente, cabe destacar seis genotipos de rotavirus por su gran importancia epidemiológica como causantes de gastroenteritis en seres humanos: G1P[8] (38% del total), G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] y G12P[8] (Bányai et al., 2012; Dóro et al., 2014).

Además de las infecciones en humanos, los rotavirus también son muy frecuentes y producen enfermedades gastrointestinales agudas en una diversidad de especies. De hecho, los rotavirus son un agente patógeno veterinario importante para animales muy jóvenes como terneros, corderos, lechones y aves de corral, que son particularmente susceptibles (Marcotte y Hammarström, 2016). Si bien la transmisión entre especies no está totalmente demostrada en la naturaleza, las características genéticas y antigénicas compartidas por múltiples cepas humanas y animales, sugieren que la transmisión interespecie es un mecanismo importante en la evolución de los rotavirus, contribuyendo a la diversificación de cepas (Dóro et al., 2014).

### **2.7.6. Tratamiento, prevención y control de la infección**

No existe un tratamiento específico para la infección por rotavirus. En las personas con sistemas inmunitarios saludables, el tratamiento consiste principalmente en una terapia de rehidratación oral durante unos pocos días para prevenir la deshidratación. En casos graves se requiere un reemplazo intensivo de líquidos y electrolitos por vía intravenosa, siendo las soluciones de rehidratación oral u ORS (oral rehydration solution) la única opción terapéutica segura, efectiva y económicamente viable para prevenir la deshidratación causada por las enfermedades diarreicas agudas (Glass et al., 2014; Kang, 2016). A pesar de ello, en los países pobres las ORS no se emplean tanto como sería deseable (Binder et al., 2014).

El control de la infección por rotavirus consiste principalmente en adoptar medidas rigurosas de higiene, incluyendo lavado cuidadoso de las manos y eliminación adecuada de las excreciones entéricas. Por otra parte, el desarrollo de vacunas frente a rotavirus ha reducido significativamente la incidencia de la enfermedad, especialmente en los países desarrollados (Payne et al., 2013). Así, en la actualidad existen dos vacunas orales desarrolladas con virus vivos, que se comercializan a nivel mundial y que son consideradas seguras y efectivas en la prevención de la infección: RotaTeq® y Rotarix® (Glass et al., 2014; Vesikari, 2016).

En la **Tabla 20** se ha incluido una comparativa de las dos vacunas autorizadas a nivel mundial frente a rotavirus. Una característica única de los rotavirus es la facilidad con la que los 11 segmentos de ARN pueden pasar por un reagrupamiento, lo que ha permitido el desarrollo de vacunas como RotaTeq, que contiene cinco cepas reagrupadas (recombinantes) humanas-bovinas. Esta vacuna fue aprobada en el año 2006 y, hasta la fecha, su administración en tres dosis ha dado unos resultados excelentes en países desarrollados (85% de protección), aunque con menor eficacia en países en vías de desarrollo (48% de protección).

Rotarix es una vacuna oral compuesta por una cepa humana de rotavirus vivos atenuados, aprobada en el 2008. Entre las ventajas de esta última, cabe destacar que se administra en dos

dosis, en lugar de tres, y que presenta mayor eficacia, tanto en países desarrollados (95% de protección) como en países en desarrollo (61% de protección).

**Tabla 20.** Comparación de las dos vacunas autorizadas a nivel mundial frente a rotavirus (Estes y Greenberg, 2013; Vesikari, 2016).

	<b>RotaTeq® (RV5)</b>	<b>Rotarix® (RV1)</b>
<b>Fabricante</b>	Merck	GlaxoSmithKline
<b>Base genética</b>	Rotavirus bovino WC3	Rotavirus humano 89-12
<b>Composición</b>	5 cepas reagrupadas humanas-bovinas	1 cepa humana
<b>Tipos humanos VP7/VP4</b>	G1-G4P[5]; G6P[8]	G1P[8]
<b>Posología</b>	3 dosis (2, 4 y 6 meses)	2 dosis (2 y 4 meses)
<b>Administración</b>	Oral	Oral
<b>Presentación</b>	Líquido	Líquido
<b>Eficacia (% protección):*</b>		
<b>Países desarrollados</b>	85	95
<b>Países en desarrollo</b>	48	61
<b>Propagación viral (%)</b>	21	≥ 50
<b>Riesgo de invaginación intestinal</b>	Si	Si

\*Se emplearon distintos sistemas de medición, análisis y poblaciones, por lo que los resultados de eficacia no son directamente comparables.

Los beneficios de la vacunación frente a rotavirus en la disminución de la mortalidad, la morbilidad y los costes sanitarios a nivel mundial son incuestionables (Gaspar et al., 2014). Un claro ejemplo es el descenso de la mortalidad en niños menores de 5 años, de 528.000 muertes en el año 2000, a 215.000 en el 2013, atribuido principalmente a la introducción de las vacunas (Tate et al., 2016). De hecho, la OMS recomienda que estas vacunas se incluyan en todos los programas nacionales de inmunización y que se consideren una prioridad en los países de Asia Meridional y Sudoriental y África subsahariana (OMS, 2016). A pesar de ello, debido principalmente a dificultades de tipo económico y logístico, estas vacunas se han empleado de manera insuficiente en países con bajos ingresos, lo que deja desprotegidos de la mitad a un tercio de los niños con necesidad de vacunarse (Babji y Kang, 2012). Además, la vacuna no

proporciona una inmunidad total frente a futuras infecciones por rotavirus, debido a la capacidad del virus para mutar y reagruparse con otras cepas, lo que modifica su estructura antigénica (Glass et al., 2014). Por otra parte, las vacunas a base de virus vivos están contraindicadas en pacientes inmunodeprimidos, debido al riesgo de infección (Marcotte y Hammarström, 2016), y presentan riesgo de invaginación intestinal en los lactantes (hasta 6 por 100.000 lactantes vacunados), complicación que provocó la retirada del mercado de una vacuna frente a rotavirus en 1999 (Vesikari, 2016).

Diferentes estudios han sugerido el uso de anticuerpos frente a rotavirus para proporcionar protección pasiva como alternativa terapéutica, previniendo y controlando así las infecciones causadas por rotavirus. Algunas de las estrategias basadas en anticuerpos han propuesto el uso de preparaciones de IgG de calostro bovino procedente de vacas hiperinmunizadas frente a rotavirus (Mainer et al., 1999; Sarker et al., 1998), calostro bovino (Inagaki et al., 2010b), e IgA de calostro y leche humana (Tino De Franco et al., 2013). Por el momento, estas estrategias presentan limitaciones prácticas importantes debido a la dificultad de producción a gran escala.

Diversos estudios han indicado la importancia de la lactancia materna como factor de protección frente a la infección por diversos patógenos, incluidos los rotavirus (Asensi et al., 2006; Gianino et al., 2002; Tino De Franco et al., 2013). Además, existen multitud de evidencias sobre la actividad antirrotavirus asociada a diversos componentes de los alimentos, tal y como se resume en la **Tabla 21**. Así, múltiples extractos naturales, aceites esenciales y zumos de origen vegetal han mostrado actividad frente a los rotavirus en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los compuestos activos identificados son polifenoles, ácidos fenólicos, taninos, pectinas, terpenoides y glicósidos flavonoides, entre otros (Rajiv et al., 2016). Además, se ha demostrado que diversos compuestos presentes en el huevo son capaces de inhibir la infección por rotavirus tanto *in vitro* como *in vivo*. En este caso, la actividad se ha atribuido a una fracción enriquecida en oligosacáridos de la yema de huevo (Koketsu et al., 1995), así como a las glicoproteínas ovomucoide y ovoalbúmina, presentes en la clara de huevo (Yolken et al., 1987).

Sin embargo, la gran mayoría de estudios acerca de alimentos con capacidad antirrotavirus están centrados en fracciones lácteas. De hecho, se ha demostrado la actividad antirrotavirus *in vitro* e *in vivo* de concentrados de proteínas del lactosuero bovino (Bojsen et al., 2007; Pérez-Cano et al., 2008; Wolber et al., 2005) y de preparados de MFGM bovina (Fuller et al., 2013). En la mayoría de estudios, el potencial antirrotavirus de las fracciones lácteas se ha atribuido a la presencia de glicoproteínas bioactivas, como las Igs, la LF, las MUCs, la LDH y la PP3 (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010a; Superti et al., 2001). Esta actividad también se ha asociado a componentes lipídicos de la leche, como esfingolípidos y triglicéridos de la MFGM (Fuller et al., 2013; Jiménez-Flores y Brisson, 2008), así como a los oligosacáridos (Morozov et al., 2018), particularmente aquellos que contienen ácido siálico (Isa et al., 2006).



En la **Tabla 21** se referencian las principales evidencias de actividad antirrotavirus atribuidas a diversas fracciones y componentes naturales en estudios *in vitro* e *in vivo*.

**Tabla 21.** Resumen de las evidencias de actividad antirrotavirus atribuida a diversas fracciones y componentes naturales en estudios *in vitro* e *in vivo*.

<b>Fracción / Componente</b>	<b>Referencia (cepa de rotavirus estudiada)</b>
<b>Leche humana</b>	
<b>Calostro y leche</b>	Gianino et al., 2002* Tino De Franco et al., 2013 (SA11)
<b>MFGM</b>	Kvistgaard et al., 2004 (RRV)
<b>IgA</b>	Asensi et al., 2006 (SA11, Wa, VA70) Tino De Franco et al., 2013 (SA11)
<b>LF</b>	Zavaleta et al., 2006*
<b>MUC1</b>	Yolken et al., 1992 (SA11, RRV, Wa)
<b>LDH</b>	Yolken et al., 1992 (SA11, RRV, Wa) Newburg et al., 1998 (YO) Kvistgaard et al., 2004 (Wa)
<b>Oligosacáridos</b>	Morozov et al., 2018
<b>Leche bovina</b>	
<b>Calostro</b>	Sarker et al., 1998* Mainer et al., 1999 (UK) Inagaki et al., 2010b (MO)
<b>WPC</b>	Kvistgaard et al., 2004 (RRV, Wa) Wolber et al., 2005 (EDIM)* Bojsen et al., 2007 (RRV, Wa, YM, RF, EMcN) Pérez-Cano et al., 2008 (SA11)*
<b>MFGM</b>	Fuller et al., 2013 (OSU)
<b>LF</b>	Superti et al., 2001, 1997 (SA11) Egashira et al., 2007*
<b>IgG</b>	Mainer et al., 1999 (UK) Bojsen et al., 2007 (RRV, Wa, YM, RF, EMcN)
<b>MUC1</b>	Kvistgaard et al., 2004 (RRV) Bojsen et al., 2007 (EMcN)
<b>LDH</b>	Inagaki et al., 2010a (MO)
<b>PP3</b>	Inagaki et al., 2010a (MO)
<b>Caseína-κ (CMP)</b>	Inagaki et al., 2014 (MO)
<b>Otros compuestos</b>	
<b>Yema de huevo</b>	Koketsu et al., 1995 (SA11)
<b>Clara de huevo</b>	Yolken et al., 1987 (SA11, Wa, NCDV, VA70)
<b>Vegetales</b>	Rajiv et al., 2016 (SA11, Wa, NCDV)

\*Estudios *in vivo*. Las demás referencias corresponden a estudios *in vitro*.



## 3. Materiales y métodos

---



## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Materiales**

#### **3.1.1. Leche y calostro de diversas especies**

La leche cruda de vaca fue suministrada por la empresa Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza). El calostro bovino procedió de la empresa Tauste Ganadera (Tauste, Zaragoza). La leche y el calostro de oveja se obtuvieron de un rebaño de ovejas Assaf de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Las leches humanas fueron amablemente donadas por diez madres lactantes sanas (> 6 días postparto) y almacenadas a -20 °C hasta su uso. El Comité Ético para la Investigación Clínica del Gobierno de Aragón (CEICA) aprobó el estudio y todas las donantes manifestaron su consentimiento. La leche de camella fue donada por una granja de Aydin (Turquía). El calostro de cerda fue cedido por una granja porcina de León (España).

Dependiendo del origen las leches se mantuvieron a 4 °C ó -20 °C, y se controló el pH (6,6-6,8) antes de su uso con un pHmetro Micro pH 2000 de Crison (Barcelona, España). Los calostros fueron almacenados a -20 °C hasta su análisis.

#### **3.1.2. Derivados lácteos y proteínas comerciales**

En la presente tesis se han testado diversos productos lácteos y proteínas comerciales. Los dos concentrados de proteínas del lactosuero (WPC, whey protein concentrate) fueron proporcionados por la empresa Arla Foods Ingredients (Viby, Dinamarca), que los obtiene tras microfiltración de lactosuero de quesería y posterior liofilización. Así, se adquirieron el Lacprodan®-80 (80% de proteína; 8% de lípidos y 7% de lactosa) y el Lacprodan® MFGM-10 (72% de proteína, representando las proteínas de la MFGM un 8% del total; 18% de lípidos y 2% de lactosa). La empresa Arla Foods Ingredients también cedió amablemente el Lacprodan® DI-3017, que es un hidrolizado de proteínas del lactosuero (WPH, whey protein hydrolysate) con una composición de 83% de proteína, 7% de lípidos y 5% de lactosa.

La leche desnatada, el butter serum y la mazada comerciales fueron cedidos por la empresa Westland Milk Products (Hokitika, Nueva Zelanda). Los dos primeros productos derivan del proceso de obtención de la grasa láctea anhidra (AMF, anhydrous milk fat) como se indica a continuación. La leche cruda de vaca se pasteuriza a 72 °C durante 15 s, se desnata y la nata se concentra por centrifugación hasta un 75% de grasa. La fracción líquida resultante se considera como leche desnatada, con una composición (% p/p) de 38,9% de proteína, 5% de lípidos y 44% de lactosa. La fracción con un 75% de grasa se homogeneiza, se somete a agitación mecánica hasta conseguir la inversión de fases y se concentra hasta un 99% de grasa. La fracción líquida resultante se denomina butter serum, y presenta una composición (% p/p) del 30,3% de proteína, 22,2% de lípidos y 41% de lactosa. La mazada comercial (33,6% de proteína, 9,7% de lípidos y 50% de lactosa) se obtiene mediante la agitación mecánica de la nata procedente de leche bovina pasteurizada y posterior separación de la mantequilla mediante filtración. Todos los productos son desecados y comercializados en polvo.

Se obtuvieron, además, ocho fórmulas de leche infantil comerciales para evaluar su potencial antirrotavirus *in vitro*. Laboratorios Ordesa (Barcelona, España) cedió amablemente tres de los productos y el resto se adquirieron en farmacia. Cuatro de las leches eran fórmulas de continuación con una composición adaptada a la de la leche materna: 9-12% de proteína, 19-22% de lípidos y 40-59% de lactosa. Las otras cuatro leches testadas correspondieron con fórmulas a base de un hidrolizado de proteínas (caseína) de leche de vaca, especialmente diseñada para el tratamiento dietético de lactantes y niños con alergia a las proteínas de la leche de vaca, de composición aproximada: 12-15% de proteína, 23-26% de lípidos y 0% de lactosa. La composición de los diferentes productos comerciales se obtuvo de la ficha técnica suministrada por el fabricante.

Las proteínas lácteas comerciales se obtuvieron de distintas fuentes. La lactoferrina bovina fue amablemente cedida por Tatua Nutritionals Company (Morrinsville, Nueva Zelanda), con una saturación de hierro del 10%. Además, se analizaron tres formas de lactoferrina humana recombinante. Dos de ellas provenían de arroz transgénico y fueron suministradas por Ventria Bioscience (Sacramento, CA, EE.UU.) en las formas holo (80% saturación de hierro) y As-Is (60% saturación de hierro). La otra lactoferrina recombinante procedía de *Aspergillus awamori* y fue proporcionada por Agennix (Houston, TX, EE.UU.) con una saturación de hierro de 18%.

La lisozima humana recombinante de arroz fue amablemente cedida por Ventria Bioscience. La  $\alpha$ -lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina, caseína- $\alpha$ , caseína- $\beta$ , caseína- $\kappa$ , la albúmina sérica bovina, la lactoperoxidasa, el cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) y el ácido nitriloacético para la saturación de hierro fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.).

La pureza de las proteínas comerciales se analizó mediante electroforesis y se estimó en más del 90% en todos los casos, por lo que se emplearon sin posterior purificación.

### **3.1.3. Material para la obtención del lactosuero y fracciones derivadas de la nata**

Para la obtención de lactosuero la quimosina recombinante se obtuvo de Chr. Hansen (Hoersholm, Dinamarca). El cloruro cálcico ( $\text{CaCl}_2$ ), el oxalato dipotásico, el cloroformo, el metanol y el ácido clorhídrico (HCl) fueron proporcionados por Panreac (Barcelona, España). La lana de vidrio y la sacarosa procedían de Sigma-Aldrich.

En la obtención de fracciones derivadas de la nata se usaron los siguientes reactivos: cloruro sódico (NaCl), cloruro potásico (KCl), cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ), fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid) disódico, que fueron suministrados por VWR International (Radnor, PA, EE.UU.).

### **3.1.4. Material para las técnicas cromatográficas**

Los geles de CM-Sepharose, DEAE-Sepharose, Q-Sepharose, SP-Sepharose, Concanavalina A-Sepharose 4B, Sephacryl S-300 y Sephacryl S-200 fueron suministrados por GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

Los geles para filtración en gel Sephadex G-100, Sephadex G-75, Sephadex G-50, Sephadex G-25, el 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris), el acetato sódico ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), el salicilato sódico, el ácido etilenglicolaminotetraacético (EGTA, ethylene glycol-tetraacetic acid), el ditioeritritol (DTE), la benzamidina, la  $\alpha$ -D-galactosa, el metil- $\alpha$ -D-manopiranosido, el Triton X-100 y el Triton X-100 reducido fueron suministrados por Sigma-Aldrich. La Jacalina-Sepharose fue proporcionada por BioVision (Milpitas, CA, EE.UU.).

El ácido tricloroacético (TCA, trichloroacetic acid), el butanol, la acetona y el Tween-20 fueron suministrados por Panreac. El sulfato amónico ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), el bicarbonato amónico ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), el bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ) y la urea fueron suministrados por VWR International.

### **3.1.5. Material para espectrofotometría**

En función de la medida a realizar se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico y un volumen de 1 mL de Hellma Analytics (Müllheim, Alemania), o bien cubetas de poliestireno de 1 cm de camino óptico y 1 mL de Sarstedt (Nümbrecht, Alemania).

### 3.1.6. Material para el ensayo del BCA

Para la realización del test del ácido bicinconínico (BCA, bicinchoninic acid) se empleó un kit comercial que fue proporcionado por Pierce (Rockford, IL, EE.UU.). Las placas Maxisorp se obtuvieron de Nunc (Roskilde, Dinamarca).

### 3.1.7. Material para electroforesis

La acrilamida-bisacrilamida (30% v/v), el persulfato de amonio (APS, ammonium persulphate), la tetrametiletilendiamina (TEMED), los soportes, cristales y peines empleados en la elaboración de los geles y los geles comerciales para electroforesis Mini-Protean TGX con una concentración de poliacrilamida del 10% y del 4-20% fueron suministrados por Bio-Rad (Hercules, CA, EE.UU.).

El marcador de pesos moleculares Page Ruler (10-170 kDa) fue obtenido de Thermo Scientific. Los marcadores de alto (53-220 kDa) y bajo (14-97 kDa) peso molecular y el azul de bromofenol fueron obtenidos de GE Healthcare.

El azul de Coomassie R-250 y el dodecilsulfato sódico (SDS, sodium dodecyl sulfate) fueron suministrados por Serva (Heidelberg, Alemania). El nitrato de plata, el  $\beta$ -mercaptoetanol, el glicerol y el ácido acético fueron obtenidos de Panreac.

El tiosulfato de sodio, el metabisulfito de sodio, el carbonato de sodio, el 2-metil-2-butanol, el formaldehído (37% p/v), la agarosa, la glicina, la pararosnilina, el ácido peryódico y el carbón activo fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. El papel Whatman 3MM fue suministrado por Whatman International (Maidstone, Reino Unido). Se emplearon puntas MiniFlex de 17 mm de diámetro interno para cargar las muestras en los geles de electroforesis, suministradas por Sorenson BioScience (Salt Lake City, UT, EE.UU.).

### 3.1.8. Material para las técnicas inmunoquímicas

Las hojas de nitrocelulosa de 0,45  $\mu$ m Trans-Blot Transfer Medium procedían de Bio-Rad. Las membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, polyvinylidene fluoride) de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro, el sustrato 4-cloro-1-naftol y el peróxido de hidrógeno (30% p/v) se obtuvieron de Merck-Millipore (Darmstadt, Alemania).

Los anticuerpos obtenidos en conejo frente a diversas proteínas bovinas: IgG, MUC1, MUC15, XOD, CD36, BTN, LDH y PP3, fueron amablemente cedidos por el Dr. Jan Trige Rasmussen, investigador del Laboratorio de Química de Proteínas de la Universidad de Aarhus



(Dinamarca). Los antisueros frente a las LFs bovina, ovina y humana,  $\alpha$ -LA humana y LYZ humana recombinante de arroz fueron previamente obtenidos por inmunización de conejos, en nuestro grupo de investigación.

Los anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa, los adyuvantes de Freund completo e incompleto y la ovoalbúmina fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Las jeringuillas y las agujas de palomilla para la extracción de sangre de los conejos se obtuvieron de Terumo (Lovaina, Bélgica).

El colorante azul de Coomassie G fue suministrado por Serva. El sustrato de la peroxidasa, que contenía 3,3',5,5'-tetrametilbencidina, fue suministrado por Zeulab (Zaragoza, España).

### **3.1.9. Material para los ensayos con cultivos celulares**

La línea de células epiteliales de riñón de embrión de mono Rhesus MA104 (CRL-2378) fue adquirida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, American Type Culture Collection) y usada para la propagación de todas las cepas de rotavirus empleadas en este estudio, así como para los ensayos de actividad antirrotavirus con muestras lácteas.

El medio mínimo esencial (MEM, minimal essential medium), el medio mínimo esencial de Eagle (EMEM, Eagle's minimal essential medium), el suero fetal bovino (FBS, foetal bovine serum) inactivado por calor, la L-glutamina, la solución de tripsina-EDTA, la penicilina/estreptomicina y la anfotericina B fueron provistos por Gibco Life Technologies (Paisley, Reino Unido). El dimetilsulfóxido y los rascadores celulares estériles procedían de Sigma-Aldrich.

El reactivo utilizado en el ensayo de citotoxicidad fue el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) de Promega (Madison, WI, EE.UU.).

Las pipetas estériles de plástico, los frascos de cultivo celular de 25 y 75 cm<sup>2</sup>, y las placas de 48 y 96 pocillos fueron suministrados por TPP Techno Plastic (Trasadingen, Suiza). Los crioviales de 2 mL procedieron de VWR.

### **3.1.10. Material para los ensayos de actividad antirrotavirus**

A lo largo de esta tesis se trabajó con seis cepas de rotavirus. La cepa de rotavirus bovino WC3 (R402-10) se obtuvo de la ATCC (VR-2102) y es con la que mayoritariamente se han realizado los ensayos. La cepa humana Wa empleada en los ensayos de PCR a tiempo real también fue suministrada por la ATCC (VR-2018).

Durante la estancia en el grupo del Dr. Arias del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, se emplearon otras cinco cepas de rotavirus: la cepa bovina NCDV fue cedida por el Dr. Snodgrass (Instituto de Investigación de Moredun, Edimburgo, Reino Unido); las cepas bovinas B223 y UK, la cepa de simio Rhesus RRV, y las cepas UK x RRV reagrupadas fueron cedidas por el Dr. Hoshino (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE.UU.); la cepa humana Wa usada en México fue suministrada por el Dr. Greenberg (Universidad de Stanford, CA, EE.UU.). Las principales características de las cepas de rotavirus empleadas en esta tesis se indican en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Características de las cepas de rotavirus empleadas: origen, serotipo y sensibilidad a neuraminidasa (NA) (Isa et al., 2006).

Cepa de rotavirus	Origen	Serotipo G y P	Sensibilidad a NA
RRV	Simio	G3P[3]	+
UK	Bovino	G6P[5]	-
WC3	Bovino	G6P[5]	-
B223	Bovino	G10P[11]	-
NCDV	Bovino	G6P[1]	+
Wa	Humano	G1P[8]	-

El antisuero de cordero frente a rotavirus bovino UK fue amablemente cedido por el Dr. Snodgrass. El antisuero de conejo frente a TLPs (triple-layered particles) y el antisuero de cabra frente a RRV fueron cedidos por el Dr. Arias. Los anticuerpos obtenidos en cabra frente a IgG de conejo conjugados con peroxidasa fueron suministrados por PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA, EE.UU.). Los anticuerpos de cabra frente a IgG de conejo conjugados con fosfatasa alcalina procedieron de SeraCare (Milford, MA, EE.UU.).

Los anticuerpos de burro frente a IgG de cordero conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, fluorescein isothiocyanate), la tripsina de páncreas porcino tipo IX-S, el 3-amino-9-etilcarbazol, el alcohol isoamílico, el cloruro de cesio, la solución de fenol saturado, la gelatina, el p-nitrofenil fosfato, la dietanolamina y el Mucocit-T fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. Las placas Maxisorp de 96 pocillos para los ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) se obtuvieron de Nunc.

Para la extracción del ARN viral y posterior ensayo de PCR se usaron 2 kits, el “RNA Viasure Extraction Kit” y el “Viasure Pathogen Real Time PCR Detection Kit”, ambos amablemente cedidos por Certest Biotec (Zaragoza, España).

### 3.1.11. Material para los ensayos de tratamientos térmicos y de altas presiones

Los viales de vidrio (7 mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y 45 mm de longitud) donde se trataron térmicamente las soluciones proteicas fueron suministrados por Brand (Wertheim, Alemania).

Para los tratamientos de altas presiones (HHP), las muestras lácteas se envasaron sin espacio de cabeza en bolsas de polietileno multicapa.

### 3.1.12. Material para los ensayos de degradación enzimática

La pepsina procedente de mucosa gástrica porcina, la tripsina, la elastasa, la lipasa y la colipasa procedentes de páncreas porcino, la  $\alpha$ -quimotripsina y la carboxipeptidasa A de páncreas bovino, el glicodeoxicolato de sodio, el taurocolato de sodio, el coagulante microbiano (procedente de *Mucor miehei*), la Alcalasa 2.4 L (procedente de *Bacillus licheniformis*) y el fluoruro de fenilmetilsulfonilo fueron suministrados por Sigma-Aldrich.

El preparado enzimático Prolyve 1000 (procedente de *Bacillus licheniformis*) fue provisto por Lyven Enzymes Industrielles (Colombelles, Francia). La Corolasa PP procedente de páncreas porcino fue suministrada por AB Enzymes (Darmstadt, Alemania). El ácido fórmico procedió de Panreac.

### 3.1.13. Otros materiales

Durante la fase experimental del presente estudio se emplearon diversos dispositivos de ultrafiltración:

- Equipo de ultrafiltración de doble cartucho de fibra hueca (3 y 100 kDa) de Amicon (Danvers, MA, EE.UU.).
- Célula y membranas de ultrafiltración (3, 10 y 30 kDa), y filtros de centrifuga Amicon Ultra (3, 10, 50 y 100 kDa) suministrados por Merck Millipore.
- Membranas de diálisis Cellu-Sep suministradas por Membrane Filtration Products (Seguin, TX, EE.UU.).

Los filtros de jeringa Acrodisc usados para la clarificación y esterilización de tampones y muestras fueron suministrados por Pall (Ann Arbor, MI, EE.UU.).

Las micropipetas procedían de Gilson (Middleton, WI, EE.UU.) y Nichiryo (Maryland Heights, MO, EE.UU.). Se empleó un pipeteador Accu-jet Pro de Brand (Wertheim, Alemania).

## **3.2. Métodos**

### **3.2.1. Obtención de fracciones a partir de leche bovina**

#### **3.2.1.1. Obtención de lactosuero y caseínas bovinas**

El lactosuero bovino se obtuvo a partir de leche cruda de vaca. Para ello, la leche se desnató en una desnatadora-centrífuga modelo ARR-DES 125 de Suministros Químicos Arroyo (Santander, España), para separar la fracción grasa. A continuación, se indujo la precipitación de las caseínas de la leche desnatada mediante la adición de quimosina recombinante y  $\text{CaCl}_2$  durante 45 min a 35 °C. El lactosuero resultante se separó de la cuajada tras el corte con liras y posterior decantación. Tras filtrado por lana de vidrio para eliminar impurezas, el lactosuero se dializó frente a tampón fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline), compuesto por  $\text{NaCl}$  0,14 M,  $\text{KCl}$  2,6 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM, pH 7,4, y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La fracción de caseínas se lavó tres veces con agua destilada, se dializó frente a PBS, pH 8,5, y se conservó a -20 °C hasta su posterior análisis.

#### **3.2.1.2. Obtención de mazada y butter serum bovinos**

Para la obtención de la mazada, primero se desnató la leche cruda, tal y como se ha explicado anteriormente, hasta obtener una nata de aproximadamente un 40% (v/v) de grasa según la determinación realizada por el método Gerber (AOAC, 1990). Tras mantener la nata toda la noche a 4 °C se sometió a agitación mecánica con una batidora Philips Cucina (Ámsterdam, Holanda) hasta que se formaron los granos de mantequilla por aglomeración de los glóbulos grasos. Finalmente, la mazada liberada se separó de los granos de mantequilla mediante filtración con una tela de quesería y lana de vidrio, se liofilizó y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

El suero o fase acuosa que queda retenida en la mantequilla y que denominaremos por su nombre en inglés, butter serum, se obtuvo calentando la mantequilla a 40 °C durante 10 min y centrifugando a 3.000 g durante 15 min a 20 °C en una centrífuga Megafuge 1.0 R de Heraeus (Hanau, Alemania). El butter serum, que quedó en la fase inferior, se separó mediante decantación de la fase superior compuesta por aceite de mantequilla. El butter serum se filtró por lana de vidrio, se liofilizó y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

### 3.2.1.3. Obtención de una fracción enriquecida en MFGM bovina

La fracción enriquecida en MFGM se obtuvo según Hvarregaard et al. (1996). Para ello, se partió de leche bovina cruda y se obtuvo la mazada tal y como se ha indicado anteriormente. A continuación, la mazada se acidificó hasta pH 4,6 con HCl 1 M, se agitó durante 30 min y se centrifugó a 17.000 g durante 75 min a 4 °C en una centrífuga Sorvall RC-5B Plus de Thermo Scientific. El precipitado resultante se resuspendió con PBS, se liofilizó y se mantuvo a -20 °C hasta su análisis, considerándolo como la fracción enriquecida en MFGM.

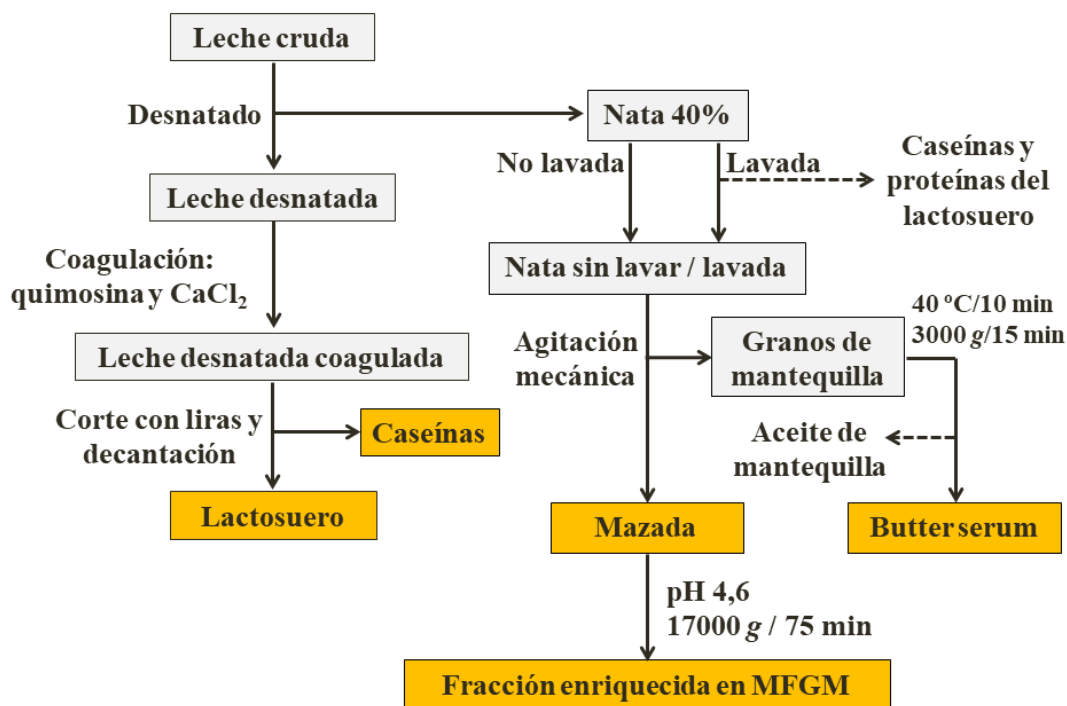
Se estudió también la obtención de la fracción enriquecida en MFGM incluyendo una etapa de lavado de la nata, en base al método descrito por Le et al. (2009). Así, se partió de leche cruda de vaca, que se centrifugó a 3.400 g durante 20 min a 4 °C para obtener la nata. Esta nata se lavó dos veces con cuatro volúmenes de la solución de lavado consistente en tampón PBS, pH 7,4, al que se añadió EDTA 1 mM, centrifugándose entre cada lavado a 3.000 g durante 15 min a 4 °C. La nata lavada se batió entonces en una mantequera hasta la separación de la mazada de los granos de mantequilla. Para la obtención de la fracción enriquecida en MFGM se empleó el procedimiento anteriormente descrito.

El efecto del lavado de la nata en la obtención de la mazada y el butter serum se evaluó comparando su composición proteica mediante electroforesis en SDS-PAGE y Western-blotting con antisueros específicos.

Con el objetivo de estudiar el efecto de los lípidos de la MFGM en su actividad antirrotavirus se procedió a su delipidación mediante el método descrito por Kanno et al. (1975). Para ello, se añadieron 11 volúmenes de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) a la fracción enriquecida en MFGM, mezclando y dejando reposar toda la noche a 4 °C. Se rompió entonces la emulsión añadiendo 2 volúmenes de agua Milli-Q y centrifugando a 3.000 g durante 10 min a 4 °C. El precipitado intermedio formado entre las fases clorofórmica y metanólica se recuperó y se trató con 2 volúmenes de la mezcla de cloroformo:metanol (2:1) de la misma manera. La fase intermedia resultante se liofilizó y se conservó a -20 °C hasta su utilización.

La composición (proteína, lípidos y lactosa) de las fracciones anteriores se determinó mediante espectrometría de infrarrojo con un MilkoScan 4000 de Foss Electric (Hillerød, Dinamarca).

En la **Figura 23** se incluye un esquema resumen de los procedimientos de obtención de las fracciones lácteas bovinas analizadas en esta tesis.

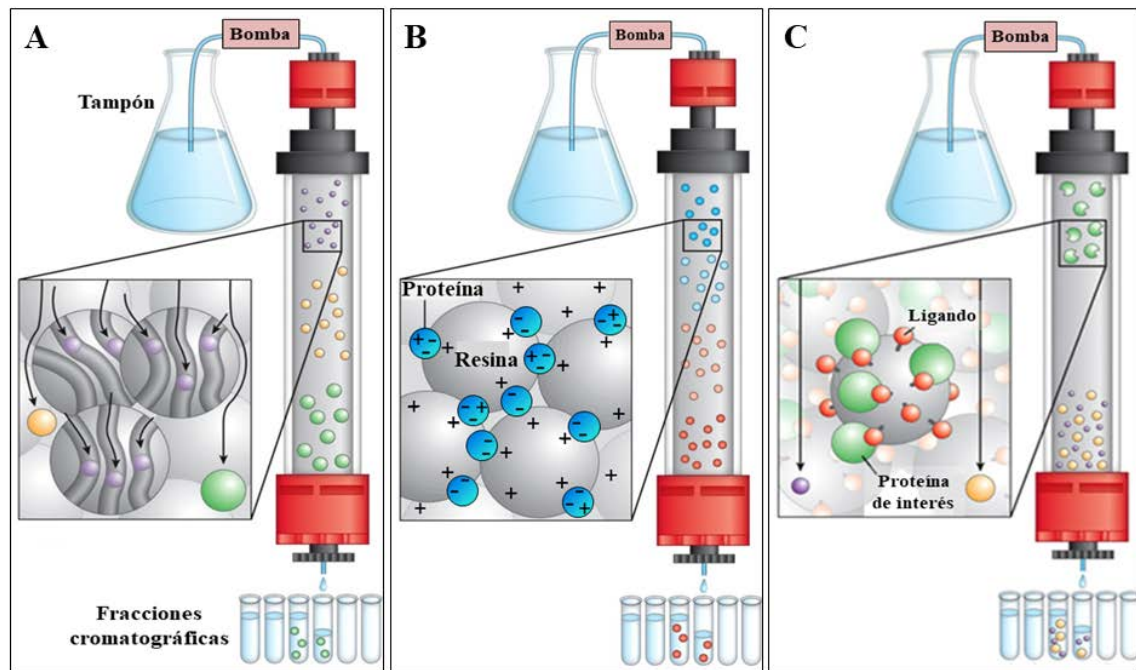


**Figura 23.** Procedimientos de obtención de las fracciones lácteas bovinas a partir de leche cruda de vaca.

### 3.2.2. Aislamiento de proteínas a partir de leche bovina

En este estudio se han aislado diversas proteínas y fracciones enriquecidas en proteínas lácteas. Para ello, tras el pretratamiento de las fracciones lácteas con diferentes agentes (detergentes, ácidos, etc.) para romper interacciones entre componentes y optimizar el aislamiento, se emplearon diversas técnicas cromatográficas (**Figura 24**):

- Cromatografía de filtración en gel: las proteínas de la muestra se separan en función de su tamaño (kDa) a través de partículas de gel con determinado tamaño de poro.
- Cromatografía de intercambio iónico: las proteínas de la muestra se separan en función de su carga eléctrica, quedando diferencialmente retenidas en las partículas de gel con una carga eléctrica determinada.
- Cromatografía de afinidad: las proteínas de la muestra se separan en función de su afinidad a los ligandos unidos a las partículas de gel.



**Figura 24.** Fundamento de las técnicas cromatográficas empleadas en esta tesis: cromatografía de filtración en gel (A), cromatografía de intercambio iónico (B) y cromatografía de afinidad (C) (Lehninger et al., 2013).

Se empleó un colector de fracciones RediFrac, una bomba peristáltica P-1 y un mezclador de gradiente GM-1 de 250 mL, que fueron suministrados por Pharmacia Biotech (Estocolmo, Suecia). El mezclador de gradiente SG30 de 30 mL procedía de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, EE.UU.). La absorbancia de las fracciones recogidas se determinó en un espectrofotómetro 6505 UV/Vis de Jenway (Staffordshire, OSA, Reino Unido).

### 3.2.2.1. Aislamiento de inmunoglobulinas bovinas

Las IgG se aislaron del calostro bovino según el método de Mainer et al. (1997), con una etapa previa de precipitación con sulfato amónico (Page et al., 1994). El calostro se desnató por centrifugación a 2.500 g durante 15 min a 4 °C, y se obtuvo el suero por adición de quimosina e incubación a 37 °C. Se añadió sulfato amónico al suero a una concentración final del 45% (v/v), agitando la mezcla toda la noche a 4 °C para lograr la precipitación selectiva de las IgG.

Tras centrifugar a 2.500 g durante 15 min a 4 °C, el precipitado, que contenía las IgG, se resuspendió y dializó frente a tampón fosfato potásico 0,01 M, pH 7,4, y se aplicó a una columna de DEAE-Sepharose (3 x 23 cm). Las IgG se eluyeron en la tercera etapa de un gradiente escalonado de tampón fosfato 0,01, 0,02 y 0,06 M, a pH 7,4, 7,2 y 7, respectivamente. Las fracciones obtenidas se caracterizaron por SDS-PAGE y Western-blotting, y aquellas

conteniendo las IgG se juntaron, se dializaron frente a PBS pH 7,4 y, finalmente, se liofilizaron y conservaron a -20 °C hasta posteriores análisis.

### **3.2.2.2. Aislamiento de una fracción enriquecida en mucinas bovinas**

El aislamiento de una fracción enriquecida en mucinas (MUCs) se realizó mediante tres procedimientos distintos:

- Cromatografía de intercambio iónico

Se empleó el procedimiento descrito por Pallesen et al. (2001), a partir de una fracción enriquecida en MFGM, obtenida tal y como se ha especificado anteriormente. La concentración proteica de la muestra de partida se ajustó a 3 mg/mL con un tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, con NaCl 0,15 M, EGTA 1 mM, y Triton X-100 al 1% (v/v). Tras agitar la solución durante 30 min a 4 °C, la muestra se centrifugó a 33.000 g durante 1 h y el sobrenadante resultante se diluyó 1:1 (v/v) con acetato sódico 0,1 M, pH 3,5.

Este sobrenadante se sometió a cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose (5 x 36 cm) previamente equilibrada con tampón acetato sódico 50 mM, pH 3,5, con 0,1% (v/v) de Triton X-100 reducido, a temperatura ambiente. En estas condiciones, las MUCs no fueron retenidas por el gel, evidenciándose su presencia en el excluido mediante lectura de absorbancia a 280 nm y SDS-PAGE con tinción PAS.

Posteriormente, las fracciones de interés se juntaron y dializaron frente al tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 toda la noche a 4 °C. La muestra se aplicó entonces a una columna de DEAE-Sepharose (5 x 11 cm) equilibrada con el mismo tampón a 4 °C, para eliminar el detergente remanente. La fracción enriquecida en MUCs (MUC1 y MUC15) se eluyó en la etapa final de un gradiente lineal de NaCl 0-2 M. La fracción de interés se dializó extensamente frente a NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 mM, pH 7,8, se liofilizó y se conservó a -20 °C.

- Degradación enzimática y ultrafiltración

En este caso, la obtención de una fracción enriquecida en MUCs se basó en varios estudios que indicaban la elevada resistencia de las MUCs a la hidrólisis enzimática, debido principalmente a su alto grado de glicosilación (Gallier et al., 2012; Le et al., 2012).

Se partió tanto de lactosuero concentrado como de fracción enriquecida en MFGM. En ambos casos, para la primera etapa de digestión gástrica las muestras se disolvieron en ácido fórmico al 5% (v/v) hasta una concentración final de 1 mg proteína/mL y un pH de 2. Se añadió entonces pepsina en una proporción 1:100 (enzima:proteína, p/p) y se incubó la mezcla a 37 °C



durante 2 h. A continuación, las muestras se liofilizaron y se redisolviéron en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM ajustando la concentración proteica a 1 mg/mL.

Posteriormente, se añadieron las enzimas pancreáticas encargadas de la digestión intestinal: tripsina (1:100 p/p), quimotripsina (1:100 p/p), carboxipeptidasa A (1:100 p/p), y elastasa (1:500 p/p), y se incubó a 37 °C durante 3 h. Las enzimas se inactivaron por tratamiento a 80 °C durante 10 min y posterior incubación con el inhibidor de proteasas, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, a una concentración final de 0,5 mM durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras degradadas enzimáticamente se ultrafiltraron en dispositivos con membranas de 30 kDa para eliminar los péptidos generados, se liofilizaron y conservaron a -20 °C.

- Cromatografía de afinidad con jacalina

En este caso, nos basamos en el método descrito por Hortin (1990) y se partió de lactosuero bovino concentrado. Se aprovechó la afinidad de la jacalina por los residuos de galactosa y N-acetilgalactosamina para obtener una fracción enriquecida en MUCs, que presentan un alto porcentaje de estos glicanos.

El lactosuero se diluyó 1:1 con PBS y se aplicó a una columna de Jacalin-Sepharose (1,5 x 5 cm) previamente equilibrada con ese mismo tampón. Tras recircular la muestra cuatro veces a 0,1 mL/min para favorecer la interacción lectina-mucina, la columna se lavó primero con 5 volúmenes de PBS con NaCl 0,5 M y posteriormente con otros 5 volúmenes de PBS. A continuación, las MUCs retenidas se eluyeron con un gradiente lineal de  $\alpha$ -D-galactosa, de 0,1 a 0,8 M en PBS. Las fracciones de interés, caracterizadas mediante SDS-PAGE y tinción PAS, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y conservaron a -20 °C.

### 3.2.2.3. Aislamiento de xantina oxidasa bovina

La obtención de XOD se realizó mediante el método descrito por Berglund et al. (1996). Inicialmente, se procedió al desnatado de la leche cruda de vaca por centrifugación a 3.000 g durante 10 min a 4 °C. La nata resultante se lavó con tampón fosfato potásico 0,2 M, pH 7,8, con DTE 2 mM y se obtuvo la mazada mediante batido intenso. La mazada obtenida se trató con EDTA-salicilato 0,5 M,  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M y butanol frío al 15% (v/v), agitando a 0 °C durante 5 min. Posteriormente, se añadió sulfato amónico a una concentración final del 15% (p/v) y, tras agitación durante 30 min, se centrifugó a 14.000 g durante 20 min. Al sobrenadante resultante, de color amarillo, se le añadió sulfato amónico a una concentración final del 30% (p/v) y se centrifugó de nuevo. El precipitado intermedio, que apareció entre la fase acuosa y el butanol, se redisolvió y dializó frente a  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM, pH 7,8 para eliminar el butanol remanente.

A continuación, la muestra se cargó en una columna de intercambio iónico de Q-Sepharose (5 x 30 cm) equilibrada con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM, pH 7,8. La XOD se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-1 M. La presencia de XOD en las fracciones se detectó midiendo la absorbancia a 280 nm y tras SDS-PAGE con tinción de Coomassie. Así, las fracciones conteniendo XOD se juntaron, se concentraron y se aplicaron a una columna de filtración en gel Sephacryl S-300 (3 x 60 cm), eluyéndose con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM, pH 7,8. Las fracciones de interés se juntaron, se concentraron y se almacenaron a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su posterior uso.

#### **3.2.2.4. Aislamiento de lactadherina bovina**

La LDH se aisló de leche cruda siguiendo el procedimiento descrito por Kim et al. (1992). Tras desnatado de la leche, la nata resultante se lavó tres veces con agua Milli-Q y se batió hasta obtener la mazada, que se acidificó y se centrifugó para obtener la fracción enriquecida en MFGM, tal y como se ha descrito anteriormente. A continuación, tras delipidar la fracción de MFGM mediante el protocolo ya descrito, esta se resuspendió con NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 g durante 1 h a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . El precipitado resultante se disolvió en un tampón Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, con urea 5 M, KCl 1 M y benzamidina 0,2 mM, se agitó durante 12 h a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  y se centrifugó a 40.000 g durante 30 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, el sobrenadante obtenido se concentró mediante ultrafiltración (10 kDa) y se aplicó a una columna de filtración en gel Sephacryl S-200 (1 x 77 cm) previamente equilibrada con el tampón que contenía urea y KCl. Las fracciones enriquecidas en LDH, analizadas por espectrofotometría (280 nm) y SDS-PAGE, se mezclaron, se concentraron y se dializaron frente al tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,2 que contenía KCl 0,15 M, NaCl 0,2 M,  $\text{CaCl}_2$  1 mM y  $\text{MnCl}_2$  1 mM.

Por último, la fracción dializada se sometió a cromatografía de afinidad en una columna de Concanavalina A-Sepharose 4B, recirculando cuatro veces a un flujo de 0,1 mL/min. La elución de las proteínas retenidas en el gel se realizó con el mismo tampón suplementado con metil- $\alpha$ -D-manopiranosido a diferentes concentraciones (2, 200 y 400 mM). Las fracciones de interés conteniendo LDH se concentraron, se dializaron frente a PBS y se almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.2.2.5. Aislamiento del componente 3 de la proteosa-peptona bovina**

El método de aislamiento de la PP3 se basó en la filtración en gel de una fracción cruda de proteosa-peptona (PPT), que se obtuvo a partir de leche cruda bovina siguiendo el procedimiento descrito por Sørensen y Petersen (1993).

Tras desnatado de la leche en una desnatadora centrífuga, la leche desnatada resultante se calentó a 90 °C durante 30 min en una cuba termostática y, posteriormente, se acidificó hasta un pH 4,6 con HCl 2 M. A continuación, al sobrenadante obtenido tras centrifugar a 1.500 g durante 30 min a 4 °C se le añadió TCA a una concentración final del 13,6% (p/v) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado resultante se reconstituyó con una solución de TCA al 12% (p/v) en agua destilada, se centrifugó a 3.400 g durante 15 min a 4 °C, y el precipitado obtenido se lavó tres veces con acetona. Tras este proceso, con objeto de eliminar los restos de acetona, el precipitado obtenido tras el último lavado se desecó a vacío durante 24 h y se trituró en un mortero, constituyendo esta fracción la PPT.

Para la obtención del componente 3 de la proteosa-peptona (PP3), la fracción PPT se sometió a una cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 y, posteriormente, a una cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose. Así, la PPT se reconstituyó en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M, pH 8 a una concentración de 100 mg/mL y se aplicó a una columna de Sephadex G-75 (2,5 x 50 cm) previamente equilibrada con el mismo tampón. Las fracciones que contenían la PP3, en base a los perfiles espectrofotométricos (280 nm) y electroforéticos, se mezclaron y se liofilizaron.

La muestra liofilizada procedente de las fracciones de la cromatografía anterior se disolvió en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  5 mM, pH 8,1, y se aplicó a una columna de Q-Sepharose (3 x 5 cm) previamente equilibrada. Para la elución de las proteínas retenidas, se empleó un gradiente lineal de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  de 5 mM a 1 M, pH 8,1. La absorbancia de las fracciones se midió a 230 nm, y aquellas que contenían PP3 (28 kDa) identificadas por SDS-PAGE, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en posteriores ensayos.

Con el objetivo de obtener el fragmento proteico de 17 kDa que se separa de la PP3 por proteólisis endógena, la muestra procedente de la Q-Sepharose se sometió a una última etapa de cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 en presencia de urea 6 M, en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,2 M, pH 5. La absorbancia de las fracciones se midió a 230 nm, y tras analizarlas por SDS-PAGE aquellas que contenían PP3 (17 kDa) se mezclaron, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### **3.2.2.6. Saturación con hierro de lactoferrina bovina**

Para evaluar la influencia de la saturación con hierro de la molécula de LF bovina en su actividad antirrotavirus, se siguió el procedimiento descrito por Harouna et al. (2015). Para ello, se preparó inicialmente una solución de nitriloacetato férrico (FeNTA) mezclando una solución de  $\text{FeCl}_3$  0,02 M con una solución de nitrilo acetato sódico (NTA) 80 mM, obteniéndose una concentración final de  $\text{Fe}^{3+}$  10 mM, NTA 40 mM, pH 5. A continuación, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de

FeNTA y 3  $\mu$ L de  $\text{NaHCO}_3$  10 mM por cada mg de LF, incubando durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, para eliminar el hierro no unido a la LF, se realizó una filtración en gel en Sephadex G-25 (1 x 30 cm) a flujo libre.

El grado de saturación de hierro de las LFs de diversas especies analizadas se estimó mediante el cociente de las absorbancias a 465 y 280 nm, a las que se midió una solución de 1 mg/mL. De esta manera se obtuvieron los siguientes porcentajes de saturación de hierro:

- LFs nativas bovina, ovina, humana, porcina y de camella: 10, 17, 6, 5 y 15%, respectivamente.

La saturación en hierro de las LFs humanas recombinantes fue facilitada por las compañías que las producen:

- LFs humanas recombinantes de arroz holo, AsIs y de *A. awamori*: 80, 60 y 3%, respectivamente.

### **3.2.3. Obtención de fracciones y proteínas a partir de leche ovina**

En el presente estudio se aislaron las siguientes fracciones y proteínas a partir de leche ovina, mediante los procedimientos anteriormente descritos para las fracciones y proteínas bovinas homólogas:

- Lactosuero y caseínas
- Fracciones derivadas de nata lavada y sin lavar: mazada, butter serum y MFGM
- IgG
- Fracción enriquecida en MUCs (por degradación enzimática)
- XOD
- PPT y PP3

Además, se aisló LF ovina mediante el procedimiento que se detalla a continuación.

#### **3.2.3.1. Aislamiento de lactoferrina ovina**

La LF ovina se aisló mediante el procedimiento descrito por Conesa et al. (2008), a partir de leche cruda. Tras desnatado de la leche cruda mediante centrifugación a 2.500 g durante 30 min a 4 °C, la leche desnatada se diluyó 1:1 con el tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,04 M, pH 7,4, conteniendo NaCl 0,8 M y Tween-20 al 0,04% (v/v), y se incubó con la SP-Sepharose durante toda la noche a 4 °C en agitación continua suave. Posteriormente, la SP-Sepharose se lavó con el tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,02 M, pH 7,4 con NaCl 0,4 M y Tween-20 al 0,02% (v/v) para eliminar las proteínas no unidas al gel. A continuación, el gel se empaquetó en una columna (5 x 30 cm) y la

LF se eluyó con el tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,02 M, pH 7,4 con NaCl 1 M. La absorbancia de las fracciones se midió a 280 nm, y aquellas que contenían LF identificadas por SDS-PAGE, se juntaron y se dializaron frente a PBS, y finalmente se liofilizaron y almacenaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

Por este mismo procedimiento se aisló LF de leche de camella y de cerda.

### **3.2.4. Obtención de fracciones y proteínas a partir de leche humana**

Se obtuvo una fracción enriquecida en MUCs humanas por degradación enzimática y se aisló LF humana mediante el procedimiento anteriormente descrito para las muestras de leches animales. Además, se obtuvo lactosuero, caseínas y una fracción enriquecida en MFGM, y se aisló  $\alpha$ -LA, LYZ y una fracción enriquecida en LDH humana mediante los procedimientos que a continuación se detallan.

#### **3.2.4.1. Obtención de lactosuero y caseínas humanas**

El lactosuero y la fracción de caseínas procedentes de leche humana se obtuvieron según el método de Svensson et al. (1999). Para ello, la leche cruda humana se desnató por centrifugación a 2.500 g durante 15 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . La leche desnatada se incubó entonces con oxalato dipotásico al 10% (p/v) durante una noche a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . A continuación, tras acidificar hasta pH 4,3 y calentar posteriormente a  $32\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 h, el precipitado de caseínas se obtuvo por centrifugación a 5.000 g durante 15 min a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , quedando el lactosuero como sobrenadante. La fracción de caseínas se lavó tres veces con agua destilada y se dializó frente a PBS pH 8,5. El lactosuero se filtró por lana de vidrio para eliminar impurezas y se dializó frente a PBS pH 7,2. Las muestras se liofilizaron y se conservaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización.

#### **3.2.4.2. Fracción enriquecida en MFGM humana**

La fracción enriquecida en MFGM humana se obtuvo según el procedimiento descrito por Kvistgaard et al. (2004) a partir de leche cruda humana. Tras obtener la nata mediante centrifugación de la leche humana a 5.000 g durante 20 min a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , esta se lavó dos veces con el tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM, pH 7,2 con NaCl 0,15 M. La nata lavada se sometió entonces a un batido intenso y se sonicó en baño de ultrasonidos Ultrasons (J.P. Selecta, Barcelona, España) durante 15 min a  $20\text{ }^\circ\text{C}$ . Tras centrifugación a 50.000 g durante 1 h a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  la fracción enriquecida en MFGM humana se resuspendió y dializó frente a PBS, y finalmente se liofilizó y se conservó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **3.2.4.3. Aislamiento de inmunoglobulinas A humanas**

Las IgAs se aislaron mediante el método descrito por Pack (2000) a partir de leche cruda. Para ello, se obtuvo el lactosuero tal y como se ha descrito anteriormente. A continuación, se procedió a la precipitación de las Igs mediante adición al lactosuero de sulfato amónico a una concentración final del 50% (p/v), seguido de incubación durante 16 h a 4 °C y posterior centrifugación a 15.000 g durante 1 h a 4 °C. El precipitado resultante se disolvió y dializó frente a Tris-HCl 0,02 M, pH 9,5 y se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Sepharose (3 x 25 cm) previamente equilibrada con ese mismo tampón. Las proteínas unidas al gel se eluyeron mediante gradiente lineal del tampón Tris-HCl con NaCl 0,10 a 0,25 M. Las fracciones de interés, conteniendo las IgAs humanas, se juntaron, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

### **3.2.4.4. Aislamiento de $\alpha$ -lactalbúmina humana**

La  $\alpha$ -LA se aisló de leche cruda según el procedimiento descrito por Barbana et al. (2008). Tras obtener el lactosuero de la manera anteriormente descrita, este se sometió a cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-100. El lactosuero humano se diluyó 1:1 con tampón acetato de sodio 25 mM, pH 6,5, con NaCl 50 mM y se aplicó en la columna de Sephadex G-100 (5 x 90 cm) equilibrada con el mismo tampón a 4 °C. Las fracciones de interés, controladas mediante medida espectrofotométrica (280 nm) y SDS-PAGE, se juntaron y aplicaron posteriormente en una columna de Sephadex G-50 (3 x 75 cm), con las mismas condiciones de trabajo. Las fracciones que contenían  $\alpha$ -LA humana se juntaron, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

### **3.2.4.5. Aislamiento de lisozima humana**

El aislamiento de la LYZ humana derivó del procedimiento de aislamiento de la LF descrito con anterioridad. Así, al comprobarse que las fracciones del excluido de la columna de SP-Sepharose contenían LYZ humana, se recuperaron y se sometieron a cromatografía de filtración en gel en Sephadex G-50 (1 x 65 cm). Las fracciones de interés se juntaron, se dializaron frente a PBS, se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

### **3.2.4.6. Aislamiento de una fracción enriquecida en lactadherina humana**

La fracción enriquecida en LDH humana se aisló a partir de una fracción enriquecida en MFGM, previamente obtenida como se ha descrito con anterioridad. Para ello, la fracción

enriquecida en MFGM se resuspendió en PBS conteniendo NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante resultante resultó estar enriquecido en LDH, por lo que se dializó frente a PBS, se liofilizó y se conservó a -20 °C hasta su posterior uso.

En la **Tabla 23** se incluye un resumen de las fracciones y proteínas lácteas obtenidas en la presente tesis.

**Tabla 23.** Fracciones y proteínas lácteas obtenidas, con las referencias que describen los procedimientos de aislamiento.

<b>Leche bovina</b>		
<b>Fracciones lácteas</b>	Lactosuero y caseínas	Ripollés et al. (2018)
	Proteosa-peptona	Sørensen y Petersen (1993)
	Mazada y butter serum procedentes de nata lavada y sin lavar	Le et al. (2009)
	Fracción enriquecida en MFGM procedente de nata lavada y sin lavar	Hvarregaard et al. (1996)
<b>Proteínas</b>	IgGs	Mainer et al. (1997)
	Fracción enriquecida en MUCs	Pallesen et al. (2001) Gallier et al.; Le et al. (2012) Hortin (1990)
	XOD	Berglund et al. (1996)
	LDH	Kim et al. (1992)
	PP3	Sørensen y Petersen (1993)
<b>Leche ovina</b>		
<b>Fracciones lácteas</b>	Lactosuero y caseínas	Ripollés et al. (2018)
	Mazada y butter serum procedentes de nata lavada y sin lavar	Le et al. (2009)
	Fracción enriquecida en MFGM procedente de nata lavada y sin lavar	Hvarregaard et al. (1996)
<b>Proteínas</b>	IgGs	Mainer et al. (1997)
	LF	Conesa et al. (2008)
	Fracción enriquecida en MUCs	Gallier et al.; Le et al. (2012)
	XOD	Berglund et al. (1996)
	PP3	Sørensen y Petersen (1993)
<b>Leche humana</b>		
<b>Fracciones lácteas</b>	Lactosuero y caseínas	Svensson et al. (1999)
	Fracción enriquecida en MFGM	Kvistgaard et al. (2004)
<b>Proteínas</b>	IgAs	Pack (2000)
	LF	Conesa et al. (2008)
	$\alpha$ -LA	Barbana et al. (2008)
	LYZ	Conesa et al. (2008)
	Fracción enriquecida en MUCs	Le et al. (2012) Gallier et al. (2012)
	Fracción enriquecida en LDH	Kim et al. (1992)

### 3.2.5. Cuantificación de proteínas mediante el ensayo del BCA

La concentración proteica de todas las fracciones y proteínas lácteas analizadas en el presente trabajo se estimó mediante el ensayo del ácido bicinconínico (BCA, bicinchoninic acid). El método se basa en la reducción del ión cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a ión cuproso ( $\text{Cu}^{1+}$ ) por las proteínas en un medio alcalino. Posteriormente, el BCA es capaz de formar un complejo púrpura intenso con los iones  $\text{Cu}^{1+}$  que se puede detectar espectrofotométricamente. Para la realización de la técnica de BCA, se empleó un kit comercial basado en el procedimiento descrito por Smith et al. (1985), que es sencillo, rápido, muy sensible y con pocas interferencias.

En primer lugar, se prepararon las soluciones estándar de albúmina sérica bovina (BSA) desde 0,02 mg/mL hasta 2,5 mg/mL en agua Milli-Q. A continuación, 25  $\mu\text{L}$  de cada estándar y de las muestras a analizar se distribuyeron en una placa de 96 pocillos y, seguidamente, se añadieron 200  $\mu\text{L}$ /pocillo del reactivo del kit que contenía el BCA. La placa se agitó durante 30 s, se incubó a 37 °C durante 30 min, y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas de microensayo Multiskan MS de Labsystem (Helsinki, Finlandia). Los resultados de concentración proteica se calcularon interpolando los datos de absorbancia de las muestras en una curva patrón, previamente obtenida representando la absorbancia de los estándares de BSA frente a su concentración.

### 3.2.6. Métodos electroforéticos

Las diferentes fracciones y proteínas lácteas obtenidas se caracterizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Se emplearon geles de diferente porcentaje de poliacrilamida, tanto comerciales como preparados en el laboratorio. Se emplearon diversos métodos de tinción: azul de Coomassie, ácido peryódico de Schiff (PAS, periodic acid Schiff) y nitrato de plata.

#### 3.2.6.1. Preparación de geles de poliacrilamida

Los geles de electroforesis utilizados para caracterizar las fracciones cromatográficas obtenidas durante el aislamiento de las diferentes fracciones y proteínas lácteas se prepararon en nuestro laboratorio a una concentración del 12% de poliacrilamida. Para la preparación del gel de separación se realizó la siguiente mezcla en un matraz kitasato: 3,4 mL de agua Milli-Q, 4 mL de una solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% (v/v), 2,5 mL de tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, y 100  $\mu\text{L}$  de SDS al 10% (p/v). A continuación, tras desgasificar la mezcla durante 15 min utilizando una trompa de vacío por agua, se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de TEMED (como



iniciador de la polimerización) y 50  $\mu$ L de APS al 10% (p/v) en agua Milli-Q (como catalizador de la reacción). Una vez preparada la mezcla, esta se vertió en el espacio entre dos vidrios, de dimensiones ajustadas al equipo MiniProtean, previamente preparados a modo de depósito en el que polimeriza tras 1 h. Para evitar la deshidratación del gel, este se cubrió con 300  $\mu$ L de 2-metil-2-butanol.

Posteriormente, una vez polimerizado el gel de separación y retirado el butanol, se añadió el gel de concentración. Este gel, destinado a alinear las muestras durante la electroforesis, se preparó al 8% de poliacrilamida mezclando en matraz kitasato: 2,3 mL de agua Milli-Q, 1,3 mL de una solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% (v/v), 1,2 mL de un tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, y 50  $\mu$ L de SDS al 10% (p/v). Tras desgasificar y añadir 5  $\mu$ L de TEMED y 25  $\mu$ L de APS al 10% (p/v), la mezcla se cargó en la parte superior del gel de separación, entre los dos cristales, y se colocó el peine de electroforesis para marcar los pocillos en los que posteriormente se cargarían las muestras a analizar. El gel de concentración se dejó polimerizar durante 1 h a temperatura ambiente. Los geles se almacenaron en nevera hasta su uso.

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

Las electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Las muestras a analizar se diluyeron 1:1 con tampón Tris-HCl 0,12 M, pH 6,8, que contenía una concentración final de glicerol del 20% (v/v), SDS al 4% (p/v) y azul de bromofenol al 0,02% (p/v). En el caso de las electroforesis que se realizaron en condiciones reductoras, al tampón se le añadió  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final del 10% (v/v). Las muestras se calentaron a 100  $^{\circ}$ C durante 5 min y se cargaron en el gel correspondiente. Las electroforesis se desarrollaron a 180 mA en una cubeta Mini-Protean Tetra Cell de Bio-Rad con una fuente de voltaje de 125 VA suministrada por Pharmacia Biotech, siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante.

Los geles elaborados en nuestro laboratorio se prepararon con un 12% de poliacrilamida, aunque también se utilizaron geles comerciales con un 10% y 4-20% de poliacrilamida. La elección de unos u otros geles para los ensayos de SDS-PAGE se realizó en base a la muestra a analizar y a la migración estimada en función del porcentaje de poliacrilamida.

### **3.2.6.3. Técnicas de tinción de los geles**

Una vez realizada la SDS-PAGE, la tinción del gel se llevó a cabo mediante diferentes técnicas, dependiendo de la concentración y del tipo de proteínas previstas en la muestra.

- Tinción con azul de Coomassie

En esta técnica, basada en el método de Bradford (1976), el azul de Coomassie, que es un colorante de tipo aniónico, se une a las proteínas de modo inespecífico, a través de fuerzas de van der Waals. Esta tinción es la técnica más común para detectar las proteínas previamente separadas en geles de poliacrilamida, con un límite de detección de entre 50-100 ng.

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se fijaron y al mismo tiempo se tiñeron en los geles con una solución de colorante con la siguiente composición: 0,065% (p/v) de azul de Coomassie R-250, 30% (v/v) de metanol, 10% (v/v) de ácido acético, y 10% (v/v) de glicerol en agua destilada. Tras mantener el gel sumergido en el colorante durante 1 h en agitación a temperatura ambiente, el colorante se retiró y se añadió la solución decolorante de composición: 25% (v/v) de metanol, 8% (v/v) de ácido acético, 2% (v/v) de glicerol, en agua destilada. Tras incubar el gel con la solución decolorante toda la noche en agitación a temperatura ambiente, las proteínas aparecieron como bandas azules sobre un fondo incoloro.

- Tinción con nitrato de plata

El método de tinción de plata está basado en el procedimiento originalmente descrito por Merrill (1981). Es un método muy sensible que permite detectar proteínas previamente separadas en geles de poliacrilamida con un límite de detección de entre 1-10 ng. El proceso está fundamentado en la unión de los iones de plata a las cadenas laterales de los aminoácidos, reduciéndose a plata metálica, de color gris-marrón oscuro.

Para aplicar esta técnica, el gel de SDS-PAGE se incubó con diversas soluciones. En primer lugar, las proteínas se fijaron en el gel con una solución de etanol al 58% (v/v) y ácido acético al 12% (v/v), en agua Milli-Q, y se incubaron durante 30 min. Posteriormente, el gel se sumergió en la misma solución anterior diluida al 12% (v/v) en agua Milli-Q durante 30 min, y luego se lavó tres veces con agua Milli-Q. El gel se sumergió entonces en una solución de tiosulfato de sodio al 0,02% (p/v) durante 1 min y, tras otros tres lavados, se incubó durante 20 min en una solución de nitrato plata al 0,2% (p/v) en agua Milli-Q conteniendo 0,075% (v/v) de formaldehído al 37%.

Finalmente, tras dos lavados con agua Milli-Q para eliminar el nitrato de plata remanente, el gel se incubó con la solución de revelado, compuesta por 6% (p/v) de carbonato de sodio, 0,05% (v/v) de formaldehído al 37% y 2% de la solución compuesta por 0,02% (v/v) de tiosulfato de sodio, en agua Milli-Q, hasta la aparición de bandas de color gris-marrón oscuro (2-5 min). Seguidamente, se incubó el gel durante 10 min en una solución de ácido acético al 0,05% (v/v) en agua Milli-Q y después en una solución de glicerol al 12% (v/v) en agua Milli-Q durante 10 min.

- Tinción con ácido peryódico de Schiff

El método de tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) está basado en el procedimiento descrito por Mantle y Allen (1978). La tinción PAS es una técnica útil y sensible para detectar proteínas glicosiladas previamente separadas en geles de poliacrilamida, con un límite de detección de 100-150 ng, que depende del grado de glicosilación y del tamaño y concentración de la proteína en cuestión.

En primer lugar, el gel se incubó durante 1 h en la solución de fijación formada por ácido acético al 10% (v/v) y metanol al 35% (v/v) en agua Milli-Q. A continuación, el gel se incubó durante 1 h en una solución de ácido peryódico al 0,7% (p/v) en ácido acético al 5% (v/v) en agua Milli-Q. Posteriormente, el gel se lavó con agua Milli-Q y se incubó con una solución de metabisulfito de sodio al 0,2% (p/v) en ácido acético al 5% (v/v) hasta que el gel adquirió un color amarillo, renovando una vez la solución hasta que el gel se decoloró. Finalmente, el gel se incubó durante 2 h con el reactivo de Schiff hasta que aparecieron las bandas características de color rosa, momento en el que se procedió a la decoloración sumergiendo el gel en la solución de fijación durante 15 min y posteriormente en una solución de ácido acético al 10% (v/v) durante 1 h.

Para la preparación del reactivo de Schiff, se añadieron 4 g de pararosanilina a 800 mL de agua Milli-Q a 95 °C, solución que se agitó durante 5 min. Posteriormente, se enfrió la solución rápidamente hasta 50 °C y se añadieron 80 mL de HCl 1 M, agitando hasta que la solución alcanzó una temperatura de 25 °C. Se añadieron entonces 6,8 g de metabisulfito de sodio y se mantuvo la mezcla en oscuridad a 4 °C durante toda la noche. Por último, se añadieron 20 g de carbón activo a la mezcla, se agitó durante 30 min y se filtró el colorante mediante un embudo de vidrio sinterizado. El reactivo se almacenó a 4 °C protegido de la luz hasta su uso.

El escaneado de geles se llevó a cabo con el Imagescanner III de GE Healthcare, programa LabScan.

### **3.2.7. Métodos inmunoquímicos**

#### **3.2.7.1. Obtención de antisueros frente a proteínas aisladas**

Los antisueros utilizados en este trabajo frente a las LFs bovina, ovina y humana,  $\alpha$ -LA humana y LYZ humana recombinante de arroz fueron previamente obtenidos en nuestro grupo de investigación en conejos, según el procedimiento descrito por Conesa et al. (2008).

Para ello, los conejos se inmunizaron en diferentes áreas de la región dorsal, por vía subcutánea, con una suspensión compuesta por 0,5 mL de la solución de proteína

correspondiente (2 mg/mL en PBS) y 0,5 mL de adyuvante completo de Freund. A las 4 semanas, se llevó a cabo una nueva inmunización con la misma cantidad de proteína, emulsionada con adyuvante incompleto de Freund. Transcurridas dos semanas de la segunda inmunización, se procedió a la extracción de sangre mediante una cánula en la arteria auricular central. La sangre obtenida se dejó coagular espontáneamente a temperatura ambiente y el coágulo se centrifugó a 1.000 g durante 10 min para la obtención del suero. Tras comprobar mediante inmunodotting la reactividad positiva del antisuero, este se almacenó a -20 °C.

Para las extracciones sucesivas, se dejó recuperar a los animales durante 1 mes, repitiendo las inoculaciones con la solución de proteína con adyuvante incompleto a los 15 días de cada extracción. Se realizaron un total de tres extracciones a los conejos inmunizados con cada proteína.

### **3.2.7.2. Inmunodotting**

La técnica de inmunodotting se utilizó para comprobar la inmunorreactividad de los antisueros obtenidos en este trabajo frente a diversas proteínas lácteas.

Se colocaron 2 µL de cada solución de proteína (1 mg/mL en PBS) sobre una membrana de nitrocelulosa y se dejaron secar al aire durante 5 min. A continuación, con el objeto de evitar uniones inespecíficas a los sitios libres de la membrana, esta se incubó con una solución de ovoalbúmina al 5% (p/v) en PBS, pH 7,4, durante 30 min en agitación. Tras lavar tres veces con PBS la membrana, se procedió a incubarla durante 1 h a temperatura ambiente con el antisuero correspondiente a la dilución apropiada, en ovoalbúmina al 3% (p/v) en PBS. Posteriormente, después de lavar cinco veces con PBS, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con un antisuero obtenido en cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, diluido 1/1.000 en ovoalbúmina al 3% (p/v) en PBS.

Por último, la membrana se lavó cinco veces con PBS y se procedió al revelado añadiendo una solución compuesta por el sustrato 4-cloro-1-naftol al 0,06% (p/v), metanol al 20% (v/v) y peróxido de hidrógeno al 0,1% (v/v) en PBS. En el momento que aparecieron manchas de color grisáceo de intensidad adecuada en los sitios de aplicación de las muestras, la reacción se detuvo lavando la membrana con agua Milli-Q.

### **3.2.7.3. Western-blotting**

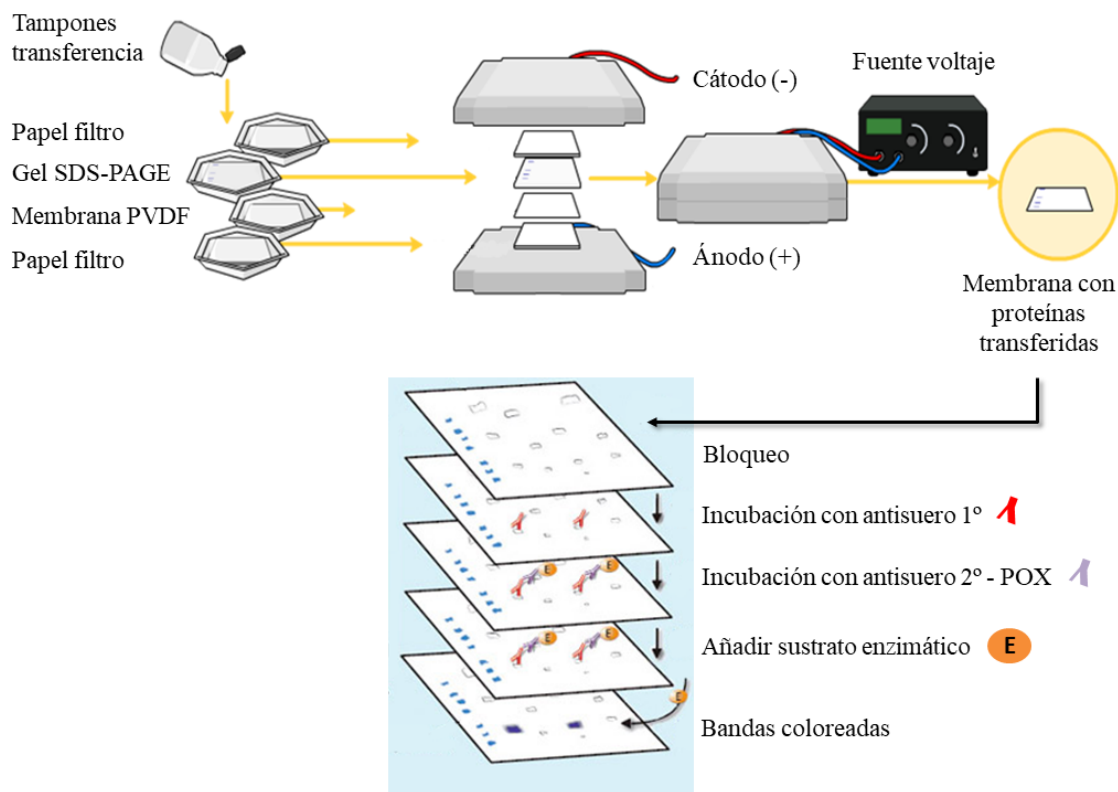
La técnica de Western-blotting se empleó en la caracterización de las fracciones y aislados de proteínas lácteas como método de confirmación de la presencia de diversas proteínas, usando los antisueros específicos obtenidos frente a ellas.

Este método está basado en el procedimiento descrito por Benfeldt et al. (1995), y en él se distinguen tres etapas fundamentales. En la primera se desarrolla una electroforesis en SDS-PAGE para separar las proteínas. Durante la segunda etapa, de electrotransferencia, las proteínas del gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF mediante la aplicación de una diferencia de potencial en un equipo TE 70 Semi-Dry Transfer Unit de GE Healthcare. Para ello se preparó la unidad de transferencia colocando superpuestos, y en orden, los siguientes componentes:

- En la parte inferior (ánodo): 1 papel de filtro Whatman 3MM humedecido en tampón Tris 0,3 M, pH 10,4 con metanol al 10% (v/v).
- 2 papeles de filtro humedecidos en tampón Tris 25 mM, pH 10,4 con metanol al 10%.
- Membrana de PVDF activada en metanol durante 10 s y aclarada en tampón Tris 25 mM, pH 10,4 con metanol al 10% (v/v).
- Gel de SDS-PAGE, en el que se han separado las proteínas previamente.
- En la parte superior (cátodo): 3 papeles de filtro humedecidos con tampón Tris 25 mM, glicina 40 mM, SDS al 0,1% (p/v), pH 9,4, con metanol al 20% (v/v).

Una vez preparada la unidad de transferencia, se aplicó una corriente eléctrica de 80 mA durante 1 h. Para comprobar la eficacia de la transferencia, el gel de electroforesis transferido se tiñó con azul de Coomassie.

En la tercera y última etapa, las proteínas transferidas a la membrana se detectaron con anticuerpos específicos y revelado enzimático. Para ello, se bloqueó la membrana durante 3 min con TBS (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4, con NaCl 0,5 M) conteniendo Tween-20 al 2% (v/v) en agua Milli-Q, para saturar los espacios no ocupados por proteínas. Posteriormente, tras lavar la membrana tres veces durante 5 min con TBS conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBS-T), esta se incubó durante toda la noche a 4 °C con el antisuero correspondiente a la dilución apropiada en TBS-T. A continuación, después de lavar la membrana tres veces con TBS-T se procedió a su incubación durante 2 h a temperatura ambiente con un antisuero obtenido en cabra anti-IgG de conejo, conjugado con peroxidasa y diluido 1/1.000 en TBS-T. Por último, la membrana se lavó tres veces con TBS-T y se reveló añadiendo el sustrato de la peroxidasa compuesto por 4-cloro-1-naftol al 0,06% (p/v), metanol al 20% (v/v) y agua oxigenada al 0,1% (v/v) en PBS. Tras la aparición de las bandas coloreadas (normalmente de 5 a 10 min a temperatura ambiente), se detuvo la reacción enzimática lavando la membrana dos veces con agua Milli-Q. El procedimiento descrito se ilustra en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Esquema de la técnica de Western-blotting (Bensaccount, 2009).

### 3.2.8. Cultivo celular

#### 3.2.8.1. Siembra y mantenimiento del cultivo celular

La línea celular que se usó para la propagación de los rotavirus y los ensayos de neutralización con muestras lácteas fue la línea MA104 de células epiteliales de riñón fetal de mono Rhesus. Para la siembra, mantenimiento y subcultivo celular se siguieron los procedimientos estandarizados (Freshney, 2010) que se detallan a continuación, todos realizados en ambiente estéril en campana de flujo laminar vertical Micro-V de Telstar (Terrasa, España).

Las células de la línea MA104 se cultivaron en frascos de 25 ó 75 cm<sup>2</sup>, según el diseño experimental, y se mantuvieron con medio MEM suplementado con FBS al 10% (v/v), solución de antibióticos (100 Unidades/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina) al 1% (v/v), L-glutamina 2 mM y 0,25 µg/mL de anfotericina B. Los frascos de cultivo se mantuvieron a 37 °C en un incubador termostatzado B5060 EK/CO<sub>2</sub> de Heraeus con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>.

El subcultivo de las células se realizó cuando estas alcanzaron la confluencia. Para ello, tras eliminar el medio de los frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> mediante aspiración con pipeta estéril, se lavó la monocapa celular con 5 mL de PBS estéril (filtrado por 0,22 µm). A continuación, se

añadieron a la monocapa 0,5 mL de una solución de tripsina-EDTA al 0,25% (p/v), con la que se incubó a 37 °C durante 5 min para que las células se desprendieran de la superficie del frasco. Seguidamente, las células se resuspendieron en 2 mL de MEM suplementado, para frenar la acción de la tripsina por el suero fetal que contiene. En el caso de los frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> los volúmenes se triplicaron. Por último, se calculó la densidad celular mediante recuento en cámara de Thoma en un microscopio invertido TMS-F de Nikon (Tokio, Japón) y, en base a este recuento, se calculó el volumen necesario de suspensión celular para conseguir una densidad final de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en un nuevo frasco de cultivo. El volumen de medio de cultivo fue de 10 mL en el caso de los frascos de 25 cm<sup>2</sup> y de 25 mL en los frascos de 75 cm<sup>2</sup>. A esta densidad celular de siembra, el subcultivo se realizó cada 4 días, un máximo de veinticinco veces, tras lo cual se procedió a descongelar una nueva alícuota de suspensión celular, tal y como se detalla a continuación.

### **3.2.8.2. Congelación y descongelación de células**

Para obtener la suspensión celular adecuada para la congelación y mantenimiento de la línea celular, se sembraron 3 frascos de 75 cm<sup>2</sup> y se incubaron hasta la confluencia. Posteriormente, tras tripsinizar las monocapas celulares de los 3 frascos, tal y como se ha descrito anteriormente, las células se juntaron en un tubo estéril que se centrifugó a 1.000 g durante 5 min a 20 °C. El precipitado celular resultante se resuspendió en MEM suplementado y su densidad se ajustó a  $12 \times 10^6$  células/mL. A continuación, tras alicuotar en crioviales la suspensión celular, a razón de 1 mL/vial, se añadió a cada uno el mismo volumen de medio de congelación compuesto por MEM al 60% (v/v), FBS al 20% (v/v) y dimetilsulfóxido al 20% (v/v). Los crioviales se mantuvieron a -80 °C durante 2 h y, posteriormente, se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Para la descongelación de las células, los crioviales se extrajeron del nitrógeno líquido y se descongelaron a temperatura ambiente. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo estéril de fondo cónico conteniendo 50 mL de medio MEM y se centrifugó a 1.000 g durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar el medio de congelación. El precipitado celular resultante se resuspendió en 10 mL de medio MEM suplementado y se transfirió a frascos de cultivo, donde se incubó en las condiciones antes descritas.

### **3.2.8.3. Siembra en placas de microensayo**

Los ensayos de neutralización de la infección por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas se realizaron en placas de microensayo de 96 pocillos (0,32 cm<sup>2</sup>/pocillo). Para

la siembra en estas placas, la suspensión celular obtenida tras tripsinización de la monocapa confluyente de los frascos de 25 cm<sup>2</sup> se ajustó con MEM suplementado para que la densidad final fuera de 2 x 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. Posteriormente, la suspensión celular se distribuyó en la placa a razón de 150 µL/pocillo, y se incubó en las condiciones anteriormente indicadas.

#### **3.2.8.4. Ensayo de citotoxicidad**

Para evaluar el efecto de las fracciones y proteínas lácteas en la viabilidad de las células MA104, se empleó un ensayo colorimétrico basado en el reactivo MTS (Barltrop et al., 1991). En presencia de la enzima succinato deshidrogenasa que poseen las células metabólicamente activas, el MTS es biorreducido a formazán, un compuesto coloreado cuya absorbancia a 490 nm es directamente proporcional al número de células viables en el cultivo.

Para ello, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos con medio MEM suplementado en las condiciones descritas anteriormente hasta la confluencia. Para realizar el ensayo, en primer lugar se eliminó el medio de los pocillos, se añadieron 100 µL/pocillo de MEM sin FBS, e incubaron a 37 °C durante 1 h. Después, las monocapas celulares se lavaron con 200 µL/pocillo de PBS estéril y se incubaron durante 2 h con 100 µL/pocillo de las diferentes muestras lácteas (a 2 mg/mL), cuya posible citotoxicidad se quería evaluar. Posteriormente, tras un lavado con PBS estéril, se añadieron 200 µL/pocillo de MEM sin FBS y 20 µL/pocillo del reactivo MTS, y se incubó la placa a 37 °C durante 2 h. La absorbancia se determinó a 490 nm a las 0, 1 y 2 h de incubación mediante medida con un lector de microplacas.

#### **3.2.9. Rotavirus**

##### **3.2.9.1. Propagación de rotavirus en la línea celular MA104**

A lo largo de este trabajo se han utilizado 8 cepas de rotavirus: 4 bovinas (WC3, UK, NCDV, B223), 1 humana (Wa), 1 de simio (RRV) y 2 cepas reagrupadas (UK x RRV 19-1-1 y UK x RRV 85-2). Las diferentes cepas se propagaron en la línea celular MA104, en base a métodos previamente descritos (Arias et al., 1996; Arnold et al., 2009), con el fin de conseguir la cantidad suficiente de suspensión vírica homogénea para la realización de todos los ensayos.

Para la propagación de los virus, se cultivaron células MA104 en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente 90-95%. Por otro lado, para activar los rotavirus y obtener una suspensión con capacidad infectante, se incubaron con tripsina a una concentración final de 20 µg/mL en PBS, durante 1 h a 37 °C en un baño termostático WNB de Memmert (Schwabach, Alemania), agitando cada 10 min. La suspensión se diluyó con medio



EMEM hasta alcanzar una concentración final de tripsina de 2 µg/mL, obteniendo así el inóculo infectante. El medio EMEM empleado en los ensayos con rotavirus se suplementó con una solución de antibióticos (100 Unidades/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina) a una concentración final del 1% (v/v), así como con L-glutamina y anfotericina B hasta una concentración final de 2 mM y 0,25 µg/mL, respectivamente.

Una vez obtenido el inóculo infectante, y tras lavar la monocapa celular con 10 mL de PBS, se procedió a la infección. Para ello, se añadió 1,5 mL de inóculo infectante al frasco de 75 cm<sup>2</sup> y se incubó durante 1 h a 37 °C en un agitador oscilante. Al finalizar, se añadieron al frasco 20 mL de EMEM suplementado con tripsina a una concentración final de 0,5 µg/mL y se incubó a 37 °C durante 2-3 días hasta que se observó el efecto citopático. En el caso de la propagación en frascos de 25 cm<sup>2</sup> se emplearon volúmenes proporcionales.

Para la obtención de las suspensiones de rotavirus, los frascos de cultivo se sometieron a tres ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación (temperatura ambiente) y, seguidamente, la monocapa celular se separó con un rascador estéril. El lisado resultante, conteniendo células y virus, se traspasó a un tubo estéril de 50 mL y se clarificó por centrifugación a 300 g durante 15 min a 4 °C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se consideró como suspensión vírica infectiva, por lo que se tituló mediante ensayos de inmunotinción (como se describe en el siguiente apartado), y se fraccionó en alícuotas de 1 mL que se almacenaron a -80 °C hasta su uso en los diversos ensayos.

### **3.2.9.2. Titulación de la suspensión de rotavirus**

Para la titulación de las suspensiones de las diversas cepas de rotavirus se emplearon los dos procedimientos basados en inmunotinción que se detallan a continuación.

- Inmunofluorescencia indirecta

Este procedimiento se empleó para titular la suspensión de rotavirus de la cepa WC3 usada en nuestro laboratorio, y se basó en el descrito por Arnold et al. (2009). Para ello, se sembró una placa de 96 pocillos con células MA104 y se incubó hasta alcanzar una confluencia del 90-95%. Antes de la infección, los pocillos se lavaron e incubaron durante 2 h con EMEM suplementado. Por otro lado, se descongeló una alícuota de la suspensión de rotavirus y se activó mediante adición de tripsina a una concentración final de 20 µg/mL e incubación a 37 °C durante 1 h, con agitación cada 10 min. Se prepararon entonces diferentes diluciones (de la 1/1 a la 1/5<sup>9</sup>) de la suspensión de rotavirus activada, en una placa de 96 pocillos con EMEM.

A continuación, el contenido de la placa con las diferentes diluciones de rotavirus activados se transfirió (25 µL/pocillo) a la placa con células MA104 preparada anteriormente y

conteniendo 25 µL/pocillo de EMEM suplementado. Se incluyeron como control negativo pocillos con 50 µL de medio EMEM. Tras incubar la placa a 37 °C durante 1 h en agitación, periodo en el que se produjo la adsorción del virus a la superficie celular, se añadieron 100 µL/pocillo de medio EMEM suplementado conteniendo FBS al 4% (v/v) y 2 µg/mL de tripsina para favorecer la infección, y la placa se incubó a 37 °C durante 16 h en agitación leve.

Transcurridas las 16 h de infección, se eliminó el medio de los pocillos por succión, recogiénolo en un recipiente con Mucocit-T al 2% (p/v) para inactivar los rotavirus remanentes, y las células se lavaron con 200 µL/pocillo de PBS. A continuación, se procedió a la fijación celular añadiendo 300 µL/pocillo de una solución de acetona:metanol:formalina (1:1:1) e incubando durante 1 min a 4 °C. Tras eliminar la solución de fijación y lavar la placa dos veces con PBS, las células infectadas se detectaron mediante inmunofluorescencia indirecta. Para ello, la placa se incubó con 30 µL/pocillo de un antisuero anti-rotavirus bovino UK obtenido en cordero (diluido 1/300 en PBS con gelatina al 2% (v/v)) a 37 °C durante toda la noche en agitación suave. Después, los pocillos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 30 µL/pocillo de anticuerpos anti-IgG de cordero obtenidos en burro conjugados con FITC (diluido 1/300 en PBS con gelatina al 2% (v/v)) durante 1 h a 37 °C con agitación suave. Por último, tras lavar tres veces con PBS, se realizó el recuento de células fluorescentes en el microscopio de fluorescencia Eclipse E400 con filtro para FITC de Nikon, y el software de tratamiento de imagen Zen lite 2012.

- Inmunotinción con carbazol

Este procedimiento se empleó para titular las suspensiones de rotavirus de las cepas utilizadas en el laboratorio del Dr. Arias, y se basó en el descrito por Arias et al. (1987). El procedimiento experimental es muy similar al de inmunofluorescencia, con alguna modificación en la fase de fijación celular e inmunodetección. Así, los pocillos se lavaron con PBS tras el periodo de infección de 16 h y la monocapa celular se fijó con acetona al 80% (v/v) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Las células infectadas se detectaron mediante inmunotinción con carbazol. Para ello, se empleó como antisuero primario un anti-TLP obtenido en conejo (diluido 1/2.000 en PBS), incubando toda la noche a 37 °C. A continuación, la placa se incubó 2 h a 37 °C con anticuerpos anti-IgG de conejo obtenidos en cabra y conjugados con peroxidasa (diluidos 1/2.000 en PBS). Finalmente, la placa se reveló incubando con una solución compuesta por 3-amino-9-etilcarbazol al 0,05% (p/v) y peróxido de hidrógeno al 0,015% (v/v) en acetato sódico 0,05 M, pH 5, durante 10 min en oscuridad a 37 °C y el recuento de células infectadas se realizó en un microscopio invertido.

Tras realizar los dos tipos de inmunotinción, el cálculo del título de la suspensión de rotavirus se realizó según Arnold et al. (2009), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ células infectadas pocillo} \times (\text{factor de dilución})^{-1} \times (\text{mL de inóculo})^{-1} = \text{FFU/mL}$$

**Tabla 24.** Título de las suspensiones de rotavirus obtenidas de las diferentes cepas bovinas (UK, WC3, B223, NCDV), humanas (Wa) y de simio (RRV).

Cepa de rotavirus	Título de la suspensión (FFU/mL)
UK	$3,4 \times 10^7$
WC3	$7,8 \times 10^5 / 1,0 \times 10^7$ *
B223	$9,7 \times 10^6$
NCDV	$1,2 \times 10^8$
Wa	$2,4 \times 10^6$
RRV	$6,0 \times 10^6$
UK x RRV 19-1-1	$1,6 \times 10^5$
UK x RRV 85-2	$5,5 \times 10^5$

\*Se obtuvieron dos suspensiones para la cepa WC3. El primer título corresponde a la suspensión obtenida y empleada en nuestro laboratorio. El segundo título corresponde a la suspensión vírica propagada y usada durante la estancia en el laboratorio del Dr. Arias.

### 3.2.9.3. Purificación de rotavirus en gradiente de cloruro de cesio

Para el ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula fue necesaria la obtención de partículas de triple capa (TLPs, triple-layered particles), que se llevó a cabo mediante purificación en gradiente de cloruro de cesio (Espejo et al., 1980). Se obtuvieron TLPs de las cepas bovinas WC3 y NCDV.

Para ello, tras obtener la suspensión de rotavirus, tal y como se ha explicado anteriormente, esta se sometió a ultracentrifugación a 150.000 g durante 1 h en una centrífuga Optima L-90K de Beckman Coulter (Pasadena, CA, EE.UU.). El precipitado resultante (conteniendo células y virus) se resuspendió en tampón Tris-HCl 40 mM, pH 7,5, con NaCl 150 mM y CaCl<sub>2</sub> 10 mM (TNC), se homogeneizó con ultraturrax y se trató con freón frío (mezcla 1:1) para extraer los lípidos de la muestra. Tras centrifugación a 5.000 g durante 5 min en una centrífuga Universal 320R de Hettich (Buford, GA, EE.UU.), se recuperó la fracción soluble de virus (sobrenadante) y se repitió la extracción cuatro veces añadiendo de nuevo tampón TNC. Los sobrenadantes con los virus se juntaron y se sometieron a un gradiente de cloruro de cesio (8,8 g cloruro de cesio / 16 mL virus) mediante ultracentrifugación a 160.000 g durante 18 h a 4 °C para separar las

partículas víricas infectivas (TLPs) de las no infectivas o defectuosas, quedando estas últimas por debajo de las TLPs. Para su posterior utilización en los ensayos de unión, se eliminó el cloruro de cesio pasando la suspensión por una columna de Sephadex G-25 y se determinó la concentración proteica mediante medida en un espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c de Thermo Scientific. Además, el título de las suspensiones de TLPs se determinó mediante inmunotinción con carbazol, como se ha descrito anteriormente, siendo de  $8,1 \times 10^8$  y  $1,6 \times 10^9$  FFU/mL, para las cepas WC3 y NCDV, respectivamente.

#### **3.2.9.4. Caracterización del ARN vírico**

La caracterización del genoma (ARN) de las diferentes cepas de rotavirus estudiadas se llevó a cabo por electroforesis en gel de poliacrilamida. En primer lugar se procedió a la extracción del ARN viral de cada suspensión. Para ello, se mezclaron 300  $\mu$ L de suspensión vírica con 30  $\mu$ L del tampón de lisis compuesto por Tris 2,6 M, EDTA 750 mM, SDS 450 mM, NaCl 6,8 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 1,8 M. Tras agitar vigorosamente durante 2 min se añadieron 300  $\mu$ L de fenol saturado pH 8 y se volvió a agitar otros 2 min. A continuación, tras añadir 300  $\mu$ L de solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y agitar durante 2 min, se centrifugó a 12.000 g durante 5 min. Al sobrenadante resultante se le adicionaron 2,5 volúmenes de etanol, se agitó durante 2 min y se centrifugó a 12.000 g durante 15 min. El precipitado resultante conteniendo el ARN extraído se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua libre de ARNasas y se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo en geles del 10% de poliacrilamida de manera similar a la explicada anteriormente (apartado 3.2.6.2.), si bien cabe destacar algunas modificaciones. El tampón con el que se diluyó 1:1 la muestra de ARN extraído estaba compuesto por Tris 20 mM, pH 6,8, glicina 150 mM, glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 1% (v/v). La electroforesis se realizó a 13 mA durante 13 h, tras lo cual los geles se tiñeron con plata.

#### **3.2.10. Ensayos de neutralización de la infección de las células MA104 por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas**

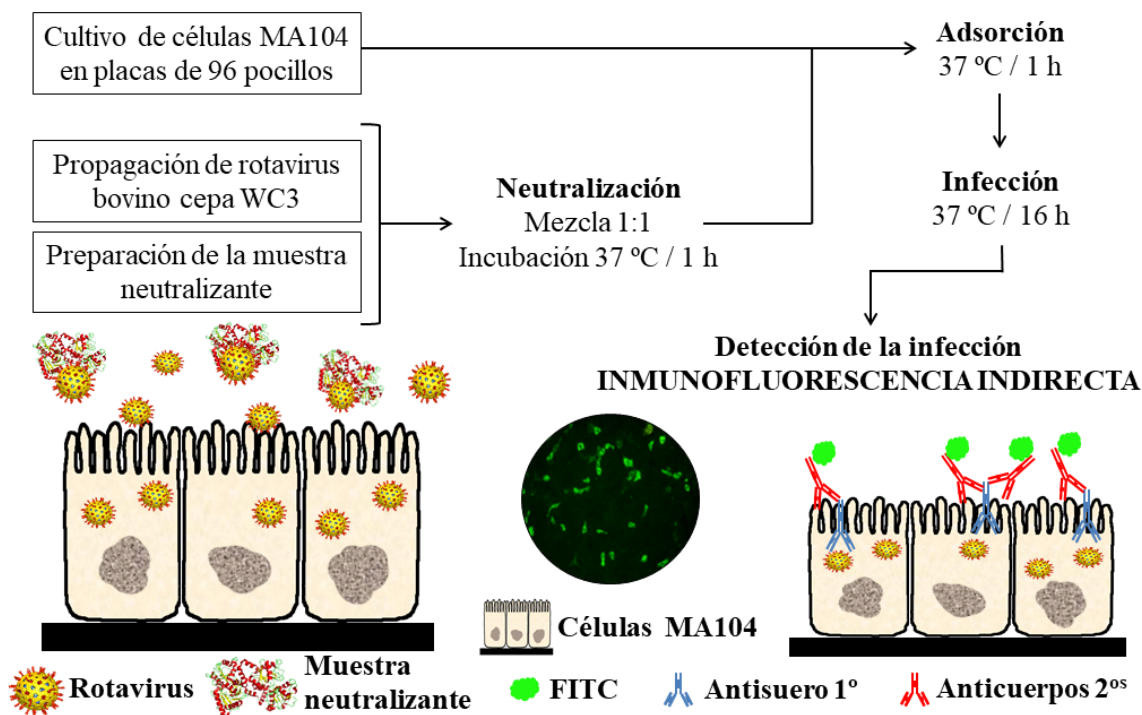
La actividad antirrotavirus mediada por las fracciones y proteínas lácteas obtenidas se evaluó mediante ensayos de neutralización de la infección, tal y como se detalla a continuación. Antes del ensayo, las muestras lácteas se dializaron frente a PBS y esterilizaron por filtración (filtros de baja adsorción proteica de 0,22 y 0,45  $\mu$ m). Posteriormente, se determinó su concentración proteica mediante BCA y se ajustó convenientemente mediante dilución con PBS estéril.

### 3.2.10.1. Determinación mediante inmunofluorescencia indirecta

La actividad neutralizante de las muestras lácteas frente a la cepa de rotavirus bovinos WC3 se evaluó mediante el ensayo de inmunofluorescencia según Arnold et al. (2009). Para ello, se preparó una placa de 96 pocillos con células MA104 y se incubó a 37 °C hasta alcanzar un 90-95% de confluencia. Antes de la infección, la placa se lavó e incubó durante 2 h con EMEM suplementado. Además, se descongeló una alícuota de la suspensión de rotavirus WC3 y se activó con tripsina (concentración final de 20 µg/mL) durante 1 h a 37 °C. A continuación, se incubaron las muestras lácteas de las que se evaluaba su actividad antivírica junto con la suspensión de rotavirus bovino activada, en una proporción 1:1 (volumen final 50 µL) en una placa de 96 pocillos de fondo cónico, durante 1 h a 37 °C. Como control negativo se empleó medio EMEM y como control positivo suspensión de rotavirus activada diluida 1:1 con EMEM. La dilución de la suspensión de virus se ajustó con EMEM para conseguir una multiplicidad de infección (MOI, multiplicity of infection), o ratio n° de virus/n° de células, de 0,02 en cada pocillo.

A continuación, el contenido de la placa incubada se transfirió (50 µL/pocillo) a la placa con células MA104 preparada anteriormente y se incubó durante 1 h a 37 °C. Para facilitar la fase de infección posterior a la adsorción, se añadieron 100 µL/pocillo de medio EMEM suplementado con FBS al 4% (v/v) y 2 µg/mL de tripsina, y la placa se incubó a 37 °C durante 16 h. Tras la infección, se procedió a la fijación celular y a la detección de las células infectadas mediante inmunofluorescencia indirecta, usando los procedimientos que se han descrito anteriormente (ver apartado 3.2.9.2.).

En la **Figura 26** se incluye un esquema del ensayo de neutralización de la infección de rotavirus WC3 con detección mediante inmunofluorescencia indirecta.



**Figura 26.** Esquema del ensayo de neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino con detección mediante inmunofluorescencia indirecta.

La actividad neutralizante de las muestras lácteas (a diferentes concentraciones) se analizó al menos por duplicado en tres ensayos independientes ( $n \geq 6$ ). Los porcentajes de neutralización se calcularon en relación al 100% de infectividad obtenida con los controles positivos, que consistieron en la suspensión de virus sin agente neutralizante. Con el objetivo de facilitar la comparación de la actividad neutralizante exhibida por las muestras lácteas, en la discusión se han incluido valores de concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ). La  $IC_{50}$  es la concentración de la muestra a la que se alcanza un 50% de inhibición de la infección de las células MA104 por los rotavirus.

En la **Tabla 25** quedan reflejadas las fracciones y proteínas lácteas evaluadas mediante este ensayo de neutralización.

**Tabla 25.** Muestras lácteas cuya capacidad de neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se ha evaluado mediante inmunofluorescencia indirecta.

<b>Muestras lácteas bovinas y ovinas</b>		<b>Concentraciones (mg proteína/mL)</b>
<b>Fracciones</b>	Calostro	0,01-0,5
	Leche cruda entera y desnatada	0,05-4
	Lactosuero	0,05-8
	Caseínas	0,5-8
	Proteosa-peptona	0,25-4
	Mazada y butter serum procedentes de nata lavada y sin lavar	0,25-8
	Fracción enriquecida en MFGM procedente de nata lavada y sin lavar	0,25-6
<b>Proteínas</b>	IgGs	0,003-1
	LF ovina (cerda y camella)	0,05-2
	Fracción enriquecida en MUCs	
	XOD	0,02-0,25
	LDH bovina	
	PP3	
<b>Muestras lácteas humanas</b>		<b>Concentraciones</b>
<b>Fracciones</b>	Leche cruda entera y desnatada	0,01-2
	Lactosuero	0,01-2
	Caseínas	0,1-2
	Fracción enriquecida en MFGM	0,5-2
<b>Proteínas</b>	IgAs	0,01-1
	LF	0,05-2
	$\alpha$ -LA y LYZ	0,5-2
	Fracción enriquecida en MUCs	0,05-2
	Fracción enriquecida en LDH	0,05-0,5
<b>Muestras lácteas comerciales</b>		<b>Concentraciones</b>
<b>Fracciones</b>	WPC y WPH	0,05-10
	Leche desnatada, mazada y butter serum	0,5-10
	Leches infantiles de fórmula	0,5-6
<b>Proteínas</b>	LF bovina nativa y saturada con Fe	0,05-2
	LFs humanas recombinantes	
	LYZ humana recombinante	0,25-2
	$\alpha$ -LA, $\beta$ -LG, caseína- $\alpha$ , caseína- $\beta$ , caseína- $\kappa$ , SA y LPOX bovinas	0,05-2
<b>Muestras lácteas hidrolizadas*</b>		

\*Las muestras lácteas hidrolizadas evaluadas se detallan en el apartado 3.2.14.

### 3.2.10.2. Validación del ensayo de neutralización mediante inmunofluorescencia

Dado que el ensayo de neutralización basado en el método de inmunofluorescencia iba a utilizarse a lo largo de toda la tesis, se sometió a validación en base a directrices internacionales: AOAC (Horwitz, 2002), Eurachem (Magnusson y Ornemark, 2014), IUPAC (Thompson et al., 2002) y la Decisión 2002/657/CE. La validación del ensayo de neutralización se llevó a cabo infectando las monocapas de células MA104 con la suspensión de rotavirus bovino WC3 y como agente neutralizante calostro bovino hiperinmune procedente de vacas inmunizadas con rotavirus bovino. Se analizaron los siguientes parámetros: especificidad, intervalo de trabajo, precisión (en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad) y robustez.

Para determinar la especificidad del ensayo se evaluó su capacidad para detectar el rotavirus distinguiéndolo de otras sustancias presentes en la matriz como componentes celulares, componentes del medio de cultivo, PBS, gelatina, etc. Las posibles interferencias que pudieran resultar de los componentes de la matriz se estudiaron mediante incubación con los antisueros primario y secundario juntos y por separado.

Además, para determinar el intervalo de trabajo y la sensibilidad de la técnica, se realizó el ensayo de neutralización utilizando calostro bovino a diversas concentraciones (1/1.000 a 1/10.000). Tras representar los porcentajes de neutralización obtenidos frente a la concentración de calostro se obtuvo el grado de correlación de los resultados ( $R^2$ ).

Se determinó la precisión o grado de concordancia entre los resultados del ensayo de neutralización en condiciones de repetibilidad (tres ensayos independientes realizados el mismo día) y en condiciones de reproducibilidad (tres ensayos independientes realizados en tres días distintos). En cada ensayo se evaluó la capacidad neutralizante del calostro bovino (1/5.000) por sextuplicado. La precisión se calculó como coeficiente de variación (CV) de los resultados de los ensayos ( $n=18$ ), mediante la siguiente fórmula:

$$CV (\%) = \frac{SD * 100}{X}$$

SD: desviación estándar de los resultados de neutralización.

X: promedio de los resultados de neutralización.

Los CV en condiciones de repetibilidad ( $CV_r$ ) y en condiciones de reproducibilidad ( $CV_R$ ) se analizaron en base a criterios de aceptación preestablecidos para ensayos inmunoquímicos similares:  $CV_r \leq 20\%$ ;  $CV_R \leq 30\%$  (Payne et al., 2006; Pecora et al., 2009).

La robustez del método de neutralización, o susceptibilidad del mismo a los cambios en las condiciones experimentales, se determinó en base a las directrices de Youden y Steiner (1975). Para ello, se seleccionaron siete factores experimentales susceptibles de fluctuación en la



práctica en el laboratorio que podían afectar a los resultados analíticos, y se estableció el valor de la modificación viable de dichos factores en relación al valor de referencia (**Tabla 26**).

**Tabla 26.** Factores experimentales susceptibles de modificación durante el ensayo de neutralización.

<b>Factor experimental</b>	<b>Referencia</b>	<b>Modificación</b>
Tiempo neutralización	1 h ( <b>A</b> )	1 h 15 min ( <b>a</b> )
Nº lavados antes fijación	1 ( <b>B</b> )	2 ( <b>b</b> )
Tiempo fijación	1 min ( <b>C</b> )	2 min ( <b>c</b> )
Nº lavados tras fijación	2 ( <b>D</b> )	1 ( <b>d</b> )
% Gelatina como bloqueante	2% ( <b>E</b> )	1% ( <b>e</b> )
Nº lavados tras 1 <sup>er</sup> antisuero	2 ( <b>F</b> )	1 ( <b>f</b> )
Nº lavados tras 2 <sup>o</sup> antisuero	3 ( <b>G</b> )	2 ( <b>g</b> )

A continuación se configuró el ensayo de robustez en base a la matriz de Youden, resultando en ocho experimentos independientes derivados de la diferente combinación de los factores experimentales previamente establecidos (**Tabla 27**).

**Tabla 27.** Configuración del ensayo de robustez según la matriz de Youden (Youden y Steiner, 1975).

<b>Factor</b>	<b>Combinación de factores experimentales</b>							
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>A/a</b>	A	A	A	A	a	a	a	a
<b>B/b</b>	B	B	B	B	B	B	b	b
<b>C/c</b>	C	c	C	C	C	c	C	c
<b>D/d</b>	D	D	D	D	d	d	D	D
<b>E/e</b>	E	e	E	E	e	E	e	E
<b>F/f</b>	F	f	F	F	F	f	f	F
<b>G/g</b>	G	g	G	G	g	G	G	g
<b>Resultado observado</b> (% neutralización)	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>U</b>	<b>V</b>	<b>W</b>	<b>X</b>	<b>Y</b>	<b>Z</b>

Cada experimento (cuyas características se detallan en la **Tabla 28**) se llevó a cabo por sextuplicado en tres días distintos (n=18).

**Tabla 28.** Características de los experimentos independientes resultado de la aplicación de la matriz de Youden.

Experimentos	Características del experimento
1	<b>1 h</b> de neutralización; <b>1</b> lavado con PBS antes de la fijación; <b>1</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>2</b> lavados con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>2%</b> de gelatina como bloqueante; <b>2</b> lavados con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>3</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
2	<b>1 h</b> de neutralización; <b>1</b> lavado con PBS antes de la fijación; <b>2</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>2</b> lavados con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>1%</b> de gelatina como bloqueante; <b>1</b> lavado con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>2</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
3	<b>1 h</b> de neutralización; <b>2</b> lavados con PBS antes de la fijación; <b>1</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>1</b> lavado con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>2%</b> de gelatina como bloqueante; <b>1</b> lavado con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>2</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
4	<b>1 h</b> de neutralización; <b>2</b> lavados con PBS antes de la fijación; <b>2</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>1</b> lavado con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>1%</b> de gelatina como bloqueante; <b>2</b> lavados con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>3</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
5	<b>1 h 15 min</b> de neutralización; <b>1</b> lavado con PBS antes de la fijación; <b>1</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>1</b> lavado con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>1%</b> de gelatina como bloqueante; <b>2</b> lavados con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>2</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
6	<b>1 h 15 min</b> de neutralización; <b>1</b> lavado con PBS antes de la fijación; <b>2</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>1</b> lavado con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>2%</b> de gelatina como bloqueante; <b>1</b> lavado con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>3</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
7	<b>1 h 15 min</b> de neutralización; <b>2</b> lavados con PBS antes de la fijación; <b>1</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>2</b> lavados con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>1%</b> de gelatina como bloqueante; <b>1</b> lavado con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>3</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero
8	<b>1 h 15 min</b> de neutralización; <b>2</b> lavados con PBS antes de la fijación; <b>2</b> min de fijación de las monocapas celulares; <b>2</b> lavados con PBS tras fijación; antisueros preparados en PBS con <b>2%</b> de gelatina como bloqueante; <b>2</b> lavados con PBS tras incubación con 1 <sup>er</sup> antisuero; <b>2</b> lavados tras incubación con 2 <sup>o</sup> antisuero

Una vez realizados los experimentos y obtenidos los resultados (% de neutralización), se compararon las medias de las mayúsculas (valores de referencia A-G) con las medias de las minúsculas correspondientes (valores modificados a-g). Si uno de los factores tiene un efecto, la diferencia será significativamente mayor que las diferencias de los otros factores.

Además, se calculó la desviación estándar de las diferencias (SDi):

$$SDi = \sqrt{2 * \sum (Di^2 / 7)}$$

Di: diferencia entre los resultados obtenidos, para cada factor, con los valores de referencia (A-G) en comparación con los valores modificados (a-g).

Si el valor SDi obtenido fuera significativamente mayor que la desviación estándar del método en condiciones de reproducibilidad, se podría deducir que el conjunto de los factores influye en el resultado y, por tanto, que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones evaluadas.

### 3.2.10.3. Determinación mediante inmunodetección con carbazol

Mediante este método se evaluó la capacidad neutralizante de diversas fracciones y proteínas lácteas frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3, UK, NCDV y B223, la cepa humana Wa y la cepa de simio RRV.

Se empleó el mismo ensayo de neutralización descrito en el apartado 3.2.10.1, con diversas modificaciones. Entre ellas cabe destacar que en este ensayo, tras la etapa de adsorción de las mezclas de virus-muestras lácteas a la placa con células MA104 durante 1 h a 37 °C, el inóculo se retiró y se realizó un lavado con MEM sin FBS. Además, también se modificó la fase de fijación celular e inmunodetección, tal y como se ha detallado en el apartado 3.2.9.2. En este caso, las muestras se analizaron por duplicado en dos experimentos independientes (n=4).

En la **Tabla 29** quedan reflejadas las fracciones y proteínas lácteas evaluadas mediante este ensayo de neutralización.

**Tabla 29.** Muestras lácteas evaluadas en el ensayo de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus (cepas WC3, UK, NCDV, B223, Wa y RRV) mediante inmunodetección con carbazol.

Muestras lácteas bovinas y ovinas		Concentraciones (mg proteína/mL)
Fracciones	Calostro	0,0002-0,25
	Lactosuero	0,05-8
	Mazada y butter serum procedentes de nata lavada	0,05-8
	Fracción enriquecida en MFGM procedente de nata lavada	
Proteínas	IgGs bovinas	0,01-0,25
	Fracción enriquecida en MUCs bovinas	0,05-10
	XOD	0,05-2
	LDH bovina	0,005-0,04
	PP3	0,1-7
Muestras lácteas comerciales		Concentraciones
Fracciones	WPC bovino	0,05-6
	Mazada y butter serum	0,05-20
Proteínas	LF bovina	0,05-4
Muestras lácteas hidrolizadas*		

\*Las hidrólisis de las muestras lácteas evaluadas en el ensayo de neutralización de la infección por rotavirus (cepas WC3, UK, NCDV, B223, Wa y RRV) mediante inmunodetección con carbazol se detalla en el apartado 3.2.14.

#### 3.2.10.4. Determinación mediante PCR a tiempo real para rotavirus humanos

Mediante este método se evaluó la capacidad neutralizante de diversas fracciones y proteínas lácteas frente a la cepa Wa de rotavirus humano (Tabla 30). El método se compone básicamente de tres etapas: neutralización, extracción de ARN y detección del ARN, cuyos aspectos más relevantes se destacan a continuación.

- Etapa de neutralización

Para poder cuantificar la actividad neutralizante de las muestras lácteas, fue necesario obtener una recta de calibrado con la suspensión de rotavirus humano. El título de la suspensión de rotavirus obtenida en nuestro laboratorio fue determinado por PCR a tiempo real en  $3,8 \times 10^6$  copias de ARN/ $\mu\text{L}$  por la empresa CerTest Biotec, que comercializa el kit de PCR utilizado. Se infectaron las células MA104 con la suspensión de virus a diferentes diluciones (1/1 a 1/5<sup>5</sup>) y se obtuvo la recta de calibrado (n=4) representando el logaritmo del número de copias de ARN

frente al logaritmo de Ct (ciclo umbral). Antes de proceder a los ensayos de neutralización, se realizó una cinética de extracción de ARN. Se infectaron los pocillos de la placa de 96 con la suspensión de rotavirus y se evaluó la extracción de ARN tras 0, 3, 6, 9, 12 y 16 h post-infección. En base a los resultados obtenidos y a diversos estudios publicados (Ayala-Breton et al., 2009; Varada et al., 2013), para los ensayos de neutralización se mantuvo la extracción de ARN a las 6 h.

Una vez establecida la recta de calibrado y el tiempo de extracción del ARN, se realizaron los ensayos de neutralización con las fracciones y proteínas lácteas. Para ello, las muestras lácteas y la suspensión vírica se mezclaron en una proporción 1:1 (v/v) y se incubaron a 37 °C durante 1 h. A continuación, se añadieron 50 µL de la mezcla/pocillo a la placa de células al 95% de confluencia a una MOI de 0,02. Tras una incubación de 1 h a 37 °C, el inóculo infeccioso se retiró y las células se lavaron una vez con 300 µL/pocillo de PBS. A continuación, tras añadir 100 µL/pocillo de EMEM suplementado, se incubaron las placas a 37 °C durante 6 h y se procedió a la extracción del ARN vírico. Como control positivo se empleó la suspensión de rotavirus sin agente neutralizante, y como control negativo el medio EMEM. Cada muestra se analizó por duplicado en dos experimentos independientes (n=4).

**Tabla 30.** Muestras lácteas evaluadas en el ensayo de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus humano Wa mediante PCR a tiempo real.

<b>Muestras lácteas bovinas</b>		<b>Concentración (mg proteína/mL)</b>
<b>Fracciones</b>	Calostro	0,1
	Lactosuero	2
	Mazada, butter serum y fracción enriquecida en MFGM de nata lavada	6
<b>Proteínas</b>	IgGs	0,2
	XOD	0,7
	LDH	0,04
<b>Muestras lácteas comerciales bovinas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones</b>	WPC	2
<b>Proteínas</b>	LF	1

- Etapa de extracción del ARN

Tras 6 h de infección se obtuvo el lisado celular mediante tres ciclos de congelación (-80 °C) y descongelación (37 °C) de las placas, seguido del raspado de la monocapa celular con punta estéril. Tras centrifugar el lisado a 13.000 g durante 1 min a 4 °C en una centrífuga

Biofuge Pico (Heraeus), el sobrenadante se empleó en la etapa posterior de extracción del ARN, mediante el “RNA Viasure Extraction Kit”, siguiendo las indicaciones del fabricante.

- Etapa de PCR a tiempo real

Por último, el ARN extraído de cada muestra se analizó por PCR a tiempo real, usando el “Viasure Pathogen Real Time PCR Detection Kit”, según las indicaciones del kit. Inicialmente, se añadieron 15 µL/pocillo del tampón de rehidratación conteniendo la mezcla adecuada de enzimas, primers, oligonucleótidos, control interno y estabilizadores. Posteriormente, se añadieron 5 µL de los controles negativo (agua libre de ARNasas) y positivo (ARN viral), y del ARN extraído de cada muestra, a los pocillos correspondientes. La placa se introdujo en el equipo de PCR StepOne de 48 pocillos de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.) y se programó el termociclador (ver condiciones en **Tabla 31**) para la amplificación de las muestras. Los resultados de neutralización (%) se calcularon en relación al número de copias de ARN vírico del control positivo (virus sin agente neutralizante). El número de copias de ARN vírico remanente tras incubar con las distintas muestras lácteas se estimó interpolando sus valores Ct en la recta de calibrado obtenida con la suspensión de rotavirus.

**Tabla 31.** Condiciones de amplificación en la PCR a tiempo real para rotavirus humanos.

Nº ciclos	Etapa de la PCR	Tiempo	Temperatura (°C)
1	Retrotranscripción	15 min	45
1	Desnaturalización inicial	2 min	95
45	Desnaturalización	10 s	95
	Alineamiento	50 s	60

### 3.2.11. Estudio del mecanismo de inhibición de la infección por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas

Con el objetivo de esclarecer qué mecanismos emplean las diferentes fracciones y proteínas lácteas para inhibir la infección por rotavirus, se llevaron a cabo cuatro tipos de ensayos:

- Ensayo de inhibición de la unión rotavirus-células
- Ensayo de inhibición post-unión rotavirus-células
- Ensayo de neutralización de cepas reagrupadas
- Ensayo de bloqueo celular

En la **Tabla 32** se incluye la relación de fracciones y proteínas lácteas analizadas.

**Tabla 32.** Muestras lácteas bovinas y ovinas evaluadas en los diferentes ensayos del estudio del mecanismo de inhibición de la infección de las células MA104 por diversas cepas de rotavirus.

<b>Ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula (cepas bovinas WC3 y NCDV)</b>		<b>Concentración (mg proteína/mL)</b>
<b>Fracciones bovinas y ovinas</b>	Calostro	0,03 / 0,5
	Lactosuero	2 / 4
	Mazada, butter serum y fracción enriquecida en MFGM de nata lavada	8
	WPC y WPH bovinos	2 / 8
<b>Proteínas bovinas</b>	IgGs	0,1
	LF	4
	Fracción enriquecida en MUCs	5
	XOD	0,35
	LDH	0,02
<b>Ensayo de inhibición post-unión rotavirus-célula (cepa bovina WC3)</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones bovinas</b>	Calostro	0,03
	Lactosuero	2
	Mazada y butter serum de nata lavada	8
<b>Proteínas bovinas</b>	IgGs	0,1
	LF	0,5
	Fracción enriquecida en MUCs	10
	LDH	0,04
<b>Ensayo de neutralización de cepas reagrupadas (cepas RRV x UK 19-1-1 y 85-2)</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones bovinas y ovinas</b>	Lactosuero	0,2 / 2
	Mazada, butter serum y fracción enriquecida en MFGM de nata lavada	1 / 2 / 3
	WPC bovino	0,1 / 0,2
<b>Proteínas bovinas</b>	IgGs	0,03
	LF	0,25 / 0,5
	Fracción enriquecida en MUCs	2
	XOD	0,35
	LDH	0,02
<b>Ensayo de bloqueo celular (cepa bovina WC3)</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones bovinas y ovinas</b>	Calostro bovino	0,1
	Lactosuero	1
	Mazada, butter serum y fracción enriquecida en MFGM de nata lavada	2 / 3
	WPC bovino	1
<b>Proteínas bovinas</b>	IgGs	0,03
	LF	0,5
	Fracción enriquecida en MUCs	5

### 3.2.11.1. Ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula

Este ensayo se llevó a cabo para comprobar si las muestras lácteas eran capaces de inhibir la unión de los rotavirus a la célula y, por ende, su infección. El método se basó en el descrito por Zárate et al. (2000), y se emplearon partículas víricas infectivas (TLPs) de las cepas WC3 y NCDV. Para ello, se sembraron placas de 48 pocillos con células MA104 hasta la confluencia, se lavaron dos veces y se incubaron con MEM a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, los pocillos se bloquearon con 500 µL/pocillo de PBS con BSA al 1% (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente. Mientras tanto, se llevó a cabo la neutralización enfrentando, en placa de 96 pocillos, volúmenes iguales de TLPs (800 ng/pocillo) y muestras lácteas, a 37 °C durante 1 h. Tras lavar las células con 500 µL/pocillo de PBS con BSA al 0,5% (p/v) a 4°C, se transfirieron 100 µL/pocillo de las mezclas de TLPs-muestras lácteas y se incubaron durante 1 h a 4 °C para evitar la internalización de los virus en las células, que ocurre a 37 °C. Como control positivo se incluyeron pocillos solo con la suspensión de TLPs a 800 ng/pocillo, sin agente neutralizante. A continuación, se lavó la placa tres veces con 500 µL/pocillo de PBS a 4 °C y se obtuvieron los lisados celulares añadiendo 120 µL/pocillo de una solución de lisis compuesta por Tris 50 mM, pH 7,5, con NaCl 150 mM y Triton X-100 al 0,1% (v/v). Posteriormente, se realizaron dos ciclos de congelación (-80 °C/15 min) y descongelación (temperatura ambiente).

La cuantificación del grado de unión de los virus a las células se realizó mediante ELISA tipo sándwich. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos con anticuerpos de captura anti-RRV obtenidos en cabra, diluidos 1/5.000 en PBS, y se incubaron una noche a 4 °C. Posteriormente, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con 200 µL/pocillo de PBS con BSA al 1% (p/v) durante 2 h a 37 °C. Tras lavar tres veces la placa con PBS-Tween 0,1% (PBS-T), se añadieron los lisados celulares (100 µL/pocillo) y se incubaron a 4 °C toda la noche. El grado de unión se determinó incubando con un antisuero primario frente a TLPs obtenido en conejo diluido 1/1.500 en PBS-T con BSA al 1%, a 37 °C durante 2 h. A continuación se incubó con un antisuero secundario frente a IgG de conejo obtenido en cabra y conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1/1.500 en PBS-T con BSA al 1%, a 37 °C durante 1 h. Tras lavar tres veces con PBS-T se añadió la solución de revelado con el sustrato de la fosfatasa alcalina p-nitrofenil fosfato, en tampón de dietanolamina al 1% (v/v), pH 9,8, con MgCl<sub>2</sub> 1 mM, y se incubó durante 7 min a 37 °C. La absorbancia se determinó a 405 nm con un NanoDrop.

Para el cálculo de la actividad inhibitoria se realizó una curva patrón con diferentes diluciones de TLPs en MEM (6-100 ng/pocillo), que se incluyeron en el ensayo de ELISA. Las absorbancias a 405 nm se representaron frente a la correspondiente concentración y se determinó la correlación. Los porcentajes de inhibición de la unión rotavirus-célula exhibidos



por las distintas muestras lácteas se obtuvieron interpolando las absorbancias en la curva patrón de TLPs, y en relación al control positivo.

### 3.2.11.2. Ensayo de inhibición post-uni3n rotavirus-c3lula

Este ensayo se realiz3 para comprobar si las muestras lácteas eran capaces de inhibir la infecci3n por rotavirus despu3 de que estos se hubieran unido a la c3lula. Para ello, se infectaron las c3lulas MA104, cultivadas en placa de 96 pocillos y en confluencia, con 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la suspensi3n de rotavirus (cepa bovina WC3) a una MOI de 0,02, y se incubaron 1 h a 4  $^{\circ}\text{C}$ , para evitar que el virus penetrara en la c3lula. Posteriormente, tras lavar las c3lulas con 120  $\mu\text{L}$ /pocillo de MEM, se a3adieron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de las muestras lácteas y se incubaron 1 h a 37  $^{\circ}\text{C}$ . A continuaci3n, se lav3 la placa con 120  $\mu\text{L}$ /pocillo de MEM, se a3adieron 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de MEM y se incubaron las placas a 37  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 h, procediendo posteriormente a la determinaci3n de la neutralizaci3n mediante inmunodetecci3n con carbazol.

### 3.2.11.3. Ensayo de neutralizaci3n de cepas reagrupadas

Se estudi3 la interacci3n de las fracciones y prote3nas lácteas neutralizantes con las prote3nas VP4 y VP7 de la c3pside del rotavirus, debido al papel protagonista de estas prote3nas en las primeras etapas de la infecci3n celular. Para ello, se llevaron a cabo los ensayos de neutralizaci3n, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.10.3, usando virus reagrupados, que se obtienen mediante transfecci3n celular y caracterizaci3n electrofor3tica de su genoma, tal y como describen D3az-Salinas et al. (2013). En este trabajo se emplearon dos cepas, la 19-1-1 y la 85-2, derivadas de la transfecci3n con las cepas RRV y UK (**Tabla 33**).

**Tabla 33.** Prote3nas de la c3pside de las cepas reagrupadas UK x RRV empleadas.

Virus	Origen de las prote3nas de la c3pside viral <sup>a</sup>					
	VP1	VP2	VP3	VP6	VP7	VP4
<b>UK</b>	U	U	U	U	U	U
<b>RRV</b>	R	R	R	R	R	R
<b>UK x RRV reagrupadas</b>						
19-1-1 <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	U
85-2 <sup>b</sup>	U	R	R	R	U	R

<sup>a</sup> U, el origen de la prote3na es UK; R, el origen de la prote3na es RRV.

<sup>b</sup> Los nombres de las cepas reagrupadas provienen de D3az-Salinas et al. (2013).

Tal y como se muestra en la **Tabla 33**, la cepa 19-1-1 posee todas las proteínas de la cápside de RRV, excepto la VP4, que es de UK. En el caso de la cepa 85-2, tiene las proteínas de RRV, excepto la VP7 y VP1, que son de UK.

#### **3.2.11.4. Ensayo de bloqueo celular**

Se estudió la interacción de las fracciones y proteínas lácteas neutralizantes con los receptores celulares de las MA104, para evaluar su influencia en la actividad antirrotavirus exhibida por dichas muestras. Para ello, se incubaron las células MA104, cultivadas en placa de 96 y en confluencia, con las muestras lácteas, durante 1 h a 4 °C, para evitar que las muestras penetraran en las células por endocitosis. Tras la incubación a 4 °C, se lavaron los pocillos tres veces con 120 µL/pocillo de MEM y se infectaron con la suspensión vírica de la cepa bovina WC3 a una MOI de 0,02, incubando durante 1 h a 37 °C. Tras lavar los pocillos con MEM, se añadieron 100 µL/pocillo de MEM y la placa se incubó a 37 °C durante 16 h procediendo, posteriormente, a la determinación de la neutralización mediante inmunodetección con carbazol.

#### **3.2.12. Tratamiento térmico de fracciones y proteínas lácteas**

Diversas fracciones y proteínas lácteas se sometieron a diferentes tratamientos térmicos con el fin de evaluar la influencia de los mismos en la actividad antirrotavirus de las muestras (ver **Tabla 34**).

Las fracciones lácteas (30 mL) se trataron en matraces erlenmeyer de 250 mL, mientras que las soluciones de proteínas (1 mL) se trataron en viales estériles de vidrio de 7 mm de diámetro externo, 6 mm de diámetro interno y 45 mm de longitud. Los recipientes con las muestras se calentaron en un baño termostático Unitronic 200 de J.P.Selecta (Barcelona, España) y la temperatura se controló mediante termómetro digital ( $\pm 0,1$  °C) de Ludwig Schneider (Wertheim, Alemania). Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- 45 °C durante 60 min
- 55 °C durante 60 min
- 63 °C durante 30 min (pasteurización baja o pasteurización LTLT, ‘low-temperature long-time’) y 60 min
- 72 °C durante 20 s, 1 min, 10 min y 60 min
- 75 °C durante 20 s (pasteurización alta o pasteurización HTST, ‘high-temperature short-time’) y 10 min
- 80 °C durante 20 s y 10 min
- 85 °C durante 20 s y 10 min

- 90 °C durante 20 s y 10 min
- 95 °C durante 20 s y 10 min

Tras el tratamiento térmico, las muestras se enfriaron rápidamente por inmersión en un baño de agua con hielo y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

El efecto de los tratamientos térmicos en la actividad antirrotavirus de las muestras lácteas se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se evaluaron como mínimo por triplicado en dos ensayos de neutralización independientes (n=6). Las muestras tratadas se analizaron mediante SDS-PAGE, en condiciones no reductoras, y Western-blotting, para comprobar cómo se modificaba el perfil proteico tras el tratamiento térmico.

**Tabla 34.** Muestras lácteas sometidas a tratamiento térmico cuya capacidad de neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta.

<b>Muestras lácteas bovinas</b>		<b>Concentración (mg proteína/mL)</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	8
	Mazada procedente de nata lavada y sin lavar	5
<b>Proteínas</b>	IgGs	0,1
	LFs nativa y saturada	1
	XOD*	0,5
	LDH*	0,1
<b>Muestras lácteas ovinas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	16
	Mazada procedente de nata lavada y sin lavar	2,5
<b>Proteínas</b>	IgGs*	0,5
	LF nativa*	1
<b>Muestras lácteas humanas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	2
<b>Proteínas</b>	IgAs*	0,1
	LF nativa*	2
<b>Otras muestras lácteas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Proteínas</b>	LFs nativas de cerda y camella*	1

\*Sometidas exclusivamente a los tratamientos de pasteurización (LTLT y HTST), 75 °C/10 min y 85 °C/20 s y 10 min. Las demás muestras se sometieron a todos los tratamientos térmicos descritos.

### **3.2.13. Tratamiento de fracciones y proteínas lácteas por altas presiones hidrostáticas**

Diversas fracciones y proteínas lácteas se sometieron a diferentes tratamientos de altas presiones hidrostáticas (HHP) con el fin de evaluar la influencia de los mismos en la actividad antirrotavirus de las muestras (ver **Tabla 35**).

El método empleado se basó en el descrito por Mayayo et al. (2016). Para ello, las muestras (1 mL) se introdujeron en bolsas de polietileno de 2 mL, y tras eliminar el espacio de cabeza, se termosellaron con la termoselladora de Comecta (Barcelona, España). El tratamiento por HHP se aplicó en un equipo Stansted Fluid Power FPG 11500 B (Stansted, Essex, Reino Unido) en el Centro Nacional de Tecnología de los Alimentos de San Adrián (Navarra, España), con propilenglicol/agua (70/30, v/v) como fluido de transmisión. La temperatura inicial del fluido de transmisión y de las muestras se ajustó a 20 °C, y el incremento de la temperatura fue de aproximadamente 3 °C cada 100 MPa.

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- 400 MPa durante 5, 10 y 15 min
- 500 MPa durante 5, 10 y 15 min
- 600 MPa durante 5, 10 y 15 min

El volumen de la cámara fue de 30 mL y la presión se incrementó a 240 MPa/min, por lo que las presiones de trabajo 400, 500 y 600 MPa se alcanzaron en 1,6, 2,1 y 2,5 min, respectivamente. Tras el tratamiento de HHP, las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su uso en los ensayos de actividad neutralizante y SDS-PAGE.

El efecto de los tratamientos de HHP en la actividad antirrotavirus de las muestras lácteas se estudió mediante inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se evaluaron como mínimo por triplicado en dos ensayos de neutralización independientes (n=6). Además, las muestras sometidas a los diferentes tratamientos de HHP se analizaron mediante SDS-PAGE, en condiciones no reductoras, para observar cómo se modificaba el perfil proteico.

**Tabla 35.** Muestras lácteas sometidas a tratamiento de HHP cuya capacidad de neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta.

<b>Muestras lácteas bovinas</b>		<b>Concentración (mg proteína/mL)</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	2
	Mazada procedente de nata lavada y sin lavar	5
<b>Proteínas</b>	IgGs	0,1
	LFs nativa y saturada	1
	XOD*	0,5
	LDH*	0,1
<b>Muestras lácteas ovinas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	4
	Mazada procedente de nata lavada y sin lavar	2,5
<b>Proteínas</b>	IgGs*	0,5
	LF nativa*	1
<b>Muestras lácteas humanas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Fracciones</b>	Lactosuero	2
<b>Proteínas</b>	IgAs*	0,1
	LF nativa*	2
<b>Otras muestras lácteas</b>		<b>Concentración</b>
<b>Proteínas</b>	LFs nativas de cerda y camella*	1

\*Sometidas exclusivamente a los tratamientos de 400 MPa/15 min, 500 MPa/15 min y 600 MPa/15 min. Las demás muestras se sometieron a todos los tratamientos de HHP descritos.

### 3.2.14. Degradación enzimática de fracciones y proteínas lácteas

El tratamiento enzimático de diversas fracciones y proteínas lácteas se llevó a cabo simulando las condiciones que se producen *in vivo* en el tracto gastrointestinal, con el fin de evaluar su influencia en la actividad antirrotavirus de las muestras. Se emplearon diferentes protocolos y preparados enzimáticos, atendiendo a diversos estudios previos.

- Hidrólisis de fracciones lácteas

El lactosuero, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM procedentes de leche cruda bovina y ovina, así como el WPC bovino comercial, se sometieron a degradación enzimática *in vitro* simulando una digestión gastrointestinal, siguiendo las condiciones de estudios de diferentes autores (Gallier et al., 2012; Jiménez-Saiz et al., 2011; Le et al., 2012).

Para ello, las muestras se disolvieron en ácido fórmico al 5% (v/v) hasta una concentración final de 1 mg proteína/mL (pH = 2). Se procedió entonces a la digestión gástrica añadiendo pepsina en una proporción 0,4:100 (enzima:proteína, p/p) y se incubó a 37 °C durante 2 h en agitación. A continuación, para inactivar la pepsina se ajustó el pH de las muestras a 7 con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM, se añadieron dos enzimas pancreáticas encargadas de la digestión intestinal: tripsina (1:100, p/p) y quimotripsina (1:100, p/p), y la mezcla se incubó a 37 °C durante 3,5 h.

De manera complementaria al procedimiento descrito, se realizó otro ensayo incluyendo una mezcla más completa de enzimas intestinales. Así, tras la digestión gástrica se incubaron las muestras lácteas durante 3,5 h a 37 °C con: tripsina (1:100, p/p), quimotripsina (1:100, p/p), carboxipeptidasa A (1:100, p/p), elastasa (1:250, p/p), solución de sales biliares 250 mM (equimolar de glicodeoxicolato de sodio y taurocolato de sodio),  $\text{CaCl}_2$  7,6 mM, lipasa (1:3895, p/p) y colipasa (1:895, p/p) preparadas en agua Milli-Q.

En ambos casos, las enzimas digestivas se inactivaron por tratamiento a 80 °C durante 10 min y posterior incubación con el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo, a una concentración final de 0,5 mM, durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras degradadas enzimáticamente se centrifugaron a 1.000 g durante 1 min para eliminar los péptidos insolubles y los sobrenadantes resultantes se liofilizaron y se conservaron a -20 °C.

- Hidrólisis de LF bovina

La LF bovina se hidrolizó con tres preparados enzimáticos diferentes: pepsina, coagulante microbiano y quimosina recombinante, siguiendo el procedimiento descrito por Ripollés et al. (2015). Para ello, se preparó una solución de LF a 50 mg/mL en agua Milli-Q y se ajustó a pH 3 con HCl 0,1 N. Posteriormente, se añadieron los correspondientes preparados enzimáticos de forma independiente a una concentración final del 3% (p/p) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 4 h. Para detener la reacción enzimática, la muestra se calentó a 80 °C durante 15 min y se ajustó el pH a 7 con NaOH 0,1 N. Tras centrifugación a 16.000 g durante 15 min, los sobrenadantes se liofilizaron y conservaron a -20 °C hasta su uso.

- Hidrólisis de la fracción PPT y de la PP3 bovinas y ovinas

El proceso de hidrólisis enzimática de las fracciones PPT y de las PP3 bovinas y ovinas se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Pedersen et al. (2012). Así, las muestras se reconstituyeron a 20 mg/mL en tampón  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  0,1 M, pH 8,0. A continuación, se añadió tripsina de páncreas porcino, disuelta en el mismo tampón, en una relación enzima:sustrato de 1:100 (p/p) y la mezcla se incubó durante 3 h a 37 °C en agitación. Tras la incubación, la mezcla se calentó en un baño termostático a 90 °C durante 10 min para inactivar la tripsina. El hidrolizado se centrifugó a 16.000 g durante 5 min, y el sobrenadante obtenido se liofilizó y congeló a -20 °C hasta su utilización.

- Hidrólisis de derivados lácteos comerciales

Los derivados lácteos comerciales: leche desnatada, mazada y butter serum, se sometieron a hidrólisis con tres preparados enzimáticos comerciales: Alcalasa 2.4L, Corolasa PP y Prolyve 1000, en base al procedimiento descrito por Ripollés et al. (2016). Las muestras lácteas se prepararon al 20% (p/v) en agua destilada y el pH se ajustó a 7 con NaOH 1 M. Los preparados enzimáticos comerciales Alcalasa y Prolyve se añadieron a una concentración del 0,5% (v/v) y la Corolasa PP en una relación enzima:sustrato de 1:100 (p/p). La hidrólisis se mantuvo durante 4 h a 50 °C a un pH constante de 7. Finalmente, los hidrolizados se calentaron a 90 °C durante 20 min para detener la reacción enzimática y se centrifugaron a 10.000 g durante 15 min. Los sobrenadantes resultantes se liofilizaron y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

El efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las muestras lácteas se determinó mediante inmunofluorescencia indirecta. Las muestras se analizaron como mínimo por triplicado y en cada ensayo se incluyó un control con la muestra sin hidrolizar. Las muestras lácteas sometidas a hidrólisis enzimática y posteriormente analizadas en el ensayo de neutralización se incluyen en la **Tabla 36**. Como puede observarse, se evaluó también la actividad antirrotavirus de diversos productos lácteos comerciales hidrolizados: leches infantiles de fórmula y WPH. El perfil electroforético de las muestras degradadas enzimáticamente se analizó mediante SDS-PAGE.

**Tabla 36.** Muestras lácteas sometidas a hidrólisis enzimática cuya capacidad de neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta.

<b>Hidrólisis de fracciones lácteas bovinas, ovinas y humanas</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Preparado enzimático empleado</b>	<b>Concentración (mg hidrolizado/mL)</b>
Lactosuero	Degradación simple: Pepsina + tripsina + quimotripsina	5
Mazada y butter serum de nata sin lavar		
Fracción enriquecida en MFGM		
WPC bovino		
<b>Hidrólisis de la LF bovina</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Preparado enzimático empleado</b>	<b>Concentración</b>
LF bovina	Pepsina Coagulante microbiano Quimosina recombinante	5 / 20

<b>Hidrólisis de la fracción PPT y de la PP3 bovinas y ovinas</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Preparado enzimático empleado</b>	<b>Concentración</b>
PPT	Tripsina	2,5-20
PP3*		1,25-15
<b>Hidrólisis de derivados lácteos comerciales</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Preparado enzimático empleado</b>	<b>Concentración</b>
Leche desnatada	Alcalasa Prolyve Corolasa PP	25-150
Mazada		
Butter serum		
<b>Productos comerciales hidrolizados</b>		
<b>Muestras</b>	<b>Preparado enzimático empleado</b>	<b>Concentración</b>
WPH*	Información no suministrada por el fabricante	0,15-15
Leches infantiles		15-150

\*Su actividad antirrotavirus también se evaluó frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3, UK, NCDV y B223, la cepa humana Wa y la cepa de simio RRV, mediante ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol.

### 3.2.15. Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 5 de GraphPad Software (La Jolla, CA, EE.UU.).

Para ello, en primer lugar se comprobó la normalidad de los datos con el test de normalidad Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, para verificar si existían diferencias entre las medias de los resultados y el grado de significación de las mismas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) seguido de un test de comparación múltiple de Tukey. Se establecieron tres grados de significación estadística:  $p < 0,001$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,1$ . Se han utilizado asteriscos (\*) y cruces (†) para expresar las diferencias significativas en las gráficas de los resultados y discusión.



## 4. Resultados y discusión

---



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Resultados publicados**

La mayor parte de los resultados derivados de la presente Tesis Doctoral se han plasmado en los siguientes artículos publicados en revistas internacionales:

**Artículo 1:** Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey.

**Artículo 2:** Antirotaviral activity of bovine and ovine dairy byproducts.

**Artículo 3:** Antirotaviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments.

**Artículo 4:** Antirotaviral activity of bovine milk components: extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism.

**Artículo 5:** Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions.

**Artículo 6:** Effect of high pressure treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine dairy by-products and bioactive milk proteins.

A continuación se reproducen íntegramente dichos artículos.



4.1.1. **Artículo 1.** Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey

---





Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/idairyj](http://www.elsevier.com/locate/idairyj)

## Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey



José Antonio Parrón <sup>a</sup>, Daniel Ripollés <sup>a</sup>, María Dolores Pérez <sup>a</sup>, Miguel Calvo <sup>a</sup>,  
Jan Trige Rasmussen <sup>b</sup>, Lourdes Sánchez <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza-CITA, Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Protein Chemistry Laboratory, Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 31 October 2015

Received in revised form

1 February 2016

Accepted 6 February 2016

Available online 21 February 2016

### ABSTRACT

Rotavirus is the major cause of infectious diarrhoea in infants and children throughout the world. Several studies have indicated that some milk fractions may protect against rotavirus infection. The present study evaluates the effect of some heat treatments on the antirotaviral activity of bovine and ovine whey by an immunofluorescence assay validated in this work. Neutralising activity of diverse proteins present in whey has also been verified individually. Bovine and ovine whey, at 1 mg mL<sup>-1</sup> protein, inhibit MA104 cells infection with bovine rotavirus strain WC3, with values of 89.2 and 76.6% inhibition, respectively. Furthermore, the inhibitory activity was influenced by temperature and duration of heat treatment. The ability of bovine and ovine whey to inhibit rotavirus infection was not affected by treatment at 75 °C for 20 s; after 85 °C for 10 min bovine and ovine whey still maintained 16.1 and 32.5%, respectively, of neutralisation activity.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Rotaviruses are one of the most common causes of severe diarrhoeal diseases in young children throughout the world. According to WHO estimations, 453,000 children below 5 years old die each year from rotavirus infections, with more than 85% of deaths occurring in developing countries (WHO, 2013).

The entry of rotaviruses into intestinal epithelial cells appears to be a multistep process, with at least three contacts between the virus and cell receptors and different requirements depending on the rotavirus strains (Arias et al., 2002). The virus replicates in the enterocytes of the small intestine, causing extensive damage to the microvilli resulting in malabsorption and loss of fluids and electrolytes (Bishop, 2009). Currently, two oral live attenuated rotavirus vaccines, Rotarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium) and RotaTeq<sup>®</sup> (Merck & Co. Inc., West Point, PA, USA), are available internationally and considered safe and effective in preventing rotavirus infection (Dennehy, 2008; WHO, 2013). Despite this, the difficulty associated with the implementation of rotavirus

immunisation programs in the developing world, related with affordability and availability of vaccines, underscores the necessity for alternative strategies to protect humans against this type of viral infections. Hence the significance of researching on neutralising agents of rotavirus infection and understanding the mechanisms by which rotaviruses interact with host cell and neutralising agents.

Different studies have suggested the use of antibodies for passive protection as an alternative therapeutic approach. Some of the antibody-based strategies have used immunoglobulin G preparations from colostrum of rotavirus hyperimmunised cows (Mainer, Domínguez, Randrup, Sánchez, & Calvo, 1999; Sarker et al., 1998), bovine colostrum (Inagaki et al., 2010b) and immunoglobulin A from human milk (Tino et al., 2013). Naturally, large scale production of bovine colostrum and human milk presents practical limitations. Therefore, there is a need for alternative milk-based sources of antirotaviral agents. Studies performed in vitro and in vivo demonstrate that a wide range of milk-derived fractions and combinations of them convey antirotaviral activity.

Effective inhibition of infection/replication of different rotavirus strains in cultured epithelial cells has been shown by testing bovine whey protein concentrates (WPC; Pérez-Cano et al., 2008; Wolber, Broomfield, Fray, Cross, & Dey, 2005), macromolecular bovine whey protein fraction (MMWP) obtained by microfiltration (0.1–0.2 μm)

\* Corresponding author. Tel.: +34 976761585.

E-mail address: [lousanchez@unizar.es](mailto:lousanchez@unizar.es) (L. Sánchez).

(Bojsen et al., 2007; Kvistgaard et al., 2004), and bovine buttermilk and whey cream (Fuller, Kuhlenschmidt, Kuhlenschmidt, Jiménez-Flores, & Donovan, 2013). Likewise, similar effects were observed with human milk samples (Newburg et al., 1998; Yolken et al., 1992).

The antiviral activity of different milk secretions most likely associates to a number of defensive bioactive proteins, such as immunoglobulins (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010b; Korhonen, Marnila, & Gill, 2000; Mainer et al., 1999) and lactoferrin (Egashira, Takayanagi, Moriuchi, & Moriuchi, 2007; Superti et al., 2001; Wakabayashi, Oda, Yamauchi, & Abe, 2014), together with proteins found associated with the milk fat globule membrane, such as MUC1 (Bojsen et al., 2007; Kvistgaard et al., 2004; Yolken et al., 1992), lactadherin (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010a; Kvistgaard et al., 2004; Newburg et al., 1998; Peterson, Patton, & Hamosh, 1998; Yolken et al., 1992), and PP3 (Inagaki et al., 2010a).

Dairy products are usually subjected to technological processes that include heat treatment. These treatments are applied for both shelf-life and technological reasons and they are nowadays an essential operation in commercial dairy processing to provide acceptable safety during the shelf-life of dairy products. As a consequence of heat treatment, proteins may undergo structural and composition changes, such as unfolding, denaturation or aggregation (Chevalier, Hirtz, Sommerer, & Kelly, 2009; Morin, Jiménez-Flores, & Pouliot, 2007). The thermostability of several whey proteins has been studied by different authors (Conesa et al., 2009; Lee & Sherbon, 2002; Mainer, Sánchez, Ena, & Calvo, 1997). However, it is very important to know the actual effect of heat treatment on the biological activity of whey components to be able to maintain this activity in functional products.

The main objective of the present work was to evaluate the effect of several heat treatments on the biological activity of bovine and ovine whey by measuring their capacity to inhibit the infection of MA104 cells by the bovine rotavirus WC3 strain. Furthermore, the rotavirus neutralising activity of different bovine whey proteins, such as immunoglobulins, lactoferrin, MUC1 and lactadherin, was proved.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and rotavirus propagation

The Rhesus monkey kidney cell line MA104 (ATCC CRI-2378), widely used for the growth and characterisation of both animal and human culture-adapted rotaviruses, was used to propagate WC3 bovine strain rotavirus (ATCC VR-2102), through an adapted assay based on previously described methods (Arias, Romero, Álvarez, & López, 1996; Arnold, Patton, & McDonald, 2009). All cell culture media and supplements were purchased from Gibco (Life Technologies Corporation, Paisley, UK). MA104 cells were cultured at a density of  $5 \times 10^5$  cells mL<sup>-1</sup> in Minimal Essential Medium (MEM), supplemented with 10% heat inactivated foetal bovine serum, 1% antibiotics (100 Units mL<sup>-1</sup> penicillin, 100 µg mL<sup>-1</sup> streptomycin), 2 mM L-glutamine, and 0.25 µg mL<sup>-1</sup> amphotericin B. Cells were grown in 25 and 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (TPP Techno Plastic, Trasadingen, Switzerland) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

For rotavirus propagation, serum free Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM), supplemented with 1% antibiotics, 2 mM L-glutamine, and 0.25 µg mL<sup>-1</sup> amphotericin B was used as diluent in all steps. Confluent cell monolayers were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) consisting of 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4, and inoculated with an aliquot of a virus suspension. Before inoculation, the virus was preactivated with trypsin from porcine pancreas type IX-S (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 20 µg mL<sup>-1</sup> for 1 h in a water bath at 37 °C, and then diluted by adding serum-free EMEM to reach a 2 µg mL<sup>-1</sup> final trypsin concentration. The virus adsorption was

achieved by incubating the flask for 1 h at 37 °C on a platform rocker to ensure equal coverage of the monolayer with the inoculum. Following adsorption, pre-warmed serum-free EMEM with 0.5 µg mL<sup>-1</sup> trypsin was added, and flasks were incubated at 37 °C until complete cytopathic effect was attained (1–3 d). When the cell monolayer was fully disrupted due to lysis, virus was harvested using three cycles of freezing at –80 °C and thawing at 37 °C. The cell lysate was transferred into a 50 mL conical tube and large cellular debris from it was removed by low-speed centrifugation (300 × g, 15 min, 4 °C). The clarified rotavirus stock was titrated, aliquoted and stored at –80 °C. Viral titre was determined by indirect immunofluorescent staining of infected cells and expressed as focus forming units (FFU) and tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>), as described previously (Arnold et al., 2009; Hamilton, Russo, & Thurston, 1977).

### 2.2. Rotavirus infectivity assay

The in vitro infection assays were performed essentially as previously described (Arnold et al., 2009; Mainer et al., 1999). MA104 cells were seeded into 96-well plates at a density of  $3.2 \times 10^4$  cells mL<sup>-1</sup>, and incubated (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) until 90–95% confluence. The plates were then washed twice, using 200 µL of pre-warmed serum free EMEM per well, and incubated for 24 h with this medium. A volume of 200 µL of rotavirus stock [7.76E+05 FFU mL<sup>-1</sup> ~ 6987.7 TCID<sub>50</sub> (25 µL)] was activated by adding 4 µL of trypsin (1 mg mL<sup>-1</sup>) to reach a final trypsin concentration of 20 µg mL<sup>-1</sup>, and incubating for 1 h in a 37 °C water bath.

Appropriate dilutions of neutralising milk fractions (25 µL), filter sterilised (0.22 µm), and activated rotavirus suspension (25 µL) were prepared in serum-free EMEM, and then mixed (1:1) and incubated for 1 h at 37 °C, for neutralisation. Serum-free EMEM and rotavirus suspensions were included as negative and positive controls, respectively. The mixture of neutralising samples and rotavirus, as well as negative and positive controls (50 µL per well), were transferred into the 96-well plates with cell culture (final rotavirus titre of 3.88E+03 FFU per well) and incubated at 37 °C for 1 h for rotavirus adsorption to cell surface, after adding 100 µL per well of serum-free EMEM with 1 g mL<sup>-1</sup> of trypsin.

For cell infection, plates were added with 100 µL per well of EMEM containing 2 µg mL<sup>-1</sup> of trypsin, 2% heat inactivated foetal serum, before incubating at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 16 h with gentle rotation. After that, a procedure to detect virus-infected cells was applied as follows. The medium was removed from wells and cells were washed once with PBS and fixed by adding 200 µL per well of a mixture consisting of acetone:methanol:formalin (1:1:1, by vol) at 4 °C for 1 min. The fixed cells were washed twice with PBS and incubated with bovine rotavirus-specific lamb antiserum (1:300), kindly donated by Dr. David Snodgrass from the Moredun Research Institute (Edinburgh, UK), in PBS supplemented with 2% gelatin (Sigma), at 37 °C for 2 h with gentle rotation. Then, the wells were washed twice with PBS and incubated with donkey anti-sheep immunoglobulin antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate (1:300) (Sigma) diluted in PBS containing 2% gelatin, at 37 °C for 1 h with gentle rotation. The titre of the virus suspension, and the infectivity and neutralisation percentages were determined by enumerating fluorescent foci (infected cells) in each well using an inverted fluorescence microscope (Eclipse E400) with a FITC-compatible filter, by image analysis with Zen lite 2012 software.

### 2.3. Validation of rotavirus infectivity assay

The rotavirus infectivity assay was validated according to international guidelines: AOAC (2002), Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014), IUPAC (Thompson, Ellison, & Wood, 2002; EC, 2002). In this validation, the following parameters were analysed:



selectivity (specificity), working range, precision within-day (repeatability), precision between-day (reproducibility), and ruggedness. The validation was developed by infecting the cell monolayers with the stock rotavirus suspension used in this study ( $3.88E+03$  FFU per well) and with a pooled colostrum from rotavirus vaccinated cows (dilution 1/5000) as neutralising agent. Results obtained in validation assays are included in the [Supplementary Material](#).

#### 2.4. Whey fractions

Raw bovine and ovine milk (25 L each) were provided by the dairy industry Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza, Spain), and temperature ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and pH (6.6–6.8) controlled until skimming using a cream separator. Skimmed milk was preheated and fractionated into casein and whey by coagulation at  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 45 min with recombinant chymosin provided by Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark). The whey fraction was recovered by decanting and filtering through glass wool, and was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until heat treatment.

#### 2.5. Purified proteins

Bovine MUC1 was purified according to [Pallesen et al. \(2001\)](#). Bovine lactadherin (PAS 6/7) was obtained as described previously by [Kim, Kanno, and Mizokami \(1992\)](#). Bovine lactoferrin was kindly provided by Tatua Nutritionals Company (Morrinsville, New Zealand) with an iron-saturation below 10%. Bovine immunoglobulins G (IgG) were isolated from whey by precipitation with ammonium sulphate followed by DEAE-Sepharose chromatography ([Mainer et al., 1997](#)).

#### 2.6. Heat treatment

Aliquots (30 mL) of bovine and ovine whey were placed in glass Erlenmeyer flasks (250 mL) and preheated in a thermostatic bath to reach a temperature about  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  below the temperature of treatment that was applied in another thermostatic bath ( $\pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Heat treatment was monitored by controlling temperatures inside the samples with a digital thermometer. The treatments applied were:  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 60 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 60 min,  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 s or 10 min,  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 s or 10 min, and  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 s or 10 min. After heating, the samples were cooled rapidly in iced water and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until freeze-drying. Afterwards, heat treated samples were diluted as required for the different assays.

#### 2.7. Sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blotting

The protein profiles of whey and protein isolates were analysed by sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using gels of 4–20% polyacrylamide (Mini-Protein TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), that were stained with Periodic Acid Schiff (PAS) reagent (Pierce Glycoprotein Staining Kit, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and/or Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva blue R, Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Germany), according to standard procedures.

Western-blotting procedure was performed essentially as previously described by [Benfeldt, Larsen, Rasmussen, Andreassen, and Petersen \(1995\)](#). In brief, proteins were electroblotted from gels onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), and then the membranes blocked for 3 min in 50 mM Tris, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 2% Tween 20. Washing solution was 50 mM Tris, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.1% Tween 20 (TBST). Specific primary rabbit antibodies ( $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  in TBST) were previously raised against individually isolated bovine milk proteins with high purity.

Quantification of protein concentration was done by BCA Protein Assay (Pierce Kit, Thermo Scientific).

#### 2.8. Statistical analysis

Data were analysed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software, by using a Kolmogorov–Smirnov normality test and a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's Multiple Comparison Test. Significance was defined as  $p < 0.05$ .

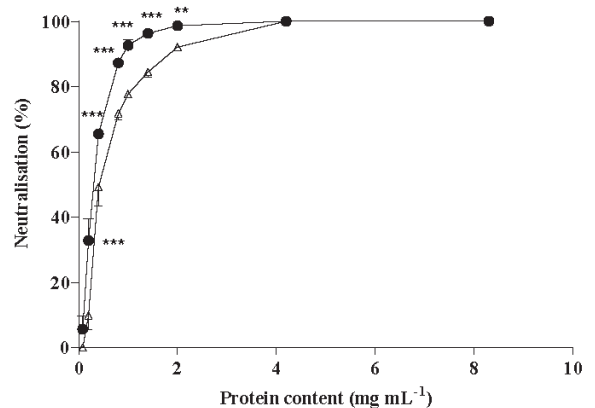
### 3. Results and discussion

#### 3.1. Neutralisation activity of whey fractions on bovine rotavirus infectivity

After validating the immunofluorescence assay and verifying that it was robust and reliable for determination of the antirotaviral activity of different milk fractions (for results see [Supplementary Material](#)), bovine and ovine whey were tested for their ability to reduce rotavirus infectivity ([Fig. 1](#)). Complete neutralisation of in vitro infection with WC3 rotavirus was achieved by incubation with increasing amounts of the two types of whey. Bovine whey showed better antirotaviral potential than ovine whey, reaching neutralisation values of 89.2% and 76.6%, respectively, at a concentration of protein of  $1\text{ mg mL}^{-1}$ . Statistically significant differences between the two types of whey were seen at a concentration as low as  $0.2\text{ mg mL}^{-1}$ .

The proteins that are naturally present in both bovine and ovine whey are, mainly,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, immunoglobulins, serum albumin, lactoferrin, lactoperoxidase, proteose-peptone ([Yadav et al., 2015](#)) and other proteins derived from the milk fat globule membrane (MFGM), like MUC1 and lactadherin ([Kvistgaard et al., 2004](#)). The different neutralising activity observed for bovine and ovine whey may be associated with interspecies variability in the presence, level and structure of bioactive proteins. The total protein content of ovine whey ( $16.6\text{--}27.8\text{ mg mL}^{-1}$ ) is higher than that of the bovine counterpart ( $9.2\text{--}13.9\text{ mg mL}^{-1}$ ) ([Cozma, Andrei, Miere, Filip, & Loghin, 2011](#)).

Unfortunately, there is a lack of quantitative studies regarding ovine whey proteins, making difficult to perform a comparison with bovine whey, mainly when focussing on bioactive components. However, [Hernández-Ledesma, Ramos, and Gómez-Ruiz](#)



**Fig. 1.** Dose-response of bovine (●) and ovine whey (Δ) on neutralising WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $**p < 0.01$ ) ( $***p < 0.001$ ) between bovine and ovine whey neutralising activity, at the same protein concentration.

(2011) observed only minor differences in the content of  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and lactoferrin in bovine and ovine whey, implying that variations in the antirotaviral activity between them may relate to other substances. Ovine milk has a higher fat content than bovine milk (almost double), and it is therefore likely that the amount of MFGM proteins is higher provided that the fat globules are of similar size. Indeed, Pisanu et al. (2011) compared bovine and ovine MFGM proteomes observing a higher presence of cytoplasmic and secreted proteins in that of sheep's milk.

Despite the higher amount of proteins in ovine whey, bovine whey presented higher neutralising activity at all concentrations lower than  $4.2 \text{ mg mL}^{-1}$  (Fig. 1). This may indicate that not only the amount, but also the structure of the bioactive proteins may be important for antirotaviral activity. In fact, Cebo and Martin (2012) characterised MFGM proteins in goat, sheep, horse and camel milk, and found prominent differences between species, mostly explained by different glycosylation, especially for lactadherin. Neutralisation activity against rotavirus reached 100% for both bovine and ovine whey at high protein levels (approximately above  $4 \text{ mg mL}^{-1}$ ), indicating that the cumulative effects of the present bioactive components outweigh the interspecies differences.

### 3.2. Neutralisation activity of isolated proteins on bovine rotavirus infectivity

To evaluate individually the inhibitory activity of several whey proteins, we proceeded to their isolation, as described in the methods section. Isolated proteins were analysed by SDS-PAGE (Fig. 2) and identified by Western-blotting using specific antibodies. The antirotaviral activity of those proteins was tested by means of the validated immunofluorescence assay (Fig. 3).

The presence of all the isolated proteins in both bovine and ovine whey can be observed in Fig. 2, although the band of lactadherin is quite faint due to its low concentration. A different electrophoretic mobility for bovine and ovine MUC1 was also observed, proving interspecies variability. The identity and presence of those proteins in whey was further proved by Western-blotting using specific antibodies.

As can be observed in Fig. 3, all isolated proteins showed neutralising activity against WC3 rotavirus on MA104 cells. IgG presented a high activity (over 90% at  $0.025 \text{ mg mL}^{-1}$ ), which is in

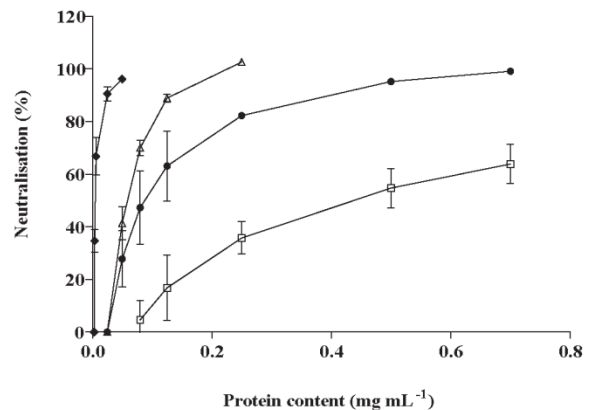


Fig. 3. Dose-response of purified proteins on neutralising WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Bovine MUC1 ( $\square$ ), bovine PAS 6/7 ( $\Delta$ ); bovine lactoferrin ( $\bullet$ ); bovine immunoglobulin G ( $\blacklozenge$ ). Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ).

accordance with several clinical studies that document that bovine IgG can provide solid protection against rotavirus infections (Inagaki et al., 2010b; Korhonen et al., 2000; Mainer et al., 1999; Sarker et al., 1998). Likewise, Bojsen et al. (2007) conducted in vitro studies showing that a commercially available bovine MMWP could inhibit rotavirus infectivity, mainly due to IgG as major components, assigning to them over 70% neutralisation at  $0.020 \text{ mg mL}^{-1}$ . Present results regarding antirotaviral activity of bovine lactoferrin (Fig. 3) prove that a  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$  concentration of this protein has a WC3 neutralising activity close to 82%. These values are very similar to those obtained by Superti et al. (2001), who reported that  $0.2 \text{ mg mL}^{-1}$  of different forms of bovine lactoferrin (apo- and holo-lactoferrin) could inhibit 75–85% of SA-11 rotavirus cytopathic effect in human colon adenocarcinoma cells (HT-29).

These results are, however, in conflict with those published by others (Bojsen et al., 2007; Kvistgaard et al., 2004), who conducted experiments in which pure bovine lactoferrin failed to show any inhibitory activity against different rotavirus strains (Wa, RRV, YM,

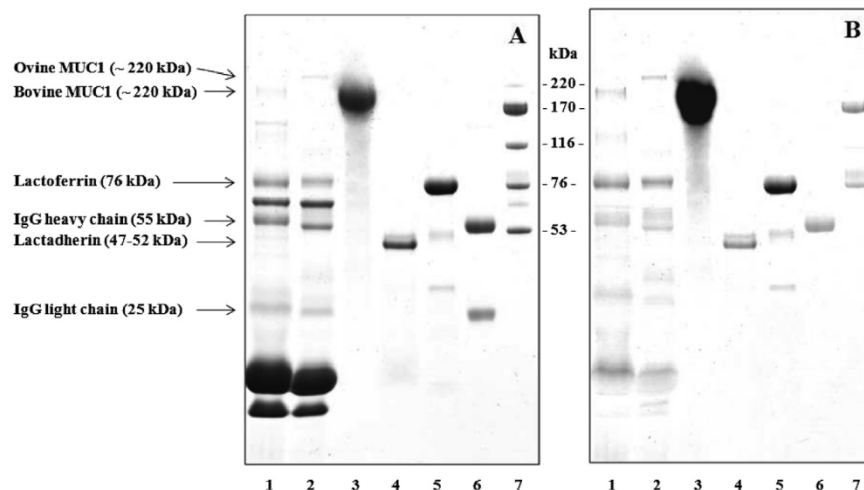
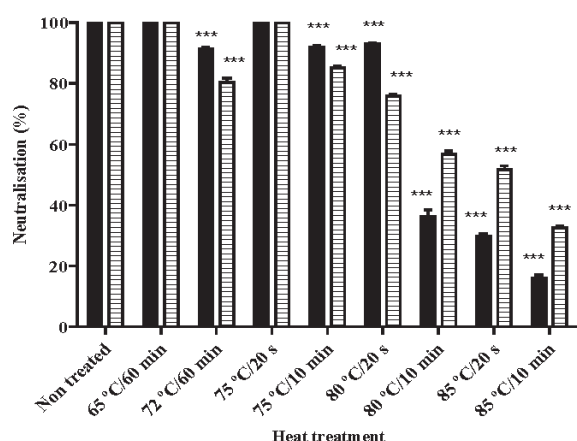


Fig. 2. Electrophoretic profile of purified proteins. (A) PAS + Coomassie staining; (B) PAS staining: lane 1, bovine whey; lane 2, ovine whey; lane 3, bovine MUC1; lane 4, bovine PAS 6/7; lane 5, bovine lactoferrin; lane 6, bovine IgG; lane 7, molecular mass marker. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gels.



**Fig. 4.** Effect of heat treatment on the neutralising activity of bovine (■) and ovine whey (▨) on WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Results are expressed in relation to control as mean ± standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $***p < 0.001$ ) in relation to controls (non-treated whey).

and RF) in MA104 and Caco-2 cells. With reference to bovine MUC1, our results (Fig. 3) showed a WC3 rotavirus neutralising activity of 35% at  $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ . In this regard, Kvistgaard et al. (2004) demonstrated how RRV rotavirus strain was effectively inhibited by bovine MUC1 in MA104 cells (near 63% inhibition at  $6.3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), whereas no effect was seen on infection by Wa rotavirus strain. As regards bovine lactadherin, the present study has proved that  $0.08 \text{ mg mL}^{-1}$  of this protein have a WC3 neutralising activity of 70%. Likewise, Inagaki et al. (2010a) demonstrated that long-term (22 h) co-incubation of MO rotavirus with bovine lactadherin resulted in measurable antiviral effect, with neutralising activity of 50% at  $5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ . In contrast, Kvistgaard et al. (2004) observed that bovine lactadherin could not inhibit Wa rotavirus strain infection of Caco-2 cells. In addition, Bojsen et al. (2007) reported that bovine lactadherin also lacked the ability to protect mice against infection with EMCN murine rotavirus strain. On the contrary, Kvistgaard et al. (2004) reported that human lactadherin inhibited infection of Caco-2 cells by Wa rotavirus strain in a dose-dependent manner.

The interspecies differences in the neutralising activity of lactadherin could be attributed to divergences in the protein structure, glycosylation pattern and microheterogeneity in the attached oligosaccharides between the proteins assayed.

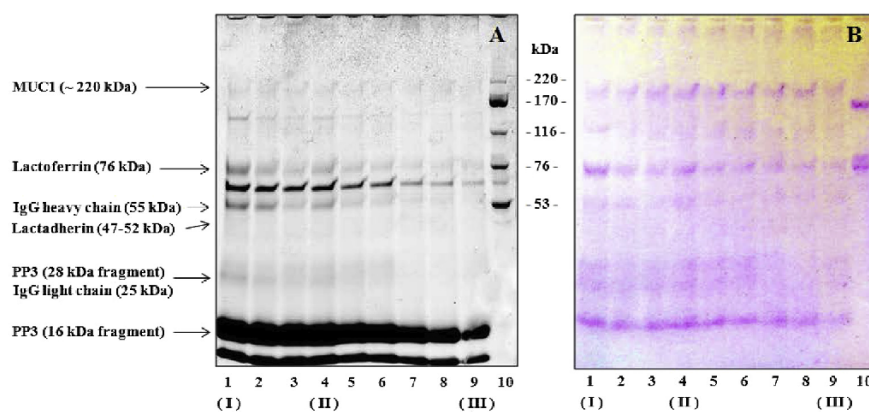
It is important to highlight that IgG, lactoferrin, MUC1 and lactadherin are glycoproteins (O'Riordan, Kane, Joshi, & Hickey, 2014). Although there is a lot of information on the glycan structures of bovine milk proteins, the role of the attached glycans in their biological functions is not completely understood. However, there is some evidence that glycosylation is involved in receptor-ligand and host-pathogen interactions. In this respect, high-mannose glycan chains have been shown to be of great importance in the defensive activity of bovine lactoferrin against pathogens (Teraguchi, Shin, Fukuwatari, & Shimamura, 1996). Binding to rotavirus and inhibition of HIV-1 transmission has also been attributed to glycosylation of human milk mucin (Saeland et al., 2009; Yolken et al., 1992). Yolken et al. (1992) also suggested that human lactadherin glycan chains, especially those which contain sialic acid, were vital for blocking the entry of rotavirus into the host cell.

Initial attachment of a virus to the host cell membrane represents a critical stage in the viral infectious cycle and is mediated by specific glycan components of cell-surface glycoproteins, glycolipids, or proteoglycans (Olofsson & Bergström, 2005). Therefore, the competition of glycosylated compounds with rotavirus for their binding to host cells could be used as an interesting strategy to diminish rotavirus infection (Kuhlenschmidt, Hanafin, Gelberg, & Kuhlenschmidt, 1999; Prasad et al., 2014).

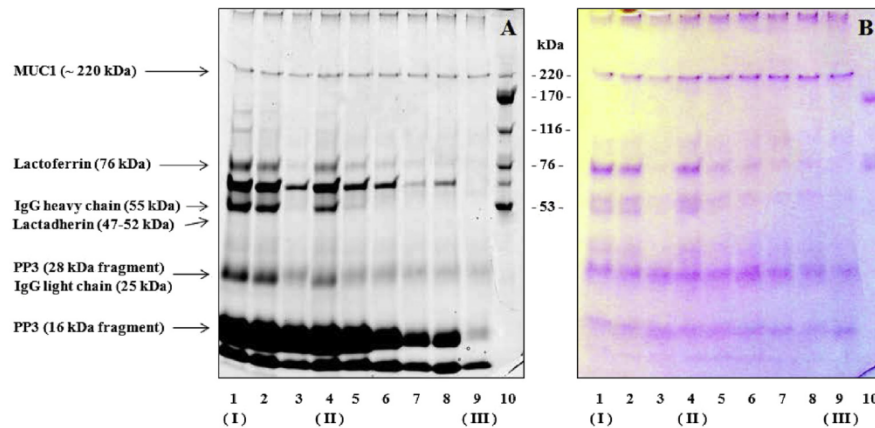
There is no evident explanation for the discrepancies between the results obtained in this study and those found by other researchers, but there are many differences between the neutralisation protocols used, e.g., protein purification, inoculation time, virus strains, cell lines, and infection detection.

### 3.3. Effect of heat treatment on the neutralising activity of whey fractions on bovine rotavirus

Heat treatments of different intensity were applied to bovine and ovine whey to assess how they affected their inhibitory activity against bovine rotavirus (Fig. 4). It was observed that heat treatments of low intensity (65 °C for 60 min and pasteurisation at 75 °C for 20 s) did not affect the neutralisation capacity regardless of whey origin. Heat treatments of intermediate intensity (72 °C for 60 min, 75 °C for 10 min and 80 °C for 20 s) significantly reduced



**Fig. 5.** Electrophoretic profile of heat treated bovine whey. (A) PAS + Coomassie staining; (B) PAS staining: lane 1 (I), non treated bovine whey; lane 2, 65 °C for 60 min; lane 3, 72 °C for 60 min; lane 4 (II), 75 °C for 20 s; lane 5, 75 °C for 10 min; lane 6, 80 °C for 20 s; lane 7, 80 °C for 10 min; lane 8, 85 °C for 20 s; lane 9 (III), 85 °C for 10 min; lane 10, molecular mass marker. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gels. Roman numerals indicate the samples analysed by Western blotting. IgG light chain (25 kDa fragment) and PP3 (16 kDa fragment) bands are probably overlapped with PP3 (28 kDa fragment) and  $\beta$ -lactoglobulin bands, respectively.



**Fig. 6.** Electrophoretic profile of heat treated ovine whey. (A) PAS + Coomassie staining; (B) PAS staining; lane 1 (I), non treated ovine whey; lane 2, 65 °C for 60 min; lane 3, 72 °C for 60 min; lane 4 (II), 75 °C for 20 s; lane 5, 75 °C for 10 min; lane 6, 80 °C for 20 s; lane 7, 80 °C for 10 min; lane 8, 85 °C for 20 s; lane 9 (III), 85 °C for 10 min; lane 10, molecular mass marker. SDS-PAGE was performed in reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gels. Roman numerals indicate the samples analysed by Western-blotting. IgG light chain (25 kDa fragment) and PP3 (16 kDa fragment) bands are probably overlapped with PP3 (28 kDa fragment) and  $\beta$ -lactoglobulin bands, respectively.

the antirotaviral activity in relation to non-treated samples. In the case of bovine whey, the neutralising effect decreased in 8.6, 8.1, and 6.8 percentage points after those treatments, respectively; whereas ovine whey lost 19.6, 14.8, and 24.2 percentage points. The application of higher heat treatments to whey samples (80 °C for 10 min, 85 °C for 20 s and 85 °C for 10 min) resulted in greater loss of antirotaviral activity. However, those treatments did not totally abolish the neutralisation activity of whey, as levels of 36.3, 29.7 and 16.1% could be still achieved in the bovine whey, whereas 56.8, 51.7 and 32.5% remained in the ovine whey, respectively.

It is remarkable that the influence of heat treatment on antirotaviral activity was different depending on the type of whey (Fig. 4). Bovine whey turned out to be more resistant to heat treatments of intermediate intensity, whereas ovine whey was more resilient to the harshest treatments. The different response to heat treatments might reflect quantitative differences between inhibitory components in the two types of whey. It might also be important to notice that prior to heating the protein concentrations of bovine and ovine whey were 8.3 and 16.1 mg mL<sup>-1</sup>, respectively, because of the preceding processing. Regardless, protein contents at those levels are far above the concentration needed to obtain complete inhibition of rotavirus infectivity that was of approximately 4 mg mL<sup>-1</sup>.

It is very likely that bioactive milk proteins vary in their susceptibility to heat induced denaturation, as isolated or in the matrix. The presence of bioactive proteins in bovine and ovine whey was monitored by SDS-PAGE as well as by Western-blotting using specific antibodies (Figs. 5–7). The presented results illustrate that the amount of IgG decreased with the intensity of heat treatment, and that they were undetectable in ovine whey after 85 °C for 10 min. However, the less detrimental treatment at 75 °C for 20 s did not cause an evident decrease in the content of IgG. This is in agreement with the results observed for the heat impact on antirotaviral activity (Fig. 4) and with previous studies describing immunoglobulin thermostability (Balan, Han, Singh, & Moughan, 2011; Chen & Chang, 1998; Domínguez, Pérez, & Calvo, 1997; Mainer et al., 1997, 1999). Emphasis could be pointed at the study by Chen and Chang (1998), who observed that exposure of isolated bovine IgG to temperatures of 95 °C for 15 s was totally damaging, while Mainer et al. (1997) proved that bovine milk immunoglobulins could resist pasteurisation treatment at 72 °C for 15 s without being affected their immunoreactivity. In addition, Bojsen et al. (2007) showed that the ability of MMWP to inhibit rotavirus

infection was heat labile, since 85 °C for 10 min resulted in increased rotavirus infectivity.

With respect to lactoferrin, the results obtained in this study (Figs. 5–7) show a decrease in the intensity of its corresponding electrophoretic band with the strength of heat treatment. The lactoferrin decrease at 75 °C for 20 s was minor but evident, while the protein was undetectable after 85 °C for 10 min. These results comply with other studies that determined lactoferrin thermoresistance by measuring immunoreactivity, e.g., Sánchez et al. (1992) who reported that pasteurisation at 72 °C for 15 s had practically no effect, while treatments at higher temperatures (81–85 °C) denatured a major fraction of lactoferrin molecules. Supportive evidence to the effect of heat on lactoferrin functionality comes from studies on the antibacterial activity of this protein (Conesa et al., 2009, 2010; Harouna et al., 2015). These studies confirmed that native bovine lactoferrin maintains its antibacterial activity after pasteurisation (63 °C for 30 min and 72 °C for 15 s), whereas its activity diminished to a great extent when subjected to higher intensity treatments (72 °C for 15 min and 85 °C for 10 min).

	Bovine whey			Ovine whey		
	I	II	III	I	II	III
<b>MUC1</b> (~ 220 kDa)						
<b>Lactoferrin</b> (76 kDa)						
<b>Lactadherin</b> (47 - 52 kDa)						
<b>Immunoglobulin G</b> (55 and 25 kDa)						
<b>PP3</b> (28 and 16 kDa)						

**Fig. 7.** Identification of bovine and ovine whey proteins by Western-blotting using specific antibodies against the different proteins: (I) non-treated whey; (II) whey treated at 75 °C for 20 s; (III) whey treated at 85 °C for 10 min. SDS-PAGE was performed in reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gels.

The results obtained in the present study show that MUC1 is highly resistant to heat denaturation (Figs. 5–7), as seen by the fact that the intensity of its corresponding electrophoretic band remained with the same intensity, even after 85 °C for 10 min. This result agrees with those obtained by Madsen, Pakkanen, and Lee (2014), which revealed that bovine submaxillary mucin was thermally stable, and even thermal treatments at 80 °C for up to 120 min did not affect its secondary structure. The authors attributed this physicochemical behaviour to the overall lack of secondary and tertiary structure of the heavily glycosylated mucins.

With respect to lactadherin, our experiments revealed that the electrophoretic band corresponding to this protein radically diminished after subjecting bovine whey to 85 °C for 10 min, and it became undetectable in ovine whey. However, less severe treatments at 75 °C for 20 s only caused a slight decrease in the lactadherin band. These results are in accordance with those obtained in studies describing the thermolability of lactadherin. Lee and Sherbon (2002) observed that heating at 80 °C resulted in the total loss of PAS 6 and partial loss of PAS 7, both proteins obtained from the MFGM, whereas Ye, Singh, Taylor, and Anema (2004) showed that PAS 7 was heat labile and PAS 6 only decreased to a lesser extent during heating treatment of whole milk. Likewise, unpublished results show that lactadherin nearly loses its phosphatidylserine-binding ability upon heating at 55 °C for 10 min (personal communication, Dr. J. T. Rasmussen).

To our knowledge, only one report relates antirotaviral activity to another relatively abundant milk protein, namely PP3. Inagaki et al. (2010a) identified PP3, more precisely a 16 kDa N-terminal fragment, as one of the components responsible for the inhibitory activity of a high molecular mass glycoprotein derived from bovine whey against replication of human rotavirus. Pedersen et al. (2012) showed by circular dichroism at different temperatures (25–100 °C) that PP3 undergoes reversible thermal denaturation and that the  $\alpha$ -helical structure of PP3 remains stable. These previous results are in good agreement with our findings (Figs. 5–7). The intensity of the band corresponding to PP3 remained the same, regardless of the heat treatment, indicating that the protein was not denatured even after incubation at 85 °C for 10 min. Interestingly, the Western-blot in Fig. 7 shows that the ovine whey has a much higher proportion of the 16 kDa PP3 fragment in comparison with that of bovine whey.

Apart from the effect of heat treatment on individual whey proteins, diverse studies have indicated that heat-induced interactions occur between milk proteins. Heating milk to above 70 °C results in a number of physicochemical changes and formation of hydrophobic interactions or disulphide-bonded aggregates of whey proteins with casein micelles, particularly through interactions with  $\kappa$ -casein (Chevalier et al., 2009; Morin et al., 2007).  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin, serum albumin, lactoferrin and  $\alpha_{s2}$ -casein via thiol/disulphide exchanges, and immunoglobulins through hydrophobic interactions, are involved in formation of protein complexes (Donato & Guyomarç'h, 2009). Ye et al. (2004) indicated that  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin associated with MFGM proteins via disulphide bonds during heat treatment of whole milk. The way in which these aggregates may affect the bioactivity of whey fractions remains to be revealed.

Despite the fact that there are few studies on the effect of heat treatment on glycans attached to proteins, the results reported by Taylor and Woonton (2009) showed that the level of glycosylation of bovine glycomacropeptide can be affected by the severity of heat treatment applied to milk.

We can suggest as a hypothesis that heat treatment may cause denaturation and/or aggregation of bioactive whey proteins (with variations in the attached carbohydrates) that would lead to the

loss of its ability to interact with viral particles, thus causing the loss of rotavirus neutralising activity. Further studies are needed to fully understand these findings.

#### 4. Conclusions

The inhibitory activity of ovine and bovine whey (77–89% neutralisation at 1 mg mL<sup>-1</sup>) against rotavirus infection on a susceptible cell line can be of great interest for its application. Several proteins are implicated in this activity, since their individual action has been assessed and proved to be of 17, 63 and 89% neutralisation (at 0.125 mg mL<sup>-1</sup>) for MUC1, lactoferrin and lactadherin, respectively; whereas 90% (at 0.025 mg mL<sup>-1</sup>) for IgG.

The effect of several heat treatments on the biological activity of bovine and ovine whey has been evaluated. Heat treatment of whey caused the loss of its antirotaviral activity; however, pasteurisation at 75 °C for 20 s maintained its neutralisation properties. The decrease in the inhibitory activity was particularly high after heat treatment at 85 °C for 10 min. The thermoresistance of several bioactive milk proteins was assessed and it was demonstrated that the amount of lactoferrin, IgG and lactadherin went down with increasing intensity of the heat treatments. In contrast, MUC1 and PP3 were resistant even to the most severe heat treatment applied in this study. The way that the bioactive proteins in the bovine and ovine whey react to heat challenges is in compliance with previous observations.

Bovine and ovine whey have become valuable by-products of cheese and casein production with several applications in the food and pharmaceutical industries, and can also be considered as sources of bioactive compounds with activity against rotaviruses. To preserve bioactivity, it is important to apply an adequate thermal treatment, or to search for alternative technologies. The current report shows that the antirotaviral activity of whey can be greatly reduced by heating, but it might be possible to find a balance between an effective heat treatment and the preservation of bioactivity.

#### Acknowledgements

José Antonio Parrón is grateful to the Spanish government for a predoctoral grant. Financial support for this study was a CICYT project (AGL2010-20835) and the European Social Fund.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary material related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.02.030>.

#### References

- AOAC. (2002). *Requirements for single laboratory validation of chemical methods*. Rockville, MD, USA: AOAC International. Draft 2002-11-07.
- Arias, C. F., Isa, P., Guerrero, C. A., Mendez, E., Zárate, S., López, T., et al. (2002). Molecular biology of rotavirus cell entry. *Archives of Medical Research*, *33*, 356–361.
- Arias, C. F., Romero, P., Álvarez, V., & López, S. (1996). Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*, *70*, 5832–5839.
- Arnold, M., Patton, J., & McDonald, S. (2009). Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. In *Current Protocols in Microbiology*. London, UK: John Wiley & Sons Inc, 15:15C3.
- Balan, P., Han, K. S., Singh, H., & Moughan, P. J. (2011). Dietary supplementation with ovine serum immunoglobulin is associated with increased gut mucin secretion in the growing rat. *Animal*, *5*, 1916–1922.
- Benfeldt, C., Larsen, L. B., Rasmussen, J. T., Andreasen, P. A., & Petersen, T. E. (1995). Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk. *International Dairy Journal*, *5*, 577–592.
- Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, *24*, 1440–1746.

- Bojsen, A., Buesa, J., Montava, R., Kvistgaard, A., Kongsbak, M., Petersen, T., et al. (2007). Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Science*, *90*, 66–74.
- Cebo, C., & Martin, P. (2012). Inter-species comparison of milk fat globule membrane proteins highlights the molecular diversity of lactadherin. *International Dairy Journal*, *24*, 70–77.
- Chen, C. C., & Chang, H. M. (1998). Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 3570–3576.
- Chevalier, F., Hirtz, C., Sommerer, N., & Kelly, A. (2009). Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 5948–5955.
- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2009). Antibacterial activity of recombinant human lactoferrin from rice: effect of heat treatment. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *73*, 1301–1307.
- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2010). Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three foodborne pathogens. *International Journal of Dairy Technology*, *63*, 209–215.
- Cozma, A., Andrei, S., Miere, D., Filip, L., & Loghin, F. (2011). Proteins profile in milk from three species of ruminants. *Notulae Scientia Biologicae*, *3*, 26–29.
- Dennehy, P. (2008). Rotavirus vaccine: an overview. *Clinical Microbiology Reviews*, *21*, 198–208.
- Domínguez, E., Pérez, M. D., & Calvo, M. (1997). Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulins in bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, *80*, 3182–3187.
- Donato, L., & Guyomarc'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/ $\kappa$ -casein complexes in heated skim milk – a review. *Dairy Science and Technology*, *89*, 3–29.
- EC. (2002). *Decision 2002/657/EC. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. Brussels, Belgium: Official Journal of the European Communities.
- Egashira, M., Takayanagi, T., Moriuchi, M., & Moriuchi, H. (2007). Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatrica*, *96*, 1238–1244.
- Fuller, K., Kuhlenschmidt, T., Kuhlenschmidt, M., Jiménez-Flores, R., & Donovan, S. (2013). Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *Journal of Dairy Science*, *96*, 3488–3497.
- Hamilton, M., Russo, R., & Thurston, R. (1977). Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, *11*, 714–719.
- Harouna, S., Carramiñana, J. J., Navarro, F., Pérez, M. D., Calvo, M., & Sánchez, L. (2015). Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging food-borne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment. *Food Control*, *47*, 520–525.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., & Gómez-Ruiz, J. A. (2011). Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. Review article. *Small Ruminant Research*, *101*, 196–204.
- Inagaki, M., Nagai, S., Yabe, T., Nagaoka, S., Minamoto, N., Takahashi, T., et al. (2010a). The bovine lactoferrin C-terminal fragment and PAS 6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *74*, 1386–1390.
- Inagaki, M., Yamamoto, M., Xijier, C., Uchida, K., Yamaguchi, H., Kawasaki, M., et al. (2010b). In vitro and in vivo evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 680–682.
- Kim, D. K., Kanno, C., & 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*, 203–211.
- Korhonen, H., Marnila, P., & Gill, H. (2000). Bovine milk antibodies for health. *British Journal of Nutrition*, *84*, 135–146.
- Kuhlenschmidt, T. B., Hanafin, W. P., Gelberg, H. B., & Kuhlenschmidt, M. S. (1999). Sialic acid dependence and independence of group A rotaviruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *473*, 309–317.
- Kvistgaard, A., Pallesen, L., Arias, C. F., López, S., Petersen, T., Heegaard, C., et al. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Science*, *87*, 4088–4096.
- Lee, S. J., & Sherbon, J. W. (2002). Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *Journal of Dairy Research*, *69*, 555–567.
- Madsen, J. B., Pakkanen, K. I., & Lee, S. (2014). Thermostability of bovine submaxillary mucin (BSM) in bulk solution and at a sliding interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, *424*, 113–119.
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem guide: The fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics* (2nd ed.). Leoben, Austria: Eurachem.
- Mainer, G., Domínguez, E., Randerup, M., Sánchez, L., & Calvo, M. (1999). Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine colostrum. *Journal of Dairy Research*, *66*, 131–137.
- Mainer, G., Sánchez, L., Ena, J. M., & Calvo, M. (1997). Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *Journal of Food Science*, *62*, 1034–1038.
- Morin, P., Jiménez-Flores, R., & Pouliot, Y. (2007). Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *International Dairy Journal*, *17*, 1179–1187.
- Newburg, D., Peterson, J., Ruiz-Palacios, G., Matson, D., Morrow, A., Shults, J., et al. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, *351*, 1160–1164.
- Olofsson, S., & Bergström, T. (2005). Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Annals of Medicine*, *37*, 154–172.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., & Hickey, R. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, *24*, 220–236.
- Pallesen, L. T., Andersen, M. H., Nielsen, R. L., Berglund, L., Petersen, T. E., Rasmussen, L. K., et al. (2001). Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *Journal of Dairy Science*, *84*, 2591–2598.
- Pedersen, L. R. L., Nielsen, S. B., Hansted, J. G., Petersen, T. E., Otzen, D. E., & Sørensen, E. S. (2012). PP3 forms stable tetrameric structures through hydrophobic interactions via the C-terminal amphipathic helix and undergoes reversible thermal dissociation and denaturation. *FEBS Journal*, *279*, 336–347.
- Pérez-Cano, F., Marín, S., Castell, M., Rodríguez, M., Rivero, M., Castellote, C., et al. (2008). Supplementing suckling rats with whey protein concentrate modulates the immune response and ameliorates rat rotavirus-induced diarrhea. *Journal of Nutrition*, *138*, 2392–2398.
- Peterson, J., Patton, S., & Hamosh, M. (1998). Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breastfed infant against infections. *Biology of the Neonate*, *74*, 143–162.
- Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Biosi, G., Tanca, A., Roggio, T., et al. (2011). The sheep milk fat globule membrane proteome. *Journal of Proteomics*, *74*, 350–358.
- Prasad, V., Shanker, S., Hu, L., Choi, J., Crawford, S., Ramani, S., et al. (2014). Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Current Opinion in Virology*, *7*, 119–127.
- Saeland, E., de Jong, M. A., Nabatov, A. A., Kalay, H., Geijtenbeek, T. B., & van Kooyk, Y. (2009). MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Molecular Immunology*, *46*, 2309–2316.
- Sánchez, L., Peiró, J. M., Castillo, H., Pérez, M. D., Ena, J. M., & Calvo, M. (1992). Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *Journal of Food Science*, *57*, 873–879.
- Sarker, S., Casswall, T., Mahalanabis, D., Alam, N., Albert, M., Brüßow, H., et al. (1998). Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *Pediatric Infectious Disease Journal*, *17*, 1149–1154.
- Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P., & Antonini, G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1528*, 107–115.
- Taylor, C., & Wootton, B. (2009). Quantity and carbohydrate content of glyco-macropptide fractions isolated from raw and heat-treated milk. *International Dairy Journal*, *19*, 709–714.
- Teraguchi, S., Shin, K., Fukuwatari, Y., & Shimamura, S. (1996). Glycans of bovine lactoferrin function as receptors for the type 1 fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *64*, 1075–1077.
- Thompson, M., Ellison, S., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, *74*, 835–855.
- Tino, M., Vieira, P., Santos, S., Ferreira, T., Araujo, E., Quintal, V., et al. (2013). Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatrics and International Child Health*, *33*, 102–107.
- Wakabayashi, H., Oda, H., Yamauchi, K., & Abe, F. (2014). Lactoferrin for prevention of common viral infections. Review article. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *20*, 666–671.
- WHO. (2013). Rotavirus vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*, *88*, 49–64.
- Wolber, F., Broomfield, A., Fray, L., Cross, M., & Dey, D. (2005). Supplemental dietary whey protein concentrate reduces rotavirus-induced disease symptoms in suckling mice. *Journal of Nutrition*, *135*, 1470–1474.
- Yadav, J. S. S., Yana, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, *33*, 756–774.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M. W., & Anema, S. (2004). Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait*, *84*, 269–283.
- Volken, R., Peterson, J., Vonderferch, S., Fouts, E., Midthum, K., & Newburg, D. (1992). Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Journal of Clinical Investigation*, *90*, 1984–1991.

4.1.2. **Artículo 2.** Antirotaviral activity of bovine and ovine dairy byproducts

---





## Antiroviral Activity of Bovine and Ovine Dairy Byproducts

José Antonio Parrón,<sup>†</sup> Daniel Ripollés,<sup>†</sup> María Dolores Pérez,<sup>†</sup> Miguel Calvo,<sup>†</sup> Jan Trige Rasmussen,<sup>§</sup> and Lourdes Sánchez<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza–CITA, Zaragoza, Spain

<sup>§</sup>Protein Chemistry Laboratory, Department of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Aarhus, Denmark

**ABSTRACT:** Rotaviral gastroenteritis is associated with significant morbidity in developed countries and a high rate of infant mortality in developing countries. Diverse studies have demonstrated that a wide range of milk-derived fractions exhibit antirotaviral activity. The present study shows the antirotaviral activity of some bovine and ovine dairy byproducts, buttermilk, butter serum, and milk fat globule membrane (MFGM), and evaluates the effect of cream washing and heat treatment on that activity. Furthermore, the rotavirus-neutralizing activity was evaluated for some MFGM proteins, such as xanthine oxidase and lactophorin. Ovine and bovine buttermilk reached rotavirus-neutralizing values of 51.3 and 32.2%, at 1 mg/mL, respectively. The cream washing process led to a significant decrease in the antirotaviral activity of fractions. This activity was also influenced by heat treatment. Treatment at 75 °C for 20 s caused 24.6 and 36.1% decreases of activity in bovine and ovine buttermilk, respectively, and 85 °C for 10 min caused decreases of 80.9 and 79.0% in both fractions, respectively.

**KEYWORDS:** antirotaviral activity, dairy byproducts, buttermilk, butter serum, milk fat globule membrane, xanthine oxidase, lactophorin, cream washing, heat treatment

### INTRODUCTION

Rotaviruses are the leading etiologic agents of severe diarrheal disease in infants and young children, but they are certainly also an important veterinary pathogen, causing disease in animals such as cattle, sheep, swine, and poultry. Across all human age groups, diarrhea is one of the top five causes of death worldwide and the second leading cause of death in children <5 years old.<sup>1</sup> Viral gastroenteritis caused by rotavirus remains a major public health concern, inducing symptoms ranging from self-limiting watery diarrhea to severe dehydration, with complications including cerebral edema, hypovolemic shock, renal failure, and death. The morbidity and mortality caused by rotaviral gastroenteritis represent a significant economic and public health burden, occurring regardless of socioeconomic status or environmental conditions, although the outcome and consequences are most severe in developing countries.<sup>2</sup>

Rotaviruses are nonenveloped viruses of the family Reoviridae with a genome composed of 11 segments of dsRNA that are enclosed in a capsid formed by three concentric protein layers. The outermost layer is composed of two proteins, VP4 and VP7,<sup>3</sup> that are responsible for the initial interactions of viral particles with the host cell receptors and virus entry.<sup>4</sup> Rotaviruses are highly host-cell specific and infect mature enterocytes in the mid and upper villous epithelium of the small intestine.<sup>5</sup> It has been proposed that rotavirus cell entry is a multistep process, which involves the two virus surface proteins and several cellular molecules, including sialic acids, integrins, the heat shock cognate protein 70, and some gangliosides.<sup>6</sup>

Two recently developed rotavirus vaccines, RotaTeq (RV5, Merck, West Point, PA, USA) and Rotarix (RV1, GlaxoSmithKline GSK, Rixensart, Belgium), have reduced rotavirus incidence in developed countries, although they are much less applied in low-income settings, due to financial and

logistic challenges, leaving between a third and half of all vaccinated children unprotected from severe rotavirus disease.<sup>7</sup> Even though benefits from rotavirus vaccination by reducing morbidity and health care costs worldwide are unquestionable, live viral vaccines are contraindicated in patients with severe immunodeficiencies, due to the risk of prolonged infection.<sup>8</sup> In addition to that, the trouble related to affordability and availability of vaccines underscores the need for alternative strategies to fight rotaviral infections.

Nowadays, oral rehydration solution remains the only safe, effective, and low-cost therapeutic option to prevent life-threatening dehydration caused by acute severe diarrheal diseases, although it is not employed to the desirable extent.<sup>9</sup> In the past few decades, there has been a focus on how to achieve passive prevention or possibly treatment of diseases caused by viral agents, particularly rotavirus. Different studies have suggested the use of antibodies from bovine colostrum or human milk for passive protection as an alternative therapeutic approach.<sup>10,11</sup> These sources cannot be used routinely due to large-scale production limitations. Thus, further research in alternative sources of antirotaviral compounds is still needed.

The literature outlines evidence for antirotaviral activity of food-derived components. Thus, several natural extracts, essential oils, and juicy preparations from vegetal origin have shown *in vitro* and/or *in vivo* activity against rotavirus. The identified active constituents are polyphenols, phenolic acids, tannins, pectins, terpenoids, and flavonoid glycosides, among others.<sup>12</sup> Furthermore, different compounds present in egg have

Received: March 7, 2017

Revised: May 4, 2017

Accepted: May 10, 2017

Published: May 10, 2017

been found to inhibit rotavirus infection, both in vitro and in vivo. In this case, activity has been attributed to an oligosaccharide-enriched fraction from delipidated egg yolk of hen,<sup>13</sup> as well as to ovomucoid and ovalbumin from chicken and turkey egg white.<sup>14</sup>

However, the great majority of studies on food compounds with antirotaviral activity have focused on milk-derived fractions, for example, bovine whey protein concentrates (WPC), buttermilk (BM), and milk fat globule membrane (MFGM). The viral-attenuating effect exerted by these milk fractions has been mainly associated with defensive bioactive proteins, such as immunoglobulins, lactoferrin, mucins, lactadherin, and lactophorin.<sup>10,15,16</sup> On the other hand, a line of studies attributes antirotaviral activity also to milk lipidic components, such as sphingolipids and triglycerides associated with MFGM,<sup>17,18</sup> and particularly to those sialyl-oligosaccharide containing compounds, because most rotavirus strains use sialic acid for cell infection.<sup>6</sup> However, there is still much to investigate to reach a better understanding of the mechanisms by which rotaviruses interact with host cells and neutralizing agents.

BM and butter serum (BS) are considered low-value byproducts of the dairy industry, both obtained in milk fat processing. However, these products have recently received more attention by researchers, presumably due to their content of components associated with the MFGM. Proteins from this membrane fraction are recognized for having nutritional benefits and physiological functions, for example, the glycoprotein mucin 1 (MUC 1), the redox enzyme xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO), cluster of differentiation 36 (CD 36), butyrophilin (BTN), periotic acid Schiff 6/7 (PAS 6/7 or lactadherin), and adipophilin (ADPH).<sup>19</sup>

The processing of milk and derived products, which normally includes heat treatment, might weaken their nutritional and biological value. Studies on the effect of heat treatment on milk fractions show that the loss of antirotaviral capacity correlates positively with treatment intensity. This effect is the result of structural changes produced on the proteins, leading to denaturation and/or aggregation.<sup>20,21</sup> Accordingly, it is important to know which kind of heat treatment can be applied during the preparation of milk fractions and derived components to retain their bioactivity, as much as possible.

The main objective of the present investigation was to evaluate the rotavirus-neutralizing activity of several dairy fractions and byproducts by measuring their capacity to inhibit the infection of MA104 cells by the bovine rotavirus WC3 strain. The effect of several heat treatments on the biological activity of bovine and ovine buttermilk has also been tested.

Additionally, the influence of cream washing on the antirotaviral activity of derived fractions and the activity of different isolated bovine MFGM proteins have been studied.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Minimal essential medium (MEM), Eagle's minimal essential medium (EMEM), heat-inactivated fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics (penicillin–streptomycin), and amphotericin B were obtained from Gibco (Life Technologies Corp., Paisley, UK).

Q-Sepharose and Sephacryl S300 were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Sephadex G-75 and trypsin from porcine pancreas type IX-S were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Mini-Protean TGX gels of 10% polyacrylamide were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). A Pierce BCA Protein Assay Kit and a Glycoprotein Staining Kit were from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250 was purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). Immobilion-P membranes were from Millipore (Bedford,

MA, USA). Bovine native lactoferrin was kindly provided by Tatum Nutritional Co. (Morrinsville, New Zealand) with an iron saturation below 10%.

**Cell Culture and Rotavirus Propagation.** Cell culture and rotavirus propagation have been performed following the procedures described in Parrón et al.<sup>20</sup> The Rhesus monkey kidney cell line MA104 (ATCC CRL-2378) was used to propagate WC3 bovine rotavirus strain (ATCC VR-2102). MA104 cells were cultured in MEM, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% antibiotics (100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), 2 mM L-glutamine, and 0.25 µg/mL amphotericin B.

Rotavirus propagation was carried out by inoculating confluent cell monolayers with an aliquot of a virus suspension. Serum-free EMEM, supplemented with 1% antibiotics, 2 mM L-glutamine, and 0.25 µg/mL amphotericin B, was used as diluent in all steps. Viral titer was determined by indirect immunofluorescent staining of infected cells and expressed as focus forming units (FFU), as previously described by Arnold et al.<sup>22</sup>

**Rotavirus Infectivity Assay.** The in vitro infection assay was performed as previously described in the study of Parrón et al.,<sup>20</sup> in which the assay was validated according to international guidelines. Briefly, MA104 cells were seeded into 96-well plates and incubated near confluence. Appropriate dilutions of filter-sterilized milk fractions were mixed (1:1) with trypsin-activated rotavirus suspension and incubated for 1 h at 37 °C to evaluate their neutralizing activity. Afterward, the samples were transferred into the 96-well cell culture plates (final rotavirus titer of  $3.8 \times 10^3$  FFU per well), previously washed once with serum-free MEM, and incubated at 37 °C during 1 h for rotavirus adsorption. Serum-free EMEM and rotavirus suspension were included as negative and positive controls, respectively. For cell infection, plates were added with 100 µL of EMEM per well containing 2 µg/mL trypsin and 2% heat-inactivated fetal serum, before incubation at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> for 16 h with gentle rotation. Subsequently, virus-infected cells were detected by immunofluorescence. The titer of the virus suspension and the infectivity percentages were determined by enumerating fluorescent foci (infected cells) in each well using a fluorescence microscope (Eclipse E400) with an FITC-compatible filter, by image analysis using Zen lite 2012 software.

**Obtaining Milk Fractions: BM, BS, MFGM, and Commercial Products.** The procedure for obtaining BM and BS from raw bovine and ovine milk was performed essentially as previously described.<sup>23</sup> Raw milk from cow and sheep (25 L each) was provided by the dairy industry Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza, Spain) and temperature (4 °C) and pH (6.6–6.8) controlled until the skimming operation, which was performed by using a cream separator (ARR-DES 12S, Suministros Químicos Arroyo, Santander, Spain). Cream was then washed twice with 4 volumes of washing buffer (0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, 1 mM EDTA) and centrifuged at 2800g for 15 min (4 °C). The washed cream was stored at 4 °C overnight before being churned into butter. The BM released in the process was filtered through several layers of cheesecloth and stored at –20 °C until analysis. Butter was melted at 50 °C for 10 min and centrifuged at 4000g for 10 min into BS and butter oil. The MFGM fraction was obtained as described in Hvarregaard et al.,<sup>24</sup> through precipitation of BM by lowering the pH to 4.65 with 2 M HCl and centrifugation at 17000g for 75 min (4 °C). The precipitated MFGM was stored at –20 °C until analysis.

To evaluate the influence of cream washing on the antirotavirus activity of the resulting BM, BS, and MFGM, the procedure was also performed without the washing operation. In addition, three commercial dairy coproducts were assayed, including WPC, BS, and BM powders. WPC was a product obtained by microfiltration of whey from cheese processing. BS was a coproduct derived from the process of obtaining anhydrous milk fat, from pasteurized (72 °C for 15 s) bovine milk. BM was obtained during butter manufacture using pasteurized (72 °C for 15 s) bovine milk. All coproducts were spray-dried and commercialized as powders.

**Obtaining Purified Proteins.** Bovine XDH/XO was obtained basically as described by Berglund et al.<sup>25</sup> through treatment of BM with cold butanol and ammonium sulfate precipitation, followed by anion-

exchange chromatography on Q-Sepharose and gel filtration on Sephacryl S300. Bovine lactophorin (component 3 of proteose peptone or PP3) was isolated as described by Sørensen and Petersen,<sup>26</sup> by gel filtration on Sephadex G-75 and Q-Sepharose ion-exchange chromatography of crude proteose peptone, obtained after heat treatment (90 °C for 30 min) of skim milk, acidification at pH 4.6, and addition of trichloroacetic acid. Furthermore, an additional Sephadex G-75 gel chromatography step was developed in the presence of urea to separate PP3 fragments of 28 and 17 kDa. Additionally, proteolytic degradation of PP3 was carried out, according to the method of Pedersen et al.,<sup>27</sup> by incubating PP3 (8 mg/mL solution) in 0.1 N  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8, with trypsin (1% w/w) for 2 h at 37 °C, to test the antirotaviral activity of the resulting peptides. Bovine immunoglobulins G (IgG) were isolated, according to the method of Mainer et al.,<sup>28</sup> by precipitation with ammonium sulfate followed by DEAE-Sepharose chromatography.

**Heat Treatment.** The heat treatment procedure was based on that previously used by Parrón et al.<sup>20</sup> Aliquots of bovine and ovine BM were placed in glass Erlenmeyers and preheated in a thermostatic bath ( $\pm 0.1$  °C) to about 5 °C below the temperatures of treatment. Heat treatments applied were 75 °C for 20 s or 10 min, 80 °C for 20 s or 10 min, and 85 °C for 20 s or 10 min. Temperature was monitored inside the samples with a digital thermometer. After heating, the samples were cooled rapidly in an iced water bath and stored at -20 °C until analysis.

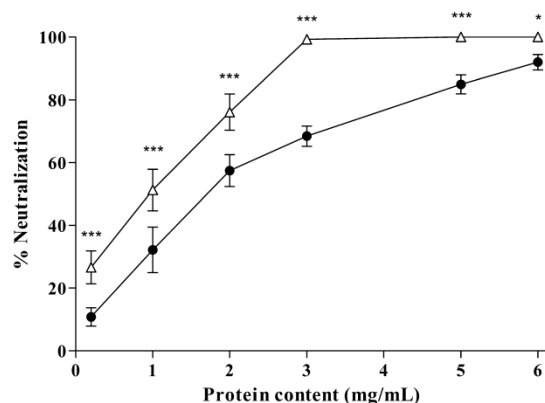
**SDS-PAGE and Western Blotting.** Protein profiles of milk fractions and isolated proteins were analyzed by SDS-PAGE using Mini-Protean TGX gels of 10% polyacrylamide, which were stained with periodic acid Schiff (PAS), using the Pierce Glycoprotein Staining Kit, and Coomassie Brilliant Blue R-250, according to standard procedures. The Western blotting procedure was performed as described by Benfeldt et al.<sup>29</sup> using Immobilon-P membranes for electroblotting of protein. The blocking buffer for membranes consisted of 50 mM Tris, pH 7.4, containing 0.5 M NaCl and 2% Tween 20, and the washing solution used was 50 mM Tris, pH 7.4, with 0.5 M NaCl and 0.1% Tween 20 (TBST). Specific primary rabbit antibodies (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in TBST) were previously raised against individually purified bovine milk proteins. Quantification of protein concentration was determined by BCA Protein Assay using the Pierce Kit.

**Statistical Analysis.** Data were analyzed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software by using a Kolmogorov–Smirnov normality test and a one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Neutralizing Activity of Bovine and Ovine Buttermilks on Bovine Rotavirus Infectivity.** Bovine and ovine BMs were tested for their ability to reduce rotavirus infectivity (Figure 1) by an immunofluorescence assay previously validated in our laboratory.<sup>20</sup> The antirotaviral potential of ovine BM was higher than that of bovine BM, reaching neutralization values of 51.3 and 32.2%, respectively, at a protein concentration of 1 mg/mL. The antirotaviral activity was dose-dependent, and the maximal neutralization was reached with ovine BM at 3 mg protein/mL, whereas the protein concentration of bovine BM must be >6 mg/mL to impede completely the infectivity. Statistically significant differences between the two types of BM were found at all protein concentrations assayed.

The composition of BM was analyzed by SDS-PAGE (Figure 2). The two BMs comprise several glycoproteins, such as IgG, lactoferrin, MUC1 and lactadherin, which were identified by both molecular weight and reactivity with specific antibodies by Western blotting. Those proteins, isolated from bovine sources, have been previously reported to hold some degree of protection against rotaviral infectivity.<sup>10,15,16,30</sup> In a recent study,<sup>20</sup> it was confirmed that IgG showed the highest ability to neutralize MA104 cells infection with the rotavirus strain WC3 (>90% antirotaviral activity at 0.025 mg/mL), ahead of lactadherin (70% at 0.08 mg/mL), lactoferrin (82% at 0.25 mg/mL), and MUC1



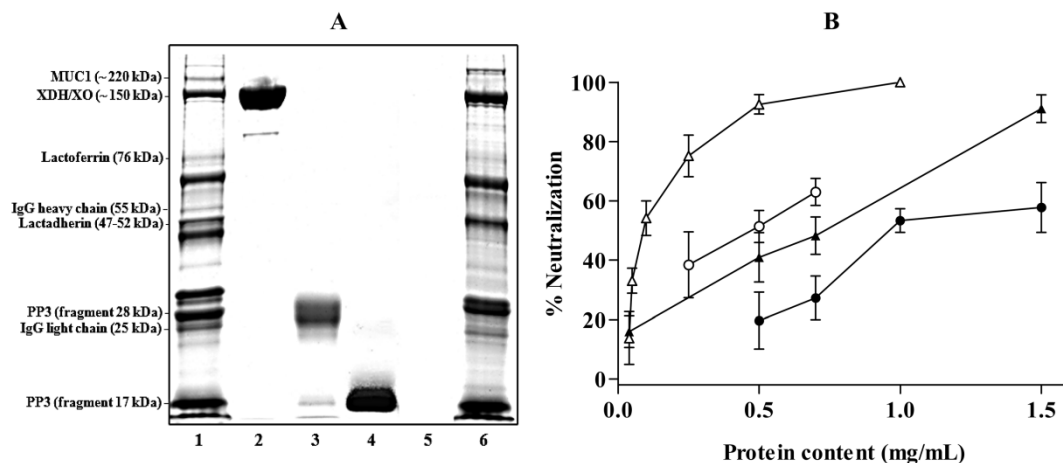
**Figure 1.** Dose–response of bovine (black circles) and ovine BM (white triangles) on neutralizing WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Results are shown as the mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\*,  $p < 0.1$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ) between bovine and ovine BM neutralizing activity, at the same protein concentration.

(35% at 0.25 mg/mL). Contradictory results have been reported for the antirotaviral activity of bovine lactadherin and lactoferrin, but this could be due to the use of different experimental procedures and rotavirus strains.

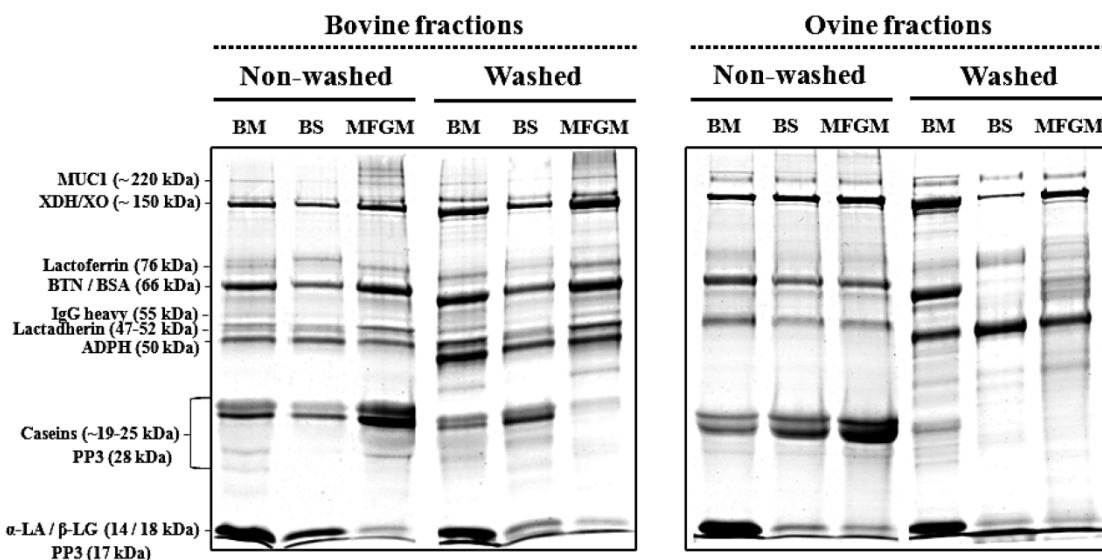
The present study provides data on the antirotaviral potential of two other BM components, XDH/XO and PP3 (Figure 2). It was observed that bovine XDH/XO, at 0.25 mg/mL, had the capacity to neutralize 75% of MA104 cells infection by WC3. To our knowledge, this might be the first time that some evidence has been presented on the antirotaviral activity of XDH/XO. On the other hand, XDH/XO has been previously reported to operate as an antimicrobial agent.<sup>31</sup> These authors suggest that the antimicrobial function of XDH/XO is linked to the ability of the enzyme to generate reactive oxygen and/or nitrogen species, which are known as bactericidal substances. The antiviral activity of reactive oxygen/nitrogen species has been poorly studied; however, there are indications pointing at such actions.<sup>32,33</sup> Whether the presently described antirotaviral activity of bovine XDH/XO can be attributed to equivalent effectors must await coming investigations.

Purified bovine PP3 was also tested for its rotaviral attenuating capacity. PP3 can be obtained from bovine milk as an intact protein (28 kDa), but a 17 kDa C-terminal fragment is also relatively prevalent and fractionable. The rotavirus neutralization activity was determined to be 19.7 and 51.4% for intact PP3 and 17 kDa fragment at 0.5 mg/mL, respectively. These results are considerably lower than those reported by Inagaki et al.,<sup>30</sup> who found a high inhibitory activity of PP3 against replication of human rotavirus strain MO. They reported that 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of intact protein exerted approximately 50% neutralization and that the same concentration of the 17 kDa fragment had 95% of neutralization activity. The discrepancies between our results and those by Inagaki et al. have no evident explanation, although there are some differences between the two experimental procedures used, such as virus strains, cell lines, protein purification, incubation time with rotavirus, and infection detection method.

In addition to that, this work shows that proteolytically degraded bovine PP3 at 0.5 mg/mL exhibited 40.9% of antirotaviral neutralizing capacity (Figure 2). Even though the cause of this antiviral activity has not been well stated yet, there is



**Figure 2.** (A) Electrophoretic profile of bovine and ovine BM. PAS + Coomassie blue staining. Lanes: 1, bovine BM; 2, bovine XDH/XO; 3, bovine PP3 (intact protein); 4, bovine PP3 (17 kDa fragment); 5, bovine PP3 (hydrolyzed); 6, ovine BM. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels. (B) Dose-response of isolated proteins on neutralizing WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells: bovine PP3 (intact protein) (black circles); 17 kDa fragment of bovine PP3 (white circles); hydrolyzed bovine PP3 (black triangles); bovine XDH/XO (white triangles). Results are shown as the mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ).



**Figure 3.** Effect of washing on the electrophoretic profile of bovine and ovine fractions (BM, buttermilk; BS, butter serum; MFGM, milk fat globule membrane). To evaluate the influence of cream washing on the antirotavirus activity of the resulted BM, BS, and MFGM, they were obtained without washing and washing the cream twice with 4 volumes of buffer. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels.

some evidence that PP3 operates as a precursor protein that, upon proteolysis, releases peptides with antibacterial capacity.<sup>27,34</sup>

#### Effect of Cream Washing on the Neutralizing Activity of Diverse Milk Fractions on Bovine Rotavirus Infectivity.

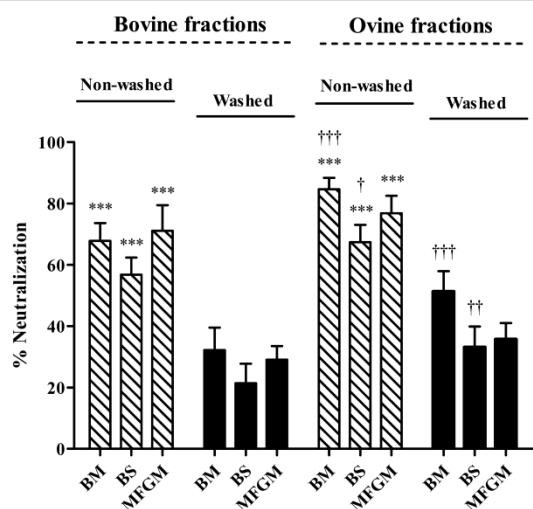
The impact of cream washing on the derived fractions from bovine and ovine milk was also investigated. The protein profiles of BM, BS, and MFGM fractions were analyzed by SDS-PAGE (Figure 3). First, it has been observed that the protein composition of bovine BM is in accordance with previous studies, in which the composition has been reported as 59% caseins, 23% serum proteins, and 19% MFGM proteins.<sup>35</sup> Even though the composition of ovine milk fractions has been far less studied, it is recognized that the protein content of ovine BM, 5.1% (w/w), is higher than that of bovine BM, 3.2% (w/w).<sup>36</sup>

The protein composition of the present bovine and ovine MFGM fractions is also similar to preceding results.<sup>37,38</sup> As expected, it is observed that the most soluble compounds are removed upon washing, the complexity and level of caseins in MFGM being heavily diminished. The effect of washing is not that pronounced in bovine fractions; actually, casein is more clearly diminished after washing the ovine fractions, although the band intensity of some proteins, such as adipophilin and lactadherin, increases after washing, in both cases. The differences in composition between washed and nonwashed BS are low, except for casein in the ovine samples.

A general loss of protein upon cream washing seems to be unavoidable and apply not only to peripherally bound proteins, such as casein and whey proteins, but also to more firmly attached proteins. These observations are supported by other

studies,<sup>23,39</sup> which showed that over two washings of cream protein loss was high, as observed by SDS-PAGE. Moreover, the results included in Figure 3 show that not only loosely bound membrane components (e.g., MUC1, lactadherin, XO/XDH) are washed out but even integral MFGM proteins (e.g., BTN) are depleted by washing procedures, as reported elsewhere.<sup>23,40</sup>

Thus, some tests were performed to assay the effect of cream washing on the neutralizing capacity of BM, BS, and MFGM against bovine rotavirus infectivity. This was evaluated by the immunofluorescence assay, and the results obtained are summarized in Figure 4. Independent of the sample origin, in



**Figure 4.** Effect of washing on neutralizing activity of bovine and ovine fractions against WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Results are shown as the mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\*,  $p < 0.001$ ) between neutralizing activity of fractions at 1 mg/mL of protein concentration, obtained from washed cream (black bars) or without previous wash (slashed bars). Daggers indicate statistically significant differences (†††,  $p < 0.001$ ; ††,  $p < 0.01$ ; †,  $p < 0.1$ ) between neutralizing activity of ovine fractions with regard to its bovine homologue.

terms of species and cream processing, BM and MFGM were superior to BS in their neutralizing activity. The neutralizing capacity of nonwashed bovine and ovine fractions at a concentration of 1 mg/mL was in a range between 60 and 80%. Bovine fractions from washed cream assayed at 1 mg/mL showed similar inhibitory activity between them (21–32%). This most likely relates to similarities in the composition and/or balance in the content of biological active compounds. As expected, ovine fractions demonstrated higher antirotaviral activity than the equivalent bovine fractions. Ovine BM from washed cream neutralized 51% of rotavirus infection, whereas the activities of BS and MFGM at 1 mg/mL were 33 and 35%, respectively.

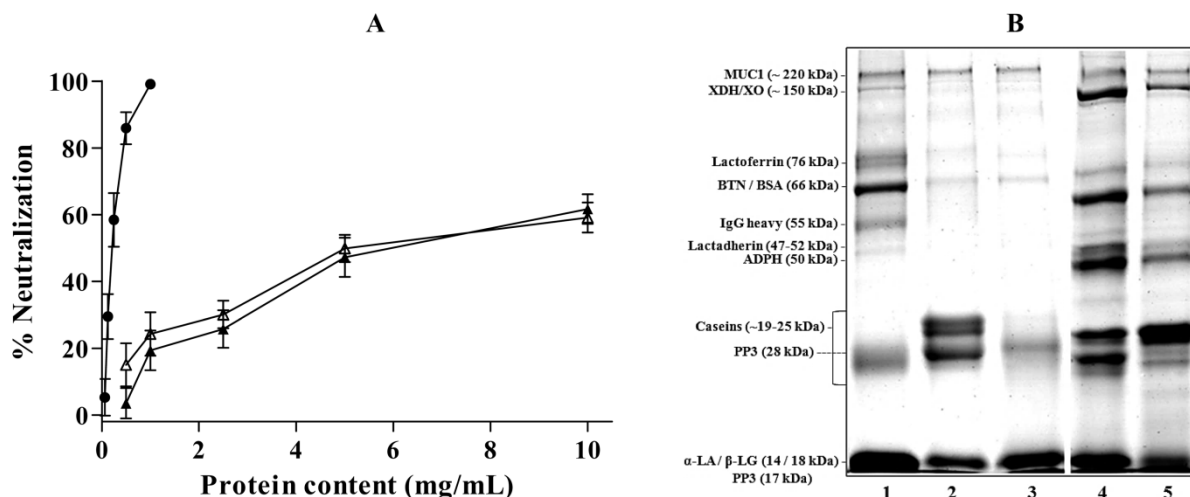
As is shown in Figure 4, statistically significant differences in rotaviral neutralizing capacity have been observed due to the cream washing process. Thus, all nonwashed fractions have shown higher rotaviral neutralizing activities in comparison with their washed homologues. This fact may be related to the removal of bioactive components with antirotaviral activity, such as whey and MFGM proteins, and lipids, by cream washing.

It is well established that cream washing facilitates isolation of MFGM material with a reduced content of skim milk components, and several studies show that the number of washing steps, the type and volume of washing liquid, and the temperature have a significant influence on the composition.<sup>39</sup> The present study clearly demonstrates that the cream washing process also affects the bioactivity of downstream fractions, which probably relates to compositional changes. For that reason, it will be advisable to use standardized and gentle conditions to keep a high recovery of bioactive substances while obtaining the MFGM-enriched fractions.

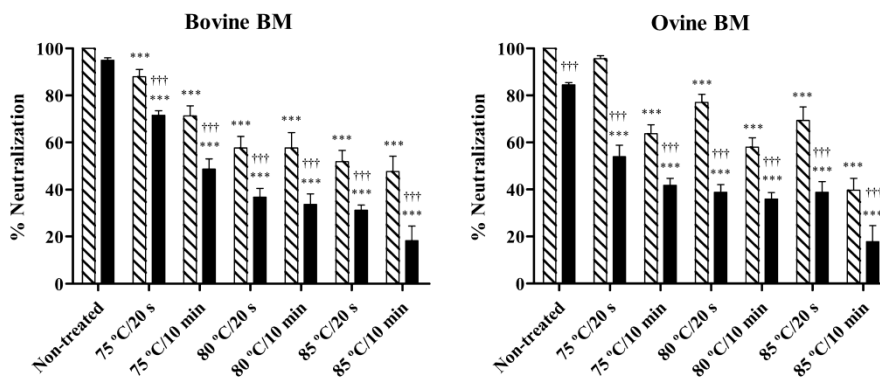
**Neutralizing Activity of Diverse Commercial Dairy Fractions on Bovine Rotavirus Infectivity.** It is clear that the conditions of dairy fraction processing have a great impact on their biological potential. To address this, commercial bovine BM and BS powders were tested for their capacity to attenuate rotavirus infectivity and were compared to a bovine WPC (Figure 5A). Bovine BM and BS turned out to have increasing neutralizing activity in the tested concentration range, both ending close to 60% at a concentration of 10 mg protein/mL. Bovine WPC was much more effective and exhibited nearly 99% neutralizing activity at 1 mg/mL, whereas commercial BM and BS only reached 24 and 19% neutralizing activity, respectively, at the same protein concentration. In comparison, BM and BS fractions prepared in the laboratory from nonwashed cream demonstrated also at 1 mg protein/mL higher neutralizing activities, of 68 and 57%, respectively. This could be explained by compositional differences arising due to the method of preparing and treating the samples. According to the specifications given by suppliers, the lipid content is remarkably different in the three commercial dairy products. Commercial BM contains the lowest amount of lipids, 9.7% (w/w), whereas BS presents 22.2 and WPC 18% (w/w). With respect to the protein content, it has been found to be similar, 33.6 and 30.3% (w/w), in BM and BS powders, respectively, but quite higher in WPC, 72% (w/w).

The samples of commercial origin and those prepared in this study displayed different bioactivities, and a great deal of that is likely to be attributed to proteins. Accordingly, differences in protein composition were analyzed by SDS-PAGE (Figure 5B). The number of intense protein bands was much higher in BM prepared in our laboratory without cream washing than in commercial BM, especially in the high molecular weight range (>40 kDa). All three commercial powders contain high amounts of whey proteins ( $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin), but only commercial BM contains a great quantity of casein. Noticeably, WPC holds much higher content of IgG and lactoferrin. WPC should contain about 6% IgG (w/w) according to the manufacturer's specifications, which is a component shown to be very important for the antirotaviral activity of bovine dairy fractions.<sup>15,20</sup>

The results obtained in the present study on the rotavirus neutralization capacity of BM and BS could easily be matched with previous records for bovine and ovine whey fractions, because they are obtained by the same experimental procedure.<sup>20</sup> With respect to the samples prepared in our laboratory, bovine and ovine whey at 1 mg protein/mL reached early rotavirus neutralization values of 89.2 and 76.6%, respectively, which is around twice as good as BM from nonwashed cream from either species. By comparing the capacity of bovine fractions (at 1 mg protein/mL) to inhibit rotavirus, it can be seen that the strongest neutralization activity was shown for WPC and whey (99 and 89.2%), followed by BM, BS, and MFGM without cream wash (67.8, 56.8, and 71.1%), BM, BS, and MFGM from washed cream



**Figure 5.** (A) Dose–response of commercial bovine fractions on neutralizing WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells: WPC (black circles); BM (white triangles); BS (black triangles). Results are shown as the mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). (B) Electrophoretic profile of commercial bovine fractions. PAS + Coomassie blue staining. Lanes: 1, commercial WPC; 2, commercial BM; 3, commercial BS; 4, nonwashed BM; 5, nonwashed BS. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels.



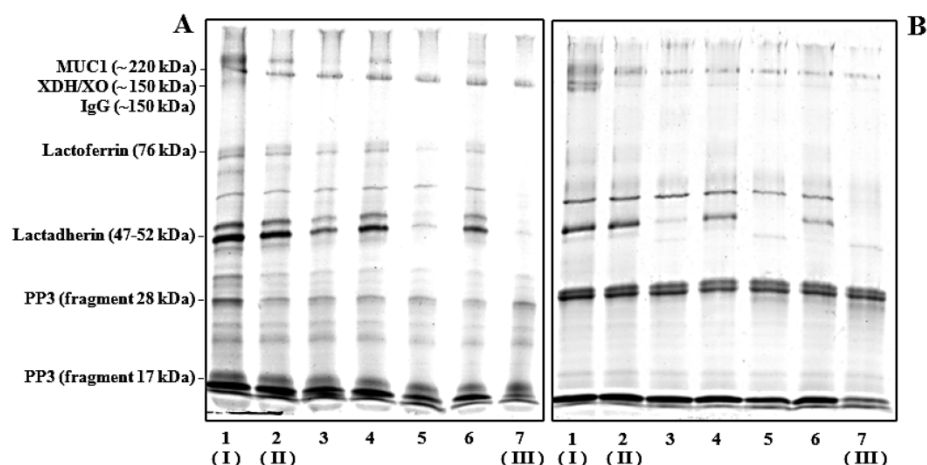
**Figure 6.** Effect of heat treatment on the neutralizing activity of nonwashed (slashed bars) and washed (black bars) BM on WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Bovine and ovine BM were tested at 5 and 2.5 mg protein/mL, respectively. Results are expressed in relation to control as the mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from three independent experiments ( $n = 9$ ). Statistically significant differences (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ) were observed for all treatments in relation to controls (nontreated BM). Statistically significant differences (†††,  $p < 0.001$ ) related to washing process were also evidenced at all treatments tested.

(32.2, 21.4, and 29.1%), and, finally, commercial BM and BS (24.3 and 19.4%). Among the tested ovine fractions, BM, BS, and MFGM from nonwashed cream were shown to attenuate rotavirus infectivity at the highest levels (84.6, 67.4, and 76.8% neutralization) and with whey in a comparable range (76.6%). BM, BS, and MFGM from washed ovine cream were less effective (51.3, 33.1, and 35.7%) than nonwashed homologues.

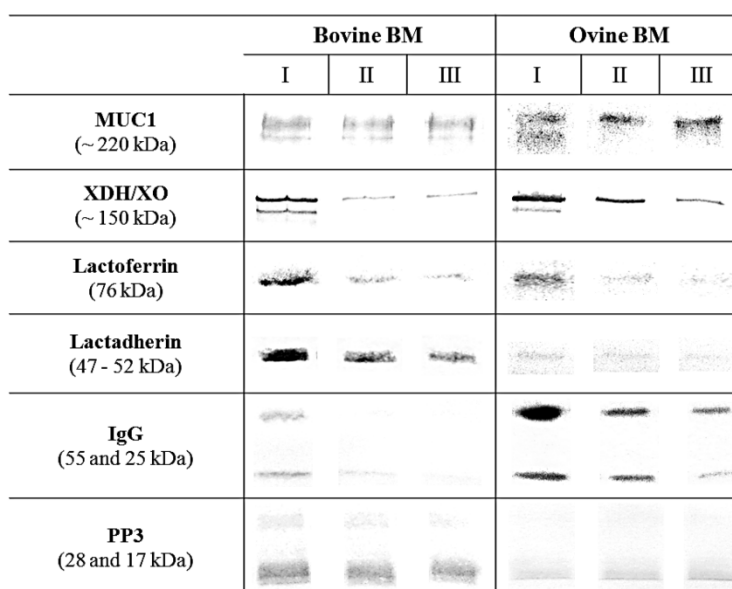
It is interesting to note the higher rotaviral neutralizing activity found for ovine fractions in comparison with bovine homologues. This might correlate with interspecies divergences in the concentration or ratio of rotavirus-neutralizing components,<sup>37,38</sup> which combined with differences in the protein structure, the glycosylation pattern, and microheterogeneity in the attached oligosaccharides, may play an important role in the overall bioactivity.<sup>6,41</sup>

**Effect of Heat Treatment on the Neutralizing Activity of BM Fractions on Bovine Rotavirus.** Heat treatments of different intensity were applied to bovine and ovine BM to evaluate the influence on their neutralizing activity against bovine

rotavirus (Figure 6). It was observed that even pasteurization at 75 °C for 20 s significantly reduced the antirotaviral neutralizing activity of bovine and ovine BM, with 23.3 and 30.5 percentage points of loss, respectively, in relation to nontreated samples. Furthermore, heat treatments of intermediate intensity (75 °C for 10 min and 80 °C for 20 s) reduced the antirotaviral activity to a greater extent. The activity of bovine BM decreased within 46.2 and 58.1 percentage points after intermediate heat treatments, respectively, whereas ovine BM lost 42.6 and 45.6 percentage points. A greater loss of antirotaviral activity occurred after the application of more extended heat treatments on BM samples (80 °C for 10 min, 85 °C for 20 s, and 85 °C for 10 min), leading to decreases of 61.2, 63.7, and 76.7 percentage points for bovine BM and 48.5, 45.7, and 66.7 points for ovine BM, respectively. It is remarkable that the influence of heat treatment on antirotaviral activity depends significantly on the type of BM (Figure 6). Bovine BM showed a higher resistance to low-intensity heat treatments than ovine BM, whereas the opposite was observed upon the harshest conditions.



**Figure 7.** Electrophoretic profile of heat-treated BM (PAS + Coomassie blue staining): (A) bovine BM; (B) ovine BM. Lanes: 1 (I), nontreated BM; 2 (II), 75 °C for 20 s; 3, 75 °C for 10 min; 4, 80 °C for 20 s; 5, 80 °C for 10 min; 6, 85 °C for 20 s; 7 (III), 85 °C for 10 min. SDS-PAGE was performed under nonreducing conditions in 10% polyacrylamide gels. Roman numerals indicate the samples analyzed by Western blotting. PP3 (17 kDa fragment) bands are probably overlapped with  $\beta$ -LG bands.



**Figure 8.** Identification of bovine and ovine BM proteins by Western blotting using specific antibodies against the different proteins: (I) nontreated BM; (II) BM treated at 75 °C for 20 s; (III) BM treated at 85 °C for 10 min. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 10% polyacrylamide gels.

Furthermore, it is observable that the cream washing influenced significantly the susceptibility of fractions to heat treatment (Figure 6). Both bovine and ovine fractions from nonwashed cream exhibited greater resistance to heat treatment and presented higher neutralizing values at all treatments tested. Such differences may be associated with the loss of BM components during the washing steps, which would result in the loss of their direct bioactivity or their protective role to heat-induced denaturation.

The presence of supposed bioactive proteins in bovine and ovine treated BM was monitored by SDS-PAGE (Figure 7), as well as by Western blotting using specific antibodies (Figure 8). Our results showed several differences in the susceptibility of diverse BM proteins to heat. With respect to XDH/XO,

lactoferrin, lactadherin, and IgG, it has been observed that their corresponding electrophoretic bands decreased with the intensity of heat treatment, as also confirmed by the loss of immunological reactivity. In contrast, electrophoretic bands corresponding to MUC1 and PP3 remained with the same intensity, even after 85 °C for 10 min, indicating that these proteins are highly resistant to heat denaturation, which is also in agreement with results obtained in previous studies.<sup>20,42,43</sup>

To substantiate these results, the impact of heat treatment on the rotavirus-neutralizing activity of bovine IgG and native bovine lactoferrin was evaluated. In this regard, values reveal that isolated bovine IgG at 0.1 mg/mL retained 100% of the neutralizing activity, after a 75 °C/20 s heat treatment, and lost 48.2 percentage points after a 85 °C/10 min treatment. In

addition, native bovine lactoferrin at 1 mg protein/mL maintained 93% of neutralizing activity, after 75 °C for 20 s treatment, whereas its activity diminished 73, 97, and 99 percentage points when subjected to higher intensity treatments of 75, 80, and 85 °C for 10 min, respectively. These results are in accordance with other studies dealing with the thermostability of IgG and lactoferrin.<sup>20,44–46</sup>

In the present work focus has been placed on heat-induced effects on individual proteins, but there are reports that imply the occurrence of interprotein interactions. In fact, heat treatment of milk (>65 °C) leads to physicochemical modifications and hydrophobic interactions or disulfide-bonded aggregates of whey proteins with casein micelles and/or MFGM proteins.<sup>21,46,47</sup> Besides that, some studies suggest that not only glycoproteins are affected by milk heating, but also glycosphingolipids,<sup>48</sup> phospholipids,<sup>49</sup> and/or triacylglycerol.<sup>50</sup>

In the present study, it has been proven that bovine and ovine BM and BS, which have been considered low-value byproducts of the milk fat industry, present a relevant antirotaviral activity in vitro. Consequently, it might be advisable to revalue these byproducts and instead consider them as sources of valuable bioactive compounds, thereby opening up potential applications by the food industry.

Even though several types of components may convey the rotavirus-neutralizing activity, focus has been on proteinous components, which may work by acting as decoys that inhibit rotaviral attachment. Besides some of the previously described bioactive proteins, antirotaviral activity could also be attributed to bovine XDH/XO and to bovine PP3 and its 17 kDa fragment. Both proteins are relatively abundant in milk, but further research is required to fully understand their antirotaviral potential and the mechanisms underlying the witnessed bioactivity, as well as to assess differences in the susceptibility of virus strains to neutralizing activity.

The present paper clearly shows that extended cream washing leads to a significant decrease of the rotavirus-neutralizing capacity of prepared BM, BS, and/or MFGM material. This is most likely due to the removal/detachment of bioactive components, and it would be advisable to establish optimized preparative procedures for such milk fractions to keep a high recovery of the biological potential.

The effect of several heat treatments on the biological activity of bovine and ovine BM has also been evaluated. The results show that the antirotaviral activity of BM was significantly reduced by heating, even after mild pasteurization (75 °C for 20 s). Cream wash seems to facilitate the effect of heating. Thus, it is important in milk fraction production to find the right balance between reduction of microbial activity by heating and preservation of desirable bioactivity. There might be a need for new industrial protocols and introduction of alternative technologies.

Finally, it is important to state that the antirotaviral activity evidenced by the current study has been observed in in vitro tests for intact dairy byproducts. The outcomes obtained here will provide a solid basis for further studies focusing on the effect of gastrointestinal digestion on the antirotaviral activity of milk-derived fractions and proteins, which is poorly studied so far. This is an important aspect to take into account because gastrointestinal enzymes might cause the degradation of dairy products with a subsequent loss of their bioactivity. Furthermore, the application of encapsulation techniques for the transport of compounds with antirotaviral activity through the gastrointestinal tract could be of particular interest.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*(L.S.) Phone: +34 976 761 585. Fax: +34 976 761 612. E-mail: lousanchez@unizar.es.

### ORCID

Lourdes Sánchez: 0000-0001-5964-823X

### Funding

The work described herein was supported by the Spanish government under a FPU predoctoral grant, a CICYT project (AGL2010-20835), and the European Social Fund.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ABBREVIATIONS USED

ADPH, adipophilin; BM, buttermilk; BS, butter serum; BTN, butyrophilin; CD 36, cluster of differentiation 36; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EMEM, Eagle's minimal essential medium; FFU, focus forming units; FITC, fluorescein isothiocyanate; IgG, immunoglobulin G; MEM, minimal essential medium; MFGM, milk fat globule membrane; MUC 1, mucin 1; PAS, periodic acid Schiff; PAS 6/7, periodic acid Schiff 6/7 or lactadherin; PP3, component 3 of proteose-peptone; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; TBST, Tris-buffered saline supplemented with 0.1% Tween 20; WPC, whey protein concentrate; XDH/XO, xanthine dehydrogenase/oxidase;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumin;  $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulin

## REFERENCES

- (1) Marcotte, H.; Hammarström, L. Immunodeficiencies: significance for gastrointestinal disease. In *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*; Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H. B., Estes, M. K., Eds.; Academic Press: Kidlington, UK, 2016; pp 47–72.
- (2) Kotloff, K. L.; Nataro, J. P.; Blackwelder, W. C.; Nasrin, D.; Farag, T. H.; Panchalingam, S.; Wu, Y.; Sow, S. O.; Sur, D.; Breiman, R. F.; et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* **2013**, *382*, 209–222.
- (3) Estes, M. K.; Kapikian, A. Z. Rotaviruses. In *Fields Virology*; Knipe, D., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Roizman, B., Strauss, S., Eds.; Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp 1917–1974.
- (4) López, S.; Arias, C. F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 271–278.
- (5) Bishop, R. Discovery of rotavirus: implications for child health. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *24* (Suppl. 3), S81–S85.
- (6) Isa, P.; Arias, C. F.; López, S. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate J.* **2006**, *23*, 27–37.
- (7) Babji, S.; Kang, G. Rotavirus vaccination in developing countries. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 443–448.
- (8) Gaspar, H. B.; Hammarström, L.; Mahlaoui, N.; Borte, M.; Borte, S. The case for mandatory newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID). *J. Clin. Immunol.* **2014**, *34*, 393–397.
- (9) Binder, H. J.; Brown, I.; Ramakrishna, B. S.; Young, G. P. Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2014**, *16*, 376–384.
- (10) Inagaki, M.; Yamamoto, M.; Uchida, K.; Yamaguchi, H.; Kawasaki, M.; Yamashita, K.; Yabe, T.; Kanamaru, Y. In vitro and in vivo evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2010**, *74*, 680–682.
- (11) Tino De Franco, M.; Vieira, P. D.; Santos, S. M. R.; Ferreira, T. L.; Araújo, E. D.; Quintal, V. S.; Carbonare, S. B. Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatr. Int. Child Health* **2013**, *33*, 102–107.



- (12) Rajiv, G.; Gurgel, P.; Dos Santos, B.; De Souza, J.; Antunes, A.; Narain, N.; Quintans-Júnior, L. J.; Queiroz, R. Medicinal plants and natural molecules with in vitro and in vivo activity against rotavirus: a systematic review. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 1830–1842.
- (13) Koketsu, M.; Nitoda, T.; Juneda, L. R.; Kim, M.; Kashimura, N.; Yamamoto, T. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 858–861.
- (14) Yolken, R. H.; Willoughby, R.; Wee, S.; Miskuff, R.; Vonderfecht, S. Sialic acid glycoproteins inhibit in vitro and in vivo replication of rotaviruses. *J. Clin. Invest.* **1987**, *79*, 148–154.
- (15) Bojsen, A.; Buesa, J.; Montava, R.; Kvistgaard, A. S.; Kongsbak, M. B.; Petersen, T. E.; Heegaard, C. W.; Rasmussen, J. T. Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 66–74.
- (16) Superti, F.; Siciliano, R.; Rega, B.; Giansanti, F.; Valentí, P.; Antonini, G. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2001**, *1528*, 107–115.
- (17) Fuller, K. L.; Kuhlenschmidt, T. B.; Kuhlenschmidt, M. S.; Jiménez-Flores, R.; Donovan, S. M. Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *J. Dairy Sci.* **2013**, *96*, 3488–3497.
- (18) Jiménez-Flores, R.; Brisson, G. The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Sci. Technol.* **2008**, *88*, 5–18.
- (19) Gallier, S.; Laubscher, A.; Jiménez-Flores, R. The milk fat globule membrane: structure, methodology for its study, and functionality. In *Food Structures, Digestion and Health*; Boland, M., Golding, M., Singh, H., Eds.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2014; pp 107–142.
- (20) Parrón, J. A.; Ripollés, D.; Pérez, M. D.; Calvo, M.; Rasmussen, J. T.; Sánchez, L. Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey. *Int. Dairy J.* **2015**, *60*, 78–85.
- (21) Chevalier, F.; Hirtz, C.; Sommerer, N.; Kelly, A. L. Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5948–5955.
- (22) Arnold, M.; Patton, J. T.; McDonald, S. M. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr. Protoc. Microbiol.* **2009**, 1–29.
- (23) Le, T. T.; Van Camp, J.; Rombaut, R.; van Leeckwyck, F.; Dewettinck, K. Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. *J. Dairy Sci.* **2009**, *92*, 3592–3603.
- (24) Hvarregard, J.; Andersen, M. H.; Berglund, L.; Rasmussen, J. T.; Petersen, T. E. Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *240*, 628–636.
- (25) Berglund, L.; Rasmussen, J. T.; Andersen, M. D.; Rasmussen, M. S.; Petersen, T. E. Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid. *J. Dairy Sci.* **1996**, *79*, 198–204.
- (26) Sørensen, E. S.; Petersen, T. E. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Res.* **1993**, *60*, 189–197.
- (27) Pedersen, L. R. L.; Hansted, J. G.; Nielsen, S. B.; Petersen, T. E.; Sørensen, U. S.; Otzen, D.; Sørensen, E. S. Proteolytic activation of proteose peptone component 3 by release of a C-terminal peptide with antibacterial properties. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 2819–2829.
- (28) Mainer, G.; Sánchez, L.; Ena, J. M.; Calvo, M. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *J. Food Sci.* **1997**, *62*, 1034–1038.
- (29) Benfeldt, C.; Larsen, L. B.; Rasmussen, J. T.; Andreasen, P. A.; Petersen, T. E. Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk. *Int. Dairy J.* **1995**, *5*, 577–592.
- (30) Inagaki, M.; Nagai, S.; Yabe, T.; Nagaoka, S.; Minamoto, N.; Takahashi, T.; Matsuda, T.; Nakagomi, O.; Nakagomi, T.; Ebina, T.; et al. The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 1386–1390.
- (31) Martin, H. M.; Hancock, J. T.; Salisbury, V.; Harrison, R. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect. Immun.* **2004**, *72*, 4933–4939.
- (32) Kim, H. J.; Kim, C. H.; Ryu, J. H.; Kim, M. J.; Park, C. Y.; Lee, J. M.; Holtzman, M. J.; Yoon, J. H. Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN- $\lambda$  regulation in human nasal epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2013**, *49*, 855–865.
- (33) West, A. P.; Shadel, G. S.; Ghosh, S. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **2011**, *11*, 389–402.
- (34) Campagna, S.; Mathot, A. G.; Fleury, Y.; Girardet, J. M.; Gaillard, J. L. Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component-3 of proteose peptone. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 1621–1626.
- (35) Britten, M.; Lamothe, S.; Robitaille, G. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2008**, *43*, 651–657.
- (36) Hamad, M. N.; Ismail, M. M.; El-Menawy, R. K. A. Chemical, rheological, microbial and microstructural characteristics of jameed made from sheep, goat and cow buttermilk or skim milk. *Am. J. Food Sci. Nutr. Res.* **2016**, *3*, 46–55.
- (37) Cebo, C.; Martin, P. Inter-species comparison of milk fat globule membrane proteins highlights the molecular diversity of lactadherin. *Int. Dairy J.* **2012**, *24*, 70–77.
- (38) Pisanu, S.; Ghisaura, S.; Pagnozzi, D.; Biossa, G.; Tanca, A.; Roggio, T.; Uzzau, S.; Addis, M. F. The sheep milk fat globule membrane proteome. *J. Proteomics* **2011**, *74*, 350–358.
- (39) Holzmüller, W.; Müller, M.; Himbert, D.; Kulozik, U. Impact of cream washing on fat globules and milk fat globule membrane proteins. *Int. Dairy J.* **2016**, *59*, 52–61.
- (40) Zheng, H.; Jiménez-Flores, R.; Everett, D. W. Bovine milk fat globule membrane proteins are affected by centrifugal washing processes. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 8403–8411.
- (41) Prasad, B. V.; Shanker, S.; Hu, L.; Choi, J. M.; Crawford, S. E.; Ramani, S.; Czako, R.; Atmar, R. L.; Estes, M. K. Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Curr. Opin. Virol.* **2014**, *7*, 119–127.
- (42) Madsen, J. B.; Pakkanen, K. I.; Lee, S. Thermostability of bovine submaxillary mucin (BSM) in bulk solution and at a sliding interface. *J. Colloid Interface Sci.* **2014**, *424*, 113–119.
- (43) Pedersen, L. R. L.; Nielsen, S. B.; Hansted, J. G.; Petersen, T. E.; Otzen, D. E.; Sørensen, E. S. PP3 forms stable tetrameric structures through hydrophobic interactions via the C-terminal amphipathic helix and undergoes reversible thermal dissociation and denaturation. *FEBS J.* **2012**, *279*, 336–347.
- (44) Harouna, S.; Carramiñana, J. J.; Navarro, F.; Pérez, M. D.; Calvo, M.; Sánchez, L. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment. *Food Control* **2015**, *47*, 520–525.
- (45) Chen, C. C.; Tu, Y. Y.; Chang, H. M. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. *J. Food Sci.* **2000**, *65*, 188–193.
- (46) Ye, A.; Singh, H.; Taylor, M. W.; Anema, S. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait* **2004**, *84*, 269–283.
- (47) Donato, L.; Guyomarç'h, F. Formation and properties of the whey protein/kappa-casein complexes in heated skim milk – a review. *Dairy Sci. Technol.* **2009**, *89*, 3–29.
- (48) Bandyopadhyay, A. K.; Ganguli, N. C. Effect of heating and chilling buffalo milk on the properties of fat globule membrane proteins. *J. Food Sci. Technol.* **1975**, *12*, 312–315.
- (49) Koops, J.; Tarassuk, N. P. The effect of various processing treatments on the partitioning of phosphatides between the fat phase and the milk plasma. *Neth. Milk Dairy J.* **1959**, *13*, 180–189.
- (50) Houlihan, A. V.; Goddard, P. A.; Nottingham, S. M.; Kitchen, B. J.; Masters, C. J. Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *J. Dairy Res.* **1992**, *59*, 187–195.



4.1.3. **Artículo 3.** Antirotaviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments

---





## Antiviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments

José Antonio Parrón · Daniel Ripollés · Sergio José Ramos · María Dolores Pérez · Zeynep Semen · Pedro Rubio · Miguel Calvo · Lourdes Sánchez

Received: 30 December 2017 / Accepted: 19 February 2018  
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

**Abstract** Rotaviral gastroenteritis causes a high rate of infant mortality and severe healthcare implications worldwide. Several studies have pointed out that human milk and dairy fractions, such as whey and buttermilk, possess antiviral activity. This activity has been mainly associated with glycoproteins, among them lactoferrin (LF). Thermal treatments are necessary to provide microbiological safety and extend the shelf life of milk products, though they may diminish their biological value. High hydrostatic pressure (HHP) treatment is a non-thermal method that causes lower degradation of food components than other treatments. Thus, the main objective of this study was to prove the antiviral activity of LFs from different origin and to evaluate the effect of several thermal and

HHP treatments on that activity. LF exerted a high antiviral activity, regardless of its origin. Native LFs from bovine, ovine, swine and camel milk, and the human recombinant forms, at 1 mg/mL, showed neutralizing values in the range 87.5–98.6%, while human LF neutralized 58.2%. Iron saturation of bovine LF did not modify its antiviral activity. Results revealed interspecies differences in LFs heat susceptibility. Thus, pasteurization at 63 °C for 30 min led to a decrease of 60.1, 44.5, 87.1, 3.8 and 8% of neutralizing activity for human, bovine, swine, ovine and camel LFs, respectively. Pasteurization at 75 °C for 20 s was less harmful to the activity of LFs, with losses ranging from 0 to 13.8%. HHP treatment at

J. A. Parrón · D. Ripollés · M. D. Pérez · M. Calvo · L. Sánchez (✉)  
 Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza/CITA, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain  
 e-mail: lousanchez@unizar.es

S. J. Ramos  
 Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), Carretera NA 134, km 53, 31570 San Adrián, Spain

Z. Semen  
 Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Şehit Ömer Halisdemir Bulvarı, 06110 Altındağ, Turkey

Z. Semen  
 International Center for Livestock Research and Training, S. Sırrı İçöz Caddesi, 06852 Mamak, Ankara, Turkey

P. Rubio  
 Unidad de Enfermedades Infecciosas y Epidemiología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, s/n, 24007 León, Spain



600 MPa for 15 min did not cause any significant decrease in the neutralizing activity of LFs.

**Keywords** Lactoferrin · Antirotaviral activity · Pasteurization · High hydrostatic pressure

## Introduction

Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein belonging to the transferrin family (Mayeur et al. 2016). LF is produced by mucosal epithelial cells in several mammalian species including human, cow, sheep, camel and pig, and found in numerous mucosal secretions, such as tears, saliva, vaginal fluids, semen, nasal and bronchial secretions, bile, gastrointestinal fluids, urine, milk and colostrum (García-Montoya et al. 2012). In addition to the well-known role of LF against bacterial, parasitic and mycotic infections (Valenti and Antonini 2005; Rosa et al. 2017), this protein also possesses a potent antiviral activity against both enveloped and naked viruses, such as cytomegalovirus, herpes simplex virus, human immunodeficiency virus, human hepatitis viruses, influenza and those related to viral gastroenteritis (Berlutti et al. 2011).

The morbidity and mortality caused by viral gastroenteritis represent a major economic and public health burden, affecting mainly the poorest countries (Das et al. 2014). Group A rotaviruses are the leading cause of severe diarrhoeal diseases in infants and young children, being one of the top five causes of death worldwide across all age groups, and the second leading cause of death in children less than 5 years old (Marcotte and Hammarström 2016).

Group A rotaviruses are non-enveloped viruses with a genome composed of 11 segments of dsRNA that are enclosed in a three protein-layered capsid. The glycoprotein VP7 forms the outermost layer, from which spikes of protein VP4 protrude (Pesavento et al. 2006). Rotavirus cell entry has been suggested to be a multistep process involving the two viral surface proteins VP4 and VP7. Thus, the interaction of the viral protein VP4 (VP8 domain) with a sialylated cellular receptor mediates the initial binding of the infectious particle to the cell surface. In the post-binding steps, both VP4 (VP5 domain) and VP7 viral proteins interact with several cell surface molecules,

including integrins and gangliosides, which seem to act as cellular co-receptors that allow the virus to gain access into the cell (Isa et al. 2006).

The antiviral activity of LF has been proposed to be exerted by blocking heparan sulphate glycosaminoglycan (GAG) cell receptors, by direct binding to viral particles or by both mechanisms, thus preventing the entry of viruses into the host cell (Valenti and Antonini 2005). The antiviral activity of LF has been mostly suggested to occur in the early steps of infection, when the virus is interacting with the cell. However, some studies have pointed out that LF possesses a dual role, both in preventing rotavirus attachment to intestinal cells (activity linked to the N-terminal part of the protein responsible for GAG binding) and also inhibiting a not very well known intracellular post-adsorption step (Superti et al. 1997, 2001).

Several studies have indicated the importance of breastfeeding as a protective factor against rotavirus infection (Gianino et al. 2002; Asensi et al. 2006; Tino De Franco et al. 2013) and also the beneficial effects of LF oral administration against rotaviral gastroenteritis (Berlutti et al. 2011). Furthermore, diverse studies have demonstrated the antirotaviral activity of some milk derived fractions, such as whey, buttermilk and milk fat globule membrane (Bojsen et al. 2007; Parrón et al. 2016, 2017). In most of those studies, the antirotaviral activity exerted by human milk and dairy fractions was partially attributed to LF.

In order to guarantee the hygienic quality of human milk, a pasteurization process at 62.5 °C for 30 min (holder pasteurization, equivalent to low-temperature long-time pasteurization, LTLT) is currently applied in human milk banks (Arslanoglu et al. 2010). Thermal treatments are also applied in industrial milk and cheese making processes, as an essential treatment to provide acceptable products with respect to safety and shelf life (Holsinger et al. 1997). Typical heat treatments used in dairy industries are 63 °C for 30 min (LTLT pasteurization) and 72 °C for 20 s (high temperature-short time pasteurization, HTST). Several reports have shown that thermal treatments usually applied to human milk and dairy products may affect some of their components, thus weakening their nutritional and biological value. In this line, it has been proved that heat treatment of bovine and ovine milk fractions causes certain loss of their antirotaviral potential (Parrón et al. 2016, 2017). This loss of activity has been hypothetically attributed to structural

changes, such as denaturation and/or aggregation of the proteins with antirotaviral activity. Therefore, considering that there are few studies of this type, it is of great interest to achieve a deeper knowledge of the effect of thermal treatments on the bioactivity of milk components. This knowledge would allow the industry to design treatments that ensure microbiological safety of functional products, while retaining its nutritional and bioactive properties.

At this respect, high hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal treatment that is currently being studied as an alternative for milk processing. HHP treatment, which is applied within the range 300–700 MPa, can provide microbiological safety to food products, while causing lower degradation of proteins and vitamins and higher sensorial quality than other treatments (Chawla et al. 2011). Despite there are some studies describing the effect of HHP treatments on the content, structure and bioactivity of human and bovine milk LFs (Peila et al. 2017; Franco et al. 2018), to our knowledge there are no works focusing on the effect on their antirotaviral activity. Therefore, the main aim of the present study has been to evidence the antirotaviral potential of purified milk LF from different species: human, bovine, ovine, swine and camel, as well as of human recombinant LF, by measuring their capacity to inhibit the infection of MA104 cells by the bovine rotavirus WC3 strain. Likewise, we evaluated the effect of several thermal and HHP treatments on LF antirotaviral activity. The influence of iron saturation and enzymatic degradation of bovine LF on its antirotaviral activity was also studied.

## Materials and methods

### Chemicals

Bovine native LF (bLF) was kindly provided by Tatua Nutritionals Company (Morrinsville, New Zealand). Three types of recombinant human LF (rhLF) were also assayed. Two preparations obtained from rice, one in the holo form and the other in the AsIs form (As Isolated from rice), were kindly provided by Ventria Bioscience (Sacramento, CA, USA). Another preparation of rhLF, from *Aspergillus awamori*, was provided by Agenix (Houston, TX, USA).

Minimal essential medium (MEM), heat-inactivated fetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics (penicillin–streptomycin), and amphotericin B, were obtained from Gibco (Life Technologies Corporation, Paisley, UK). Specific antiserum against bovine rotavirus obtained in lamb was kindly donated by Dr. David Snodgrass from the Moredun Research Institute (Edinburgh, UK).

SP-Sepharose was purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Sephadex G-25, ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>), nitriloacetic acid disodium salt (NTA), trypsin from porcine pancreas type IX-S, pepsin from porcine gastric mucosa, microbial rennet from *Mucor miehei*, gelatin and donkey anti-sheep immunoglobulin antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Recombinant chymosin was purchased from Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark). Mini-Protean TGX gels of 10 and 4–20% polyacrylamide were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Pierce BCA Protein Assay Kit and Periodic Acid Schiff (PAS) Staining Kit were supplied by Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250 was purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany).

### Cells and rotavirus strains

Cell culture and rotavirus propagation have been performed following the procedures described in Parrón et al. (2016). The Rhesus monkey kidney cell line MA104 (ATCC CRL-2378) was used to propagate the bovine rotavirus WC3 strain (ATCC VR-2102). Cells were cultured in tissue culture flasks with MEM supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% antibiotics (100 Units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), 2 mM L-glutamine and 0.25 µg/mL amphotericin B. Rotavirus propagation was carried out by inoculating confluent cell monolayers with an aliquot of a virus suspension. Flasks were incubated at 37 °C until complete cytopathic effect was attained (1–3 days). When the cell monolayer was fully disrupted due to lysis, virus was harvested by three cycles of freezing at – 80 °C and thawing at 37 °C, and the cell lysate transferred into a 50 mL conical tube. After centrifugation at 300×g for 15 min at 4 °C to remove the cellular debris, clarified rotavirus suspension was titrated, aliquoted and stored

at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use in infectivity assays. The viral titer of the final rotavirus suspension was about  $7.76 \times 10^5$  Focus Forming Units (FFU)/mL, determined by indirect immunofluorescent staining of infected cells, as described previously (Arnold et al. 2009).

#### LF samples

Human milk samples were kindly donated by healthy mothers and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The Ethical Committee for Clinical Research of the Government of Aragón (CEICA) approved the study and all donors provided informed consent. Raw milk from sheep was provided by the dairy industry Villacorona (El Burgo de Ebro, Spain). Swine colostrum was obtained from breeding sows (3–6 deliveries) of a commercial pig farm by manual milking after administration of 5 UI oxytocin. Camel milk was obtained from dromedaries of a commercial farm in Aydin (Turkey) by automatic milking.

Milk was kept frozen ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) or in refrigeration ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), depending on the species, until LF isolation. Milk pH was controlled to ensure it was in the normal range values (6.6–6.8).

LFs from human (hLF), ovine (oLF), swine (sLF) and camel (cLF) milks were obtained by a chromatographic procedure previously described (Conesa et al. 2008b). Briefly, milk was skimmed by centrifugation at  $2500\times g$  for 30 min at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  and diluted 1:1 with 0.04 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4, containing 0.8 M NaCl and 0.04% (v/v) Tween 20. Then, milk was batchwise incubated with SP-Sepharose at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight. Afterwards, SP-Sepharose was packed into a column and the unbound proteins washed out with 0.02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4, containing 0.4 M NaCl and 0.02% (v/v) Tween 20. LF was further eluted with 0.02 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer, pH 7.4, containing 1 M NaCl, and further dialyzed against phosphate buffered saline (PBS) consisting of 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4.

#### Iron saturation of LF

The iron saturation of LF was estimated from the absorbance ratio between 465 and 280 nm, and that obtained for human, ovine, swine and camel native LFs was around 6, 17, 5 and 15%, respectively. bLF

was provided with a 10% iron saturation. As regards rhLFs, the iron saturation of the holo and AsIs forms from rice, and that from *A. awamori* were 80, 60 and 3%, respectively.

Native bLF was saturated with iron basically as described in Oria et al. (1995). In brief, the ferric nitrilotriacetate (FeNTA) solution was prepared as follows. Solutions of 20 mM ferric chloride ( $\text{FeCl}_3$ ) and 80 mM nitrilotriacetic acid disodium salt (NTA) were prepared in deionized water. Afterwards, equal volumes of these solutions were mixed. For this, the solution of  $\text{FeCl}_3$  was added dropwise to the stirring NTA solution, while maintaining the pH between 4.5 and 6 with 1 N NaOH. The final pH of the complex was around 5 and the Fe:NTA molar ratio was 1:4. To fully saturate native bLF, 3  $\mu\text{L}$  of FeNTA solution and 3  $\mu\text{L}$  of 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  buffer, pH 7.4, were added per mg of protein, and incubated for 24 h at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Subsequently, the iron-saturated bLF was subjected to Sephadex G-25 chromatography to remove unbound iron.

#### Preparation of LF solutions

The purity of all isolated and commercial LFs was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 10% polyacrylamide gels, which were PAS and Coomassie stained, according to standard procedures. It was observed in all cases a main band corresponding to a protein of about 78 kDa and purity higher than 90%, thus they were used without further purification.

The LF solutions were prepared in PBS, sterilized through a low-binding protein 0.22  $\mu\text{m}$  filter, and its protein concentration quantified by the BCA Protein Assay. The concentration of solutions was adjusted to 2, 1, 0.5, 0.25, 0.10, and 0.05 mg/mL.

#### Rotavirus infectivity assay

The in vitro infection assay employed in this study was previously described and validated according to international guidelines (Parrón et al. 2016). Briefly, MA104 cells were seeded into 96-well plates and incubated until confluence. Before inoculation, the virus suspension was activated with trypsin at 20 mg/mL for 1 h in a water bath at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , as a required step to make rotavirus particles infective (Arias et al. 1996). In order to evaluate their neutralizing activity,



appropriate dilutions of LF solutions were mixed (1:1) with trypsin activated rotavirus suspension and incubated for 1 h at 37 °C. The samples (50 µL/well) were then transferred into the 96-well cell culture plates and incubated for 1 h at 37 °C to achieve rotavirus adsorption. Before cell infection, plates were added with 100 µL/well of MEM containing 2 µg/mL trypsin and 2% heat-inactivated fetal serum, and after infection were incubated in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 16 h at 37 °C. Serum-free MEM and rotavirus suspension were included as negative and positive controls, respectively.

Afterwards, virus-infected cells were detected by immunofluorescence. Thus, cells were fixed by a mixture consisting of acetone:methanol:formalin (1:1:1) for 1 min at 4 °C, washed twice with PBS and incubated with bovine rotavirus-specific lamb antiserum (1:300 in PBS with 2% gelatin) at 37 °C overnight. After incubation, wells were washed twice with PBS and incubated with donkey anti-sheep immunoglobulin antiserum conjugated with FITC (1:300 in PBS with 2% gelatin) at 37 °C for 1 h. The infectivity percentages were determined by enumerating fluorescent foci (infected cells) in each well using a fluorescence microscope (Eclipse B400) with a FITC-compatible filter, by image analysis using the Zen lite 2012 software.

#### Enzymatic hydrolysis of bLF

Hydrolysis of bLF was achieved following the method described in Ripollés et al. (2015). A solution of native bLF was prepared at 50 mg/mL in ultrapure water and the pH adjusted to 3 with 0.1 N HCl. The enzymes used to obtain the hydrolysates were: pepsin from porcine gastric mucosa, microbial rennet from *Mucor miehei* and recombinant chymosin. Each enzyme was added at 3% (w/w) to bLF solutions, and the mixture further incubated at 37 °C for 4 h. Afterwards, hydrolysis was stopped by heating at 80 °C for 15 min, the pH adjusted to 7 with 0.1 N NaOH and the hydrolysate centrifuged at 16,000×g for 15 min to remove insoluble peptides. The supernatants obtained were lyophilized and stored at – 20 °C until use. Lyophilized hydrolysates were further reconstituted with PBS, analyzed by means of SDS-PAGE and tested at 5 and 20 mg/mL in the rotavirus infectivity assay.

#### Heat treatment of LF

Heat treatment procedure was in essence based on that previously used by Parrón et al. (2016). Aliquots of LF solutions (1 mL) were placed in sterile glass vials (7 mm outer diameter and 6 mm inner diameter) and heated in a thermostatic bath ( $\pm$  0.1 °C) at different temperatures and holding times: 63 °C for 30 min (low-temperature long-time pasteurization, LTLT), 75 °C for 20 s (high-temperature short-time pasteurization, HTST) or 10 min, and 85 °C for 20 s or 10 min, among others. Bovine native and iron-saturated forms, ovine, swine and camel LFs were treated at 1 mg/mL, while hLF was treated at 2 mg/mL. Temperature was monitored inside the samples with a digital thermometer. After heat treatment, the samples were cooled rapidly in an iced water bath and stored at – 20 °C until analysis. Heat-treated samples were analyzed by SDS-PAGE and by the rotavirus infectivity assay to evaluate the influence of thermal treatments on the antirotaviral activity of LF.

#### HHP treatment of LF

High pressure treatment procedure was based on that previously described by Mayayo et al. (2014). Aliquots of LF solutions (1 mL) were introduced into 2 mL sterile polyethylene bags. Bovine native and iron-saturated forms, ovine, swine and camel LFs were tested at 1 mg/mL and hLF at 2 mg/mL. After eliminating headspace, bags were heat-sealed and pressurised using a Stansted Fluid Power 11500 B (Stansted, Essex, United Kingdom) with a mixture of propylene glycol/water (70/30, v/v), as the pressure transmitting fluid. Pressure was raised to 400, 500 or 600 MPa and maintained at those values for 5, 10 and 15 min. The initial temperature of transmitting fluid and samples was equilibrated at 20 °C, and the approximate temperature increase was 3 °C per 100 MPa. HHP treated samples were kept at 4 °C until further analysis by SDS-PAGE and rotavirus infectivity assay to study the effect of HHP treatments on the antirotaviral activity of LF.

#### Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software, by using a Kolmogorov–

Smirnov normality test and a One-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

## Results and discussion

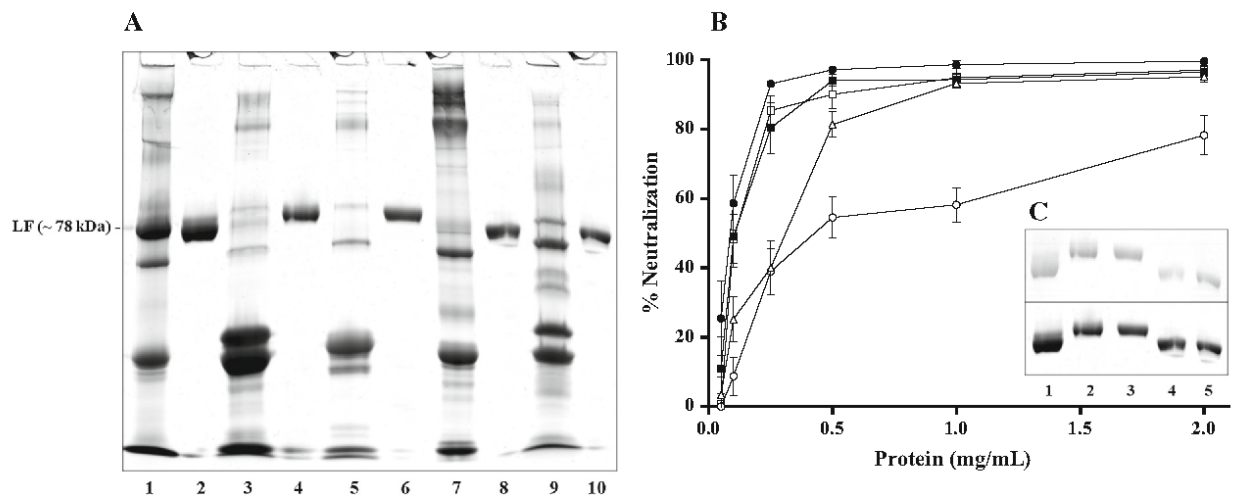
### Rotaviral neutralizing activity of LF

It is well known that milk composition varies widely in mammals due to many factors, such as environment, diet, life history, stage of lactation, and genetic factors. All these factors are responsible for the variations in milk components, what makes difficult to establish comparisons across species (Skibieli et al. 2013; Claeys et al. 2014). Furthermore, LF content in milk from mammalian species is not homogeneous. Thus, LF is the second most abundant whey protein in human milk, with a concentration of 1.5–4 mg/mL. By contrast, LF concentration in bovine milk ranges between 0.02 and 0.5 mg/mL, about 0.8 mg/mL in ovine milk, between 0.2 and 2 mg/mL in swine milk, and ranging 0.02–7.2 mg/mL in camel milk (Claeys et al. 2014; Karav et al. 2017). This variability in composition can be noted in Fig. 1a, in which clear differences in the protein profile of the mammalian milks analyzed in this study have been evidenced, the

band with the highest intensity corresponding to LF in human milk.

In the present study, LF was successfully isolated from human, sheep, pig and camel milk by using SP-Sepharose cation exchange chromatography. In all cases the chromatographic profile presented a similar pattern, with only one peak in the elution step with 1 M NaCl (data not shown), revealing a main band corresponding to a protein of about 78 kDa by SDS-PAGE (Fig. 1a). Since purity of isolated LFs was estimated to be higher than 90%, they were used without further purification for the different assays performed in this work.

Even though there are several studies showing the antiviral potential of milk components, they are mainly focused on human and bovine species (Peterson et al. 2013; O'Riordan et al. 2014), while studies on other species, such as ovine, camel or swine are very limited (El Agamy et al. 1992; El-Fakharany et al. 2013; Parrón et al. 2017). In addition to that, the studies of the antirotaviral activity of milk components have been mainly focused on immunoglobulins and milk fat globule membrane (MFGM) proteins, such as mucins and lactadherin (Kvistgaard et al. 2004; Asensi et al. 2006; Inagaki et al. 2010; Tino De Franco et al. 2013), and few works aimed at milk LF (Superti et al.



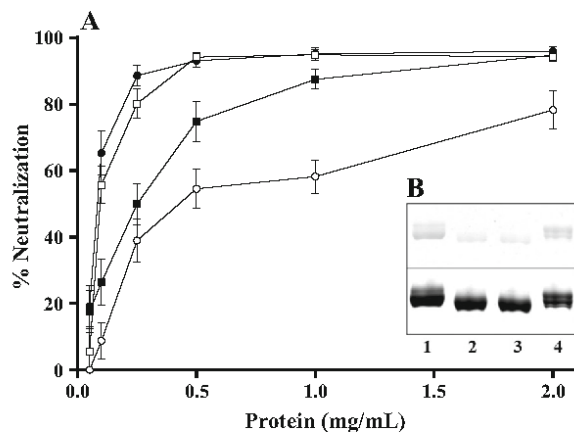
**Fig. 1** **a** Electrophoretic profile of native LF isolated from milk of several species. Lane 1, human milk; lane 2, human LF (hLF); lane 3, bovine milk; lane 4, bovine LF (bLF); lane 5, ovine milk; lane 6, ovine LF (oLF); lane 7, swine milk; lane 8, swine LF (sLF); lane 9, camel milk; lane 10, camel LF (cLF). SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 10% polyacrylamide gel. PAS + Coomassie staining. **b** Dose-response of native LF on neutralizing bovine rotavirus WC3 strain

infection of MA104 cells. (open circle) hLF; (filled circle) bLF; (open square) oLF; (filled square) sLF; (open triangle) cLF. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). **c** Comparative electrophoretic profile of LFs stained with PAS (above) or PAS + Coomassie (below). Lane 1, hLF; lane 2, bLF; lane 3, oLF; lane 4, sLF; lane 5, cLF

1997, 2001; Bojsen et al. 2007; Parrón et al. 2016). This fact underlines the interest of achieving further evidences of the potential and action mechanisms of different mammalian LFs against rotaviral infections.

In this study, native LFs isolated from several mammalian milks have been tested for their ability to inhibit bovine rotavirus WC3 strain infectivity on MA104 cells (Fig. 1b). Thus, bovine, ovine and swine LFs at 1 mg/mL showed rotavirus neutralizing values ranging 94.2–98.6%, with an  $IC_{50}$  of around 100  $\mu$ g/mL. Camel LF at 1 mg/mL exerted a similar neutralizing value of 93.1%, though with a higher  $IC_{50}$  near 400  $\mu$ g/mL. Furthermore, a significantly lower neutralizing value, of 58.2%, was obtained for native human LF at the same concentration, with an  $IC_{50}$  of approximately 500  $\mu$ g/mL.

With reference to the antirotaviral activity exerted by the recombinant human LFs (rhLF) tested (Fig. 2a), it is noteworthy that the three forms of rhLF showed remarkable higher activities than native hLF, with neutralizing values of 95.1, 94.8 and 87.5%, for rice holo rhLF, rice AsIs rhLF, and *A. awamori* rhLF, respectively, at a concentration of 1 mg/mL. This is also evident when comparing their  $IC_{50}$ , of 100  $\mu$ g/mL



**Fig. 2** a Dose–response of recombinant human LFs (rhLFs) on neutralizing bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. (Open circle) native hLF; (filled circle) rice holo rhLF; (open square) rice AsIs rhLF; (filled square) *Aspergillus awamori* rhLF. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). b Electrophoretic profile of rhLFs. Lane 1, native hLF; lane 2, rice holo rhLF; lane 3, rice AsIs rhLF; lane 4, *A. awamori* rhLF. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 10% polyacrylamide gel. PAS (above) and PAS + Coomassie staining (below)

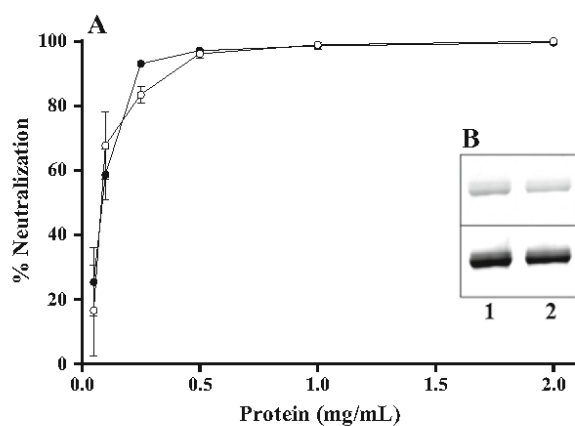
for holo and AsIs rhLF, and of 250  $\mu$ g/mL for *A. awamori* rhLF.

These results are in good accordance with those obtained in the studies by Superti et al. (1997, 2001), who found that bLF (both apo and holo forms) at 0.2 mg/mL inhibited from 75 to 85% the infectivity of the neuraminidase sensitive (NA-sensitive) simian rotavirus strain SA11 on HT-29 cells ( $IC_{50}$  46–50  $\mu$ g/mL). In addition to that, diverse authors suggested that LF and lactadherin, along with antirotavirus immunoglobulins, were responsible for the antirotaviral potential of human colostrum and milk (Asensi et al. 2006; Tino De Franco et al. 2013). In this line, some studies have also suggested that a daily intake of bLF-containing products (Egashira et al. 2007) or of an oral rehydration solution containing rhLF from rice, ameliorated the symptoms of rotaviral gastroenteritis in children. In contrast, other authors reported that bLF did not exert inhibitory activity against infection of MA104 and Caco-2 cells by several rotavirus strains, such as Wa (human), RRV (simian), YM (porcine), and RF (bovine) (Kvistgaard et al. 2004; Bojsen et al. 2007). The discrepancies among authors on the antirotaviral activity attributed to LF might be explained by differences in the neutralization protocols, the detection method of infection, the protein purification procedures, the cell lines, or the inoculation period used in the studies. At this respect, it is important to highlight that several studies have shown that rotavirus strains differ in their binding preferences towards glycans, particularly sialic acid (Prasad et al. 2014; Arias et al. 2016), which would probably explain the divergences in the results obtained.

Considering that glycosylation seems to be involved in receptor–ligand and host–pathogen interactions (Peterson et al. 2013; O’Riordan et al. 2014), differences in the neutralizing activity of LFs assayed in this work could be attributed to divergences in their glycosylation degree and microheterogeneity in the attached glycans. In fact, according to diverse authors, LFs from different origin have a high amino acid sequence homology, though each LF exhibits a unique glycosylation pattern (Karav et al. 2017; Figueroa-Lozano et al. 2018). This different glycosylation may be responsible for their specific biological properties. In this line, native and recombinant LFs showed different degree of glycosylation, since different intensity of their electrophoretic bands was observed after PAS staining (Figs. 1c, 2b). Despite this, no clear

correlation was observed between PAS staining of proteins and their corresponding antirotaviral activity, what could indicate that the type of glycans attached to LF has greater influence on its rotavirus neutralization capacity than its degree of glycosylation.

Diverse studies show that the conformation of LF changes with iron binding, and also that LF forms with different iron saturation levels have different activities (Conesa et al. 2008a; Wang et al. 2013). In this regard, we have evaluated the antirotaviral activity of iron-saturated bLF in comparison with that of native bLF (Fig. 3). As it can be observed, no statistically significant differences were evidenced between the activity of both LFs, which is in line with the study of Superti et al. (2001), who found that complete iron saturation of bLF did not modify its antirotaviral activity. Moreover, no relationship was observed between the iron saturation degree of LFs tested in this study and their corresponding antirotaviral activity. These observations could indicate that conformational changes in bLF upon iron saturation do not have any effect on its activity, not interfering in the attachment phase of virus infection (Siciliano et al. 1999). Furthermore, bLF has been suggested to possess a dual activity, by preventing the virus attachment to intestinal cells and by inhibiting infection at a post-attachment step (Superti et al. 2001).



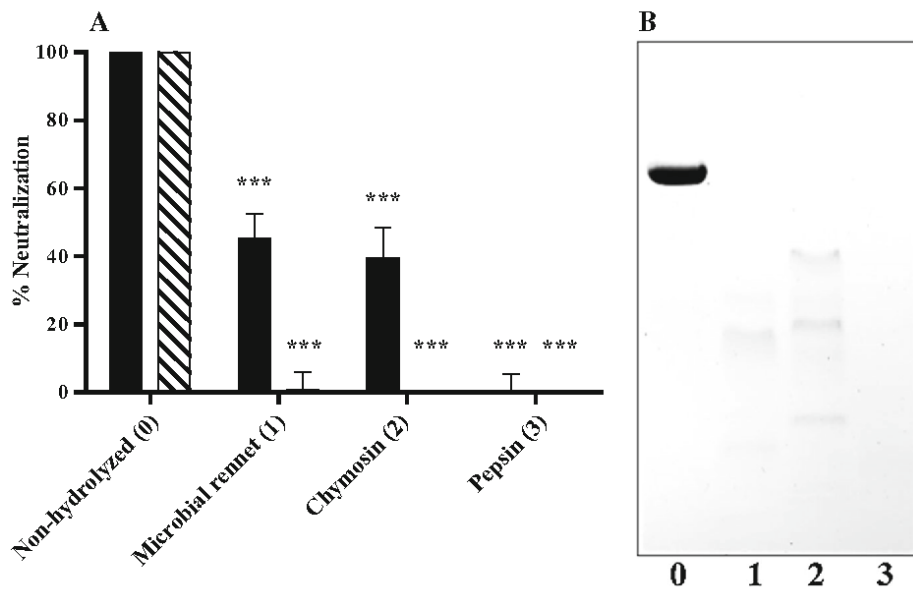
**Fig. 3** a Dose–response of bovine LF (bLF) with different iron saturation on neutralizing bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. (Open circle) iron-saturated bLF; (filled circle) native bLF. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). b Electrophoretic profile of native (lane 1) and iron-saturated bLF (lane 2). SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 10% polyacrylamide gel. PAS (above) and PAS + Coomassie staining (below)

The enzymatic hydrolysis of bLF caused a significant loss of its antirotaviral activity. In fact, as it can be observed in Fig. 4a, hydrolysis of bLF with microbial rennet or chymosin resulted in hydrolysates with a significantly lower antirotaviral activity in comparison with the non-hydrolysed bLF. When bLF was hydrolysed with pepsin, a complete loss of antirotaviral activity was evidenced (Fig. 4a), in line with the greater degradation shown in the SDS-PAGE profile of bLF treated with that enzyme (Fig. 4b).

At this respect, Superti et al. (2001) demonstrated that peptidic fragments obtained by tryptic digestion of bLF were able to inhibit simian rotavirus SA11 strain, though at lower extent than non-hydrolyzed protein. In a similar way, Siciliano et al. (1999) identified some fractions derived from the tryptic digestion of bLF that maintained its activity towards herpes simplex virus type 1, though to a lesser extent than the non-hydrolyzed form. Although LF susceptibility to digestion varies depending on its glycosylation (van Veen et al. 2004), the overall susceptibility of LF to gastrointestinal digestion is an important aspect to take into account as it might cause the loss of its bioactivity. Consequently, further studies focusing on this aspect and on the use of encapsulation techniques for the transport of bioactive compounds through the gastrointestinal tract, could be of great interest when considering oral application of LF in human or veterinary healthcare.

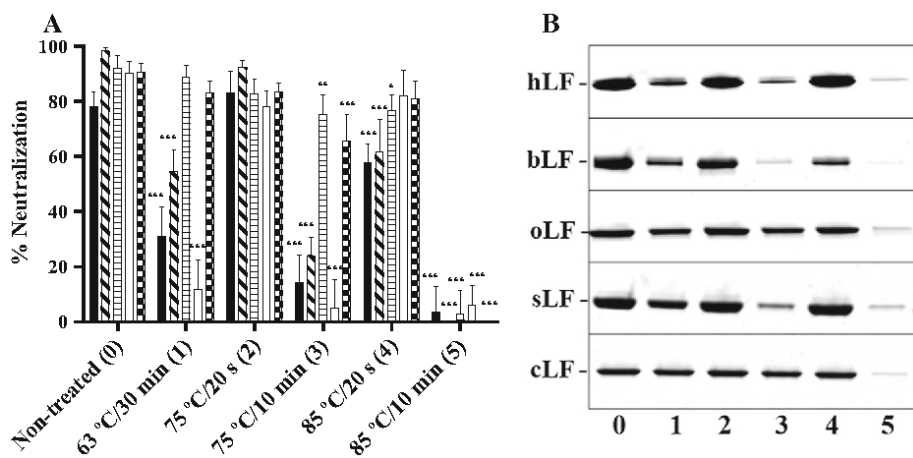
#### Effect of heat treatment on the antirotaviral activity of LF

Heat treatments of different intensity were applied to native LFs to assess their effect on its neutralizing activity against rotavirus WC3 (Fig. 5a). It was observed that even LTLT pasteurization (63 °C for 30 min) caused a significant decrease of the antirotaviral activity of human, bovine and swine LFs, of approximately 60, 44 and 87%, respectively. By contrast, that treatment did not cause a significant damage to ovine and camel LFs, which maintained 96 and 92% of their neutralizing activity, respectively. Interestingly, HTST pasteurization treatment (75 °C for 20 s) did not affect, in a significant manner, the antirotaviral capacity of LFs, with minor activity losses ranging 0–13%. Thermal treatments of increased intensity (75 °C for 10 min and 85 °C for 10 min) caused higher activity losses to all LFs. The



**Fig. 4 a** Effect of enzymatic degradation of native bovine LF (bLF) on its rotavirus WC3 strain neutralizing activity. bLF was hydrolysed with three different enzymes: microbial rennet, chymosin or pepsin. bLF hydrolysates were lyophilized, reconstituted and tested at 20 (■) and 5 (▨) mg/mL. Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate

statistically significant differences (\*\**p* < 0.001) respect to controls (non-hydrolyzed proteins). **b** Electrophoretic profile of native bLF degraded by enzymes. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 10% polyacrylamide gel. PAS + Coomassie staining. The lane number corresponds to the numbers in brackets as regards enzymatic treatments

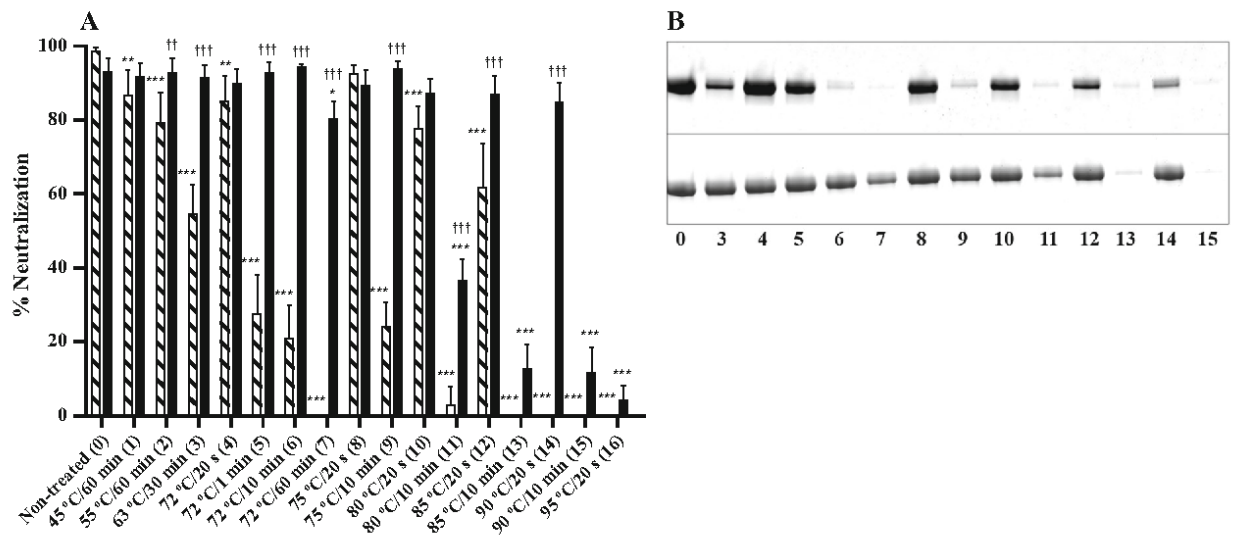


**Fig. 5 a** Effect of heat treatment on the neutralizing activity of native LFs against bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. Human LF (■); bovine LF (▨); ovine LF (▩); swine LF (□) and camel LF (▧). Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\**p* < 0.001; \*\**p* < 0.01; \**p* < 0.1) respect to

controls (non-treated proteins). Human LF (hLF) was treated at 2 mg/mL; bovine (bLF), ovine (oLF), swine (sLF), and camel (cLF) LFs were treated at 1 mg/mL. **b** Electrophoretic profile of heat treated native LFs. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The line number corresponds to the numbers in brackets as regards thermal treatments

electrophoretic profiles of heat treated LFs (Fig. 5b) clearly showed a decrease in the intensity of all the protein bands when increasing the treatment severity.

It can be observed in Fig. 6 the higher thermal resistance of iron-saturated bLF in comparison with the native form. In fact, the saturated form has shown



**Fig. 6** a Effect of heat treatment on the neutralizing activity of native (▨) and iron saturated (■) bovine LF (bLF) at 1 mg/mL against bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\* $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.1$ ) respect to controls (non-treated

proteins). Crosses indicate statistically significant differences ( $\dagger\dagger\dagger p < 0.001$ ;  $\dagger\dagger p < 0.01$ ) between iron-saturated and native bLF. b Electrophoretic profile of heat treated native (above) and saturated bLF (below). SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The line number corresponds to the numbers in brackets as regards thermal treatments

significant higher antirotaviral activity at most heat treatments (Fig. 6a), what correlates well with the corresponding electrophoretic profile (Fig. 6b). In this regard, it is important to take into account that the iron-saturated forms of LF present higher capacity to maintain its bioactivity upon pasteurization treatments than the native forms, what should be considered for functional applications of LF.

There are several references as regards the effect of thermal treatments on milk LF content and its bioactivity (Franco et al. 2018). Thus, different authors agreed that LTLT pasteurization of human milk may cause losses of LF levels, measured by its immunoreactivity, ranging from 57 to 80%, while HTST pasteurization affect LF to a lesser extent, leading to losses of 35–60% (Mayayo et al. 2014; Peila et al. 2016). These results agree with those obtained in the study of Sánchez et al. (1992), who reported that HTST pasteurization had practically no effect on LF immunoreactivity, while denaturation was observed after treatments at higher temperatures (81–85 °C).

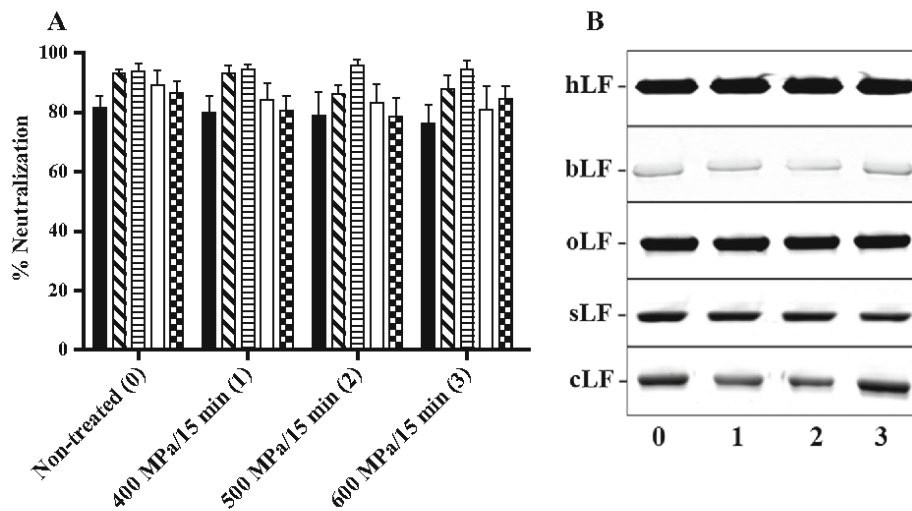
In view of the above results, it seems clear that HTST pasteurization is better than LTLT pasteurization in preserving the antirotaviral activity of LF from several mammalian milks, along with other

bioactivities. This knowledge could contribute to the optimization of milk processing techniques.

#### Effect of HHP treatment on the antirotaviral activity of LF

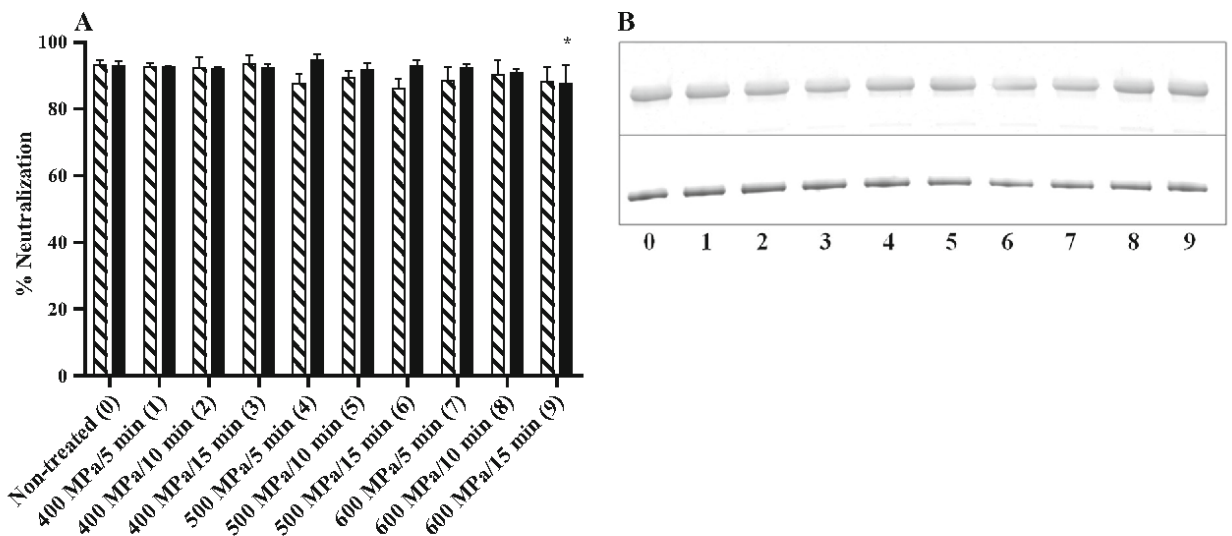
HHP treatments of different intensity were applied to native milk LFs in order to evaluate the effect on their rotaviral neutralizing activity (Fig. 7a). As it can be observed, none of the HHP treatments tested in this study affected significantly the neutralizing activity of LFs, in a similar way to that observed with HTST pasteurization. Thus, the highest HHP treatment, at 600 MPa for 15 min, led to a slight decrease of activity, in the range 0–9%, very close to the 0–13% decrease observed after HTST pasteurization, and significantly lower than that observed after LTLT pasteurization of human, bovine and swine LFs, that was of 60.1, 44.5 and 87.1%, respectively. The electrophoretic profile of HHP treated LFs (Fig. 7b) is in accordance with the corresponding neutralizing activity, since no change on the electrophoretic band intensity was observed.

The antirotaviral activity of iron-saturated bLF and of the native form after HHP treatment was not



**Fig. 7 a** Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of native LFs against bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. Human LF (■); bovine LF (▨); ovine LF (▩); swine LF (□) and camel LF (▧). Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). No statistically significant differences were observed in relation to controls (non-treated proteins).

Human LF (hLF) was treated at 2 mg/mL; bovine (bLF), ovine (oLF), swine (sLF) and camel (cLF) LFs were treated at 1 mg/mL. **b** Electrophoretic profile of HHP treated native LFs. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The line number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments



**Fig. 8 a** Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of the native (▨) and iron saturated (■) bovine LF (bLF) at 1 mg/mL against bovine rotavirus WC3 strain infection of MA104 cells. Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate statistically significant differences (\**p* < 0.1) respect to controls (non-treated proteins). No

statistically significant differences have been evidenced as regards influence of iron saturation on the antirotaviral activity of bLF. **b** Electrophoretic profile of native (above) and saturated (below) bLF after HHP treatment. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The line number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments

statistically different (Fig. 8a), which had a good relationship with the corresponding electrophoretic profile (Fig. 8b). These observations indicate that the

conformational changes of bLF molecule upon iron saturation do not have any influence neither on HHP treatment susceptibility nor on its antirotaviral activity.

Several studies have investigated the effect of HHP treatments on the content and immunoreactivity of milk LFs and also on its bioactivity, as it has been reported in the reviews by Peila et al. (2017) and Franco et al. (2018). Thus, Mayayo et al. (2014) observed that HHP treatment of human milk at pressures of 300, 400, 500 and 600 MPa for 15 min induced LF immunoreactivity losses of 9, 23, 34 and 48%, respectively, without LF aggregation. Mazri et al. (2012) evaluated the effect of HHP treatment on the immunoreactivity of bLF naturally present in skim milk and whey, and as isolated in phosphate buffer, over a pressure range from 450 to 700 MPa. They observed that the degree of bLF immunoreactivity loss increased with pressure and time of treatment, up to 75, 65 and 98% in milk, whey and buffer, respectively, after 600 MPa for 15 min.

The results obtained in this study demonstrate that LF presents a high antirotaviral activity, regardless of the origin. The different activity of LFs could be explained by structure and glycosylation interspecies differences. However, iron saturation of LF does not seem to modify its antirotaviral activity, though confers high resistance to thermal denaturation, thus avoiding the loss of antirotaviral activity. Furthermore, LTLT pasteurization, currently recommended in all international guidelines for human milk banks, has been proved to significantly decrease the antirotaviral activity of LFs from human, bovine and swine milk. By contrast, HTST pasteurization and HHP treatments have not been harmful to the antirotaviral potential of LF, regardless milk origin. Therefore, those treatments can be an alternative to LTLT pasteurization, especially for human milk and bLF supplemented products. Despite that, extensive research is required to ensure microbiological safety and biological activity of functional products subjected to non-thermal treatments, making them a reliable alternative to thermal treatments.

**Acknowledgements** The work described herein was supported by Spanish government under a FPU predoctoral grant and a CICYT project (AGL2010-20835), and by the European Social Fund.

## References

- Arias CF, Romero P, Alvarez V, López S (1996) Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J Virol* 70:5832–5839
- Arias CF, Silva-Ayala D, Isa P et al (2016) Rotavirus attachment, internalization, and vesicular traffic. In: Svensson L, Desselberger U, Greenberg HB, Estes MK (eds) *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp 103–119
- Arnold M, Patton JT, McDonald SM (2009) Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr Protoc Microbiol* 15:15C.3.1–15C.3.24
- Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P et al (2010) Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J Matern Neonatal Med* 23:1–20
- Asensi MT, Martínez-Costa C, Buesa J (2006) Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42:560–567
- Berlutti F, Pantanella F, Natalizi T et al (2011) Antiviral properties of lactoferrin: a natural immunity molecule. *Molecules* 16:6992–7018
- Bojsen A, Buesa J, Montava R et al (2007) Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *J Dairy Sci* 90:66–74
- Chawla R, Patil GR, Singh AK (2011) High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J Food Sci Technol* 48:260–268
- Claeys WL, Verraes C, Cardoen S et al (2014) Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42:188–201
- Conesa C, Rota MC, Pérez MD et al (2008a) Antimicrobial activity of recombinant human lactoferrin from *Aspergillus awamori*, human milk lactoferrin and their hydrolysates. *Eur Food Res Technol* 228:205–211
- Conesa C, Sánchez L, Rota C et al (2008b) Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comp Biochem Physiol* 150:131–139
- Das JK, Salam RA, Bhutta ZA (2014) Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Curr Opin Infect Dis* 27:451–458
- Egashira M, Takayanagi T, Moriuchi M, Moriuchi H (2007) Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatr* 96:1242–1244
- El Agamy ESI, Ruppner R, Ismail A et al (1992) Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. *J Dairy Res* 59:169–175
- El-Fakharany EM, Sánchez L, Al-Mehdar HA, Redwan EM (2013) Effectiveness of human, camel, bovine and sheep lactoferrin on the hepatitis C virus cellular infectivity: comparison study. *Virol J* 10:199–209
- Figuerola-Lozano S, Valk-Weeber RL, van Leeuwen SS et al (2018) Dietary N-glycans from bovine lactoferrin and TLR modulation. *Mol Nutr Food Res* 62:1–30
- Franco I, Pérez MD, Conesa C et al (2018) Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: an overview. *Food Res Int* 106:173–182
- García-Montoya IA, Cendón TS, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q (2012) Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim Biophys Acta* 1820:226–236
- Gianino P, Mastretta E, Longo P et al (2002) Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and



- asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J Hosp Infect* 50:13–17
- Holsinger VH, Rajkowski KT, Stabel JR (1997) Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev Sci Tech* 16:441–451
- Inagaki M, Yamamoto M, Uchida K et al (2010) In vitro and in vivo evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. *Biosci Biotechnol Biochem* 74:680–682
- Isa P, Arias CF, López S (2006) Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconj J* 23:27–37
- Karav S, German JB, Rouquié C et al (2017) Studying lactoferrin N-glycosylation. *Int J Mol Sci* 18:870–884
- Kvistgaard AS, Pallesen LT, Arias CF et al (2004) Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J Dairy Sci* 87:4088–4096
- Marcotte H, Hammarström L (2016) Immunodeficiencies: significance for gastrointestinal disease. In: Svensson L, Desselberger U, Greenberg HB, Estes MK (eds) *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis*. Academic Press, Kidlington, pp 47–72
- Mayayo C, Montserrat M, Ramos SJ et al (2014) Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *Int Dairy J* 39:246–252
- Mayeur S, Spahis S, Pouliot Y, Levy E (2016) Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 24:813–836
- Mazri C, Sánchez L, Ramos SJ et al (2012) Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine lactoferrin and lactoperoxidase. *J Dairy Sci* 95:549–557
- O’Riordan N, Kane M, Joshi L, Hickey RM (2014) Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* 24:220–236
- Oria R, Sánchez L, Houston T et al (1995) Effect of nitric oxide on expression of transferrin receptor and ferritin and on cellular iron metabolism in K562 human erythroleukemia cells. *Blood* 85:2962–2966
- Parrón JA, Ripollés D, Pérez MD et al (2016) Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey. *Int Dairy J* 60:78–85
- Parrón JA, Ripollés D, Pérez MD et al (2017) Antirotaviral activity of bovine and ovine dairy byproducts. *J Agric Food Chem* 65:4280–4288
- Peila C, Moro GE, Bertino E et al (2016) The Effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients* 8:477–496
- Peila C, Emmerik NE, Giribaldi M et al (2017) Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64:353–361
- Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BVV (2006) Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol* 309:189–219
- Peterson R, Cheah WY, Grinyer J, Packer N (2013) Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology* 23:1425–1438
- Prasad BVV, Shanker S, Hu L et al (2014) Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Curr Opin Virol* 7:119–127
- Ripollés D, Harouna S, Parrón JA et al (2015) Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int Dairy J* 45:15–22
- Rosa L, Cutone A, Lepanto MS et al (2017) Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *Int J Mol Sci* 18:1985–2011
- Sánchez L, Peiró JM, Castillo H et al (1992) Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *J Food Sci* 57:873–879
- Siciliano R, Rega B, Marchetti M et al (1999) Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *Biochem Biophys Res Commun* 264:19–23
- Skibiél AL, Downing LM, Orr TJ, Hood WR (2013) The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *J Anim Ecol* 82:1254–1264
- Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L (1997) Antitrotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol* 186:83–91
- Superti F, Siciliano R, Rega B et al (2001) Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim Biophys Acta* 1528:107–115
- Tino De Franco M, Vieira PD, Santos SMR et al (2013) Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatr Int Child Health* 33:102–109
- Valenti P, Antonini G (2005) Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol Life Sci* 62:2576–2587
- van Veen HA, Geerts MEJ, van Berkel PHC, Nuijens JH (2004) The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur J Biochem* 271:678–684
- Wang XY, Guo HY, Zhang W et al (2013) Effect of iron saturation level of lactoferrin on osteogenic activity in vitro and in vivo. *J Dairy Sci* 96:33–39



4.1.4. **Artículo 4.** Antirotaviral activity of bovine milk components: extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism

---





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)



## Antiviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism

José Antonio Parrón<sup>a</sup>, Daniel Ripollés<sup>a</sup>, Ana Cristina Sánchez<sup>b</sup>, María Dolores Pérez<sup>a</sup>, Miguel Calvo<sup>a</sup>, Susana López<sup>b</sup>, Carlos Federico Arias<sup>b,\*</sup>, Lourdes Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza/CITA, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Instituto de Biotecnología, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Bovine milk  
Rotaviral strains  
Antiviral activity  
Reassortant rotaviruses

### ABSTRACT

The viral gastroenteritis mediated by rotavirus remains a major health problem, causing significant infant morbidity and mortality, and health care costs worldwide. Diverse studies have indicated that some milk-derived fractions exhibit antiviral activity, associated to proteins such as immunoglobulins, lactoferrin, mucins, and lactadherin. Nevertheless, further studies are needed to enable greater understanding of the interaction mechanisms involving rotaviruses, host cells, and neutralizing agents. Our results demonstrate that bovine milk is a source of antiviral compounds against a wide range of strains. The neutralizing activity of milk fractions was found to be directed to the spike protein VP4, while the purified milk proteins inhibited through interaction with either VP4 and/or VP7. The present results highlight the huge potential of bovine milk components for their inclusion in functional foods to control rotavirus diarrhea.

### 1. Introduction

The morbidity and mortality caused by viral gastroenteritis represent a major economic and public health burden, affecting mainly the poorest countries (Das, Salam, & Bhutta, 2014). Group A rotaviruses are the leading cause of severe diarrheal disease in infants and young children, being one of the top five causes of death worldwide across all age groups, and the second leading cause of death in children less than 5 years old (Marcotte & Hammarström, 2016).

The introduction of oral rotavirus vaccines has significantly reduced the incidence of the disease, especially in developed countries (Payne et al., 2013). However, these vaccines are scarcely used in lower income countries, leaving between a third to a half of children unprotected from severe rotavirus disease (Babji & Kang, 2012). In addition, they have shown a lower efficacy in countries with a high burden of diarrheal disease (Babji & Kang, 2012; Glass, Parashar, Patel, Gentsch, & Jiang, 2014), where they are needed most, so the impact of vaccine use on global estimates of rotavirus mortality has been limited (Tate,

Burton, Boschi-Pinto, & Parashar, 2016). Furthermore, due to diverse hindrances regarding the availability of vaccines, contraindications in immunodeficient patients, and suboptimal use of therapeutic oral rehydration solutions (Binder, Brown, Ramakrishna, & Young, 2014; Gaspar, Hammarström, Mahlaoui, Borte, & Borte, 2014), the need for development of effective alternative approaches to prevent and control rotaviral gastroenteritis disease still remains.

Group A rotaviruses are non-enveloped viruses with a genome composed of 11 segments of dsRNA that are enclosed in a capsid consisting of three concentric protein layers. The outermost layer of the viral particle is composed of 260 trimers of the glycoprotein VP7 forming a smooth surface from which 60 trimeric spikes of VP4 protrude (Pesavento, Crawford, Estes, & Prasad, 2006). These viruses are classified into G- and P-types based on genetic and antigenic diversity of the two outer capsid proteins, VP7 (G-serotypes or genotypes) and VP4 (P-serotypes or genotypes), respectively. To date, 27 different G- and 37P-genotypes have been described in both humans and animals (Trojnar et al., 2013). The majority of the viruses infecting humans

*Abbreviations:* SA, sialic acid; NA, neuraminidase; TLPs, triple-layered particles; SC, serocolostrum; BM, buttermilk; BS, butter serum; MFGM, milk fat globule membrane; WPC, whey protein concentrate; IgG, immunoglobulin G; LF, lactoferrin; MUCs, mucins; LDH, lactadherin; XDH/XO, xanthine dehydrogenase/oxidase;  $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulin;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumin; BSA, bovine serum albumin; CN, caseins; BTN, butyrophilin; PBS, phosphate buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

\* Corresponding authors.

E-mail address: [lousanchez@unizar.es](mailto:lousanchez@unizar.es) (L. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.002>

Received 20 November 2017; Received in revised form 22 January 2018; Accepted 2 March 2018  
1756-4646/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

belong to G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8], and G12P[8] types (Bányai et al., 2012). With regard to bovine rotaviruses, at least nine G serotypes (G1-4, 6–8, 10, 11) and three P genotypes (P1, P5, and P11) have been found so far, but G6, G10, P[5], and P[11] have been reported to be the predominant G and P types, with G6P[11] being the most frequent combination (Alkan et al., 2010; Suocheng, Zhuandi, Tuanjie, Ayimu, & Fengling, 2013).

It has been shown that rotavirus cell entry is a multistep process involving the two virus surface proteins. The binding of the infectious particle to the cell surface is mediated by the initial interaction of the VP8 domain of the protein VP4 with a sialylated cellular receptor. In the post-binding steps, the VP5 domain of VP4 and the glycoprotein VP7 interact with several cell surface molecules, including integrins, the heat shock cognate 70 protein and gangliosides, which have been proposed to function as cellular co-receptors that allow the virus to gain access into the cell (Isa, Arias, & López, 2006).

A critical step in the rotavirus infection is the virus cell attachment. A variety of studies have shown that rotavirus strains differ in their binding preferences for host cell surface glycans, particularly for sialic acid (SA)-containing receptors (Arias, Silva-Ayala, Isa, Díaz-Salinas, & López, 2016; Prasad et al., 2014; Yu & Blanchard, 2014). The cell binding, and thus the infectivity, of some animal rotavirus strains is reduced after removing SA from the cell surface by neuraminidase (NA) treatment, leading to their classification as NA-sensitive strains. In contrast, other animal and most of human rotavirus strains are classified as NA-resistant, since their binding to cells and infectivity are not affected by the NA treatment. Despite these observations, the role of glycans in rotavirus infection is not fully understood. A better understanding of the binding of rotavirus to host cells is critical for the successful development of potential therapeutic strategies against rotavirus diarrhoea.

Several carbohydrate-based compounds have been identified as rotavirus inhibitors (Isa et al., 2006; Kiefel & Itzstein, 2003). Regarding food-derived components, *in vitro* and *in vivo* experiments have attributed antirotaviral activity to an oligosaccharide-enriched fraction and glycoproteins from egg (Koketsu et al., 1995), as well as to several natural extracts, essential oils, and juicy preparations from vegetal origin (Rajiv et al., 2016). Furthermore, diverse studies have demonstrated the antirotaviral activity of some milk-derived fractions, such as whey, buttermilk (BM), and milk fat globule membrane (MFGM), being a suitable source of free and conjugated glycans (O'Riordan, Kane, Joshi, & Hickey, 2014; Ross, Lane, Kilcoyne, Joshi, & Hickey, 2015). This activity of the milk fractions was mainly associated with defensive bioactive glycoproteins, such as immunoglobulins, lactoferrin, mucins, lactadherin and lactophorin (Parrón et al., 2016, 2017). Some lipidic components, such as sialyl-sphingolipids and triglycerides associated with MFGM, have also been involved in their antirotaviral activity (Fuller, Kuhlenschmidt, Kuhlenschmidt, Jiménez-Flores, & Donovan, 2013).

There are very few reports addressing the mechanism of neutralizing activity of food compounds against the infectivity of different rotavirus strains. In this work, we evaluated the potential of several bovine milk fractions, including dairy by-products and isolated proteins, for neutralizing a wide range of rotavirus strains from bovine (UK, WC3, B223, NCDV), monkey (RRV), and human origin (Wa), belonging to different P and G serotypes, and having different sensitivities to NA treatment. Furthermore, we investigated the mechanism through which the milk fractions and proteins interfere with the rotaviral infectious process by employing reassortant UK x RRV viruses.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and rotavirus strains

The rhesus monkey epithelial cell line MA104 (ATCC CRL-2378) was used to propagate the different rotavirus strains. Cells were grown

**Table 1**  
Characteristics of the rotavirus strains used in this work.<sup>a</sup>

Rotavirus strain	Origin	G and P serotypes	NA sensitivity
RRV	Simian	G3P[3]	+
UK	Bovine	G6P[5]	–
WC3	Bovine	G6P[5]	–
B223	Bovine	G10P[11]	–
NCDV	Bovine	G6P[1]	+
Wa	Human	G1P[8]	–

<sup>a</sup> The characteristics of the rotavirus strains are from Isa et al. (2006).

in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)-reduced serum (Thermo Scientific HyClone, Logan, UT) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

Bovine rotavirus NCDV was obtained from D.R. Snodgrass (Moredun Research Institute, Edinburgh, UK); bovine rotavirus WC3 was purchased from ATCC (VR-2102), bovine rotaviruses B223 and UK, and the Rhesus RRV, as well as the UK × RRV reassortants used were donated by Y. Hoshino (National Institute of Health, Bethesda, MD); human Wa rotavirus strain was obtained from H.B. Greenberg (Stanford University, Stanford, CA). The characteristics of the rotavirus strains are listed in Table 1. All rotavirus strains were propagated as previously described (Pando, Isa, Arias, & López, 2002). Rotavirus cell lysates were activated with trypsin (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA) at 10 µg/mL for 30 min at 37 °C.

### 2.2. Antibodies, reagents and commercial dairy products

Rabbit anti-TLPs polyclonal serum was produced in our laboratory as described in Zárate et al. (2000). Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody was purchased from PerkinElmer Life Sciences (Waltham, MA).

Chymosin was provided by Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark). Ammonium sulphate and trichloroacetic acid were from Panreac (Barcelona, Spain). Q-Sepharose, DEAE-Sepharose, CM-Sepharose, Sephacryl S300, Sephacryl S200 and Concanavalin A agarose were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Sephadex G-75 was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Three powdered commercial dairy co-products were studied; including whey protein concentrate (WPC), butter serum (BS) and buttermilk (BM) powders. WPC was produced by microfiltration (0.1–0.2 µm) of whey from commercial cheese production and spray-drying of retentate. BS was derived from the process of obtaining anhydrous milk fat. Briefly, raw bovine milk was pasteurized at 72 °C for 15 s, skimmed and cream concentrated by centrifugation giving a 75% fat fraction that was homogenized, subjected to phase inversion and concentrated to a 99% fat content, obtaining an aqueous fraction herein termed commercial BS. BM was obtained during butter manufacture as follows: raw bovine milk was pasteurized at 72 °C for 15 s, skimmed and the cream subjected to churning to obtain butter and BM. All co-products were spray-dried into powders. Bovine lactoferrin (LF) was kindly provided by Tatua Nutritionals Company (Morrinsville, New Zealand) with an iron-saturation below 10%.

### 2.3. Obtaining milk fractions

Colostrum from the first milking was obtained from healthy cows (Tauste Ganadera, Tauste, Spain) and skimmed by centrifugation at 2000g for 15 min at 4 °C. Serocolostrum (SC) was obtained after enzymatic coagulation of caseins with chymosin at 35 °C for 45 min and separation by centrifugation at 2000g for 15 min. Raw bovine milk was provided by the dairy industry Villacorona (El Burgo de Ebro, Spain), and skimmed as described above. Whey fraction was achieved by coagulation with chymosin and further recovered by decanting and filtering through glass wool.

Furthermore, BM and BS were obtained from raw bovine milk essentially as previously described (Parrón et al., 2017). Raw bovine milk was provided by the dairy industry Villacorona and skimmed using a cream separator. Cream was then washed twice with washing buffer (2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14 M NaCl, 3 mM KCl, pH 7.2, 1 mM EDTA) and centrifuged at 2800g for 15 min at 4 °C. The washed cream was stored at 4 °C overnight and churned into butter, obtaining BM that was collected and filtered through several layers of cheese-cloth. Butter was melted at 50 °C for 10 min, and centrifuged at 4000g for 10 min into BS and butter oil. The MFGM fraction was obtained as described by Hvarregaard, Andersen, Berglund, Rasmussen, and Petersen (1996), through precipitation from BM by lowering the pH to 4.65 and centrifugation at 17000g for 75 min at 4 °C. All fractions of interest were freeze-dried and stored at –20 °C until further analysis.

#### 2.4. Obtaining purified proteins

Bovine immunoglobulins G (IgG) were isolated, according to Mainer, Sánchez, Ena, & Calvo (1997), by means of precipitation with ammonium sulfate followed by DEAE-Sepharose chromatography. A fraction enriched in bovine mucin 1 (MUC1) and 15 (MUC15) was obtained as described by Pallesen et al. (2001), by ion-exchange chromatography on a CM-Sepharose column coupled by DEAE-Sepharose column. Bovine xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO) was obtained as described by Berglund, Rasmussen, Andersen, Rasmussen, & Petersen (1996), through treatment of buttermilk with cold butanol and ammonium sulphate precipitation, followed by anion-exchange chromatography on Q-Sepharose and gel-filtration on Sephacryl S300. Bovine lactadherin (LDH) was isolated following the procedure of Kim, Kanno, & Mizokami (1992) through gel-filtration on Sephacryl S200 and affinity chromatography on Concanavalin A agarose. Bovine lactophorin (PP3) was isolated according to Sørensen & Petersen (1993), using Sephadex G-75 gel chromatography and Q-Sepharose ion-exchange chromatography of crude proteose peptone, obtained essentially after heat treatment (90 °C for 30 min) of skim milk, followed by acidification at pH 4.6 and addition of trichloroacetic acid.

#### 2.5. Infectivity and neutralization assays

The *in vitro* infection assays were performed as previously described by Arias, Lizano, and López (1987). The multiplicity of infection (MOI) used in the neutralization assays was the same for each strain (MOI = 0.02), giving approximately 1000 infected cells per well, of a 96-well plate, in the positive controls (without neutralizing agent). The newly synthesized viral antigens were clearly detected at 16 h post-infection.

Appropriate dilutions of neutralizing milk fractions in phosphate buffered saline (PBS, consisting of 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, pH 8.5) were mixed (1:1) with the corresponding trypsin-activated rotavirus strain and incubated for 1 h at 37 °C. Then, the mixtures were used to infect confluent cell monolayers grown on 96-well tissue culture plates. After 1 h of adsorption at 37 °C the inoculum was removed and the cells were washed once with PBS and incubated with DMEM at 37 °C for 16 h. The cells were washed with PBS and fixed for 30 min with 80% (v/v) acetone in PBS. The infected cells were detected using an immunoperoxidase focus staining assay, basically as previously stated (Arias et al., 1987).

To investigate the mechanism of the different neutralizing dairy fractions, we used UK x RRV rotavirus reassortants having different combinations of the capsid proteins VP4 and VP7 as is shown in Table 2 (Díaz-Salinas et al., 2013).

#### 2.6. SDS-PAGE and Western-blotting

Protein profiles of the different milk fractions and isolates were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**Table 2**

Capsid proteins of UK x RRV reassortants employed in this study.

Virus	Origin of virus capsid proteins <sup>a</sup>					
	VP1	VP2	VP3	VP6	VP7	VP4
UK	U	U	U	U	U	U
RRV	R	R	R	R	R	R
UK × RRV Reassortants						
19-1-1 <sup>b</sup>	R	R	R	R	R	U
85-2 <sup>b</sup>	U	R	R	R	U	R

<sup>a</sup> U, the protein is of UK origin; R, the protein is of RRV origin.

<sup>b</sup> Original reported names of the reassortant viruses (Díaz-Salinas et al., 2013).

(SDS-PAGE) using 4–20% polyacrylamide gels (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The gels were stained with Periodic Acid Schiff (PAS) and Coomassie, according to standard procedures. Western-blotting procedure was performed to confirm the protein identity, in essence as described by Benfeldt, Larsen, Rasmussen, Andreassen, & Petersen (1995).

#### 2.7. Compositional analysis

The protein, lipid, and lactose content of bovine milk fractions were determined by infrared spectroscopy using a MilkoScan 4000 (Foss Electric, Hilleroed, Denmark). The fractions that had been freeze-dried after having been obtained from milk were reconstituted at 10% (w/v) with distilled water prior to compositional analysis.

#### 2.8. Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software, by using a Kolmogorov-Smirnov normality test and a One-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterization of bovine milk fractions and proteins

In the present study, the protein profile and overall composition of several bovine milk-derived fractions were analysed by SDS-PAGE and infrared spectroscopy, respectively (Fig. 1). The high efficacy of the purification procedures employed to isolate IgG, LF, MUCs, LDH, XDH/XO, and PP3 was confirmed by SDS-PAGE (Fig. 1), and the identity of the proteins was verified by Western-blotting using specific antibodies (data not shown).

The protein and lipid composition varied considerably among the different milk fractions. Thus, as shown in Fig. 1B, the lyophilized bovine whey presented percentages of protein, lipid, and lactose of 13, 1, and 68% (w/w), respectively, in agreement with Yadav et al. (2015). Furthermore, the electrophoretic protein profile obtained for whey follows the characteristic pattern, with the major proteins β-lactoglobulin (β-LG), α-lactalbumin (α-LA), immunoglobulins (Igs), bovine serum albumin (BSA), and LF. With regard to bovine SC, the estimated composition was 40% (w/w) of protein, 1% (w/w) of lipids, and 26% (w/w) of lactose. Its protein profile revealed a similar pattern to that of whey, with an evident higher content of Igs, LF, and BSA, in agreement with data reported previously (McGrath, Fox, McSweeney, & Kelly, 2016).

When analyzing the composition of fractions derived from cream, in particular BM, BS, and MFGM, a high lipid content was observed in all samples, of 16, 42, and 68% (w/w), respectively, in agreement with previous reports (Britten, Lamothe, & Robitaille, 2008; Vandergheem et al., 2010). Furthermore, even though those fractions presented similar protein content (in the range of 24–28%), some differences were observed in their electrophoretic profiles (Fig. 1). In this regard, the

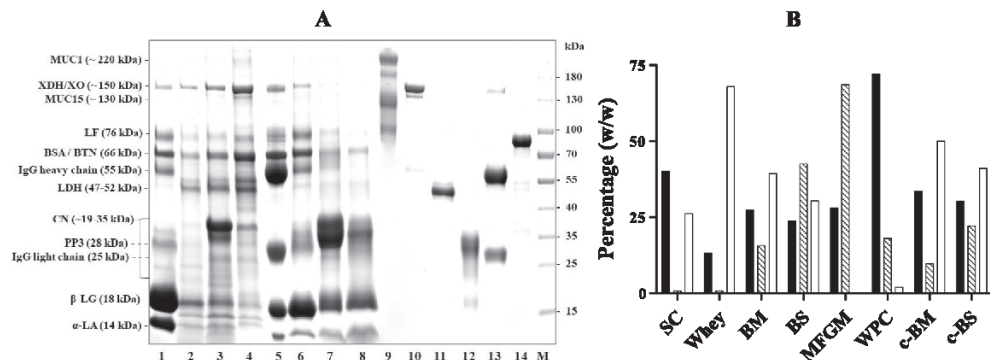


Fig. 1. (A) Electrophoretic profile of bovine milk samples. Lane 1: whey; lane 2: buttermilk (BM); lane 3: butter serum (BS); lane 4: milk fat globule membrane (MFGM); lane 5: serocolostrum (SC); lane 6: whey protein concentrate (WPC); lane 7: commercial BM (c-BM); lane 8: commercial BS (c-BS); lane 9: mucin enriched fraction (MUCs); lane 10: xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO); lane 11: lactadherin (LDH); lane 12: lactophorin (PP3); lane 13: immunoglobulin G (IgG); lane 14: lactoferrin (LF); M: molecular weight marker. SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining. (B) Compositional analysis by infrared spectroscopy of the different dairy products tested in this study expressed as weight percentage (w/w): black bars, protein; slashed bars, lipid; white bars, lactose.

MFGM fraction presented the characteristic profile of membrane proteins which are butyrophilin (BTN), LDH, XDH/XO, MUC15, MUC1, and PP3, as reported elsewhere (O’Riordan et al., 2014; Ross et al., 2015). Moreover, BM and BS contained other milk proteins, such as caseins (CN),  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, and LF, in addition to the MFGM proteins, which is in agreement with previous studies that reported a composition for bovine BM of 59% CN, 23% serum proteins, and 19% MFGM proteins (Britten et al., 2008).

With respect to the commercial products evaluated in the present study, it is noteworthy that bovine WPC presented, according to manufacturers, 72% (w/w) of protein content, MFGM representing 8% of total protein (including 1.4% MUC1, 1% LDH),  $\beta$ -LG (32%),  $\alpha$ -LA (6%), IgG (6%), BSA (4%), and LF (1.5%), what is in accordance with the electrophoretic pattern shown in Fig. 1. Commercial BM and BS showed higher protein content (34 and 30%, respectively) and lower lipid content (10 and 22%, respectively) than the BM and BS fractions prepared in our laboratory, what may be explained by the use of different isolation procedures. In fact, a higher content of CN,  $\beta$ -LG, and  $\alpha$ -LA was evidenced in the commercial fractions.

Besides the overall composition of the bovine milk-fractions described above, it is important to consider the role of glycans in receptor-ligand and host-pathogen interactions (O’Riordan et al., 2014). In fact, it is generally accepted that many rotavirus strains bind to either terminal or subterminal sialic acid residues in glycoconjugates, although neutral glycans have also been reported to be recognized by human rotaviruses (Isa et al., 2006; Yu & Blanchard, 2014). In this regard, bovine milk and its derived fractions represent a good source of glycosylated compounds, mainly lactose, free oligosaccharides, glycolipids, and glycoproteins. It has been reported a higher proportion of sialylated compounds in bovine colostrum in comparison with transitional and mature milk (Takimori et al., 2011). Furthermore, a different degree and type of glycosylation has been documented for bovine milk proteins (O’Riordan et al., 2014; Ross et al., 2015).

### 3.2. Rotavirus neutralization activity of milk fractions

The bovine milk fractions were tested for their ability to reduce the infectivity of different rotavirus strains in MA104 cells, using an immunoperoxidase focus reduction assay (Fig. 2). Notable differences of virus neutralization activity were observed depending on the milk fractions and rotavirus strains evaluated. Thus, bovine SC neutralized efficiently all rotavirus strains, with neutralization percentages ranging from 54 to 100%, even at 0.03 mg of protein/mL. With respect to whey and WPC, a similar trend for neutralizing capacity was evidenced. In fact, at 1 mg of protein/mL both fractions exerted antirotaviral

neutralizing activity ranging from 72 to 100% for all strains. With regard to the cream derived fractions, BM, BS, and MFGM, an overall lower antirotaviral activity was observed in comparison to the SC and whey preparations. Thereby, it was necessary to increase the concentration of BM and BS to 2 mg of protein/mL to obtain a similar antirotaviral activity, with neutralizing values of 74–96% for RRV and NCDV strains, respectively, and 17–67% inhibition for the rest of strains. The MFGM fraction at the same protein concentration (2 mg/mL) showed a neutralizing activity for RRV and NCDV strains comparable to that of BM and BS, of 94 and 91%, respectively. However, the MFGM fraction exerted a lower activity against the other strains (up to 30% neutralization at 2 mg of protein/mL). Furthermore, both commercial BM and BS showed no neutralizing capacity even at 4 mg of protein/mL for most rotavirus strains, what may be related to the loss of bioactivity during pasteurization (Parrón et al., 2017). The only exception was the NCDV strain that was neutralized by commercial BM and BS to an extent similar to the other milk fractions evaluated.

It is interesting to observe the similar activity achieved for most fractions when neutralizing the bovine rotavirus UK and WC3 strains, although at different concentrations. Thus, SC at 0.03 mg of protein/mL blocked the infectivity of these two strains by 96–100%, whey and WPC at 1 mg of protein/mL neutralized 71–83%, and the cream derived fractions, at 2 mg of protein/mL inhibited 20–40% the virus infectivity. These comparable results most probably reflect the fact that WC3 and UK strains share the G6P[5] serotype.

On the other hand, notable differences were observed when comparing the neutralizing profiles of NA-sensitive strains (RRV and NCDV) with those of NA-resistant viruses (WC3, UK, B223 and Wa). The two NA-sensitive strains showed an overall higher susceptibility to neutralization by the bovine milk fractions. The simian rotavirus RRV (G3P [3]) was more efficiently neutralized than the NA-resistant strains, being neutralized more than 82% by bovine SC at 0.03 mg of protein/mL and between 74 and 100% by whey and cream derived fractions at 2 mg of protein/mL. The neutralization activity of the different milk fractions on NCDV (G6P[1]) was even more striking; bovine SC neutralized 100% of the virus infectivity at 0.01 mg of protein/mL, and the other milk fractions, including the commercial BM and BS, inhibited its infectivity from 82 to 91% at 0.5 mg protein/mL.

Altogether, the results in Fig. 2 show that the antirotaviral activity exerted by bovine milk fractions is mainly associated to the whey components of milk and colostrum, rather than to the cream derived fractions, what is consistent with our previous results (Parrón et al., 2016, 2017). On the other hand, the different susceptibility of the rotavirus strains evaluated can be explained, among other factors, because they belong to G and P serotypes and to either of the groups with



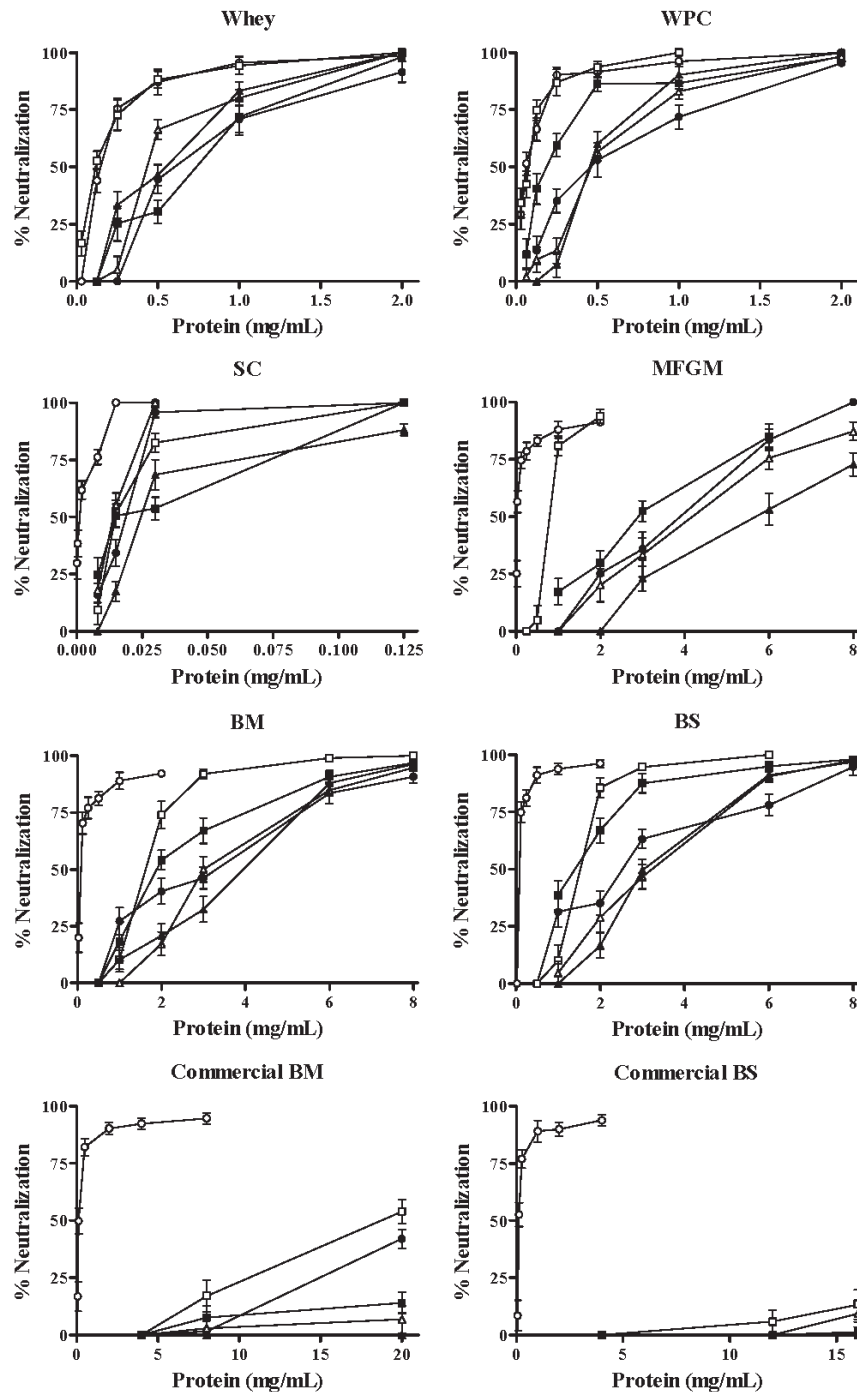


Fig. 2. Dose-response of bovine milk fractions on neutralizing rotaviral strains infectivity of MA104 cells. NCDV (white circles); UK (black circles); RRV (white squares); Wa (black squares); WC3 (white triangles); B223 (black triangles). Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of duplicates from two independent experiments ( $n = 4$ ). WPC, whey protein concentrate; SC, serocolostrum; MFGM, milk fat globule membrane; BM, buttermilk; BS, butter serum.

different NA-sensitivity.

### 3.3. Rotavirus neutralization activity of milk purified proteins

In this work, we also evaluated the capacity of several proteins

purified from bovine milk to neutralize the infectivity of different rotavirus strains (Fig. 3). The IgG preparation showed the highest rotavirus neutralizing activity, with NCDV, RRV, UK, and WC3 being the viruses more susceptible to neutralization (inhibition of infectivity ranging between 94 and 100% at 0.1 mg of IgG/mL); the infectivity of

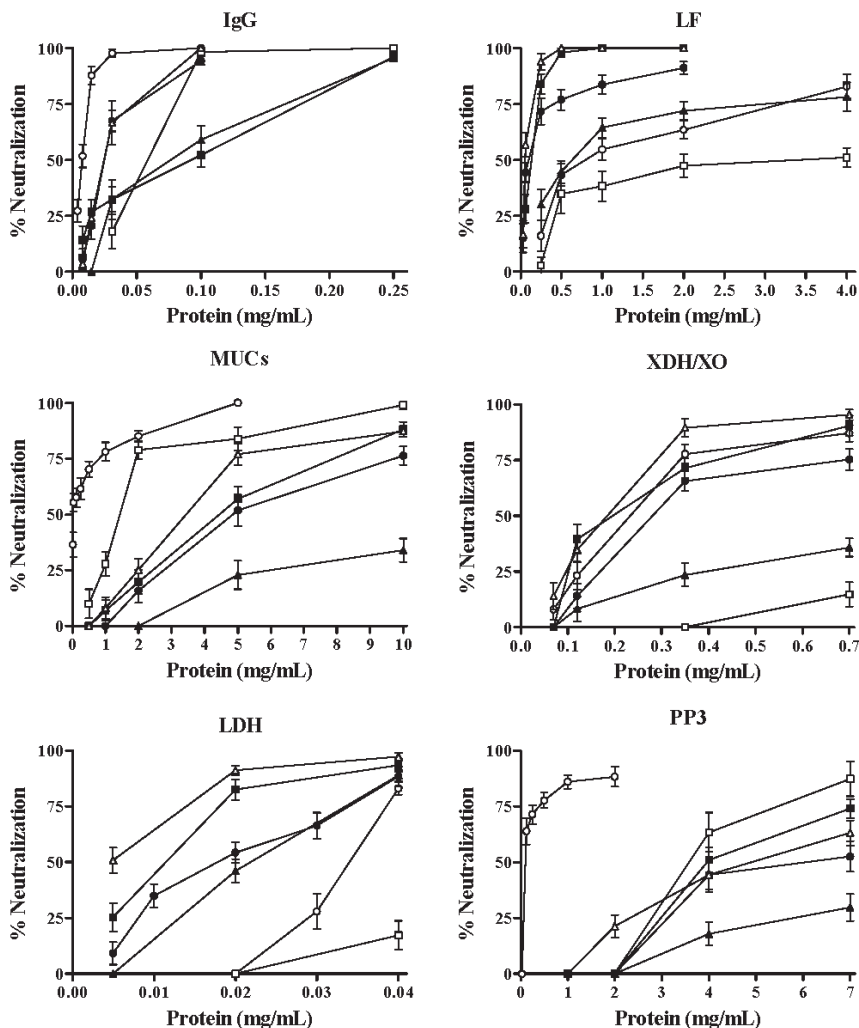


Fig. 3. Dose-response of bovine milk proteins on neutralizing rotaviral strains infectivity of MA104 cells. NCDV (white circles); UK (black circles); RRV (white squares); Wa (black squares); WC3 (white triangles); B223 (black triangles). Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of duplicates from two independent experiments ( $n = 4$ ). IgG, immunoglobulin G; LF, lactoferrin; MUCs, mucin enriched fraction; XDH/XO, xanthine dehydrogenase/oxidase; LDH, lactadherin; PP3, lactophorin.

rotaviruses Wa and B223 was reduced by 52 and 59%, respectively, for the same protein concentration. These results are in good agreement with other studies supporting that bovine IgG can provide high protection against rotavirus infection (Bojsen et al., 2007; Parrón et al., 2016). However, it is interesting to note that, although to different levels, all strains were neutralized by IgG, regardless their G and P genotype specificities. This finding strongly indicates the existence of a heterotypic neutralization mechanism that includes not only bovine viruses, but also human and simian rotavirus strains. More studies are needed to explore this heterotypic neutralization activity of bovine IgG.

As observed in Fig. 3, bovine LF also showed a differential neutralization activity for the rotavirus strains evaluated, with neutralization percentages ranging from 77 to 100% for Wa, UK, and WC3, and from 35 to 45% for B223, NCDV, and RRV viruses, when added at 0.5 mg/mL. These results agree with those of previous studies we performed (Parrón et al., 2016), which showed that bovine LF at 0.25 mg/mL neutralizes WC3 infectivity by about 82%, and also with those from the work by Superti et al. (2001), who found that bovine LF at 0.2 mg/mL inhibited 75 to 85% of the NA-sensitive simian rotavirus strain SA11 infectivity in HT-29 cells. In contrast, other authors (Bojsen et al., 2007;

Kvistgaard et al., 2004) reported that bovine LF had no inhibitory activity against rotavirus strains Wa, RRV, YM (porcine), and RF (bovine) in MA104 and Caco-2 cells. These discrepancies may result from differences in the neutralization protocols, protein purification procedures, cell lines, inoculation time, or the infection detection methods used in different studies.

The third protein we assayed was bovine LDH, and we found it had a high antirotaviral activity, neutralizing 83–97% of UK, WC3, Wa, B223, and NCDV infectivity at a concentration of only 0.04 mg/mL. Interestingly, RRV showed a significantly lower susceptibility than the other strains, being neutralized only in a 17% at the same protein concentration. The results presented here fit well with previous observations pointing to a high antirotaviral activity of bovine LDH against WC3 (Parrón et al., 2016) and human MO (Inagaki, Nagai, et al., 2010) strains. In contrast, other authors found that bovine LDH did not inhibit Wa rotavirus infection in Caco-2 cells (Kvistgaard et al., 2004) and this protein also failed to protect mice against infection with EMcN, a murine rotavirus strain (Bojsen et al., 2007).

Likewise, we found that bovine XDH/XO neutralized the infectivity of UK, Wa, NCDV, and WC3 viruses by 66–90% at 0.35 mg/mL (Fig. 3),

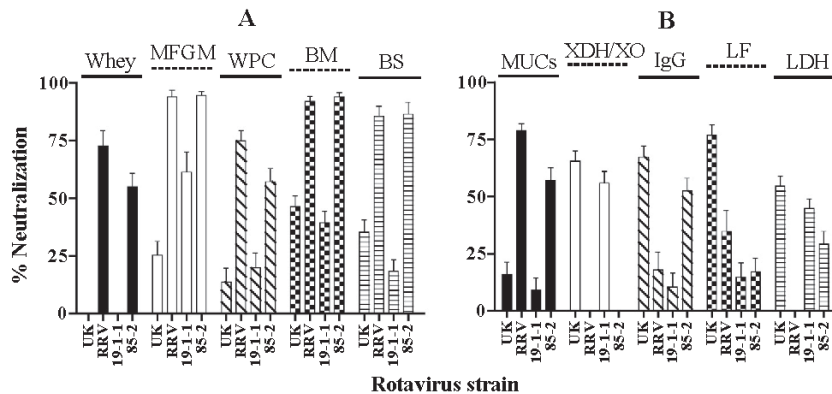


Fig. 4. Neutralizing activity of bovine milk samples against rotaviral reassortant strains infectivity of MA104 cells. (A) Milk fractions: whey 0.25 mg/mL (black bars); MFGM 2 mg/mL (white bars); WPC 0.125 mg/mL (slashed bars); BM 3 mg/mL (squared bars); BS 2 mg/mL (horizontal bars). (B) Milk proteins: MUCs 2 mg/mL (black bars); XDH/XO 0.35 mg/mL (white bars); IgG 0.03 mg/mL (slashed bars); LF 0.5 mg/mL (squared bars); LDH 0.02 mg/mL (horizontal bars). Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of duplicates from two independent experiments ( $n = 4$ ).

showing low activity against B223 and RRV strains, with neutralizing percentages of 23 and 0%, respectively, at the same protein concentration. These findings are in agreement with previous observations for WC3 neutralization (Parrón et al., 2017), and provide valuable data on the scarcely documented antirotaviral activity of XDH/XO.

With regard to MUCs, it was found that at a concentration of 2 mg/mL they neutralize RRV and NCDV strain infectivity more efficiently (79 and 85%, respectively) than that of B223, UK, Wa, and WC3 strains (0–25%). This preferential inhibition of NA-sensitive strains correlates with the fact that MUCs are glycosylated proteins containing a high amount of sialic acid, and can interact with this type of strains more efficiently. These observations are in agreement with a previous report showing that bovine MUC1 exerted a mild neutralizing activity on WC3 (Parrón et al., 2016), while it was highly effective inhibiting the infectivity of the EMcN murine rotavirus (Bojsen et al., 2007). Similarly, Kvistgaard et al. (2004) found around 63% inhibition of RRV strain by bovine MUC1 at 6.3  $\mu$ g/mL, whereas no effect was observed on rotavirus Wa infectivity.

Finally, PP3 was found to poorly neutralize most of the rotavirus strains tested in this study, with no neutralization observed for UK, Wa, B223, and RRV strains, and only 21% inhibition for WC3 after incubation with 2 mg/mL of protein. Interestingly, a significantly higher neutralizing activity of 88% was observed for NCDV at the same protein concentration. Even though very few studies have focused on the rotavirus neutralizing activity of bovine PP3, we showed previously a low neutralizing activity for this protein ( $\sim$ 20% at 0.5 mg/mL) against WC3 (Parrón et al., 2017), whereas a high inhibitory activity was reported ( $\sim$ 50% at 1  $\mu$ g/mL) on the replication of MO human strain (Inagaki, Nagai, et al., 2010).

Altogether, the analysis of the neutralizing activity of the various purified proteins showed a different effect on the infectivity of the rotavirus strains evaluated. Despite these differences, a similar susceptibility to neutralization by the different milk proteins was found for UK and WC3 strains, suggesting that the specificity of the inhibitory proteins is related to the G and P types of the rotavirus surface proteins. We also observed clear differences between the NA-sensitive and NA-resistant strains tested in this study. Thus, NA-sensitive strains showed noticeably different susceptibility patterns to neutralization by IgG, LF, MUCs, and LDH, in comparison with the NA-resistant strains. Whereas NA-sensitive strains seem to be more susceptible to IgG and MUCs neutralization, while more resistant to LF and LDH, as compared with the NA-resistant strains. Despite the overall similar tendency described for the NA-sensitive strains, there are also clear differences among them, indicating that specific characteristics, other than their sensitivity to NA, are involved in determining their susceptibility to the different proteins. On the other hand, when focusing on the neutralizing activity of bovine milk proteins against NA-resistant strains, an overall constant activity pattern was noticed. Thus, the following pattern was observed

for all of them, in order of decreasing activity: LDH > IgG > LF > XDH/XO > > MUCs > PP3.

The differences in the neutralizing activity exhibited by the milk fractions and proteins analyzed are most probably related to divergences in their overall macromolecule compositions and structures. The main factor for such differences could be related with the glycosylation degree and micro-heterogeneity of the attached glycans, along with the glycan binding preferences of the rotavirus strains, particularly to sialic acid. Further studies are needed to fully understand the differences on neutralizing activity exerted by milk glycoproteins, and also to elucidate the so far uncharacterized mechanism of neutralization exerted by the non- or poorly-glycosylated proteins, such as XDH/XO.

#### 3.4. Neutralizing activity of milk fractions and proteins against reassortant viruses

To identify the viral proteins associated with the neutralizing activity of several bovine milk fractions and proteins, we evaluated their capacity to inhibit the infectivity of reassortant viruses from the parental strains RRV and UK. These two rotavirus strains were neutralized to different degrees by the various samples assayed; thus, using reassortant UK  $\times$  RRV viruses having different combinations of VP4 and VP7 it is possible to determine which of the viral surface proteins is associated with their inhibitory effect. For instance, the whey fraction blocked RRV infectivity by 75% at 0.25 mg/mL, while UK was not affected at this concentration (Fig. 2), indicating that either VP4 or VP7, or both surface proteins of RRV, but not those of UK, are being targeted by the whey components to inhibit virus infectivity. The analysis of the reassortant virus 85-2, which contains the VP4 protein derived from RRV and VP7 from UK, and the reassortant 19-1-1 that has the VP7 protein of RRV and VP4 derived from UK (Table 2) should tell which of the RRV surface proteins is the main target of the inhibitory components. As it can be observed in Fig. 4, the infectivity of the parental RRV virus and the reassortant 85-2 were blocked by 50–75%, while the infectivity of the parental UK virus and reassortant 19-1-1 was not affected, clearly indicating that the VP4 protein, but not VP7, of RRV is interacting with the inhibitory components of whey that prevent the virus infection. In agreement with this observation is the fact that whey inhibited the RRV cell binding by 80% (Fig. 2), suggesting that the inhibitory components of this fraction interacts with VP4, and more specifically with its VP8 domain, which has been identified as the attachment factor of the virus. This observation is also in agreement with the fact that the NA-sensitive virus RRV interacts efficiently with glycans, particularly sialic acid, through its VP8 domain.

At the concentrations tested, all the milk fractions seem to exert the same mechanism of neutralization, since RRV and the reassortant virus 85-2 were more susceptible to be inhibited than rotavirus UK and the reassortant 19-1-1 (Fig. 4). Similar results were obtained when bovine

MUCs were used to block the infectivity of these viruses. Interestingly, the reverse was observed with XDH/XO, since this protein blocked the infectivity of UK and reassortant 19-1-1, but not those of RRV and 85-2, indicating that XDH/XO interacts mainly, and specifically with the VP4 protein of UK, which belongs to the P[5] genotype. It would be interesting to test if the P type is associated with this phenotype, by evaluating if other viruses with the P[5] genotype, like WC3, behave in the same manner. These observations also support the idea that the main mechanism of rotavirus neutralization by milk components is exerted at the level of binding to the cell surface.

On the other hand, IgG seem to interact mainly with the VP7 protein of UK, since they preferentially neutralized UK and the reassortant virus 85-2. The pattern of neutralization by LF and LDH is more complex and these proteins probably interact mostly with both the VP7 and VP4 proteins of rotavirus UK.

In addition to the antirotaviral activity proven here *in vitro*, several studies have shown promising results when using milk derived fractions and proteins for preventing rotavirus infection in *in vivo* assays (Bojsen et al., 2007; Egashira, Takayanagi, Moriuchi, & Moriuchi, 2007; Inagaki, Yamamoto, et al., 2010). All this information underlines the interest to carry out further studies to better understand the potential of milk samples as therapeutic agents against rotaviral infections.

#### 4. Conclusions

The results obtained in the present study demonstrate that bovine milk is a valuable source of antirotaviral compounds, since several milk-derived fractions and proteins showed relevant neutralizing activity against a wide range of rotaviral strains. The differences in the neutralizing activity that were observed among milk samples and rotavirus strains, are most likely associated to divergences in the glycan composition and structure of samples, along with variability in the glycan binding preferences of the rotavirus strains evaluated.

The neutralizing activity was determined to be directed to either VP4 or VP7, or to both surface proteins. Although further research should be extended to other rotavirus strains, the present results clearly highlight the huge potential of milk fractions for their inclusion in functional foods. Provided that the milk fractions inhibit the infectivity of rotavirus strains of human, simian, and bovine origin, with different G and P serotypes, they could be effective to prevent and probably to alleviate the symptoms of rotavirus diseases in different animal species. In this regard, special mention should be made to bovine whey, buttermilk and butter serum, which have been typically considered low-value by-products of dairy industry. Since it has been proven in the present study that those dairy by-products are good sources of antirotaviral compounds, this could allow valorizing them for their potential applications in food industry.

Finally, it is important to consider that the antirotaviral activity evidenced by the current study has been evaluated in *in vitro* assays for intact milk-derived samples. However, the bioactivity of samples might be affected by different factors, such as technological processing, gastrointestinal digestion and *in vivo* processes. Thus, our further research should mainly focus on achieving the highest preservation of antirotaviral activity of milk fractions, by searching for less harmful processing technologies, along with encapsulation techniques for the transport of bioactive compounds through the gastrointestinal tract without loss of activity.

#### Funding

The work described herein was supported by Spanish government under a FPU predoctoral grant, a CICYT project (AGL2010-20835) and the European Social Fund. It was also partially supported by grant IG200317 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### References

- Alkan, F., Ozkul, A., Oguzoglu, T. C., Timurkan, M. O., Caliskan, E., Martella, V., & Burgu, I. (2010). Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997–2008. *Veterinary Microbiology*, *141*, 231–237.
- Arias, C. F., Lizano, M., & López, S. (1987). Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Journal of General Virology*, *68*, 633–642.
- Arias, C. F., Silva-Ayala, D., Isa, P., Díaz-Salinas, M. A., & López, S. (2016). Rotavirus attachment, internalization, and vesicular traffic. In L. Svensson, U. Desselberger, H. B. Greenberg, & M. K. Estes (Eds.), *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis* (pp. 103–119). Cambridge: Academic Press.
- Babji, S., & Kang, G. (2012). Rotavirus vaccination in developing countries. *Current Opinion in Virology*, *2*, 443–448.
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A. D., Nelson, E. A. S., Gentsch, J. R., & Parashar, U. D. (2012). Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: Insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*, *30*, 122–130.
- Benfeldt, C., Larsen, L. B., Rasmussen, J. T., Andreassen, P. A., & Petersen, T. E. (1995). Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk. *International Dairy Journal*, *5*, 577–592.
- Berglund, L., Rasmussen, J. T., Andersen, M. D., Rasmussen, M. S., & Petersen, T. E. (1996). Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid. *Journal of Dairy Science*, *79*, 198–204.
- Binder, H. J., Brown, I., Ramakrishna, B. S., & Young, G. P. (2014). Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century. *Current Gastroenterology Reports*, *16*, 376–384.
- Bojsen, A., Buesa, J., Montava, R., Kvistgaard, A. S., Kongsbak, M. B., Petersen, T. E., ... Rasmussen, J. T. (2007). Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *Journal of Dairy Science*, *90*, 66–74.
- Britten, M., Lamothe, S., & Robitaille, G. (2008). Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *International Journal of Food Science and Technology*, *43*, 651–657.
- Das, J. K., Salam, R. A., & Bhutta, Z. A. (2014). Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *27*, 451–458.
- Díaz-Salinas, M. A., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, Y., López, S., & Arias, C. F. (2013). The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by rotavirus to enter MA104 cells. *Journal of Virology*, *87*, 1658–1663.
- Egashira, M., Takayanagi, T., Moriuchi, M., & Moriuchi, H. (2007). Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatrica*, *96*, 1242–1244.
- Fuller, K. L., Kuhlenschmidt, T. B., Kuhlenschmidt, M. S., Jiménez-Flores, R., & Donovan, S. M. (2013). Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *Journal of Dairy Science*, *96*, 3488–3497.
- Gaspar, H. B., Hammarström, L., Mahlaoui, N., Borte, M., & Borte, S. (2014). The case for mandatory newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID). *Journal of Clinical Immunology*, *34*, 393–397.
- Glass, R. I., Parashar, U., Patel, M., Gentsch, J., & Jiang, B. (2014). Rotavirus vaccines: Successes and challenges. *Journal of Infection*, *68*, 9–18.
- Hvarregaard, J., Andersen, M. H., Berglund, L., Rasmussen, J. T., & Petersen, T. E. (1996). Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *European Journal of Biochemistry*, *240*, 628–636.
- Inagaki, M., Nagai, S., Yabe, T., Nagaoka, S., Minamoto, N., Takahashi, T., ... Kanamaru, Y. (2010). The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 1386–1390.
- Inagaki, M., Yamamoto, M., Uchida, K., Yamaguchi, H., Kawasaki, M., Yamashita, K., ... Kanamaru, Y. (2010). In vitro and in vivo evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*, 680–682.
- Isa, P., Arias, C. F., & López, S. (2006). Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate Journal*, *23*, 27–37.
- Kiefel, M. J., & Itzstein, M. Von (2003). Carbohydrates as inhibitors of rotaviral infection. In Y. C. Reiko, & T. Lee (Eds.), *Recognition of carbohydrates in biological systems* (pp. 395–412). San Diego: Elsevier Inc.
- Kim, D. H., Kanno, C., & Mizokami, Y. (1992). Purification and characterization of major glycoproteins, PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1122*, 203–211.
- Koketsu, M., Nitoda, T., Juneda, L. R., Kim, M., Kashimura, N., Yamamoto, T., ... Yamamoto, T. (1995). Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *43*, 858–861.
- Kvistgaard, A. S. S., Pallesen, L. T., Arias, C. F., López, S., Petersen, T. E., Heegaard, C. W., & Rasmussen, J. T. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Research*, *87*, 4088–4096.
- Mainer, G., Sánchez, L., Ena, J. M. M., & Calvo, M. (1997). Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *Journal of Food Science*, *62*, 1034–1038.
- Marcotte, H., & Hammarström, L. (2016). Immunodeficiencies: Significance for gastrointestinal disease. In L. Svensson, U. Desselberger, H. B. Greenberg, & M. K. Estes (Eds.), *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis* (pp. 47–72).

- Kidlington: Academic Press.
- McGrath, B. A., Fox, P. F., McSwiney, P. L. H., & Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: A review. *Dairy Science & Technology*, 96, 133–158.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., & Hickey, R. M. (2014). Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology*, 24, 220–236.
- Pallese, L. T., Andersen, M. H., Nielsen, R. L., Berglund, L., Petersen, T. E., Rasmussen, L. K., & Rasmussen, J. T. (2001). Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *Journal of Dairy Science*, 84, 2591–2598.
- Pando, V., Isa, P., Arias, C. F., & López, S. (2002). Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology*, 295, 190–200.
- Parrón, J. A., Ripollés, D., Pérez, M. D., Calvo, M., Rasmussen, J. T., & Sánchez, L. (2016). Effect of heat treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine whey. *International Dairy Journal*, 60, 78–85.
- Parrón, J. A., Ripollés, D., Pérez, M. D., Calvo, M., Rasmussen, J. T., & Sánchez, L. (2017). Antiviral activity of bovine and ovine dairy byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 4280–4288.
- Payne, D. C., Boom, J. A., Staat, M. A., Edwards, K. M., Szilagyi, P. G., Klein, E. J., ... Parashar, U. D. (2013). Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children < 5 years of age, 2009–2011. *Clinical Infectious Diseases*, 57, 13–20.
- Pesavento, J. B., Crawford, S. E., Estes, M. K., & Prasad, B. V. V. (2006). Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 309, 189–219.
- Prasad, B. V. V., Shanker, S., Hu, L., Choi, J. M., Crawford, S. E., Ramani, S., ... Estes, M. K. (2014). Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Current Opinion in Virology*, 7, 119–127.
- Rajiv, G., Gurgel, P., Dos Santos, B., De Souza, J., Antunes, A., Narain, N., ... Queiroz, R. (2016). Medicinal plants and natural molecules with in vitro and in vivo activity against rotavirus: A systematic review. *Phytomedicine*, 23, 1830–1842.
- Ross, S. A., Lane, J. A., Kilcoyne, M., Joshi, L., & Hickey, R. M. (2015). The milk fat globule membrane: A potential source of health-promoting glycans. In V. K. Gupta, & M. G. Tuohy (Eds.). *Biotechnology of bioactive compounds: Sources and applications* (pp. 631–668). Chichester: John Wiley & Sons.
- Sørensen, E. S., & Petersen, T. E. (1993). Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. *Journal of Dairy Research*, 60, 189–197.
- Suocheng, W., Zhuandi, G., Tianjie, C., Ayimu, G., & Fengling, T. (2013). Genotyping of calves rotavirus in China by reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 189, 36–40.
- Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P., & Antonini, G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1528, 107–115.
- Takimori, S., Shimaoka, H., Furukawa, J., Yamashita, T., Amano, M., Fujitani, N., ... Nishimura, S. I. (2011). Alteration of the N-glycome of bovine milk glycoproteins during early lactation. *The FEBS Journal*, 278, 3769–3781.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., & Parashar, U. D. (2016). Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62, 96–105.
- Trojan, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P. H., & John, R. (2013). Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *Journal of General Virology*, 94, 136–142.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., & Blecker, C. (2010). Milk fat globule membrane and buttermilks: From composition to valorization. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 14, 485–500.
- Yadav, S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R. D., & Surampalli, R. Y. (2015). Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, 33, 756–774.
- Yu, X., & Blanchard, H. (2014). Carbohydrate recognition by rotaviruses. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 15, 101–106.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C. A., Arias, C. F., & López, S. (2000). Integrin  $\alpha 2 \beta 1$  mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology*, 278, 50–54.



4.1.5. **Artículo 5.** Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions

---







Contents lists available at ScienceDirect

# Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ifsset](http://www.elsevier.com/locate/ifsset)

## Effect of thermal and high-pressure treatments on the antirotaviral activity of human milk fractions



José Antonio Parrón<sup>a</sup>, Daniel Ripollés<sup>a</sup>, Sergio José Ramos<sup>b</sup>, María Dolores Pérez<sup>a</sup>, Miguel Calvo<sup>a</sup>, Lourdes Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza/CITA, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), Carretera Na134, km 53, 31570 San Adrián, Navarra, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Human milk  
Antirotaviral activity  
HoP  
HTST  
HHP

### ABSTRACT

Rotaviral gastroenteritis is associated with high rate of infant mortality and morbidity. Antirotaviral activity has been associated with some glycoproteins, such as immunoglobulins A (IgA), lactoferrin (LF), mucins and lactadherin of human milk. Although holder pasteurization (HoP, 63 °C for 30 min) is the treatment currently applied to human milk, it may lead to a decrease of its bioactive properties. The antirotaviral capacity of human milk showed to be mainly associated with the whey fraction, focusing on IgA and LF, with neutralizing values of 100, 100 and 62%, at 1 mg protein/mL, respectively. HoP reduced the antirotaviral activity of human whey, IgA and LF, 30, 98 and 60%, respectively. Interestingly, high temperature-short time (HTST) pasteurization at 75 °C for 20 s did not affect the antirotaviral activity of samples, while the highest HHP treatment at 600 MPa for 15 min only reduced the activity of human whey, IgA and LF, 9, 40 and 10%, respectively.

### 1. Introduction

Rotaviruses are the main cause of severe diarrheal disease in infants and young children, and the second cause of death in children < 5-years-old (Marcotte & Hammarström, 2016). The morbidity and mortality caused by viral gastroenteritis represent a major public health concern, affecting mainly the poorest countries (Das, Salam, & Bhutta, 2014).

It has been demonstrated that the entry of rotaviruses into intestinal epithelial cells is a multistep process involving the outermost proteins of the virus, VP7 and VP4, and several cell surface molecules with different requirements depending on the rotavirus strain (Arias, Silva-Ayala, Isa, Díaz-Salinas, & López, 2016). The virus replicates in the enterocytes of the small intestine, causing extensive damage to the microvilli and resulting in malabsorption and loss of fluids and electrolytes. The consequences of the infection include severe dehydration, cerebral edema, hypovolemic shock, renal failure and even death (Bishop, 2009).

The oral introduction of live attenuated rotavirus vaccines has significantly reduced the incidence of the disease, especially in developed

countries (Payne et al., 2013). However, due to financial and logistic problems these vaccines are scarcely used in lower income countries, leaving between a third to a half of children unprotected from severe rotavirus disease (Babji & Kang, 2012). Thus, the need for alternative approaches to face the rotaviral gastroenteritis disease is of high priority.

It is widely accepted that breastfeeding is the optimal way to provide infants with the essential nutrients for healthy growth and development, also protecting them against a broad spectrum of pathogens (Liu & Newburg, 2013; Peterson, Cheah, Grinyer, & Packer, 2013). When mothers cannot breastfeed their children, the nutrition recommended by the World Health Organization (WHO) can be delivered by donated breast milk. This is a better alternative than infant formula, at least for the first six months and especially for low-birth-weight premature infants (Sousa, Delgadillo, & Saraiva, 2014b; WHO, 2003). In particular, the protein fraction of human milk plays an important role on its bioactivity (Lønnerdal, 2016). Caseins and whey proteins represent approximately 40% and 60% of the total protein in human milk, the latter containing the majority of bioactive proteins like  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA), lactoferrin (LF), immunoglobulins, human serum

**Abbreviations:**  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumin; HoP, holder pasteurization; HTST, high temperature-short time; HHP, high hydrostatic pressure; IgA, immunoglobulins A; LDH, lactadherin; LF, lactoferrin; Lyz, lysozyme; MEM, minimum essential medium; MFGM, milk fat globule membrane; MUCs, mucins; PBS, phosphate-buffered saline; rhLF, recombinant human lactoferrin; rhLyz, recombinant human lysozyme; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

\* Corresponding author.

E-mail address: [lousanchez@unizar.es](mailto:lousanchez@unizar.es) (L. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.ifsset.2018.03.008>

Received 11 October 2017; Received in revised form 19 February 2018; Accepted 6 March 2018

Available online 07 March 2018

1466-8564/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

albumin, and lysozyme (Lyz). Milk fat globule membrane (MFGM) proteins, including mucins (MUCs), butyrophilin and lactadherin (LDH) represent < 5% of human milk proteins (Peterson et al., 2013).

One of the protective mechanisms attributed to human milk is associated with glycoconjugates, mainly oligosaccharides and glycoproteins, whose glycan moieties may act as decoy receptors, hampering pathogen binding to the cell surface (Liu & Newburg, 2013; Lönnerdal, 2016). While the protective activity of human milk oligosaccharides has been well established (Kunz, Kuntz, & Rudloff, 2014), human milk glycoproteins have received less attention, even though they seem to play important bioactive roles. Although some studies have indicated the role of breastfeeding as a protective factor against rotavirus infection (De Franco et al., 2013; Gianino et al., 2002), there are few studies regarding the antirotaviral activity of the majority of human proteins. Most studies focus on IgA (Asensi, Martínez-Costa, & Buesa, 2006; De Franco et al., 2013) or MFGM proteins MUC1 and LDH (Kvistgaard et al., 2004; Newburg et al., 1998; Yolken et al., 1992).

In order to guarantee the hygienic quality of human milk, a pasteurization process at 62.5 °C for 30 min (holder pasteurization, HoP) is currently applied in human milk banks (Arslanoglu et al., 2010). Nevertheless, there are several studies reporting that thermal treatments usually applied to pasteurization of human milk may lead to a reduction of its beneficial and protective properties, affecting important biological components, such as proteins and in particular, immunoglobulins (Peila et al., 2017).

Consequently, it would be advisable to develop treatments for human milk that can ensure microbial inactivation, while preserving its nutritional, immunological, and bioactive properties. At this respect, different alternative processing methods are currently being studied in order to evaluate their effect on human milk safety and quality, including high temperature-short time (72–75 °C, 15–20 s, HTST) pasteurization and high hydrostatic pressure (HHP) treatments. These treatments seem to maintain most organoleptic and nutritional properties of milk, causing minor degradation of proteins and vitamins than other treatments (Holsinger, Rajkowski, & Stabel, 1997). HHP treatment is a non-thermal processing method that can provide microbiologically safe, nutritionally intact, and products of high sensory quality by applying pressures in the range of 400–600 MPa for 5–10 min (Sousa et al., 2014b). The pressure-induced sterilization and inactivation of non-enveloped and enveloped viruses, including rotaviruses, have been demonstrated in several studies (Pontes et al., 2001; Silva et al., 2014).

Although there are several studies on the effect of technological treatments on the protein content of human milk (Peila et al., 2017), to our knowledge there are no studies focusing on its antirotaviral potential. The aim of the present study was to evaluate the rotavirus-neutralizing activity of different human milk fractions and proteins, such as IgA, LF, Lyz,  $\alpha$ -LA, MUCs, LDH and caseins, and compare the effects of several heat and pressure treatments on antirotaviral activity. This activity was determined measuring the ability of milk fractions and proteins to inhibit the infection of MA104 cells by the WC3 bovine rotavirus strain.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell culture and rotavirus propagation

Cell culture and rotavirus propagation have been performed following the procedures described in Parrón et al. (2016). The Rhesus monkey kidney cell line MA104 (ATCC CRL-2378) was used to propagate WC3 bovine rotavirus strain (ATCC VR-2102). Cells were cultured in minimum essential medium (MEM), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% antibiotics (100 Units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin), 2 mM L-glutamine, and 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B. Rotavirus propagation was carried out by inoculating confluent cell monolayers with an aliquot of virus suspension. Serum-free

MEM, supplemented with 1% antibiotics, 2 mM L-glutamine, and 0.25  $\mu$ g/mL amphotericin B was used as diluent in all steps. All cell culture media and supplements were purchased from Gibco (Life Technologies Corporation, Paisley, UK).

### 2.2. Obtaining human milk fractions: Skimmed milk, whey, caseins and MFGM

Transitional (6–15 days after birth) and mature (> 15 days after birth) human milk samples from ten healthy donors were kindly donated and stored at –20 °C. The Ethical Committee for Clinical Research of the Government of Aragón (CEICA) approved the study and all donors provided informed consent. Frozen human milk was thawed and skimmed by centrifugation at 2500g for 15 min at 4 °C. Whey was obtained from skimmed milk after precipitation of casein fraction as previously described (Svensson et al., 1999). In brief, human skimmed milk was supplemented with 10% (w/v) potassium oxalate and incubated at 4 °C overnight. After lowering the pH to 4.3, heating to 32 °C for 2 h, and incubating at 4 °C overnight, the casein fraction was precipitated by centrifugation at 5000g for 15 min at 20 °C. The casein fraction was then washed three times with distilled water and dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8.5. Human whey was filtered through glass wool and dialyzed against PBS pH 7.2. Human MFGM was isolated basically as described by Kvistgaard et al. (2004). Briefly, cream was obtained by centrifugation of human milk for 20 min at 5000g, and washed twice with 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.15 M NaCl, pH 7.2. After intense churning and sonication of washed material, human MFGM was obtained by centrifugation at 50000g for 1 h. All fractions were stored at –20 °C until analysis.

### 2.3. Purification of human proteins

Human immunoglobulins A (IgA) were isolated by means of conventional fractionation using size-exclusion chromatography, according to Pack (2000). Thus, human immunoglobulins were pelleted from whey by adding ammonium sulfate to 50% (w/v), followed by incubation for 16 h at 4 °C and centrifugation at 15000g for 1 h at 4 °C. Afterwards, the pellet was dissolved and dialyzed against 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 9.5, and further applied onto a DEAE-Sepharose column equilibrated with the same buffer. Bound IgA were eluted using the Tris buffer with a linear gradient from 0.10 to 0.25 M NaCl.

Human lactoferrin (LF) was purified using cation exchange chromatography on SP-Sepharose following the procedure of Conesa et al. (2008). In brief, milk was skimmed by centrifugation at 2500g for 30 min at 4 °C, diluted 1:1 with a buffer containing 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.8 M NaCl, 0.04% (v/v) Tween 20, pH 7.4, and batchwise incubated with SP-Sepharose at 4 °C overnight. Afterwards, the SP-Sepharose was packed onto a column and washed with a 0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer, with 0.4 M NaCl, 0.02% (v/v) Tween 20, pH 7.4, to wash out the unbound proteins. LF was eluted with a buffer containing 0.02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 M NaCl, pH 7.4. The iron saturation of LF, estimated from the ratio of absorbances at 280 and 465 nm, was < 15%.

Three forms of recombinant human LF (rhLF) were also tested. Two forms were obtained from rice and kindly provided by Ventria Bioscience (Sacramento, CA, USA), in the holo form (~80% iron saturation) and as-isolated from rice (~60% iron saturation). Another rhLF from *Aspergillus awamori* (~18% iron saturation) was provided by Agennix (Houston, TX, USA). These proteins were analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) showing a main band corresponding to a ~80 kDa protein, so they were used in the experiments without further purification.

Human lysozyme (Lyz) was essentially obtained from human skimmed milk through cation exchange chromatography on SP-Sepharose, as described above for human LF purification, followed by gel-filtration on Sephadex G-50 of fractions excluded from SP-

Sephacose column. A recombinant human Lyz (rhLyz) obtained from rice was kindly supplied by Ventria Bioscience, and tested in this study after checking its purity, which was above 95% as determined by SDS-PAGE (~14 kDa).

Human  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA) was isolated according to Barbana, Pérez, Pocovi, Sánchez, and Wehbi (2008). In short, human whey was obtained after skimming by centrifugation at 2000g for 30 min at 4 °C and further casein separation by adding  $\text{CaCl}_2$  and ultracentrifugation at 100000 g for 2 h at 4 °C. Whey was then subjected to gel filtration chromatography on a Sephadex G-100 column equilibrated with 25 mM sodium acetate buffer, with 50 mM NaCl, pH 6.5, at 4 °C, and further chromatographed under the same conditions on a Sephadex G-50 column.

A fraction enriched in human mucins (MUCs) was obtained from human MFGM through an adapted method based on Le et al. (2012), including an initial step of enzymatic degradation by incubating first with pepsin (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 0.4:100 (w/w) enzyme:protein ratio, for 2 h at 37 °C with continuous shaking. Afterwards, the mixture was incubated with trypsin (Sigma) at 1:100 (w/w) enzyme:protein ratio, and  $\alpha$ -chymotrypsin (Sigma) at 1:100 (w/w) enzyme:protein ratio, for 3.5 h at 37 °C. Samples were then subjected to ultrafiltration through 30,000 MWCO membranes, in order to remove small proteins and peptides.

A fraction enriched in human lactadherin (LDH) was obtained by resuspension of MFGM with PBS containing 0.02 M NaCl and further centrifugation at 25000g for 1 h at 4 °C. The resulting supernatant was enriched in LDH. All protein fractions were dialyzed against distilled water, lyophilized and stored at -20 °C until analysis.

#### 2.4. Rotavirus infectivity assay

The *in vitro* rotavirus infection assay was performed as previously described in the study of Parrón et al. (2016), in which the assay was validated according to international guidelines. Briefly, MA104 cells were seeded into 96-well plates and incubated near confluence. Appropriate dilutions of human milk fractions and proteins were mixed (1:1) with trypsin-activated rotavirus suspension and incubated for 1 h at 37 °C, to evaluate their neutralizing activity. Afterwards, the samples were transferred into the 96-well cell culture plates and incubated at 37 °C during 1 h for rotavirus adsorption. Serum-free MEM and rotavirus suspension were included as negative and positive controls, respectively. For cell infection, plates were added with 100  $\mu\text{L}$  per well of MEM containing 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of trypsin and 2% heat inactivated fetal serum, before incubating at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  for 16 h with gentle rotation. Virus-infected cells were detected afterwards by immunofluorescence. The infectivity percentages were determined by enumerating fluorescent foci (infected cells) in each well using a fluorescence microscope (Eclipse E400) with a FITC-compatible filter, by image analysis using the Zen lite 2012 software.

#### 2.5. Treatment of human fractions

The protein concentrations of the samples selected for thermal and HHP treatments were those showing neutralization activity above 80%: pooled human whey at 2 mg protein/mL, IgA at 0.1 mg protein/mL, and LF at 2 mg protein/mL. The heat treatment procedure was based on that previously used (Parrón et al., 2016). The samples were placed in glass vials (~1 mL) and heated in a thermostatic bath ( $\pm 0.1$  °C) at: 45 and 55 °C for 60 min, 63 °C for 30 min, 72 °C from 20 s to 60 min, and 75, 80 and 85 °C for 20 s and 10 min. Temperature was monitored inside the samples with a digital thermometer. After heating, the samples were cooled rapidly in an iced water bath and stored at -20 °C until analysis.

High pressure treatment procedure was based on that previously

described by Mayayo et al. (2016). Aliquots of pooled human whey (2 mg protein/mL), IgA (0.1 mg protein/mL), and LF (2 mg protein/mL) were introduced into 2-mL polyethylene bags. After eliminating headspace, bags were heat-sealed and pressurised using a Stansted Fluid Power FPG 11500 B (Stansted, Essex, United Kingdom), with propylene glycol/water (70/30, v/v) as the pressure-transmitting fluid. The chamber volume was of 30 mL. Pressure was raised to 400, 500 or 600 MPa and maintained at those values for 5, 10 and 15 min. The pressure was increased at 240 MPa/min, which gave come-up times of 1.6, 2.1 and 2.5 min at 400, 500 and 600 MPa, respectively. The initial temperature of transmitting fluid and samples was equilibrated at 20 °C, and the approximate temperature increase was 3 °C per 100 MPa. HHP-treated samples were kept at 4 °C until analysis.

#### 2.6. SDS-PAGE and Western-blotting

Protein profiles of milk fractions and proteins were analyzed by SDS-PAGE using 4–20% polyacrylamide gels (Mini-Protean TGX, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), which were Coomassie and Periodic Acid Schiff (PAS) stained, according to standard procedures. Western-blotting procedure was performed to confirm the protein identity, in essence as described by Benfeldt, Larsen, Rasmussen, Andreassen, and Petersen (1995) using PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Quantification of protein concentration was done by BCA Protein Assay (Pierce Kit, Thermo Scientific). The compositional values of human milk were obtained by infrared spectroscopy using a MilkoScan 4000 (Foss Electric, Hilleroed, Denmark).

#### 2.7. Statistical analysis

Data were analyzed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software, by using a Kolmogorov-Smirnov normality test and a One-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Rotaviral neutralizing activity of human milk fractions and proteins

It is widely accepted that the composition of human milk is influenced by many factors, such as genetics, lactation period, and dietary habits. These factors are responsible for the differences in human milk components between individuals, what makes difficult to establish a general composition (Sousa et al., 2014b; Wojcik, Rechtman, Lee, Montoya, & Medo, 2009). The results we have found in the present study when evaluating the rotaviral activity of milks from different donors reflect that variability. In fact, even though there are not clear differences in the electrophoretic profile of human milk fractions from 10 healthy donors, significant differences have been evidenced when analyzing their neutralizing rotaviral activity (Fig. 1), obtaining values ranging from 3 to 100%, at 1 mg of protein/mL. Taking into account these wide differences between donors and in pursuit of achieving representative results, milk from the 10 donors was pooled. This pooled milk was the starting material for subsequent experiments to obtain fractions and proteins, which were subjected to compositional and biological assays.

The electrophoretic profile of the samples tested in this study (Fig. 2) showed that the majority of the human milk proteins are whey proteins, the most abundant being  $\alpha$ -LA, LF, IgA and Lyz, what is consistent with results from various studies, which indicate approximate contents of 17, 17, 11 and 5% of total human milk proteins, respectively (Peterson et al., 2013). By contrast, both caseins and MFGM proteins, including MUCs and LDH, represent lower proportion

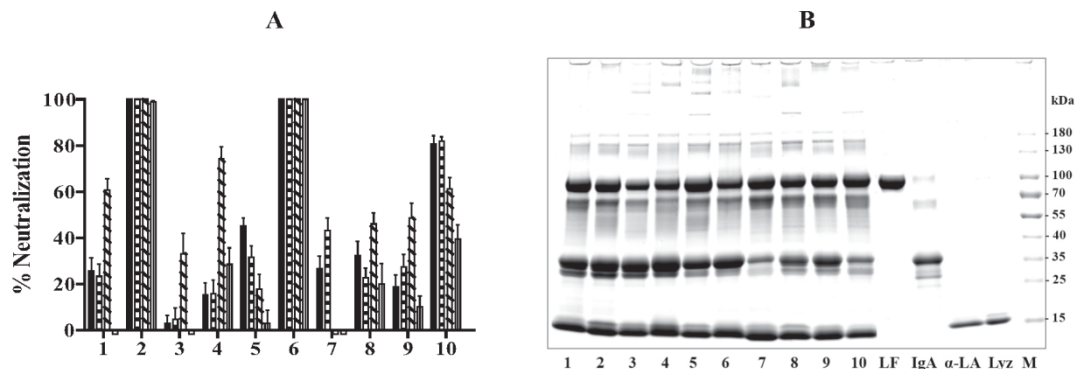


Fig. 1. (A) Effect of human milk fractions from ten donors (numbered 1–10) on neutralizing WC3 rotaviral infection of MA104 cells. (■) Whole milk at 1 mg protein/mL; (□) skimmed milk at 1 mg protein/mL; (▨) whey at 0.5 mg protein/mL; (▩) casein fraction at 4 mg protein/mL. Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). (B) Electrophoretic profile of skimmed human milk from ten donors (numbered 1–10). SDS-PAGE was performed under reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining. LF, lactoferrin; IgA, immunoglobulins A; α-LA, α-lactalbumin; Lyz, lysozyme; M, molecular weight marker.

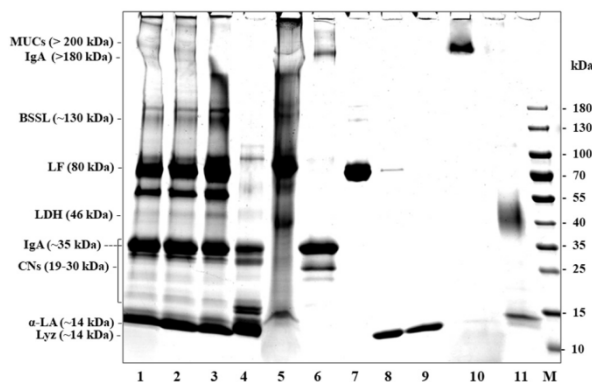


Fig. 2. Electrophoretic profile of human fractions and proteins. Lane 1, whole milk; lane 2, skimmed milk; lane 3, whey; lane 4, casein fraction; lane 5, MFGM fraction; lane 6, immunoglobulins A (IgA); lane 7, lactoferrin (LF); lane 8, lysozyme (Lyz); lane 9, α-lactalbumin (α-LA); lane 10, mucins enriched fraction (MUCs); lane 11, lactadherin enriched fraction (LDH); M, molecular weight marker. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining.

compared to the whey fraction in human milk. Furthermore, the protein, lipid, and lactose percentages of human milk evaluated in this study are in good accordance with compositional data reported by other authors (Sousa et al., 2014b). Thus, the pooled whole milk presented percentages of protein, lipid, and lactose of 1.1, 2.3 and 5.2% (w/v), respectively.

It is widely accepted that breastfeeding acts as a protective factor against rotavirus infection (De Franco et al., 2013; Gianino et al., 2002). Despite the fact that human milk shows a complex composition, most of the studies performed on its antirotaviral capacity have mainly focused on IgA (Asensi et al., 2006; De Franco et al., 2013), or MFGM proteins MUC1 and LDH (Kvistgaard et al., 2004; Newburg et al., 1998; Yolken et al., 1992). Thus, there is a lack of studies addressing other human milk components, what underlines the need of new evidence to better understand their potential and action mechanisms against rotaviral infections.

In the present study, several human milk fractions have been tested for their ability to reduce rotavirus infectivity (Fig. 3A). Thus, complete neutralization of *in vitro* cell infection with WC3 rotavirus was observed upon incubation either with raw whole milk, skimmed milk or whey, at 1 mg of protein/mL. By contrast, both casein and MFGM fractions showed significantly lower neutralizing values, being of 3 and 2%,

respectively, at the same protein concentration, and higher values, of about 36 and 39% when tested at 2 mg of protein/mL. These results suggest that the antirotaviral potential of human milk is mainly associated to the whey fraction components. Moreover, the fat content appears not to be determinant in the overall activity, since no significant differences have been found between the antirotaviral activity of whole and skimmed human milk.

Interestingly, significant interspecies differences in the antirotaviral activity have been found when analyzing the results of the human milk fractions in comparison with those obtained for their bovine counterparts in previous studies we performed under the same conditions (Parrón et al., 2016, 2017). In fact, we observed that bovine raw whole milk, skimmed milk and whey, showed lower WC3 neutralizing values, being of 74, 73 and 93%, at 1 mg of protein/mL, respectively. On the contrary, both bovine casein and MFGM fractions showed significantly higher antirotaviral activity, of 46 and 29% at the same protein concentration, respectively, than their human counterparts. Despite these divergences, the antirotaviral potential of bovine milk was found to be mainly associated with the whey fraction, as in the case of human milk.

Results obtained with milk fractions are in good agreement with the rotavirus neutralizing activity shown by the isolated proteins assayed in this study (Fig. 3B). At this respect, both IgA and LF, the major human whey proteins, at a concentration of 1 mg/mL, reached neutralization values of 100 and 62%, respectively. However, α-LA and Lyz showed negligible activities, at 1 mg/mL and even at 2 mg/mL. Furthermore, it has been evidenced a certain degree of antirotaviral activity as regards both MUCs-enriched fraction (51%, at 1 mg/mL) and LDH-enriched fraction (78%, at 0.5 mg/mL), which contrasted with the scarce activity previously attributed to MFGM whole fraction (2%, at 1 mg protein/mL). These MFGM proteins may easily act against rotavirus infection when totally solubilized, better than as MFGM components.

With respect to the antirotaviral activity exerted by the recombinant LF (rhLF) tested in this study, significant differences were observed in comparison with LF isolated from human milk. Thus, the three forms of rhLF assayed at 1 mg/mL showed neutralizing values of 95, 95 and 87%, for the rice holo, the rice as isolated, and the *Aspergillus awamori* rhLF, respectively, which are significantly higher than that obtained with human milk LF (62% neutralizing activity). These results seem to indicate that there is no correlation between the degree of LF iron saturation and its antirotaviral activity, which is in agreement with results obtained by Superti et al. (2001) who found that complete iron saturation of bovine LF did not modify its antirotaviral activity. By contrast, no significant differences were found between antirotaviral activity of Lyz from human milk and the recombinant protein obtained from rice.

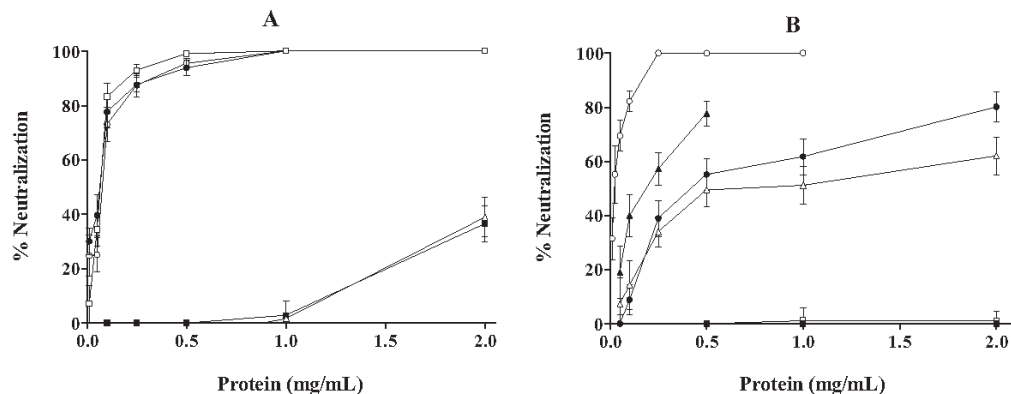


Fig. 3. Dose-response of human samples on neutralizing WC3 rotaviral strain infectivity of MA104 cells. (A) Human milk pooled fractions: (○) whole milk; (●) skimmed milk; (◻) whey; (■) casein fraction; (▲) MFGM defatted fraction. (B) Human milk proteins: (○) immunoglobulins A; (●) lactoferrin; (◻) lysozyme; (■) α-lactalbumin; (▲) mucins enriched fraction; (△) lactadherin enriched fraction. Results are shown as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ).

Our results are in good accordance with those obtained by Asensi et al. (2006) who demonstrated the neutralizing activity of human milk against three rotavirus strains (human Wa and VA70, simian SA11). These authors found no correlation between the antirotaviral activity and the concentrations of IgA in human milk and serum samples, suggesting that antirotavirus IgA were only partly responsible for this activity and pointing out that other bioactive components, such as LF and LDH, could also be involved. Similar results were also reported by De Franco et al. (2013) as they observed that human colostrum and milk samples had the capacity to neutralize the rotavirus independently of their antirotaviral IgA levels, indicating a potential protective role of other components besides immunoglobulins. Furthermore, interspecies differences have been reported on the antirotaviral potential of milk IgA. Thus, it has been shown that bovine milk predominant immunoglobulins (IgG) presented a higher activity over 90% at 0.025 mg/mL (Parrón et al., 2016) than those predominant in human milk (IgA), around 55% at 0.025 mg/mL. These differences could be attributed to the vaccination programmes commonly applied in bovine species, resulting in milk with a high titer of specific antirotavirus immunoglobulins.

As regards the antirotaviral capacity of human LF, our results have shown that its neutralizing activity against WC3 strain is close to 40% at a concentration of 0.25 mg/mL. This finding contrasted with that we obtained previously, which showed that native bovine LF at the same concentration could inhibit about 82% of WC3 rotavirus infection of MA104 cells (Parrón et al., 2016). These results were very similar to those obtained by Superti et al. (2001) who showed that apo and holo forms of bovine LF at 0.2 mg/mL exerted an inhibition of SA-11 strain, from 75 to 85%, in human colon adenocarcinoma cells (HT-29).

With reference to human MUCs, our results showed a WC3 rotavirus-neutralizing activity of 34% at 0.25 mg/mL. In this regard, Yolken et al. (1992) have also attributed antirotaviral activity to a human milk mucin complex fraction containing the MFGM protein MUC1 at 0.1 µg/mL, which showed 50% of inhibition of MA104 cell infection with SA11 rotavirus strain. Furthermore, we have previously demonstrated that infection of MA104 cells by WC3 rotavirus strain was 35% inhibited by bovine MUC1 at 0.25 mg/mL (Parrón et al., 2016). However, no inhibitory effect was observed by Kvistgaard et al. (2004) with a similar fraction, on infection by rotavirus strain Wa, suggesting the great influence of the strain when studying their inhibitory factors.

The present study showed that human LDH at a concentration of 0.1 mg/mL has a WC3 neutralizing activity of 40%. In this respect,

Kvistgaard et al. (2004) reported that human LDH inhibited infection of Caco-2 cells by rotavirus strain Wa in a dose-dependent manner (60% inhibition at 0.1 mg/mL). Likewise, Yolken et al. (1992) also suggested that human LDH was able to block the entry of rotavirus into the host cell, activity that was mainly attributed to the presence of sialic acid glycan chains in LDH. Furthermore, Newburg et al. (1998) evaluated the correlation between the concentration of LDH in breast milk and the appearance of symptomatic rotavirus infection. The results obtained showed the existence of significant differences between LDH concentration in milk received by symptomatic (29.2 µg/mL) and asymptomatic (48.4 µg/mL) infected babies. In addition, Parrón et al. (2016) observed that the incubation of WC3 rotavirus with bovine LDH at 0.08 mg/mL resulted in a neutralizing activity of 70%. In contrast, Kvistgaard et al. (2004) observed that bovine LDH could not inhibit Wa rotavirus infection of Caco-2 cells, revealing again the differences that may exist in the sensitivity of strains to inhibitory factors.

Differences in the neutralizing activity exhibited by milk fractions or proteins assayed in several studies could be attributed to either inter or intraspecies divergences in their overall composition and structure. In particular, differences in the glycosylation degree and microheterogeneity of the attached glycans to proteins should be considered, as several studies pointed out that glycosylation is involved in receptor-ligand and host-pathogen interactions (Liu & Newburg, 2013; Peterson et al., 2013). This could explain the different activities observed in the present study between glycosylated (IgA, LF, MUCs and LDH) and poorly or non-glycosylated proteins (α-LA and Lyz). In addition, it is necessary to take into account the differences between the rotavirus strains used, with regard to their binding preferences to glycans, particularly sialic acid (Arias et al., 2016; Prasad et al., 2014). Furthermore, some discrepancies could derive from differences between the neutralization protocols, protein purification procedures, cell lines, inoculation time and methods to detect infection used.

### 3.2. Effect of heat treatment on the antirotaviral activity of human milk fractions and proteins

The effect of heat treatments of different intensity applied to human whey on its inhibitory activity against WC3 rotavirus was determined (Fig. 4A). It was observed that HoP (63 °C for 30 min), caused a significant decrease of the neutralizing activity of human whey, of approximately 30%, whereas HTST pasteurization treatments (72 °C for 20 s and 75 °C for 20 s) did not affect its antirotaviral capacity. These

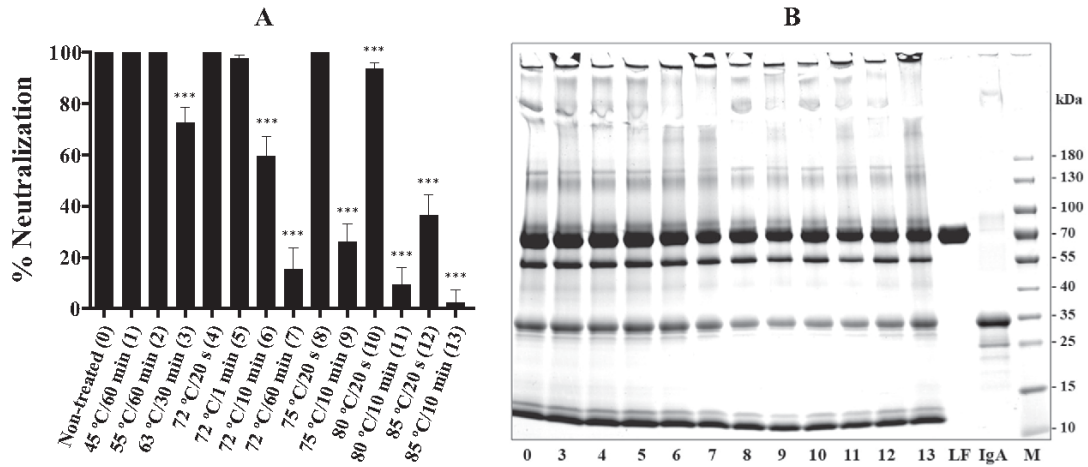


Fig. 4. Effect of heat treatment on the neutralizing activity of human whey against WC3 rotaviral strain infection of MA104 cells. (A) Results are expressed as percentage with respect to positive control as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $***p < 0.001$ ) in relation to non-treated whey. Whey was treated at 2 mg/mL protein concentration. (B) Electrophoretic profile of heat treated human whey. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining. LF, lactoferrin; IgA, immunoglobulins A; M, molecular weight marker. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards thermal treatments.

results highlight the fact that these last treatments could be used as alternative methods for processing human milk to preserve its bioactivity. Heat treatments of high intensity, between 72 °C for 10 min and 85 °C for 10 min, induced higher losses of activity, of 40 and 98%, respectively. The electrophoretic profile of human whey samples subjected to severe heat treatments (Fig. 4B) showed the presence of aggregates that could not enter the wells and a slight decrease in the intensity of some protein bands.

Taking into account that IgA and LF are the proteins that have mainly shown antirotaviral activity in human whey, we also evaluated the effect of different heat treatments on their activity (Fig. 5A). HoP affected significantly to both proteins, causing a decrease of the neutralizing activity, of 98 and 60%, for IgA and LF, respectively. By contrast, HTST pasteurization, at 75 °C for 20 s, did not affect the antirotaviral activity of IgA and LF. However, heat treatments of higher intensity (75 °C for 10 min and 85 °C for 10 min) caused significant losses of LF and IgA activity, between 82 and 100%. The decrease in the intensity of the electrophoretic bands corresponding to IgA and LF after heat treatments was in accordance with the neutralizing results (Fig. 5B).

Most of the studies performed to determine the effect of technological treatments on human whey proteins have been focused on defensive components, such as IgA, LF and Lyz (Peila et al., 2017), while none of them has focused on their antirotaviral activity. Thus, Mayayo et al. (2016) observed that HoP and HTST pasteurization of human milk caused a decrease of about 57% of IgA immunoreactivity measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), whereas thermal treatments of higher intensity (over 80 °C for 15 s) produced losses higher than 78%. Although diverse studies have reported similar IgA losses after HoP pasteurization, ranging between 49 and 60% (Contador, Delgado-Adámez, Delgado, Cava, & Ramírez, 2013; Giribaldi et al., 2016; Viazis, Farkas, & Allen, 2007), other studies have evidenced lower losses, ranging from 20 to 28% (Chang et al., 2013; Czank, Prime, Hartmann, Simmer, & Hartmann, 2009; Permanyer et al., 2010; Sousa, Delgado, & Saraiva, 2014a), or even no degradation of IgA (Evans, Ryley, Neale, Dodge, & Lewarne, 1978). Furthermore, Giribaldi et al. (2016) showed that HTST pasteurization preserved 79% of IgA immunoreactivity, while HoP pasteurization only preserved 46%; in contrast to other authors that showed similar losses of IgA after applying HoP or HTST treatments (Mayayo et al., 2016; Peila et al., 2017).

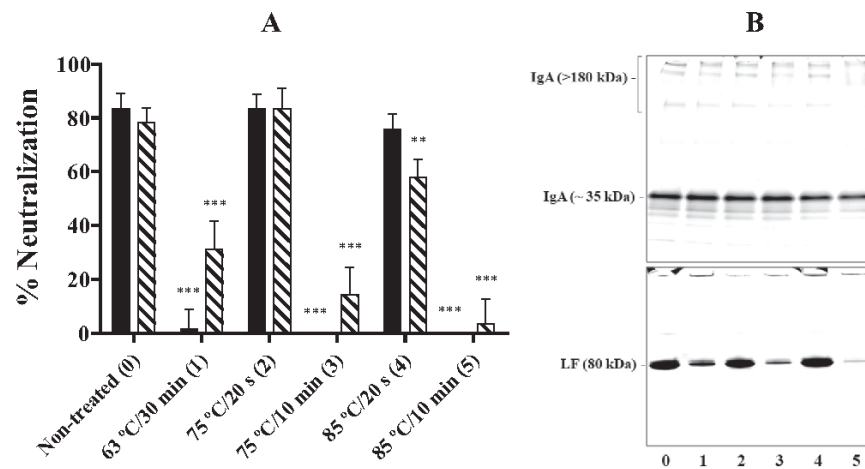


Fig. 5. Effect of heat treatment on the neutralizing activity of human immunoglobulins A (■) and lactoferrin (▨) against WC3 rotaviral strain infection of MA104 cells. (A) Dose-response results expressed as percentage with respect to positive control as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $***p < 0.001$ ;  $**p < 0.01$ ) in relation to non-treated proteins. Immunoglobulins A (IgA) and lactoferrin (LF) were treated at 0.1 and 2 mg/mL, respectively. (B) Electrophoretic profile of heat treated human proteins. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards thermal treatments.

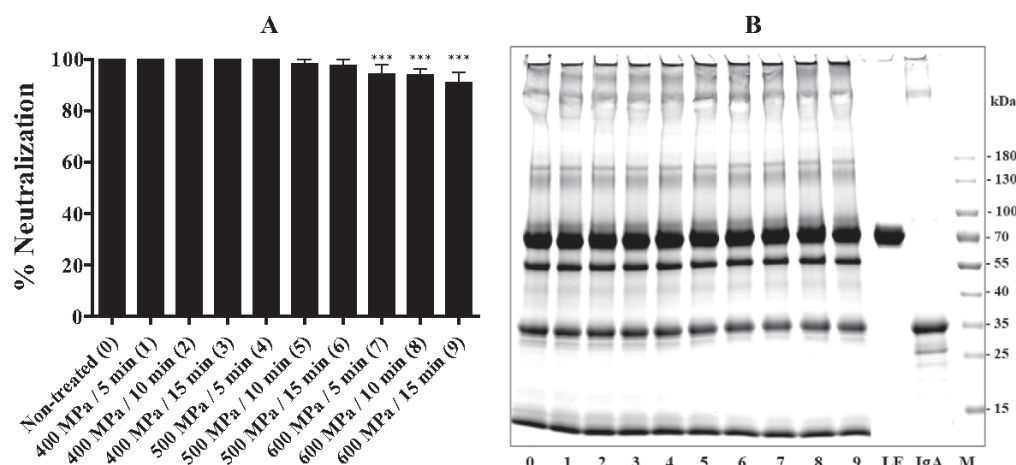


Fig. 6. Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of human whey against WCs rotaviral strain infection of MA104 cells. (A) Results expressed as percentage with respect to positive control as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $***p < 0.001$ ) in relation to non-treated whey. Whey was treated at 2 mg/mL of protein concentration. (B) Electrophoretic profile of HHP treated human whey. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining. LF, lactoferrin; IgA, immunoglobulins A; M, molecular weight marker. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments.

Human LF has also been reported to be altered after thermal treatments. Several studies agreed that HoP pasteurization of human milk causes a decrease of LF immunoreactivity, with losses ranging from 57 to 80% (Chang et al., 2013; Mayayo et al., 2014; Peila et al., 2016). Furthermore, several authors have pointed out that even HTST pasteurization may affect LF immunoreactivity, while to a lesser extent than HoP, causing losses from 35 to 60% (Mayayo et al., 2014; Peila et al., 2016). Heat treatments at lower temperatures, such as 40 °C or 60 °C for 30 min, did not cause significant changes in LF and IgA immunoreactivity (Chang et al., 2013).

At this respect, the present study points out that HTST pasteurization treatment preserves the antirotaviral activity of human whey, IgA and LF, better than HoP, what should be taken into account in the design of human milk processing conditions in order to maintain its bioactivity.

### 3.3. Effect of HHP treatment on the antirotaviral activity of human milk fractions and proteins

HHP treatments of different intensity were applied to human whey in order to evaluate the effect on its rotaviral neutralizing activity

(Fig. 6A). HHP treatments were slightly harmful to the antirotaviral activity of samples. In fact, HHP treatments at 400 and 500 MPa, for 5, 10 and 15 min, did not affect significantly the activity of human whey, as previously observed for HTST pasteurization. Likewise, the more severe HHP treatments of whey at 600 MPa for 5, 10 and 15 min, led to slight decreases of neutralizing activity, of 6, 6 and 9%, respectively, which is much lower than that produced by HoP (30%). The electrophoretic profile of HHP treated human whey (Fig. 6B) was in good accordance with the neutralizing results, since no apparent changes were observed in the intensity of the electrophoretic bands.

The effect of different HHP treatments on the rotavirus-neutralizing activity of native IgA and LF was different (Fig. 7A). It has been shown that HHP treatment seems to be more harmful to IgA than to LF. Thus, HHP treatments at 400, 500 and 600 MPa for 15 min caused significantly losses of the antirotaviral activity of IgA, of 21, 30 and 40%, respectively. These losses were much lower than those produced after HoP (98%), and significantly higher than those obtained after HTST pasteurization (0% of loss). However, none of the HHP treatments tested on LF, 400, 500 and 600 MPa for 15 min, affected significantly its activity, similarly to results obtained after HTST pasteurization, while in contrast with the 60% loss produced after HoP. Furthermore, no

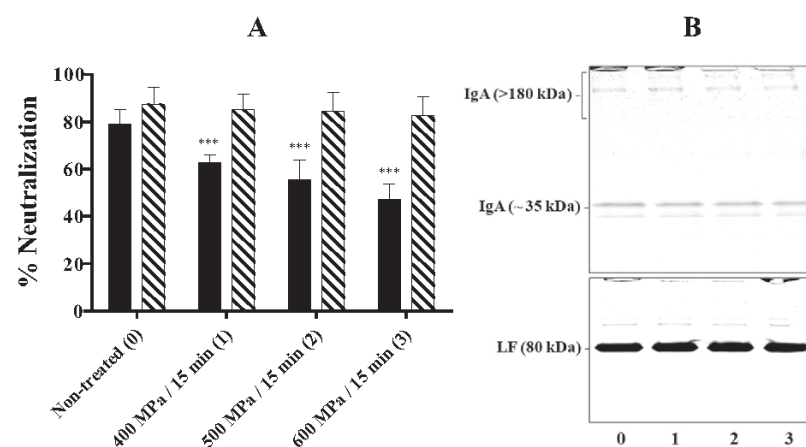


Fig. 7. Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of human immunoglobulin A (■) and lactoferrin (▨) against WCs rotaviral strain infection of MA104 cells. (A) Results expressed as percentage with respect to positive control as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences ( $***p < 0.001$ ) in relation to non-treated proteins. Immunoglobulin A (IgA) and lactoferrin (LF) were treated at 0.1 and 2 mg/mL, respectively. (B) Electrophoretic profile of HHP treated human proteins. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. Coomassie staining. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments.

decrease in the intensity of the electrophoretic bands corresponding to human IgA and LF after HHP treatments was observed (Fig. 7B), what may correlate with a minor damage of samples, in accordance with the neutralizing results.

Several studies have been carried out on the effect of applying HHP treatment to human milk, specifically determining IgA and LF content and immunoreactivity. Even though HHP has been reported to be less harmful to proteins than HoP, as we have observed in our study, some divergences exist among results from different studies. Thus, Sousa et al. (2014a) found that immunoreactivity of IgA was fully preserved after HHP treatment of human colostrum at 200 and 400 MPa up to 30 min, and even after pressures up to 600 MPa for 2.5 min. By contrast, in the same study it was shown that HHP treatment at 600 MPa for 15 min led to similar IgA losses than HoP pasteurization (20%). Furthermore, Viazis et al. (2007) showed that HHP processing of human milk at 400 MPa for 30, 60, 90, and 120 min resulted in losses of 14, 13, 19 and 25% IgA immunoreactivity, respectively, being lower than the decrease produced after HoP pasteurization (49%). Other studies have also indicated a high maintenance of IgA after HHP treatment of human milk. Thus, no loss of IgA was observed after treatment at 400 MPa for 5 min, while losses of 12 and 31% were produced after 500 and 600 MPa for 5 min, respectively (Permanyer et al., 2010). Contador et al. (2013) showed that human milk treated at 400 MPa for 6 min maintained IgA levels, determined by ELISA, higher than those resulting after HoP; whereas at 600 MPa for 6 min the decrease was similar to that obtained after HoP (50–60%). Similar results were observed by Mayayo et al. (2016) who showed that HHP treatments at 300, 400, 500 and 600 MPa for 30 min led to a decrease of IgA concentration of 20, 42, 53 and 64%, respectively, whereas HoP pasteurization caused a decrease of approximately 57%.

The effect of HHP on LF denaturation has been also investigated. HHP treatment of human milk at pressures of 300, 400, 500 and 600 MPa for 15 min resulted in 9, 23, 34 and 48% of LF denaturation, respectively, whereas HoP pasteurization denatured 80% (Mayayo et al., 2014). The same study also pointed out that LF aggregation did not take place after HHP, whereas aggregates involving disulphide bonds occurred during thermal treatments.

Divergences in results obtained between studies could be mainly attributed to different treatment conditions and equipment, with particular focus on holding times and initial temperature of the samples, and transmitting fluid in the pressure chamber. In fact, it is known that temperature reached during pressure treatment due to adiabatic compression is an important parameter that influences protein denaturation, as it has been observed for IgA (Delgado et al., 2013).

Results derived from the present study clearly suggest that HHP treatment, at pressures < 600 MPa for 15 min, is a potential alternative to HoP pasteurization of human milk, in terms of antirotaviral activity retention. However, more studies are needed to elucidate whether these conditions for treatment also respect the overall nutritional and hygienic quality criteria demanded by human milk banks.

#### 4. Conclusions

The results obtained in this study demonstrated that human milk is a valuable source of antirotaviral compounds, with whey fraction and the proteins IgA and LF showing the highest capacity. HoP pasteurization, which is currently recommended in all international human milk bank guidelines, has been proved to significantly decrease the antirotaviral activity of human whey, IgA and LF. Both HTST pasteurization and HHP treatment, at pressures < 600 MPa, have shown promising results as potential alternatives to HoP pasteurization of human milk, in terms of retention of antirotaviral activity. Despite that, more research is necessary in order to know which technological treatments and conditions should be applied to human milk to ensure microbiological safety, as well as maintenance of biological activity, making those treatments a reliable alternative to the conventional HoP pasteurization.

#### Funding

The work described herein was supported by Spanish government under a FPU Predoctoral Grant, a CICYT project (AGL2010-20835) and the European Social Fund.

#### References

- Arias, C. F., Silva-Ayala, D., Isa, P., Díaz-Salinas, M. A., & López, S. (2016). Rotavirus attachment, internalization, and vesicular traffic. In L. Svensson, U. Desselberger, H. B. Greenberg, & M. K. Estes (Eds.), *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis* (pp. 103–119). Cambridge: Academic Press.
- Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A. M., Biasini, A., ... Moro, G. E. (2010). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 23, 1–20.
- Asensi, M. T., Martínez-Costa, C., & Buesa, J. (2006). Anti-rotavirus antibodies in human milk: Quantification and neutralizing activity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42, 560–567.
- Babji, S., & Kang, G. (2012). Rotavirus vaccination in developing countries. *Current Opinion in Virology*, 2, 443–448.
- Barbana, C., Pérez, M. D., Pocoli, C., Sánchez, L., & Wehbi, Z. (2008). Interaction of human  $\alpha$ -lactalbumin with fatty acids: Determination of binding parameters. *Biochemistry (Moscow)*, 73, 711–716.
- Benfeldt, C., Larsen, L. B., Rasmussen, J. T., Andreasen, P. A., & Petersen, T. E. (1995). Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk. *International Dairy Journal*, 5, 577–592.
- Bishop, R. (2009). Discovery of rotavirus: Implications for child health. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24, 81–85.
- Chang, J., Chen, C., Fang, L., Tsai, C., Chang, Y., & Wang, T. (2013). Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. *Pediatrics and Neonatology*, 54, 360–366.
- Conesa, C., Sánchez, L., Rota, C., Pérez, M. D., Calvo, M., Farnaud, S., & Evans, R. W. (2008). Isolation of lactoferrin from milk of different species: Calorimetric and antimicrobial studies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 150, 131–139.
- Contador, R., Delgado-Adámez, J., Delgado, F. J., Cava, R., & Ramírez, R. (2013). Effect of thermal pasteurisation or high pressure processing on immunoglobulin and leukocyte contents of human milk. *International Dairy Journal*, 32, 1–5.
- Czank, C., Prime, D. K., Hartmann, B., Simmer, K., & Hartmann, P. E. (2009). Retention of the immunological proteins of pasteurized human milk in relation to pasteurizer design and practice. *Pediatric Research*, 66, 374–379.
- Das, J. K., Salam, R. A., & Bhutta, Z. A. (2014). Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27, 451–458.
- De Franco, M. T., Vieira, P. D., Santos, S. M. R., Ferreira, T. L., Araújo, E. D., Quintal, V. S., & Carbonare, S. B. (2013). Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatrics and International Child Health*, 33, 102–107.
- Delgado, F. J., Contador, R., Álvarez-Barrientos, A., Cava, R., Delgado-Adámez, J., & Ramírez, R. (2013). Effect of high pressure thermal processing on some essential nutrients and immunological components present in breast milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 50–56.
- Evans, T. J., Ryley, H. C., Neale, L. M., Dodge, J. A., & Lewame, V. M. (1978). Effect of storage and heat on antimicrobial proteins in human milk. *Archives of Disease in Childhood*, 53, 239–241.
- Gianino, P., Mastretta, E., Longo, P., Laccisaglia, A., Sartore, M., Russo, R., & Mazzaccara, A. (2002). Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *Journal of Hospital Infection*, 50, 13–17.
- Giribaldi, M., Coscia, A., Peila, C., Antoniazzi, S., Lamberti, C., Ortoffi, M., ... Cavallarin, L. (2016). Pasteurization of human milk by a benchtop high-temperature short-time device. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 228–233.
- Holsinger, V. H., Rajkowski, K. T., & Stabel, J. R. (1997). Milk pasteurisation and safety: A brief history and update. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 16, 441–451.
- Kunz, C., Kuntz, S., & Rudloff, S. (2014). Bioactivity of human milk oligosaccharides. In F. Moreno, & M. L. Sanz (Eds.), *Food oligosaccharides: Production, analysis and bioactivity*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Kvistgaard, A. S., Pallesen, L. T., Arias, C. F., López, S., Petersen, T. E., Heegaard, C. W., & Rasmussen, J. T. (2004). Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *Journal of Dairy Science*, 87, 4088–4096.
- Le, T. T., Van de Wiele, T., Do, T. N. H., Debysier, G., Struijs, K., Devreese, B., ... Van Camp, J. (2012). Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science*, 95, 2307–2318.
- Liu, B., & Newburg, D. S. (2013). Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeeding Medicine*, 8, 354–362.
- Lönnerdal, B. (2016). Bioactive proteins in human milk - potential benefits for preterm infants. *Clinics in Perinatology*, 44, 179–191.
- Marcotte, H., & Hammarström, L. (2016). Immunodeficiencies: significance for gastrointestinal disease. In L. Svensson, U. Desselberger, H. B. Greenberg, & M. K. Estes (Eds.), *Viral gastroenteritis. Molecular epidemiology and pathogenesis* (pp. 47–72). Kidlington: Academic Press.
- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Calvo, M., Sánchez, L., & Pérez, M. D. (2014). Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *International Dairy Journal*, 39, 246–252.



- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S. J., Martínez-Lorenzo, M. J., Calvo, M., Sánchez, L., & Pérez, M. D. (2016). Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk. *European Food Research and Technology*, *242*, 891–898.
- Newburg, D. S., Peterson, J. A., Ruiz-Palacios, G. M., Matson, D. O., Morrow, A. L., Shults, J., ... Taylor, M. R. (1998). Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*, *351*, 1160–1164.
- Pack, T. D. (2000). Purification of human IgA. *Current Protocols in Immunology*, *38*, 2.10B.1–2.10B.7.
- Parrón, J. A., Ripollés, D., Pérez, M. D., Calvo, M., Rasmussen, J. T., & Sánchez, L. (2016). Effect of heat treatment on antitrotaviral activity of bovine and ovine whey. *International Dairy Journal*, *60*, 78–85.
- Parrón, J. A., Ripollés, D., Pérez, M. D., Calvo, M., Rasmussen, J. T., & Sánchez, L. (2017). Antitrotaviral activity of bovine and ovine dairy byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*, 4280–4288.
- Payne, D. C., Boom, J. A., Staat, M. A., Edwards, K. M., Szilagyi, P. G., Klein, E. J., ... Parashar, U. D. (2013). Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children < 5 years of age, 2009–2011. *Clinical Infectious Diseases*, *57*, 13–20.
- Peila, C., Emmerik, N. E., Giribaldi, M., Stahl, B., Ruitenber, J. E., Van Elburg, R. M., ... Cavallarín, L. (2017). Human milk processing: A systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *64*, 353–361.
- Peila, C., Moro, G. E., Bertino, E., Cavallarín, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., ... Coscia, A. (2016). The effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: A review. *Nutrients*, *8*, 477–496.
- Permanyer, M., Castellote, C., Ramírez-Santana, C., Audí, C., Pérez-Cano, F. J., Castell, M., ... Franch, A. (2010). Maintenance of breast milk immunoglobulin A after high-pressure processing. *Journal of Dairy Science*, *93*, 877–883.
- Peterson, R., Cheah, W. Y., Grinyer, J., & Packer, N. (2013). Glycoconjugates in human milk: Protecting infants from disease. *Glycobiology*, *23*, 1425–1438.
- Pontes, L., Cordeiro, Y., Giongo, V., Villas-Boas, M., Barreto, A., Araújo, J. R., & Silva, J. L. (2001). Pressure-induced formation of inactive triple-shelled rotavirus particles is associated with changes in the spike protein VP4. *Journal of Molecular Biology*, *307*, 1171–1179.
- Prasad, B. V. V., Shanker, S., Hu, L., Choi, J. M., Crawford, S. E., Ramani, S., ... Estes, M. K. (2014). Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Current Opinion in Virology*, *7*, 119–127.
- Silva, J. L., Oliveira, A. C., Vieira, T. C. R. G., De Oliveira, G. A. P., Suarez, M. C., & Foguel, D. (2014). High-pressure chemical biology and biotechnology. *Chemical Reviews*, *114*, 7239–7267.
- Sousa, S. G., Delgado, I., & Saraiva, J. A. (2014a). Effect of thermal pasteurisation and high-pressure processing on immunoglobulin content and lysozyme and lactoperoxidase activity in human colostrum. *Food Chemistry*, *151*, 79–85.
- Sousa, S. G., Delgado, I., & Saraiva, J. A. (2014b). Human milk composition and preservation: Evaluation of high-pressure processing as a non-thermal pasteurisation technology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *56*, 1043–1060.
- Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P., & Antonini, G. (2001). Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1528*, 107–115.
- Svensson, M., Sabharwal, H., Håkansson, A., Mossberg, A. K., Lipniunas, P., Leffler, H., ... Linse, S. (1999). Molecular characterization of alpha-lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 6388–6396.
- Viazis, S., Farkas, B. E., & Allen, J. C. (2007). Effects of high-pressure processing on immunoglobulin A and lysozyme activity in human milk. *Journal of Human Lactation*, *23*, 253–261.
- WHO (2003). Infant and young child feeding. *A tool for assessing national practices, policies and programmes*. Geneva: World Health Organization.
- Wojcik, K. Y., Rechtman, D. J., Lee, M. L., Montoya, A., & Medo, E. T. (2009). Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *Journal of the American Dietetic Association*, *109*, 137–140.
- Volken, R. H., Peterson, J. A., Vonderfecht, S. L., Fouts, E. T., Midthun, K., & Newburg, D. S. (1992). Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *Journal of Clinical Investigation*, *90*, 1984–1991.



4.1.6. **Artículo 6.** Effect of high pressure treatment on antirotaviral activity of bovine and ovine dairy by-products and bioactive proteins

---





Contents lists available at ScienceDirect

Innovative Food Science and Emerging Technologies

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/IFSET](http://www.elsevier.com/locate/IFSET)

## Effect of high pressure treatment on the antirotaviral activity of bovine and ovine dairy by-products and bioactive milk proteins



José Antonio Parrón<sup>a</sup>, Daniel Ripollés<sup>a</sup>, Fanny Navarro<sup>b</sup>, Sergio José Ramos<sup>c</sup>,  
María Dolores Pérez<sup>a</sup>, Miguel Calvo<sup>a</sup>, Lourdes Sánchez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2), Universidad de Zaragoza/CITA, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Escuela de Nutrición y Dietética, Universidad de los Andes, Avenida Don Tulio, Mérida, Venezuela

<sup>c</sup> Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria (CNTA), Carretera Na134, km 53, 31570 San Adrián, Navarra, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Dairy by-products  
Whey / buttermilk  
Antirotaviral activity  
HHP  
Pasteurization

### ABSTRACT

Whey and buttermilk have shown a certain degree of neutralizing activity against rotavirus, which are still a serious public health problem worldwide. High hydrostatic pressure (HHP) can be an alternative to thermal treatment for preservation of dairy products, providing acceptable safety and shelf life with minimal effects on their quality. The main objective of the present study was to evaluate the effect of HHP treatments of 400, 500 or 600 MPa for 5, 10 and 15 min, at 20 °C, on the antirotaviral activity of bovine and ovine whey and buttermilk, along with the effect of HHP and thermal treatments on the activity of some bioactive proteins, such as immunoglobulins and lactoferrin. The antirotaviral activity of dairy fractions was barely affected by treatments below 500 MPa for 15 min, with the greatest activity loss of 17%. High temperature-short time pasteurization was not significantly harmful to the antirotaviral activity of any of the milk proteins tested, which maintained 90–100% of their activity. By contrast, notable differences were observed among proteins regarding the loss of their activity upon low temperature-long time pasteurization and HHP treatments, with losses ranging 0–78% and 0–88%, respectively.

### 1. Introduction

Whey is the main by-product of cheese-making industry, being a good source of proteins with high nutritional value and interesting functional properties (Blecker et al., 1997). The world cheese production was estimated as nearly 23 million tons in 2017 (OECD/FAO, 2016), which resulted in an approximate amount of 180 million tons of whey (Mollea, Marmo, & Bosco, 2013). Buttermilk is the aqueous phase released during the churning of cream, constituting the main by-product from butter manufacture. Despite buttermilk has been undervalued for many years, it is gaining substantial attention due to its technological properties, such as the emulsifying capacity, which is related to its protein and polar lipid content of the milk fat globule membrane (MFGM) (Vanderghem et al., 2010). It was estimated a butter production near 11 million tons in 2017 (OECD/FAO, 2016), resulting in an equivalent amount of buttermilk (Morin, Jiménez-Flores,

& Pouliot, 2007).

Several studies have attributed biological activities to the components of whey and buttermilk, along with their functional properties (Mollea et al., 2013; O'Riordan, Kane, Joshi, & Hickey, 2014). Among them, their activity against rotavirus infection (Parrón et al., 2016, 2017) is of great interest as this agent is the leading cause of severe diarrheal disease in infants and young children, and one of the top five causes of death worldwide across all age groups (Marcotte & Hammarström, 2016). Rotaviruses are non-enveloped viruses that are enclosed in a capsid consisting of three concentric protein layers, the outermost being formed by a smooth surface of the glycoprotein VP7 from which spikes of VP4 protrude (Pesavento, Crawford, Estes, & Prasad, 2006). These two viral surface proteins have been shown to be involved in rotavirus intestinal cell entry (Arias, Silva-Ayala, Isa, Díaz-Salinas, & López, 2016). The binding to the intestinal cell surface is mediated by the initial interaction of protein VP4 (VP8 domain) with a

*Abbreviations:* LDH, lactadherin; LF, lactoferrin; LTLT, low temperature-long time; HHP, high hydrostatic pressure; HTST, high temperature-short time; IgG, immunoglobulin G; MFGM, milk fat globule membrane; PBS, phosphate buffered saline; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; XOD, xanthine oxidase

\* Corresponding author.

E-mail address: [lousanchez@unizar.es](mailto:lousanchez@unizar.es) (L. Sánchez).

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.007>

Received 12 March 2018; Received in revised form 4 July 2018; Accepted 6 July 2018

Available online 07 July 2018

1466-8564/© 2018 Published by Elsevier Ltd.

sialylated cellular receptor. The VP5 domain of VP4 and the glycoprotein VP7 interact with several cell surface molecules in the post-binding steps.

Some milk-derived fractions, such as whey, buttermilk and MFGM have been shown to possess antirotaviral activity, what has been mainly related to their overall content of free and conjugated glycans (O'Riordan et al., 2014). Furthermore, some milk glycoproteins, such as immunoglobulins, lactoferrin, mucins, lactadherin and lactophorin have been proved to exert some degree of antirotaviral activity (Inagaki et al., 2010; Parrón et al., 2016, 2017). In a recent study, the neutralizing activity of several bovine milk glycoproteins was determined to be directed to either VP4 or VP7, or to both rotavirus capsid proteins, supporting the idea that the main mechanism of rotavirus neutralization by milk components is exerted at the level of the binding stage to the intestinal cell surface (Parrón et al., 2018).

In view of previous studies and due to the low cost and availability of large amount of whey and buttermilk, these fractions can be considered as valuable dairy by-products with potential applications in food and pharmaceutical industries. However, technological treatments usually applied in industry can lead to adverse modifications. Several reports have proven that thermal treatments, such as pasteurization, used by the dairy industry may affect some of their components, thus reducing their nutritional and biological value. In this line, it was shown that heat treatment of bovine and ovine whey and buttermilk led to a certain damage of their antirotaviral capacity (Parrón et al., 2016, 2017), what was mainly attributed to denaturation and/or aggregation of the proteins exerting that activity (Chevalier, Hirtz, Sommerer, & Kelly, 2009; Morin et al., 2007).

High hydrostatic pressure (HHP) is a non-thermal treatment considered as an alternative to thermal processing, since it is known to provide microbiologically safe food products while maintaining proteins, vitamins and sensory quality better than other treatments (Chawla, Patil, & Singh, 2011). However, HHP may cause substantial modifications to milk proteins, by affecting their technological properties and the final quality of dairy products (Patel & Huppertz, 2014). In fact, pressure induces denaturation of whey proteins and affects casein micelle structure, causing micellar disruption and reaggregation, and releasing soluble casein particles (Huppertz, Fox, & Kelly, 2004).

Despite several studies describe the HHP-induced changes on milk proteins and the influence of pressure on different milk properties (for review see Chawla et al., 2011), to our knowledge there are no studies focusing on the effect of HHP on the antirotaviral activity. Therefore, the main aim of the present study has been to evaluate the effect of several HHP treatments on the antirotaviral activity of various dairy by-products and some of their proteins. The influence of thermal treatment on the antirotaviral activity of some milk proteins was also studied.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and antibodies

Minimal essential medium (MEM), heat-inactivated foetal bovine serum, L-glutamine, antibiotics (penicillin-streptomycin), and amphotericin B were purchased from Gibco (Life Technologies Corporation, Paisley, UK). DEAE-Sepharose, SP-Sepharose, Q-Sepharose, Sephacryl S300, Sephacryl S200 and Concanavalin A agarose were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). Bovine native LF was kindly provided by Tatua Nutritionals Company (Morrinsville, New Zealand). Bovine rotavirus-specific lamb antiserum was kindly donated by Dr. David Snodgrass from the Moredun Research Institute (Edinburgh, UK). Specific primary rabbit antibodies against individually purified milk proteins were kindly donated by Dr. Jan Trige Rasmussen from the Protein Chemistry Laboratory (Aarhus, Denmark).

Trypsin from porcine pancreas type IX-S, gelatine and donkey anti-sheep immunoglobulin antiserum conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,

USA). Recombinant chymosin was purchased from Chr. Hansen (Hørsholm, Denmark). Mini-Protean TGX gels of 4–20% polyacrylamide were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Pierce BCA Protein Assay Kit was from Thermo Fisher Scientific (Rockford, IL, USA). Coomassie Brilliant Blue R-250 was purchased from Serva Feinbiochemica (Heidelberg, Germany). Immobilon-PVDF membranes were from Millipore (Bedford, MA, USA).

### 2.2. Cells and rotavirus propagation

The bovine rotavirus WC3 strain (ATCC VR-2102) was propagated in the Rhesus monkey kidney cell line MA104 (ATCC CRL-2378) according to previously described procedures (Parrón et al., 2016). In short, cells were cultured until confluence in tissue culture flasks with MEM supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 1% antibiotics (100 Units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin), 2 mM L-glutamine and 0.25 µg/mL amphotericin B.

For rotavirus propagation, confluent cell flasks were infected at a multiplicity of infection (MOI, ratio virus/cell) of 0.1 with an aliquot of a rotavirus suspension. Upon incubation at 37 °C for 1–3 d, when the cell monolayer was fully lysed, virus was harvested by three cycles of freezing at –80 °C and thawing at 37 °C. After centrifugation at 300g for 15 min at 4 °C, the clarified rotavirus suspension was titrated, aliquoted in cryovials and stored at –80 °C until use in the infectivity assays. The viral titer of the final rotavirus suspension was about  $7.8 \times 10^5$  Focus Forming Units (FFU)/mL, calculated according to Arnold, Patton, and McDonald (2009).

### 2.3. Obtaining milk fractions

Raw milk from cow and sheep was provided by the dairy industry Villacorona (El Burgo de Ebro, Zaragoza, Spain). Bovine and ovine whey were obtained from raw milk upon skimming using a cream separator and further coagulation with recombinant chymosin at 35 °C for 45 min. Whey fractions were recovered by decanting the curd and filtering whey through glass wool.

The procedure for obtaining bovine and ovine buttermilk from raw milk was carried out basically as previously described (Le, Van Camp, Rombaut, van Leeckwyck, & Dewettinck, 2009). The cream, obtained by skimming raw milk, was washed twice with four volumes of washing buffer (0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 2.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2, with 1 mM EDTA) and centrifuged at 2800g for 15 min at 4 °C. The washed cream was stored at 4 °C overnight and churned into butter, obtaining buttermilk that was collected and filtered through several layers of cheesecloth. In order to evaluate the influence of cream washing on the antirotaviral activity of the HHP-treated buttermilk, the procedure was also performed without the washing operation. All milk fractions were freeze-dried and stored at –20 °C until further analysis.

### 2.4. Purification of proteins

Bovine and ovine immunoglobulins G (IgG) were isolated, according to Mainer, Sánchez, Ena, and Calvo (1997), by means of precipitation with ammonium sulfate followed by DEAE-Sepharose chromatography. Lactoferrin (LF) was purified from ovine milk using cation exchange chromatography on SP-Sepharose according to the procedure of Conesa et al. (2008). Bovine and ovine xanthine oxidase (XOD) were obtained as described by Berglund, Rasmussen, Andersen, Rasmussen, and Petersen (1996), through treatment of buttermilk with cold butanol and ammonium sulphate precipitation, followed by anion-exchange chromatography on Q-Sepharose and gel-filtration on Sephacryl S300. Bovine lactadherin (LDH) was isolated as described by Kim, Kanno, and Mizokami (1992), by means of gel-filtration on Sephacryl S200 and further affinity chromatography on Concanavalin A agarose.

All purified proteins were dialyzed against phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.14 M NaCl, 2.6 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

1.4 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4, freeze-dried and stored at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  until further analysis. The protein solutions were reconstituted in PBS prior to analysis, sterilized through a low-binding protein 0.22- $\mu\text{m}$  filter, and its protein concentration quantified by the BCA Protein Assay.

### 2.5. Rotavirus neutralization assay

The rotavirus neutralization assay was performed *in vitro* as previously described and validated in the study of Parrón et al. (2016). In brief, rotavirus suspension was activated by incubation with 20- $\mu\text{g}/\text{mL}$  trypsin for 1 h at  $37\text{ }^\circ\text{C}$ , as a required step to make rotavirus particles infective by cleaving the VP4 capsid protein (Arias, Romero, Alvarez, & López, 1996). For neutralization, milk fractions and proteins were mixed (1:1) with the activated rotavirus suspension (diluted to achieve a final MOI of 0.02) and incubated for 1 h at  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Afterwards, the mixtures were transferred (100  $\mu\text{L}/\text{well}$ ) into 96-well plates with confluent MA104 cells and incubated at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  for 16 h with gentle rotation. Serum-free MEM and rotavirus suspension without neutralizing agents were included as negative and positive controls of infectivity, respectively.

Virus-infected cells were detected then by immunofluorescence as follows. Plates were washed once with PBS and fixed with 200  $\mu\text{L}/\text{well}$  of acetone:methanol:formalin (1:1:1) at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 min. The fixed cells were washed twice with PBS and incubated with bovine rotavirus-specific lamb antiserum diluted 1:300 (in PBS with 2% gelatine) at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  overnight. Afterwards, wells were washed twice with PBS and incubated with donkey anti-sheep immunoglobulin antiserum conjugated with FITC diluted 1:300 (in PBS with 2% gelatine) at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 h. The infectivity percentages were determined by enumerating fluorescent foci (infected cells) in each well using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse E400) with a FITC-compatible filter, by image analysis using the Zen lite 2012 software. The rotavirus neutralizing percentages were calculated in relation to positive controls.

### 2.6. HHP treatment of milk fractions and proteins

The concentrations of milk fractions selected for HHP treatments were those showing rotavirus neutralizing activity above 80%: for bovine and ovine whey were 2 and 4 mg protein/mL, respectively, and for bovine and ovine buttermilk 5 and 2.5 mg protein/mL, respectively. Bovine IgG, LF, XOD and LDH were treated at 0.1, 1, 0.5 and 0.1 mg protein/mL, respectively. The ovine proteins IgG and LF were treated at 0.5 and 1 mg protein/mL, respectively.

High pressure procedure was based on that previously described by Mayayo et al. (2014). Aliquots (2 mL) of milk samples were introduced into polyethylene bags, which were heat-sealed and pressurised using a Stansted Fluid Power FPG 11500 B (Stansted, Essex, United Kingdom), with propylene glycol/water (70/30, v/v) as the pressure-transmitting fluid. The chamber volume was of 30 mL. Pressure was raised to 400, 500 or 600 MPa and maintained at those values for 5, 10 and 15 min. The pressure was increased at 240 MPa/min, which gave come-up times of 1.6, 2.1 and 2.5 min at 400, 500 and 600 MPa, respectively. The initial temperature of transmitting fluid and samples was equilibrated at  $20\text{ }^\circ\text{C}$ , and the approximate temperature increase was  $3\text{ }^\circ\text{C}$  per 100 MPa. HHP-treated samples were kept at  $4\text{ }^\circ\text{C}$  until analysis by SDS-PAGE and by the rotavirus infectivity assay.

### 2.7. Thermal treatment of proteins

The bovine proteins IgG, LF, XOD and LDH, and the ovine proteins IgG and LF were heat-treated at the same protein concentrations previously used for HHP treatment. Heat treatment procedure was based on that previously used by Parrón et al. (2016), whereby aliquots of milk protein solutions (1 mL) were placed in sterile glass vials (7 mm outer diameter and 6 mm inner diameter) and heated in a thermostatic bath ( $\pm 0.1\text{ }^\circ\text{C}$ ) at different temperatures and holding times:  $63\text{ }^\circ\text{C}$  for

30 min (low-temperature long-time pasteurization, LTLT),  $75\text{ }^\circ\text{C}$  for 20 s (high-temperature short-time pasteurization, HTST) or 10 min, and  $85\text{ }^\circ\text{C}$  for 20 s or 10 min. After heat treatment, the samples were immediately ice-cooled and stored at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  until analysis. Heat-treated samples were analysed by SDS-PAGE and by the rotavirus infectivity assay to evaluate the influence of thermal treatments on the anti-rotaviral activity of milk proteins, in comparison with HHP treatments.

### 2.8. SDS-PAGE and Western-blotting

Protein profiles of milk fractions and proteins were analysed by SDS-PAGE using 4–20% polyacrylamide gels, which were Coomassie Blue and Periodic Acid Schiff (PAS) stained according to standard procedures. Western-blotting procedure was performed, to confirm the identity of purified milk proteins, according to Benfeldt, Larsen, Rasmussen, Andreasen, and Petersen (1995) using PVDF membranes. Quantification of protein concentration of milk samples, as a setting step prior to SDS-PAGE and rotavirus infectivity assays, was done by the BCA Protein Assay.

### 2.9. Compositional analysis

Bovine and ovine whey and buttermilk, which had been freeze-dried after isolation, were reconstituted at 10% (w/v) with distilled water to determine their composition. The protein, lipid and lactose contents of the fractions were determined by infrared spectroscopy using a MilkoScan 4000 (Foss Electric, Hilleroed, Denmark).

### 2.10. Statistical analysis

Results were analysed for statistical significance with GraphPad Prism 5 software, by using a Kolmogorov-Smirnov normality test and a One-way ANOVA with Tukey's Multiple Comparison Test.

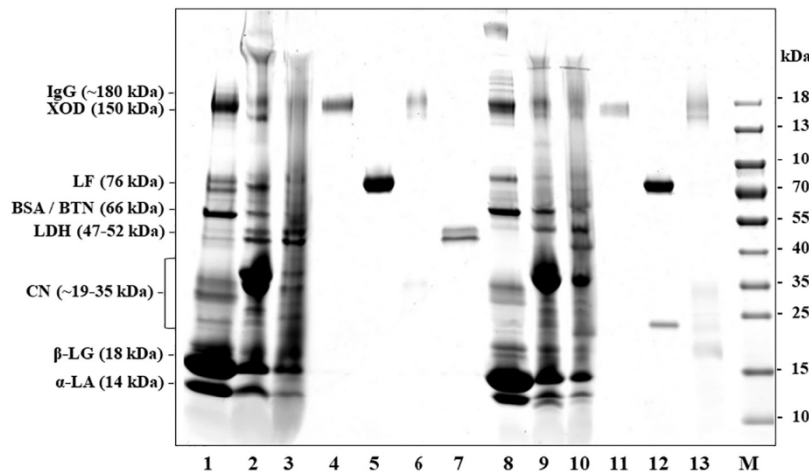
## 3. Results and discussion

### 3.1. Milk fractions and proteins

In the present study, the protein profile of bovine and ovine dairy by-products was characterized by SDS-PAGE (Fig. 1). It can be observed that the electrophoretic protein profile obtained for bovine and ovine whey followed the characteristic pattern (Yadav et al., 2015), with the major proteins  $\beta$ -lactoglobulin ( $\beta$ -LG),  $\alpha$ -lactalbumin ( $\alpha$ -LA), immunoglobulins, bovine serum albumin (BSA), and LF. Bovine whey presented percentages of protein, lipid, and lactose of 13, 1, and 68% (w/w), respectively, in agreement with those reported by Yadav et al. (2015). The protein content of the ovine whey was of 21% (w/w), higher than that of its bovine counterpart.

The composition of bovine and ovine buttermilk was consistent with data of previous reports (Britten, Lamothe, & Robitaille, 2008; Hamad, Ismail, & El-Menawy, 2016; Vanderghem et al., 2010). Thus, ovine buttermilk from non-washed cream presented very similar protein and lactose contents, 30.5 and 39.5% (w/w), respectively, in comparison with its bovine homologous, with values of 27.5 and 39% (w/w), respectively. Instead, the lipid content of ovine buttermilk from non-washed cream, of 20% (w/w), was clearly higher than that of bovine buttermilk, of 15.5% (w/w). Moreover, it was observed a similar protein profile for bovine and ovine buttermilk (Fig. 1). In both cases, it was observed the presence of caseins and the whey proteins  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, and LF, along with some MFGM proteins, such as butyrophilin (BTN), LDH and XOD, in agreement with previous studies (Britten et al., 2008).

With respect to bovine and ovine buttermilk derived from washed cream, it was observed that some compounds were removed upon washing. Thus, even though the lipid fraction was not affected, the protein and lactose contents were clearly diminished up to 15 and 14.5% (w/w), and 16 and 17% (w/w), after washing both bovine and



**Fig. 1.** Electrophoretic profile of milk fractions and proteins. Lane 1, bovine whey; lane 2, bovine buttermilk from non-washed cream; lane 3, bovine buttermilk from washed cream; lane 4, bovine immunoglobulin G (IgG); lane 5, bovine lactoferrin (LF); lane 6, bovine xanthine oxidase (XOD); lane 7, bovine lactadherin (LDH); lane 8, ovine whey; lane 9, ovine buttermilk from non-washed cream; lane 10, ovine buttermilk from washed cream; lane 11, ovine IgG; lane 12, ovine LF; lane 13, ovine XOD; M, molecular weight marker. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel. PAS + Coomassie staining. BSA, bovine serum albumin; BTN, butyrophilin; CN, caseins;  $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulin;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbumin.

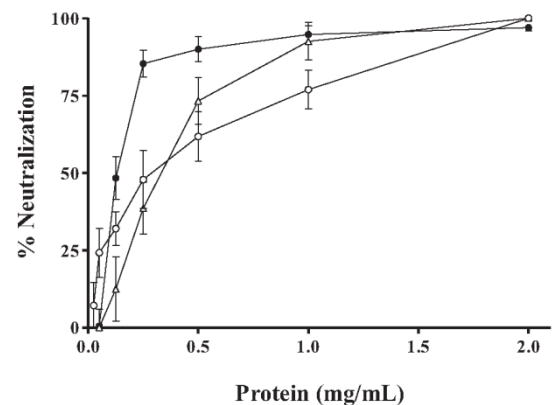
ovine buttermilk, respectively. The effect of washing was also evidenced when comparing the electrophoretic profiles of washed and non-washed buttermilk (Fig. 1). In fact, diverse proteins such as caseins (mainly  $\kappa$ -casein), the whey proteins  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA and LF, and also some proteins from the milk fat globule membrane, such as XOD and BTN, were shown to clearly diminish after washing buttermilk, which is in good accordance with results of other studies (Holzmüller, Müller, Himbert, & Kulozik, 2016; Le et al., 2009).

The efficacy of the protein purification procedures used in this study to isolate bovine and ovine IgG and XOD, bovine LDH and ovine LF was confirmed by SDS-PAGE (Fig. 1). Commercial native bovine LF analysed by SDS-PAGE revealed a main band corresponding to a protein of about 76 kDa (Fig. 1), so it was used without further purification for the different assays performed in this work. The identity of proteins was verified by Western-blotting using specific antibodies (data not shown).

### 3.2. Antiviral activity of ovine proteins

Diverse studies have previously attributed some degree of antiviral activity to several fractions and proteins from bovine milk (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010; Superti et al., 2001). In this line, previous studies carried out in our research group confirmed that several fractions from bovine and ovine milk, including whey and buttermilk, showed ability to neutralize the infection of MA104 cells with the rotavirus strain WC3 (Parrón et al., 2016, 2017). Evidence on the antiviral potential of several bovine milk proteins, such as IgG, LF, LDH and XOD were also reported in those studies. Despite this, very little evidence exists on the antiviral potential of milk components of species different from bovine and human.

The present study provides data on the antiviral capacity of diverse ovine milk proteins (Fig. 2). It was observed that ovine IgG, at 0.5 mg/mL, had the capacity to neutralize 62% of MA104 cells infection by WC3 rotavirus. This finding highlighted some interspecies differences, since bovine IgG showed a significantly higher activity over 90% at 0.02 mg/mL in a previous study performed *in vitro* under the same conditions (Parrón et al., 2016). Bovine IgG at 0.02 mg/mL was also reported to inhibit over 70% the infection of Caco-2 cells by human Wa rotavirus (Bojsen et al., 2007). Present results regarding antiviral activity of ovine LF (Fig. 2) prove that this protein at 0.25 mg/mL has a WC3-neutralizing activity of 85%. This result is very close to that obtained for the bovine counterpart in the same experimental conditions, as bovine LF exerted a WC3-antiviral activity of 82% at 0.25 mg/mL (Parrón et al., 2016). Similarly, Superti et al. (2001) attributed to bovine LF the capacity of inhibiting 75–85% of human HT-29 cells infection by SA-11 rotavirus. With respect to ovine XOD, it has been



**Fig. 2.** Dose-response of ovine milk proteins on neutralizing infection of MA104 cells by WC3 rotavirus strain. Immunoglobulin G (IgG, white circles); lactoferrin (LF, black circles); xanthine oxidase (XOD, white triangles). Results are shown as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ).

shown in our study that this protein possesses the capacity to neutralize MA104 cells infection by WC3 strain. In fact, it was observed a 73% neutralization at XOD concentration of 0.5 mg/mL (Fig. 2), somewhat lower than the previously reported activity for bovine XOD that was of 92% at the same concentration (Parrón et al., 2017).

The antiviral activity of milk proteins has been mainly attributed to their carbohydrate content, since glycans are well-known to be involved in receptor-ligand and host-pathogen interactions (Prasad et al., 2014). At this respect, divergences in the antiviral activities between milk proteins may be explained by their different degree and type of glycosylation, which has been previously documented (O’Riordan et al., 2014). Furthermore, the fact that diverse rotavirus strains differ in their binding preferences towards glycans (Arias et al., 2016) may also contribute to explain the divergences in the results. Besides that, the antiviral activity of XOD has no evident explanation. In fact, the glycosylation of XOD has not been fully confirmed, some authors even suggesting that bovine XOD is not glycosylated (Mather, 2000). Thus, the antiviral mechanism of milk-derived XOD merits further investigations.



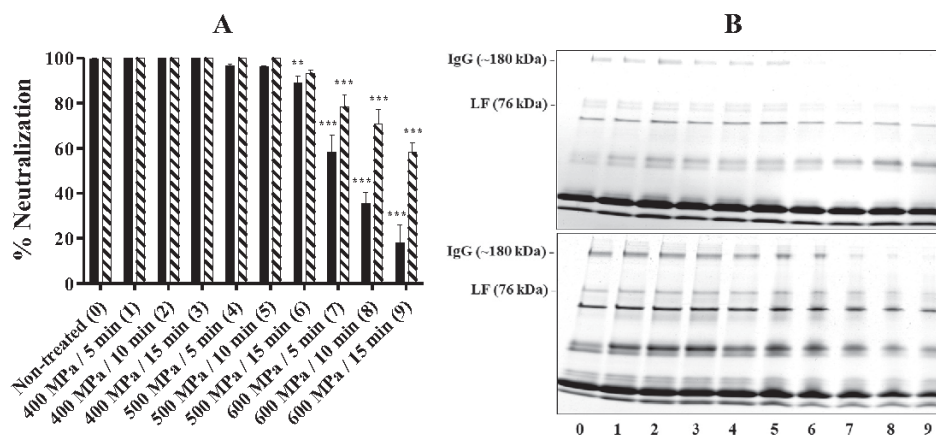


Fig. 3. (A) Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of bovine (black bars) and ovine (slashed bars) whey against WC3 rotaviral strain infection of MA104 cells. Results are expressed as percentage with respect to positive controls, as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ) in relation to non-treated whey. Bovine and ovine whey were treated at 2 and 4 mg/mL of protein concentration, respectively. (B) Electrophoretic profile of HHP treated bovine (upper) and ovine (lower) whey. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel and it was Coomassie blue stained. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments. IgG, immunoglobulin G; LF, lactoferrin.

### 3.3. Effect of HHP treatment on the antirotaviral activity of milk fractions

The effect of HHP treatment applied to bovine and ovine whey on its neutralizing activity against WC3 rotavirus was evaluated in this study (Fig. 3A). It was observed that HHP treatment of bovine whey at 500 MPa for 10 min and treatments at lower intensity did not cause a significant decrease in its antirotaviral activity. Moreover, 500 MPa for 15 min led to 10% loss of neutralizing activity, while greater losses were observed after treatments of higher intensity, reaching 82% decrease of activity upon 600 MPa for 15 min. Similar results were obtained for ovine whey, with no significant losses of activity at 500 MPa for 15 min, while 42% decrease of activity was found upon 600 MPa for 15 min (Fig. 3A). In accordance with this, the electrophoretic profile of whey samples subjected to HHP treatments (Fig. 3B) showed a decrease in the intensity of some protein bands, mainly those corresponding to IgG and LF, becoming more evident at the treatments of highest intensity. As can be noted, a similar electrophoretic pattern was observed for bovine and ovine whey. In a previous study (Parrón et al., 2016), bovine and ovine whey were heat-treated in order to evaluate the effect of this treatment on their antirotaviral activity against the strain WC3. Thus, it was stated that LTLT and HTST pasteurization, as well as HHP treatments below 500 MPa for 15 min, were not harmful to their neutralizing capacity.

The rotavirus-neutralizing activity of bovine and ovine buttermilk was evaluated in the present study. Furthermore, the impact of cream washing before obtaining buttermilk on its susceptibility to HHP treatment was also investigated. As it can be observed in Fig. 4A, the antirotaviral activity of bovine buttermilk from non-washed cream did not significantly diminish after treatment at 500 MPa for 15 min, even if losses ranging from 13 to 21% were evidenced upon 600 MPa for 5–15 min. It was noticeable the significant minor resistance to HHP exhibited by bovine buttermilk obtained from washed cream (Fig. 4A). In fact, it was observed a 17% decrease of neutralizing activity after 500 MPa for 5 min, rising to 99% decrease upon 600 MPa for 15 min. Even though such differences in the neutralizing activity of buttermilk were not clearly reflected in the electrophoretic patterns (Fig. 4B), they may be associated to the loss of some buttermilk components along the washing steps.

With respect to ovine buttermilk, it was found an overall higher resistance to HHP in comparison with the bovine counterpart. Thus, as regards ovine buttermilk from non-washed cream, no significant losses

of antirotaviral activity were observed even after 600 MPa for 10 min, and only 15% decrease upon 600 MPa for 15 min (Fig. 5A). Ovine buttermilk from washed cream also showed higher resistance than the bovine homologous, since no significant decrease of neutralizing activity was found even upon 500 MPa for 15 min, while 57% decrease of activity was recorded at 600 MPa for 15 min (Fig. 5A). Once again, the cream washing process caused the loss of components (Fig. 5B), thus increasing the susceptibility of ovine buttermilk to HHP treatment, even though not as markedly as it was observed for bovine buttermilk. It would appear that ovine buttermilk is not affected as much as bovine buttermilk by the washing process of cream or that it contains a greater amount of components resistant to HHP.

These findings are in line with a previous study conducted by our group (Parrón et al., 2017), in which bovine and ovine buttermilk fractions from non-washed cream maintained their antirotaviral activity upon heat treatment in comparison with the homologous fractions from washed cream. It was also shown that the antirotaviral activity of buttermilk was affected in a different extent by heating, depending on the species origin.

Divergences in results may be attributed to different susceptibility of milk components to pressure-induced denaturation and aggregation. It has been reported that pressure-induced reactions of whey proteins lead to the unfolding of monomeric proteins, aggregation and gelation. These structural changes are mediated by intra- and intermolecular bonds within or between the molecules linked by hydrophobic interactions and disulfide bridges, depending on the type and concentration of protein, pH, ionic strength, intensity of the pressure treatment and pressurizing temperature (Patel & Huppertz, 2014). In this line, it has been stated that the whey proteins  $\alpha$ -LA and  $\beta$ -LG are denatured to different extent by HHP treatment, the former being more resistant than the latter. Furthermore,  $\beta$ -LG has been shown to associate with the casein micelles upon treatment of milk at 300–600 MPa, and also to form amorphous aggregates (Scollard, Beresford, Needs, Murphy, & Kelly, 2000).

All these differences with regard to denaturation, interaction and aggregation of proteins will result in structurally and compositionally different products, which ultimately may affect their functionality (Patel, Singh, Anema, & Creamer, 2006). Further studies are needed to fully understand the mechanisms by which HHP-induced changes affect the bioactivity of dairy fractions, including the ability to interact with rotaviral particles.

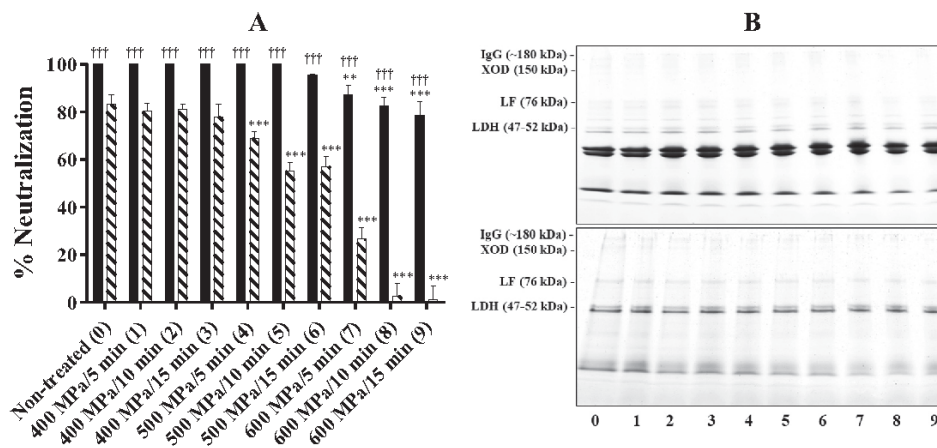


Fig. 4. (A) Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of non-washed (black bars) and washed (slashed bars) bovine buttermilk on WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Bovine buttermilk was tested at 5 mg protein/mL. Results are expressed as percentage with respect to positive controls, as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001) in relation to non-treated buttermilk. Daggers indicate statistically significant differences (†††p < 0.001) in relation to washing process. (B) Electrophoretic profile of HHP treated bovine buttermilk from non-washed (upper) and washed (lower) cream. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel and was Coomassie blue stained. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments. IgG, immunoglobulin G; XOD, xanthine oxidase; LF, lactoferrin; LDH, lactadherin.

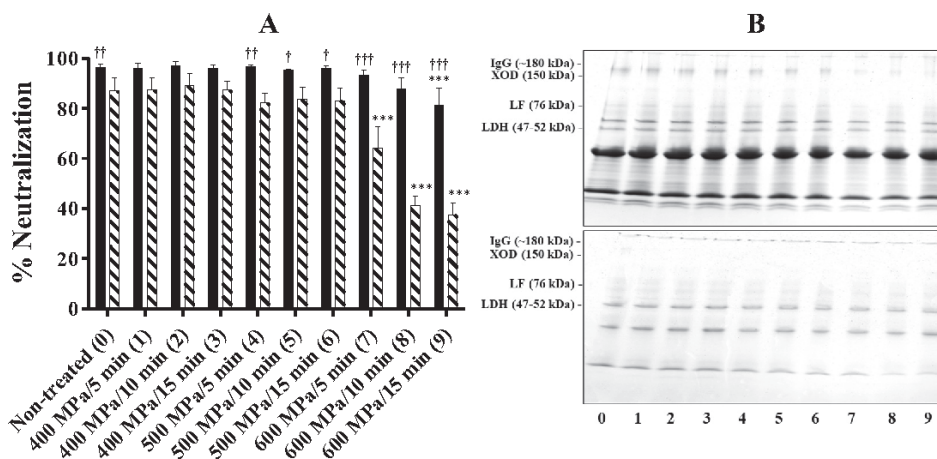
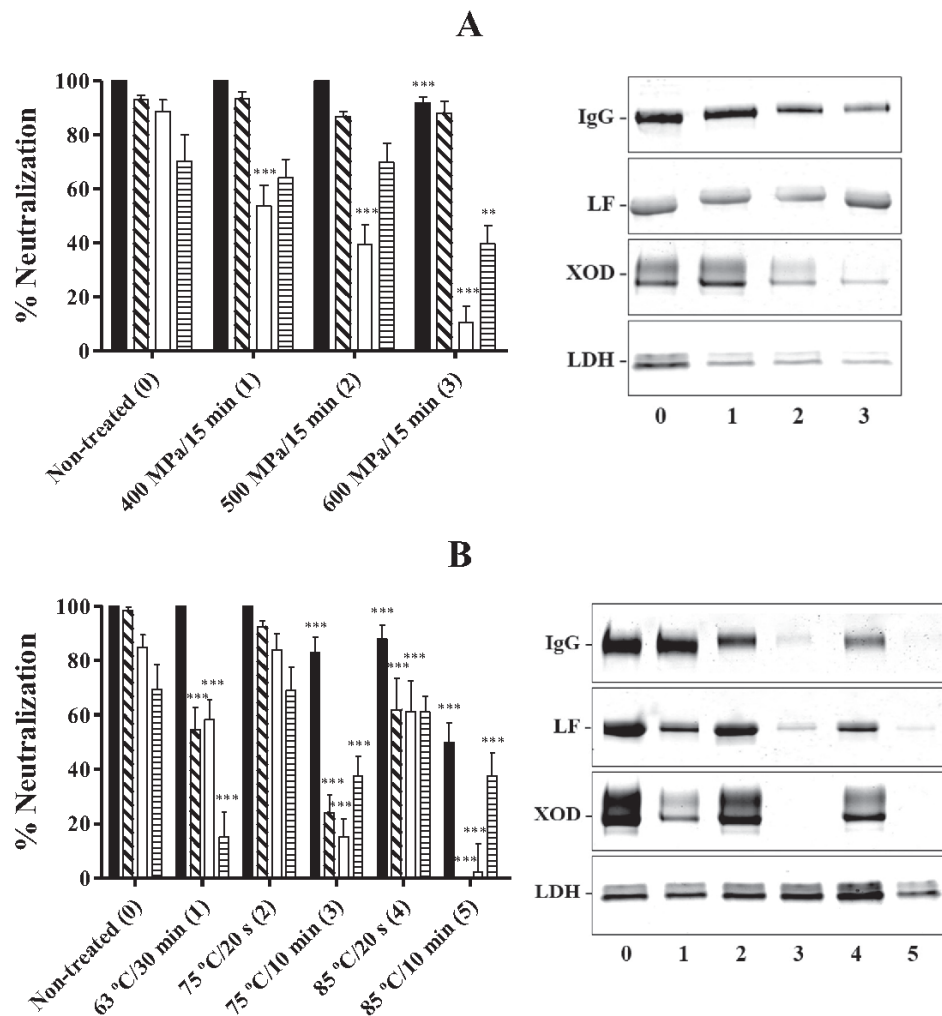


Fig. 5. (A) Effect of HHP treatment on the neutralizing activity of non-washed (black bars) and washed (slashed bars) ovine buttermilk on WC3 rotavirus infectivity of MA104 cells. Ovine buttermilk was tested at 2.5 mg protein/mL. Results are expressed as percentage with respect to positive controls, as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\*p < 0.001) in relation to non-treated buttermilk. Daggers indicate statistically significant differences (†††p < 0.001) in relation to washing process. (B) Electrophoretic profile of HHP treated ovine buttermilk from non-washed (upper) and washed (lower) cream. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel and was Coomassie blue stained. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP treatments. IgG, immunoglobulin G; XOD, xanthine oxidase; LF, lactoferrin; LDH, lactadherin.

In view of the above results, it seems clear that the loss of antirotaviral activity of milk fractions upon HHP treatments is higher when they are obtained from washed cream, as it had been previously evidenced after thermal treatments of those milk fractions (Parrón et al., 2017). Thus, in order to maintain the biological potential of milk fractions as high as possible, it would be recommended to optimize the procedures to obtain those fractions. In addition to this, the present study has pointed out that HHP could be considered as alternative to thermal treatments, especially to preserve the bioactive properties of heat sensitive products.

### 3.4. Effect of HHP and thermal treatment on the antirotaviral activity of milk proteins

Taking into account that some bovine milk-derived proteins, including IgG, LF, XOD and LDH, showed relevant WC3 antirotaviral activity in previous studies (Parrón et al., 2016, 2017), the impact of HHP (Fig. 6A) and thermal (Fig. 6B) treatments on their activity was evaluated. In this regard, different susceptibility to HHP and thermal treatments was observed among proteins. Thus, HHP treatment at 500 MPa for 15 min did not affect significantly the activity of bovine IgG and LDH. Besides that, bovine LF was shown to be resistant even to the highest HHP treatment of 600 MPa for 15 min. By contrast, bovine



**Fig. 6.** Effect of HHP (A) and heat (B) treatments on the neutralizing activity of bovine proteins against WC3 rotaviral strain infection of MA104 cells. Results are expressed as percentage with respect to positive controls, as mean  $\pm$  standard deviation of triplicates from two independent experiments ( $n = 6$ ). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\*)  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$  in relation to non-treated proteins. Immunoglobulins G (IgG, black bars), lactoferrin (LF, slashed bars), xanthine oxidase (XOD, white bars) and lactadherin (LDH, horizontal bars) were treated at 0.1, 1, 0.5 and 0.1 mg/mL, respectively. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel and was Coomassie blue stained. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP and thermal treatments.

XOD showed to be highly susceptible to HHP treatment, since losses of its antirotaviral activity of 39, 56 and 88% were produced upon 400, 500 and 600 MPa for 15 min, respectively.

When focusing on thermal treatments, it has to be highlighted that HTST pasteurization was not harmful to the activity of any of the bovine milk proteins tested in the present study (Fig. 6B). Even though LTLT pasteurization did not affect bovine IgG activity, it caused, by contrast, significant neutralizing activity losses of 44, 31 and 78% to bovine LF, XOD and LDH, respectively. The highest heat treatment, at 85 °C for 10 min, induced high losses of activity, of 50, 100, 99 and 46%, for bovine IgG, LF, XOD and LDH, respectively. The electrophoretic patterns included in Fig. 6 corresponding to HHP and heat-treated IgG, LF and XOD was in accordance with their neutralizing activity, since the decrease in the intensity of the corresponding electrophoretic bands matched with the loss of activity. On the contrary, contradictory results were observed at this respect for bovine LDH, which cannot be easily explained.

Focusing on the effect of HHP (Fig. 7A) and thermal (Fig. 7B) treatments on the antirotaviral potential of ovine IgG and LF, different susceptibility was found. Thus, even though HHP treatment did not affect the activity of ovine LF, even at the highest intensity, losses of 34, 37 and 56% were observed upon treatment of ovine IgG at 400, 500 and 600 MPa for 15 min, respectively. For thermal treatments it was evidenced that both LTLT and HTST pasteurization did not alter significantly the activity of ovine IgG and LF. However, heat treatment of 85 °C for 10 min led to 93 and 99% decrease of the neutralizing activity of ovine IgG and LF, respectively.

There are several studies dealing with the effect of HHP and thermal treatments on the denaturation, immunoreactivity and bioactivity of milk proteins, which provide divergent results. As regards HHP-treated bovine IgG, Li et al. (2006) found that its immunoreactivity determined by ELISA was significantly reduced even at pressures as low as 414 MPa for 6 min. This is not in accordance with our results, which showed a scarce influence of a similar treatment on the antirotaviral capacity of

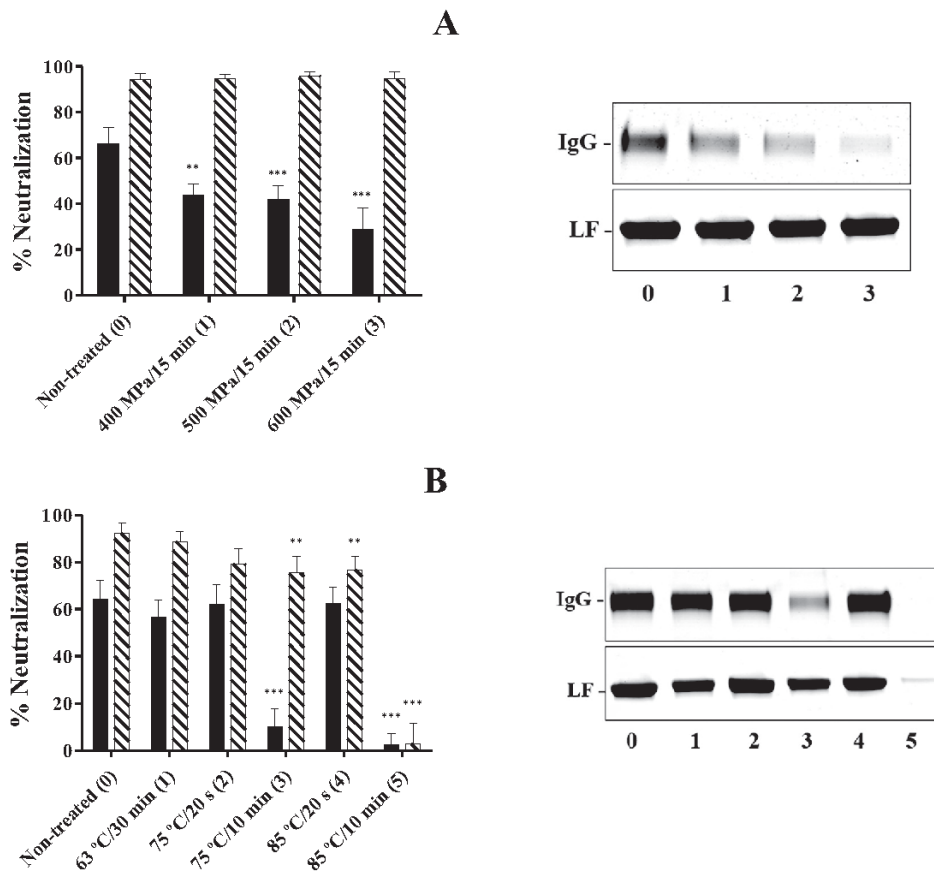


Fig. 7. Effect of HHP (A) and heat (B) treatments on the neutralizing activity of ovine proteins against WC3 rotaviral strain infection of MA104 cells. Results are expressed as percentage with respect to positive controls, as mean ± standard deviation of triplicates from two independent experiments (n = 6). Asterisks indicate statistically significant differences (\*\*\*p < 0.001; \*\*p < 0.01) in relation to non-treated proteins. Immunoglobulins G (IgG, black bars) and lactoferrin (LF, slashed bars) were treated at 0.5 and 1 mg/mL, respectively. SDS-PAGE was performed under non-reducing conditions in 4–20% polyacrylamide gradient gel and was Coomassie blue stained. The code number corresponds to the numbers in brackets as regards HHP and thermal treatments.

IgG. By contrast, Trujillo et al. (2007) reported that a treatment of 400 MPa for 10 min did not affect the IgG concentration of caprine colostrum, determined by an immunodiffusion method. In another study, immunoglobulins from caprine milk were shown to be resistant to 300 MPa for 10 min, by determining their denaturation by the loss of solubility at pH 4.6, although 35% denaturation occurred after treatment at 500 MPa for 10 min (Felipe, Capellas, & Law, 1997). It was also reported that the pressure stability of bovine IgGs was better in colostrum than as isolated proteins (Indyk, Williams, & Patel, 2008), suggesting that some colostrum components had protective effects on the denaturation of IgG. In the study of Mazri, Sánchez, Ramos, Calvo, and Pérez (2011) a loss of bovine LF immunoreactivity was reported which increased with pressure and time of treatment. The decrease of LF immunoreactivity was stated to depend on treatment media, being of 75, 65 and 98% in milk, whey and PBS, respectively, after 600 MPa for 15 min. Furthermore, bovine LF was shown to maintain its antibacterial activity against *E. coli* O157:H7 after treatment at 400 MPa for 15 min (Franco, Pérez, Castillo, Calvo, & Sánchez, 2013).

As regards thermal treatment, our results are in good accordance with diverse studies (Chen & Chang, 1998; Mainier et al., 1997) pointing that the immunoreactivity of bovine milk immunoglobulins resists HTST pasteurization. With respect to LF, the results obtained in the present study agree with those obtained by Sánchez et al. (1992) who showed that HTST pasteurization had no significant effect on bovine LF

immunoreactivity, though denaturation was observed upon treatments of higher intensity. Furthermore, bovine LF has been reported to maintain its antibacterial activity upon LTLT and HTST pasteurization (Harouna et al., 2015; Paulsson, Svensson, Kishore, & Satyanarayan Naidu, 1993), in agreement with our observations as regards antirotaviral activity of ovine LF. By contrast, LTLT pasteurization was harmful to the antirotaviral potential of bovine LF. Besides that, our results for bovine LDH and XOD are in accordance with the thermolability previously reported for these proteins by diverse authors (Houlihan, Goddard, Nottingham, Kitchen, & Masters, 1992; Lee & Sherbon, 2002; Ye, Singh, Taylor, & Anema, 2004).

4. Conclusions

The present study has focused on dairy by-products as an interesting source of compounds with antirotaviral activity, with potential use in functional food industry. The effect of HHP on the activity of bovine and ovine whey and buttermilk was evaluated. Thus, treatment of whey below 500 MPa for 15 min preserved its antirotaviral activity. As regards buttermilk, treatment as high as 500 MPa for 15 min showed to be scarcely harmful to its antirotaviral activity. Furthermore, it can be concluded that cream washing causes a relevant loss of antirotaviral activity and enhances HHP susceptibility of the derived buttermilk fractions, in comparison with the non-washed product. A different



## 4.2. Resultados no publicados

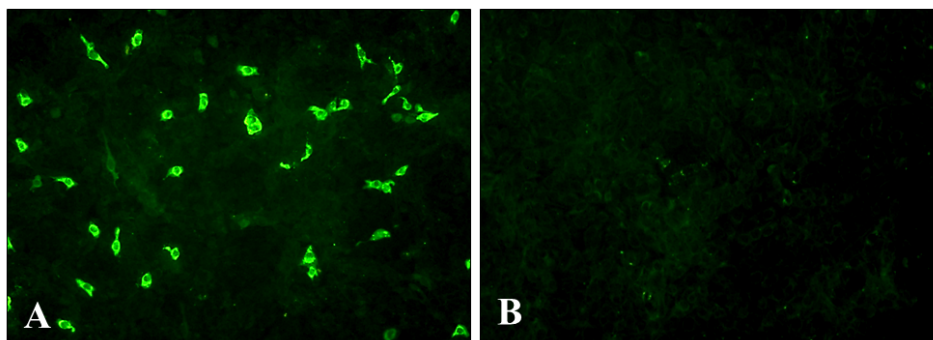
En este apartado se muestran los resultados obtenidos en la tesis y no incluidos en los artículos anteriormente descritos.

### 4.2.1. Neutralización de la infección de las células MA104 por rotavirus

#### 4.2.1.1. Validación del ensayo de neutralización

El ensayo de neutralización de la infección de las células MA104 por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas, con detección por inmunofluorescencia, se validó en base a directrices internacionales. Aunque los resultados del estudio de validación están publicados en el primer artículo del compendio, dado que aparecen únicamente en el documento on-line como material suplementario, se detallan a continuación. Se analizaron los parámetros de especificidad, intervalo de trabajo, precisión (en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad) y robustez.

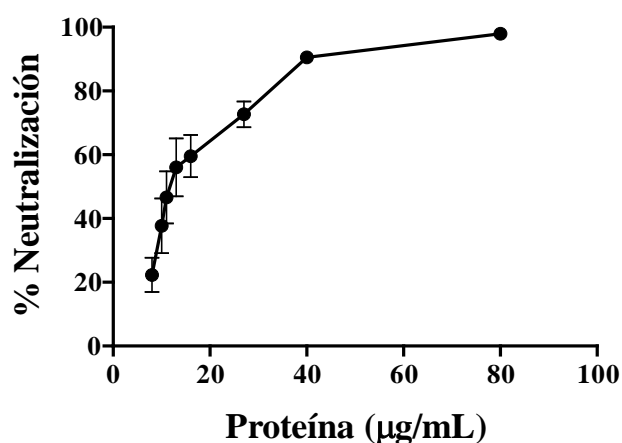
En lo que respecta a la especificidad del ensayo, se comprobó que tanto el antisuero de cordero anti-rotavirus bovino como los anticuerpos de burro anti-IgG de cordero conjugados con FITC no mostraban reactividad cruzada con otras sustancias presentes en la matriz, como componentes celulares, componentes del medio de cultivo, PBS, gelatina, etc. En el ensayo de neutralización se detectó claramente el rotavirus en el interior de las células por inmunofluorescencia, mientras que los componentes de la matriz no dieron una reacción positiva, como se observa en la **Figura 27**.



**Figura 27.** Imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia para determinar la especificidad del ensayo de neutralización. Células MA104 incubadas con: (A) rotavirus WC3 a una MOI de 0,02; (B) PBS con gelatina al 2% (v/v). 100 x.

En todos los ensayos se incluyeron pocillos con el rotavirus como control positivo y pocillos sin los rotavirus como control negativo.

Para determinar el intervalo de trabajo y la sensibilidad de la técnica, se infectaron las monocapas celulares con la suspensión de rotavirus bovino WC3, a una MOI de 0,02, y se realizó el ensayo de neutralización empleando concentraciones crecientes de calostro bovino hiperinmune como agente neutralizante. Tal y como puede observarse en la **Figura 28**, el calostro hiperinmune neutralizó de manera muy efectiva la infección por rotavirus, obteniéndose una respuesta proporcional (grado de correlación  $R^2$  de 0,97) a un intervalo de trabajo entre 8 y 80  $\mu\text{g/mL}$  de proteína.



**Figura 28.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por calostro bovino hiperinmune. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de sextuplicados de tres experimentos independientes ( $n=18$ ).

La precisión del ensayo de neutralización se determinó tanto en condiciones de repetibilidad como de reproducibilidad. A este respecto, los resultados obtenidos mostraron que el ensayo es repetitivo y reproducible. De hecho, los coeficientes de variación obtenidos en condiciones de repetibilidad ( $CV_r$ ) y de reproducibilidad ( $CV_R$ ) fueron de 7,4% y 10,2%, respectivamente, muy por debajo de los criterios de aceptación preestablecidos para ensayos inmunoquímicos similares:  $CV_r \leq 20\%$ ;  $CV_R \leq 30\%$  (Payne et al., 2006; Pecora et al., 2009).

En cuanto al estudio de la robustez del ensayo, la desviación estándar de las diferencias (SDi) fue inferior a la desviación estándar en condiciones de reproducibilidad ( $1,5 < 6,2$ ), por lo que se ha concluido que el método es robusto. Es decir, que el conjunto de factores o variaciones elegidas no altera de manera significativa el resultado del ensayo. No obstante, el factor B (número de lavados antes de la fijación celular) resultó ser sensible a los cambios y ejercer una influencia significativa en los resultados del ensayo, por lo que es necesario

controlarlo para que el método sea robusto. Aunque existen múltiples referencias de inmunoensayos cuantitativos basados en la identificación de células infectadas con virus (Arnold et al., 2009; Payne et al., 2006), en la gran mayoría de los casos no se incluye la validación de los métodos empleados, lo que complica la comparación y discusión de los resultados obtenidos. Payne et al. (2006) indicaron que el tiempo de infección no debería superar las 18 h para evitar el riesgo de infecciones secundarias y, por tanto, de un elevado número de focos (células) infectados. En el presente ensayo de neutralización, el tiempo tras la infección primaria se mantiene en torno a 16 h, coincidiendo con el ciclo replicativo del rotavirus (Arias et al., 2002) y favoreciendo la robustez del ensayo.

De manera complementaria al estudio de validación, mediante el ensayo de citotoxicidad basado en el reactivo MTS (Barltrop et al., 1991) se comprobó que las diferentes muestras lácteas no alteraban la viabilidad de las células MA104.

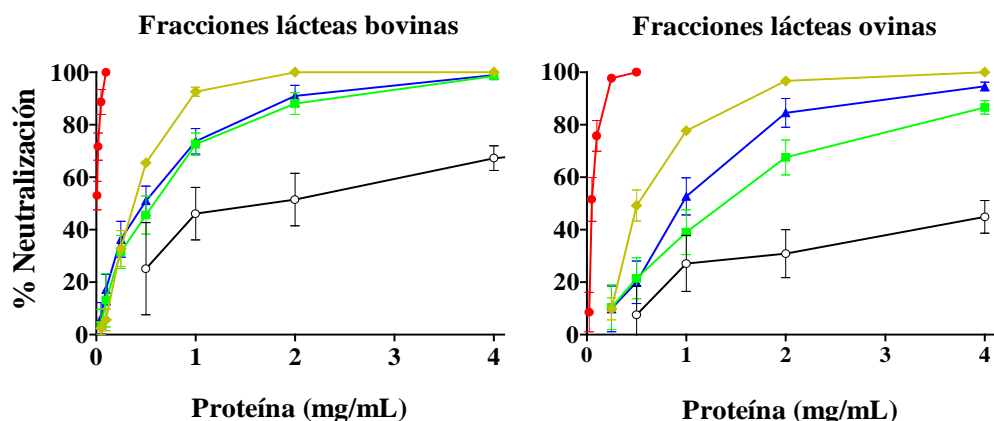
#### **4.2.1.2. Neutralización de la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino**

Para evaluar la capacidad de las diferentes fracciones para neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3, se empleó el ensayo de neutralización y detección mediante inmunofluorescencia, puesto a punto y validado durante el desarrollo de la tesis. La mayoría de los resultados de neutralización asociados a las fracciones y proteínas lácteas bovinas, ovinas y humanas, ya se han publicado y, por lo tanto, forman parte del compendio que conforma este trabajo. No obstante, se han testado además muchas otras fracciones y proteínas, cuyos resultados se exponen a continuación.

##### **4.2.1.2.1. Neutralización mediada por calostro y leche bovina y ovina**

Se ha comprobado que el calostro bovino presenta un elevado potencial antirrotavirus. De hecho, tal y como se muestra en la **Figura 29**, a una concentración de 0,1 mg de proteína/mL se alcanzó la neutralización completa de la infección de las células MA104 por la cepa de rotavirus bovino WC3, con un  $IC_{50}$  de tan sólo 14  $\mu$ g/mL. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Inagaki et al. (2010b), que observaron que el calostro bovino obtenido a los 6-7 días postparto exhibía una elevada capacidad para inhibir la replicación de los rotavirus humanos de la cepa MO en las células MA104, con un  $IC_{50}$  de 2,1  $\mu$ g/mL. Estos autores también comprobaron que la administración oral de calostro bovino, antes de la inoculación de los rotavirus, era capaz de prevenir el desarrollo de diarrea en ensayos con ratones.





**Figura 29.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por fracciones lácteas bovinas y ovinas. (●) Calostro; (▲) leche cruda; (■) leche desnatada; (◆) lactosuero; (⊖) caseínas. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de dos experimentos independientes ( $n=6$ ).

La leche cruda de vaca también mostró actividad antirrotavirus *in vitro* frente a la cepa bovina WC3, con un 74% de neutralización a 1 mg de proteína/mL ( $IC_{50}$  de 0,48 mg/mL) (Figura 29), similar al resultado observado por Inagaki et al. (2010b) con la cepa humana MO en las células MA104 ( $IC_{50}$  de 0,2 mg/mL). Además, en este trabajo se ha comprobado que el desnatado de la leche mantiene intacta la capacidad neutralizante de la misma, observándose que la leche desnatada presenta el mismo perfil de actividad e  $IC_{50}$  que la leche entera, lo que parece indicar que la actividad inhibitoria de la infección por rotavirus está más asociada a componentes de la fase proteica de la leche que a la grasa láctea.

Por otra parte, la separación del lactosuero y las caseínas de la leche desnatada, puso de manifiesto que los componentes con actividad antirrotavirus se encuentran mayoritariamente en el suero. De hecho, el lactosuero bovino a 1 mg de proteína/mL presentó un 93% de neutralización de la infección mediada por la cepa bovina WC3 ( $IC_{50}$  de 0,37 mg/mL), mientras que las caseínas neutralizaron el 46% de la infección a esa misma concentración ( $IC_{50}$  de 1,83 mg/mL) (Figura 29).

La actividad antirrotavirus de diversas fracciones lácteas ovinas ha sido igualmente evaluada en este estudio, evidenciándose diferencias interespecie. Así, tal y como se ha representado en la Figura 29, las muestras ovinas mostraron menor actividad que las homólogas bovinas, con valores de  $IC_{50}$  de 0,045, 1,03, 1,41, 0,56 y 8,38 mg/mL, para el calostro, la leche cruda, la leche desnatada, el lactosuero y las caseínas ovinas, respectivamente. Tanto las diferencias interespecie como las divergencias observadas entre fracciones lácteas

intraespecie, en lo que respecta a la capacidad antirrotavirus, pueden deberse en parte a variaciones en su composición, especialmente en lo que respecta a la presencia, cantidad y estructura de componentes bioactivos.

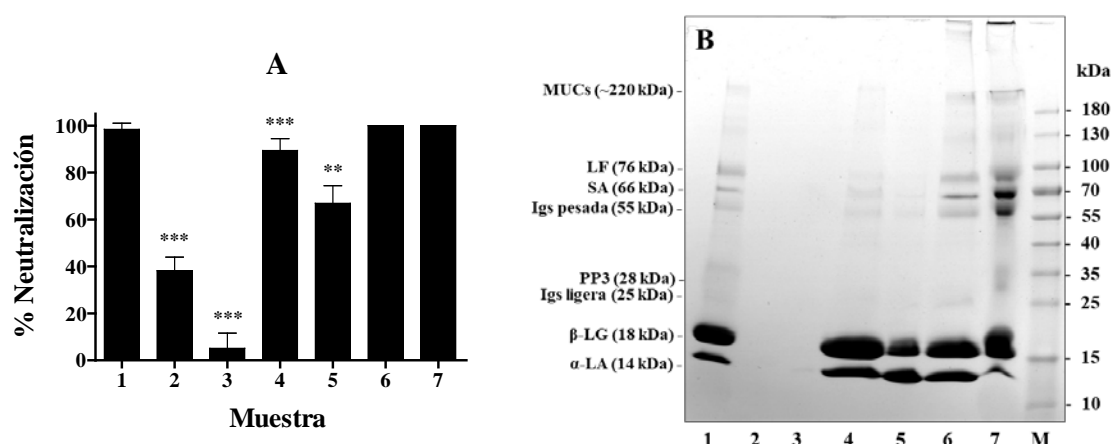
A este respecto, se ha comprobado mediante espectrometría de infrarrojo que el lactosuero bovino presenta porcentajes de proteína, lípidos y lactosa de 13, 1 y 68% (p/p), respectivamente, en consonancia con lo reportado por Yadav et al. (2015). El lactosuero ovino mostró un mayor contenido proteico (21% p/p) que el bovino, y casi el doble de lípidos, coincidiendo con observaciones previas (Haenlein y Wendorff, 2006) y con el mayor contenido proteico y lipídico asignado a la leche cruda ovina en comparación con la bovina (Claeys et al., 2014). Para todas las concentraciones de proteína testadas, las fracciones bovinas presentaron una mayor actividad antirrotavirus en comparación con las fracciones ovinas (**Figura 29**). Este hecho podría indicar que no sólo la cantidad, sino también el tipo y la estructura de los componentes bioactivos pueden participar de manera importante en la capacidad antirrotavirus.

En esta línea, se ha comprobado que el suero de calostro bovino presenta un perfil electroforético similar al lactosuero, aunque con una mayor proporción de Igs, LF y SA, de acuerdo con estudios previos (McGrath et al., 2016). De hecho, las Igs (IgG, IgA e IgM) suponen hasta el 70-80% del total de las proteínas del calostro bovino (Smolenski et al., 2007), muy por encima del 2-3% que representan en la leche (Farkye y Shah, 2015) y del 8-10% en el lactosuero (Ryan y Walsh, 2016). Además, la concentración de LF que se ha encontrado en el calostro bovino oscila entre el 0,15-0,5% (McGrath et al., 2016), hasta 100 veces superior a la existente en la leche (Indyk y Filonzi, 2005). Esta elevada concentración de proteínas bioactivas es de particular importancia para el neonato, contribuyendo a la transferencia de inmunidad pasiva y a la protección frente a agentes patógenos, como los rotavirus. Así, diferentes estudios han sugerido el uso de calostro bovino procedente de vacas hiperinmunizadas frente a rotavirus (Mainier et al., 1999; Sarker et al., 1998) o calostro bovino normal (Inagaki et al., 2010b) para proporcionar protección pasiva frente a las infecciones causadas por rotavirus, si bien estas estrategias presentan limitaciones prácticas dada la dificultad de producción a gran escala.

Después del calostro, el lactosuero es la fracción láctea, tanto bovina como ovina, que ha mostrado mayor capacidad antirrotavirus (**Figura 29**). Tal y como se ha discutido en diversos artículos del presente compendio, se ha comprobado que el potencial antirrotavirus del lactosuero está relacionado con la presencia de diversas proteínas que han mostrado una elevada actividad inhibitoria frente a este virus, especialmente las IgGs, la LF, la XOD y la LDH. De manera complementaria a estas observaciones, se llevó a cabo un ensayo para discernir qué subfracciones del suero albergaban mayor actividad antirrotavirus. Para ello, se filtró el lactosuero bovino a través de filtros con diferentes puntos de corte: 3, 10, 30 y 100 kDa; y se

determinó la capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por las diversas fracciones de lactosuero bovino filtrado.

Así, tal y como puede observarse en la **Figura 30-A**, el retenido resultante de filtrar el lactosuero con membranas de 30 y 100 kDa mantuvo la actividad antirrotavirus en relación al lactosuero no filtrado. Este hecho concuerda con la presencia de Igs (~180 kDa) y LF (76 kDa), proteínas con capacidad antirrotavirus, detectada en el perfil electroforético de estas fracciones (**Figura 30-B**). Además, la exclusión de estas proteínas debido al uso de filtros con puntos de corte menores (3, 10 y 30 kDa) provocó la obtención de lactosueros con una capacidad antirrotavirus significativamente menor.



**Figura 30.** (A) Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por lactosuero bovino filtrado con diferentes puntos de corte. El lactosuero se testó a una concentración de 1 mg de proteína/mL. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de tres experimentos independientes (n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) en relación al lactosuero no filtrado. (B) Perfil electroforético de las muestras. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras, en geles de 4-20% de poliácridamida, que fueron teñidos con PAS y Coomassie. Muestras: 1, lactosuero sin filtrar; 2, < 3 kDa; 3, 3-10 kDa; 4, 3-100 kDa; 5, 10-30 kDa; 6, > 30 kDa; 7, > 100 kDa; M, marcador de pesos moleculares.

Todo ello parece indicar que la subfracción de proteínas de peso molecular superior a 30 kDa, incluyendo la LF y las Igs, es la que participa principalmente en la capacidad antirrotavirus del lactosuero. La subfracción de bajo peso molecular (< 30 kDa), incluyendo las proteínas  $\alpha$ -LA,  $\beta$ -LG y PP3, presenta menor actividad a este respecto. Estas observaciones coinciden con los resultados del estudio de Bojsen et al. (2007), quienes fraccionaron un lactosuero bovino concentrado obteniendo una fracción proteica de alto peso molecular, incluyendo Igs, a la que asociaron la mayor parte de la actividad antirrotavirus exhibida por el lactosuero.

#### 4.2.1.2.2. Neutralización mediada por fracciones lácteas bovinas y ovinas derivadas de la nata

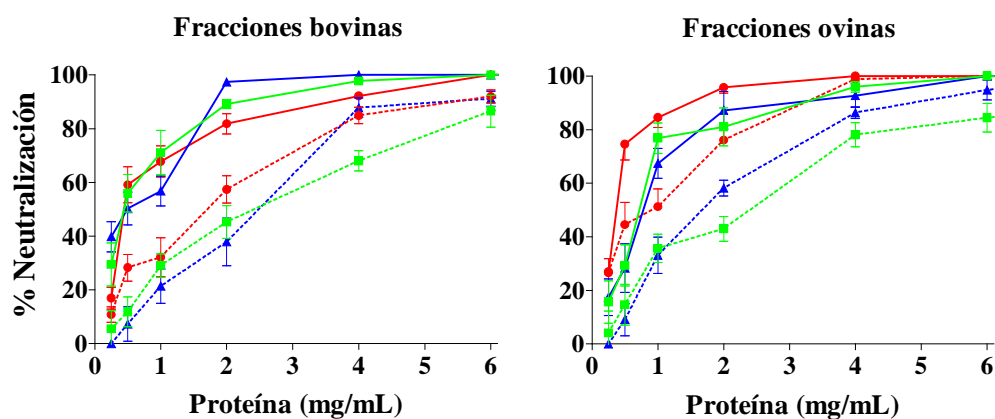
Además de las fracciones lácteas indicadas anteriormente, en esta tesis se ha estudiado la actividad antirrotavirus de diversas fracciones lácteas bovinas y ovinas derivadas de la nata: la mazada, el butter serum y la MFGM. Aunque algunos resultados a este respecto ya están publicados en el 2º artículo del presente compendio, a continuación se incluyen resultados más completos.

Tal y como puede observarse en la **Figura 31**, el potencial antirrotavirus de la mazada ovina ( $IC_{50}$  de 0,37 mg/mL) fue mayor que el de la mazada bovina ( $IC_{50}$  de 0,46 mg/mL), mostrando valores de neutralización de 85 y 68%, respectivamente, a una concentración de 1 mg de proteína/mL. Estas diferencias, que fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones testadas, podrían deberse a divergencias en su composición. A este respecto, las determinaciones realizadas en este trabajo mediante espectrometría infrarroja mostraron una mayor concentración de proteínas y lípidos en la mazada ovina (30,5 y 20% p/p, respectivamente) en comparación con la mazada bovina (27,5 y 15,5% p/p, respectivamente), de acuerdo con estudios previos (Britten et al., 2008; Hamad et al., 2016).

En lo que respecta al butter serum y MFGM bovinas, la capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovinos WC3 fue sólo ligeramente inferior a la de la mazada bovina. De hecho, se registró un  $IC_{50}$  de 0,55 y 0,49 mg/mL para el butter serum y la MFGM bovinas, respectivamente (**Figura 31**). Esta similitud podría asociarse con la composición proteica determinada mediante espectroscopía, situada para todas las fracciones en el rango de 24-28% (p/p), si bien el contenido lipídico del butterserum (42% p/p) y de la MFGM (68% p/p) fue notablemente superior al de la mazada bovina, coincidiendo con diversos estudios (Britten et al., 2008; Vanderghem et al., 2010). En cambio, en el caso de las fracciones ovinas se constató que el butter serum y la MFGM presentaban menor actividad antirrotavirus,  $IC_{50}$  de 0,87 y 0,85 mg/mL, respectivamente, que la mazada ovina (**Figura 31**). En este caso, el contenido proteico y lipídico del butter serum y de la MFGM ovinas fue de 32 y 48% (p/p), y 31 y 69% (p/p), respectivamente, valores superiores a los de la mazada ovina.

Cuando se analizaron los perfiles electroforéticos de las fracciones derivadas del procesado de la nata bovina y ovina, se pudo comprobar que el patrón electroforético obtenido para las mazadas bovina y ovina era muy similar, evidenciándose en ambos casos la presencia de caseínas y de proteínas del lactosuero, como  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA y LF, junto con algunas proteínas de la MFGM, como BTN, LDH y XOD, coincidiendo con las observaciones de Britten et al. (2008). Además, se observó que el butter serum presentaba un perfil similar al de la mazada, si bien algo más enriquecido en proteínas de la MFGM. La MFGM mostró el perfil característico

con las proteínas de membrana MUC1, MUC15, XOD, BTN, LDH y PP3, y escasa presencia de proteínas del lactosuero (Dewettinck et al., 2008).



**Figura 31.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por fracciones lácteas bovinas y ovinas derivadas del procesado de la nata. (●) Mazada; (-●-) mazada lavada; (▲) butter serum; (-▲-) butter serum lavado; (■) MFGM; (-■-) MFGM lavada. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de tres experimentos independientes (n=9).

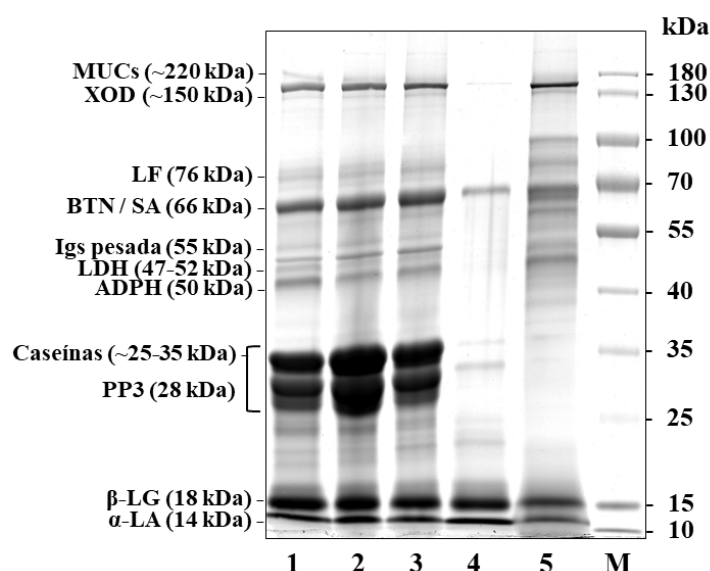
Como ya se ha comentado, la mazada, tanto bovina como ovina, es la fracción derivada del procesado de la nata que mayor capacidad neutralizante ha mostrado, superior a la del butter serum y a la de la MFGM. Este hecho podría estar relacionado con la mayor proporción de proteínas del lactosuero en la mazada, en comparación con el butter serum y la MFGM, puesto que estas proteínas, especialmente las Igs y la LF, han mostrado, en general, mayor actividad antirrotavirus que las proteínas de la MFGM. Este mismo argumento serviría para explicar, en parte, la menor actividad neutralizante observada para el butter serum y la MFGM ovinas, en comparación con las homólogas bovinas. De hecho, puesto que las fracciones ovinas han presentado un mayor contenido lipídico que las bovinas, es probable que la cantidad de proteínas de la MFGM sea mayor, dado que los glóbulos grasos son del mismo tamaño. A este respecto, Pisanu et al. (2011) compararon el proteoma de la MFGM bovina y ovina observando una mayor presencia de proteínas en la fracción ovina.

En esta tesis también se ha evaluado la influencia del lavado de la nata en la composición y actividad antirrotavirus de las fracciones derivadas, tanto bovinas como ovinas, como ya se ha discutido en el 2º artículo del compendio, y cuyo análisis se amplía a continuación.

Tal y como puede observarse en la **Figura 31**, el potencial antirrotavirus de todas las fracciones derivadas de nata lavada, tanto bovinas como ovinas, fue inferior al de las fracciones homólogas derivadas de nata sin lavar. Así, la mazada, el butter serum y la MFGM bovinas derivadas de nata lavada presentaron un  $IC_{50}$  de 1,55, 2,37 y 2,35 mg/mL, respectivamente; valores significativamente mayores que los obtenidos para las fracciones derivadas de nata sin lavar, de 0,46, 0,55 y 0,49 mg/mL, respectivamente. De igual manera, los  $IC_{50}$  calculados para la mazada, el butter serum y la MFGM ovinas derivadas de nata lavada, de 0,87, 1,62 y 2,82 mg/mL, respectivamente, fueron superiores a los de las fracciones derivadas de nata sin lavar, de 0,37, 0,87 y 0,85 mg/mL, respectivamente.

El hecho de que el proceso de lavado favorezca la pérdida de proteínas y otros compuestos bioactivos podría explicar, al menos en parte, estos resultados. De hecho, se comprobó mediante espectroscopía de infrarrojo que el contenido de proteína y lactosa de las fracciones disminuía notablemente con el lavado, si bien el de lípidos no se veía afectado. Además, se observó mediante SDS-PAGE que el lavado de la nata alteraba la composición de las fracciones resultantes. Así, se comprobó que el contenido de ciertas proteínas como las caseínas, las proteínas del lactosuero  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA y LF, y algunas proteínas de la MFGM, como la XOD y la BTN, se veía disminuido por efecto del lavado, en consonancia con las observaciones de Holzmüller et al. (2016) y de Le et al. (2009).

En esta línea, tal y como puede observarse en la **Figura 32**, cada lavado con PBS de la nata provoca la pérdida generalizada de proteínas. La SDS-PAGE muestra una elevada pérdida de proteínas tras tres lavados de la nata con PBS. Las proteínas arrastradas con la solución de lavado no son solamente las periféricas, como las caseínas, las proteínas del lactosuero o las proteínas débilmente unidas a la MFGM, como MUCs, XOD y LDH, sino también algunas proteínas integrales de la MFGM, como la BTN, coincidiendo estos resultados con los de estudios previos (Le et al., 2009; Zheng et al., 2013).



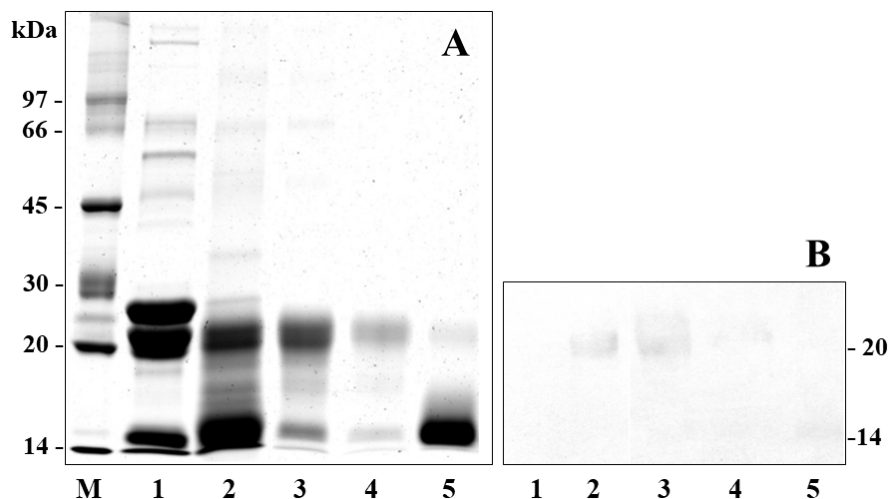
**Figura 32.** Perfil electroforético de las muestras derivadas del lavado con PBS de la nata en el proceso de obtención de la mazada bovina. Muestras: 1, mazada bovina derivada de nata sin lavar; 2, excluido del primer lavado de la nata; 3, excluido del segundo lavado; 4, excluido del tercer lavado; 5, mazada bovina de nata lavada; M, marcador de pesos moleculares. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras con mercaptoetanol, en geles del 10% de poliacrilamida, que fueron teñidos con PAS y Coomassie.

#### 4.2.1.2.3. Neutralización mediada por la fracción PPT y la PP3 bovinas y ovinas

En el presente estudio se ha obtenido la fracción proteosa-peptona (PPT) de leche bovina y ovina y a partir de ellas se ha aislado el componente 3, también conocido como lactoforina o PP3. Una vez obtenidas ambas fracciones, se ha evaluado su capacidad de neutralización de la infección de la línea celular MA104 por rotavirus bovinos WC3, mediante el ensayo de neutralización con detección por inmunofluorescencia indirecta, previamente puesto a punto y validado. También se ha estudiado el efecto de la degradación enzimática de la PPT y PP3, bovinas y ovinas, en su actividad antirrotavirus, aspecto que se detalla y discute en el apartado 4.2.3.2.

En la **Figura 33** se incluye el perfil electroforético de las principales fracciones obtenidas durante el aislamiento de la fracción PPT y de la proteína PP3 bovina. La fracción PPT se obtuvo tras desnatado de la leche cruda, y posterior calentamiento, acidificación y tratamiento con TCA, como se ha descrito previamente. Tras someter la fracción PPT a una cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 y, posteriormente, a una cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose, se obtuvo la PP3. En el caso de la PP3 bovina, esta se sometió a una última etapa de cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 en presencia de urea 6 M, consiguiéndose separar un fragmento proteico de 28 kDa de otro fragmento de 17 kDa que se

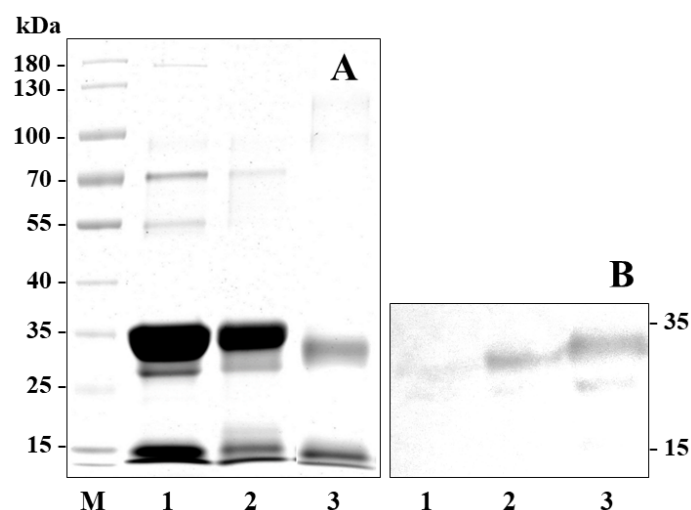
separa de la PP3 por proteólisis endógena. Tal y como se muestra en la **Figura 33-A**, tras las diversas etapas del aislamiento se obtuvo la PP3 bovina, y sus dos fragmentos, con un alto grado de pureza, cuya identidad se confirmó mediante Western-blotting con anticuerpos específicos (**Figura 33-B**). Tanto los perfiles cromatográficos como los electroforéticos obtenidos durante el aislamiento de la PP3 bovina, fueron coherentes con los referenciados por Sørensen y Petersen (1993).



**Figura 33.** (A) Perfil electroforético de la obtención de la fracción PPT y de la proteína PP3 bovinas. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras con mercaptoetanol, en geles del 12% de poliacrilamida, que fueron teñidos con PAS y Coomassie. Muestras: M, marcador de pesos moleculares; 1, leche cruda de vaca; 2, fracción PPT bovina; 3, PP3 bovina; 4, PP3 fragmento de 28 kDa; 5, PP3 fragmento de 17 kDa. (B) Comprobación de la identidad de las muestras mediante Western-blotting con antisuero específico anti-PP3 bovina.

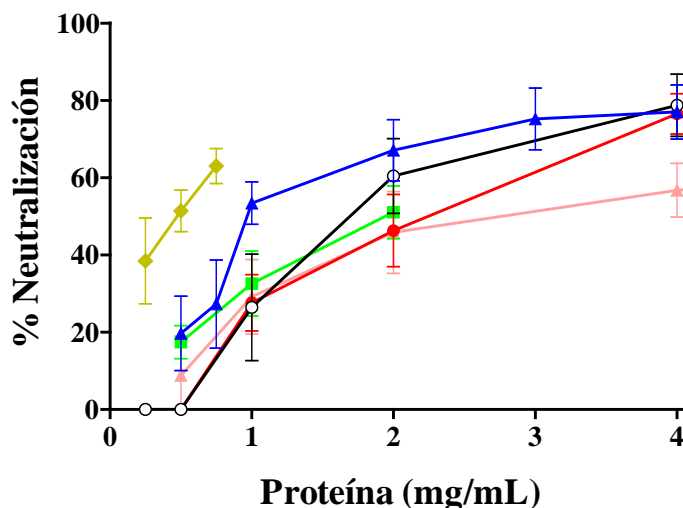
La fracción PPT y la proteína PP3 se han obtenido de leche cruda ovina, siguiendo la metodología descrita por Sørensen y Petersen (1993). En este caso no se realizó la cromatografía de filtración en gel Sephadex G-75 en presencia de urea 6 M para separar los fragmentos proteicos de 28 y 17 kDa. Como puede observarse en la **Figura 34**, el perfil electroforético de las fracciones ovinas es bastante similar al de las fracciones bovinas.





**Figura 34.** (A) Perfil electroforético de la obtención de la fracción PPT y de la proteína PP3 ovinas. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras con mercaptoetanol, en geles del 12% de poliacrilamida, que fueron teñidos con PAS y Coomassie. Muestras: M, marcador de pesos moleculares; 1, leche cruda de oveja; 2, fracción PPT ovina; 3, PP3 ovina. (B) Comprobación de la identidad de las muestras mediante Western-blotting con antiseroo específico anti-PP3 ovina.

En la **Figura 35** se resumen los resultados obtenidos en esta tesis en relación a la actividad antirrotavirus de la PPT y PP3 bovinas y ovinas. Así, en el caso de las muestras bovinas, fue el fragmento C-terminal de la PP3, de 17 kDa, el que mostró una mayor actividad antirrotavirus frente a la cepa bovina WC3 en células MA104, seguido de la PP3 intacta, del fragmento de la PP3 de 28 kDa, y de la PPT, con  $IC_{50}$  de 0,46, 0,97, 1,91 y 2,13 mg/mL, respectivamente. Estos resultados de neutralización son notablemente inferiores a los publicados por Inagaki et al. (2010a), quienes atribuyeron a la PP3 bovina una elevada actividad inhibitoria de la replicación de los rotavirus humanos MO en células MA104. De hecho, estos autores observaron que 1  $\mu$ g/mL de la PP3 intacta ejercía aproximadamente un 50% de neutralización, mientras que la misma concentración del fragmento de 17 kDa tenía una actividad neutralizante del 95%. Las diferencias de actividad observadas podrían atribuirse a divergencias en la estructura y glicosilación de los diferentes fragmentos de la PP3, que existen entre los estudios de diversos autores (Coddeville et al., 1998; Girardet et al., 1995). Las diferencias podrían deberse también a otros factores, como los procedimientos experimentales de purificación de las proteínas y el tipo de cepa vírica empleada para determinar la capacidad antirrotavirus (ver apartado 4.2.1.3.2).



**Figura 35.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por la fracción proteosa-peptona (PPT) y por la proteína PP3 bovinas y ovinas. (●) PPT bovina; (▲) PP3 bovina intacta; (■) PP3 bovina (fragmento 28 kDa); (◆) PP3 bovina (fragmento 17 kDa); (⊖) PPT ovina; (▲) PP3 ovina intacta. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de dos experimentos independientes (n=6).

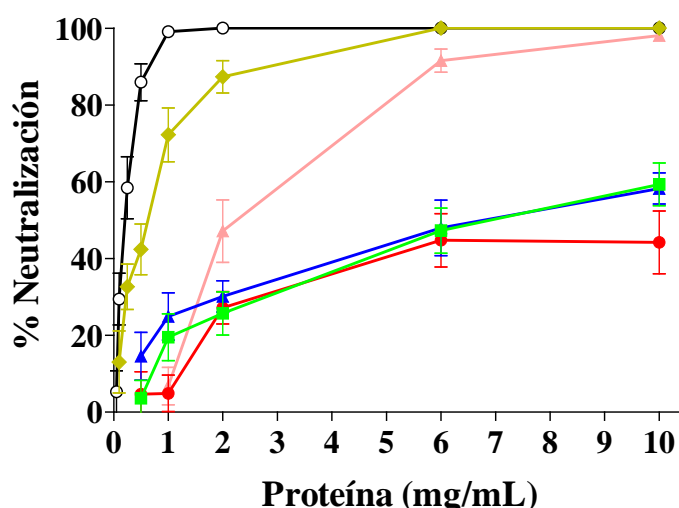
La evaluación de la actividad antirrotavirus de la PPT y PP3 ovinas ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias interespecie. De hecho, aunque la PPT ovina mostró mayor capacidad neutralizante ( $IC_{50}$  de 1,72 mg/mL) que la fracción homóloga bovina ( $IC_{50}$  de 2,13 mg/mL), la PP3 ovina presentó una actividad ( $IC_{50}$  de 2,72 mg/mL) notablemente inferior a la manifestada por la PP3 bovina ( $IC_{50}$  de 0,97 mg/mL) (**Figura 35**). Aunque no se han encontrado estudios referentes a la PP3 ovina, lo que dificulta la discusión de los resultados obtenidos, las diferencias interespecie podrían tener que ver con las variaciones de estructura y glicosilación detectadas por diversos autores entre las PP3 de diversas especies (Inagaki et al., 2010a; Lister et al., 1998).

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan que tanto la fracción PPT como la proteína PP3 presentan un potencial antirrotavirus bajo, sobre todo si se compara con la actividad exhibida por otras fracciones lácteas, como el lactosuero ( $IC_{50}$  de 0,37 y 0,56 mg/mL, para el bovino y ovino, respectivamente), y por otras proteínas lácteas, como las Igs, la LF, la XOD o la LDH, con  $IC_{50}$  inferiores a 0,099 mg/mL, en el caso de las proteínas bovinas, e inferiores a 0,36 mg/mL, en el caso de las derivadas de leche ovina, como queda reflejado en algunos de los artículos del compendio. No obstante, debido a la elevada concentración en la leche bovina tanto de la fracción PPT, de entre 0,5-3 g/L (Innocente et al., 2011), como de la PP3, 0,2-0,3 g/L (Pedersen et al., 2012b), podría ser viable su uso como ingredientes funcionales.

#### 4.2.1.2.4. Neutralización mediada por productos lácteos comerciales

En este trabajo se ha evaluado la actividad antirrotavirus de diversos productos lácteos comerciales, como la leche desnatada, la mazada, el butter serum, dos concentrados de proteínas del lactosuero (WPC), un hidrolizado de proteínas del lactosuero (WPH), varias leches de fórmula infantiles, así como varias proteínas aisladas de leche bovina. Si bien algunos de los resultados obtenidos ya están publicados en los artículos del presente compendio, la mayoría no lo está todavía, por lo que se incluye su descripción y discusión en este apartado.

Tal y como puede observarse en la **Figura 36**, tanto la leche desnatada como la mazada y el butter serum bovinos comerciales presentaron una capacidad antirrotavirus baja. De hecho, la actividad neutralizante exhibida por la leche desnatada comercial ( $IC_{50}$  de  $> 10$  mg/mL) distó notablemente de la actividad observada para la leche cruda desnatada ( $IC_{50}$  de 0,48 mg/mL). De igual manera, la capacidad antirrotavirus de la mazada y del butter serum bovinos comerciales ( $IC_{50}$  de 6,82 y 6,93 mg/mL, respectivamente), fue inferior a la de los productos homólogos obtenidos en este estudio, que mostraron  $IC_{50}$  de 0,46 y 0,55 mg/mL, respectivamente.



**Figura 36.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por diversos productos lácteos bovinos comerciales. (●) Leche desnatada; (▲) mazada; (■) butter serum; (◆) WPC-1 (Lacprodan-80); (○) WPC-2 (Lacprodan MFGM-10); (▲) WPH (Lacprodan DI-3017). Los resultados de neutralización están calculados en porcentaje respecto al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media ± desviación estándar de triplicados de tres experimentos independientes (n=9).

Las diferencias observadas entre las fracciones comerciales y las obtenidas experimentalmente, que fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones analizadas, podrían deberse a diversos aspectos, como las divergencias en los procesos de

obtención y en la composición de los productos, así como el efecto del procesado. A este respecto, de acuerdo con las especificaciones dadas por los fabricantes, la mazada y el butter serum comerciales poseen una concentración de proteínas del 34 y 30% (p/p), respectivamente, y un contenido en lípidos del 10 y 22% (p/p), respectivamente. Si comparamos esta composición con la de las fracciones homólogas obtenidas en el laboratorio, se pone de manifiesto que estas últimas contienen menos proteína y más lípidos que las comerciales. Además, el perfil electroforético por SDS-PAGE de las muestras comerciales evidenció una mayor presencia de caseínas,  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA (proteínas que han mostrado un potencial antirrotavirus bajo o nulo), en comparación con las fracciones obtenidas experimentalmente, lo que podría explicar en parte las divergencias observadas en relación a la actividad antirrotavirus de las fracciones.

Además de las diferencias composicionales, en esta tesis se ha comprobado que los tratamientos tecnológicos a los que se ven sometidas las muestras lácteas durante su procesado pueden disminuir su potencial antirrotavirus. Así, según las especificaciones del fabricante, estos productos han sido sometidos a una pasteurización alta (72 °C durante 15 s) más el tratamiento térmico asociado al proceso de atomización no especificado.

En lo que respecta a los concentrados de proteínas del lactosuero (WPC), se comprobó su elevado potencial frente a la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3. Así, tal y como se ha representado en la **Figura 36**, el WPC-1 (Lacprodan-80) y el WPC-2 (Lacprodan MFGM-10) presentaron un  $IC_{50}$  de 0,72 y 0,20 mg/mL, respectivamente, actividad muy superior a la mostrada por los otros productos lácteos comerciales testados ( $IC_{50} > 6$  mg/mL) y del orden de la obtenida para el lactosuero bovino obtenido experimentalmente ( $IC_{50}$  de 0,37 mg/mL). Estos resultados se aproximan a las observaciones de Bojsen et al. (2007), que llevaron a cabo estudios *in vitro* demostrando que un WPC bovino presentaba actividad inhibitoria de la infección de células Caco-2 por diferentes cepas de rotavirus (Wa humana, RRV de simio, RF bovina y YM porcina), con  $IC_{50}$  comprendidos entre 0,05-0,1 mg/mL, y cuya capacidad fue atribuida principalmente a la presencia de IgGs, asignándoles en torno al 70% de neutralización a una concentración de 25  $\mu$ g/mL.

La diferente actividad observada entre los dos WPC evaluados en esta tesis está probablemente relacionada con su composición. A este respecto, según las especificaciones del fabricante, el Lacprodan-80 contiene un 82% (p/p) de proteínas del lactosuero, un 8% (p/p) de lípidos y un 7% (p/p) de lactosa, sin especificar qué proteínas y qué otros azúcares contiene. Por otra parte, el Lacprodan MFGM-10 posee un 72% (p/p) de proteínas, de las cuales un 8% son proteínas de la MFGM (1,4% de MUC1 y 1% de LDH, entre otras), un 6% son Igs y un 1,5% es LF; un 18% (p/p) de lípidos, un 2% (p/p) de lactosa y un 1,5% (p/p) de ácido siálico. Aunque ambos WPC han mostrado una elevada actividad antirrotavirus, el mayor potencial atribuido al

Lacprodan MFGM-10 muy probablemente es debido a su mayor contenido en glicoproteínas con actividad neutralizante frente a rotavirus, como las Igs, la LF y la LDH, así como a su elevada concentración en ácido siálico, cuya función inhibidora también ha sido ampliamente demostrada (Isa et al., 2006; Prasad et al., 2014).

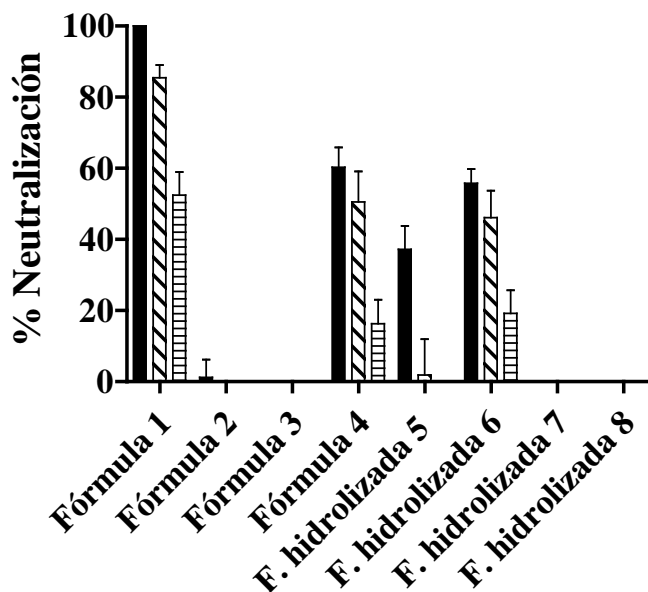
Además de evaluar la actividad antirrotavirus de los WPC, se ha estudiado la capacidad de un hidrolizado de proteínas del lactosuero comercial, el Lacprodan DI-3017, obteniéndose una actividad neutralizante notablemente inferior ( $IC_{50}$  de 3,19 mg/mL) en comparación con la exhibida por los productos lácteos equivalentes sin hidrolizar ( $IC_{50}$  entre 0,20-0,72 mg/mL). La descripción y discusión de estos resultados se detalla en el apartado 4.2.3.

En cuanto a las leches de fórmula infantiles estudiadas en la presente tesis, se ha comprobado gran variabilidad entre marcas, en lo que respecta a su potencial antirrotavirus *in vitro*. De hecho, tal como se muestra en la **Figura 37**, sólo cuatro de las ocho leches de fórmula analizadas mostraron capacidad de neutralización de la infección por rotavirus, tras ser reconstituidas a 150 mg de producto/mL, según las recomendaciones de uso del fabricante. Las leches evaluadas fueron cuatro fórmulas de continuación de composición adaptada a la de la leche materna (fórmulas 1-4) y cuatro fórmulas a base de un hidrolizado de caseínas de leche de vaca (fórmulas 5-8).

Como puede observarse en la **Figura 37**, dos de las fórmulas de continuación (2 y 3) no mostraron actividad antirrotavirus a 150 mg de producto/mL. En cambio, las fórmulas de continuación 1 y 4 sí fueron capaces de inhibir la infección por rotavirus, presentando porcentajes de neutralización del 100 y 60%, a 150 mg de producto/mL, respectivamente; manteniendo incluso cierta actividad (del 52 y 16%, respectivamente) cuando se ensayaron a 15 mg de producto/mL. También las fórmulas a base de hidrolizado presentaron resultados dispares. Así, las fórmulas 7 y 8 no presentaron actividad, ni siquiera a 150 mg de producto/mL. Las fórmulas 5 y 6, en cambio, exhibieron una capacidad neutralizante del 37 y 56%, a 150 mg de producto/mL, respectivamente; si bien sólo la fórmula 6 mantuvo cierta actividad a concentraciones inferiores (**Figura 37**).

Las diferencias de actividad detectadas podrían atribuirse a variaciones en la composición de las leches entre marcas, aunque siempre teniendo en cuenta que deben cumplir con las recomendaciones de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (Koletzko et al., 2005), así como del Reglamento Delegado (UE) 2016/127 de la Comisión en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los preparados para lactantes y preparados de continuación (DOUE, 2016). A este respecto, la composición declarada por los fabricantes fue muy similar entre las distintas fórmulas, con una composición para las fórmulas de continuación adaptada a la de la leche

materna de: 9-12% de proteína, 19-22% de lípidos y 60-64% de carbohidratos (40-59% de lactosa); y una composición para las fórmulas a base del hidrolizado de caseínas de leche de vaca de: 12-15% de proteína, 23-26% de lípidos y 52-59% de carbohidratos (0% de lactosa).

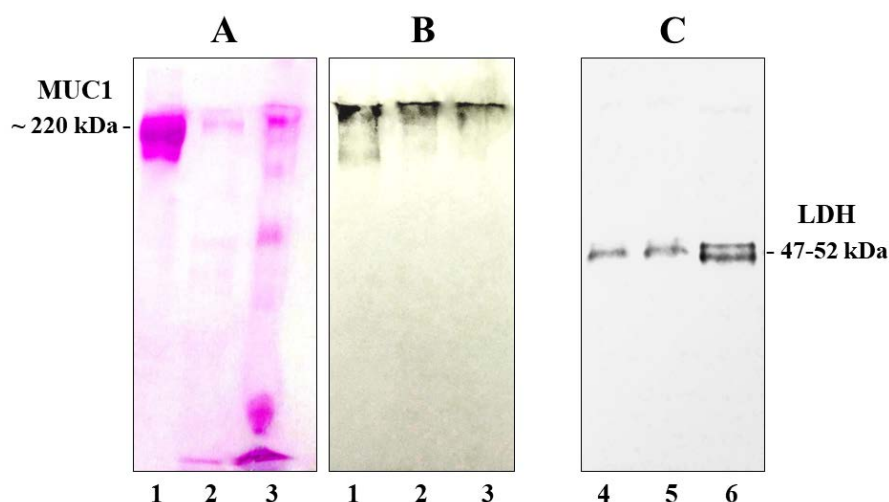


**Figura 37.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por leches infantiles de fórmula. Las leches se ensayaron a tres concentraciones distintas: 150 mg de producto/mL (■), 50 mg de producto/mL (▨) y 15 mg de producto/mL (▤). Las leches 1-4 son fórmulas de continuación con una composición adaptada a la de la leche materna. Las otras cuatro leches (fórmulas 5-8) corresponden con fórmulas a base de un hidrolizado de proteínas (caseína) de leche de vaca. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de tres experimentos independientes (n=9).

Dada la similar composición general de las fórmulas evaluadas, las diferencias de actividad antirrotavirus podrían explicarse atendiendo a la proporción de proteínas. De hecho, la proporción de las proteínas presentes mayoritariamente en estas preparaciones infantiles, las caseínas y las proteínas del lactosuero, puede variar entre el 40-83% y el 17-60% del total de proteínas, respectivamente, en las fórmulas de continuación (Guo y Ahmad, 2014c). Además de las caseínas y proteínas del lactosuero, en los últimos años se ha incrementado el interés en el uso de la MFGM como ingrediente en las fórmulas infantiles debido a las propiedades funcionales atribuidas a sus fosfolípidos y glicoproteínas (Ross et al., 2015). Así, por ejemplo, el Lactodan MFGM-10 es un WPC que contiene MFGM y que se ha utilizado como ingrediente en fórmulas infantiles por su alta concentración de proteínas y lípidos bioactivos. La

elevada capacidad antirrotavirus de este WPC ( $IC_{50}$  de 0,20 mg/mL) ha sido demostrada en este estudio y discutida anteriormente.

A este respecto, dada la elevada actividad antirrotavirus de la leche de fórmula 1 ( $IC_{50}$  de 1,89 mg/mL), en comparación con las demás fórmulas analizadas ( $IC_{50} \geq 6$  mg/mL), se decidió profundizar en su caracterización. Así, tal y como se muestra en la **Figura 38**, se comprobó la presencia de las proteínas de MFGM MUC1 y LDH en la leche de fórmula 1 mediante SDS-PAGE y Western-blotting.

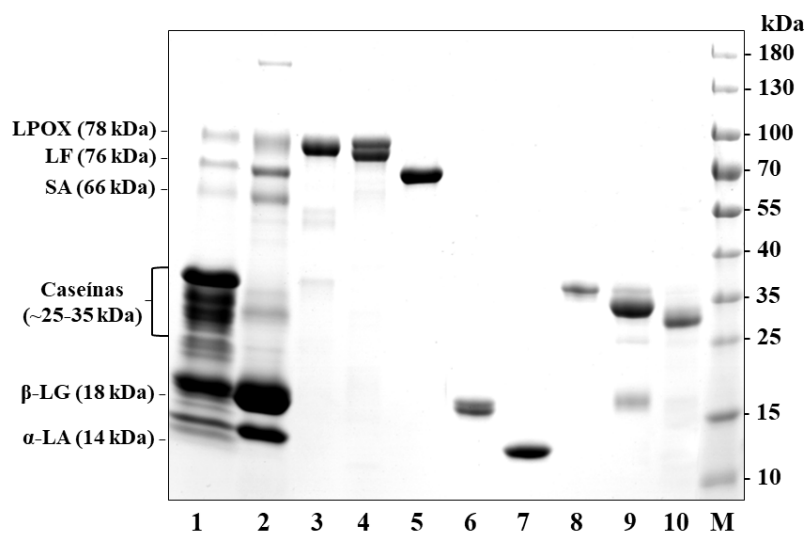


**Figura 38.** Detección de MUC1 en la leche infantil de fórmula 1 mediante tinción PAS (A) y Western-blotting con antisuero específico anti-MUC1 bovina (B). (C) Detección de LDH en la leche infantil de fórmula 1 mediante Western-blotting con antisuero específico anti-LDH bovina. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras, en geles del 10% de poliacrilamida. Muestras: 1, MUC1 bovina (control positivo); 2, leche infantil de fórmula 1 (1,5 mg/pocillo); 3, leche infantil de fórmula 1 (3 mg/pocillo); 4, leche infantil de fórmula 1 (0,9 mg/pocillo); 5, leche infantil de fórmula 1 (1,2 mg/pocillo); 6, LDH bovina (control positivo).

La MUC1 se detectó claramente en el preparado lácteo, con una banda que coincidió con el peso molecular de la MUC1 bovina pura (220 kDa). Además, se comprobó que la MUC1 estaba fuertemente glicosilada, dada la intensa coloración obtenida con la tinción PAS para glicoproteínas, de acuerdo con el 57-65% de glicosilación descrito por Ross et al. (2015). La LDH se detectó en sus dos variantes (PAS6 y PAS7) con una marcada intensidad, correspondiendo a los pesos moleculares de 47 y 52 kDa. La concentración de LDH en la fórmula 1 se estimó en 0,18% (p/p) mediante un ELISA competitivo previamente desarrollado en nuestro laboratorio.

Tal y como se ha discutido en diversos artículos del presente compendio, se ha comprobado que el potencial antirrotavirus de la leche bovina está asociado principalmente al lactosuero, debido a la presencia de diversas proteínas que han mostrado una elevada actividad inhibitoria frente a la cepa WC3 de rotavirus bovino, especialmente las IgGs y la LF. Además, se ha detectado la presencia de proteínas de la MFGM en el lactosuero, como la XOD y la LDH, con un elevado potencial antirrotavirus frente a la WC3.

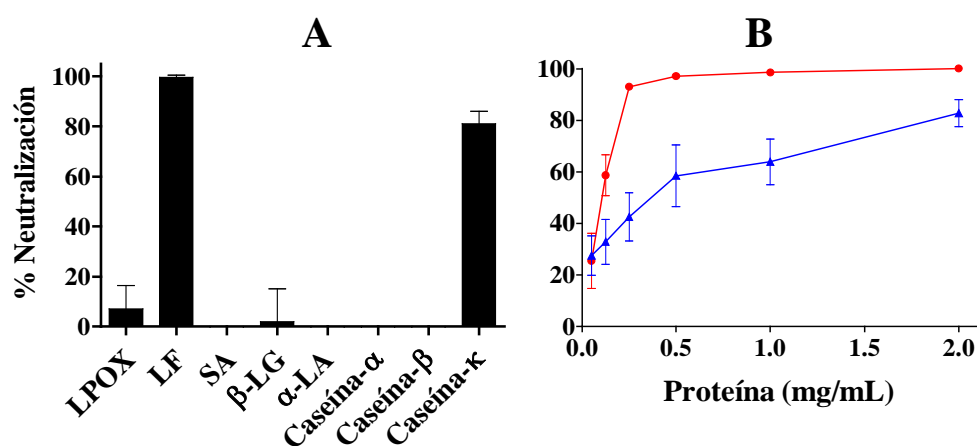
Con el objetivo de completar la información relativa al potencial antirrotavirus de la fracción proteica del lactosuero bovino, se evaluaron las proteínas mayoritarias más relevantes: la  $\beta$ -LG, la  $\alpha$ -LA, la SA y la LPOX. Además, se evaluaron también las caseínas- $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ , derivadas de leche bovina, para determinar en qué medida participaban de la actividad neutralizante frente a la cepa WC3 previamente observada para la fracción completa de caseínas bovinas ( $IC_{50}$  de 1,83 mg/mL). Así, se comprobó la pureza de las proteínas comerciales mediante SDS-PAGE (Figura 39), que se estimó en más del 90% en todos los casos, por lo que se emplearon sin posterior purificación.



**Figura 39.** Perfil electroforético de las proteínas de leche bovina comerciales. Muestras: 1, leche desnatada; 2, lactosuero; 3, lactoferrina (LF); 4, lactoperoxidasa (LPOX); 5, albúmina sérica (SA); 6,  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -LG); 7,  $\alpha$ -lactalbúmina ( $\alpha$ -LA); 8, caseína- $\alpha$ ; 9, caseína- $\beta$ ; 10, caseína- $\kappa$ ; M, marcador de pesos moleculares. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras, en geles del 4-20% de poliacrilamida que se tiñeron con PAS y Coomassie.



Posteriormente, la capacidad antirrotavirus de las proteínas comerciales bovinas se evaluó mediante el ensayo de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3, comprobándose una muy escasa o nula actividad para la mayoría de proteínas. De hecho, tal y como se muestra en la **Figura 40**, la  $\beta$ -LG, la  $\alpha$ -LA, la SA, la LPOX y las caseínas- $\alpha$  y  $\beta$  no presentaron actividad a 2 mg/mL de concentración. Por el contrario, además de la LF, de cuya actividad antirrotavirus se ha discutido ampliamente, la caseína- $\kappa$  presentó un  $IC_{50}$  de 0,35 mg/mL. Esta actividad resultó muy inferior a la descrita por Inagaki et al. (2014), quienes atribuyeron a la caseína- $\kappa$  bovina un  $IC_{50}$  de 0,1  $\mu$ g/mL frente a la infección de células MA104 con rotavirus humanos MO. Estos autores concluyeron que la actividad antirrotavirus de la caseína- $\kappa$ , glicoproteína con alrededor del 60% de glicosilación en su estructura (O’Riordan et al., 2014), estaba mediada por la interacción directa de sus residuos O-glicosilados con las partículas víricas. Las diferencias entre los resultados podrían atribuirse a divergencias en los procedimientos experimentales y a la variabilidad entre las cepas víricas empleadas.



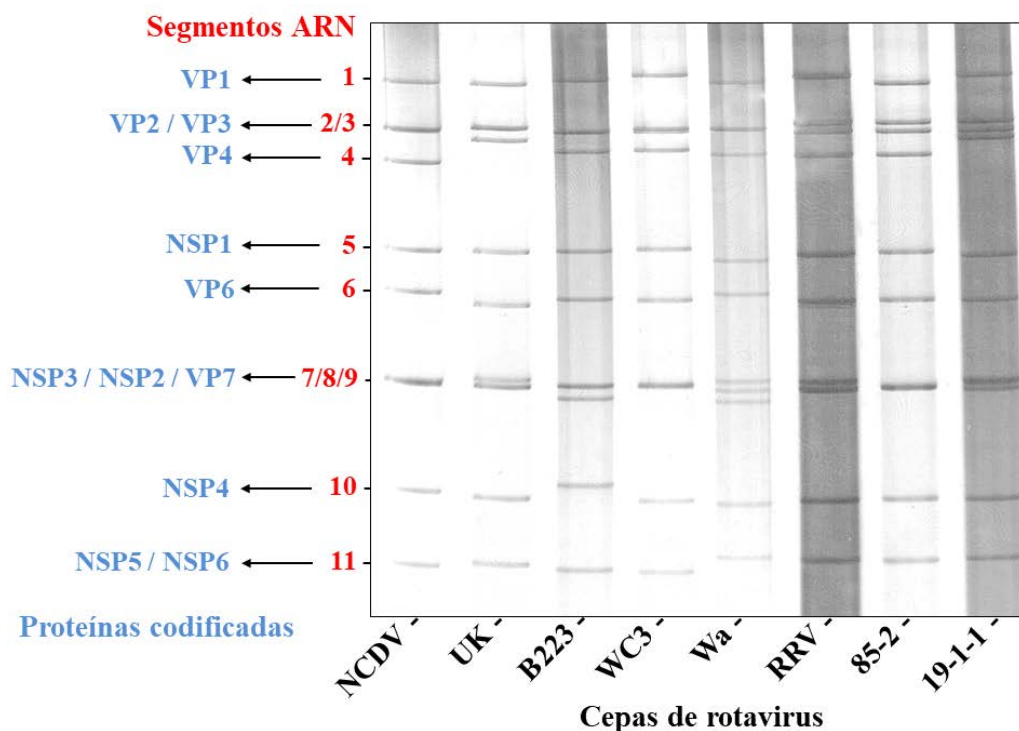
**Figura 40.** (A) Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3 mediada por diversas proteínas de leche bovina comercial a una concentración de 2 mg/mL. LPOX, lactoperoxidasa; LF, lactoferrina; SA, albúmina sérica;  $\beta$ -LG,  $\beta$ -lactoglobulina;  $\alpha$ -LA,  $\alpha$ -lactalbúmina. (B) Dosis-respuesta de la neutralización exhibida por la LF (●) y la caseína- $\kappa$  (▲). Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de tres experimentos independientes (n=9).

### 4.2.1.3. Neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus

#### 4.2.1.3.1. Caracterización del ARN vírico

En este estudio se ha evaluado la capacidad neutralizante de múltiples proteínas y fracciones lácteas frente a 8 cepas de rotavirus distintas, con diferente sensibilidad al tratamiento con neuraminidasa y pertenecientes a diferentes serotipos P y G (tal y como se ha indicado en el apartado 3.1.10): 4 bovinas (WC3, UK, NCDV, B223), 1 humana (Wa), 1 de simio (RRV) y 2 cepas reagrupadas (UK x RRV 19-1-1 y UK x RRV 85-2).

Las diferentes cepas de rotavirus se propagaron y su genoma se caracterizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con el fin de comprobar la pureza de los stocks virales obtenidos y la adecuación para su uso en posteriores ensayos de actividad con muestras lácteas. Así, tal y como se muestra en la **Figura 41**, las suspensiones víricas obtenidas, correspondientes a cada cepa de rotavirus propagada, no estaban contaminadas con otras cepas.



**Figura 41.** Perfil electroforético de los segmentos de ARN viral de las diversas suspensiones de rotavirus. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones no reductoras, en gels del 10% de poliacrilamida que se tiñeron con plata.

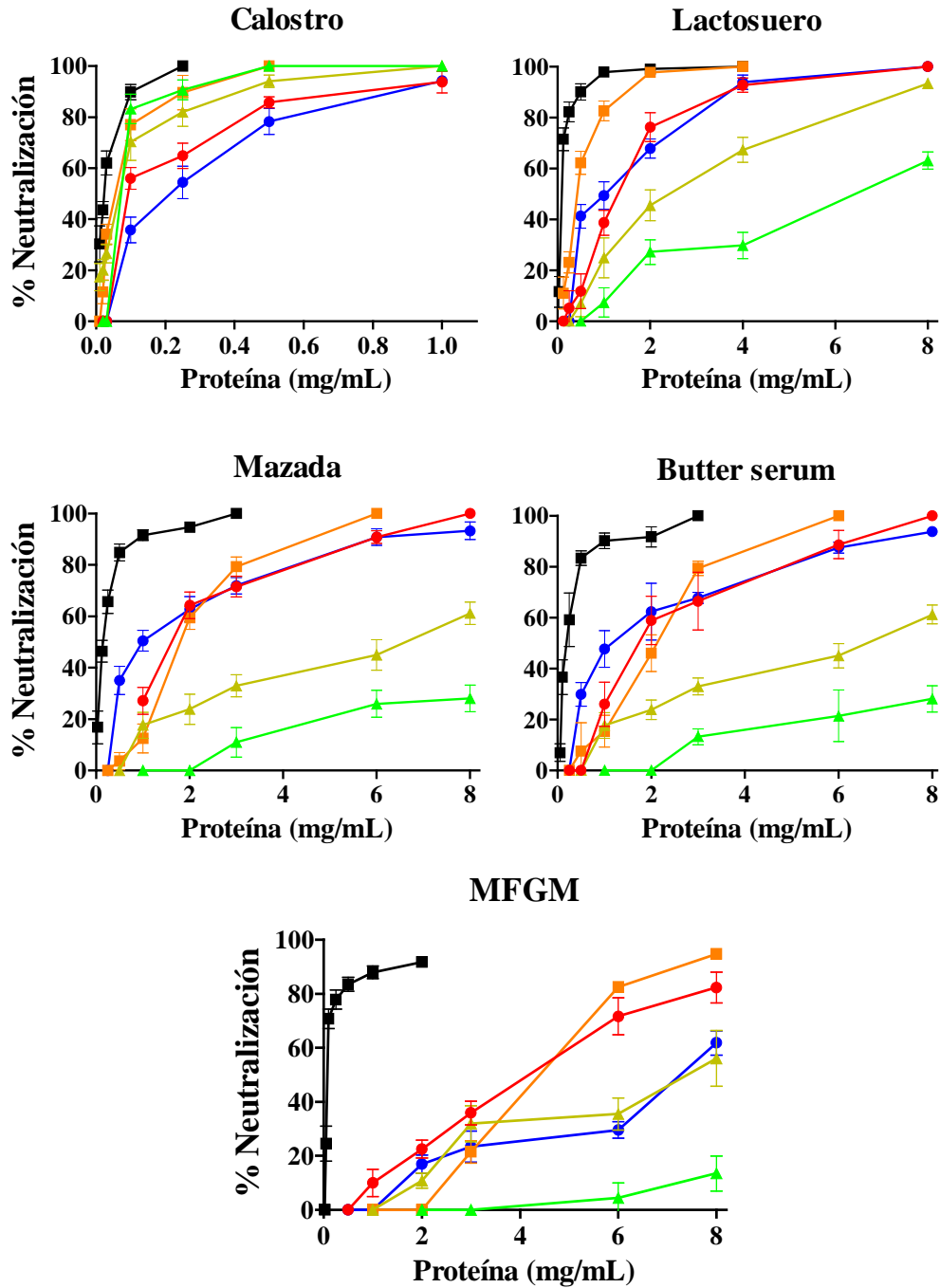
Los 11 segmentos de ARN que constituyen el genoma viral codifican la síntesis de las proteínas estructurales (VP1 a VP6) y no estructurales (NSP1 a NSP6) que conforman el rotavirus (Estes y Greenberg, 2013). En la **Figura 41** se puede comprobar la diferente migración de los segmentos de ARN viral en el gel, generando un patrón electroforético característico para cada cepa de rotavirus. Cabe destacar que tanto los genes 2 y 3, que codifican la síntesis de las proteínas VP2 y VP3, respectivamente, como los genes 7, 8 y 9, que codifican la síntesis de las proteínas NSP3, NSP2 y VP7, respectivamente, tienen un tamaño similar entre sí, por lo que aparecen casi solapados en el gel. Además, el gen 11 codifica la síntesis de dos proteínas no estructurales, la NSP5 y la NSP6 (Harrison y Dormitzer, 2016).

Por otra parte, se ha comprobado el patrón electroforético del genoma de los virus reagrupados empleados en la tesis, las cepas 19-1-1 y 85-2 derivadas de la transfección con las cepas RRV y UK (Díaz-Salinas et al., 2013). Así, tal y como se muestra en la **Figura 41**, la cepa 19-1-1 posee el mismo perfil electroforético que la cepa RRV, excepto el gen que codifica la proteína VP4, que es igual al de la cepa UK. En cambio, la cepa 85-2 presenta el mismo perfil que la cepa RRV, excepto para los genes que codifican las proteínas VP7 y VP1, que provienen de la cepa UK.

#### **4.2.1.3.2. Neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas ovinas**

La capacidad neutralizante de diversas fracciones y proteínas lácteas bovinas y ovinas frente a la infección de células MA104 por distintas cepas de rotavirus se ha evaluado en este trabajo mediante el método de neutralización con inmunodetección con carbazol. Dado que los resultados correspondientes a las muestras bovinas están incluidos en el 4º artículo del presente compendio, aquí se presentan exclusivamente los relativos a las muestras ovinas.

En la **Figura 42** se incluyen los resultados de neutralización exhibidos por las fracciones lácteas ovinas frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3, UK, NCDV y B223, la cepa humana Wa y la cepa de simio RRV. Se ha comprobado que existen claras diferencias de actividad neutralizante entre las muestras lácteas y, además, se ha observado diferente susceptibilidad a la neutralización entre cepas de rotavirus.



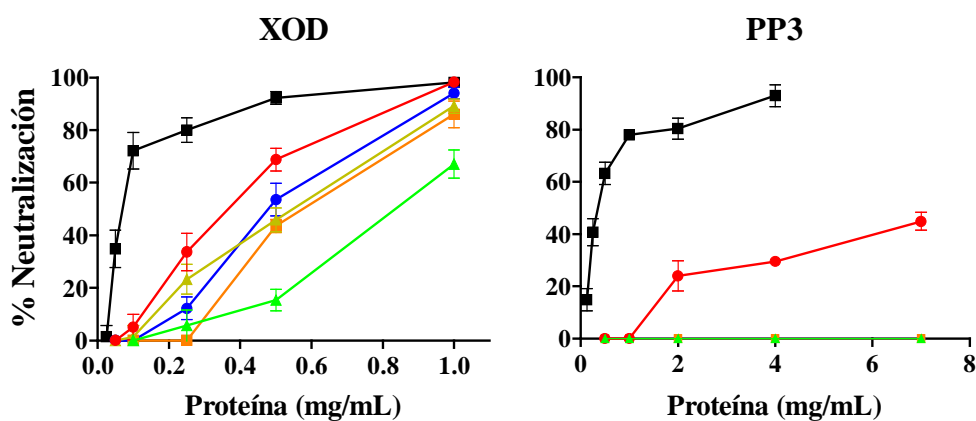
**Figura 42.** Neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus mediada por fracciones lácteas ovinas. Cepas de rotavirus: WC3 (●); UK (◆); B223 (▲); Wa (▲); NCDV (■); RRV (■). Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4). MFGM, membrana del glóbulo graso de la leche.

De forma general para las distintas cepas, se ha comprobado una actividad neutralizante que respeta el siguiente orden: calostro > lactosuero > fracciones derivadas del procesado de la nata (mazada  $\approx$  butter serum > MFGM) (**Figura 42**). Así, el calostro ovino presentó unos  $IC_{50}$  de 0,019, 0,059, 0,072, 0,072, 0,12 y 0,22 mg de proteína/mL frente a las cepas de rotavirus NCDV, RRV, B223, Wa, WC3 y UK, respectivamente. El lactosuero ovino también mostró una alta capacidad antirrotavirus, especialmente frente a las cepas NCDV, RRV, UK y WC3, con  $IC_{50}$  de 0,094, 0,43, 0,98 y 1,35 mg/mL, respectivamente; aunque con menor actividad frente a las cepas Wa ( $IC_{50}$  de 2,66 mg/mL) y B223 ( $IC_{50}$  de 6,08 mg/mL). En cuanto a las fracciones derivadas del procesado de la nata, se comprobó una menor actividad neutralizante en comparación con el lactosuero y el calostro. A este respecto, la mazada y el butter serum ovinos mostraron una capacidad antirrotavirus similar, presentando unos  $IC_{50}$  de 0,13 y 0,17; 1,02 y 1,19; 1,61 y 1,66; 1,74 y 1,90; 6,30 y 6,52; y > 8 mg de proteína/mL frente a las cepas de rotavirus NCDV, UK, WC3, RRV, Wa y B223, respectivamente. La MFGM ovina neutralizó de manera menos efectiva la infección de las células MA104 por las cepas B223, UK, Wa, RRV y WC3, con  $IC_{50}$  de > 8; 7,19; 6,44; 4,25 y 3,98 mg de proteína/mL, respectivamente. En cambio, la MFGM ovina mostró una elevada actividad frente a la cepa NCDV, para la que se determinó un  $IC_{50}$  de 0,080 mg/mL.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la gran influencia de la cepa de rotavirus en la actividad inhibitoria de las fracciones. A este respecto, se ha comprobado la diferente susceptibilidad de las cepas a la neutralización por parte de las fracciones lácteas. Así, se han observado diferencias notables al comparar los perfiles de neutralización de las cepas sensibles a NA (NCDV y RRV) con las cepas resistentes a NA (WC3, UK, B223 y Wa). De hecho, las cepas sensibles a NA mostraron, de manera general, una mayor susceptibilidad a la neutralización por las fracciones lácteas ovinas, de manera similar a lo detectado para las muestras bovinas (discutido en el 4º artículo del compendio). Así, la cepa bovina NCDV (G6P[1]) fue la más eficientemente neutralizada, obteniéndose unos valores de  $IC_{50}$  de 0,019, 0,094 y entre 0,08-0,17 mg/mL tras su neutralización con el calostro, el lactosuero y las fracciones derivadas de la nata ovinas, respectivamente. Respecto a la cepa de simio RRV (G3P[3]), se ha comprobado una mayor susceptibilidad, en comparación con las cepas resistentes a NA, con el calostro ( $IC_{50}$  de 0,059 mg/mL) y el lactosuero ( $IC_{50}$  de 0,43 mg/mL) ovinos. En cambio, las fracciones derivadas de la nata ovina presentaron valores  $IC_{50}$  comparables entre la cepa sensible a NA RRV y las cepas resistentes WC3 y UK, aunque notablemente inferiores a los obtenidos frente a las cepas resistentes B223 y Wa.

Por otra parte, es interesante observar la similar actividad mostrada por la mayoría de fracciones lácteas frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3 y UK, lo que podría estar relacionado con el hecho de que estas cepas pertenecen al mismo serotipo G6P[5].

Además, mediante el ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol se evaluó la actividad de la XOD y la PP3 ovinas frente a las diversas cepas de rotavirus (**Figura 43**). De esta manera, se confirmó que la XOD presenta una alta capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por diferentes cepas de rotavirus, mostrando  $IC_{50}$  de 0,094, 0,34, 0,48, 0,52, 0,56 y 0,69 mg/mL, para las cepas NCDV, WC3, UK, Wa, RRV y B223, respectivamente. La PP3 ovina mostró, en cambio, una baja actividad frente a la mayoría de las cepas de rotavirus testadas, con un  $IC_{50}$  de  $> 7$  mg/mL, en todos los casos excepto frente a la cepa NCDV, que fue neutralizada de manera más efectiva, registrándose un  $IC_{50}$  de 0,36 mg/mL.



**Figura 43.** Neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus mediada por la xantina oxidasa (XOD) y el componente 3 de la proteosa-peptona (PP3) ovinas. Cepas de rotavirus: WC3 (●); UK (●); B223 (▲); Wa (▲); NCDV (■); RRV (■). Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

Si bien en términos generales se han observado similitudes entre estos resultados y los obtenidos con las muestras bovinas (4º artículo del compendio), en términos de diferencias entre cepas y patrón de actividad neutralizante exhibido por las fracciones y proteínas lácteas, las muestras derivadas de leche bovina han mostrado mayor actividad que las ovinas. Estas diferencias interespecie, así como las diferencias en los resultados de neutralización exhibidos por las muestras lácteas ovinas, podrían estar relacionadas con diferencias en composición y/o estructura de los componentes bioactivos de las muestras, con especial mención a los compuestos glicosilados. De hecho, como ya se ha discutido anteriormente, está generalmente aceptado que muchas cepas de rotavirus se unen a residuos de ácido siálico, tanto terminales como subterminales, de los glicoconjugados, e incluso algunos glicanos neutros son reconocidos por los rotavirus humanos (Isa et al., 2006; Yu y Blanchard, 2014). A este respecto, la leche y

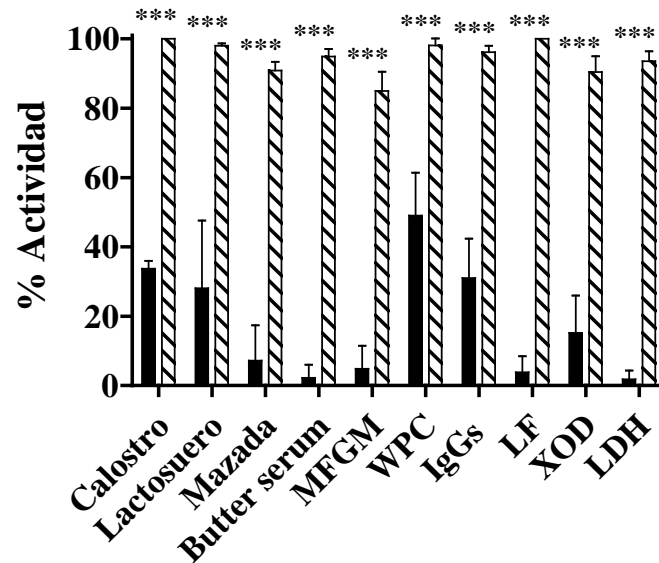
las fracciones lácteas derivadas representan una buena fuente de compuestos glicosilados, principalmente lactosa, oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas, aunque existen variaciones en la proporción de los mismos (Takimori et al., 2011), e incluso se ha documentado un diferente grado y tipo de glicosilación para las proteínas de la leche (O’Riordan et al., 2014; Ross et al., 2015).

#### **4.2.1.4. Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus humano Wa mediante PCR a tiempo real**

Aparte de los ensayos de neutralización con inmunodetección de la infección por fluorescencia y con carbazol, en esta tesis se ha aplicado un método de detección del ARN mediante PCR a tiempo real tras la neutralización (apartado 3.2.10.4). Con este método se ha evaluado la capacidad neutralizante de diversas proteínas y fracciones lácteas frente a la cepa Wa de rotavirus humano, cuyos resultados se incluyen en la **Figura 44**.

Se infectaron las células MA104 con la suspensión de rotavirus humanos Wa obtenida en nuestro laboratorio ( $3,8 \times 10^6$  copias de ARN/ $\mu\text{L}$ ) a diferentes diluciones (1/1 a 1/5<sup>5</sup>) y se obtuvo la recta de calibrado (n=4) representando el logaritmo del número de copias de ARN frente al logaritmo de Ct (ciclo umbral), presentando un  $R^2=0,99$ . Los resultados de neutralización (%) se calcularon en relación al número de copias de ARN vírico del control positivo (virus sin agente neutralizante). El número de copias de ARN vírico remanente tras incubarse con las distintas muestras lácteas se estimó interpolando los valores Ct en la recta de calibrado obtenida con la suspensión de rotavirus.

De esta manera, se comprobó que el calostro bovino (0,1 mg de proteína/mL), el lactosuero bovino y el WPC Lacprodan MFGM-10 (2 mg/mL) presentaban capacidad de reducción del número de copias de ARN de rotavirus humanos Wa, con porcentajes de actividad inhibitoria de 34, 28 y 49%, respectivamente (**Figura 44**). Las fracciones lácteas derivadas del procesado de la nata bovina, mazada, butter serum y MFGM, a una concentración de 2 mg de proteína/mL, presentaron actividades notablemente inferiores, de 7, 2 y 5%, respectivamente. Por otra parte, la actividad antirrotavirus detectada mediante el ensayo de PCR a tiempo real asociada a las proteínas lácteas bovinas fue variable. Así, las IgGs (0,2 mg/mL), la LF (1 mg/mL), la XOD (0,7 mg/mL) y la LDH (0,04 mg/mL), exhibieron actividades del 31, 4, 15 y 2%, respectivamente.



**Figura 44.** Actividad inhibitoria de la infección de células MA104 por rotavirus humano Wa mediada por fracciones y proteínas lácteas bovinas. Comparación de los resultados de inhibición obtenidos mediante PCR a tiempo real (■) e inmunoensayo con carbazol (▨). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre los resultados de los dos ensayos, para cada muestra. Muestras: calostro (0,1 mg/mL); lactosuero (2 mg/mL); mazada (6 mg/mL); butter serum (6 mg/mL); MFGM (6 mg/mL); WPC, Lactrodan MFGM-10 (2 mg/mL); IgGs, inmunoglobulinas G (0,2 mg/mL); LF, lactoferrina (1 mg/mL); XOD, xantina oxidasa (0,7 mg/mL); LDH, lactadherina (0,04 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

Según el diseño del ensayo de PCR a tiempo real, los resultados están relacionados principalmente con la capacidad exhibida por las diversas fracciones y proteínas lácteas para reducir el número de virus que se adsorben a la superficie celular y que posteriormente pueden penetrar e infectar la célula. Además, parte de la actividad detectada podría atribuirse a etapas post-unión, al menos hasta las 6 h post-infección antes de la extracción del ARN viral, puesto que las muestras lácteas y el virus entran en contacto con la monocapa celular durante 1 h a 37 °C, pudiendo ocurrir la endocitosis.

En la **Figura 44** se han representado los resultados del ensayo de PCR a tiempo real en comparación con los resultados del ensayo de neutralización con inmunodetección de la infección con carbazol (incluidos en el 4º artículo del compendio). Como puede observarse, los resultados del segundo ensayo indican una actividad de inhibición de la infección por rotavirus humanos Wa de entre el 85-100%, para las mismas muestras a la misma concentración, que son significativamente superiores a los obtenidos con el ensayo de PCR. Es necesario considerar que el diseño del segundo ensayo (apartado 3.2.10.3) arroja información sobre la capacidad de



las muestras para inhibir la infección por rotavirus a nivel global, como suma de la capacidad para inhibir la unión virus-célula y la capacidad de actuar en etapas post-unión, hasta las 16 h post-infección en que se fija la monocapa celular y se procede a la detección de la infección.

De esta manera, la comparativa de los resultados parece indicar que la inhibición de la infectividad por rotavirus humanos Wa mediada por las diversas fracciones y proteínas lácteas, no sólo se debe a la inhibición de la unión virus-célula, sino que también ocurre a nivel intracelular, en una etapa post-unión, afectando de alguna forma a su capacidad infectiva. Estas observaciones coinciden con los resultados del ensayo de inhibición de la infectividad en etapas post-unión de los rotavirus bovinos WC3 a las células MA104 mediada por muestras lácteas bovinas, llevado a cabo en esta tesis y que se describe y discute en el apartado 4.2.2.2.

#### **4.2.2. Mecanismos de inhibición de la infección por rotavirus mediada por fracciones y proteínas lácteas**

Con el objetivo de esclarecer qué mecanismos emplean las diferentes muestras lácteas para inhibir la infección por rotavirus, se llevaron a cabo cuatro tipos de ensayos: de inhibición de la unión rotavirus-célula; de inhibición post-unión rotavirus-célula; de neutralización de cepas reagrupadas; y de bloqueo celular, cuyos resultados se discuten a continuación.

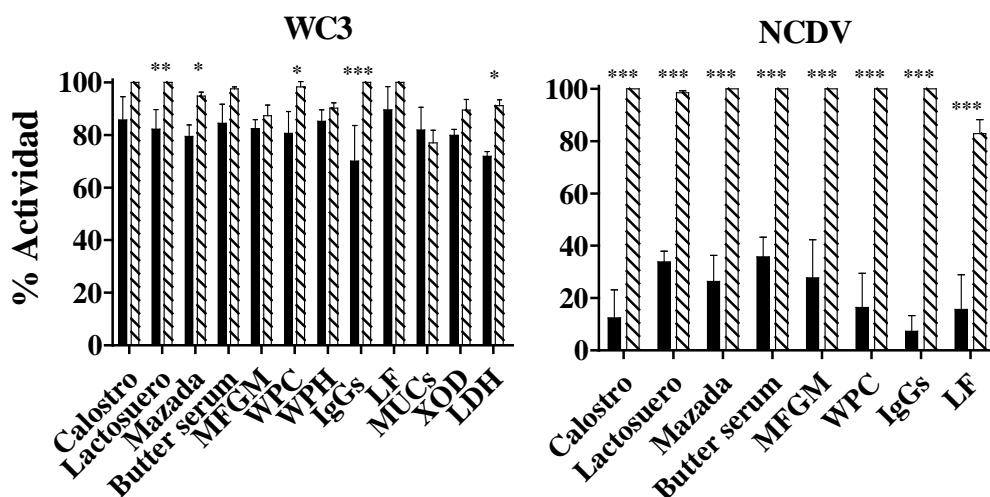
##### **4.2.2.1. Inhibición de la unión rotavirus-célula**

Para el ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula se empleó la cepa de rotavirus bovino WC3, por ser la cepa modelo con la que se han realizado la mayoría de ensayos de neutralización durante el desarrollo de la tesis. Además, se llevaron a cabo ensayos similares con la cepa bovina NCDV, sensible al tratamiento con NA, para poder comparar los resultados obtenidos con la cepa WC3, resistente al tratamiento con NA.

Para ello, se preincubaron durante 1 h a 37 °C las TLPs purificadas junto con las diferentes muestras lácteas, antes de añadirles a las monocapas de células MA104 confluentes. Las mezclas virus-muestras lácteas se incubaron con las células durante 1 h a 4 °C para evitar la endocitosis y localizar la actividad inhibitoria en la superficie celular. Tras la incubación, la monocapa celular se lavó dos veces y el virus adsorbido a las células (es decir, aquel cuya unión a la célula no pudo ser inhibida por la muestra láctea en cuestión) se cuantificó mediante ELISA, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.11.1.

Así, tal y como puede observarse en la **Figura 45**, la mayoría de muestras lácteas bovinas evaluadas presentaron una capacidad de inhibición de la unión del rotavirus bovino WC3 a las células MA104 de más del 70%, respecto al control positivo (TLPs sólo con MEM, sin agente

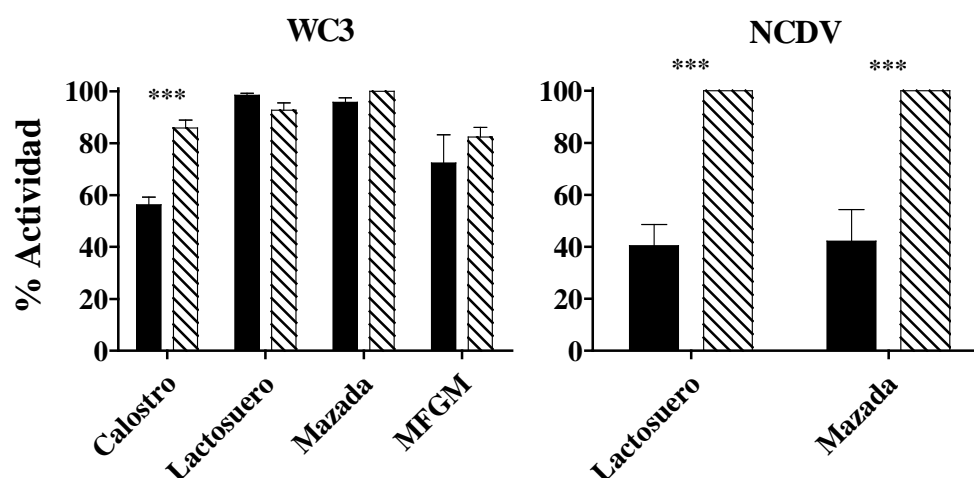
neutralizante). Estos resultados parecen indicar que la actividad neutralizante exhibida por las muestras lácteas frente a la cepa WC3 se debe principalmente a su capacidad para inhibir la unión del rotavirus a las células. A pesar de esto, parece ser que otros mecanismos distintos al de inhibición de la unión virus-célula deben estar involucrados en la capacidad antirrotavirus global, puesto que se han observado diferencias significativas en la actividad exhibida por algunas muestras bovinas, como el lactosuero, la mazada, el WPC, las IgGs y la LDH bovinas (**Figura 45**). En el caso de la cepa bovina NCDV, en cambio, parece más evidente que el mecanismo de neutralización de la infectividad no sólo se debe a la inhibición de la unión a las células, sino también a procesos post-unión. De hecho, para todas las muestras lácteas testadas se ha observado una diferencia significativa entre la actividad de neutralización global y la capacidad de inhibición de la unión rotavirus-célula (**Figura 45**).



**Figura 45.** Inhibición de la unión de los rotavirus bovinos WC3 y NCDV a las células MA104 mediada por fracciones y proteínas lácteas bovinas. Comparación de los resultados de inhibición de la unión rotavirus-célula (■) y de neutralización de la infección (▨). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,1$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) entre los resultados de los dos ensayos, para cada muestra. Muestras: calostro (0,03 mg/mL); lactosuero (2 mg/mL); mazada (8 mg/mL); butter serum (8 mg/mL); MFGM (8 mg/mL); WPC, Lacprodan MFGM-10 (2 mg/mL); WPH, Lacprodan DI-3017 (8 mg/mL); IgGs, inmunoglobulinas G (0,1 mg/mL); LF, lactoferrina (4 mg/mL); MUCs, mucinas (5 mg/mL); XOD, xantina oxidasa (0,35 mg/mL); LDH, lactadherina (0,02 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes ( $n=4$ ).

Mediante este mismo ensayo se han evaluado diversas muestras lácteas ovinas, obteniéndose resultados similares a los anteriormente descritos para las muestras bovinas. Así, tal y como se muestra en la **Figura 46**, la actividad neutralizante exhibida por las muestras

lácteas ovinas frente a la cepa WC3 parece deberse mayoritariamente a su capacidad para inhibir la unión del rotavirus a las células, si bien otros procesos post-unión podrían estar involucrados, hecho que es especialmente evidente en el caso de la cepa bovina NCDV.

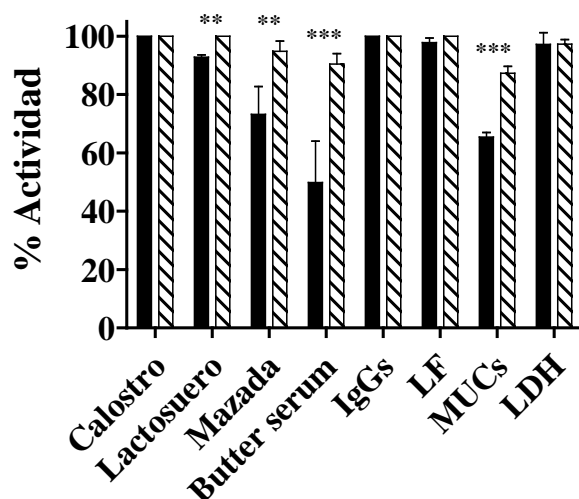


**Figura 46.** Inhibición de la unión de los rotavirus bovinos WC3 y NCDV a las células MA104 mediada por fracciones y proteínas lácteas ovinas. Comparación de los resultados de inhibición de la unión rotavirus-célula (■) y de neutralización de la infección (▨). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0,001$  entre los resultados de los dos ensayos, para cada muestra. Muestras: calostro (0,5 mg/mL); lactosuero (4 mg/mL); mazada (8 mg/mL); MFGM (8 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

#### 4.2.2.2. Inhibición post-unión rotavirus-célula

El ensayo de inhibición post-unión rotavirus-célula se realizó para evaluar la capacidad de las muestras lácteas de inhibir la infección de la línea celular MA104 por rotavirus bovinos WC3 después de que éstos se hubieran unido a las células. Para ello, se incubaron las células con los virus durante 1 hora a 4 °C, permitiendo a esta temperatura que el virus se adsorba a la superficie celular pero sin penetrar en el citoplasma, proceso que sí ocurre a 37 °C. Posteriormente, tras eliminar mediante lavado los virus no adsorbidos, se añadieron las muestras lácteas a testar, se incubaron 1 hora a 37 °C, y se procedió como se ha detallado anteriormente para los ensayos de neutralización con inmunodetección con carbazol. Bajo estas condiciones, es razonable asumir que si se observa inhibición de la infección, esta esté ocurriendo en una etapa posterior a la unión del rotavirus a la célula.

De esta manera, tal y como se muestra en la **Figura 47**, se ha comprobado que todas las fracciones y proteínas lácteas testadas son capaces, en mayor o menor medida, de inhibir la infectividad de los rotavirus (WC3) incluso una vez unidos a las células. De hecho, el calostro, las IgGs, la LF y la LDH bovinas, a las concentraciones testadas, presentaron la capacidad de inhibición de la infección post-unión virus-célula, que fue muy similar a su capacidad global de neutralización de la infección por rotavirus.



**Figura 47.** Inhibición de la infectividad en etapas post-unión de los rotavirus bovinos WC3 a las células MA104 mediada por fracciones y proteínas lácteas bovinas. Comparación de los resultados de inhibición post-unión (■) y de neutralización de la infección (▨). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) entre los resultados de los dos ensayos, para cada muestra. Muestras: calostro (0,03 mg/mL); lactosuero (2 mg/mL); mazada (8 mg/mL); butter serum (8 mg/mL); IgGs, inmunoglobulinas G (0,1 mg/mL); LF, lactoferrina (0,5 mg/mL); MUCs, mucinas (10 mg/mL); LDH, lactadherina (0,04 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

El lactosuero, la mazada, el butter serum y las MUCs bovinas también mostraron actividad de inhibición post-unión virus-célula, si bien a las concentraciones testadas esta actividad resultó significativamente inferior a su capacidad antirrotavirus global (**Figura 47**). Si comparamos estos resultados con los del ensayo de inhibición de la unión rotavirus-célula, parece evidente que la capacidad global antirrotavirus (al menos frente a la cepa bovina WC3) exhibida por estas muestras lácteas se debe a la suma de su potencial de inhibición de la unión virus-célula más su capacidad de actuación en etapas posteriores a esa unión e incluso a nivel intracelular. A este respecto, Kvistgaard et al. (2004) obtuvieron resultados similares, comprobando que un WPC bovino era capaz de neutralizar la infección de células Caco-2 por el

rotavirus humano Wa, tanto en ensayos de unión rotavirus-célula como en ensayos post-unión. En cambio, en ese mismo estudio, la LDH humana sólo mostró capacidad para inhibir la unión del rotavirus humano a las células.

Como hipótesis en relación a los resultados obtenidos en el ensayo post-unión virus-célula, es posible que las muestras lácteas sean capaces de separar los virus ya unidos a la superficie celular interaccionando con proteínas de la cápside viral de manera similar a como lo hacen para inhibir la unión virus-célula. Por otra parte, tal vez las fracciones y proteínas lácteas son capaces de interaccionar con más de un sitio de unión en la cápside del rotavirus, pudiendo así interferir en las etapas de unión y post-unión durante la infección celular. Es necesario seguir investigando para poder discernir la veracidad y relevancia de estos mecanismos de acción.

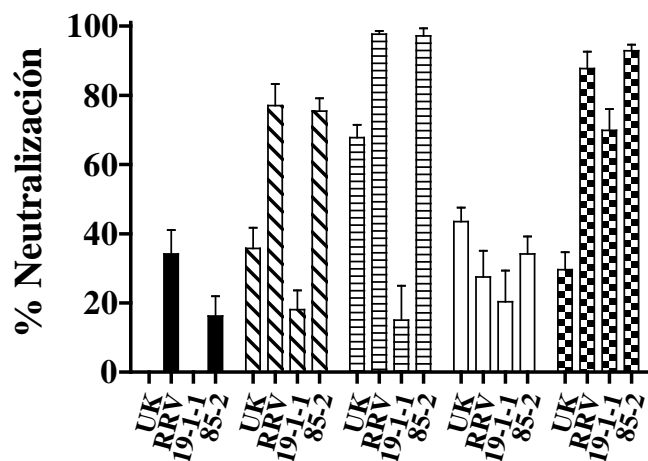
#### 4.2.2.3. Neutralización de cepas reagrupadas

Con el objetivo de identificar las proteínas virales asociadas con la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas bovinas y ovinas, se ha evaluado su capacidad de inhibición de la infección de dos cepas de virus reagrupados (19-1-1 y 85-2) derivadas de la transfección con las cepas RRV (de simio) y UK (bovina). La cepa 19-1-1 posee todas las proteínas de la cápside iguales a RRV, excepto la VP4, que es de UK. En el caso de la cepa 85-2, esta tiene las proteínas iguales a RRV, excepto la VP7, que es de UK, tal y como describen Díaz-Salinas et al. (2013). Puesto que las cepas RRV y UK fueron neutralizadas de diferente manera por las diversas muestras lácteas testadas, mediante el uso de virus reagrupados UK x RRV con diferentes combinaciones de las proteínas VP4 y VP7, es posible determinar qué proteína de la cápside del rotavirus está asociada a la actividad inhibitoria. Si bien en el 4º artículo del presente compendio ya se han incluido resultados a este respecto, derivados del estudio de la interacción de múltiples fracciones y proteínas lácteas bovinas con los virus reagrupados, a continuación se detallan y discuten los resultados correspondientes a las fracciones lácteas ovinas.

Así, tal y como se muestra en la **Figura 48**, el calostro ovino neutralizó la infectividad de la cepa RRV un 34% a 0,03 mg/mL, mientras que la cepa UK mantuvo su infectividad a esa concentración, indicando que la VP4, la VP7, o ambas proteínas de la cápside del virus RRV, pero no de UK, estaban siendo la diana de los componentes del calostro para la inhibición de la infectividad del virus. Los ensayos de neutralización con las cepas de rotavirus reagrupadas 85-2 y 19-1-1 nos permitieron discernir qué proteína de la cápside del rotavirus RRV era la diana principal de los componentes antirrotavirus. Así, la infectividad del virus RRV y el reagrupado 85-2 fue inhibida entre un 16-34%, mientras que la infectividad del UK y del reagrupado 19-1-1 no fue afectada (100% de infectividad), indicando claramente que es la

proteína VP4, y no la VP7, de RRV, la que interacciona con los componentes inhibitorios del calostro ovino, previniendo la infección por el virus.

Resultados similares se han obtenido para el calostro (0,1 mg/mL), lactosuero (2 mg/mL) y MFGM ovinos (6 mg/mL) (**Figura 48**), así como para las fracciones lácteas bovinas evaluadas (artículo 4°), por lo que parece claro que la mayoría de muestras lácteas neutralizan al rotavirus a través del bloqueo de su proteína VP4. Estas observaciones confirman los resultados obtenidos en los ensayos de unión, en los que se ha comprobado que la inhibición de la unión de los rotavirus a las células es un mecanismo empleado por la mayoría de muestras lácteas para neutralizar su infectividad. Además, los resultados concuerdan con el hecho de que la cepa RRV sensible a NA interactúa eficientemente con los glicanos, especialmente ácido siálico, a través del dominio VP8\* de la proteína VP4, que ha sido identificado como un importante factor de unión del virus a las células (Arias et al., 2016; Isa et al., 2008, 2006).



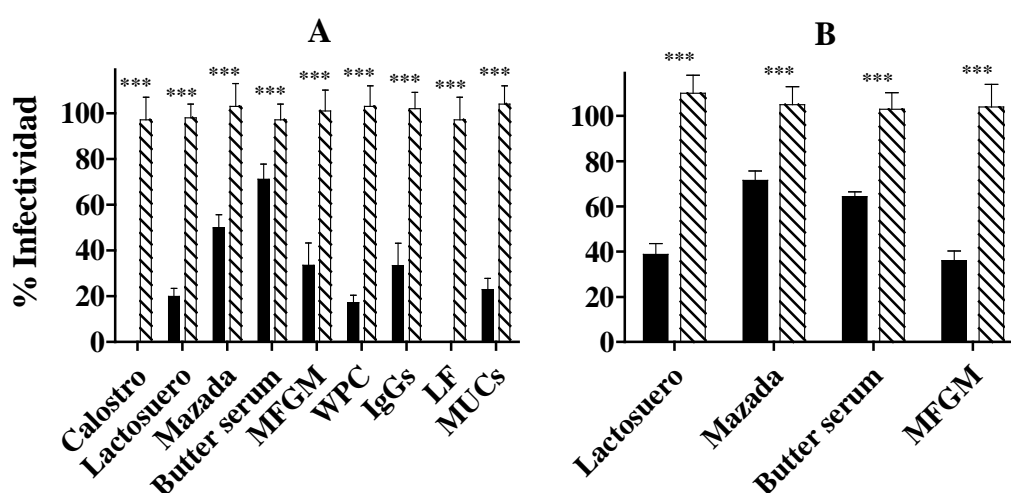
**Figura 48.** Neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus reagrupados (UK x RRV) mediada por fracciones y proteínas lácteas ovinas. Muestras: (■) calostro (0,03 mg/mL); (▨) calostro (0,1 mg/mL); (▩) lactosuero (2 mg/mL); (□) mazada (1 mg/mL); (▣) MFGM (6 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

En cambio, la mazada ovina a 1 mg/mL mostró un comportamiento distinto al del resto de fracciones. A falta de confirmar estas observaciones con experimentos adicionales, parece ser que esta fracción interacciona preferentemente con la proteína VP7 de la cápside de UK, puesto que neutraliza de manera más efectiva las cepas UK y 85-2. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para las IgGs bovinas, que neutralizaron la infección por rotavirus vía interacción con la proteína VP7 de UK. El bloqueo de la proteína VP7 inhibiría la entrada del virus a la célula evitando su interacción con las integrinas celulares, según diversos estudios (Graham et al.,

2005, 2003; Guerrero et al., 2000a). El patrón de neutralización de otras proteínas lácteas bovinas, como la LF y la LDH, se mostró más complejo, probablemente debido a que estas proteínas interaccionan con ambas proteínas VP7 y VP4 de la cápside de UK.

#### 4.2.2.4. Bloqueo celular

Mediante el ensayo de bloqueo celular se ha querido comprobar si la actividad antirrotavirus exhibida por las fracciones y proteínas lácteas está asociada a la interacción con las células MA104. Para ello, se incubaron las células con las muestras durante 1 h a 4 °C, para evitar la endocitosis, y se infectaron con la suspensión de rotavirus bovinos WC3 procediendo, posteriormente, a realizar el ensayo de neutralización mediante inmunodetección con carbazol. Como puede observarse en la **Figura 49**, parece claro que las muestras lácteas no interaccionan con receptores celulares, puesto que la incubación de las células con las muestras lácteas resultó en, aproximadamente, un 100% de infectividad en todos los casos.



**Figura 49.** Inhibición de la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3 mediada por fracciones y proteínas lácteas bovinas (A) y ovinas (B) preincubadas con los rotavirus (■) o con las células (▨). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*) entre los resultados de las dos preincubaciones, para cada muestra. Muestras: calostro (0,1 mg/mL); lactosuero (1 mg/mL); mazada (3 mg/mL); butter serum (2 mg/mL); MFGM (3 mg/mL); WPC, Lacprodan MFGM-10 (1 mg/mL); IgGs, inmunoglobulinas G (0,03 mg/mL); LF, lactoferrina (0,5 mg/mL); MUCs, mucinas (5 mg/mL). Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

Se puede concluir, por tanto, que la actividad antirrotavirus exhibida por las muestras lácteas se debe a su interacción con los virus, en etapas pre y/o post-unión virus-célula, y no con las células. Estos resultados contrastan con las observaciones de diversos estudios en los que la LF bovina mostró actividad frente al virus del herpes simple tipo 1 y el VIH (Roderiquez et al., 1995; WuDunn y Spear, 1989), atribuyendo parte de esta actividad a la capacidad de la LF para competir con los virus por los receptores celulares, especialmente por proteoglicanos celulares conteniendo heparan sulfato (Wu et al., 1995).

#### **4.2.3. Efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas**

En esta tesis se ha evaluado la influencia del tratamiento enzimático de diversas fracciones y proteínas lácteas en su actividad antirrotavirus. A este respecto, se ha testado el lactosuero, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM procedentes de leche cruda bovina y ovina, la fracción PPT y la PP3 bovinas y ovinas, la LF bovina y diversos derivados lácteos comerciales, como leche desnatada, mazada, butter serum y WPC bovinos.

Puesto que solamente se han publicado los resultados relativos al efecto de la degradación enzimática sobre la actividad antirrotavirus de la LF bovina (incluidos en el artículo 3º de este compendio), a continuación se detallan los resultados restantes.

##### **4.2.3.1. Degradación enzimática del lactosuero y de las fracciones lácteas derivadas de la nata bovina y ovina**

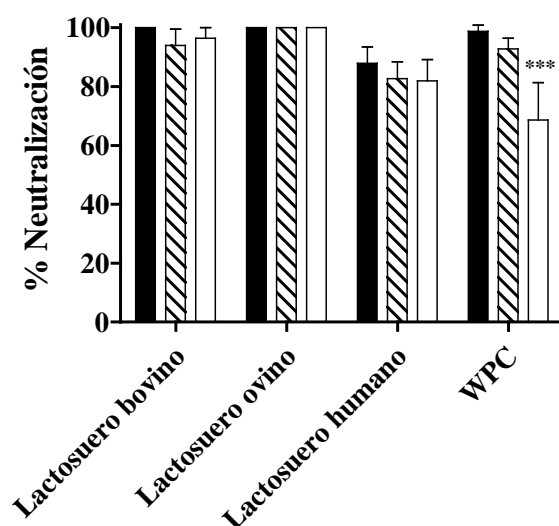
El lactosuero, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM procedentes de leche cruda bovina y ovina, así como el WPC bovino comercial, se sometieron a una degradación enzimática simulando una digestión gastrointestinal *in vitro* (Gallier et al., 2012; Jiménez-Saiz et al., 2011; Le et al., 2012).

Las muestras lácteas se hidrolizaron mediante dos procedimientos: una digestión gástrica con pepsina (2 h a 37 °C) seguida de una digestión intestinal con tripsina y quimotripsina (3,5 h a 37 °C) (digestión simple); y una degradación enzimática con carboxipeptidasa A, elastasa, sales biliares, lipasa y colipasa, además de las enzimas de la digestión simple (3,5 h a 37 °C) (digestión completa). Las muestras hidrolizadas fueron liofilizadas y reconstituidas con PBS a 5 mg/mL, concentración a la que se evaluó su actividad antirrotavirus frente a la cepa bovina WC3 mediante el ensayo de neutralización con detección por inmunofluorescencia.

En la **Figura 50** se muestran los resultados obtenidos en relación al efecto de la degradación enzimática del lactosuero en su actividad antirrotavirus. Como puede observarse, la



hidrólisis enzimática del lactosuero, tanto simple como completa, no causó una pérdida significativa de su actividad antirrotavirus. De hecho, los hidrolizados generados por ambos tipos de degradación del lactosuero bovino, ovino y humano a una concentración de 5 mg/mL presentaron una actividad antirrotavirus máxima de 96, 100 y 83%, respectivamente, comparable con la actividad exhibida por las muestras sin degradar a la misma concentración, de 100, 100 y 88%, respectivamente.

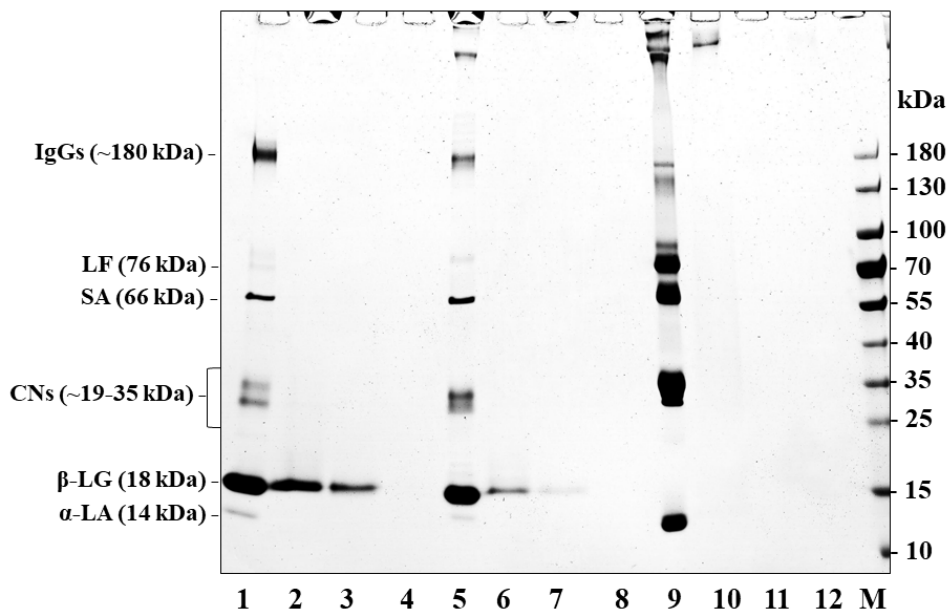


**Figura 50.** Efecto de la degradación enzimática del lactosuero en su actividad neutralizante frente a la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3. Los lactosueros fueron sometidos a una digestión simple (▨) y una digestión completa (□) y testados a 5 mg/mL. Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de un único experimento (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*\*)  $p < 0,001$  respecto a las muestras sin degradar (■).

En cambio, aunque la degradación simple del WPC bovino no alteró la capacidad antirrotavirus del hidrolizado resultante, que se mantuvo al 93% a 5 mg/mL, la hidrólisis completa la disminuyó de manera significativa, en torno al 30%, respecto al WPC sin degradar (**Figura 50**). La mayor susceptibilidad del WPC a la hidrólisis, en comparación con el lactosuero bovino crudo, podría deberse al tratamiento térmico comercial del WPC. De hecho, el tratamiento térmico modifica notablemente la estructura tridimensional de las proteínas del lactosuero, provocando la pérdida de su estructura secundaria y terciaria, haciéndolas más sensibles a la acción de las enzimas digestivas (Dupont y Tome, 2014), tal y como se ha demostrado para la  $\beta$ -LG (Barbé et al., 2013) y la  $\alpha$ -LA (Inglingstad et al., 2010).

La eficacia de la degradación enzimática de las muestras lácteas se comprobó mediante SDS-PAGE. Así, tal como se muestra en la **Figura 51**, incluso la digestión gástrica con pepsina

degradó la mayoría de proteínas del lactosuero, a excepción de la  $\beta$ -LG. Además, con la digestión intestinal simple y completa, se ha observado la pérdida progresiva de intensidad de las bandas electroforéticas. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados con leche cruda y concentrados de proteínas del lactosuero bovinos (Dupont y Tome, 2014; Gallier et al., 2012; Mota et al., 2004).



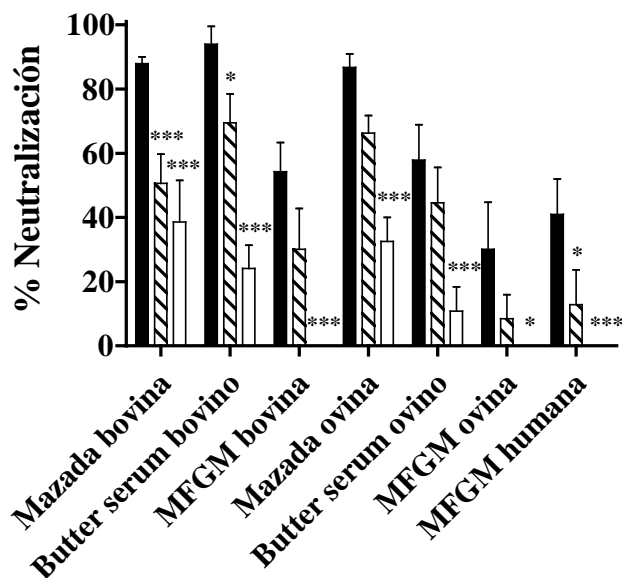
**Figura 51.** Perfil electroforético de los lactosueros degradados enzimáticamente. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones no reductoras, en geles del 4-20% de poliacrilamida, que fueron teñidos con plata. Muestras: 1, lactosuero bovino sin degradar; 2, lactosuero bovino tras digestión con pepsina; 3, lactosuero bovino tras digestión simple; 4, lactosuero bovino tras digestión completa; 5, lactosuero ovino sin degradar; 6, lactosuero ovino tras digestión con pepsina; 7, lactosuero ovino tras digestión simple; 8, lactosuero ovino tras digestión completa; 9, lactosuero humano sin degradar; 10, lactosuero humano tras digestión con pepsina; 11, lactosuero humano tras digestión simple; 12, lactosuero humano tras digestión completa; M, marcador de pesos moleculares.

Así, se ha demostrado que la estructura globular de la  $\beta$ -LG la hace muy resistente a la proteólisis por enzimas digestivos, permaneciendo casi inalterada tras la digestión gástrica durante 1 h a 37 °C (Dupont et al., 2010), e incluso a la digestión duodenal con tripsina y quimotripsina, gracias a la protección de la fosfatidilcolina de la mucosa gástrica (Mandalari et al., 2009). La  $\alpha$ -LA, en cambio, parece ser más susceptible a la hidrólisis *in vitro* que la  $\beta$ -LG (Nik et al., 2010), aunque también se ha descrito el papel protector de los fosfolípidos de la mucosa frente a la degradación de la  $\alpha$ -LA por enzimas pancreáticos (Moreno et al., 2005).

En lo que respecta a las Igs, se ha observado mediante SDS-PAGE que las IgGs son extensamente degradadas tras la digestión con pepsina (**Figura 51**). En cambio, Jasion y Burnett

(2015) realizaron una revisión exhaustiva de 15 estudios *in vivo* con humanos, concluyendo que en 12 de ellos la administración oral de IgGs de distinto origen, calostro y leche humana y/o bovina, resistía la digestión gástrica e intestinal, manteniéndose entre el 5-49% de la cantidad inicial ingerida. La estabilidad de la IgG se atribuyó a la estructura de la molécula, debido a la presencia de puentes disulfuro intra e intermoleculares, grupos glicosilados y dominios tridimensionales. Además, se ha comprobado que los fragmentos Fab mantienen su capacidad de unión y de neutralización de antígenos tras su paso por el aparato digestivo, aunque haya una degradación parcial de las Igs (Jasion y Burnett, 2015). Estas observaciones explicarían, al menos en parte, la elevada capacidad antirrotavirus que mantienen los lactosueros degradados enzimáticamente. Estos resultados están de acuerdo con diversos estudios que han descrito la eficacia de terapias orales frente a gastroenteritis causadas por rotavirus, en los que se han utilizado calostro y leche humanos y calostro bovino hiperinmune en niños (Gianino et al., 2002; Sarker et al., 1998) y WPC bovino en ratas y ratones (Pérez-Cano et al., 2008; Wolber et al., 2005). Por otra parte, se ha comprobado que la LF es extensamente degradada durante la digestión gástrica del lactosuero (**Figura 51**), coincidiendo con las observaciones de Furlund et al. (2013). Además, en esta tesis se ha demostrado que la degradación enzimática de la LF bovina causa la pérdida significativa de su actividad antirrotavirus (resultados publicados en el 3<sup>er</sup> artículo del compendio).

Los resultados obtenidos en esta tesis sobre el efecto de la degradación enzimática de las fracciones derivadas de la nata en su actividad antirrotavirus se muestran en la **Figura 52**. Como puede observarse, la hidrólisis enzimática de las fracciones lácteas derivadas del procesado de la nata, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM bovina, ovina y humana, provocó la pérdida de su actividad antirrotavirus de manera notablemente superior que en los lactosueros. De hecho, los hidrolizados generados por digestión simple de la mazada y del butter serum bovinos presentaron una actividad antirrotavirus de 51 y 69%, respectivamente, a 5 mg/mL de concentración, actividad significativamente inferior a la exhibida por las muestras sin degradar, de 88 y 94%, respectivamente, a esa misma concentración (**Figura 52**). La digestión simple de la MFGM bovina causó una pérdida de actividad antirrotavirus del 44%, aunque no significativa, lo que se podría atribuir a un efecto protector de la grasa frente a la hidrólisis enzimática (Le et al., 2012). La degradación completa de estas fracciones causó una pérdida significativa de su actividad, del 56, 74 y 100%, para la mazada, butter serum y MFGM bovinas, respectivamente.

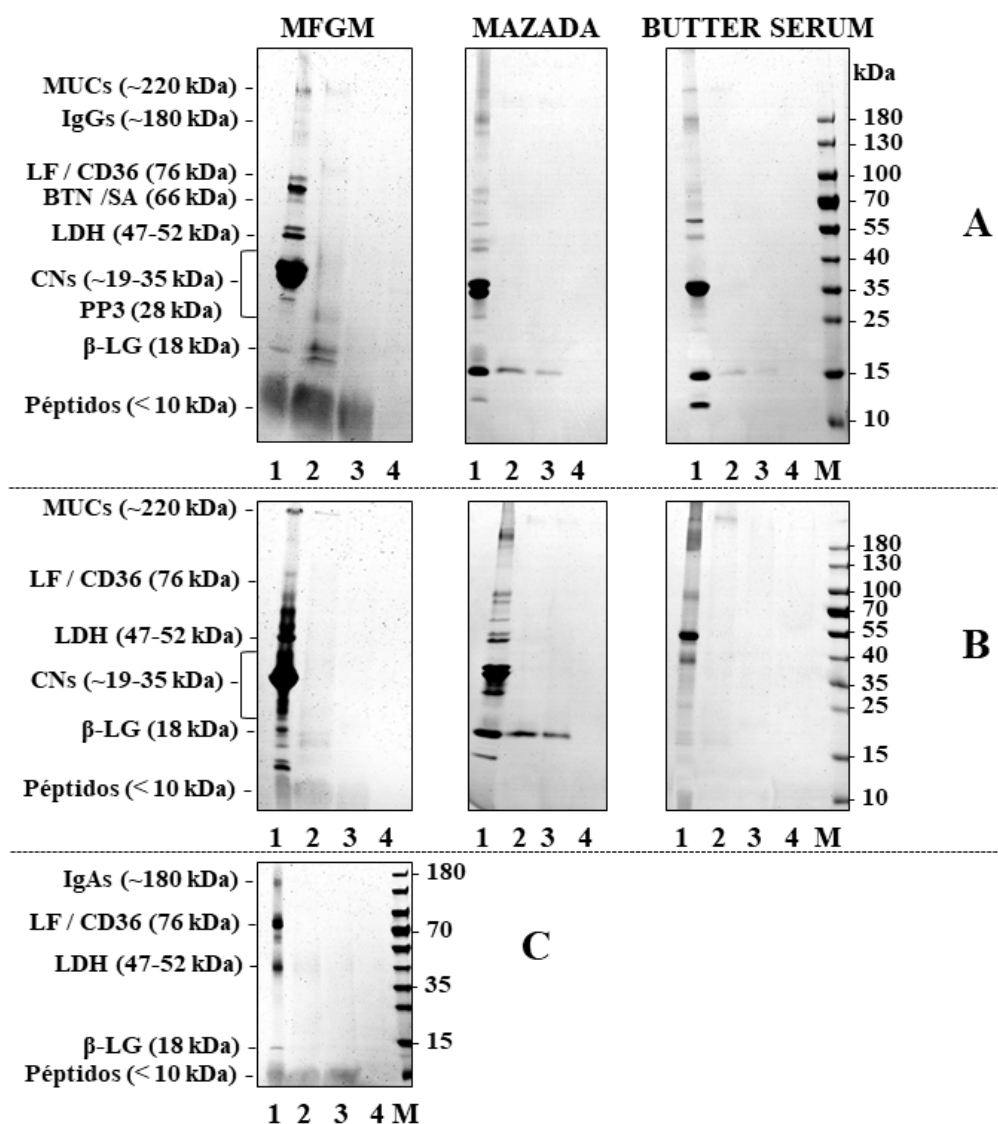


**Figura 52.** Efecto de la degradación enzimática en la actividad neutralizante de diversas fracciones derivadas de la grasa de leche bovina frente a la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3. Las muestras fueron hidrolizadas mediante digestión simple (▨) y digestión completa (□) y testadas a 5 mg/mL. Los resultados de actividad están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de un único experimento (n=3). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,1$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ) respecto a las muestras sin degradar (■).

En el caso de las fracciones ovinas, se ha comprobado que su actividad antirrotavirus es menos susceptible a la degradación simple que las homólogas bovinas. De hecho, la actividad de la mazada, del butter serum y de la MFGM ovinas no se vió significativamente alterada tras la digestión simple (**Figura 52**). De nuevo, este hecho podría estar relacionado con el mayor contenido lipídico de estas fracciones en comparación con el de sus homólogas bovinas. Por el contrario, la digestión completa provocó una disminución de su potencial antirrotavirus de entre el 63 y 100%, de manera muy similar a lo observado para las fracciones bovinas. Según se muestra en la **Figura 52**, tanto la digestión simple como la completa provocaron la pérdida significativa de la actividad antirrotavirus de la MFGM humana, del 69 y 100%, respectivamente.

En la **Figura 53** se ha incluido el patrón electroforético de las fracciones derivadas de la grasa de leche bovina, ovina y humana degradadas enzimáticamente. Como puede observarse, la proteólisis con pepsina parece provocar la degradación de la mayoría de proteínas de la MFGM, excepto las MUCs, la CD36 y la LDH, entre otras, que parecen resistir en parte a la acción de esta enzima, coincidiendo con los resultados de diversos estudios. Así, se ha comprobado que el

alto grado de glicosilación de determinadas glicoproteínas de la MFGM, como las MUCs (57-67% de glicosilación), la CD36 (24%), la LDH (13-27%) y la PP3 (17%), les confiere cierta resistencia a la degradación gástrica (Gallier et al., 2012; Greenwalt et al., 1992; Le et al., 2012; Peterson et al., 1998). Además, estos autores han comprobado que la presencia de lípidos ofrece una protección estérica a las proteínas de la MFGM frente a la acción de las enzimas digestivas. De igual manera, se ha demostrado que la glicosilación de la LF (van Veen et al., 2004) y de la caseína- $\kappa$  (Boutrou et al., 2013) les hace menos susceptibles a la digestión enzimática.



**Figura 53.** Perfil electroforético de la degradación enzimática de las fracciones derivadas de la grasa de leche bovina (A), ovina (B) y humana (C). La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones no reductoras, en geles del 4-20% de poliacrilamida, que fueron teñidos con plata. Muestras: 1, sin degradar; 2, tras digestión con pepsina; 3, tras digestión simple; 4, tras digestión completa; M, marcador de pesos moleculares.

Con la digestión simple y completa, en cambio, se ha observado por SDS-PAGE una hidrólisis aparentemente completa de las proteínas de la MFGM (**Figura 53**), en consonancia con diversos estudios (Gallier et al., 2012; Ye et al., 2011).

En lo que respecta al perfil electroforético de la degradación enzimática de la mazada y el butter serum bovinos y ovinos (**Figura 53**), puede observarse una degradación similar a la obtenida para los lactosueros (**Figura 51**), donde la mayoría de proteínas, a excepción de la  $\beta$ -LG, es extensamente degradada ya durante la digestión gástrica. De manera similar, parece que las caseínas, que se encuentran en la mazada y el butter serum derivadas del proceso de obtención, también son extensamente degradadas durante la digestión con pepsina, coincidiendo con las observaciones de Dupont et al. (2010).

Si comparamos los perfiles de SDS-PAGE de las diferentes fracciones lácteas sometidas a degradación enzimática, se pone de manifiesto que el tamaño de los péptidos generados tras hidrolizar las MFGMs, próximo a 10 kDa, es mayor al de los derivados de la hidrólisis de los lactosueros y de las mazadas y butter serums, que no aparecen en el gel debido a su bajo peso molecular ( $< 10$  kDa). Este hecho podría estar asociado a la protección estérica ofrecida por la glicosilación y por los lípidos de la MFGM a las proteínas, dificultando la acción de las enzimas digestivas y dando como resultado péptidos menos degradados.

A pesar de la mayor resistencia de las glicoproteínas de la MFGM a la degradación enzimática en comparación con las proteínas del lactosuero (Le et al., 2012; Vanderghem et al., 2011), se ha comprobado que el lactosuero es capaz de mantener su capacidad antirrotavirus casi intacta tras la digestión gastrointestinal *in vitro*, de manera notablemente superior a las fracciones lácteas derivadas del procesado de la nata, con pérdidas de entre el 56 y 100%. Aunque estas diferencias no tienen fácil explicación, pueden estar asociadas a divergencias en la proporción de compuestos bioactivos entre las fracciones. Tal vez, en el caso del lactosuero, la mayoría de componentes con actividad antirrotavirus no se vean afectados por la acción de las enzimas, o las regiones activas de las proteínas permanezcan inalteradas y expuestas tras la hidrólisis.

Hay que considerar que los estudios sobre la actividad directa de los péptidos frente a la infección por rotavirus son muy escasos. Ijaz et al. (1998) demostraron que un péptido sintético derivado de la proteína viral VP4 inhibía la infección por rotavirus, bloqueando los sitios de unión del virus en las células huésped. De manera similar, Chenoll et al. (2016) identificaron un péptido de 11 aminoácidos (1,28 kDa), con actividad antirrotavirus y sin residuos glicosilados, que se generó por hidrólisis de la caseína- $\beta$  mediante proteasas producidas por *Bifidobacterium longum*. Este péptido mostró actividad inhibitoria de la unión del rotavirus a las células y también en etapas post-unión, observándose diferente sensibilidad dependiendo de la cepa de

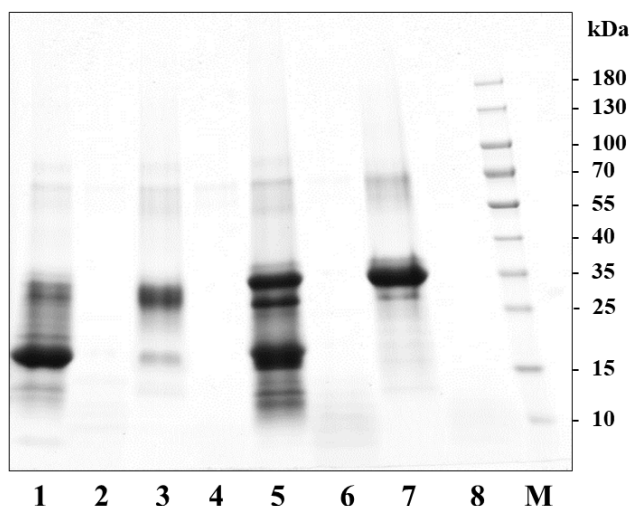
rotavirus (Wa, Ito y VA70) y de la línea celular (HT-29 y MA104). En base a estas observaciones, los autores sugirieron un mecanismo de acción dual para el péptido activo, con capacidad para interactuar tanto con la superficie celular como con la cápside viral, de acuerdo con estudios previos (Muñoz et al., 2011). Por otra parte, Superti et al. (2001) demostraron que algunos péptidos no glicosilados derivados de la hidrólisis de la LF bovina eran capaces de interactuar con el rotavirus de manera específica en diferentes etapas de la infección.

La susceptibilidad general de las fracciones y proteínas lácteas a la digestión gastrointestinal es un aspecto a tener en cuenta, puesto que puede provocar la pérdida de su actividad biológica, tal y como se ha comprobado en esta tesis. El uso de técnicas de encapsulación para el transporte de compuestos bioactivos a través del tracto gastrointestinal podría ser de gran interés para asegurar la eficacia de la administración oral de las muestras lácteas como terapia antirrotavirus en seres humanos y animales.

#### **4.2.3.2. Degradación enzimática de la fracción PPT y de la PP3 bovinas y ovinas**

Se ha evaluado el efecto de la degradación enzimática de la fracción PPT y de la proteína PP3 bovinas y ovinas en su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por el rotavirus bovino WC3. La hidrólisis enzimática de las muestras se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Pedersen et al. (2012), tal y como se ha detallado en el apartado 3.2.14. Las muestras se trataron con tripsina de páncreas porcino durante 3 h a 37 °C y los hidrolizados resultantes se liofilizaron y congelaron a -20 °C hasta su utilización.

La eficacia de la hidrólisis puede observarse en la electroforesis de la **Figura 54**. El perfil electroforético de las muestras hidrolizadas indica que la degradación enzimática fue prácticamente completa, generándose péptidos de peso molecular en torno a 10 kDa, que aparecen como bandas tenues difuminadas.



**Figura 54.** Perfil electroforético de la degradación enzimática de las PPT y PP3 bovinas y ovinas. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones no reductoras, en gels del 12% de poliacrilamida, que fueron teñidos con azul de Coomassie. Muestras: 1, PPT bovina sin degradar; 2, hidrolizado de PPT bovina; 3, PP3 bovina sin degradar; 4, hidrolizado de PP3 bovina; 5, PPT ovina sin degradar; 6, hidrolizado de PPT ovina; 7, PP3 ovina sin degradar; 8, hidrolizado de PP3 ovina; M, marcador de pesos moleculares.

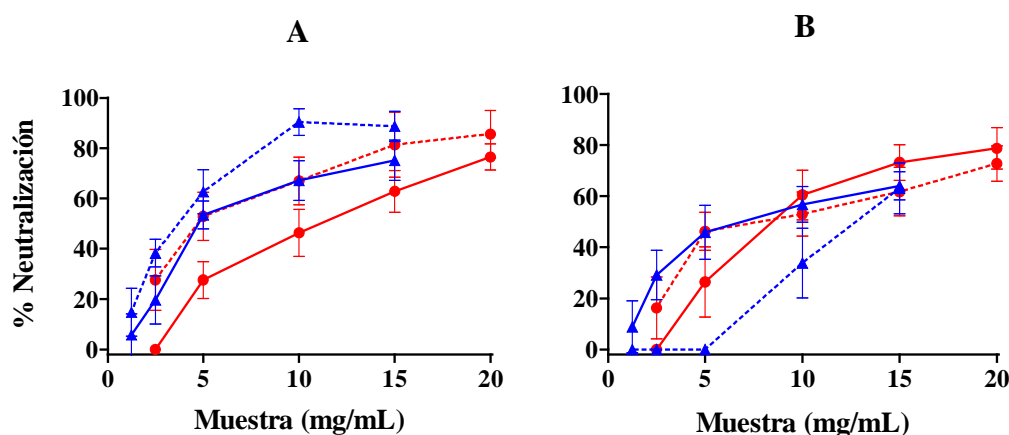
Para evaluar la actividad antirrotavirus de los hidrolizados de la fracción PPT y de la PP3 bovinas y ovinas, estos se reconstituyeron con PBS a diferentes concentraciones, entre 1,25-20 mg/mL, y se testaron en el ensayo de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovinos WC3, mediante inmunofluorescencia. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 55**. Así, se ha observado que el hidrolizado generado tras la degradación enzimática de la fracción PPT bovina presenta mayor potencial antirrotavirus ( $IC_{50}$  de 4,43 mg de muestra/mL) que la PPT sin hidrolizar ( $IC_{50}$  de 10,75 mg/mL). De manera similar, el hidrolizado de la PP3 bovina mostró una actividad neutralizante algo superior a la de la proteína intacta, con  $IC_{50}$  de 3,53 y 3,93 mg/mL, respectivamente (**Figura 55-A**). En lo que respecta a las muestras ovinas (**Figura 55-B**), se puede comprobar que la capacidad antirrotavirus del hidrolizado enzimático de la PPT ovina fue ligeramente superior ( $IC_{50}$  de 7,78 mg de muestra/mL) que la de su homóloga sin hidrolizar ( $IC_{50}$  de 8,19 mg/mL). En el caso de la PP3 ovina, el hidrolizado presentó menor actividad ( $IC_{50}$  de 12,80 mg/mL) que la proteína intacta ( $IC_{50}$  de 7,13 mg/mL).

En el caso de las muestras bovinas, la mayor actividad antirrotavirus observada para los hidrolizados de la PPT y PP3, en comparación con las muestras sin degradar, podría estar relacionada con la generación de péptidos activos tras la hidrólisis con tripsina. Esta hipótesis estaría de acuerdo con las observaciones de Inagaki et al. (2010a), quienes atribuyeron a un péptido C-terminal de 17 kDa, derivado de la proteólisis endógena de la PP3 bovina, una



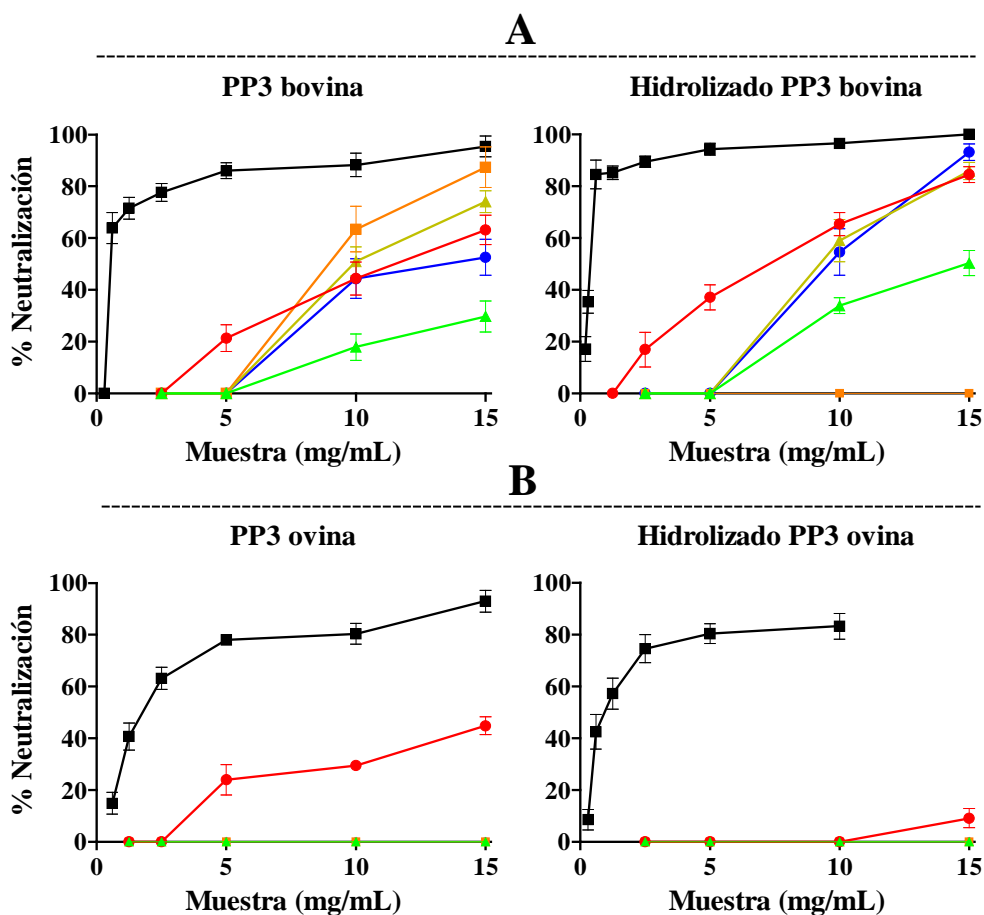
actividad neutralizante *in vitro* de la replicación de los rotavirus humanos MO en células MA104 del 95%, a una concentración de 1 µg/mL. Asimismo, se ha comprobado que este fragmento de 17 kDa presenta mayor actividad antirrotavirus frente a la cepa bovina WC3 en células MA104 que la PPT y la PP3 intactas, como ya se ha descrito en el apartado 4.2.1.2.3. Además, diversos estudios han demostrado que la proteólisis de la PP3 genera péptidos con actividad antibacteriana (Campagna et al., 2004; Pedersen et al., 2012a).

Aunque todavía se desconoce la causa de esta actividad antirrotavirus, parece ser que la glicosilación de la PP3 juega un papel fundamental (Inagaki et al., 2010a). En esta línea, las diferencias de actividad observadas podrían atribuirse a divergencias en la estructura y glicosilación de los diferentes fragmentos peptídicos generados tras la degradación enzimática de la PPT y PP3 (Coddeville et al., 1998; Girardet et al., 1995).



**Figura 55.** Efecto de la degradación enzimática de las PPT y PP3 bovinas (A) y ovinas (B) en su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por rotavirus bovino WC3. (●) Fracción PPT sin degradar; (- ● -) hidrolizado de PPT; (▲) PP3 sin degradar; (- ▲ -) hidrolizado de PP3. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media ± desviación estándar de triplicados de dos experimentos independientes (n=6).

En este trabajo también se ha evaluado la capacidad neutralizante de los hidrolizados de la PP3 bovina y ovina frente a la infección de células MA104 por distintas cepas de rotavirus, mediante el método de neutralización con inmunodetección con carbazol (**Figura 56**).



**Figura 56.** Efecto de la degradación enzimática de la PP3 bovina (A) y ovina (B) en su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus. Cepas de rotavirus: WC3 (●); UK (●); B223 (▲); Wa (▲); NCDV (■); RRV (■). Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

Según puede observarse en la **Figura 56**, la susceptibilidad a la neutralización varía notablemente entre las cepas de rotavirus. De hecho, se ha comprobado que la cepa bovina NCDV es mucho más susceptible que las demás, obteniéndose valores de  $IC_{50}$  de 0,54 y 0,38 mg de muestra/mL para la neutralización de esta cepa por la PP3 bovina intacta e hidrolizada, respectivamente. El resto de cepas evaluadas fueron inhibidas de manera menos efectiva. Así, la neutralización mediada por el hidrolizado de la PP3 bovina frente a las cepas WC3, Wa, UK, B223 y RRV arrojó valores de  $IC_{50}$  de 6,92; 8,76; 9,48; 14,82 y  $> 15$  mg de muestra/mL, respectivamente; siendo estos de 11,42; 9,81; 13,36;  $> 15$  y 7,94 mg de muestra/mL, respectivamente, en el caso de la neutralización con la PP3 bovina sin degradar frente a estas mismas cepas.

Por lo tanto, a pesar de las diferencias entre cepas, se ha observado que el hidrolizado de PP3 bovina inhibe de manera más eficaz la mayoría de cepas, en comparación a la PP3 sin degradar. Estas observaciones podrían indicar que la hidrólisis con tripsina de la PP3 bovina favorece la liberación de fragmentos peptídicos que contienen más sitios activos que la proteína intacta, gracias tal vez a cambios estéricos que permiten a estos sitios interaccionar con los rotavirus, impidiendo de esta forma la infección celular.

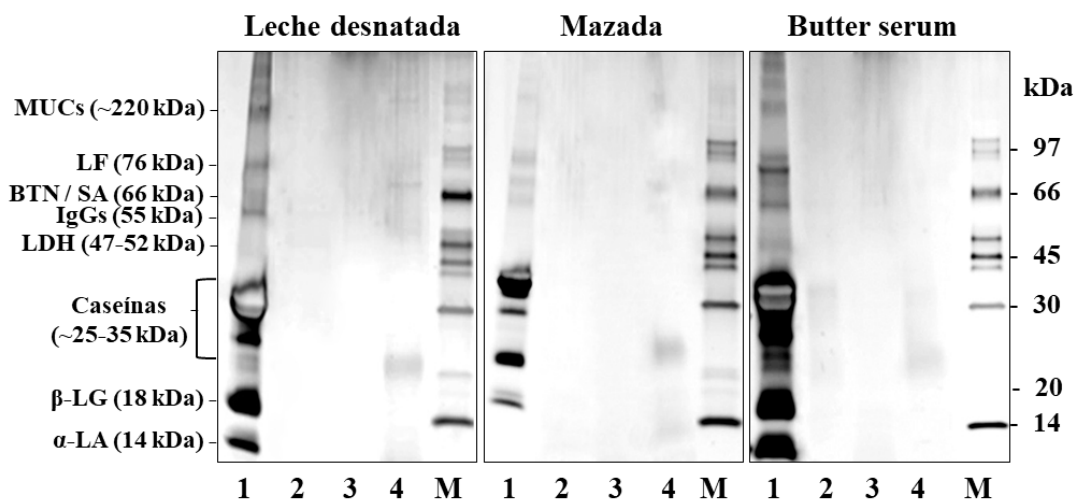
Las muestras ovinas mostraron una actividad antirrotavirus notablemente inferior a la de las homólogas bovinas. De hecho, tal y como puede extraerse de la **Figura 56**, sólo la cepa bovina NCDV fue neutralizada de manera eficaz tras la incubación con la PP3 ovina, tanto intacta como degradada enzimáticamente, mostrando  $IC_{50}$  de 1,36 y 0,94 mg de muestra/mL, respectivamente. Para todas las demás cepas testadas no se alcanzó el 50% de neutralización ni siquiera a una concentración de 15 mg/mL de ambas muestras.

#### **4.2.3.3. Degradación enzimática de derivados lácteos comerciales**

Se ha estudiado el efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de tres derivados lácteos comerciales: leche desnatada, mazada y butter serum. Los productos lácteos se sometieron a hidrólisis con tres preparados enzimáticos comerciales: Alcalasa, Corolasa PP y Prolyve, usados en diferentes estudios para generar péptidos bioactivos (Mota et al., 2004; Ripollés et al., 2016). Las muestras lácteas se prepararon al 20% (p/v) y, tras añadir los preparados enzimáticos comerciales, la hidrólisis se mantuvo durante 4 h a 50 °C a un pH constante de 7. Los hidrolizados resultantes se liofilizaron y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

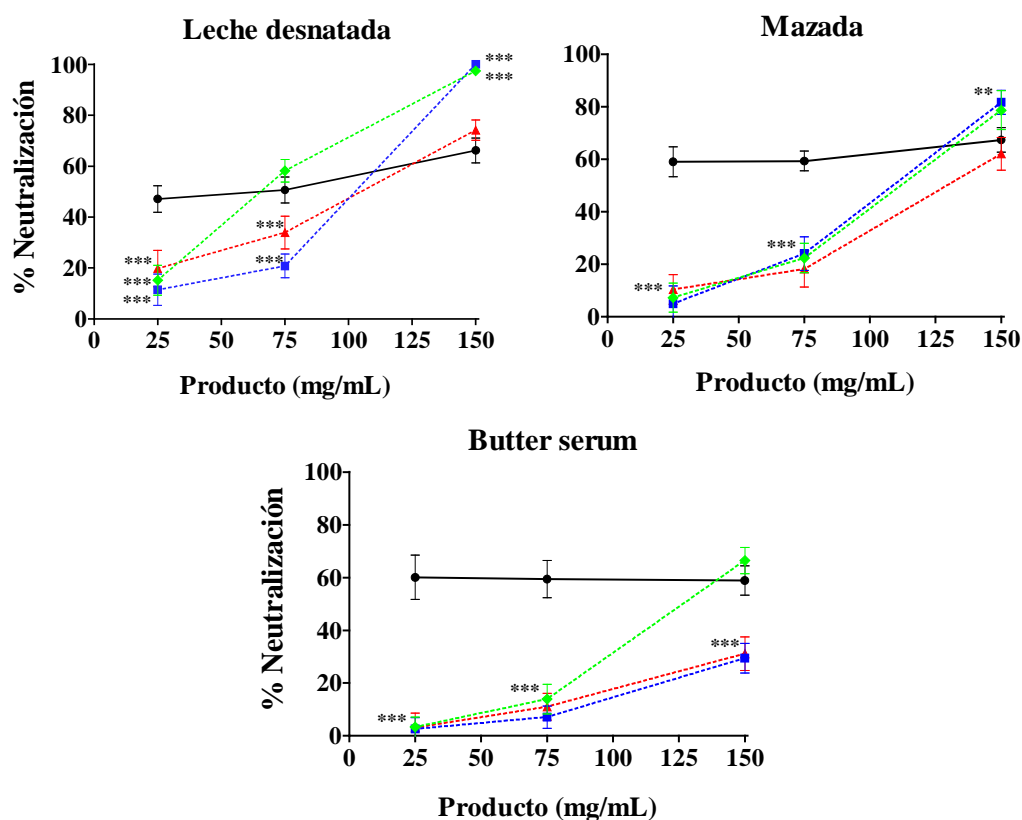
Tal como puede comprobarse en la **Figura 57**, los perfiles electroforéticos de los hidrolizados obtenidos con Alcalasa y Prolyve muestran casi la total degradación de todas las proteínas de la leche desnatada, de la mazada y del butter serum tras 4 h de hidrólisis, produciéndose péptidos que no se aprecian en las electroforesis debido a su bajo peso molecular. En cambio, en los hidrolizados obtenidos con la Corolasa PP todavía se observa alguna proteína resistente a la digestión, o fragmentos peptídicos de mayor tamaño, lo que indica una menor degradación proteica que con Alcalasa y Prolyve.

Los productos lácteos comerciales hidrolizados y liofilizados se reconstituyeron a 25, 75 y 150 mg/mL con PBS y su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se determinó mediante el ensayo validado de inmunofluorescencia indirecta.



**Figura 57.** Perfil electroforético de la degradación enzimática de leche desnatada, mazada y butter serum comerciales. La SDS-PAGE se llevó a cabo en condiciones reductoras, en geles del 4-20% de poliacrilamida, que fueron teñidos con plata. Muestras: 1, productos sin hidrolizar; 2, hidrolizados con Alcalasa; 3, hidrolizados con Prolyve; 4, hidrolizados con Corolasa PP; M, marcador de pesos moleculares.

La degradación enzimática de los productos lácteos comerciales alteró su capacidad antirrotavirus. De hecho, cuando se testaron a 25 mg/mL, todos los hidrolizados mostraron una actividad significativamente inferior a la de sus homólogos sin degradar (**Figura 58**). Así, la degradación enzimática de la leche desnatada comercial con los tres preparados enzimáticos provocó un descenso de su actividad antirrotavirus de entre el 58-76%, siendo del 82-92% y 94-96% para los hidrolizados de la mazada y del butter serum, respectivamente. Aún incrementando la concentración de los hidrolizados a 75 mg/mL en el ensayo de neutralización, la pérdida de actividad asociada a la hidrólisis fue significativa, situada entre el 59-69% para la mazada y entre el 77-88% para el butter serum. En cambio, los hidrolizados de la leche desnatada mostraron una actividad variable a 75 mg/mL. De hecho, el hidrolizado con Prolyve mantuvo su capacidad antirrotavirus al 58%, mientras que los derivados de la acción de la Alcalasa y de la Corolasa PP perdieron un 33-59% de su actividad original, previa a la hidrólisis (**Figura 58**). A 150 mg/mL, por el contrario, algunos hidrolizados presentaron una actividad neutralizante significativamente superior a la del producto correspondiente sin hidrolizar. A este respecto, los hidrolizados de leche desnatada con Prolyve y Corolasa PP incrementaron su actividad en un 47-51%, en comparación con la leche desnatada sin degradar. El hidrolizado de la mazada con esos mismos preparados enzimáticos mostró una mayor capacidad neutralizante, entre el 17-21% superior a la de la mazada intacta.

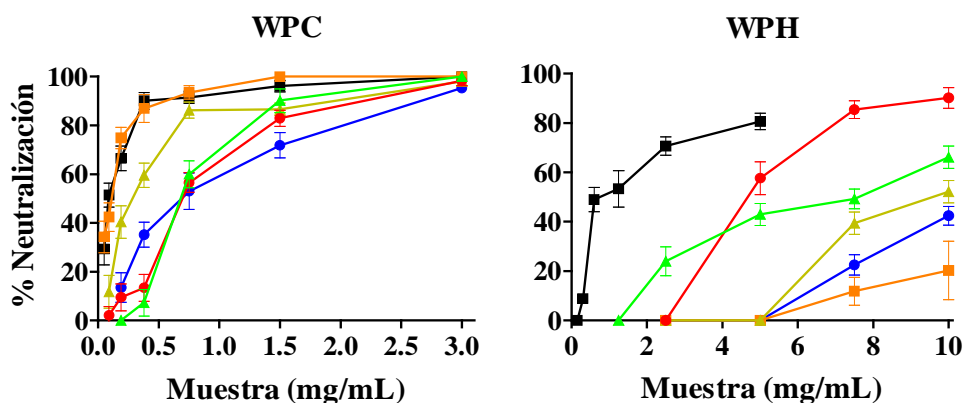


**Figura 58.** Efecto de la degradación enzimática de diversos derivados lácteos comerciales en su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino. Los productos lácteos fueron hidrolizados con Alcalasa (▲), Corolasa PP (■) y Prolyve (◆) y testados a 25, 75 y 150 mg de muestra/mL. Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de triplicados de dos experimentos independientes (n=6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001) respecto a las muestras sin degradar (●).

Las diferencias de actividad evidenciadas parecen indicar que los diferentes preparados enzimáticos empleados generan hidrolizados con distinto patrón peptídico y, por lo tanto, distinto potencial antirrotavirus. Independientemente del grado de hidrólisis de las proteínas de los productos lácteos, la conservación, la pérdida o la exposición de los sitios activos frente a los rotavirus como consecuencia de la degradación enzimática será el hecho que determine el mantenimiento, la pérdida o el incremento de la actividad antirrotavirus de los hidrolizados, en comparación con la actividad del producto original sin degradar. A este respecto, Ripollés et al. (2016) caracterizaron mediante RP-HPLC los hidrolizados originados a partir de estos derivados lácteos comerciales, comprobando que los preparados con Corolasa PP presentaban un perfil de péptidos muy diferente a los obtenidos por Alcalasa y Prolyve. Además, se observaron

diferencias en la actividad antioxidante de los hidrolizados según los preparados enzimáticos empleados.

En esta tesis también se ha evaluado la actividad antirrotavirus de un hidrolizado de proteínas del lactosuero (WPH) comercial, el Lacprodan DI-3017. Esta actividad se determinó mediante el ensayo de neutralización con detección por inmunofluorescencia frente a la cepa bovina WC3, así como frente a las demás cepas mediante el ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol. De esta forma, mediante el ensayo de inmunofluorescencia se obtuvo un  $IC_{50}$  de 5,26 mg/mL para el WPH frente a la infección de las células MA104 por el rotavirus WC3. Esta actividad resultó notablemente inferior a la de los dos lactosueros comerciales testados en este trabajo, el Lacprodan MFGM-10 y el Lacprodan-80, que presentaron un  $IC_{50}$  de 0,23 y 0,72 mg de muestra/mL, respectivamente, frente a WC3. Los resultados obtenidos con el ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol, permitieron confirmar las observaciones anteriores, según se muestra en la **Figura 59**.



**Figura 59.** Efecto de la degradación enzimática del lactosuero bovino comercial en su capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por diferentes cepas de rotavirus. Cepas de rotavirus: WC3 (●); UK (●); B223 (▲); Wa (▲); NCDV (■); RRV (■). Los resultados de neutralización están calculados en relación al control positivo (virus sin agente neutralizante) y expresados como la media  $\pm$  desviación estándar de duplicados de dos experimentos independientes (n=4).

Además de la gran variabilidad entre cepas, se comprobó la menor capacidad neutralizante del WPH frente a todas ellas, en comparación con el WPC Lacprodan MFGM-10, el producto lácteo equivalente al WPH sin degradar enzimáticamente. Así, el WPH mostró unos valores de  $IC_{50}$  de 0,87; 4,14; 7,72; 9,39;  $> 10$  y  $> 10$  mg de muestra/mL, frente a las cepas NCDV, WC3, B223, Wa, UK y RRV, respectivamente, mientras que los  $IC_{50}$  del WPC fueron de 0,09; 0,66; 0,55; 0,29; 0,73 y 0,11 mg de muestra/mL, frente a esas mismas cepas, respectivamente.

## 5. Discusi3n general

---





## 5. DISCUSIÓN GENERAL

La discusión de los resultados de esta Tesis Doctoral se ha incluido en cada uno de los artículos y apartados que componen la sección de resultados y discusión. Además, con el objetivo de facilitar la comparación de todos los resultados obtenidos en este estudio, se ha incluido esta discusión general, completándola con diversas tablas resumen.

### 5.1. Actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas

La gastroenteritis causada por rotavirus sigue siendo, a día de hoy, un serio problema de salud pública a nivel mundial. De hecho, la diarrea provocada por los rotavirus es una de las principales causas de muerte entre todos los grupos de edad y la segunda causa de muerte en neonatos y niños menores de 5 años (Marcotte y Hammarström, 2016), afectando principalmente a los países en vías de desarrollo (Kotloff et al., 2013).

En los últimos años, la vacunación frente a rotavirus ha contribuido a reducir de manera incuestionable la morbilidad y los costes de atención médica en los países desarrollados (Dennehy, 2008). En cambio, en los países en vías de desarrollo se ha puesto de manifiesto la dificultad de la implementación de los programas de vacunación, principalmente debido a problemas de accesibilidad y disponibilidad de las vacunas (Babji y Kang, 2012). Además, el hecho de que estas vacunas estén desaconsejadas en pacientes inmunodeprimidos (Gaspar et al., 2014), evidencia la necesidad de investigar en estrategias alternativas de protección frente a este tipo de agentes virales.

En consecuencia, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación de la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas derivadas de la leche bovina y ovina, así como de subproductos de la industria láctea, en busca de evidencias que permitieran valorar su potencial como ingredientes para alimentos funcionales. Asimismo, se han evaluado diversas proteínas y fracciones obtenidas a partir de leche humana por el gran interés que tiene conocer su actividad desde el punto de vista de la investigación básica y también para poder compararlas con sus homólogas bovinas y ovinas. En las **Tablas 37** y **38**, ubicadas al final de este apartado,

se incluyen los valores de concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) obtenidos para todas las muestras lácteas en los ensayos de neutralización de la infección por rotavirus mediante inmunofluorescencia indirecta e inmunodetección con carbazol, respectivamente.

Se ha comprobado que el calostro bovino presenta un elevado potencial antirrotavirus frente a cepas pertenecientes a distintos genotipos. De hecho, se han obtenido unos valores de  $IC_{50}$  de 0,81-24  $\mu\text{g/mL}$  frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3, UK, NCDV y B223, la cepa humana Wa y la cepa de simio RRV, en consonancia con otros estudios (Inagaki et al., 2010b). Aunque se ha demostrado la eficacia del uso de calostro bovino como alternativa terapéutica para prevenir y controlar la infección causada por rotavirus (Inagaki et al., 2010b; Mainer et al., 1999; Sarker et al., 1998), la dificultad de producción a gran escala supone una limitación práctica importante.

La leche desnatada de vaca también mostró capacidad antirrotavirus *in vitro*, con un valor  $IC_{50}$  de 0,48 mg/mL frente a la cepa bovina WC3. Esta actividad fue igual a la de la leche cruda de vaca, lo que podría indicar que la actividad inhibitoria de la infección por rotavirus está más asociada a componentes de la fase proteica de la leche que a la grasa láctea. A este respecto, la separación del lactosuero y las caseínas de la leche desnatada puso de manifiesto que los componentes con actividad antirrotavirus se encuentran mayoritariamente en el suero, que de hecho presentó unos valores de  $IC_{50}$  de 0,11-0,71 mg/mL frente a las diversas cepas de rotavirus, notablemente superior al  $IC_{50}$  de 1,83 mg/mL mostrado por las caseínas bovinas frente a la infección mediada por la cepa bovina WC3.

Los resultados de esta tesis podrían contribuir de manera relevante a la revalorización del lactosuero derivado de la industria quesera, como un producto con elevado potencial antirrotavirus. Hay que tener en cuenta que existen escasas referencias de este uso del lactosuero y que, a nivel mundial, se estima una producción aproximada de 180-218 millones de toneladas de lactosuero para el año 2020 (OECD/FAO, 2016). Además, se ha comprobado que incluso los concentrados de proteínas del lactosuero (WPC) comerciales mantienen un elevado potencial antirrotavirus frente a las diversas cepas evaluadas en este estudio, con valores de  $IC_{50}$  comprendidos entre 0,065-0,72 mg/mL, de acuerdo con las observaciones de Bojsen et al. (2007), que obtuvieron  $IC_{50}$  comprendidos entre 0,05-0,1 mg/mL para la inhibición de la infección de células Caco-2 por diferentes cepas de rotavirus (Wa humana, RRV de simio, RF bovina y YM porcina) mediada por un WPC bovino.

Como indican los estudios publicados, el potencial antirrotavirus de las fracciones lácteas se ha atribuido a diversos componentes, como las glicoproteínas (Bojsen et al., 2007; Inagaki et al., 2010a; Superti et al., 2001), algunos componentes lipídicos de la leche, entre ellos los esfingolípidos y los triglicéridos del glóbulo graso (Fuller et al., 2013; Jiménez-Flores y

Brisson, 2008), y los oligosacáridos (Morozov et al., 2018). Sin embargo, esta tesis se ha centrado únicamente en la capacidad antirrotavirus de las proteínas. Para poder evaluar individualmente la actividad antirrotavirus de las principales proteínas lácteas, en algunos casos se procedió a su aislamiento y en otros se adquirieron comercialmente.

El lactosuero comprende diversas fracciones y proteínas, encontrándose entre las mayoritarias la  $\beta$ -LG, la  $\alpha$ -LA, las Igs, la fracción PPT, la SA, la LF y la LPOX (Yadav et al., 2015). Además, se ha detectado la presencia de proteínas de la MFGM como componentes minoritarios del lactosuero, que pueden liberarse y solubilizarse con facilidad en el suero, como por ejemplo las MUCs, la XOD, la LDH o la PP3 (Liu et al., 2005; Sørensen et al., 1997). Se ha comprobado que algunas de las proteínas mayoritarias del lactosuero bovino, como la  $\beta$ -LG, la  $\alpha$ -LA, la SA y la LPOX, que representan un 40-58, 11-25, 5-10 y 0,5% del total de proteínas del lactosuero (Farkye y Shah, 2015), no presentan actividad antirrotavirus *in vitro*, ni siquiera a una concentración de 2 mg/mL. Por el contrario, el potencial antirrotavirus del lactosuero bovino parece estar relacionado con las IgGs, la LF, la XOD y la LDH, proteínas que han mostrado una elevada actividad inhibitoria frente a este virus.

Así, las IgGs bovinas, que representan el 6,4-8% del total de proteínas del lactosuero (Farkye y Shah, 2015), mostraron una elevada actividad antirrotavirus frente a todas las cepas del estudio, con valores de  $IC_{50}$  entre 4,8-93  $\mu$ g/mL, coincidiendo con los datos de diversos estudios (Bojsen et al., 2007; Korhonen et al., 2000; Mainer et al., 1999). Estas observaciones podrían indicar la existencia de un mecanismo de neutralización heterotípico de las IgGs bovinas frente a cepas bovinas, humanas y simias, independientemente del genotipo G y P.

La LF bovina supone un 1-2% del total de proteínas del lactosuero (Farkye y Shah, 2015), y también se ha comprobado que posee una elevada capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por diferentes cepas de rotavirus. De hecho, se han obtenido unos valores de  $IC_{50}$  entre 0,071-0,91 mg/mL, frente a las diversas cepas evaluadas, excepto para la cepa de simio RRV, que resultó ser especialmente resistente a la neutralización por parte de la LF bovina, exhibiendo un  $IC_{50}$  de 3,19 mg/mL. Esta gran variabilidad observada entre cepas de rotavirus en cuanto a su susceptibilidad frente a la neutralización por esta proteína coincide con los resultados de otros estudios. Así, Superti et al. (2001) demostraron que la LF bovina era capaz de inhibir el efecto citopático causado por los rotavirus de simio SA11 en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29, con un  $IC_{50} < 0,20$  mg/mL, mientras que Bojsen et al. (2007) y Kvistgaard et al. (2004), en cambio, concluyeron que esta proteína era incapaz de inhibir la infección de células MA104 y Caco-2 por diversas cepas de rotavirus simio RRV, porcino YM, bovino RF y humano Wa. Además, se ha comprobado en este trabajo que el grado de saturación de hierro de la molécula de LF no afecta de manera significativa a su capacidad antirrotavirus, de manera coincidente con las observaciones de Superti et al. (2001). Esto parece

indicar que los cambios conformacionales que acontecen tras la saturación con hierro (Siciliano et al., 1999) no influyen en su capacidad de interactuar con el rotavirus.

La fracción proteosa-peptona (PPT) bovina representa un 10% del total de proteínas del lactosuero (Farkye y Shah, 2015), y está formada por al menos 38 componentes, una mezcla compleja de glicoproteínas, fosfoproteínas y péptidos, siendo el componente 3 (PP3) el mayoritario (Innocente et al., 1998). Se ha comprobado que la fracción PPT contribuye al potencial antirrotavirus del lactosuero, puesto que ha mostrado actividad frente a la cepa WC3, con un  $IC_{50}$  de 2,13 mg/mL. Además, se ha observado que la proteína PP3 derivada de la PPT bovina es capaz de inhibir la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3 ( $IC_{50}$  de 0,97 mg/mL), aunque fue el fragmento C-terminal de la PP3, de 17 kDa, el que mostró una mayor actividad frente a esta cepa ( $IC_{50}$  de 0,46 mg/mL).

Los resultados del ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol también apuntaron a una baja actividad de la PP3 bovina frente a la mayoría de las cepas de rotavirus testadas, con unos valores de  $IC_{50}$  comprendidos entre 3,80 y  $> 7$  mg/mL. En cambio, la cepa bovina NCDV fue neutralizada de manera más efectiva ( $IC_{50}$  de 0,11 mg/mL), en consonancia con la elevada actividad atribuida por Inagaki et al. (2010a) a la PP3 bovina frente a la cepa humana MO ( $IC_{50}$  de 1  $\mu$ g/mL), poniéndose de nuevo de manifiesto la gran variabilidad existente entre cepas de rotavirus en lo que respecta a su susceptibilidad frente a agentes neutralizantes. A pesar de la menor actividad antirrotavirus exhibida en general por la fracción PPT bovina, y su componente PP3, en comparación con la actividad de otras proteínas séricas, como las IgGs o la LF, su elevada concentración en la leche podría hacer factible su uso como ingredientes funcionales.

Además de las proteínas características del lactosuero, en la presente tesis se ha comprobado, mediante SDS-PAGE y Western-blotting, la presencia de proteínas minoritarias procedentes de la MFGM, como las MUCs (MUC1 y MUC15), la XOD y la LDH, y se ha demostrado su actividad antirrotavirus. Así, las MUCs bovinas mostraron la capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por la cepa de rotavirus bovino WC3, exhibiendo un  $IC_{50}$  de 0,52 mg/mL. Por otra parte, el ensayo de inmunodetección con carbazol evidenció la variabilidad entre cepas, obteniéndose valores de  $IC_{50}$  de 0,047 y 1,35 mg/mL frente a las cepas NCDV y RRV, respectivamente, siendo de 3,41 hasta  $> 10$  mg/mL para las restantes. La variabilidad observada coincide con los resultados de diversos autores que demostraron que la MUC1 bovina era capaz de inhibir de manera efectiva la infección de las células MA104 por la cepa de rotavirus de simio RRV ( $IC_{50}$  de  $< 6,3$   $\mu$ g/mL), así como la infección de la cepa murina EMcN, si bien no tenía efecto neutralizante en el caso de la cepa humana Wa (Bojsen et al., 2007; Kvistgaard et al., 2004). La inhibición preferente de las cepas de rotavirus sensibles a NA (NCDV y RRV) puede estar relacionada con el hecho de que las MUCs (MUC1 y MUC15) son

proteínas altamente glicosiladas, entre 57-67% de glicosilación, y contienen una elevada proporción de ácido siálico en su estructura (Pallesen et al., 2007, 2002, 2001), favoreciendo su interacción con estos virus (Isa et al., 2006).

En el presente estudio se ha observado también que la XOD bovina posee una elevada capacidad neutralizante frente a diversas cepas de rotavirus. De hecho, esta proteína presentó un valor  $IC_{50}$  de 86  $\mu\text{g/mL}$  frente a la infección de las células MA104 por la cepa de rotavirus bovinos WC3. Además, el ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol también confirmó una alta actividad frente a la mayoría de cepas evaluadas, con valores  $IC_{50}$  entre 0,17 y 0,29  $\text{mg/mL}$ , si bien la actividad frente a las cepas B223 y RRV fue menor ( $IC_{50} > 0,7$   $\text{mg/mL}$ ). Aunque diversos estudios han asociado a la XOD con cierta capacidad antimicrobiana (Martin et al., 2004), los resultados que aquí se presentan pueden ser los primeros que proponen la actividad antirrotavirus para esta proteína.

En cuanto a la LDH bovina, se ha probado que esta proteína posee una capacidad antirrotavirus muy elevada frente a la mayoría de cepas estudiadas, presentando unos valores de  $IC_{50}$  de 5-59  $\mu\text{g/mL}$ . La cepa de simio RRV, en cambio, mostró una menor susceptibilidad a la neutralización por esta proteína, coincidiendo con la variabilidad observada por otros autores en cuanto a las cepas. A este respecto, Inagaki et al. (2010a) obtuvieron una  $IC_{50}$  de 5  $\mu\text{g/mL}$  para la LDH bovina, tras la incubación de las células MA104 con rotavirus humanos MO. En cambio, Kvistgaard et al. (2004) concluyeron que esta proteína era incapaz de inhibir la infección de las células Caco-2 por rotavirus humanos de la cepa Wa. Además, Bojsen et al. (2007) llevaron a cabo estudios *in vivo* donde observaron que la LDH bovina era incapaz de inhibir la infección mediada por los rotavirus de la cepa murina EMcN.

Además de las muestras lácteas indicadas anteriormente, se ha estudiado la actividad antirrotavirus de diversas fracciones lácteas derivadas de la nata: la mazada, el butter serum y la MFGM. Se ha comprobado que estas fracciones presentan una capacidad de neutralización variable en función de la cepa de rotavirus, que, en general, ha resultado ser inferior a la actividad exhibida por el calostro y el lactosuero para las distintas cepas (**Tablas 37 y 38**).

El suero de mantequilla o mazada es el principal subproducto que se libera durante el batido de la nata en el proceso de formación de mantequilla, estimándose una producción mundial del orden de 6,5 millones de toneladas de mantequilla para el año 2020 (OECD/FAO, 2016), que generará una cantidad equivalente de mazada (Morin et al., 2007). A este respecto, la capacidad de neutralización de la mazada bovina ( $IC_{50}$  de 0,46  $\text{mg/mL}$ ) frente a la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovinos observada en este estudio, podría contribuir a revalorizar este subproducto y considerar su potencial como ingrediente en alimentos funcionales.

Otro subproducto de la industria láctea es el butter serum, en este caso derivado del proceso de obtención de la grasa láctea anhidra o AMF (anhydrous milk fat), que es uno de los productos lácteos más consumidos en la India (Siwach et al., 2016), con una producción anual mundial de aproximadamente 0,2 millones de toneladas (FAOSTAT, 2018). El butter serum bovino ha mostrado un potencial antirrotavirus frente a la cepa WC3 ( $IC_{50}$  de 0,55 mg/mL) sólo ligeramente inferior al exhibido por la mazada bovina, debido a la similar composición de ambas fracciones lácteas, con especial atención a su contenido proteico y a su elevada cantidad de fosfolípidos (Gassi et al., 2016; Vanderghem et al., 2010), y con variaciones principalmente en el contenido lipídico (Rombaut et al., 2006).

A pesar de que la mazada y el butter serum se han considerado durante años subproductos de la industria láctea con escaso valor comercial (Vanderghem et al., 2010), en los últimos años estos productos han suscitado gran interés por el potencial nutricional y tecnológico atribuido, en gran parte, a sus componentes derivados de la MFGM (Gallier et al., 2014). Además, en esta tesis se ha comprobado que la MFGM bovina posee una capacidad antirrotavirus ( $IC_{50}$  de 0,49 mg/mL frente a la cepa WC3) similar a la del butter serum y la mazada bovinas, a pesar de su mayor proporción de lípidos (Vanderghem et al., 2010).

El potencial antirrotavirus mostrado por las fracciones lácteas derivadas del procesado de la nata puede explicarse, al menos en parte, por la presencia de proteínas con capacidad neutralizante, cuya presencia en dichas fracciones se confirmó mediante SDS-PAGE y Western-blotting. De hecho, en el perfil electroforético de la mazada se evidenció la presencia de proteínas del lactosuero (Igs, LF,  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA) y de caseínas, junto con algunas proteínas de la MFGM (BTN, LDH y XOD), coincidiendo con las observaciones de Britten et al. (2008). El butter serum presentó un perfil similar al de la mazada, pero algo más enriquecido en proteínas de la MFGM. La MFGM mostró el perfil característico, con las proteínas de membrana MUC1, MUC15, XOD, BTN, LDH y PP3, y escasa presencia de proteínas del lactosuero (Dewettinck et al., 2008).

En el caso de la MFGM, los glicanos que componen las glicoproteínas y los glicolípidos, localizados en la parte exterior de la membrana (glicocálix), pueden actuar de señuelo para diferentes virus y bacterias, impidiendo así la infección celular (Gallier et al., 2014; Guri et al., 2012; Ross et al., 2015). A este respecto, en los últimos años se ha incrementado el interés por el uso de la MFGM como ingrediente en las fórmulas infantiles, debido a las propiedades bioactivas atribuidas a sus fosfolípidos y glicoproteínas (Ross et al., 2015). De hecho, algunas fórmulas emplean el Lacprodan MFGM-10, que es un WPC suplementado con MFGM. Así, este WPC ha mostrado una elevada capacidad antirrotavirus en este estudio y, además, se ha demostrado que la elevada actividad antirrotavirus de la leche de fórmula 1 ( $IC_{50}$  de 1,89 mg/mL), en comparación con las demás fórmulas analizadas ( $IC_{50} \geq 6$  mg/mL), se debe a

la utilización de este WPC como ingrediente, evidenciándose la presencia de las proteínas de la MFGM MUC1 y LDH en la leche de fórmula 1 mediante SDS-PAGE y Western-blotting.

En esta tesis también se ha evaluado la influencia del lavado de la nata en la composición y actividad antirrotavirus de las fracciones derivadas de ella. El potencial antirrotavirus de todas las fracciones obtenidas a partir de la nata lavada, mazada, butter serum y MFGM, fue significativamente inferior al de las fracciones homólogas derivadas de nata sin lavar (**Tabla 37**). Es probable que estas observaciones estén asociadas al hecho de que el proceso de lavado favorece la pérdida de proteínas y otros compuestos bioactivos, en consonancia con los resultados obtenidos del análisis de composición mediante espectroscopía de infrarrojo y SDS-PAGE. Así, se ha comprobado que el contenido de ciertas proteínas como las caseínas, las proteínas del lactosuero  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA y LF, y algunas proteínas de la MFGM, como la XOD y la BTN, se ve disminuido por efecto del lavado, de acuerdo con diversos estudios (Holzmüller et al., 2016; Le et al., 2009). Por este motivo, sería aconsejable optimizar los procedimientos de obtención de este tipo de fracciones derivadas del procesado de la nata, con el objetivo de minimizar la pérdida de componentes bioactivos. Los resultados del ensayo de neutralización con inmunodetección con carbazol mostraron variabilidad entre las cepas de rotavirus, poniendo de manifiesto la baja actividad exhibida por todas las fracciones derivadas de nata lavada frente a la mayoría de cepas evaluadas ( $IC_{50}$  entre 0,75-5,59 mg/mL), en comparación con la capacidad mostrada por el calostro y lactosuero bovinos. En cambio, la cepa bovina NCDV sí fue neutralizada de manera efectiva por estas fracciones ( $IC_{50}$  entre 45-93  $\mu$ g/mL) (**Tabla 38**).

La evaluación de la actividad antirrotavirus de la mazada, el butter serum y la leche desnatada comerciales en polvo, puso de manifiesto su baja capacidad antirrotavirus en comparación con la de los productos homólogos obtenidos experimentalmente en este estudio. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para todas las concentraciones analizadas y se observaron para todas las cepas de rotavirus evaluadas, excepto en el caso de la cepa bovina NCDV, que fue neutralizada de manera muy efectiva con todas las fracciones (**Tablas 37 y 38**). Estas observaciones podrían atribuirse a divergencias en los procesos de obtención y en la composición de los productos, así como al efecto del procesado industrial. A este respecto, el perfil electroforético de las muestras comerciales evidenció una mayor presencia de caseínas,  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA (proteínas que han mostrado un potencial antirrotavirus bajo o nulo), en comparación con las fracciones obtenidas experimentalmente, lo que podría explicar en parte las divergencias observadas en relación a la actividad antirrotavirus de las fracciones. Además, teniendo en cuenta que, según las especificaciones del fabricante, estos productos han sido sometidos a una pasteurización alta (72 °C durante 15 s) más el tratamiento asociado al proceso de secado por atomización, cabe esperar cambios físico-químicos en los

mismos, como agregación y desnaturalización de proteínas (Borad et al., 2017; Schuck, 2014), que pueden disminuir su potencial antirrotavirus, tal y como se ha comprobado en esta tesis.

Los ensayos realizados con muestras lácteas derivadas de especies distintas a la bovina han puesto de manifiesto interesantes diferencias interespecie. Así, aunque el patrón de capacidad antirrotavirus observado fue similar entre las diversas fracciones bovinas y ovinas evaluadas (calostro >> lactosuero > leche entera = leche desnatada  $\geq$  fracciones derivadas de la nata >> caseínas), en general las muestras derivadas de leche bovina han mostrado mayor actividad que las homólogas ovinas, lo que puede comprobarse si se comparan los IC<sub>50</sub> incluidos en las **Tablas 37 y 38**. Tanto estas diferencias interespecie como las divergencias observadas entre fracciones lácteas intraespecie, en lo que respecta a la capacidad antirrotavirus, pueden deberse en parte a variaciones en su composición, especialmente en lo que respecta a la concentración, proporción, tipo y estructura de los componentes bioactivos.

A este respecto, diversos estudios han comprobado que existen divergencias en la composición de las fracciones lácteas bovinas y ovinas (Britten et al., 2008; Cebo y Martin, 2012; Hamad et al., 2016; Pisanu et al., 2011). Aunque la escasez de estudios cuantitativos respecto al contenido de proteínas en las fracciones lácteas ovinas dificulta la comparativa con las homólogas bovinas, algunos estudios indican sólo pequeñas diferencias en el contenido de proteínas del lactosuero (Hernández-Ledesma et al., 2011) y una mayor proporción de proteínas de la MFGM en el caso de las fracciones ovinas (Pisanu et al., 2011). Aparte del contenido de proteínas en las fracciones lácteas, diversos estudios han observado diferencias interespecie en la estructura y glicosilación de las mismas (Inagaki et al., 2010a; Lister et al., 1998; Ross et al., 2015; Wilson et al., 2008), lo que podría explicar, al menos en parte, las divergencias de actividad antirrotavirus registradas en esta tesis. De hecho, se ha comprobado que las LFs aisladas de la leche de diversas especies presentan diferente capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3. Así, las LFs bovina, ovina, humana, de cerda y de camella presentaron unos IC<sub>50</sub> de 0,099; 0,12; 0,48; 0,10 y 0,34 mg/mL, respectivamente. Teniendo en cuenta el diferente grado de saturación de hierro de las LFs analizadas, del 10, 17, 6, 5 y 15%, para las LFs nativas bovina, ovina, humana, porcina y de camella, respectivamente, estos resultados confirman que no parece que exista una correlación entre el grado de saturación con hierro de la molécula de LF y su actividad antirrotavirus, de acuerdo con los resultados obtenidos por Superti et al. (2001). En cambio, las diferencias en la actividad de las LFs podrían estar asociadas a divergencias en la estructura y composición, especialmente en lo relativo a la cantidad y tipo de glicanos. De hecho, diversos estudios han afirmado que las LFs de distinto origen presentan una alta homología en su secuencia aminoacídica, aunque cada una exhibe un perfil de glicosilación único (Figuerola-Lozano et al., 2018; Karav et al., 2017).



En la presente tesis también se ha estudiado la capacidad antirrotavirus de la leche humana, así como de diversas fracciones y proteínas derivadas de esta. Así, se ha podido comprobar la importancia de la leche materna como factor de protección frente a la infección por rotavirus, en consonancia con diversos estudios previos (Asensi et al., 2006; Gianino et al., 2002; Tino De Franco et al., 2013). De manera similar a lo observado para las leches bovina y ovina, el potencial antirrotavirus de la leche humana está asociado principalmente a los componentes del lactosuero. Además, el contenido graso de la leche humana parece no ser determinante en dicha actividad. De hecho, la leche cruda, entera y desnatada, y el lactosuero presentaron unos valores  $IC_{50}$  muy similares entre sí, comprendidos entre 63-74  $\mu\text{g/mL}$ , y muy superiores a los obtenidos con las caseínas y MFGM humanas ( $IC_{50} > 2 \text{ mg/mL}$ ). En comparación con las fracciones homólogas bovinas y ovinas, la leche y el lactosuero humanos mostraron un potencial antirrotavirus significativamente mayor, poniendo de manifiesto la existencia de diferencias interespecie.

Para confirmar el origen de la actividad antirrotavirus del lactosuero humano, se aislaron algunas de sus proteínas mayoritarias, como la  $\alpha$ -LA, la LF, las IgAs y la LYZ, así como algunas minoritarias derivadas de la MFGM, como las MUCs y la LDH (Peterson et al., 2013). La presencia de estas proteínas en el lactosuero se confirmó mediante SDS-PAGE y Western-blotting, y su capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovinos se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta. De esta forma, se comprobó que dos de las proteínas mayoritarias del lactosuero humano, la  $\alpha$ -LA y la LYZ, no poseen capacidad neutralizante frente a la cepa WC3, ni siquiera a la mayor concentración analizada de 2  $\text{mg/mL}$ . Por el contrario, se determinó que las IgAs son las proteínas que contribuyen mayoritariamente en el potencial antirrotavirus del lactosuero humano, presentando un  $IC_{50}$  de 21  $\mu\text{g/mL}$ , en consonancia con el estudio de Asensi et al. (2006), que sugirieron la participación de las IgAs en la actividad neutralizante de la leche humana frente a las cepas de rotavirus humano Wa y VA70, y de simio SA11. La mayor capacidad antirrotavirus exhibida por las IgGs bovinas frente a la cepa WC3 ( $IC_{50}$  de 4,8  $\mu\text{g/mL}$ ) en comparación con las IgAs humanas, podría atribuirse a los programas de vacunación comúnmente aplicados a las vacas, por lo que producen leche con una elevada concentración de Igs específicas frente a rotavirus.

También se ha demostrado que la LF participa en la actividad antirrotavirus exhibida por la leche y el lactosuero humanos, de acuerdo con estudios previos (Asensi et al., 2006; Tino De Franco et al., 2013). Así, la LF humana nativa presentó un  $IC_{50}$  de 0,48  $\text{mg/mL}$  frente a la cepa WC3, actividad significativamente inferior a la mostrada por las LFs humanas recombinantes evaluadas en este estudio, las formas holo y As-Is procedentes de arroz transgénico y la procedente de *A. awamori*, con  $IC_{50}$  de 0,084, 0,094 y 0,26  $\text{mg/mL}$ , respectivamente, frente a la misma cepa. Estos resultados coinciden con observaciones previas que parecen indicar que el

grado de saturación con hierro no influye en la actividad antirrotavirus de la LF, asociándose las diferencias de actividad a divergencias en la estructura y composición (Conesa et al., 2010a; Fujiyama et al., 2004).

Aparte de las IgAs y la LF, otras proteínas minoritarias presentes en el lactosuero humano han exhibido capacidad de neutralización de la cepa WC3, como las MUCs y la LDH, con unos valores de  $IC_{50}$  de 0,78 y 0,19 mg/mL, respectivamente. A este respecto, Yolken et al. (1992) atribuyeron a las MUCs humanas un  $IC_{50}$  de 0,1  $\mu$ g/mL frente a la infección de células MA104 por la cepa SA11 de rotavirus de simio. Por otra parte, Kvistgaard et al. (2004) demostraron que la LDH humana podía inhibir la infección de células Caco-2 por la cepa de rotavirus humanos Wa, con un  $IC_{50} < 0,1$  mg/mL, capacidad atribuida principalmente a la presencia de ácido siálico en su estructura, que puede interactuar con las partículas víricas y bloquear su entrada en la célula hospedadora (Yolken et al., 1992). Además, se ha observado que, en general e independientemente de la especie, las proteínas de la MFGM presentan de manera aislada unos valores de  $IC_{50}$  superiores a los de la fracción MFGM completa correspondiente. Este hecho podría deberse a que las proteínas en solución presentan una conformación estructural que favorece su interacción con las proteínas virales, en mayor medida que si se encuentran formando parte de la MFGM.

Algunas de las discrepancias existentes entre los resultados obtenidos en la presente tesis y los obtenidos por otros autores podrían corresponderse a diferencias entre los procedimientos experimentales empleados, destacando el tipo de ensayos de neutralización de la infección, los procedimientos de purificación de proteínas, los tiempos de inoculación y de incubación, el método de detección de la infección, así como las cepas de rotavirus y las líneas celulares utilizadas para determinar la capacidad antirrotavirus de las muestras. Por otra parte, la gran variabilidad observada en esta tesis en lo que respecta al potencial antirrotavirus de las diversas fracciones y proteínas lácteas evaluadas podría atribuirse a diferencias, intra e interespecie, en su composición y estructura. En particular, las diferencias en el grado de glicosilación y la heterogeneidad de los glicanos de las proteínas lácteas (O’Riordan et al., 2014; Ross et al., 2015) podrían ser de especial relevancia, teniendo en cuenta que los grupos glicosilados participan en interacciones específicas del tipo receptor-ligando y huésped-patógeno (Liu y Newburg, 2013; O’Riordan et al., 2014). Además, se ha demostrado que existe diferente afinidad de las distintas cepas de rotavirus por los glicanos, especialmente por el ácido siálico (Arias et al., 2016; Prasad et al., 2014).

Estas observaciones justificarían, de manera global, la capacidad antirrotavirus mostrada por la leche y las fracciones lácteas evaluadas, dado que representan una buena fuente de compuestos glicosilados, principalmente lactosa, oligosacáridos, glicolípidos y glicoproteínas. Este argumento concuerda, además, con la actividad antirrotavirus media-alta exhibida en este

estudio por las proteínas glicosiladas de la leche (Igs, LF, MUCs, LDH, PP3 y caseína- $\kappa$ ) en comparación con la escasa o nula actividad mostrada por las proteínas lácteas no glicosiladas o escasamente glicosiladas ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, LYZ, SA y caseínas- $\alpha_{S1}$ ,  $\alpha_{S2}$  y  $\beta$ ) (**Tabla 37**). Como excepción, se ha observado que la XOD, a la que se considera una proteína no glicosilada o débilmente glicosilada (Mather, 2000), posee una elevada capacidad antirrotavirus frente a diversas cepas. Si bien la actividad antimicrobiana de esta proteína se ha asociado a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno y/o de nitrógeno, con potencial bactericida (Martin et al., 2004), la actividad antivírica ha sido escasamente estudiada (Kim et al., 2013; West et al., 2011), no existiendo referencias respecto al potencial antirrotavirus de la XOD previas a esta tesis.

A pesar de la gran cantidad de información acerca de la glicosilación de las proteínas lácteas (O’Riordan et al., 2014; Peterson et al., 2013), el papel que ejercen los glicanos en su actividad antirrotavirus ha sido poco estudiado. Se sabe que la unión inicial del rotavirus a la membrana de la célula huésped es una etapa crítica en el ciclo infectivo del virus que está mediada por compuestos específicos de la cápside de los rotavirus y de la superficie celular, como glicoproteínas y glicolípidos (Arias et al., 2016; Olofsson y Bergström, 2005). A este respecto, la competición entre distintos compuestos glicosilados y los rotavirus podría usarse como estrategia para disminuir la infección de las células huésped por estos virus (Isa et al., 2006), lo que se ha comprobado en esta tesis mediante la evaluación de distintas cepas de rotavirus con diferente genotipo y sensibilidad a la NA. Además, se ha estudiado el mecanismo de inhibición de la infección de las células MA104 por los rotavirus mediada por las fracciones y proteínas lácteas, lo que puede contribuir a esclarecer su potencial como ingredientes funcionales y puede ser determinante para el desarrollo de estrategias terapéuticas frente a las infecciones por rotavirus.

La diferente susceptibilidad de las cepas de rotavirus evaluadas en esta tesis puede explicarse, entre otros factores, por su pertenencia a serotipos G y P distintos, y a grupos con diferente sensibilidad al tratamiento con NA. Así, es interesante observar la similar actividad mostrada por la mayoría de fracciones y proteínas lácteas frente a las cepas de rotavirus bovinos WC3 y UK (**Tabla 38**), que pertenecen al mismo serotipo G6P[5]. De hecho, el calostro, el lactosuero, la mazada y la LF bovinas, por ejemplo, presentaron unos  $IC_{50}$  de 0,014 y 0,019; 0,41 y 0,62; 3,14 y 3,23; y 0,071 y 0,077 mg/mL, frente a las cepas WC3 y UK, respectivamente. Por otra parte, se han observado diferencias notables al comparar los perfiles de neutralización de las cepas sensibles a NA (RRV y NCDV) con las cepas resistentes a NA (WC3, UK, B223 y Wa). De hecho, las cepas sensibles a NA mostraron, de manera general, una mayor susceptibilidad a la neutralización por parte de las diversas fracciones y proteínas lácteas (**Tabla 38**). Entre las cepas sensibles a NA, la actividad neutralizante de las diferentes muestras

lácteas frente a la cepa bovina NCDV (G6P[1]) fue notablemente superior que frente a la cepa de simio RRV (G3P[3]), lo que parece indicar que otras características específicas, aparte de su sensibilidad a la NA, son determinantes en su susceptibilidad a la neutralización.

Por otra parte, a pesar de las diferencias observadas entre las cepas resistentes a NA, en lo que respecta a su susceptibilidad a la neutralización por parte de las diversas fracciones y proteínas lácteas, curiosamente se ha puesto de manifiesto un patrón de actividad constante. De hecho, tal y como puede comprobarse en la **Tabla 38**, para todas las cepas resistentes a NA se observó el siguiente patrón para las fracciones lácteas, en orden decreciente de actividad: calostro > lactosuero  $\approx$  WPC > mazada  $\approx$  butter serum > MFGM  $\gg$  mazada y butter serum comerciales. Además, se registró el siguiente patrón para las proteínas lácteas, en orden decreciente de actividad: LDH > IgGs > LF > XOD  $\gg$  MUCs > PP3.

Con el objetivo de esclarecer qué mecanismos emplean las diferentes proteínas y fracciones lácteas para inhibir la infección por rotavirus, se llevaron a cabo cuatro tipos de ensayos: de inhibición de la unión rotavirus-célula; de inhibición post-unión rotavirus-célula; de neutralización de cepas reagrupadas; y de bloqueo celular. Así, según los resultados obtenidos en este estudio, parece evidente que la capacidad global antirrotavirus (al menos frente a la cepa bovina WC3) exhibida por todas las fracciones y proteínas lácteas testadas se debe, en mayor o menor medida, a la suma de su potencial de inhibición de la unión virus-célula, más su capacidad de actuación en etapas posteriores a esa unión. De manera similar, Kvistgaard et al. (2004) comprobaron que un WPC bovino era capaz de neutralizar la infección de células Caco-2 por el rotavirus humano Wa, tanto en ensayos de unión rotavirus-célula como en ensayos post-unión. Superti et al. (2001) obtuvieron resultados similares para la LF bovina frente a la cepa de rotavirus de simio SA11 en células de adenocarcinoma de colon humano HT-29.

Por lo tanto, parece ser que las muestras lácteas son capaces de unirse a los virus, impidiendo que estos se unan a la superficie de las células y la infecten. Asimismo, es posible que presenten la capacidad de separar los virus ya unidos a la superficie celular interaccionando con proteínas de la cápside viral de manera similar a como lo hacen para inhibir la unión virus-célula. Por otra parte, tal vez las fracciones y proteínas lácteas son capaces de interaccionar con más de un sitio de unión en la cápside del rotavirus, pudiendo así interferir en las etapas de unión y post-unión durante la infección celular. A este respecto, para identificar las proteínas virales asociadas con la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas bovinas y ovinas, se ha evaluado su capacidad de inhibición de la infección de dos cepas de virus reagrupados (19-1-1 y 85-2) derivados de la transfección realizada en las cepas RRV (de simio) y UK (bovina), tal y como describen Díaz-Salinas et al. (2013).

Así, se ha comprobado que es la proteína VP4, y no la VP7, la que interacciona con los componentes inhibitorios de la mayoría de muestras lácteas, bovinas y ovinas, evaluadas, por lo que parece claro que estas neutralizan al rotavirus a través del bloqueo de su proteína VP4. Estas observaciones apoyan la idea de que el principal mecanismo de neutralización de la infección por rotavirus mediado por los componentes lácteos ocurre a nivel de unión del virus a la superficie celular. Además, los resultados concuerdan con el hecho de que la cepa RRV sensible a NA interactúa eficientemente con los glicanos, especialmente ácido siálico, a través del dominio VP8\* de la proteína VP4, que ha sido identificado como un importante factor de unión del virus a las células (Arias et al., 2016; Isa et al., 2006, 2008). En cambio, las IgGs bovinas parecen interactuar principalmente con la proteína VP7 de la cápside viral, en consonancia con las observaciones de Hoshino y Zapikian (2000). El bloqueo de la proteína VP7 inhibiría la entrada del virus a la célula evitando su interacción con las integrinas celulares, según se propone en diversos estudios (Graham et al., 2003, 2005; Guerrero et al., 2000a). El patrón de neutralización de otras proteínas lácteas bovinas, como la LF y la LDH, se mostró más complejo, probablemente debido a que estas proteínas interactúan con ambas proteínas, VP7 y VP4, de la cápside del virus.

Los resultados del ensayo de bloqueo celular parecen confirmar que la actividad antirrotavirus exhibida por las fracciones y proteínas lácteas está asociada a la interacción de estas con los rotavirus, en etapas pre y/o post-unión virus-célula, y no con receptores de las células MA104. De hecho, la incubación de las células con las muestras lácteas resultó en, aproximadamente, un 100% de infectividad en todos los casos.

**Tabla 37.** Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de las muestras lácteas evaluadas en el ensayo de neutralización de la infección por rotavirus bovino WC3 mediante inmunofluorescencia.

IC <sub>50</sub> (mg proteína/mL)				
Muestras lácteas obtenidas experimentalmente		Bovinas	Ovinas	Humanas
<b>Fracciones</b>	Calostro	0,014	0,045	ND
	Leche cruda entera	0,48	1,03	0,074
	Leche desnatada	0,48	1,41	0,063
	Lactosuero	0,37	0,56	0,068
	Caseínas	1,83	8,38	> 2
	Proteosa-peptona	2,13	1,72	ND
	Mazada procedente de nata sin lavar	0,46	0,37	
	Mazada procedente de nata lavada	1,55	0,87	
	Butter serum procedente de nata sin lavar	0,55	0,87	
	Butter serum procedente de nata lavada	2,37	1,62	
	MFGM procedente de nata sin lavar	0,49	0,85	ND
	MFGM procedente de nata lavada	2,35	2,82	> 2
	<b>Proteínas</b>	IgGs bovinas y ovinas; IgAs humanas	0,0048	0,28
LF		ND	0,12	0,48
MUCs		0,52	0,68	0,78
XOD		0,086	0,36	ND
LDH		0,059	ND	0,19
PP3		0,97	2,72	ND
α-LA		ND	ND	> 2
LYZ				> 2
Muestras lácteas comerciales		IC <sub>50</sub> (mg proteína/mL)		
<b>Fracciones bovinas</b>	WPC: Lacprodan-80 / Lacprodan MFGM-10	0,72 / 0,20		
	WPH	3,19		
	Leche desnatada	> 10		
	Mazada	6,82		
	Butter serum	6,93		
	Leches infantiles de fórmula: fórmula 1 / fórmula 4 / resto de fórmulas	1,89 / 6 / > 6		
<b>Proteínas</b>	LF bovina nativa / saturada con Fe	0,099 / 0,077		
	LFs humanas recombinantes: holo de arroz / As-Is de arroz / de <i>A. awamori</i>	0,084 / 0,094 / 0,26		
	LYZ humana recombinante de arroz	> 2		
	CN-κ bovina	0,35		
	α-LA, β-LG, CN-α,-β, SA, LPOX bovinas	> 2		

ND: no determinado en esta tesis.

**Tabla 38.** Concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de las muestras lácteas evaluadas en el ensayo de neutralización de la infección por rotavirus (cepas WC3, UK, B223, Wa, NCDV y RRV) mediante inmunodetección con carbazol.

		IC <sub>50</sub> (mg proteína/mL)					
Muestras lácteas bovinas		Cepa de rotavirus					
		WC3	UK	B223	Wa	NCDV	RRV
<b>Fracciones</b>	Calostro	0,014	0,019	0,024	0,019	0,00081	0,016
	Lactosuero	0,41	0,62	0,53	0,71	0,14	0,11
	Mazada*	3,14	3,23	3,81	1,85	0,091	1,63
	Butter serum*	3,17	2,26	3,05	1,30	0,093	1,56
	MFGM*	3,99	3,39	5,59	2,93	0,045	0,75
<b>Proteínas</b>	IgGs	0,026	0,027	0,064	0,093	0,0069	0,050
	MUCs	3,41	4,74	> 10	4,13	0,047	1,35
	XOD	0,17	0,29	> 0,7	0,21	0,22	> 0,7
	LDH	0,0050	0,016	0,021	0,0096	0,031	> 0,04
	PP3	4,71	5,85	> 7	4,39	0,11	3,80
Muestras lácteas ovinas		WC3	UK	B223	Wa	NCDV	RRV
<b>Fracciones</b>	Calostro	0,12	0,22	0,072	0,072	0,019	0,059
	Lactosuero	1,35	0,98	6,08	2,66	0,094	0,43
	Mazada*	1,61	1,02	> 8	6,52	0,13	1,74
	Butter serum*	1,66	1,19	> 8	6,30	0,17	1,90
	MFGM*	3,98	7,19	> 8	6,44	0,080	4,25
<b>Proteínas</b>	XOD	0,34	0,48	0,69	0,52	0,094	0,56
	PP3	> 7	> 7	> 7	> 7	0,36	> 7
Muestras lácteas bovinas comerciales		WC3	UK	B223	Wa	NCDV	RRV
<b>Fracciones</b>	WPC: Lacprodan MFGM-10	0,49	0,44	0,48	0,18	0,065	0,074
	WPH	2,84	> 8	6,06	7,51	0,90	> 8
	Mazada	> 20	> 20	> 20	> 20	0,28	18,62
	Butter serum	> 20	> 20	> 20	> 20	0,12	> 20
<b>Proteínas</b>	LF	0,071	0,077	0,66	0,12	0,91	3,19

\*Fracciones derivadas del procesamiento de nata lavada.

## **5.2. Efecto de los tratamientos tecnológicos en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas**

Los tratamientos tecnológicos aplicados a la leche pueden clasificarse en térmicos y no térmicos. Los tratamientos térmicos son el método habitual de higienización de la leche, tanto de la leche humana de bancos como de la leche y productos lácteos industriales (Arslanoglu et al., 2010; Considine et al., 2007). Sin embargo, en los últimos años se está incrementando el interés y estudio de tecnologías no térmicas de conservación, como las altas presiones hidrostáticas (HHP), como alternativa a los tratamientos térmicos empleados, debido a su menor impacto en el valor nutritivo y organoléptico de la leche (Evrendilek, 2014).

A este respecto, uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del efecto de los tratamientos térmicos y de las HHP aplicados a diversas fracciones y proteínas derivadas de la leche bovina, ovina y humana, sobre su integridad y su capacidad de neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus de la cepa bovina WC3.

Los tratamientos térmicos son esenciales en la industria láctea como proceso tecnológico necesario para alargar la vida útil y garantizar la calidad higiénica y la seguridad microbiológica de los productos (Holsinger et al., 1997). La pasteurización baja o LTLT (63 °C durante 30 min) y la pasteurización alta o HTST (72 °C durante 15 s) son tratamientos térmicos habitualmente empleados en la industria láctea y quesera. En el caso de la leche humana, los bancos de leche llevan a cabo un tratamiento de pasteurización a 62,5 °C durante 30 min para garantizar su calidad higiénica y microbiológica (Arslanoglu et al., 2010).

Múltiples estudios han demostrado que los tratamientos térmicos aplicados a la leche, tanto a la leche humana como a la leche y productos lácteos bovinos en la industria, pueden provocar cambios físico-químicos en sus componentes en función de su intensidad, disminuyendo su valor nutritivo y alterando sus características organolépticas, funcionales y biológicas (Deeth y Lewis, 2017c; Peila et al., 2017). Aunque la termorresistencia de diversas proteínas lácteas ha sido ampliamente estudiada (Lee y Sherbon, 2002; Mainer et al., 1997; Mayayo et al., 2016; Sánchez et al., 1992), poco se conoce acerca del efecto del tratamiento térmico sobre su capacidad antirrotavirus. Por lo tanto, este estudio es necesario para conocer cuáles son los tratamientos térmicos más adecuados con el objetivo de mantener la bioactividad de las diversas fracciones y proteínas lácteas lo más intacta posible, y aumentar así su eficacia como ingredientes en alimentos funcionales.

Tras el tratamiento térmico de las diversas muestras lácteas estudiadas, su capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta. La pérdida de actividad que se produjo en las muestras



por los tratamientos térmicos más relevantes se incluyen en la **Tabla 39**, para facilitar la discusión e interpretación de los mismos.

Se ha comprobado que el tratamiento térmico del lactosuero bovino induce la pérdida de su actividad antirrotavirus, si bien la magnitud de la pérdida varía de manera significativa en función de la intensidad del tratamiento. De hecho, tanto la pasteurización baja como la pasteurización alta mantuvieron inalterada dicha actividad, mientras que los tratamientos más intensos causaron pérdidas significativas y progresivas de la capacidad neutralizante del lactosuero bovino, de hasta el 84% tras 85 °C durante 10 min.

Teniendo en cuenta la capacidad exhibida por algunas de las proteínas presentes en el lactosuero, como las IgGs, la LF, la XOD y la LDH, para neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus de la cepa bovina WC3, tras su aislamiento se evaluó el efecto de diversos tratamientos térmicos sobre dicha actividad. El efecto de los tratamientos térmicos se estudió, además, analizando el lactosuero tratado mediante SDS-PAGE y Western-blotting. De esta forma, se ha puesto de manifiesto la diferente susceptibilidad de estas proteínas al efecto del tratamiento térmico.

Por una parte, se ha comprobado que las IgGs bovinas mantienen intacta su actividad antirrotavirus tras las pasteurizaciones baja y alta, aunque los tratamientos térmicos de mayor intensidad provocan descensos estadísticamente significativos, de hasta el 50% tras 85 °C durante 10 min. Esta pérdida de actividad se correspondió bien con los resultados obtenidos tras el análisis por SDS-PAGE y Western-blotting, mostrando la disminución de intensidad de las bandas electroforéticas y de la inmunoreactividad de las IgGs de manera proporcional a la intensidad del tratamiento. Estas observaciones concuerdan con los resultados de diversos estudios que comprobaron que la inmunoreactividad de las IgGs bovinas resistía el tratamiento de pasteurización a 72 °C durante 15 s, siendo muy afectada por un tratamiento de 95 °C durante 15 s (Chen y Chang, 1998; Mainer et al., 1997). Además, Bojsen et al. (2007) observaron que la capacidad antirrotavirus de una fracción láctea bovina enriquecida en Igs era sensible al tratamiento térmico, puesto que su exposición a 85 °C durante 10 min producía un notable descenso de la capacidad neutralizante.

En lo que respecta a la LF bovina nativa, se ha comprobado que esta proteína es notablemente más susceptible a los tratamientos térmicos que las IgGs. De hecho, aunque su actividad antirrotavirus no se vio significativamente alterada tras la pasteurización alta, la pasteurización baja sí causó una pérdida significativa del 44,5%. Con tratamientos térmicos de mayor intensidad se registraron pérdidas progresivas, de hasta el 100% tras 85 °C durante 10 min, coincidiendo con los resultados derivados de la SDS-PAGE y del Western-blotting, en los que la LF fue indetectable tras el tratamiento de máxima intensidad. De manera similar,

Sánchez et al. (1992) observaron que la LF bovina mantenía casi intacta su inmunorreactividad tras la pasteurización alta, mientras que tratamientos más intensos (81-85 °C) desnaturalizaban en gran medida las moléculas de LF. En esta línea, diversos estudios han confirmado que la LF bovina nativa mantiene su capacidad antibacteriana tras la pasteurización baja y alta, aunque se ve extensamente afectada con tratamientos de mayor intensidad (72 °C durante 15 min y 85 °C durante 10 min) (Conesa et al., 2010b; Harouna et al., 2015).

Aunque se ha comprobado que el grado de saturación de hierro de la molécula de LF bovina no afecta de manera significativa a su capacidad antirrotavirus, en consonancia con diversos estudios (Siciliano et al., 1999; Superti et al., 2001), se ha observado que la forma saturada (> 90% de saturación) es mucho más resistente al tratamiento térmico en comparación con la forma nativa (10% de saturación). De hecho, la LF bovina saturada ha mostrado mayor actividad antirrotavirus que la LF nativa a todos los tratamientos, manteniendo intacta dicha capacidad incluso tras 85 °C durante 20 s, coincidiendo con los perfiles electroforéticos obtenidos. Es conocido que los cambios conformacionales que acontecen en la molécula de LF tras la saturación con hierro le confieren mayor resistencia al tratamiento térmico (Sánchez et al., 1992) y, como consecuencia, mantienen en mayor medida su capacidad de neutralizar la infección mediada por los rotavirus. Estas observaciones podrían ser relevantes para el uso de la LF como ingrediente en alimentos funcionales.

La capacidad antirrotavirus de la XOD bovina también se preservó tras la pasteurización alta. En cambio, la pasteurización baja causó una pérdida significativa de dicha actividad, del 31%, que aumentó al 97% tras un tratamiento de 85 °C durante 10 min. A pesar de la escasez de trabajos acerca de la termorresistencia de la XOD de la leche, varios estudios han apuntado a la desnaturalización y pérdida del 30% de la actividad enzimática de esta proteína tras 60 °C durante 60 min (Beyaztaş y Arslan, 2015; Sharma et al., 2016), resultados similares a los obtenidos en esta tesis. Además, Houlihan et al. (1992) evidenciaron mediante SDS-PAGE la pérdida casi total de XOD tras un tratamiento de 80 °C durante 20 min.

De manera similar a la XOD, la LDH bovina mostró una elevada resistencia a la pasteurización alta, manteniendo la práctica totalidad de su potencial antirrotavirus tras este tratamiento. La pasteurización baja, por el contrario, causó un descenso del 78% en dicha actividad, superior incluso a la pérdida registrada tras 85 °C durante 10 min, que fue del 46%. Estos resultados concuerdan con diversos estudios sobre la termorresistencia de esta proteína. De hecho, Lee y Sherbon (2002) confirmaron mediante SDS-PAGE la pérdida total de la PAS6 y la pérdida parcial de la PAS7 bovinas tras el calentamiento de la leche cruda a 80 °C durante 3 min. A su vez, Ye et al. (2002) mostraron que las bandas electroforéticas de la PAS6/7 prácticamente desaparecían tras tratamientos de la leche superiores a 75 °C durante 10 min, coincidiendo con los resultados descritos por Houlihan et al. (1992). Asimismo, Ripollés et al.

(2018) comprobaron mediante ELISA que el tratamiento de 72 °C durante 60 min aplicado al lactosuero bovino provocaba una pérdida de la inmunorreactividad de la LDH del 48%, mientras que la pasteurización alta no le afectaba de manera significativa.

Aunque no se ha evaluado el efecto del tratamiento térmico sobre la actividad antirrotavirus de las MUCs y la PP3 bovinas, los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE y Western-blotting relativos al tratamiento térmico del lactosuero bovino parecen indicar que estas proteínas son altamente resistentes, incluso a 85 °C durante 10 min, lo que podría relacionarse con el efecto protector que ejercen los glicanos unidos a su molécula, según diversos estudios (Madsen et al., 2014; Pedersen et al., 2012b; Ross et al., 2015).

En esta tesis también se han aplicado diversos tratamientos térmicos a la mazada, con el objetivo de evaluar la influencia en su capacidad para neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3. De esta manera, se ha observado que aunque la pasteurización baja de la mazada bovina no modifica de manera significativa su capacidad antirrotavirus, esta sí se ve alterada tras la pasteurización alta, con una pérdida del 12%. Con tratamientos térmicos de intensidad creciente se evidenció una pérdida progresiva, aumentando hasta el 52% tras un tratamiento de 85 °C durante 10 min.

Además, se ha comprobado que el proceso de lavado de la nata influencia significativamente la sensibilidad de la mazada obtenida al tratamiento térmico. De hecho, la mazada bovina procedente de nata lavada presentó pérdidas significativamente mayores de actividad neutralizante, en comparación con la mazada procedente de nata sin lavar, para todos los tratamientos térmicos evaluados. De manera similar a lo observado para el lactosuero, los resultados del análisis por SDS-PAGE correspondiente al tratamiento térmico de la mazada reveló la pérdida progresiva de IgGs, LF, XOD y LDH, que fue más evidente en el caso de la mazada de nata lavada. De nuevo, las MUCs y la PP3 exhibieron cierta termorresistencia. Estas observaciones podrían estar asociadas a la pérdida de diversos componentes activos de la mazada con el lavado, dando como resultado la pérdida directa de la capacidad antirrotavirus y/o la disminución de protección que ejercen los componentes eliminados por el lavado sobre los componentes activos frente a la desnaturalización térmica.

Los ensayos realizados con muestras lácteas derivadas de especies distintas a la bovina han puesto de manifiesto interesantes diferencias interespecie. Así, el lactosuero ovino mostró mayor resistencia a los tratamientos térmicos de elevada intensidad (85 °C durante 20 s y 10 min) en comparación con el homólogo bovino, como puede comprobarse atendiendo a los porcentajes de pérdida de actividad (**Tabla 39**). Ambos lactosueros, bovino y ovino, mantuvieron igualmente intacta su capacidad antirrotavirus tras las pasteurizaciones baja y alta. En cambio, el lactosuero de leche humana presentó una susceptibilidad a los tratamientos

térmicos notablemente superior. De hecho, se evidenció una pérdida de su actividad del 27,6% tras la pasteurización baja, que ascendió progresivamente hasta la pérdida prácticamente total tras 85 °C durante 10 min. Por el contrario, dicha actividad no se vió modificada tras la pasteurización alta.

Por otra parte, aunque la mazada ovina ha mostrado un comportamiento similar al de la mazada bovina tras los tratamientos térmicos de mayor intensidad (75 °C durante 10 min y 85 °C durante 20 s y 10 min), se han observado diferencias en lo que respecta a la resistencia a los tratamientos de pasteurización. Así, la mazada ovina procedente de nata sin lavar ha mostrado mayor resistencia que su homóloga bovina a la pasteurización alta, mientras que ambas presentan una elevada resistencia a la pasteurización baja, sin pérdida significativa de su actividad antirrotavirus. En cambio, aunque ambas mazadas procedentes de nata lavada ven alterada de manera significativa su actividad antirrotavirus tras la pasteurización alta, sólo la ovina mantiene intacta dicha actividad tras la pasteurización baja.

La diferente sensibilidad a los tratamientos térmicos evidenciada entre las fracciones lácteas, bien dentro de la misma especie o entre especies, podría asociarse a divergencias en su composición, sobre todo en lo que respecta a compuestos con actividad antirrotavirus y/o compuestos con cierta resistencia al tratamiento térmico, como la grasa o los compuestos glicosilados. A este respecto, se ha comprobado una gran variabilidad en la susceptibilidad térmica de las Igs y las LFs nativas aisladas de leches de distintas especies. De hecho, las IgGs ovinas parecen notablemente más susceptibles a los tratamientos térmicos de elevada intensidad (75 °C y 85 °C durante 10 min) en comparación con las IgGs bovinas. Además, aunque la pasteurización de ambos tipos de IgGs no causa pérdidas significativas de actividad, estas son mayores en el caso de las IgGs ovinas. Las IgAs humanas, en cambio, mostraron una elevada sensibilidad a la pasteurización baja, así como a los tratamientos térmicos de elevada intensidad (75 °C y 85 °C durante 10 min), experimentando una pérdida del 98-100% de su actividad. Por el contrario, la pasteurización alta mantuvo intacta la capacidad antirrotavirus de las IgAs humanas. Estas observaciones concuerdan con los resultados obtenidos por Giribaldi et al. (2016), quienes mostraron que la pasteurización alta provocaba una pérdida de inmunorreactividad de la IgA del 21%, inferior al 54% alcanzado tras la pasteurización baja. En cambio, otros autores registraron pérdidas similares de IgA mediante ELISA, en torno al 57%, tras ambos tipos de pasteurización (Mayayo et al., 2016; Peila et al., 2017).

El tratamiento térmico de las LFs derivadas de leche de distintas especies también puso de manifiesto diferencias de sensibilidad. Así, mientras que la pasteurización baja provocó la pérdida significativa de la actividad antirrotavirus de las LFs bovina, humana y de cerda, de 44,5; 60,1 y 87,1%, respectivamente, las LFs ovina y de camella mantuvieron dicha actividad sin cambios significativos tras este tratamiento. Esta mayor resistencia térmica de las LFs ovina

y de camella también se evidenció tras 75 °C durante 10 min. El tratamiento de 85 °C durante 10 min causó una pérdida de actividad similar para todas las LFs, de entre el 93,3-100%. La pasteurización alta, en cambio, no afectó de manera significativa al potencial antirrotavirus de ninguna de las LFs, con leves pérdidas comprendidas entre 0-13,8%. Diversos estudios han observado que la pasteurización baja de la leche humana provoca una pérdida de la inmunorreactividad de la LF entre el 57-80%, mientras que la pasteurización alta la disminuye en menor medida, entre el 35-50% (Mayayo et al., 2014; Peila et al., 2016).

La sensibilidad individual al tratamiento térmico exhibida por las proteínas lácteas está asociada a su estructura y al grado de glicosilación (Deeth y Lewis, 2017c; O’Riordan et al., 2014). Además, como consecuencia del tratamiento térmico las proteínas lácteas pueden experimentar cambios estructurales y de composición, como desdoblamiento, desnaturalización o agregación. De hecho, el tratamiento térmico de la leche por encima de 65 °C provoca la desnaturalización de las proteínas del lactosuero y la formación de agregados por interacción de estas con las micelas de caseínas (especialmente caseína- $\kappa$ ) y/o con las proteínas de la MFGM (Chevalier et al., 2009; Morin et al., 2007), mediante interacciones hidrofóbicas, en el caso de la  $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA, SA y LF, o mediante puentes disulfuro, en el caso de las Igs y  $\beta$ -LG (Donato y Guyomarc’h, 2009; Ye et al., 2004).

Por otra parte, Taylor y Woonton (2009) mostraron que al aumentar la severidad del tratamiento térmico de la leche bovina disminuía el grado de glicosilación del glicomacropéptido bovino. Además de esto, diversos estudios han sugerido que no sólo las proteínas se ven afectadas por el tratamiento térmico de la leche, sino también los glicoesfingolípidos, los fosfolípidos y los triglicéridos (Deeth y Lewis, 2017c; Houlihan et al., 1992).

Teniendo todo lo anterior en consideración, una posible explicación a la pérdida de actividad antirrotavirus de las muestras lácteas tras el tratamiento térmico sería que la desnaturalización y/o agregación inducida térmicamente en las proteínas bioactivas lleva asociado un cambio conformacional y/o de composición en su estructura, con alteraciones incluso en la glicosilación. Tal vez estos cambios en las proteínas suponen la disminución o pérdida de los sitios activos con capacidad de interaccionar con las partículas víricas, causando por tanto la merma de su actividad neutralizante.

Los resultados del presente estudio pueden ser útiles para conocer qué tratamientos térmicos son más adecuados para conservar el potencial antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas. Parece claro que la pasteurización alta es el tratamiento térmico más apropiado para la mayoría de muestras lácteas a tal efecto. De hecho, tras dicho tratamiento ninguna de las proteínas evaluadas en este estudio vio alterada de manera significativa su

capacidad neutralizante, independientemente de la especie de origen. De igual manera, los lactosueros bovino, ovino y humano mantuvieron intacta su actividad antirrotavirus tras este tratamiento. La mazada ovina tampoco se vio significativamente afectada, mientras que la bovina experimentó una ligera pérdida de actividad. En cambio, la mazada procedente de nata lavada, tanto bovina como ovina, sí se vio significativamente afectada tras esta pasteurización.

La pasteurización baja ha resultado un tratamiento muy conveniente para mantener sin cambios significativos la actividad antirrotavirus de todas las muestras lácteas ovinas. Por el contrario, este tratamiento, habitualmente usado en los bancos de leche para garantizar su calidad higiénica, ha provocado pérdidas significativas en la actividad de todas las muestras lácteas humanas evaluadas, de manera similar a las producidas en algunas muestras lácteas bovinas, como la mazada lavada, la LF, la XOD y la LDH. Además, se ha evidenciado que el resto de los tratamientos térmicos de mayor intensidad provocan pérdidas significativas de actividad para la mayoría de las muestras testadas.

Por lo tanto, tal vez sería interesante que se optimizaran, en base a los resultados obtenidos, las técnicas de procesado y conservación empleadas tanto en los bancos de leche humana como en la industria láctea, con el fin de mantener el potencial antirrotavirus de productos especiales lo más alto posible, garantizando a su vez la calidad higiénica y microbiológica. A este respecto, en los últimos años está cobrando interés el uso de tratamientos no térmicos, como las altas presiones hidrostáticas (HHP), para el procesado de alimentos en la industria.

La principal ventaja del tratamiento con HHP, comprendido en la práctica entre 100 y 600 MPa durante 1-30 min, es su capacidad para inactivar la mayoría de enzimas y microorganismos alterantes y patógenos, con una mínima alteración de las propiedades nutricionales y sensoriales del alimento, dado que esta tecnología no se aplica a temperaturas altas normalmente (Chawla et al., 2011; Huppertz, 2010). Sin embargo, se ha comprobado que la presión puede inducir ciertos cambios en la estructura de las proteínas lácteas (Huppertz et al., 2006; Meng et al., 2017). Aunque existen diversos estudios acerca del efecto de las HHP en el contenido y estructura de las proteínas lácteas, la mayoría de ellos se centran en la leche bovina y en las proteínas mayoritarias, fundamentalmente las caseínas y las proteínas del lactosuero (Mazri et al., 2011, 2012). Aunque existen algunos estudios sobre el efecto que las HHP tienen sobre las propiedades biológicas de las proteínas lácteas (Franco et al., 2013, 2018), es necesario seguir investigando sobre el efecto en algunas proteínas minoritarias como las de la MFGM.

Por lo tanto, otro de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del efecto de las HHP aplicadas a diversas fracciones y proteínas derivadas de la leche bovina, ovina y humana, sobre su integridad y su capacidad de neutralizar la infección de las células

MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3. Este estudio puede contribuir a evaluar la potencialidad y viabilidad de las HHP como tecnología alternativa a los tratamientos térmicos tradicionales. Así, tras el tratamiento HHP de las diversas muestras lácteas estudiadas, su capacidad antirrotavirus se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta. Los porcentajes de pérdida de actividad provocados para todas las muestras por las HHP se incluyen en la **Tabla 40**, con el objetivo de facilitar la discusión e interpretación de los mismos, así como su comparación con los resultados de los tratamientos térmicos.

Se ha comprobado que los tratamientos del lactosuero bovino por HHP de hasta 500 MPa durante 10 min no alteran de manera significativa su capacidad antirrotavirus frente a la cepa WC3. Por el contrario, los tratamientos de mayor intensidad sí inducen una pérdida progresiva de dicha actividad, de hasta el 82% tras el tratamiento del lactosuero a 600 MPa durante 15 min. De manera similar al lactosuero, la mazada bovina procedente de nata no lavada mantuvo intacto su potencial antirrotavirus incluso tras 500 MPa durante 10 min. Sin embargo, la mazada mostró una mayor resistencia que el lactosuero a los tratamientos de HHP de más intensidad, experimentando una pérdida de actividad del 13-21% tras 600 MPa durante 5-15 min. Estos resultados podrían estar asociados a diferencias de composición entre fracciones y especialmente al efecto protector de la grasa, cuyo contenido es mayor en la mazada (Britten et al., 2008). En esta línea, se ha observado una resistencia al tratamiento por HHP significativamente mayor en las muestras procedentes de nata no lavada, de manera similar a lo observado en el caso de los tratamientos térmicos. De hecho, la mazada bovina procedente de nata lavada experimentó una pérdida significativa de su capacidad antirrotavirus del 17% tras 500 MPa durante 5 min, alcanzando el 99% de descenso con el tratamiento de 600 MPa durante 15 min. Estas observaciones podrían deberse a la pérdida de componentes de la mazada con capacidad antirrotavirus tras el lavado, así como a la disminución de componentes con acción protectora frente a la desnaturalización inducida por las HHP. Estas evidencias podrían contribuir a optimizar los procedimientos de obtención de estas fracciones lácteas, con el fin de mantener su potencial antirrotavirus.

Teniendo en cuenta la capacidad exhibida por algunas de las proteínas lácteas, como las IgGs, la LF, la XOD y la LDH, para neutralizar la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3, tras su aislamiento se evaluó el efecto de diversos tratamientos de HHP sobre dicha actividad. El efecto de las HHP sobre las proteínas se estudió, además, mediante SDS-PAGE. De esta forma, se ha puesto de manifiesto la diferente susceptibilidad de estas proteínas al efecto del tratamiento por HHP. Así, se ha comprobado que las IgGs bovinas son muy resistentes, puesto que mantienen su actividad antirrotavirus intacta incluso a 600 MPa durante 10 min, e incluso el tratamiento a 600 MPa durante 15 min provocó un descenso de solo el 8%. Otros autores, por el contrario, demostraron mediante ELISA que la

inmunorreactividad de las IgGs bovinas disminuía significativamente tras un tratamiento de 414 MPa durante 6 min (Li et al., 2006).

De manera similar a las IgGs, la LF bovina ha mostrado una elevada resistencia a los tratamientos de HHP, manteniendo su actividad antirrotavirus sin disminuciones significativas incluso a los tratamientos de mayor intensidad. Además, se ha comprobado que la LF bovina saturada con hierro presenta la misma resistencia a los tratamientos de HHP que la LF bovina nativa, lo que parece indicar que los cambios conformacionales que acontecen en la molécula de LF tras la saturación con hierro no afectan a su sensibilidad a las HHP y, como consecuencia, se mantiene inalterada su capacidad antirrotavirus. De acuerdo con estos resultados, Franco et al. (2013) demostraron que las LFs bovinas nativa y apo (sin hierro ligado) mantenían su actividad antibacteriana frente a *E. coli* O157:H7 tras un tratamiento de 400 MPa durante 15 min. Por el contrario, Mazri et al. (2011) registraron un descenso del 98% en la inmunorreactividad de la LF bovina nativa en PBS, tras un tratamiento de 600 MPa durante 15 min.

La LDH bovina también mostró una elevada resistencia a los tratamientos de HHP, manteniendo su capacidad de neutralización de la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos de la cepa WC3 sin cambios significativos, incluso tras 600 MPa durante 10 min. El tratamiento de 600 MPa durante 15 min provocó, en cambio, un descenso significativo de dicha capacidad, del 44%. Por otra parte, y en contraste con los resultados obtenidos para las IgGs, LF y LDH bovinas, la XOD bovina presentó una alta susceptibilidad al tratamiento por HHP. De hecho, cuando esta proteína se sometió a tratamientos de 400-600 MPa durante 15 min, se registraron pérdidas de su capacidad antirrotavirus de entre el 39-88%. Estas observaciones ponen de manifiesto diferencias intraespecie en lo que respecta a la susceptibilidad de las proteínas lácteas al tratamiento por HHP, que podrían deberse, en parte, a divergencias en su estructura y grado de glicosilación. A este respecto, la glicosilación podría ejercer un papel protector frente a las HHP en el caso de las glicoproteínas IgGs, LF y LDH, pero no en la XOD bovina, que se ha clasificado como proteína no glicosilada (Mather, 2000).

A pesar de la resistencia exhibida por las IgGs, la LF y la LDH bovinas al tratamiento directo por HHP, los perfiles electroforéticos de las fracciones lácteas tratadas por HHP parecen indicar cierta pérdida de estas proteínas al aumentar la intensidad del tratamiento, principalmente cuando se aumenta a 600 MPa. Estas observaciones podrían atribuirse a que la pérdida de potencial antirrotavirus observado para las fracciones lácteas bovinas se debe más a procesos de agregación que al efecto directo sobre las proteínas bioactivas como las IgGs, la LF y la LDH, puesto que a tratamientos de hasta 600 MPa durante 10 min no se han visto significativamente alteradas.



A este respecto, se sabe que las proteínas mayoritarias del lactosuero,  $\beta$ -LG y  $\alpha$ -LA, se desnaturalizan tras tratamientos a presiones  $> 100$  ó  $> 400$  MPa, respectivamente. La mayor parte de la  $\beta$ -LG desnaturalizada forma agregados con las micelas de caseína de la leche, aunque parte permanece en el lactosuero o se adsorbe a la MFGM, al igual que la  $\alpha$ -LA desnaturalizada (Considine et al., 2007; Huppertz et al., 2006). Los agregados se forman mediante enlaces intra e intermoleculares entre moléculas unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro, dependiendo del tipo y concentración de las proteínas, pH, fuerza iónica, intensidad y temperatura del tratamiento de HHP (Patel y Huppertz, 2014). Los cambios derivados de la desnaturalización, interacción y agregación de las proteínas lácteas dan lugar a productos estructural y composicionalmente distintos al original no tratado, con propiedades funcionales alteradas (Patel et al., 2006). Aunque en algunos casos estos cambios conformacionales y de composición en la estructura de las proteínas pueden mejorar las propiedades tecnológicas de la leche y los productos lácteos derivados (Trujillo et al., 2002), es probable que favorezcan la disminución o pérdida de los sitios activos con capacidad de interactuar con los rotavirus, lo que explicaría la pérdida de actividad neutralizante observada tras el tratamiento por HHP de las fracciones lácteas.

En este estudio, se han evidenciado diferencias interespecie frente a los tratamientos por HHP tras evaluar diversas muestras lácteas de especies distintas a la bovina. Así, todas las fracciones lácteas ovinas han mostrado una mayor resistencia al tratamiento por HHP que sus homólogas bovinas, como puede observarse si se comparan los porcentajes de pérdida de actividad antirrotavirus recogidos en la **Tabla 40**. De hecho, las pérdidas de actividad observadas tras el tratamiento de mayor intensidad aplicado al lactosuero y mazada ovinas fueron del 42 y 16%, respectivamente. Además, el proceso de lavado de la nata afectó menos a la mazada ovina que a la bovina, manteniendo la primera un 43% de actividad tras 600 MPa durante 15 min. Esto podría indicar que la mazada ovina resiste mejor que la bovina la pérdida de componentes con actividad antirrotavirus tras el proceso de lavado de la nata, o que contiene mayor cantidad de componentes resistentes a las HHP.

Cabe destacar que las IgGs ovinas mostraron una elevada sensibilidad al tratamiento por HHP, en contraposición a la notable resistencia exhibida por sus homólogas bovinas. Así, los tratamientos de 400, 500 y 600 MPa durante 15 min provocaron pérdidas de actividad de las IgGs ovinas del 34, 37 y 56%, respectivamente, poniendo de manifiesto diferencias interespecie que podrían responder a divergencias de composición y/o estructura. En cambio, la LF ovina mantuvo su potencial antirrotavirus intacto incluso tras el tratamiento de HHP de mayor intensidad, de manera similar a lo observado para la LF bovina. En esta misma línea, se ha comprobado que las LFs aisladas de leche de otras especies, como la humana, la de cerda y la de camella, también son altamente resistentes a los tratamientos de HHP, puesto que no se han

observado pérdidas significativas de su capacidad antirrotavirus a ninguno de los tratamientos de HHP aplicados.

En lo que respecta a las muestras lácteas humanas incluidas en este estudio, también se han observado diferencias interespecie. Así, el lactosuero humano mostró una mayor resistencia al tratamiento por HHP que sus homólogos bovino y ovino, con ligeros porcentajes de pérdida de actividad antirrotavirus, de entre 5,6-9% tras el tratamiento a 600 MPa durante 5-15 min. En cambio, el tratamiento HHP directo aplicado a las IgAs humanas provocó una pérdida significativa de su capacidad antirrotavirus frente a la cepa WC3, de entre el 21-40% tras 400-600 MPa durante 15 min, pérdida superior a la observada para las IgGs bovinas, pero inferior a la registrada para las IgGs ovinas.

A pesar de que existen multitud de estudios sobre el efecto de diversos tratamientos tecnológicos de la leche en el contenido e inmunorreactividad de sus principales proteínas, especialmente Igs y LF (Franco et al., 2018; Peila et al., 2017), son muy escasos los estudios centrados en la influencia de dichos tratamientos en las propiedades biológicas. Además, en lo que respecta a la actividad antirrotavirus, los estudios son prácticamente inexistentes, lo que pone de manifiesto el interés y relevancia de los resultados que hemos obtenido, que pueden ser útiles para decidir qué tratamientos tecnológicos son más adecuados para conservar el potencial antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas de distintas especies.

Así, si comparamos los resultados de pérdida de capacidad antirrotavirus derivados de los tratamientos térmicos y de HHP de las muestras lácteas (**Tablas 39 y 40**), parece claro que la pasteurización alta es un tratamiento muy apropiado para conservar la actividad neutralizante de la mayoría de muestras, de igual manera que el tratamiento de HHP a 500 MPa durante  $\leq 15$  min. A este respecto, tanto la pasteurización alta como las HHP a 500 MPa durante  $\leq 15$  min podrían ser alternativas interesantes a la pasteurización baja de la leche humana, tratamiento habitual en los bancos de leche, en términos de conservación del potencial antirrotavirus. Asimismo, sería interesante aplicar estos tratamientos a los productos suplementados con proteínas bioactivas, como la LF de distintas especies, puesto que mantienen su potencial antirrotavirus en mayor medida que tras la pasteurización baja.

Los resultados de esta tesis sin duda pueden contribuir a optimizar los procedimientos de obtención y tratamiento de diversas fracciones y productos lácteos en la industria y en los bancos de leche. Sin embargo, son necesarios futuros estudios para elucidar si las condiciones de tratamiento aquí descritas, tanto térmicas como de HHP, son adecuadas en base a criterios nutricionales, microbiológicos y/o funcionales, de lo que dependerá su viabilidad práctica.

**Tabla 39.** Efecto del tratamiento térmico de las muestras lácteas en su actividad neutralizante de la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3. Para cada muestra, la pérdida de actividad neutralizante (%) tras el tratamiento térmico se ha calculado en relación a la actividad exhibida por la muestra sin tratar.

<b>Pérdida de actividad neutralizante (%) tras tratamiento térmico*</b>					
<b>Muestras bovinas</b>	<b>Tratamiento térmico</b>				
	<b>63 °C/30 min (LTLT)</b>	<b>75 °C/20 s (HTST)</b>	<b>75 °C/10 min</b>	<b>85 °C/20 s</b>	<b>85 °C/10 min</b>
Lactosuero	0	0	8,1	70,3	83,9
Mazada (nata sin lavar)	3,8	12	28,7	48,0	52,3
Mazada (nata lavada)	31,4	25,9	45,8	62,4	77,2
IgGs	0	0	16,8	12,1	49,9
LF nativa	44,5	6,1	75,5	37,3	100
LF saturada	1,7	4,0	0	6,6	86,5
XOD	31,4	1,2	82,0	27,8	97,3
LDH	78,3	0,7	46,2	12,3	45,8
<b>Muestras ovinas</b>	<b>63 °C/30 min</b>	<b>75 °C/20 s</b>	<b>75 °C/10 min</b>	<b>85 °C/20 s</b>	<b>85 °C/10 min</b>
Lactosuero	0	0	14,8	48,3	67,5
Mazada (nata sin lavar)	0	4,4	36,3	30,7	60,3
Mazada (nata lavada)	0	36,9	50,1	54,2	77,5
IgGs	11,9	3,8	84,5	3,0	96,4
LF nativa	3,8	10,1	18,3	16,6	97,0
<b>Muestras humanas</b>	<b>63 °C/30 min</b>	<b>75 °C/20 s</b>	<b>75 °C/10 min</b>	<b>85 °C/20 s</b>	<b>85 °C/10 min</b>
Lactosuero	27,6	0	73,9	63,7	97,7
IgAs	98,2	0	100	8,8	100
LF nativa	60,1	0	81,7	26,0	95,5
<b>Otras muestras</b>	<b>63 °C/30 min</b>	<b>75 °C/20 s</b>	<b>75 °C/10 min</b>	<b>85 °C/20 s</b>	<b>85 °C/10 min</b>
LF nativa de cerda	87,1	13,8	94,5	9,2	93,3
LF nativa de camella	8,0	7,8	27,6	10,5	100

\*Se han sombreado los % de pérdida de actividad neutralizante estadísticamente no significativos en relación a la muestra sin tratar.

**Tabla 40.** Efecto del tratamiento de HHP de las muestras lácteas en su actividad neutralizante de la infección de las células MA104 por los rotavirus bovinos WC3. Para cada muestra, la pérdida de actividad neutralizante (%) tras el tratamiento de HHP se ha calculado en relación a la actividad exhibida por la muestra sin tratar.

<b>Pérdida de actividad neutralizante (%) tras tratamiento de altas presiones*</b>									
<b>Muestras bovinas</b>	<b>Tratamientos HHP (MPa/min)</b>								
	<b>400 MPa</b>			<b>500 MPa</b>			<b>600 MPa</b>		
	<b>5 min</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
Lactosuero	0	0	0	2,8	3,2	10,4	41,4	64,2	81,7
Mazada (sin lavar)	0	0	0	0	0	4,6	12,7	17,3	21,3
Mazada (lavada)	3,3	2,7	6,3	17,2	33,7	31,5	68,1	96,7	98,6
IgGs	0	0	0	0	0	0	0	4,4	8,1
LF nativa	0,5	0,9	0	5,9	3,9	6,7	5,0	3,2	5,4
LF saturada	0,2	0,7	0	0	3,0	0	0,6	1,5	3,8
XOD	NT	NT	39,4	NT	NT	55,7	NT	NT	88,0
LDH	NT	NT	8,7	NT	NT	0,6	NT	NT	43,6
<b>Muestras ovinas</b>	<b>400 MPa</b>			<b>500 MPa</b>			<b>600 MPa</b>		
	<b>5 min</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
	Lactosuero	0	0	0	0	0	6,7	21,5	29,2
Mazada (sin lavar)	0,4	0	0,5	0	1,0	0,2	3,3	9,0	15,7
Mazada (lavada)	0	0	0	5,6	3,9	4,5	26,2	52,6	56,9
IgGs	NT	NT	34,0	NT	NT	36,7	NT	NT	56,5
LF nativa	NT	NT	0	NT	NT	0	NT	NT	0
<b>Muestras humanas</b>	<b>400 MPa</b>			<b>500 MPa</b>			<b>600 MPa</b>		
	<b>5 min</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
	Lactosuero	0	0	0	0	1,6	2,3	5,6	6,1
IgAs	NT	NT	20,8	NT	NT	29,7	NT	NT	40,2
LF nativa	NT	NT	2,8	NT	NT	3,6	NT	NT	5,5
<b>Otras muestras</b>	<b>400 MPa</b>			<b>500 MPa</b>			<b>600 MPa</b>		
	<b>5 min</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
	LF de cerda	NT	NT	5,7	NT	NT	7,0	NT	NT
LF de camella	NT	NT	7,0	NT	NT	9,0	NT	NT	2,3

\*Se han sombreado los % de pérdida de actividad neutralizante estadísticamente no significativos en relación a la muestra sin tratar.

NT: no se ha tratado la muestra en las condiciones de HHP establecidas.

### 5.3. Efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de las fracciones y proteínas lácteas

Para poder considerar el uso oral de cualquier ingrediente funcional, bien sea para alimentación humana o para uso veterinario, es necesario tener en cuenta su comportamiento en condiciones similares a las gastrointestinales *in vivo*. A pesar de los numerosos estudios sobre la digestión enzimática de las fracciones y proteínas lácteas (Dupont y Tome, 2014; Inglingstad et al., 2010), algunos de ellos centrados en el efecto sobre su actividad biológica (Ripollés et al., 2015, 2016; van Hooijdonk et al., 2000), son escasas las referencias en lo que respecta al efecto en su potencial antirrotavirus. Por ello, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio del efecto de algunos tratamientos enzimáticos sobre la integridad y la actividad antirrotavirus de diversas fracciones y proteínas lácteas.

A este respecto, los lactosueros bovino, ovino y humano, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM procedentes de leche cruda bovina y ovina, así como el WPC bovino comercial, se sometieron a una degradación enzimática, tanto simple como completa, simulando una digestión gastrointestinal *in vitro*, en base a diversos estudios (Gallier et al., 2012; Jiménez-Saiz et al., 2011; Le et al., 2012), tal y como se ha detallado en el apartado 3.2.14. La actividad antirrotavirus de los hidrolizados se evaluó frente a la cepa bovina WC3 mediante el ensayo de neutralización con detección por inmunofluorescencia. La eficacia de la degradación enzimática de las muestras lácteas se comprobó mediante SDS-PAGE.

Si bien la hidrólisis enzimática del lactosuero bovino, ovino y humano, tanto simple como completa, no causó una pérdida significativa de su actividad antirrotavirus, la degradación completa del WPC bovino sí afectó de manera significativa a dicha capacidad. Así, se registró una pérdida de actividad del 30% respecto al WPC sin degradar, que probablemente se deba al efecto del tratamiento térmico al que es sometido este producto en su procesado industrial. Este tratamiento podría provocar la pérdida de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas del lactosuero, haciéndolas más sensibles a la acción de las enzimas digestivas (Dupont y Tome, 2014), tal y como se ha demostrado para la  $\beta$ -LG (Barbé et al., 2013) y la  $\alpha$ -LA (Inglingstad et al., 2010).

La elevada capacidad antirrotavirus que mantienen los lactosueros degradados enzimáticamente podría explicarse, al menos en parte, por la estabilidad de la Igs. Así, diversos estudios han demostrado que aunque haya una degradación parcial de las Igs tras su paso por el aparato digestivo, gracias a su estructura y a la presencia de puentes disulfuro intra e intermoleculares y de grupos glicosilados, los fragmentos Fab mantienen su capacidad de unión y de neutralización de antígenos (Jasion y Burnett, 2015). En esta misma línea, diversos

estudios han descrito la eficacia de terapias orales frente a gastroenteritis causadas por rotavirus en niños, en los que se han utilizado calostro y leche humanos y calostro bovino hiperinmune (Gianino et al., 2002; Sarker et al., 1998) y WPC bovino en ratas y ratones (Pérez-Cano et al., 2008; Wolber et al., 2005).

En cambio, en esta tesis se ha comprobado que la degradación enzimática de la LF bovina causa la pérdida significativa de su capacidad para neutralizar la infección de células MA104 por rotavirus de la cepa bovina WC3. De hecho, la hidrólisis con pepsina de la LF bovina generó hidrolizados sin actividad antirrotavirus, ni siquiera a 5 mg/mL de concentración. También se obtuvieron hidrolizados de LF con coagulante microbiano y con quimosina recombinante, enzimas con interés en la industria alimentaria, que tampoco tenían actividad antirrotavirus. Por otra parte, Superti et al. (2001) demostraron que los fragmentos peptídicos obtenidos tras la digestión *in vitro* con tripsina de la LF bovina eran capaces de inhibir la infección de células MA104 por rotavirus de la cepa de simio SA11, si bien en menor medida que la proteína intacta. En esta línea, diversos estudios *in vivo* han atribuido a la LF parte del éxito de terapias orales frente a los síntomas de la infección con rotavirus (Bethell y Huang, 2004; Egashira et al., 2007; Zavaleta et al., 2006). Estas discrepancias podrían deberse a diferencias de susceptibilidad entre las cepas de rotavirus, así como a diferencias de estructura y secuencia en los péptidos generados con distintos preparados enzimáticos. En esta línea, Ripollés et al. (2015) observaron que los hidrolizados de LF bovina obtenidos con diferentes preparados enzimáticos presentaban péptidos con distintos pesos moleculares que exhibían diferente actividad antibacteriana. A este respecto, si bien los péptidos derivados de la LF bovina se han obtenido normalmente con pepsina porcina, tratando de imitar las condiciones fisiológicas que ocurren en el organismo (Plate et al., 2006; Ruiz-Giménez et al., 2012), el estudio del efecto de otras proteasas, como las que se utilizan normalmente en la coagulación de la leche, tiene un gran interés con el objetivo de obtener hidrolizados que pudieran mejorar las propiedades de la proteína nativa.

La hidrólisis enzimática de las fracciones lácteas derivadas del procesado de la nata, la mazada, el butter serum y la fracción enriquecida en MFGM bovina, ovina y humana, provocó una disminución de su actividad antirrotavirus de manera notablemente superior que en los lactosueros. De hecho, la degradación completa de estas fracciones causó una pérdida significativa de su actividad, de entre el 56 y el 100%. Aunque estas diferencias no tienen fácil explicación, pueden estar asociadas a divergencias en la proporción de compuestos bioactivos entre las fracciones. Tal vez, en el caso del lactosuero, la mayoría de los componentes con actividad antirrotavirus no se vean afectados por la acción de las enzimas, o bien las regiones activas de las proteínas permanezcan inalteradas y expuestas tras la hidrólisis. En contraposición a estas observaciones, algunas glicoproteínas de la MFGM, como las MUCs, la CD36, la LDH y

la PP3, exhibieron cierta resistencia frente a la degradación gástrica, atribuida al alto grado de glicosilación en su estructura, así como a la presencia de lípidos, que ofrecen una protección estérica frente a la acción de las enzimas digestivas, dificultando su acción y dando como resultado péptidos menos degradados (Gallier et al., 2012; Greenwalt et al., 1992; Le et al., 2012; Peterson et al., 1998).

Se ha evaluado el efecto de la degradación enzimática con tripsina de la fracción PPT y de la proteína PP3 bovinas y ovinas en su potencial antirrotavirus. La hidrólisis enzimática de las muestras se llevó a cabo según el procedimiento descrito por Pedersen et al. (2012) y la capacidad de neutralización de la infección de células MA104 por el rotavirus bovino WC3 se determinó mediante inmunofluorescencia. En el caso de las muestras bovinas, se observó una mayor actividad antirrotavirus para los hidrolizados de la PPT y PP3, en comparación con las muestras sin degradar. Este hecho podría estar indicando que la hidrólisis con tripsina de la PPT y PP3 bovinas favorece la liberación de fragmentos peptídicos que contienen más sitios activos que las muestras intactas, gracias tal vez a cambios estéricos que permiten a estos sitios interactuar con los rotavirus, impidiendo de esta forma la infección celular. De hecho, se ha comprobado que el fragmento de 17 kDa derivado de la proteólisis endógena de la PP3 bovina presenta mayor actividad antirrotavirus frente a la cepa bovina WC3 que la PPT y la PP3 intactas. Estas observaciones coinciden con los resultados de Inagaki et al. (2010a), quienes atribuyeron a un péptido C-terminal de 17 kDa una elevada actividad antirrotavirus frente a la cepa humana MO, así como con diversos estudios que han demostrado que la proteólisis de la PP3 bovina genera péptidos con una actividad antibacteriana superior a la de la proteína sin degradar (Campagna et al., 2004; Pedersen et al., 2012a).

En este trabajo también se ha evaluado la capacidad neutralizante de los hidrolizados de la PP3 frente a la infección de células MA104 por distintas cepas de rotavirus, mediante el método de neutralización con inmunodetección con carbazol. Así, se ha comprobado que la susceptibilidad a la neutralización varía notablemente entre cepas. De hecho, la cepa bovina NCDV, sensible a la NA, fue eficazmente neutralizada por el hidrolizado de la PP3 bovina, obteniéndose un  $IC_{50}$  de 0,38 mg de muestra/mL. En cambio, el resto de cepas evaluadas, WC3, Wa, UK, B223 y RRV, fueron inhibidas de manera menos efectiva por este hidrolizado, con valores de  $IC_{50}$  de entre 6,92 y  $> 15$  mg de muestra/mL. De nuevo, a pesar de las diferencias entre cepas, se comprobó que el hidrolizado de la PP3 bovina inhibía de manera más eficaz la mayoría de cepas, en comparación con la proteína sin degradar. Por otra parte, la PPT y PP3 ovinas mostraron, en general, una actividad antirrotavirus notablemente inferior a la de las homólogas bovinas. Aunque todavía se desconoce la causa de esta actividad antirrotavirus, parece ser que la glicosilación de la PP3 juega un papel fundamental (Inagaki et al., 2010a). En esta línea, las diferencias de actividad observadas, tanto interespecie como intraespecie, podrían

atribuirse a divergencias en la estructura y glicosilación de los diferentes fragmentos peptídicos generados tras la degradación enzimática de la PPT y PP3 (Coddeville et al., 1998; Girardet et al., 1995).

Se ha estudiado el efecto de la degradación enzimática en la actividad antirrotavirus de tres derivados lácteos comerciales: leche desnatada, mazada y butter serum. Estos productos se sometieron a hidrólisis con tres preparados enzimáticos comerciales: Alcalasa, Corolasa PP y Prolyve, usados en diferentes estudios para generar péptidos bioactivos (Mota et al., 2004; Ripollés et al., 2016). La capacidad de los hidrolizados obtenidos para neutralizar la infección de células MA104 por la cepa WC3 de rotavirus bovino se determinó mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta. De esta manera, se han puesto de manifiesto interesantes diferencias de actividad entre los hidrolizados obtenidos con los diferentes preparados enzimáticos. De hecho, todos los hidrolizados de los productos lácteos comerciales obtenidos con los tres preparados enzimáticos mostraron una actividad significativamente inferior a la de los productos sin degradar, cuando se testaron a 25 y 75 mg/mL, con una pérdida de actividad de entre el 58-96% y el 33-88%, respectivamente. A 150 mg/mL, por el contrario, los hidrolizados de leche desnatada con Prolyve y Corolasa PP incrementaron su actividad en un 47-51%, en comparación con la leche desnatada sin degradar. El hidrolizado de la mazada con esos mismos preparados enzimáticos mostró una mayor capacidad neutralizante, entre el 17-21% superior a la de la mazada intacta. Estas observaciones parecen indicar que los diferentes preparados enzimáticos empleados generan hidrolizados con distinto patrón peptídico y, por lo tanto, distinto potencial antirrotavirus. A este respecto, Ripollés et al. (2016) caracterizaron mediante RP-HPLC los hidrolizados de estos derivados lácteos comerciales, comprobando que los preparados con Corolasa PP presentaban un perfil de péptidos, y un potencial antioxidante asociado, muy diferentes a los obtenidos por Alcalasa y Prolyve.

Los resultados de este estudio parecen indicar que, independientemente del grado de hidrólisis de las fracciones y proteínas lácteas, el hecho que determina el mantenimiento, la pérdida o el incremento de la actividad antirrotavirus de los hidrolizados resultantes es la conservación, la pérdida o la mayor exposición de sus sitios activos frente a los rotavirus como consecuencia de la degradación enzimática. Además, dado que los diferentes preparados enzimáticos generan patrones peptídicos distintos, con diferente capacidad antirrotavirus, tal vez sería interesante profundizar en el estudio de preparados de enzimas que mantengan o aumenten dicho potencial. Por otra parte, el uso de técnicas de encapsulación para el transporte de compuestos bioactivos a través del tracto gastrointestinal podría ser de gran interés para asegurar la eficacia de la administración oral de las muestras lácteas como terapia antirrotavirus en seres humanos y animales.



## 6. Conclusiones/Conclusions



## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente tesis nos han permitido obtener las siguientes conclusiones:

**Primera:** Las leches bovina, ovina y humana, son una fuente importante de compuestos con actividad inhibitoria frente a diferentes cepas de rotavirus. Esta capacidad está asociada principalmente a los componentes del lactosuero y, más concretamente, a diversas proteínas (Igs, LF, XOD y LDH), mientras que el contenido graso de la leche parece no ser determinante en dicha actividad. Estos resultados aportan un valor añadido al lactosuero derivado de la industria quesera, como un producto con elevado potencial antirrotavirus.

**Segunda:** La mazada y el butter serum, subproductos de la industria láctea derivados del proceso de obtención de mantequilla y de grasa láctea anhidra, respectivamente, presentan actividad antirrotavirus frente a distintas cepas. Esta capacidad se debe, al menos en parte, a la presencia de proteínas activas derivadas del lactosuero (Igs y LF) y de la MFGM (MUCs, LDH y XOD). Estos resultados podrían contribuir a revalorizar dichos subproductos por su potencial como ingredientes en alimentos funcionales.

**Tercera:** El proceso de lavado de la nata durante la obtención de la mazada, el butter serum y la MFGM produce la pérdida de proteínas, como las caseínas, algunas proteínas del lactosuero ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA y LF) y algunas proteínas de la MFGM (XOD y BTN), disminuyendo de manera significativa su capacidad antirrotavirus. Por ello, sería aconsejable optimizar los procedimientos de obtención de este tipo de fracciones para minimizar la pérdida de componentes bioactivos.

**Cuarta:** La variabilidad observada en la actividad antirrotavirus de las muestras lácteas podría atribuirse a diferencias intra e interespecie en su composición, especialmente en lo que respecta a la concentración, proporción, tipo y estructura de los componentes bioactivos. Las diferencias en el grado de glicosilación y la heterogeneidad de los glicanos de las proteínas podrían ser de especial relevancia, debido a la diferente afinidad de las distintas cepas de rotavirus por los glicanos, especialmente por el ácido siálico.

**Quinta:** La sensibilidad de las distintas cepas de rotavirus a la neutralización por parte de diversas muestras lácteas puede explicarse, entre otros factores, por su pertenencia a diferentes serotipos y a grupos con diferente sensibilidad al tratamiento con neuraminidasa (NA). De hecho, las cepas bovinas WC3 y UK, pertenecientes al mismo serotipo G6P[5], han mostrado un comportamiento similar. Por otra parte, las cepas sensibles a NA (RRV y NCDV) mostraron, de manera general, una mayor susceptibilidad a la neutralización por las muestras lácteas en comparación con las cepas resistentes a NA (WC3, UK, B223 y Wa).

**Sexta:** La actividad antirrotavirus frente a la cepa WC3 exhibida por todas las fracciones y proteínas lácteas se debe, en mayor o menor medida, a su capacidad para interactuar con los rotavirus en etapas pre y post-unión a las células, no con los receptores celulares. En la mayoría de las muestras lácteas, el principal mecanismo de neutralización ocurriría a nivel de la unión del virus a la superficie celular, mediante el bloqueo de la proteína VP4 de la cápside del virus. Las IgGs bovinas parecen interactuar principalmente con la proteína VP7, mientras que la LF y la LDH interactúan probablemente con ambas proteínas, VP7 y VP4.

**Séptima:** Los tratamientos tecnológicos de las muestras lácteas pueden inducir la pérdida de su actividad antirrotavirus, en mayor o menor medida. La desnaturalización y agregación inducidas en las proteínas bioactivas por los tratamientos térmicos o de altas presiones, lleva asociado un cambio conformacional y de composición, que tal vez supone la disminución o pérdida de los sitios activos con capacidad de interactuar con las partículas víricas, causando por tanto la merma de su actividad neutralizante.

**Octava:** La pasteurización baja a 63 °C durante 30 min, habitualmente aplicada en los bancos de leche para garantizar su calidad higiénica, provoca pérdidas significativas en la actividad de todas las muestras lácteas humanas, de manera similar a las producidas en algunas muestras lácteas bovinas, como la mazada lavada, la LF, la XOD y la LDH. Sin embargo, es un tratamiento que ha mantenido sin cambios significativos la actividad antirrotavirus de todas las muestras lácteas ovinas evaluadas.

**Novena:** Tanto la pasteurización alta a 72 °C durante 15 s como el tratamiento de HHP a 500 MPa durante  $\leq 15$  min son muy apropiados para mantener el potencial antirrotavirus de la mayoría de fracciones y proteínas lácteas, independientemente de la especie de origen. Ambos podrían ser tratamientos alternativos a la pasteurización baja de la leche bovina y humana, y sería interesante su aplicación a productos especiales suplementados con proteínas bioactivas, como la LF.

**Décima:** El proceso de lavado de la nata durante la obtención de la mazada aumenta su sensibilidad al tratamiento térmico y a las altas presiones, incrementando significativamente la pérdida de su potencial antirrotavirus. Esta pérdida podría deberse a la eliminación de componentes con capacidad antirrotavirus tras el lavado, así como a la disminución de componentes con acción protectora frente a la desnaturalización inducida por la temperatura y las altas presiones.

**Undécima:** La degradación enzimática de las fracciones y proteínas lácteas afecta a su capacidad antirrotavirus, generando patrones peptídicos con diferente actividad. Independientemente del grado de hidrólisis que experimentan las muestras lácteas, el hecho que determina la actividad antirrotavirus de los hidrolizados resultantes parece ser la conservación, la pérdida o la mayor exposición de sus sitios activos frente a los rotavirus como consecuencia de la degradación enzimática.

## 6. CONCLUSIONS

The results obtained in this thesis have enabled us to reach the following conclusions:

**First:** Bovine, ovine and human milks are an important source of compounds with inhibitory activity against different rotavirus strains. This capacity is mainly associated to the whey components and, more specifically, to some proteins (Igs, LF, XOD and LDH), while the milk fat content does not seem to be a determinant factor on this activity. These results provide an added value to the whey derived from the cheese industry, as a product with a high antirotaviral potential.

**Second:** Buttermilk and butter serum, dairy by-products from the manufacture process of butter and anhydrous milk fat, respectively, present antirotaviral capacity against different strains. This activity is due, at least in part, to the presence of active proteins from whey (Igs and LF) and from the MFGM (MUCs, LDH and XOD). These findings could contribute to revalue these by-products due to their potential as ingredients in functional foods.

**Third:** The cream washing process during the obtaining of buttermilk, butter serum and MFGM causes the loss of proteins, such as caseins, some whey proteins ( $\beta$ -LG,  $\alpha$ -LA and LF) and some MFGM proteins (XOD and BTN), thus significantly reducing their antirotaviral capacity. Therefore, it would be advisable to optimize the obtaining procedures for these fractions in order to minimize the loss of bioactive components.

**Fourth:** The variability observed in the antirotaviral activity of milk samples could be attributed to inter and intraspecies differences in composition, especially with regard to the content, proportion, type and structure of the bioactive components. Differences in the glycosylation degree and heterogeneity of protein glycans could be of particular relevance, due to the different affinity among rotavirus strains towards glycans, especially sialic acid.

**Fifth:** The sensitivity shown by different rotaviral strains to neutralization mediated by milk samples can be explained, among other factors, by belonging to diverse serotypes and groups with different sensitivity to neuraminidase (NA) treatment. In fact, bovine strains WC3 and UK, belonging to the serotype G6P[5], have shown a similar behaviour. Moreover, NA sensitive strains (RRV and NCDV) showed, in general, a greater susceptibility to neutralization by milk samples in comparison with NA resistant strains (WC3, UK, B223 and Wa).

**Sixth:** The antirotaviral activity against WC3 strain exerted by all milk fractions and proteins is due, to a greater or lesser extent, to their capacity to interact with rotavirus in the steps of pre and post-binding to the cells, not with the cell receptors. In most milk samples, the main mechanism of neutralization may happen at the virus attachment to cell surface step, by blocking the VP4 protein of the virus capsid. Bovine IgGs appear to interact mainly with the VP7 protein, while LF and LDH probably interact with both VP7 and VP4 proteins.

**Seventh:** Technological treatments of milk samples may lead to the loss of their antirotaviral activity, to a greater or lesser extent. Denaturation and aggregation induced in the bioactive proteins, either by thermal or high pressure treatments, involve a conformational and compositional change, which may imply the decrease or loss of active sites able to interact with virus particles, thus depleting their neutralizing activity.

**Eighth:** Pasteurization at 63 °C for 30 min, usually applied in human milk banks to guarantee its hygienic quality, leads to significant activity losses of all human milk samples, similarly to that observed for some bovine milk samples, such as washed buttermilk, LF, XOD and LDH. However, this is a suitable treatment that maintains without significant changes the antirotaviral activity of all tested ovine milk samples.

**Ninth:** Pasteurization at 72 °C for 15 s and HHP treatment at a 500 MPa for  $\leq$  15 min are highly suited for the maintenance of the antirotaviral potential of most milk fractions and proteins, regardless of the species of origin. Both treatments can be alternative treatments to LTLT pasteurization of bovine and human milks, and also their application to special products supplemented with bioactive proteins, such as LF, could be of interest.

**Tenth:** The cream washing process during the obtaining of buttermilk rises its sensitivity to the thermal and HHP treatments, significantly increasing the loss of its antirotaviral potential. These findings could be due to the elimination of compounds with antirotaviral capacity upon washes, along with the decrease of components with a protective role against denaturation caused by temperature and high pressure.

**Eleventh:** The enzymatic degradation of milk fractions and proteins affects their antirotaviral capacity, generating peptidic patterns with different activity. Regardless the degree of hydrolysis, the fact that determines the antirotaviral activity of the hydrolysates seems to be the preservation, the loss or the increased exposure of their active sites against rotavirus as a result of the enzymatic degradation.



## 7. Bibliografía

---



- Abdelhakim, A.H., Salgado, E.N., Fu, X., Pasham, M., Nicastro, D., Kirchhausen, T., Harrison, S.C., 2014. Structural correlates of rotavirus cell entry. *PLoS Pathog.* 10, e1004355.
- AEBLH, 2018. Asociación Española de Bancos de Leche Humana. Web: <http://www.aebhl.org/>.  
Accedido por última vez: 17/07/2018.
- Agostoni, C., Decsi, T., Fewtrell, M., Goulet, O., Kolacek, S., Koletzko, B., Kim, A., Michaelsen, F., Moreno, L., Puntis, J., et al., 2008. Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 46, 99–110.
- Aguinaga, M.A., Gómez-Carballar, F., Nieto, R., Aguilera, J.F., 2011. Production and composition of Iberian sow's milk and use of milk nutrients by the suckling Iberian piglet. *Animal* 5, 1390–1397.
- Akhter, J., Al-Hajjar, S., Myint, S., Hussain, S.M., 1995. Viral contamination of environmental surfaces on a general paediatric ward and playroom in a major referral centre in Riyadh. *Eur. J. Epidemiol.* 11, 587–590.
- Alkan, F., Ozkul, A., Oguzoglu, T.C., Timurkan, M.O., Caliskan, E., Martella, V., Burgu, I., 2010. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. *Vet. Microbiol.* 141, 231–237.
- Andersen, M.H., Graversen, H., Fedosov, S.N., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T., 2000. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin. *Biochemistry* 39, 6200–6206.
- Anema, S.G., 2014. The whey proteins in milk: thermal denaturation, physical interactions and effects on the functional properties of milk, in: Singh, H., Boland, M.J., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 269–318.
- Ansari, S.A., Springthorpe, V.S., Sattar, S.A., 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* 13, 448–461.
- AOAC, 1990. Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington.
- Arias, C.F., Isa, P., Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., López, T., Espinosa, R., Romero, P., López, S., 2002. Molecular biology of rotavirus cell entry. *Arch. Med. Res.* 33, 356–361.
- Arias, C.F., Lizano, M., López, S., 1987. Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68, 633–642.
- Arias, C.F., Romero, P., Alvarez, V., López, S., 1996. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *J. Virol.* 70, 5832–5839.
- Arias, C.F., Silva-Ayala, D., Isa, P., Díaz-Salinas, M.A., López, S., 2016. Rotavirus attachment, internalization, and vesicular traffic, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 103–120.

- Arnold, M., Patton, J.T., McDonald, S.M., 2009. Culturing, storage, and quantification of rotaviruses. *Curr. Protoc. Microbiol.* 15, 15C.3.
- Arslanoglu, S., Bertino, E., Tonetto, P., De Nisi, G., Ambruzzi, A.M., Biasini, A., Profeti, C., Spreghini, M.R., Moro, G.E., 2010. Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J. Matern-Fetal Neo. M.* 23, 1–20.
- Asensi, M.T., Martínez-Costa, C., Buesa, J., 2006. Anti-rotavirus antibodies in human milk: quantification and neutralizing activity. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 42, 560–567.
- Augustin, M.A., Clarke, P.T., 2008. Skim milk powders with enhanced foaming and steam-frothing properties. *Dairy Sci. Technol.* 88, 149–161.
- Ayala-Breton, C., Arias, M., Espinosa, R., Romero, P., Arias, C.F., López, S., 2009. Analysis of the kinetics of transcription and replication of the rotavirus genome by RNA interference. *J. Virol.* 83, 8819–8831.
- B**abji, S., Kang, G., 2012. Rotavirus vaccination in developing countries. *Curr. Opin. Virol.* 2, 443–448.
- Baker, H.M., Baker, E.N., 2004. Lactoferrin and iron: structural and dynamic aspects of binding and release. *BioMetals* 17, 209–216.
- Ballard, O., Morrow, A., 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr. Clin. N. Am.* 60, 49–74.
- Balthazar, C.F., Pimentel, T.C., Ferrão, L.L., Almada, C.N., Santillo, A., Albenzio, M., Mollakhalili, N., Mortazavian, A.M., Nascimento, J.S., Silva, M.C., et al., 2017. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 16, 247–262.
- Bányai, K., László, B., Duque, J., Steele, A.D., Nelson, E.A.S., Gentsch, J.R., Parashar, U.D., 2012. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine* 30, 122–130.
- Bányai, K., Pitzer, V.E., 2016. Molecular epidemiology and evolution of rotaviruses, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 279–300.
- Barbana, C., Pérez, M.D., 2011. Interaction of  $\alpha$ -lactalbumin with lipids and possible implications for its emulsifying properties - A review. *Int. Dairy J.* 21, 727–741.
- Barbana, C., Pérez, M.D., Pocovi, C., Sánchez, L., Wehbi, Z., 2008. Interaction of human alpha-lactalbumin with fatty acids: determination of binding parameters. *Biochemistry-Moscow* 73, 711–716.
- Barbé, F., Ménard, O., Le Gouar, Y., Buffière, C., Famelart, M.H., Laroche, B., Le Feunteun, S., Dupont, D., Rémond, D., 2013. The heat treatment and the gelation are strong determinants of the kinetics of milk proteins digestion and of the peripheral availability of amino acids. *Food Chem.* 136, 1203–

1212.

- Barbosa-Cánovas, G., Bermúdez-Aguirre, D., 2010a. Pasteurization of milk with pulsed electric fields, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Milk Production and Processing. Woodhead, Boca Ratón, pp. 400–419.
- Barbosa-Cánovas, G., Bermúdez-Aguirre, D., 2010b. Other novel milk preservation technologies: ultrasound, irradiation, microwave, radio frequency, ohmic heating, ultraviolet light and bacteriocins, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Milk Production and Processing. Woodhead, Boca Ratón, pp. 420–450.
- Bartrop, J.A., Owen, T.C., Cory, A.H., Cory, J.G., 1991. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1, 611–614.
- Baumer, J.H., 2004. Guidelines for the establishment and operation of human milk banks in the UK. *Arch. Dis. Child.* 89, 27–28.
- Benfeldt, C., Larsen, L.B., Rasmussen, J.T., Andreasen, P.A., Petersen, T.E., 1995. Isolation and characterization of plasminogen and plasmin from bovine milk. *Int. Dairy J.* 5, 577–592.
- Benkerroum, N., 2008. Antimicrobial activity of lysozyme with special relevance to milk. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4856–4867.
- Bensaccount, 2009. Web: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Western\\_Blot\\_binding.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Western_Blot_binding.png).  
Accedido por última vez: 12/05/2018.
- Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T., 1996a. Structural characterization of bovine CD36 from the milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1309, 63–68.
- Berglund, L., Rasmussen, J.T., Andersen, M.D., Rasmussen, M.S., Petersen, T.E., 1996b. Purification of the bovine xanthine oxidoreductase from milk fat globule membranes and cloning of complementary deoxyribonucleic acid. *J. Dairy Sci.* 79, 198–204.
- Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., Valenti, P., 2011. Antiviral properties of lactoferrin - A natural immunity molecule. *Molecules* 16, 6992–7018.
- Bethell, D.R., Huang, J., 2004. Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea. *BioMetals* 17, 337–342.
- Beyaztaş, S., Arslan, O., 2015. Purification of xanthine oxidase from bovine milk by affinity chromatography with a novel gel. *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 30, 442–447.
- Bhatia, J., Greer, F., 2008. Use of soy protein-based formulas in infant feeding. *Pediatrics* 121, 1062–1068.
- Bickel, P.E., Tansey, J.T., Welte, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 419–440.

- Binder, H.J., Brown, I., Ramakrishna, B.S., Young, G.P., 2014. Oral rehydration therapy in the second decade of the twenty-first century. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 16, 376–384.
- Bishop, R., 2009. Discovery of rotavirus: implications for child health. *J. Gastroen. Hepatol.* 24, 81–85.
- Björck, L., Claesson, O., 1979. Xanthine oxidase as a source of hydrogen peroxide for the lactoperoxidase system in milk. *J. Dairy Sci.* 62, 1211–1215.
- Blecker, C., Paquot, M., Lamberti, I., Sensidoni, A., Lognay, G., Deroanne, C., 1997. Improved emulsifying and foaming of whey proteins after enzymic fat hydrolysis. *J. Food Sci.* 62, 48–52.
- Blewett, H.J.H., Cicalo, M.C., Holland, C.D., Field, C.J., 2008. The immunological components of human milk. *Adv. Food Nutr. Res.* 54, 45–80.
- BOE, 1967. Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. BOE nº 248, de 17 de octubre de 1967, pp. 14180-14187.
- Bojsen, A., Buesa, J., Montava, R., Kvistgaard, A.S., Kongsbak, M.B., Petersen, T.E., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., 2007. Inhibitory activities of bovine macromolecular whey proteins on rotavirus infections in vitro and in vivo. *J. Dairy Sci.* 90, 66–74.
- Bokkhim, H., Bansal, N., Grndahl, L., Bhandari, B., 2013. Physico-chemical properties of different forms of bovine lactoferrin. *Food Chem.* 141, 3007–3013.
- Borad, S.G., Kumar, A., Singh, A.K., 2017. Effect of processing on nutritive values of milk protein. *Crit. Rev. Food Sci.* 57, 3690–3702.
- Bourlieu, C., Michalski, M.C., 2015. Structure-function relationship of the milk fat globule. *Curr. Opin. Clin. Nutr.* 18, 118–127.
- Boutrou, R., Gaudichon, C., Dupont, D., Jardin, J., Airinei, G., Benamouzig, R., Tome, D., 2013. Sequential release of milk protein-derived bioactive peptides in the jejunum in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 97, 1314–1323.
- Božanić, R., Barukčić, I., Lisak, K., 2014. Possibilities of whey utilisation. *Austin J. Nutr. Food Sci.* 2, 1–7.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Pieścik, M., Puntis, J., Shamir, R., Szajewska, H., et al., 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 52, 238–250.
- Brandelli, A., Daroit, D.J., Corrêa, A.P.F., 2015. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res. Int.* 73, 149–161.
- Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C., 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated

- protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249–2263.
- Britten, M., Lamothe, S., Robitaille, G., 2008. Effect of cream treatment on phospholipids and protein recovery in butter-making process. *Int. J. Food Sci. Tech.* 43, 651–657.
- Brown, K.H., Peerson, J.M., Fontaine, O., 1994. Use of nonhuman milks in the dietary management of young children with acute diarrhea: a meta-analysis of clinical trials. *Pediatrics* 93, 17–27.
- Bruni, N., Capucchio, M.T., Biasibetti, E., Pessione, E., Cirrincione, S., Giraudo, L., Corona, A., Dosio, F., 2016. Antimicrobial activity of lactoferrin-related peptides and applications in human and veterinary medicine. *Molecules* 21, 752–777.
- Buccioni, A., Minieri, S., Rapaccini, S., 2013. Effect of total proteose-peptone content on the variability of bovine milk foaming property. *Ital. J. Anim. Sci.* 12, 72–76.
- Burling, H., Graverholt, G., 2008. Milk - A new source for bioactive phospholipids for use in food formulations. *Lipid Tech.* 20, 229–231.
- Campagna, S., Cosette, P., Molle, G., Gaillard, J.L., 2001. Evidence for membrane affinity of the C-terminal domain of bovine milk PP3 component. *Biochim. Biophys. Acta* 1513, 217–222.
- Campagna, S., Mathot, A.G., Fleury, Y., Girardet, J.M., Gaillard, J.L., 2004. Antibacterial activity of lactophorin, a synthetic 23-residues peptide derived from the sequence of bovine milk component 3 of proteose peptone. *J. Dairy Sci.* 87, 1621–1626.
- Campoy, C., Escolano-Margarit, V., Anjos, T., Szajewska, H., Uauy, R., 2012. Omega 3 fatty acids on child growth, visual acuity and neurodevelopment. *Brit. J. Nutr.* 107, 85–106.
- Cappozzo, J.C., Koutchma, T., Barnes, G., 2015. Chemical characterization of milk after treatment with thermal (HTST and UHT) and nonthermal (turbulent flow ultraviolet) processing technologies. *J. Dairy Sci.* 98, 5068–5079.
- CDCP, 2018. Centers for Disease Control and Prevention. Rotavirus in the U.S. Web: <https://www.cdc.gov/rotavirus/surveillance.html>. Accedido por última vez: 25/02/2018.
- Cebo, C., Caillat, H., Bouvier, F., Martin, P., 2010. Major proteins of the goat milk fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 93, 868–876.
- Cebo, C., Martin, P., 2012. Inter-species comparison of milk fat globule membrane proteins highlights the molecular diversity of lactadherin. *Int. Dairy J.* 24, 70–77.
- Cerf, O., Condrón, R., 2006. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol. Infect.* 134, 946–951.
- Cervato, G., Cazzola, R., Cestaro, B., 1999. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50, 291–296.
- Champoux, J.J., Falkow, S., Neidhardt, F.C., 2010. Virus de la diarrea, in: Kenneth, J.R., Ray, C.G. (Eds.), *Sherris Medical Microbiology*. Mc. Graw Hill, Mexico D.F., pp. 209–215.
- Chantry, C.J., Wiedeman, J., Buehring, G., Peerson, J.M., Hayfron, K., K'Aluoch, O., Lonnerdal, B.,

- Israel-Ballard, K., Coutsoudis, A., Abrams, B., 2011. Effect of flash-heat treatment on antimicrobial activity of breastmilk. *Breastfeed. Med.* 6, 111–116.
- Chawla, R., Patil, G.R., Singh, A.K., 2011. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. *J. Food Sci. Technol.* 48, 260–268.
- Chen, C.C., Chang, H.M., 1998. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. *J. Agr. Food Chem.* 46, 3570–3576.
- Chen, Q., Park, H.C., Goligorsky, M.S., Chander, P., Fischer, S.M., Gross, S.S., 2012. Untargeted plasma metabolite profiling reveals the broad systemic consequences of xanthine oxidoreductase inactivation in mice. *PLoS One* 7, e37149.
- Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Buesa, J., Ramón, D., Genovés, S., Fábrega, J., Urgell, M.R., Moreno Muñoz, J.A., 2016. Identification of a peptide produced by *Bifidobacterium longum* CECT 7210 with antirotaviral activity. *Front. Microbiol.* 7, 1–11.
- Chevalier, F., Hirtz, C., Sommerer, N., Kelly, A.L., 2009. Use of reducing/nonreducing two-dimensional electrophoresis for the study of disulfide-mediated interactions between proteins in raw and heated bovine milk. *J. Agr. Food Chem.* 57, 5948–5955.
- Chin-Dusting, J., Shennan, J., Jones, E., Williams, C., Kingwell, B., Dart, A., 2006. Effect of dietary supplementation with  $\beta$ -casein A1 or A2 on markers of disease development in individuals at high risk of cardiovascular disease. *Brit. J. Nutr.* 95, 136–144.
- Cilliers, F.P., Gouws, P.A., Koutchma, T., Engelbrecht, Y., Adriaanse, C., Swart, P., 2014. A microbiological, biochemical and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innov. Food Sci. Emerg.* 23, 94–106.
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., De Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., De Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., et al., 2013. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. *Food Control* 31, 251–262.
- Claeys, W.L., Verraes, C., Cardoen, S., De Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K., Herman, L., 2014. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42, 188–201.
- Clausen, M.R., Skibsted, L.H., Stagsted, J., 2009. Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *J. Agr. Food Chem.* 57, 2912–2919.
- Clydesdale, F.M., Ho, C.T., Lee, C.Y., Mondy, N.I., Shewfelt, R.L., 1991. The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids, and minerals. *Crit. Rev. Food Sci.* 30, 599–638.
- Coddeville, B., Girardet, J.M., Plancke, Y., Campagna, S., Linden, G., Spik, G., 1998. Structure of the O-glycopeptides isolated from bovine milk component PP3. *Glycoconjugate J.* 15, 371–378.
- Coles, J.M., Chang, D.P., Zauscher, S., 2010. Molecular mechanisms of aqueous boundary lubrication by



- mucinous glycoproteins. *Curr. Opin. Colloid In.* 15, 406–416.
- Conesa, C., Calvo, M., Sánchez, L., 2010a. Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnol. Adv.* 28, 831–838.
- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Pérez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L., 2010b. Effect of heat treatment on the antibacterial activity of bovine lactoferrin against three foodborne pathogens. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 209–215.
- Conesa, C., Rota, C., Castillo, E., Pérez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L., 2009. Antibacterial activity of recombinant human lactoferrin from rice: effect of heat treatment. *Biosci. Biotech. Bioch.* 73, 1301–1307.
- Conesa, C., Sánchez, L., Rota, C., Pérez, M.D., Calvo, M., Farnaud, S., Evans, R.W., 2008. Isolation of lactoferrin from milk of different species: calorimetric and antimicrobial studies. *Comp. Biochem. Physiol.* 150, 131–139.
- Considine, T., Patel, H.A., Anema, S.G., Singh, H., Creamer, L.K., 2007. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments - a review. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8, 1–23.
- Conway, V., Couture, P., Gauthier, S., Pouliot, Y., Lamarche, B., 2014. Effect of buttermilk consumption on blood pressure in moderately hypercholesterolemic men and women. *Nutrition* 30, 116–119.
- Conway, V., Gauthier, S.F., Pouliot, Y., 2013. Antioxidant activities of buttermilk proteins, whey proteins, and their enzymatic hydrolysates. *J. Agr. Food Chem.* 61, 364–372.
- Coppola, L.E., Molitor, M.S., Rankin, S.A., Lucey, J.A., 2014. Comparison of milk-derived whey protein concentrates containing various levels of casein. *Int. J. Dairy Technol.* 67, 467–473.
- Cornish, J., Callon, K.E., Naot, D., Palmano, K.P., Banovic, T., Bava, U., Watson, M., Lin, J.M., Tong, P.C., Chen, Q., et al., 2004. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*. *Endocrinology* 145, 4366–4374.
- Cortés-Sánchez, A.D.J., Valle-González, E.R., Salazar-Flores, R.D., Ashutosh, S., 2015. Biotechnological alternatives for the utilization of dairy industry waste products. *Adv. Biosci. Biotech.* 6, 223–235.
- Costard, S., Espejo, L., Groenendaal, H., Zagmutt, F.J., 2017. Outbreak-related disease burden associated with consumption of unpasteurized cow's milk and cheese, United States, 2009–2014. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 957–964.
- Coulson, B.S., 2015. Expanding diversity of glycan receptor usage by rotaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 15, 90–96.
- Coulson, B.S., Londrigan, S.L., Lee, D.J., 1997. Rotavirus contains integrin ligand sequences and a disintegrin-like domain that are implicated in virus entry into cells. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 5389–5394.
- Cui, L., Huang, M., Zhao, D., Deng, Y., Qian, B., Zhang, L., Luo, Y., Wu, Q., Wu, M., 2011. Amino acid composition, antioxidant property and angiotensin I - converting enzyme (ACE) inhibitory activity of micropeptides in skim milk powder. *Philipp. Agric. Sci.* 94, 258–263.

- Dalgleish, D.G., 2011. On the structural models of bovine casein micelles - Review and possible improvements. *Soft Matter* 7, 2265–2272.
- Dalgleish, D.G., 1990. Denaturation and aggregation of serum proteins and caseins in heated milk. *J. Agr. Food Chem.* 38, 1995–1999.
- Dalmau, J., Ferrer, B., Vitoria, I., 2015. Lactancia artificial. *Pediatría Integral* 19, 251–259.
- Daniels, M.J., Wang, Y., Lee, M., Venkitaraman, A.R., 2004. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* 306, 879–881.
- Das, J.K., Salam, R.A., Bhutta, Z.A., 2014. Global burden of childhood diarrhea and interventions. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 27, 451–458.
- De Buyser, M.L., Dufour, B., Maire, M., Lafarge, V., 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 1–17.
- De Kruif, C.G., Holt, C., 2003. Casein micelle structure, functions and interactions, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, Boston, pp. 233–276.
- de Wit, J.N., 1998. Nutritional and functional characteristics of whey proteins in food products. *J. Dairy Sci.* 81, 597–608.
- DeCamp, L.R., Byerley, J.S., Doshi, N., Steiner, M.J., 2008. Use of antiemetic agents in acute gastroenteritis. *Arch. Pediat. Adol. Med.* 162, 858–863.
- Decisión 2002/657/CE. Decisión de la Comisión de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de la Unión Europea* n° L221 de 17/08/2002.
- Deeth, H., 2017. Optimum thermal processing for extended shelf-life (ESL) milk. *Foods* 6, 102–123.
- Deeth, H., 2010. Improving UHT processing and UHT milk products, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Woodhead, Boca Ratón, pp. 302–329.
- Deeth, H.C., Lewis, M.J., 2017a. Heat treatments of milk - thermisation and pasteurisation, in: Deeth, H.C., Lewis, M.J. (Eds.), *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 15–39.
- Deeth, H.C., Lewis, M.J., 2017b. Non-thermal technologies, in: Deeth, H.C., Lewis, M.J. (Eds.), *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 427–460.
- Deeth, H.C., Lewis, M.J., 2017c. Changes during heat treatment of milk, in: Deeth, H.C., Lewis, M.J. (Eds.), *High Temperature Processing of Milk and Milk Products*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 177–260.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M., 2012. Effect of lactoferrin and its derivatives against gram-positive bacteria *in vitro* and, combined with high pressure, in chicken breast fillets. *Meat Sci.* 90, 71–76.
- Dennehy, P.H., 2008. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 198–208.

- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T.T., Messens, K., Van Camp, J., 2008. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int. Dairy J.* 18, 436–457.
- Díaz-Salinas, M.A., Romero, P., Espinosa, R., Hoshino, Y., López, S., Arias, C.F., 2013. The spike protein VP4 defines the endocytic pathway used by Rotavirus to enter MA104 cells. *J. Virol.* 87, 1658–1663.
- Donato, L., Guyomarc'h, F., 2009. Formation and properties of the whey protein/k-casein complexes in heated skim milk - a review. *Dairy Sci. Technol.* 89, 3–29.
- Donovan, S.M., Odle, J., 1994. Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu. Rev. Nutr.* 14, 147–67.
- Dóro, R., László, B., Martella, V., Leshem, E., Gentsch, J., Parashar, U., Bányai, K., 2014. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 28, 446–461.
- DOUE, 2016. Reglamento (UE) 2016/127 de la Comisión de 25 de septiembre de 2015 que complementa el Reglamento (UE) nº 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los requisitos específicos de composición e información aplicables a los preparados para lactantes y preparados de continuación, así como a los requisitos de información sobre los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L25/1 de 02/02/2016.
- DOUE, 2012. Decisión de ejecución de la Comisión 2012/725/UE 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) nº 258/97 del Parlamento Europeo. *Diario Oficial de la Unión Europea* nº L327/46 de 27/11/2012.
- DOUE, 2004. Reglamento (CE) 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* nº L139 de 30/04/2004.
- Dupont, D., Mandalari, G., Molle, D., Jardin, J., Léonil, J., Faulks, R.M., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C., Mackie, A.R., 2010. Comparative resistance of food proteins to adult and infant *in vitro* digestion models. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 767–780.
- Dupont, D., Tome, D., 2014. Milk proteins: digestion and absorption in the gastrointestinal tract, in: Singh, H., Boland, M.J., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 557–569.
- Edwards, P.J.B., Jameson, G.B., 2014. Structure and stability of whey proteins, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 201–242.
- EFSA, 2016a. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA J.* 14, 4634.
- EFSA, 2016b. Safety of UV-treated milk as a novel food pursuant to Regulation (EC) nº 258/97. *EFSA J.*

- 14, 4370.
- EFSA, 2015. Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA J.* 13, 3940
- EFSA, 2012. Scientific opinion on dietary reference values for protein. *EFSA J.* 10, 2557.
- Egashira, M., Takayanagi, T., Moriuchi, M., Moriuchi, H., 2007. Does daily intake of bovine lactoferrin-containing products ameliorate rotaviral gastroenteritis? *Acta Paediatr.* 96, 1238–1244.
- Eichwald, C., Arnoldi, F., Laimbacher, A.S., Schraner, E.M., Fraefel, C., Wild, P., Burrone, O.R., Ackermann, M., 2012. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One* 7, e47947.
- El-Loly, M., 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane - a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 61, 7–32.
- El-Loly, M., 2007. Bovine milk immunoglobulins in relation to human health. *Int. J. Dairy Sci.* 2, 183–195.
- El-Samragy, Y.A., Hansen, C.L., McMahon, D.J., 1993. Production of ultrafiltered skim milk retentate powder. 2. Functional properties. *J. Dairy Sci.* 76, 2886–2890.
- EMBA, 2018. European Milk Bank Association. Web: <https://europeanmilkbanking.com/>. Accedido por última vez: 03/04/2018.
- Enroth, C., Eger, B.T., Okamoto, K., Nishino, T., Pai, E.F., 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: structure-based mechanism of conversion. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 10723–10728.
- Ensslin, M.A., Shur, B.D., 2007. The EGF repeat and discoidin domain protein, SED1/MFG-E8, is required for mammary gland branching morphogenesis. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 2715–2720.
- Espejo, R., Martínez, E., López, S., Muñoz, O., 1980. Different polypeptide composition of two human Rotavirus types. *Infect. Immun.* 28, 230–237.
- Estes, M.K., Cohen, J., 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 53, 410–449.
- Estes, M.K., Greenberg, H.B., 2013. Rotaviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1347–1401.
- Etienne, L., Girardet, J.M., Linden, G., 1994. Growth promotion of *Bifidobacterium animalis* by bovine milk proteose-peptone. *Lait* 74, 313–323.
- Eurostat, 2017. Milk and milk product statistics. Web: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk\\_and\\_milk\\_product\\_statistics](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Milk_and_milk_product_statistics). Accedido por última vez: 12/05/2018.
- Euston, S.R., Hirst, R.L., Hill, J.P., 1999. The emulsifying properties of  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants A, B and C. *Colloid Surface B* 12, 193–202.
- Evans, J., Zulewska, J., Newbold, M., Drake, M.A., Barbano, D.M., 2010. Comparison of composition and sensory properties of 80% whey protein and milk serum protein concentrates. *J. Dairy Sci.* 93,

1824–1843.

- Evrendilek, G.A., 2014. Non-thermal processing of milk and milk products for microbial safety, in: Ozer, B., Evrendilek, G.A. (Eds.), *Dairy Microbiology and Biochemistry*. CRC Press, Ankara, pp. 322–355.
- FAOSTAT, 2018. FAO Statistical Database. Web: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. Accedido por última vez: 17/04/2018.
- Farkye, N.Y., Shah, N., 2015. Milk Proteins, in: Ustunol, Z. (Ed.), *Applied Food Protein Chemistry*. John Wiley & Sons, San Luis Obispo, pp. 427–458.
- Farrell, H.M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G.T., Brown, E.M., Butler, J.E., Creamer, L.K., Hicks, C.L., Hollar, C.M., Ng-Kwai-Hang, K.F., Swaisgood, H.E., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk - Sixth revision. *J. Dairy Sci.* 87, 1641–1674.
- Figuroa-Lozano, S., Valk-Weeber, R.L., van Leeuwen, S.S., Dijkhuizen, L., de Vos, P., 2018. Dietary N-glycans from bovine lactoferrin and TLR modulation. *Mol. Nutr. Food Res.* 62, 1–30.
- Fleming, F.E., Bohm, R., Dang, V.T., Holloway, G., Haselhorst, T., Madge, P.D., Deveryshetty, J., Yu, X., Blanchard, H., von Itzstein, M., et al., 2014. Relative roles of GM1 ganglioside, N-acetylneuraminic acids, and  $\alpha 2\beta 1$  integrin in mediating rotavirus infection. *J. Virol.* 88, 4558–4571.
- Fong, B.Y., Norris, C.S., MacGibbon, A.K.H., 2007. Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *Int. Dairy J.* 17, 275–288.
- Franco, I., Pérez, M.D., Castillo, E., Calvo, M., Sánchez, L., 2013. Effect of high pressure on the structure and antibacterial activity of bovine lactoferrin treated in different media. *J. Dairy Res.* 80, 283–290.
- Franco, I., Pérez, M.D., Conesa, C., Calvo, M., Sánchez, L., 2018. Effect of technological treatments on bovine lactoferrin: an overview. *Food Res. Int.* 106, 173–182.
- Freedman, S.B., Adler, M., Seshadri, R., Powell, E.C., 2006. Oral ondansetron for gastroenteritis in a pediatric emergency department. *New Engl. J. Med.* 354, 1698–1705.
- Freshney, R.I., 2010. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*, 6th ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Fujiyama, K., Sakai, Y., Misaki, R., Yanagihara, I., Honda, T., Anzai, H., Seki, T., 2004. N-linked glycan structures of human lactoferrin produced by transgenic rice. *Biosci. Biotech. Bioch.* 68, 2565–2570.
- Fuller, K.L., Kuhlenschmidt, T.B., Kuhlenschmidt, M.S., Jiménez-Flores, R., Donovan, S.M., 2013. Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 96, 3488–3497.
- Furlund, C.B., Ulleberg, E.K., Devold, T.G., Flengsrud, R., Jacobsen, M., Sekse, C., Holm, H., Vegarud, G.E., 2013. Identification of lactoferrin peptides generated by digestion with human gastrointestinal enzymes. *J. Dairy Sci.* 96, 75–88.
- Furness, J.B., 2006. *The enteric nervous system*. 1st ed. Blackwell Publishing, Oxford.

- Gallier, S., Laubscher, A., Jimenez-Flores, R., 2014. The milk fat globule membrane: structure, methodology for its study, and functionality, in: Boland, M., Golding, M., Singh, H. (Eds.), *Food Structures, Digestion and Health*. Elsevier, Palmerston North, pp. 107–141.
- Gallier, S., Ye, A., Singh, H., 2012. Structural changes of bovine milk fat globules during *in vitro* digestion. *J. Dairy Sci.* 95, 3579–3592.
- Gao, J., Serrero, G., 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J. Biol. Chem.* 274, 16825–16830.
- García-Montoya, I.A., Cendón, T.S., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2012. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 226–236.
- Garcia, C., Innis, S., 2013. Structure of the human milk fat globule. *Lipid Technol.* 25, 223–226.
- Gaspar, H.B., Hammarström, L., Mahlaoui, N., Borte, M., Borte, S., 2014. The case for mandatory newborn screening for severe combined immunodeficiency (SCID). *J. Clin. Immunol.* 34, 393–397.
- Gassi, J.Y., Famelart, M.H., Lopez, C., 2008. Heat treatment of cream affects the physicochemical properties of sweet buttermilk. *Dairy Sci. Technol.* 88, 369–385.
- Gassi, J.Y., Blot, M., Beaucher, E., Robert, B., Leconte, N., Camier, B., Rousseau, F., Bourlieu, C., Jardin, J., Briard-Bion, V., et al., 2016. Preparation and characterisation of a milk polar lipids enriched ingredient from fresh industrial liquid butter serum: combination of physico-chemical modifications and technological treatments. *Int. Dairy J.* 52, 26–34.
- Gauthier, S.F., Paquin, P., Pouliot, Y., Turgeon, S., 1993. Surface activity and related functional properties of peptides obtained from whey proteins. *J. Dairy Sci.* 76, 321–328.
- Gésan-Guiziou, G., 2010. Removal of bacteria, spores and somatic cells from milk by centrifugation and microfiltration techniques, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Woodhead, Boca Ratón, pp. 349–372.
- Giaccone, D., Revello-Chion, A., Galassi, L., Bianchi, P., Battelli, G., Coppa, M., Tabacco, E., Borreani, G., 2016. Effect of milk thermisation and farming system on cheese sensory profile and fatty acid composition. *Int. Dairy J.* 59, 10–19.
- Gianino, P., Mastretta, E., Longo, P., Laccisaglia, A., Sartore, M., Russo, R., Mazzaccara, A., 2002. Incidence of nosocomial rotavirus infections, symptomatic and asymptomatic, in breast-fed and non-breast-fed infants. *J. Hosp. Infect.* 50, 13–17.
- Giansanti, F., Panella, G., Leboffe, L., Antonini, G., 2016. Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals* 9, 61–76.
- Girardet, J.M., Linden, G., Loye, S., Courthaudon, J.L., Lorient, D., 1993. Study of mechanism of lipolysis inhibition by bovine milk proteose peptone component 3. *J. Dairy Sci.* 76, 2156–2163.
- Girardet, J.M., Coddeville, B., Plancke, Y., Campagna, S., Linden, G., Spik, G., 1995. Structure of glycopeptides isolated from bovine milk component PP3. *Eur. J. Biochem.* 234, 939–946.

- Giribaldi, M., Coscia, A., Peila, C., Antoniazzi, S., Lamberti, C., Ortoffi, M., Moro, G.E., Bertino, E., Civera, T., Cavallarin, L., 2016. Pasteurization of human milk by a benchtop High-Temperature Short-Time device. *Innov. Food Sci. Emerg.* 36, 228–233.
- Glass, R.I., 2006. New hope for defeating rotavirus. *Sci. Am.* 294, 47–55.
- Glass, R.I., Parashar, U., Patel, M., Gentsch, J., Jiang, B., 2014. Rotavirus vaccines: successes and challenges. *J. Infection* 68, 9–18.
- Godber, B.L.J., Schwarz, G., Mendel, R.R., Lowe, D.J., Bray, R.C., Eisenthal, R., Harrison, R., 2005. Molecular characterization of human xanthine oxidoreductase: the enzyme is grossly deficient in molybdenum and substantially deficient in iron-sulphur centres. *Biochem. J.* 388, 501–508.
- González-Chávez, S.A., Arévalo-Gallegos, S., Rascón-Cruz, Q., 2009. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Ag.* 33, 301–309.
- Gopal, P.K., Gill, H.S., 2000. Oligosaccharides and glycoconjugates in bovine milk and colostrum. *Brit. J. Nutr.* 84, 69–74.
- Goyal, A., Sharma, V., Upadhyay, N., Sihag, M., Kaushik, R., 2013. High pressure processing and its impact on milk proteins: a review. *J. Dairy Sci. Technol.* 2, 2319–3409.
- Graham, K.L., Fleming, F.E., Halasz, P., Hewish, M.J., Nagesha, H.S., Holmes, I.H., Takada, Y., Coulson, B.S., 2005. Rotaviruses interact with  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha 4\beta 1$  integrins by binding the same integrin domains as natural ligands. *J. Gen. Virol.* 86, 3397–3408.
- Graham, K.L., Halasz, P., Tan, Y., Hewish, M.J., Takada, Y., Mackow, E.R., Robinson, M.K., Coulson, B.S., 2003. Integrin-using rotaviruses bind  $\alpha 2\beta 1$  integrin  $\alpha 2$  I domain via VP4 DGE sequence and recognize  $\alpha X\beta 2$  and  $\alpha V\beta 3$  by using VP7 during cell entry. *J. Virol.* 77, 9969–9978.
- Graham, K.L., Takada, Y., Coulson, B.S., 2006. Rotavirus spike protein VP5\* binds  $\alpha 2\beta 1$  integrin on the cell surface and competes with virus for cell binding and infectivity. *J. Gen. Virol.* 87, 1275–1283.
- Greenberg, H.B., Estes, M.K., 2009. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology* 136, 1939–1951.
- Greenberg, H.B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, R.G., Kalica, A.R., Flores, J., Hoshino, Y., 1983. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47, 267–275.
- Greenwalt, D.E., Lipsky, R.H., Ockenhouse, C.F., Ikeda, H., Tandon, N.N., Jamieson, G.A., 1992. Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80, 1105–1115.
- Guerrero, C.A., Méndez, E., Zárate, S., Isa, P., López, S., Arias, C.F., 2000a. Integrin  $\alpha V\beta 3$  mediates rotavirus cell entry. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 14644–14649.
- Guerrero, C.A., Zárate, S., Corkidi, G., López, S., Arias, C.F., 2000b. Biochemical characterization of rotavirus receptors in MA104 cells. *J. Virol.* 74, 9362–9371.

- Guo, M., 2014. Chemical composition of human milk, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 19–32.
- Guo, M., Ahmad, S., 2014a. Ingredients selection for infant formula, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 172–210.
- Guo, M., Ahmad, S., 2014b. Human milk banking, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 112–138.
- Guo, M., Ahmad, S., 2014c. Formulation guidelines for infant formula, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 141–171.
- Guri, A., Griffiths, M., Khursigara, C.M., Corredig, M., 2012. The effect of milk fat globules on adherence and internalization of *Salmonella enteritidis* to HT-29 cells. *J. Dairy Sci.* 95, 6937–6945.
- Gutiérrez, M., Isa, P., Sánchez-San Martín, C., Pérez-Vargas, J., Espinosa, R., Arias, C.F., López, S., 2010. Different rotavirus strains enter MA104 cells through different endocytic pathways: the role of clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* 84, 9161–9169.
- Ha, G.E., Chang, O.K., Han, G.S., Ham, J.S., Park, B.Y., Jeong, S.G., 2015. Comparison of antioxidant activities of hydrolysates of domestic and imported skim milk powders treated with papain. *Korean J. Food Sci. An.* 35, 360–369.
- Haenlein, G.F.W., Wendorff, W.L., 2006. Sheep milk, in: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell, Newark, pp. 137–194.
- Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., Taylor, J.A., Loitto, V.M., Magnusson, K.E., Ahlman, H., et al., 2011. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 7, e1002115.
- Hagbom, M., Svensson, L., 2016. Rotavirus disease mechanisms, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 189–218.
- Hall, W.L., Millward, D.J., Long, S.J., Morgan, L.M., 2003. Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *Brit. J. Nutr.* 89, 239–248.
- Hamad, M.N., Ismail, M.M., El-Menawy, R.K.A., 2016. Chemical, rheological, microbial and microstructural characteristics of jameed made from sheep, goat and cow buttermilk or skim milk. *Am. J. Food Sci. Nutr.* 3, 46–55.
- Hamosh, M., Peterson, J.A., Henderson, T.R., Scallan, C.D., Kiwan, R., Ceriani, R.L., Armand, M., Mehta, N., Hamosh, P., 1999. Protective function of human milk: the milk fat globule. *Semin. Perinatol.* 23, 242–249.
- Hancock, J.T., Salisbury, V., Ovejero-boglione, M.C., Cherry, R., Hoare, C., Eisenthal, R., Harrison, R., 2002. Antimicrobial properties of milk: dependence on presence of xanthine oxidase and nitrite.



- Antimicrob. Agents Ch. 46, 3308–3310.
- Harouna, S., Carramiñana, J.J., Navarro, F., Pérez, M.D., Calvo, M., Sánchez, L., 2015. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin on the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*: effect of media and heat treatment. *Food Control* 47, 520–525.
- Harrison, R., 2006. Milk xanthine oxidase: properties and physiological roles. *Int. Dairy J.* 16, 546–554.
- Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., 2016. Structure and function of the rotavirus particle, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 89–102.
- Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.R., Keenan, T.W., 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294, 309–321.
- Heid, H.W., Schnölzer, M., Keenan, T.W., 1996. Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane. *Biochem. J.* 320, 1025–1030.
- Heine, W.E., Klein, P.D., Reeds, P.J., 1991. The importance of  $\alpha$ -lactalbumin in infant nutrition. *J. Nutr.* 121, 277–283.
- Hendricks, G.M., Guo, M., 2014a. Bioactive components in human milk, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 33–54.
- Hendricks, G.M., Guo, M., 2014b. Component interactions and processing damage during the manufacture of infant formula, in: Guo, M. (Ed.), *Human Milk Biochemistry and Infant Formula Manufacturing Technology*. Elsevier, Kidlington, pp. 233–245.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J.Á., 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Res.* 101, 196–204.
- Hines, M.E., Foegeding, E.A., 1993. Interactions of  $\alpha$ -lactalbumin and bovine serum albumin with  $\beta$ -lactoglobulin in thermally induced gelation. *J. Agr. Food Chem.* 41, 341–346.
- Hintze, K.J., Snow, D., Burtenshaw, I., Ward, R.E., 2011. Nutraceutical properties of milk fat globular membrane, in: Elnashar, M. (Ed.), *Biotechnology of Biopolymers*. IntechOpen, pp. 321–343.
- Hite, B.H., 1899. The effect of pressure in the preservation of milk. *W. Va. Agr. Exp. St. Bull.* 58, 15–35.
- Holland, J.W., Boland, M.J., 2014. Post-translational modifications of caseins, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 141–168.
- Holsinger, V.H., Rajkowski, K.T., Stabel, J.R., 1997. Milk pasteurisation and safety: a brief history and update. *Rev. Sci. Tech.* 16, 441–451.
- Holz Müller, W., Müller, M., Himbert, D., Kulozik, U., 2016. Impact of cream washing on fat globules and milk fat globule membrane proteins. *Int. Dairy J.* 59, 52–61.
- Horne, D.S., 2014. Casein micelle structure and stability, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From expression to food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 169–200.

- Hortin, G.L., 1990. Isolation of glycopeptides containing O-linked oligosaccharides by lectin affinity chromatography on jacalin-agarose. *Anal. Biochem.* 191, 262–267.
- Horwitz, W., 2002. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods. Draft 2002-11-07, 1–33.
- Hoshino, Y., Zapikian, A.Z., 2000. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J. Health Popul. Nutr.* 18, 5–14.
- Host, A., Halcken, S., 2004. Hypoallergenic formulas - When, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication. *Allergy* 59, 45–52.
- Hotchkiss, J.H., Chen, J.H., Lawless, H.T., 1999. Combined effects of carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* 82, 690–695.
- Hotchkiss, J.H., Werner, B.G., Lee, E.Y.C., 2006. Addition of carbon dioxide to dairy products to improve quality: a comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 5, 158–168.
- Houlihan, A.V., Goddard, P.A., Nottingham, S.M., Kitchen, B.J., Masters, C.J., 1992. Interactions between the bovine milk fat globule membrane and skim milk components on heating whole milk. *J. Dairy Res.* 59, 187–195.
- Huang, B.X., Kim, H.Y., Dass, C., 2004. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 15, 1237–1247.
- Huott, M.L., Josephson, R. V., Hens, J.R., Rogers, G.W., Patton, S., 1995. Polymorphic forms of the epithelial mucin, PAS-I (MUC1), in milk of Holstein cows (*Bos taurus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 111, 559–565.
- Huppertz, T., 2010. High pressure processing of milk, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk. Milk Production and Processing*. Woodhead, Boca Ratón, pp. 373–399.
- Huppertz, T., Fox, P.F., de Kruif, K.G., Kelly, A.L., 2006. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: a review. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 593–598.
- Hurley, W.L., Theil, P.K., 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 3, 442–474.
- Hvarregaard, J., Andersen, M.H., Berglund, L., Rasmussen, J.T., Petersen, T.E., 1996. Characterization of glycoprotein PAS-6/7 from membranes of bovine milk fat globules. *Eur. J. Biochem.* 240, 628–636.
- Ibrahim, H.R., Aoki, T., Pellegrini, A., 2002. Strategies for new antimicrobial proteins and peptides: lysozyme and aprotinin as model molecules. *Curr. Pharm. Design* 8, 671–693.
- Ijaz, M.K., Uduman, S., Redmond, M.J., Dent, D., 1998. Inhibition of rotavirus infection *in vitro* and *in vivo* by a synthetic peptide from VP4. *Vaccine* 16, 916–920.
- Inagaki, M., Muranishi, H., Yamada, K., Kakehi, K., Uchida, K., Suzuki, T., Yabe, T., Nakagomi, T., Nakagomi, O., Kanamaru, Y., 2014. Bovine  $\kappa$ -casein inhibits human rotavirus (HRV) infection via direct binding of glycans to HRV. *J. Dairy Sci.* 97, 2653–2661.

- Inagaki, M., Nagai, S., Yabe, T., Nagaoka, S., Minamoto, N., Takahashi, T., Matsuda, T., Nakagomi, O., Nakagomi, T., Ebina, T., et al., 2010a. The bovine lactophorin C-terminal fragment and PAS6/7 were both potent in the inhibition of human rotavirus replication in cultured epithelial cells and the prevention of experimental gastroenteritis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74, 1386–1390.
- Inagaki, M., Yamamoto, M., Uchida, K., Yamaguchi, H., Kawasaki, M., Yamashita, K., Yabe, T., Kanamaru, Y., 2010b. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the efficacy of bovine colostrum against human rotavirus infection. *Biosci. Biotech. Bioch.* 74, 680–682.
- Indyk, H.E., Filonzi, E.L., 2005. Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis. *Int. Dairy J.* 15, 429–438.
- Inglingsstad, R.A., Devold, T.G., Eriksen, E.K., Holm, H., Jacobsen, M., Liland, K.H., Rukke, E.O., Vegarud, G.E., 2010. Comparison of the digestion of caseins and whey proteins in equine, bovine, caprine and human milks by human gastrointestinal enzymes. *Dairy Sci. Technol.* 90, 549–563.
- Innocente, N., Biasutti, M., Blecker, C., 2011. HPLC profile and dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction from bovine milk and from whey protein concentrate. *Int. Dairy J.* 21, 222–228.
- Innocente, N., Comparin, D., Corradini, C., 2002. Proteose-peptone whey fraction as emulsifier in ice-cream preparation. *Int. Dairy J.* 12, 69–74.
- Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C., Paquot, M., 1999. Emulsifying properties of the total fraction and the hydrophobic fraction of bovine milk proteose-peptones. *Int. Dairy J.* 8, 981–985.
- Innocente, N., Corradini, C., Blecker, C., Paquot, M., 1998. Dynamic surface properties of the proteose-peptone fraction of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 81, 1833–1839.
- Isa, P., Arias, C.F., López, S., 2006. Role of sialic acids in rotavirus infection. *Glycoconjugate J.* 23, 27–37.
- Isa, P., Gutiérrez, M., Arias, C.F., López, S., 2008. Rotavirus cell entry. *Future Virol.* 3, 135–146.
- Isa, P., Realpe, M., Romero, P., López, S., Arias, C.F., 2004. Rotavirus RRV associates with lipid membrane microdomains during cell entry. *Virology* 322, 370–381.
- Ishii, T., Aoki, N., Noda, A., Adachi, T., Nakamura, R., Matsuda, T., 1995. Carboxy-terminal cytoplasmic domain of mouse butyrophilin specifically associates with a 150-kDa protein of mammary epithelial cells and milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1245, 285–292.
- Istrate, C., Hagbom, M., Vikstrom, E., Magnusson, K.E., Svensson, L., 2014. Rotavirus infection increases intestinal motility but not permeability at the onset of diarrhea. *J. Virol.* 88, 3161–3169.
- Ito, O., Kamata, S., Hayashi, M., Ushiyama, K., 1993. Milk fat globule membrane substances inhibit mouse intestinal  $\beta$ -glucuronidase. *J. Food Sci.* 58, 753–755.
- Jardí, C., Aranda, N., Bedmar, C., Arija, V., 2015. Nutritional composition of infant milk formulas. Level of compliance in their manufacture and adequacy of nutritional needs. *Pediatr. Ann.* 83, 417–429.

- Jasion, V.S., Burnett, B.P., 2015. Survival and digestibility of orally-administered immunoglobulin preparations containing IgG through the gastrointestinal tract in humans. *Nutr. J.* 14, 22–30.
- Jeewanthi, R.K.C., Lee, N.K., Paik, H.D., 2015. Improved functional characteristics of whey protein hydrolysates in food industry. *Korean J. Food Sci. An.* 35, 350–359.
- Jelen, P., 2003. Whey processing: utilization and products, in: Roginski, H., Fuquay, J.W., Fox, P.F. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, Londres, pp. 2739–2745.
- Jensen, R.G., 2002. The composition of bovine milk lipids: january 1995 to december 2000. *J. Dairy Sci.* 85, 295–350.
- Jiang, H.P., Serrero, G., 1992. Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for an adipose differentiation-related protein. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7856–7860.
- Jiménez-Flores, R., Brisson, G., 2008. The milk fat globule membrane as an ingredient: why, how, when? *Dairy Sci. Technol.* 88, 5–18.
- Jiménez-Saiz, R., Martos, G., Carrillo, W., López-Fandiño, R., Molina, E., 2011. Susceptibility of lysozyme to *in vitro* digestion and immunoreactivity of its digests. *Food Chem.* 127, 1719–1726.
- Jonckheere, N., Skrypek, N., Frénois, F., Van Seuning, I., 2013. Membrane-bound mucin modular domains: from structure to function. *Biochimie* 95, 1077–1086.
- Juffs, H., Deeth, H., 2007. *Scientific evaluation of pasteurisation for pathogen reduction in milk and milk products*, 1st ed. FSANZ, Canberra.
- K**ang, G., 2016. Therapy of viral gastroenteritis, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 73–88.
- Kanno, C., Shimizu, M., Yamauchi, K., 1975. Isolation and physicochemical properties of a soluble glycoprotein fraction of milk fat globule membrane. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1835–1842.
- Karamoko, G., Danthine, S., Olive, G., Blecker, C., 2013. Interfacial and foaming properties of two types of total proteose-peptone fractions. *Food Bioprocess Tech.* 6, 1944–1952.
- Karamoko, G., Renaville, R., Blecker, C., 2016. Interfacial activities of milk total proteose-peptone: contribution and miscibility of nonhydrophobic and hydrophobic fractions. *Int. Dairy J.* 61, 29–36.
- Karav, S., German, J.B., Rouquié, C., Le Parc, A., Barile, D., 2017. Studying lactoferrin N-glycosylation. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 870–884.
- Keenan, T.W., Patton, S., 1995. The structure of milk: implications for sampling and storage. The milk lipid globule membrane, in: Jensen, R.G. (Ed.), *Handbook of Milk Composition*. Elsevier, Storrs, pp. 5–50.
- Kelly, A.L., O’Connell, J.E., Fox, P.F., 2013. Manufacture and properties of milk powders, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. Springer, Cork, pp. 1027–1061.
- Kim, D.H., Kanno, C., Mizokami, Y., 1992. Purification and characterization of major glycoproteins,

- PAS-6 and PAS-7, from bovine milk fat globule membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1122, 203–211.
- Kim, H.J., Kim, C.H., Ryu, J.H., Kim, M.J., Park, C.Y., Lee, J.M., Holtzman, M.J., Yoon, J.H., 2013. Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN- $\lambda$  regulation in human nasal epithelial cells. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 49, 855–865.
- Kobata, R., Tsukahara, H., Ohshima, Y., Ohta, N., Tokuriki, S., Tamura, S., Mayumi, M., 2008. High levels of growth factors in human breast milk. *Early Hum. Dev.* 84, 67–69.
- Koenig, Á., de Albuquerque, E.M., Correia, S.F., Costa, F.A., 2005. Immunologic factors in human milk: the effects of gestational age and pasteurization. *J. Hum. Lact.* 21, 439–443.
- Koketsu, M., Nitoda, T., Juneda, L.R., Kim, M., Kashimura, N., Yamamoto, T., 1995. Sialyloligosaccharides from egg yolk as an inhibitor of rotaviral infection. *J. Agr. Food Chem.* 43, 858–861.
- Koletzko, B., Baker, S., Cleghorn, G., Fagundes, N., 2005. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 41, 584–599.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., 2004.  $\beta$ -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* 87, 785–796.
- Korhonen, H., 2009. Milk-derived bioactive peptides: from science to applications. *J. Funct. Foods* 1, 177–187.
- Korhonen, H., Marnila, P., Gill, H.S., 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *Brit. J. Nutr.* 84, 75–80.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *Int. Dairy J.* 16, 945–960.
- Kotloff, K.L., Nataro, J.P., Blackwelder, W.C., Nasrin, D., Farag, T.H., Panchalingam, S., Wu, Y., Sow, S.O., Sur, D., Breiman, R.F., et al., 2013. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet* 382, 209–222.
- Koutchma, T., 2009. Advances in ultraviolet light technology for non-thermal processing of liquid foods. *Food Bioprocess Tech.* 2, 138–155.
- Kramer, M.S., Kakuma, R., 2012. Optimal duration of exclusive breastfeeding. *Cochrane Db. Syst. Rev.* 15, 1–42.
- Krissansen, G.W., 2007. Emerging health properties of whey proteins and their clinical implications. *J. Am. Coll. Nutr.* 26, 713–723.
- Kristo, E., Hazizaj, A., Corredig, M., 2012. Structural changes imposed on whey proteins by UV irradiation in a continuous UV light reactor. *J. Agr. Food Chem.* 60, 6204–6209.

- Królczyk, J.B., Dawidziuk, T., Janiszewska-Turak, E., Sołowiej, B., 2016. Use of whey and whey preparations in the food industry - a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 66, 157–165.
- Kumar, R., Garsa, A.K., Shrivastava, B., 2015. Natural and cultured buttermilk, in: Puniya, A.K. (Ed.), *Fermented Milk and Dairy Products*. CRC Press, Boca Ratón, pp. 203–225.
- Kumosinski, T.F., Brown, E.M., Farrell, H.M., 1993. Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: an energy-minimized  $\beta$ -casein structure. *J. Dairy Sci.* 76, 931–945.
- Kunz, C., Kuntz, S., Rudloff, S., 2014. Bioactivity of human milk oligosaccharides, in: Moreno, F., Sanz, M.L. (Eds.), *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 5–20.
- Kushibiki, S., Hodate, K., Kurisaki, J., Shingu, H., Ueda, Y., Watanabe, A., Shinoda, M., 2001. Effect of  $\beta$ -lactoglobulin on plasma retinol and triglyceride concentrations, and fatty acid composition in calves. *J. Dairy Res.* 68, 579–586.
- Kvistgaard, A.S., Pallesen, L.T., Arias, C.F., López, S., Petersen, T.E., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., 2004. Inhibitory effects of human and bovine milk constituents on rotavirus infections. *J. Dairy Sci.* 87, 4088–4096.
- Ladomenou, F., Moschandreas, J., Kafatos, A., Tselentis, Y., Galanakis, E., 2010. Protective effect of exclusive breastfeeding against infections during infancy: a prospective study. *Arch. Dis. Child.* 95, 1004–1008.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lahov, E., Regelson, W., 1996. Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* 34, 131–145.
- Larsson, S.C., Andersson, S., Johansson, J., Wolk, A., 2018. Cultured milk, yogurt, and dairy intake in relation to bladder cancer risk in a prospective study of Swedish women and men. *Am. J. Clin. Nutr.* 88, 1083–1087.
- Le Maux, S., Bouhallab, S., Giblin, L., Brodkorb, A., Croguennec, T., 2014. Bovine  $\beta$ -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties. *Dairy Sci. Technol.* 94, 409–426.
- Le, T.T., Van Camp, J., Rombaut, R., van Leeckwyck, F., Dewettinck, K., 2009. Effect of washing conditions on the recovery of milk fat globule membrane proteins during the isolation of milk fat globule membrane from milk. *J. Dairy Sci.* 92, 3592–3603.
- Le, T.T., Van de Wiele, T., Do, T.N.H., Debyser, G., Struijs, K., Devreese, B., Dewettinck, K., Van Camp, J., 2012. Stability of milk fat globule membrane proteins toward human enzymatic gastrointestinal digestion. *J. Dairy Sci.* 95, 2307–2318.
- Leaf, A., Winterson, R., 2009. Breast-milk banking: evidence of benefit. *Paediatr. Child Health.* 19, 395–399.

- Lee, S.J., Sherbon, J.W., 2002. Chemical changes in bovine milk fat globule membrane caused by heat treatment and homogenization of whole milk. *J. Dairy Res.* 69, 555–567.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger principles of biochemistry*, 6th ed. Worth Publishers, New York.
- Lemale, J., 2014. Alimentación para lactantes: leches maternizadas y leches de continuación. *Pediatría* 49, 1–7.
- Leung, A., Otley, A., 2009. Concerns for the use of soy-based formulas in infant nutrition. *Paediatr. Child Health.* 14, 109–113.
- Lewis, M., 2010. Improving pasteurised and extended shelf-life milk, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Woodhead, Boca Ratón, pp. 277–301.
- Li, S.Q., Zhang, H.Q., Balasubramaniam, V.M., Lee, Y.Z., Bomser, J.A., Schwartz, S.J., Dunne, C.P., 2006. Comparison of effects of high-pressure processing and heat treatment on immunoactivity of bovine milk immunoglobulin G in enriched soymilk under equivalent microbial inactivation levels. *J. Agr. Food Chem.* 54, 739–746.
- Li, X., Chen, D., Wang, G., Lu, Y., 2014. Investigation on the interaction between bovine serum albumin and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Lumin.* 156, 255–261.
- Listenberger, L.L., Ostermeyer-Fay, A.G., Goldberg, E.B., Brown, W.J., Brown, D.A., 2007. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J. Lipid Res.* 48, 2751–2761.
- Lister, I.M., Rasmussen, L.K., Johnsen, L.B., Møller, L., Petersen, T.E., Sørensen, E.S., 1998. The primary structure of caprine PP3: amino acid sequence, phosphorylation, and glycosylation of component PP3 from the proteose-peptone fraction of caprine milk. *J. Dairy Sci.* 81, 2111–2115.
- Liu, B., Newburg, D.S., 2013. Human milk glycoproteins protect infants against human pathogens. *Breastfeed. Med.* 8, 354–362.
- Liu, B., Yu, Z., Chen, C., Kling, D.E., Newburg, D.S., 2012. Human milk Mucin 1 and Mucin 4 inhibit *Salmonella Enterica* serovar Typhimurium invasion of human intestinal epithelial cells *in vitro*. *J. Nutr.* 142, 1504–1509.
- Liu, C., Erickson, A.K., Henning, D.R., 2005. Distribution and carbohydrate structures of high molecular weight glycoproteins, MUC1 and MUCX, in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 88, 4288–4294.
- Lønnerdal, B., 2016. Bioactive proteins in human milk - Potential benefits for preterm infants. *Clin. Perinatol.* 44, 179–191.
- López-Expósito, I., Recio, I., 2008. Protective effect of milk peptides: antibacterial and antitumor properties, in: Bösze, Z. (Ed.), *Bioactive Components of Milk*. Springer, New York, pp. 271–295.
- López-Fandiño, R., 2006. High pressure-induced changes in milk proteins and possible applications in dairy technology. *Int. Dairy J.* 16, 1119–1131.

- Lopez, C., 2011. Milk fat globules enveloped by their biological membrane: unique colloidal assemblies with a specific composition and structure. *Curr. Opin. Colloid In.* 16, 391–404.
- López, S., Arias, C.F., 2004. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol.* 12, 271–278.
- Lu, X., Gruia-Gray, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Londos, C., Kimmel, A.R., 2001. The murine perilipin gene: the lipid droplet-associated perilipins derive from tissue-specific, mRNA splice variants and define a gene family of ancient origin. *Mamm. Genome* 12, 741–749.
- MacGibbon, A.K.H., Taylor, M.W., 2006. Composition and structure of bovine milk lipids, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Lipids*. Springer, New York, pp. 1–42.
- Madenci, A.B., Bilgiçli, N., 2014. Effect of whey protein concentrate and buttermilk powders on rheological properties of dough and bread quality. *J. Food Quality* 37, 117–124.
- Madsen, J.B., Pakkanen, K.I., Lee, S., 2014. Thermostability of bovine submaxillary mucin (BSM) in bulk solution and at a sliding interface. *J. Colloid Interf. Sci.* 424, 113–119.
- Madureira, A.R., Pereira, C.I., Gomes, A.M.P., Pintado, M.E., Malcata, F.X., 2007. Bovine whey proteins - Overview on their main biological properties. *Food Res. Int.* 40, 1197–1211.
- Magnusson, B., Ornemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods - A laboratory guide to method validation and related topics*. 2nd ed. Leoben.
- Mainer, G., Domínguez, E., Randrup, M., Sánchez, L., Calvo, M., 1999. Effect of heat treatment on anti-rotavirus activity of bovine colostrum. *J. Dairy Res.* 66, 131–137.
- Mainer, G., Sánchez, L., Ena, J.M., Calvo, M., 1997. Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. *J. Food Sci.* 62, 1034–1038.
- Majorek, K.A., Porebski, P.J., Dayal, A., Zimmerman, M.D., Jablonska, K., Stewart, A.J., Chruszcz, M., Minor, W., 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* 52, 174–182.
- Maldonado, Y.A., Glode, M.P., Bhatia, J., 2014. Consumption of raw or unpasteurized milk and milk products by pregnant women and children. *Pediatrics* 133, 175–179.
- Mañá, P., Goodyear, M., Bernard, C., Tomioka, R., Freire-Garabal, M., Liñares, D., 2004. Tolerance induction by molecular mimicry: prevention and suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis with the milk protein butyrophilin. *Int. Immunol.* 16, 489–499.
- Mandalari, G., Mackie, A.M., Rigby, N.M., Wickham, M.S.J., Mills, E.N.C., 2009. Physiological phosphatidylcholine protects bovine  $\beta$ -lactoglobulin from simulated gastrointestinal proteolysis. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 131–139.
- Mann, B., Kumari, A., Kumar, R., Sharma, R., Prajapati, K., Mahboob, S., Athira, S., 2015. Antioxidant activity of whey protein hydrolysates in milk beverage system. *J. Food Sci. Technol.* 52, 3235–3241.



- Mantle, M., Allen, A., 1978. A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain. *Biochem. Soc. T.* 6, 607–609.
- Marafon, A.P., Sumi, A., Granato, D., Alcântara, M.R., Tamime, A.Y., Nogueira de Oliveira, M., 2011. Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. *J. Dairy Sci.* 94, 5330–5340.
- Marcotte, H., Hammarström, L., 2016. Immunodeficiencies: significance for gastrointestinal disease, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 47–72.
- Markus, C.R., Olivier, B., De Haan, E.H.F., 2002. Whey protein rich in  $\alpha$ -lactalbumin increases the ratio of plasma tryptophan to the sum of the other large neutral amino acids and improves cognitive performance in stress-vulnerable subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 75, 1051–1056.
- Marshall, K., 2004. Therapeutic applications of whey protein. *Altern. Med. Rev.* 9, 136–156.
- Martin, H.M., Hancock, J.T., Salisbury, V., Harrison, R., 2004. Role of xanthine oxidoreductase as an antimicrobial agent. *Infect. Immun.* 72, 4933–4939.
- Martínez, M.A., López, S., Arias, C.F., Isa, P., 2013. Gangliosides have a functional role during rotavirus cell entry. *J. Virol.* 87, 1115–1122.
- Mather, I.H., 2000. A review and proposed nomenclature for major proteins of the milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 83, 203–247.
- Mather, I.H., Keenan, T.W., 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland Biol.* 3, 259–273.
- Mather, I.H., Tamplin, C.B., Irving, M.G., 1980. Separation of the proteins of bovine milk-fat-globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity. *Eur. J. Biochem.* 110, 327–336.
- Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V.V., Cohen, J., Rey, F.A., 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the viron. *EMBO J.* 20, 1485–1497.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., et al., 2008. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621–1629.
- Matthijnssens, J., Desselberger, U., 2012. Genome diversity and evolution of rotaviruses, in: Hacker, J., Dobrindt, U., Kurth, R. (Eds.), *Genome Plasticity and Infectious Diseases*. ASM Press, Washington, pp. 214–241.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., Johne, R., 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177–1182.

- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S.J., Martínez-Lorenzo, M.J., Calvo, M., Sánchez, L., Pérez, M.D., 2016. Effect of high pressure and heat treatments on IgA immunoreactivity and lysozyme activity in human milk. *Eur. Food Res. Technol.* 242, 891–898.
- Mayayo, C., Montserrat, M., Ramos, S.J., Martínez-Lorenzo, M.J., Calvo, M., Sánchez, L., Pérez, M.D., 2014. Kinetic parameters for high-pressure-induced denaturation of lactoferrin in human milk. *Int. Dairy J.* 39, 246–252.
- Mayeur, S., Spahis, S., Pouliot, Y., Levy, E., 2016. Lactoferrin, a pleiotropic protein in health and disease. *Antioxid. Redox Sign.* 24, 813–836.
- Mazri, C., Ramos, S.J., Sánchez, L., Montserrat, M., Calvo, M., Pérez, M.D., 2011. Effect of high pressure treatment on bovine whey proteins. *Ital. J. Food Sci.* 23, 80–83.
- Mazri, C., Sánchez, L., Ramos, S.J., Calvo, M., Pérez, M.D., 2012. Effect of high-pressure treatment on denaturation of bovine lactoferrin and lactoperoxidase. *J. Dairy Sci.* 95, 549–557.
- McClain, B., Settembre, E., Temple, B.R.S., Bellamy, A.R., Harrison, S.C., 2010. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 397, 587–599.
- McEvoy, K., Hayes, J., Kealey, C., Brady, D., 2016. Influence of sweet whey protein concentrate and its hydrolysates on host–pathogen interactions in the emerging foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* 121, 873–882.
- McGrath, B.A., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Kelly, A.L., 2016. Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci. Technol.* 96, 133–158.
- McManaman, J.L., Zabaronick, W., Schaack, J., Orlicky, D.J., 2003. Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J. Lipid Res.* 44, 668–673.
- Meier, R.F., Reddy, B.R., Soeters, P.B., 2016. The importance of nutrition as an integral part of disease management. *Nestlé Nutrition Institute Workshop Series*, Karger, pp. 1664–2147.
- Meisel, H., 2005. Biochemical properties of peptides encrypted in bovine milk proteins. *Curr. Med. Chem.* 12, 1905–1919.
- Mendonca, M.A., Araujo, W.M.C., Borgo, L.A., Alencar, E.D.R., 2017. Lipid profile of different infant formulas for infants. *PLoS One* 12, e0177812.
- Meng, X., Bai, Y., Gao, J., Li, X., Chen, H., 2017. Effects of high hydrostatic pressure on the structure and potential allergenicity of the major allergen bovine  $\beta$ -lactoglobulin. *Food Chem.* 219, 290–296.
- Merril, C.R., 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437–1438.
- Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S.L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K., 2015. Candidate new Rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 660–663.
- Miura, S., Gan, J.W., Brzostowski, J., Parisi, M.J., Schultz, C.J., Londos, C., Oliver, B., Kimmel, A.R.,

2002. Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277, 32253–32257.
- Modi, N., 2006. Donor breast milk banking. *Br. Med. J.* 333, 1133–1134.
- Mollea, C., Marmo, L., Bosco, F., 2013. Valorisation of cheese whey, a by-product from the dairy industry, in: Muzzalupo, I. (Ed.), *Food Industry*. IntechOpen, pp. 549–588.
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C., 2011. Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chem.* 124, 697–702.
- Moran, A.P., Gupta, A., Joshi, L., 2011. Sweet-talk: role of host glycosylation in bacterial pathogenesis of the gastrointestinal tract. *Gut* 60, 1412–1425.
- Moreno, F.J., Mackie, A.R., Mills, E.N.C., 2005. Phospholipid interactions protect the milk allergen  $\alpha$ -lactalbumin from proteolysis during *in vitro* digestion. *J. Agr. Food Chem.* 53, 9810–9816.
- Morgan, J., 2006. Human milk, in: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell, Newark, pp. 407–420.
- Morin, P., Jiménez-Flores, R., Pouliot, Y., 2007. Effect of processing on the composition and microstructure of buttermilk and its milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 17, 1179–1187.
- Morin, P., Pouliot, Y., Jiménez-Flores, R., 2006. A comparative study of the fractionation of regular buttermilk and whey buttermilk by microfiltration. *J. Food Eng.* 77, 521–528.
- Morozov, V., Hansman, G., Hanisch, F.G., Schrotten, H., Kunz, C., 2018. Human milk oligosaccharides as promising antivirals. *Mol. Nutr. Food Res.* 62, 1–14.
- Morr, C.V., Ha, E.Y.W., 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci.* 33, 431–476.
- Mota, M.V.T., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Oliveira, M.B.P., Rocha, C., Teixeira, J.A., Torres, D., Gonçalves, M.P., 2004. Enzymatic hydrolysis of whey protein concentrates: peptide HPLC profiles. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 27, 2625–2639.
- Motarjemi, Y., Moy, G.G., Jooste, P.J., Anelich, L.E., 2014. Milk and dairy products, in: Motarjemi, Y., Lelieveld, H. (Eds.), *Food Safety Management. A Practical Guide for the Food Industry*. Academic Press, Amsterdam, pp. 83–119.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C.T., Welti-Chanes, J., Torres, A., 2011. High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food Bioprocess Tech.* 4, 969–985.
- Muñoz, J.A.M., Chenoll, E., Casinos, B., Bataller, E., Ramón, D., Genovés, S., Montava, R., Ribes, J.M., Buesa, J., Fábrega, J., et al., 2011. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl. Environ. Microb.* 77, 8775–8783.

- Murphy, C., Devine, T., O’Kennedy, R., 2016. Technology advancements in antibody purification. *Antib. Technol. J.* 6, 17–32.
- Nag, S.K., 2010. Contaminants in milk: routes of contamination, analytical techniques and methods of control, in: Griffiths, M.W. (Ed.), *Improving the Safety and Quality of Milk*. Woodhead, Boca Ratón, pp. 146–178.
- Nakata, N., Furukawa, K., Greenwalt, D.E., Sato, T., Kobata, A., 1993. Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: occurrence of novel hybrid-type sugar chains containing the Neu5Aca2→6GalNAcβ1→4GlcNAc and the Manα1→2Manα1→3Manα1→6Man groups. *Biochemistry* 32, 4369–4383.
- Nandi, S., Suzuki, Y.A., Huang, J., Yalda, D., Pham, P., Wu, L., Bartley, G., Huang, N., Lönnerdal, B., 2002. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Sci.* 163, 713–722.
- Navarro, A., Williamson, L., Angel, M., Patton, J.T., 2016. Rotavirus replication and reverse genetics, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 121–144.
- Newburg, D.S., Peterson, J.A., Ruiz-Palacios, G.M., Matson, D.O., Morrow, A.L., Shults, J., Guerrero, M.L., Chaturvedi, P., Newburg, S.O., Scallan, C.D., et al., 1998. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet* 351, 1160–1164.
- Newburg, D.S., Ruiz-palacios, G.M., Morrow, A.L., 2005. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 37–58.
- Ng, T.B., Cheung, R.C.F., Wong, J.H., Wang, Y., Ip, D.T.M., Wan, D.C.C., Xia, J., 2015. Antiviral activities of whey proteins. *Appl. Microbiol. Biot.* 99, 6997–7008.
- Nickerson, S.C., Akers, R.M., 2011. Mammary gland: anatomy, in: Fuquay, J.W., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, San Diego, pp. 328–337.
- Nielsen, R.L., Andersen, M.H., Mabhout, P., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T., 1999. Isolation of adipophilin and butyrophilin from bovine milk and characterization of a cDNA encoding adipophilin. *J. Dairy Sci.* 82, 2543–2549.
- Nik, A.M., Wright, A.J., Corredig, M., 2010. Surface adsorption alters the susceptibility of whey proteins to pepsin-digestion. *J. Colloid Interf. Sci.* 344, 372–381.
- Noyelle, K., Van Dael, H., 2002. Kinetics of conformational changes induced by the binding of various metal ions to bovine α-lactalbumin. *J. Inorg. Biochem.* 88, 69–76.
- O’Connell, J.E., Fox, P.F., 2003. Heat-induced coagulation of milk, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry*. Springer, Boston, pp. 879–946.
- O’Mahony, J., O’Donoghue, M., Morgan, J.G., Hill, C., 2000. Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimised plaque assay procedure. *Int. J. Food Microbiol.* 61, 177–185.

- O'Mahony, J.A., Fox, P.F., 2014. Milk: an overview, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 19–73.
- O'Riordan, N., Kane, M., Joshi, L., Hickey, R.M., 2014. Structural and functional characteristics of bovine milk protein glycosylation. *Glycobiology* 24, 220–236.
- OECD/FAO, 2016. Dairy and dairy products, in: *OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025*. OECD Publishing, Paris.
- Ogg, S.L., Komaragiri, M.V.S., Mather, I.H., 1996. Structural organization and mammary-specific expression of the butyrophilin gene. *Mamm. Genome* 7, 900–905.
- Oliver, S.P., Boor, K.J., Murphy, S.C., Murinda, S.E., 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 793–806.
- Olofsson, S., Bergström, T., 2005. Glycoconjugate glycans as viral receptors. *Ann. Med.* 37, 154–72.
- OMS, 2016. Rotavirus diseases burden estimates. Web: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/estimates/rotavirus/en/).  
Accedido por última vez: 04/02/2018.
- OMS, 2009. The physiological basis of breastfeeding, in: *Infant and Young Child Feeding*. WHO Press, Geneve, pp. 9–18.
- Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K., Matsuda, T., 2002. Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles: a possible role in membrane secretion. *Eur. J. Biochem.* 269, 1209–1218.
- Otzen, D.E., Blans, K., Wang, H., Gilbert, G.E., Rasmussen, J.T., 2012. Lactadherin binds to phosphatidylserine-containing vesicles in a two-step mechanism sensitive to vesicle size and composition. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1019–1027.
- Pack, T.D., 2000. Purification of human IgA. *Curr. Protoc. Immunol.* 38, 2.10B.1-2.10B.7.
- Packard, V.S., 1982. Infant formula composition, formulation, and processing, in: Packard, V.S. (Ed.), *Human Milk and Infant Formula*. Academic Press, Boston, pp. 140–175.
- Page, M., Baines, M.G., Thorpe, R., 1994. Preparation of purified immunoglobulin G (IgG), in: Walker, J.M. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, pp. 407–431.
- Pallesen, L.T., Andersen, M.H., Nielsen, R.L., Berglund, L., Petersen, T.E., Rasmussen, L.K., Rasmussen, J.T., 2001. Purification of MUC1 from bovine milk-fat globules and characterization of a corresponding full-length cDNA clone. *J. Dairy Sci.* 84, 2591–2598.
- Pallesen, L.T., Berglund, L., Rasmussen, L.K., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T., 2002. Isolation and characterization of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin. *Eur. J. Biochem.* 269, 2755–2763.
- Pallesen, L.T., Pedersen, L.R.L., Petersen, T.E., Rasmussen, J.T., 2007. Characterization of carbohydrate structures of bovine MUC15 and distribution of the mucin in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 90, 3143–

3152.

- Pando, V., Isa, P., Arias, C.F., López, S., 2002. Influence of calcium on the early steps of rotavirus infection. *Virology* 295, 190–200.
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 105, 1–14.
- Park, M.S., Shinde, P.L., Yang, Y.X., Kim, J.S., Choi, J.Y., Yun, K., Kim, Y.W., Lohakare, J.D., Yang, B.K., Lee, J.K., et al., 2010. Reproductive performance, milk composition, blood metabolites and hormone profiles of lactating sows fed diets with different cereal and fat sources. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 23, 226–233.
- Park, Y.W., Haenlein, G.F.W., 2006. Overview of milk of non-bovine mammals, in: Park, Y.W., Haenlein, G.F.W. (Eds.), *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*. Blackwell, Newark, pp. 3–9.
- Park, Y.W., Nam, M.S., 2015. Bioactive peptides in milk and dairy products: a review. *Korean J. Food Sci. An.* 35, 831–840.
- Parker, P., Sando, L., Pearson, R., Kongsuwan, K., Tellam, R.L., Smith, S., 2010. Bovine Muc1 inhibits binding of enteric bacteria to Caco-2 cells. *Glycoconjugate J.* 27, 89–97.
- Patel, H.A., Huppertz, T., 2014. Effects of high-pressure processing on structure and interactions of milk proteins, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 243–267.
- Patel, H.A., Singh, H., Anema, S.G., Creamer, L.K., 2006. Effects of heat and high hydrostatic pressure treatments on disulfide bonding interchanges among the proteins in skim milk. *J. Agr. Food Chem.* 54, 3409–3420.
- Patton, S., 2011. Milk in human health and nutrition, in: Fuquay, J.W., Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Academic Press, Oxford, pp. 607–612.
- Payne, A.F., Binduga-Gajewska, I., Kauffman, E.B., Kramer, L.D., 2006. Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *J. Virol. Methods* 134, 183–189.
- Payne, D.C., Boom, J.A., Staat, M.A., Edwards, K.M., Szilagyi, P.G., Klein, E.J., Selvarangan, R., Azimi, P.H., Harrison, C., Moffatt, M., et al., 2013. Effectiveness of pentavalent and monovalent rotavirus vaccines in concurrent use among US children <5 years of age, 2009–2011. *Clin. Infect. Dis.* 57, 13–20.
- Pecora, A., Pérez, M.S., Rodriguez, D., Seki, C., Levy, M.S., Bochoeyer, D., Dus Santos, M.J., Wigdorovitz, A., 2009. Development and validation of an ELISA for quantitation of bovine viral diarrhoea virus antigen in the critical stages of vaccine production. *J. Virol. Methods* 162, 170–178.
- Pedersen, L.R.L., Hansted, J.G., Nielsen, S.B., Petersen, T.E., Sørensen, U.S., Otzen, D., Sørensen, E.S., 2012a. Proteolytic activation of proteose peptone component 3 by release of a C-terminal peptide with antibacterial properties. *J. Dairy Sci.* 95, 2819–2829.

- Pedersen, L.R.L., Nielsen, S.B., Hansted, J.G., Petersen, T.E., Otzen, D.E., Sørensen, E.S., 2012b. PP3 forms stable tetrameric structures through hydrophobic interactions via the C-terminal amphipathic helix and undergoes reversible thermal dissociation and denaturation. *FEBS J.* 279, 336–347.
- Peila, C., Emmerik, N.E., Giribaldi, M., Stahl, B., Ruitenbergh, J.E., Van Elburg, R.M., Moro, G.E., Bertino, E., Coscia, A., Cavallarin, L., 2017. Human milk processing: a systematic review of innovative techniques to ensure the safety and quality of donor milk. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 64, 353–361.
- Peila, C., Moro, G.E., Bertino, E., Cavallarin, L., Giribaldi, M., Giuliani, F., Cresi, F., Coscia, A., 2016. The Effect of holder pasteurization on nutrients and biologically-active components in donor human milk: a review. *Nutrients* 8, 477–496.
- Pérez-Cano, F.J., Marín-Gallén, S., Castell, M., Rodríguez-Palmero, M., Rivero, M., Castellote, C., Franch, A., 2008. Supplementing suckling rats with whey protein concentrate modulates the immune response and ameliorates rat rotavirus-induced diarrhea. *J. Nutr.* 2392–2398.
- Pérez, M.D., Calvo, M., 1995. Interaction of  $\beta$ -lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *J. Dairy Sci.* 78, 978–988.
- Permyakov, E.A., Berliner, L.J., 2000.  $\alpha$ -Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett.* 473, 269–274.
- Pesavento, J.B., Crawford, S.E., Estes, M.K., Prasad, B.V.V., 2006. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr. Top. Microbiol.* 309, 189–219.
- Peterson, J.A., Patton, S., Hamosh, M., 1998. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol. Neonate* 74, 143–162.
- Peterson, R., Cheah, W.Y., Grinyer, J., Packer, N., 2013. Glycoconjugates in human milk: protecting infants from disease. *Glycobiology* 23, 1425–1438.
- Pettersson-Kastberg, J., Mossberg, A.K., Trulsson, M., Yong, Y.J., Min, S., Lim, Y., O'Brien, J.E., Svanborg, C., Mok, K.H., 2009.  $\alpha$ -Lactalbumin, engineered to be nonnative and inactive, kills tumor cells when in complex with oleic acid: a new biological function resulting from partial unfolding. *J. Mol. Biol.* 394, 994–1010.
- Phan, T.T.Q., Asaduzzaman, M., Le, T.T., Fredrick, E., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., 2013. Composition and emulsifying properties of a milk fat globule membrane enriched material. *Int. Dairy J.* 29, 99–106.
- Picariello, G., Ferranti, P., Mamone, G., Roepstorff, P., Addeo, F., 2008. Identification of N-linked glycoproteins in human milk by hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* 8, 3833–3847.
- Pinto, R.M., Gajardo, R., Abad, F.X., Bosch, A., 1995. Detection of fastidious infectious enteric viruses in water. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2636–2638.
- Pisanu, S., Ghisaura, S., Pagnozzi, D., Biosa, G., Tanca, A., Roggio, T., Uzzau, S., Addis, M.F., 2011. The sheep milk fat globule membrane proteome. *J. Proteomics* 74, 350–358.

- Plate, K., Beutel, S., Buchholz, H., Demmer, W., Fischer-Frühholz, S., Reif, O., Ulber, R., Scheper, T., 2006. Isolation of bovine lactoferrin, lactoperoxidase and enzymatically prepared lactoferricin from proteolytic digestion of bovine lactoferrin using adsorptive membrane chromatography. *J. Chromatogr. A* 1117, 81–86.
- Pouliot, Y., 2008. Membrane processes in dairy technology - From a simple idea to worldwide panacea. *Int. Dairy J.* 18, 735–740.
- Prasad, B. V., Shanker, S., Hu, L., Choi, J.M., Crawford, S.E., Ramani, S., Czako, R., Atmar, R.L., Estes, M.K., 2014. Structural basis of glycan interaction in gastroenteric viral pathogens. *Curr. Opin. Virol.* 7, 119–127.
- Quaranta, S., Giuffrida, M.G., Cavaletto, M., Giunta, C., Godovac-Zimmermann, J., Cañas, B., Fabris, C., Bertino, E., Mombro, M., Conti, A., 2001. Human proteome enhancement: high-recovery method and improved two-dimensional map of colostrum fat globule membrane proteins. *Electrophoresis* 22, 1810–1818.
- Rajiv, G., Gurgel, P., Dos Santos, B., De Souza, J., Antunes, A., Narain, N., Quintans-Júnior, L.J., Queiroz, R., 2016. Medicinal plants and natural molecules with *in vitro* and *in vivo* activity against rotavirus: a systematic review. *Phytomedicine* 23, 1830–1842.
- Ramirez, R., Saraiva, J., Lamela, C.P., Torres, J.A., 2009. Reaction kinetics analysis of chemical changes in pressure-assisted thermal processing. *Food Eng. Rev.* 1, 16–30.
- Rammer, P., Groth-Pedersen, L., Kirkegaard, T., Daugaard, M., Rytter, A., Szyniarowski, P., Hoyer-Hansen, M., Povlsen, L.K., Nylandsted, J., Larsen, J.E., et al., 2010. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 9, 24–32.
- Rasmussen, J.T., 2009. Bioactivity of milk fat globule membrane proteins. *Aust. J. Dairy Technol.* 64, 63–67.
- Rasmussen, J.T., Berglund, L., Rasmussen, M.S., Petersen, T.E., 1998. Assignment of disulfide bridges in bovine CD36. *Eur. J. Biochem.* 257, 488–494.
- Ray, P.G., Kelkar, S.D., Walimbe, A.M., Biniwale, V., Mehendale, S., 2007. Rotavirus immunoglobulin levels among Indian mothers of two socio-economic groups and occurrence of rotavirus infections among their infants up to six months. *J. Med. Virol.* 79, 341–349.
- Reche, M., Pascual, C., Fiandor, A., Polanco, I., Rivero-Urgell, M., Chifre, R., Johnston, S., Martín-Esteban, M., 2010. The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy. *Pediatr. Allergy Immun.* 21, 577–585.
- Reinemann, D.J., Gouws, P., Cilliers, T., Houck, K., Bishop, J.R., 2006. New methods for UV treatment of milk for improved food safety and product quality. ASABE Annual International Meeting, Portland.
- Restani, P., Ballabio, C., Di Lorenzo, C., Tripodi, S., Fiocchi, A., 2009. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events. *Anal. Bioanal. Chem.* 395, 47–56.



- Revilla, I., Escuredo, O., González-Martín, M.I., Palacios, C., 2017. Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. *Food Chem.* 214, 468–477.
- Riccio, P., 2004. The proteins of the milk fat globule membrane in the balance. *Trends Food Sci. Tech.* 15, 458–461.
- Ripollés, D., Harouna, S., Parrón, J.A., Arenales, I., Calvo, M., Pérez, M.D., Sánchez, L., 2017. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* adhesion to caco-2 cells by commercial dairy powders and raw buttermilk. *J. Agr. Food Chem.* 65, 1043–1050.
- Ripollés, D., Harouna, S., Parrón, J.A., Calvo, M., Pérez, M.D., Carramiñana, J.J., Sánchez, L., 2015. Antibacterial activity of bovine milk lactoferrin and its hydrolysates prepared with pepsin, chymosin and microbial rennet against foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Int. Dairy J.* 45, 15–22.
- Ripollés, D., Parrón, J.A., Calvo, M., Pérez, M.D., FitzGerald, R.J., Sánchez, L., 2016. Antioxidant activity of co-products from milk fat processing and their enzymatic hydrolysates obtained with different proteolytic preparations. *Int. Dairy J.* 60, 70–77.
- Ripollés, D., Parrón, J.A., Fraguas, J., Calvo, M., Pérez, M.D., Sánchez, L., 2018. Determination of lactadherin concentration in dairy by-products by ELISA: effect of heat treatment and hydrolysis. *J. Dairy Sci.* 101, 912–923.
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Lorkowski, S., Schnoor, M., Robenek, M.J., Heid, H., Troyer, D., Severs, N.J., 2006. Butyrophilin controls milk fat globule secretion. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 10385–10390.
- Roderiquez, G., Oravec, T.S., Yanagishita, M., Bou-Habib, D.C., Mostowski, H., Norcross, M.A., 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J. Virol.* 69, 2233–2239.
- Rodríguez, J.M., Chichón, F.J., Martín-Forero, E., González-Camacho, F., Carrascosa, J.L., Castón, J.R., Luque, D., 2014. New insights into rotavirus entry machinery: stabilization of rotavirus spike conformation is independent of trypsin cleavage. *PLoS Pathog.* 10, e1004157.
- Romão, M.J., 2009. Molybdenum and tungsten enzymes: a crystallographic and mechanistic overview. *Dalton T.* 21, 4053–4068.
- Rombaut, R., Van Camp, J., Dewettinck, K., 2006. Phospho- and sphingolipid distribution during processing of milk, butter and whey. *Int. J. Food Sci. Tech.* 41, 435–443.
- Rosa, L., Cutone, A., Lepanto, M.S., Paesano, R., Valenti, P., 2017. Lactoferrin: a natural glycoprotein involved in iron and inflammatory homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1985–2011.
- Ross, S.A., Lane, J.A., Kilcoyne, M., Joshi, L., Hickey, R.M., 2015. The milk fat globule membrane: a potential source of health-promoting glycans, in: Gupta, V., Tuohy, M., Lohani, M., O'Donovan, A. (Eds.), *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. John Wiley & Sons,

- Chichester, pp. 631–668.
- Ruiz-Giménez, P., Salom, J.B., Marcos, J.F., Vallés, S., Martínez-Maqueda, D., Recio, I., Torregrosa, G., Alborch, E., Manzanares, P., 2012. Antihypertensive effect of a bovine lactoferrin pepsin hydrolysate: identification of novel active peptides. *Food Chem.* 131, 266–273.
- Rukke, E.O., Sørhaug, T., Stepaniak, L., 2011. Heat treatment of milk: thermization of milk. *Enc. Dairy Sci.* 4, 693–698.
- Ruvoën-Clouet, N., Mas, E., Marionneau, S., Guillon, P., Lombardo, D., Le Pendu, J., 2006. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of ‘secretor’ mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem. J.* 393, 627–634.
- Ryan, M.P., Walsh, G., 2016. The biotechnological potential of whey. *Rev. Environ. Sci. Bio.* 15, 479–498.
- Rynne, N.M., Beresford, T.P., Kelly, A.L., Guinee, T.P., 2004. Effect of milk pasteurization temperature and *in situ* whey protein denaturation on the composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 14, 989–1001.
- Rysstad, G., Kolstad, J., 2006. Extended shelf life milk—advances in technology. *Int. J. Dairy Technol.* 59, 85–96.
- Saarinen, K.M., Vaarala, O., Klemetti, P., 1999. Transforming growth factor- $\beta$ 1 in mother's colostrum and immune responses to cow's milk proteins in infants with cow's milk allergy. *Clin. Immunol.* 104, 1093–1098.
- Saboya, L.V., Maubois, J.L., 2000. Current developments of microfiltration technology in the dairy industry. *Lait* 80, 541–553.
- Saeland, E., de Jong, M.A.W.P., Nabatov, A.A., Kalay, H., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y., 2009. MUC1 in human milk blocks transmission of human immunodeficiency virus from dendritic cells to T cells. *Mol. Immunol.* 46, 2309–2316.
- Samyn-Petit, B., Gruber, V., Flahaut, C., Wajda-Dubos, J.P., Farrer, S., Pons, A., Desmaizieres, G., Slomianny, M.C., Theisen, M., Delannoy, P., 2001. N-glycosylation potential of maize: the human lactoferrin used as a model. *Glycoconjugate J.* 18, 519–527.
- San Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G., 2002. Food processing by high hydrostatic pressure. *Crit. Rev. Food Sci.* 42, 627–645.
- Sánchez, L., Aranda, P., Pérez, M.D., Calvo, M., 1988. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol. Chem. H-S.* 369, 1005–1008.
- Sánchez, L., Peiró, J.M., Castillo, H., Pérez, M.D., Ena, J.M., Calvo, M., 1992. Kinetic parameters for denaturation of bovine milk lactoferrin. *J. Food Sci.* 57, 873–879.
- Sandberg, T., Blom, H., Caldwell, K.D., 2009. Potential use of mucins as biomaterial coatings. I. Fractionation, characterization, and model adsorption of bovine, porcine, and human mucins. *J.*

- Biomed. Mater. Res. 91, 762–772.
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., Kongsuwan, K., Smith, S., Tellam, R.L., 2009. Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. *J. Dairy Sci.* 92, 5276–5291.
- Sarker, M.R., Akhtar, S., Torres, J.A., Paredes-Sabja, D., 2013. High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 18–26.
- Sarker, S.A., Casswall, T.H., Mahalanabis, D., 1998. Successful treatment of rotavirus diarrhea in children with immunoglobulin from immunized bovine colostrum. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 17, 1149–1154.
- Schmidt, V.S.J., Kaufmann, V., Kulozik, U., Scherer, S., Wenning, M., 2012. Microbial biodiversity, quality and shelf life of microfiltered and pasteurized extended shelf life (ESL) milk from Germany, Austria and Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 1–9.
- Schroten, H., Hanisch, F.G., Plogmann, R., Hacker, J., Uhlenbruck, G., Nobis-Bosch, R., Wahn, V., 1992. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to bucal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.* 60, 2893–2899.
- Schuck, P., 2014. Effects of drying on milk proteins, in: Singh, H., Boland, M., Thompson, A. (Eds.), *Milk Proteins. From Expression to Food*. Academic Press, Palmerston North, pp. 319–342.
- Schuck, P., Jeantet, R., Bhandari, B., Chen, X.D., Perrone, Í.T., de Carvalho, A.F., Fenelon, M., Kelly, P., 2016. Recent advances in spray drying relevant to the dairy industry: a comprehensive critical review. *Dry. Technol.* 34, 1773–1790.
- Sedaghati, M., Ezzatpanah, H., Boojar, M.M.A., Ebrahimi, M.T., Aminafshar, M., Dameshghian, M., 2014.  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin hydrolysates as sources of antibacterial peptides. *J. Agric. Sci. Technol.* 16, 1587–1600.
- Seifu, E., Buys, E.M., Donkin, E.F., 2005. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 16, 137–154.
- Seok, J.S., Shimoda, M., Azuma, N., Kanno, C., 2001. Structures of the N-linked sugar chains in PAS-7 glycoprotein sharing the same protein core with PAS-6 glycoprotein from the bovine milk fat globule membrane. *Biosci. Biotech. Bioch.* 65, 901–912.
- Sepulveda, D.R., Góngora-Nieto, M.M., Guerrero, J.A., Barbosa-Cánovas, G. V., 2005. Production of extended-shelf life milk by processing pasteurized milk with pulsed electric fields. *J. Food Eng.* 67, 81–86.
- Settembre, E.C., Chen, J.Z., Dormitzer, P.R., Grigorieff, N., Harrison, S.C., 2011. Atomic model of an infectious rotavirus particle. *EMBO J.* 30, 408–416.
- Shahriar, F., Ngeleka, M., Gordon, J.R., 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*. *Dev. Comp. Immunol.* 30, 723–734.
- Sharma, A., Jana, A.H., Chavan, R.S., 2012. Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications - A review. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 11, 518–528.
- Sharma, P., Oey, I., Everett, D.W., 2016. Thermal properties of milk fat, xanthine oxidase, caseins and whey proteins in pulsed electric field-treated bovine whole milk. *Food Chem.* 207, 34–42.
- Shi, H.B., Yu, K., Luo, J., Li, J., Tian, H.B., Zhu, J.J., Sun, Y.T., Yao, D.W., Xu, H.F., Shi, H.P., Loo, J.J., 2015. Adipocyte differentiation-related protein promotes lipid accumulation in goat mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* 98, 6954–6964.
- Shi, J., Pipe, S.W., Rasmussen, J.T., Heegaard, C.W., Gilbert, G.E., 2008. Lactadherin blocks thrombosis and hemostasis *in vivo*: correlation with platelet phosphatidylserine exposure. *J. Thromb. Haemost.* 6, 1167–1174.
- Shi, Y.D., Sun, G.Q., Zhang, Z.G., Deng, X., Kang, X.H., Liu, Z.D., Ma, Y., Sheng, Q.H., 2011. The chemical composition of human milk from Inner Mongolia of China. *Food Chem.* 127, 1193–1198.
- Shida, K., Takamizawa, K., Nagaoka, M., Kushiro, A., Osawa, T., Tsuji, T., 1994. Enterotoxin-binding glycoproteins in a proteose-peptone fraction of heated bovine milk. *J. Dairy Sci.* 77, 930–939.
- Siciliano, R., Rega, B., Marchetti, M., Seganti, L., Antonini, G., Valenti, P., 1999. Bovine lactoferrin peptidic fragments involved in inhibition of herpes simplex virus type 1 infection. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 264, 19–23.
- Silvestre, J.S., Théry, C., Hamard, G., Boddart, J., Aguilar, B., Delcayre, A., Houbron, C., Tamarat, R., Blanc-Brude, O., Heeneman, S., et al., 2005. Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat. Med.* 11, 499–506.
- Silvestre, M.D., Ruiz, P., Martínez-Costa, C., Plaza, A., López, M.C., 2008. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J. Hum. Lact.* 24, 371–376.
- Singh, H., 2006. The milk fat globule membrane - A biophysical system for food applications. *Curr. Opin. Colloid In.* 11, 154–163.
- Singh, H., 2004. Heat stability of milk. *Int. J. Dairy Technol.* 57, 111–119.
- Siwach, R., Tokas, J., Seth, R., 2016. Use of lycopene as a natural antioxidant in extending the shelf-life of anhydrous cow milk fat. *Food Chem.* 199, 541–546.
- Skibieli, A.L., Downing, L.M., Orr, T.J., Hood, W.R., 2013. The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *J. Anim. Ecol.* 82, 1254–1264.
- Slavov, A.K., 2017. General characteristics and treatment possibilities of dairy wastewater - A review. *Food Technol. Biotech.* 55, 14–28.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic

- acid. Anal. Biochem. 150, 76–85.
- Smoczyński, M., Staniewski, B., Kielczewska, K., 2012. Composition and structure of the bovine milk fat globule membrane. Some nutritional and technological implications. Food Rev. Int. 28, 188–202.
- Smolenski, G., Haines, S., Kwan, F.Y.S., Bond, J., Farr, V., Davis, S.R., Stelwagen, K., Wheeler, T.T., 2007. Characterisation of host defence proteins in milk using a proteomic approach. J. Proteome Res. 6, 207–215.
- Sodini, I., Morin, P., Olabi, A., Jiménez-Flores, R., 2006. Compositional and functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, and whey buttermilk. J. Dairy Sci. 89, 525–536.
- Sørensen, E.S., Petersen, T.E., 1993. Purification and characterization of three proteins isolated from the proteose peptone fraction of bovine milk. J. Dairy Res. 60, 189–197.
- Sørensen, E.S., Rasmussen, L.K., Møller, L., Petersen, T.E., 1997. The localization and multimeric nature of component PP3 in bovine milk: purification and characterization of PP3 from caprine and ovine milks. J. Dairy Sci. 80, 3176–3181.
- Sousa, S.G., Delgadillo, I., Saraiva, J.A., 2014. Human milk composition and preservation: evaluation of high-pressure processing as a nonthermal pasteurization technology. Crit. Rev. Food Sci. 56, 1043–1060.
- Spalatel, C., 2012. Biotechnological valorisation of cheese whey. Innov. Rom. Food Biotech. 10, 1–8.
- Spitsberg, V.L., 2005. Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. J. Dairy Sci. 88, 2289–2294.
- Spitsberg, V.L., Gorewit, R.C., 2002. Isolation, purification and characterization of fatty-acid-binding protein from milk fat globule membrane: effect of bovine growth hormone treatment. Pakistan J. Nutr. 1, 43–48.
- Spitsberg, V.L., Matitashvili, E., Gorewit, R.C., 1995. Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland. Eur. J. Biochem. 230, 872–878.
- Sprong, R.C., Hulstein, M.F.E., Lambers, T.T., Van Der Meer, R., 2012. Sweet buttermilk intake reduces colonisation and translocation of *Listeria monocytogenes* in rats by inhibiting mucosal pathogen adherence. Brit. J. Nutr. 108, 2026–2033.
- Stack, A., Sillen, G., 1998. Bactofugation of liquid milks. Nutr. Food Sci. 98, 280–282.
- Stanciuc, N., Râpeanu, G., 2010. An overview of bovine  $\alpha$ -lactalbumin structure and functionality. Food Technol. 34, 82–93.
- Stelwagen, K., Carpenter, E., Haigh, B., Hodgkinson, A., Wheeler, T.T., 2009. Immune components of bovine colostrum and milk. J. Anim. Sci. 87, 3–9.
- Stessl, B., Hein, I., 2010. Identifying pathogens in milk, in: Griffiths, M.W. (Ed.), Improving the Safety and Quality of Milk. Woodhead, Boca Ratón, pp. 87–112.
- Stevens, C.R., Millar, T.M., Clinch, J.G., Kanczler, J.M., Bodamyali, T., Blake, D.R., 2000. Antibacterial

- properties of xanthine oxidase in human milk. *Lancet* 356, 829–830.
- Sugahara, T., Onda, H., Shinohara, Y., Horii, M., Akiyama, K., Nakamoto, K., Hara, K., 2005. Immunostimulation effects of proteose-peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1725, 233–240.
- Sundarraaj, A.A., Rajathi, A.A., Vishaal, S.C., Rohit, D., Prakash, M.S., 2018. Food biotechnology applications in dairy and dairy products. *J. Pharm. Res.* 12, 520–525.
- Suocheng, W., Zhuandi, G., Tuanjie, C., Ayimu, G., Fengling, T., 2013. Genotyping of calves rotavirus in China by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 189, 36–40.
- Superti, F., Ammendolia, M.G., Valenti, P., Seganti, L., 1997. Antiroviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med. Microbiol. Immunol.* 186, 83–91.
- Superti, F., Siciliano, R., Rega, B., Giansanti, F., Valenti, P., Antonini, G., 2001. Involvement of bovine lactoferrin metal saturation, sialic acid and protein fragments in the inhibition of rotavirus infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1528, 107–115.
- Suzuki, Y.A., Kelleher, S.L., Yalda, D., Wu, L., Huang, J., Huang, N., Lönnerdal, B., 2003. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 36, 190–199.
- Svanborg, S., Johansen, A.G., Abrahamsen, R.K., Skeie, S.B., 2015. The composition and functional properties of whey protein concentrates produced from buttermilk are comparable with those of whey protein concentrates produced from skimmed milk. *J. Dairy Sci.* 98, 5829–5840.
- Svensson, M., Sabharwal, H., Håkansson, A., Mossberg, A.K., Lipniunas, P., Leffler, H., Svanborg, C., Linse, S., 1999. Molecular characterization of  $\alpha$ -lactalbumin folding variants that induce apoptosis in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 274, 6388–6396.
- Svensson, O., Arnebrant, T., 2010. Mucin layers and multilayers - physicochemical properties and applications. *Curr. Opin. Colloid In.* 15, 395–405.
- Swaigood, H.E., 2003. Chemistry of the caseins, in: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry. Proteins*. Springer, Boston, pp. 139–201.
- Takimori, S., Shimaoka, H., Furukawa, J., Yamashita, T., Amano, M., Fujitani, N., Takegawa, Y., Hammarström, L., Kacs Kovics, I., Shinohara, Y., et al., 2011. Alteration of the N-glycome of bovine milk glycoproteins during early lactation. *FEBS J.* 278, 3769–3781.
- Tamayo, G., Sáenz, A., Hernández, M.R., Pedrón, C., García, M.D., 1997. Fórmulas infantiles especiales. *An. Españoles Pediatría* 47, 455–465.
- Tao, N., DePeters, E.J., Freeman, S., German, J.B., Grimm, R., Lebrilla, C.B., 2008. Bovine milk glycome. *J. Dairy Sci.* 91, 3768–3778.
- Tate, J.E., Burton, A.H., Boschi-Pinto, C., Parashar, U.D., 2016. Global, regional, and national estimates

- of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clin. Infect. Dis.* 62, 96–105.
- Taylor, C.M., Woonton, B.W., 2009. Quantity and carbohydrate content of glycomacropeptide fractions isolated from raw and heat-treated milk. *Int. Dairy J.* 19, 709–714.
- Thomä-Worringer, C., Sørensen, J., López-Fandiño, R., 2006. Health effects and technological features of caseinomacropeptide. *Int. Dairy J.* 16, 1324–1333.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855.
- Tiengou, L.E., Gloro, R., Pouzoulet, J., Bouhier, K., Read, M.H., Arnaud-Battandier, F., Plaze, J.M., Blaizot, X., Dao, T., Piquet, M.A., 2006. Semi-elemental formula or polymeric formula: is there a better choice for enteral nutrition in acute pancreatitis? Randomized comparative study. *JPEN-Parenter. Enter.* 30, 1–5.
- Tino De Franco, M., Vieira, P.D., Santos, S.M.R., Ferreira, T.L., Araújo, E.D., Quintal, V.S., Carbonare, S.B., 2013. Neutralizing activity and secretory IgA antibodies reactive with rotavirus SA-11 (serotype G3) in colostrum and milk from Brazilian women. *Paediatr. Int. Child H.* 33, 102–107.
- Torres-Flores, J.M., Silva-Ayala, D., Espinoza, M.A., López, S., Arias, C.F., 2015. The tight junction protein JAM-A functions as coreceptor for rotavirus entry into MA104 cells. *Virology* 475, 172–178.
- Touch, V., Hayakawa, S., Yamada, S., Kaneko, S., 2004. Effects of a lactoperoxidase-thiocyanate-hydrogen peroxide system on *Salmonella enteritidis* in animal or vegetable foods. *Int. J. Food Microbiol.* 93, 175–183.
- Tovar-Hernández, G., Peña, H.R., Velázquez, G., Ramírez, J.A., Torres, J.A., 2005. Effect of combined thermal and high pressure processing on the microbial stability of milk during refrigerated storage. *Annu. Meet. New Orleans.*
- Trojnar, E., Sachsenröder, J., Twardziok, S., Reetz, J., Otto, P.H., Johne, R., 2013. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 94, 136–142.
- Trujillo, A.J., Capellas, M., Saldo, J., Gervilla, R., Guamis, B., 2002. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. *Innov. Food Sci. Emerg.* 3, 295–307.
- Tully, D.B., Jones, F., Tully, M.R., 2001. Currents in human milk banking. Donor milk: what's in it and what's not. *J. Hum. Lact.* 17, 152–155.
- Uhnoo, I., Olding-Stenkvis, E., Kreuger, A., 1986. Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses, and bacteria. *Arch. Dis. Child.* 61, 732–738.
- Updegrave, K., 2005. Human milk banking in the United States. *Newborn Infant Nurs. Rev.* 5, 27–33.
- Urashima, T., Saito, T., Nakamura, T., Messer, M., 2001. Oligosaccharides of milk and colostrum in non-human mammals. *Glycoconjugate J.* 18, 357–371.

- Van Boekel, M.A.J.S., Weerens, C.N.J.M., Holstra, A., Scheidtweiler, C.E., Alink, G.M., 1993. Antimutagenic effects of casein and its digestion products. *Food Chem. Toxicol.* 31, 731–737.
- van Hooijdonk, A.C.M., Kussendrager, K.D., Steijns, J.M., 2000. *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defence. *Brit. J. Nutr.* 84, 127–134.
- van Veen, H.A., Geerts, M.E.J., van Berkel, P.H.C., Nuijens, J.H., 2004. The role of N-linked glycosylation in the protection of human and bovine lactoferrin against tryptic proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 271, 678–684.
- Vandenplas, Y., Rudolph, C.D., Di Lorenzo, C., Hassall, E., Liptak, G., Mazur, L., Sondheimer, J., Staiano, A., Thomson, M., Veereman-Wauters, G., 2009. Pediatric gastroesophageal reflux clinical practice guidelines. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 49, 498–547.
- Vanderghem, C., Bodson, P., Danthine, S., Paquot, M., Deroanne, C., Blecker, C., 2010. Milk fat globule membrane and buttermilks: from composition to valorization. *Biotechnol. Agron. Soc.* 14, 485–500.
- Vanderghem, C., Danthine, S., Blecker, C., Deroanne, C., 2007. Effect of proteose-peptone addition on some physico-chemical characteristics of recombined dairy creams. *Int. Dairy J.* 17, 889–895.
- Vanderghem, C., Francis, F., Danthine, S., Deroanne, C., Paquot, M., De Pauw, E., Blecker, C., 2011. Study on the susceptibility of the bovine milk fat globule membrane proteins to enzymatic hydrolysis and organization of some of the proteins. *Int. Dairy J.* 21, 312–318.
- Varada, J.C., Teferedegne, B., Crim, R.L., Mdluli, T., Audet, S., Peden, K., Beeler, J., Murata, H., 2013. A neutralization assay for respiratory syncytial virus using a quantitative PCR-based endpoint assessment. *Virol. J.* 10, 195–206.
- Verraes, C., Vlaemynck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M., Herman, L., 2015. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *Int. Dairy J.* 50, 32–44.
- Vesikari, T., 2016. Rotavirus vaccines and vaccination, in: Svensson, L., Desselberger, U., Greenberg, H.B., Estes, M.K. (Eds.), *Viral Gastroenteritis. Molecular Epidemiology and Pathogenesis*. Academic Press, Cambridge, pp. 301–328.
- Vestman, N.R., Timby, N., Holgerson, P.L., Kressirer, C.A., Claesson, R., Domellöf, M., Öhman, C., Tanner, A.C., Hernell, O., Johansson, I., 2013. Characterization and *in vitro* properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol.* 13, 193–205.
- Vianna, P.C.B., Walter, E.H.M., Dias, M.E.F., Faria, J.A.F., Netto, F.M., Gigante, M.L., 2012. Effect of addition of CO<sub>2</sub> to raw milk on quality of UHT-treated milk. *J. Dairy Sci.* 95, 4256–4262.
- Vieira, A.A., Soares, F.V.M., Pimenta, H.P., Abranches, A.D., Moreira, M.E.L., 2011. Analysis of the influence of pasteurization, freezing/thawing, and offer processes on human milk's macronutrient concentrations. *Early Hum. Dev.* 87, 577–580.



- Vissac, C., Lémery, D., Le Corre, L., Fustier, P., Déchelotte, P., Maurizis, J.C., Bignon, Y.J., Bernard-Gallon, D.J., 2002. Presence of BRCA1 and BRCA2 proteins in human milk fat globules after delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1586, 50–56.
- Vogel, H.J., 2012. Lactoferrin, a bird's eye view. *Biochem. Cell Biol.* 90, 233–244.
- von Berg, A., Koletzko, S., Filipiak-Pittroff, B., Laubereau, B., Grübl, A., Wichmann, H.E., Bauer, C.P., Reinhardt, D., Berdel, D., 2007. Certain hydrolyzed formulas reduce the incidence of atopic dermatitis but not that of asthma: three-year results of the German Infant Nutritional Intervention Study. *J. Allergy Clin. Immun.* 119, 718–725.
- Wakabayashi, H., Miyauchi, H., Shin, K., Yamauchi, K., Matsumoto, I., Abe, K., Takase, M., 2007. Orally administered lactoperoxidase increases expression of the FK506 binding protein 5 gene in epithelial cells of the small intestine of mice: a DNA microarray study. *Biosci. Biotech. Bioch.* 71, 2274–2282.
- Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Takase, M., 2006. Lactoferrin research, technology and applications. *Int. Dairy J.* 16, 1241–1251.
- Walstra, P., 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *Int. Dairy J.* 9, 189–192.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J., 2006. *Dairy Science and Technology*. 2nd ed., CRC Press, Boca Ratón.
- Wang, R.M., Mao, J.J., Song, J.F., Huo, C.X., He, Y.F., 2007. Antioxidant activity of bovine serum albumin binding amino acid Schiff-bases metal complexes. *Chinese Chem. Lett.* 18, 1416–1418.
- Wang, S.M., Hwang, R. Der, Greenberg, A.S., Yeo, H.L., 2003. Temporal and spatial assembly of lipid droplet-associated proteins in 3T3-L1 preadipocytes. *Histochem. Cell Biol.* 120, 285–292.
- Wang, X., Hirno, S., Willen, R., Wadstrom, T., 2001. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J. Med. Microbiol.* 50, 430–435.
- Ward, P.P., Piddington, C.S., Cunningham, G.A., Zhou, X., Wyatt, R.D., Conneely, O.M., 1995. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Bio/Technology* 13, 498–503.
- Ward, R.L., Knowlton, D.R., Pierce, M.J., 1984. Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. *J. Clin. Microbiol.* 19, 748–753.
- Watanabe, S., Murata, S., Kumura, H., Nakamura, S., Bollen, A., Moguilevsky, N., Shimazaki, K., 2000. Bovine lactoperoxidase and its recombinant: comparison of structure and some biochemical properties. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 274, 756–761.
- Wei, Z., Nishimura, T., Yoshida, S., 2000. Presence of a glycan at a potential N-glycosylation site, Asn-281, of bovine lactoferrin. *J. Dairy Sci.* 83, 683–689.
- West, A.P., Shadel, G.S., Ghosh, S., 2011. Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 389–402.

- Whanger, P.D., 2004. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Brit. J. Nutr.* 91, 11–28.
- Wilson, N.L., Robinson, L.J., Donnet, A., Bovetto, L., Packer, N.H., Karlsson, N.G., 2008. Glycoproteomics of milk: differences in sugar epitopes on human and bovine milk fat globule membranes. *J. Proteome Res.* 7, 3687–3696.
- Wirjantoro, T.I., Lewis, M.J., Grandison, A.S., Williams, G.C., Delves-Broughton, J., 2001. The effect of nisin on the keeping quality of reduced heat-treated milks. *J. Food Protect.* 64, 213–219.
- Wojcik, K.Y., Rechtman, D.J., Lee, M.L., Montoya, A., Medo, E.T., 2009. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 137–140.
- Wolber, F.M., Broomfield, A.M., Fray, L., Cross, M.L., Dey, D., 2005. Supplemental dietary whey protein concentrate reduces rotavirus-induced disease symptoms in suckling mice. *J. Nutr.* 135, 1470–1474.
- Wu, F., Liu, Y., Li, J., Hou, L., Lei, F., Huang, S., Feng, L., Zhao, X., 2017. Human serum albumin-mediated apoptin delivery suppresses breast cancer cell growth *in vitro* and *in vivo*. *Oncol. Lett.* 13, 579–586.
- Wu, H., Monroe, D.M., Church, F.C., 1995. Characterization of the glycosaminoglycan-binding region of lactoferrin. *Arch. Biochem. Biophys.* 317, 85–92.
- WuDunn, D., Spear, P.G., 1989. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J. Virol.* 63, 52–58.
- Wyatt, R., James, W., Bohl, E., Theil, K., Saif, L., Kalica, A., Greenberg, H., Kapikian, A., Chanock, R., 1980. Human rotavirus type 2: cultivation *in vitro*. *Science* 207, 189–191.
- Yabe, U., Sato, C., Matsuda, T., Kitajima, K., 2003. Polysialic acid in human milk: CD36 is a new member of mammalian polysialic acid-containing glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 278, 13875–13880.
- Yadav, J.S.S., Yan, S., Pilli, S., Kumar, L., Tyagi, R.D., Surampalli, R.Y., 2015. Cheese whey: a potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnol. Adv.* 33, 756–774.
- Ye, A., Cui, J., Singh, H., 2011. Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during *in vitro* gastric digestion of milk. *J. Dairy Sci.* 94, 2762–2770.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S., 2004. Interactions of whey proteins with milk fat globule membrane proteins during heat treatment of whole milk. *Lait* 84, 269–283.
- Ye, A., Singh, H., Taylor, M.W., Anema, S., 2002. Characterization of protein components of natural and heat-treated milk fat globule membranes. *Int. Dairy J.* 12, 393–402.
- Yolken, R.H., Peterson, J.A., Vonderfecht, S.L., Fouts, E.T., Midthun, K., Newburg, D.S., 1992. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest.* 90, 1984–1991.
- Yolken, R.H., Willoughby, R., Wee, S., Miskuff, R., Vonderfecht, S., 1987. Sialic acid glycoproteins

- inhibit *in vitro* and *in vivo* replication of rotaviruses. *J. Clin. Invest.* 79, 148–154.
- Youden, W.J., Steiner, E.H., 1975. Statistical manual of the association of official analytical chemists, AOAC International. Arlington.
- Yu, X., Blanchard, H., 2014. Carbohydrate recognition by rotaviruses. *J. Struct. Funct. Genom.* 15, 101–106.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Guerrero, C.A., Arias, C.F., López, S., 2000a. Integrin  $\alpha 2\beta 1$  mediates the cell attachment of the Rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology* 278, 50–54.
- Zárate, S., Espinosa, R., Romero, P., Méndez, E., Arias, C.F., López, S., 2000b. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. *J. Virol.* 74, 593–599.
- Zavaleta, N., Figueroa, D., Rivera, J., Sánchez, J., Alfaro, S., Lönnnerdal, B., 2006. Efficacy of rice-based oral rehydration solution containing recombinant human lactoferrin and lysozyme in Peruvian children with acute diarrhea. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 44, 258–264.
- Zhang, S., Liu, L., Pang, X., Lu, J., Kong, F., Lv, J., 2016. Use of microfiltration to improve quality and shelf life of ultra-high temperature milk. *J. Food Process. Pres.* 40, 707–714.
- Zhang, X., Ding, K., Yu, X., Chang, W., Sun, J., Zhou, Z.H., 2015. *In situ* structures of the segmented genome and RNA polymerase complex inside a dsRNA virus. *Nature* 527, 531–534.
- Zheng, H., Jiménez-Flores, R., Everett, D.W., 2013. Bovine milk fat globule membrane proteins are affected by centrifugal washing processes. *J. Agr. Food Chem.* 61, 8403–8411.
- Zimmerman, A.W., Veerkamp, J.H., 2002. New insights into the structure and function of fatty acid-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1096–1116.



## 8. Apéndices

---



## 8. APÉNDICES

### 8.1. Apéndice 1. Características de las revistas

En la **Tabla 41** se muestran las principales características de las revistas en las que han sido publicados los artículos que conforman la presente tesis por compendio. Se especifican los nombres de las revistas, sus índices de impacto (según el Journal of Citation Reports), las áreas temáticas a las que pertenecen y el año y fase de publicación en la que se encuentran.

**Tabla 41.** Características principales de las revistas de publicación de los artículos que conforman esta tesis por compendio.

Artículo	Revista	Índice impacto	Área temática	Año	Estado
1	International Dairy Journal	2,067	Food Science & Technology	2016	Publicado
2	Journal of Agricultural and Food Chemistry	3,154	Agriculture, Chemistry, Food Science & Technology	2017	Publicado
3	Biometals	2,183	Biochemistry & Molecular Biology	2018	Publicado
4	Journal of Functional Foods	3,144	Food Science & Technology	2018	Publicado
5	Innovative Food Science and Emerging Technologies	2,573	Food Science & Technology	2018	Publicado
6	Innovative Food Science and Emerging Technologies	2,573	Food Science & Technology	2018	Publicado

## 8.2. Apéndice 2. Contribución del doctorando

Dña. M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua y D. Miguel Calvo Rebollar, ambos Catedráticos del Área de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

### **Certifican:**

Que D. **José Antonio Parrón Quesada**, con DNI nº 76918492-Y, es el autor principal del trabajo experimental y de la redacción de todos los artículos que conforman la presente Tesis Doctoral titulada “Estudio de las proteínas con actividad antirrotavirus presentes en las fracciones y derivados lácteos para su utilización en productos funcionales”, que ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

Y para que así conste, firman la presente en Zaragoza, a 15 de octubre de 2018



Fdo.: M<sup>a</sup> Lourdes Sánchez Paniagua



Fdo.: Miguel Calvo Rebollar



### 8.3. Apéndice 3. Renuncia de coautores no Doctores

Dña. **Mª Lourdes Sánchez Paniagua** y D. **Miguel Calvo Rebollar**, como directores de la presente memoria presentada por D. **José Antonio Parrón Quesada**, con DNI nº 76918492-Y, para optar al grado de Doctor,

**Certifican:**

Que todos los coautores de los artículos presentados en la modalidad de compendio de publicaciones en dicha memoria son Doctores, a excepción de Dña. Zeynep Semen y Dña. Ana Cristina Sánchez, quienes han renunciado expresamente a presentar dichos trabajos como parte de otra Tesis Doctoral, lo que consta en documentos adjuntos.

A continuación se indican los coautores Doctores de los artículos que conforman el compendio:

Daniel Ripollés  
Lourdes Sánchez  
María Dolores Pérez  
Miguel Calvo  
Jan Trige Rasmussen  
Carlos Federico Arias  
Susana López  
Sergio José Ramos  
Pedro Rubio  
Fanny Navarro

Y para que así conste, firman la presente en Zaragoza, a 15 de octubre de 2018



Fdo.: Mª Lourdes Sánchez Paniagua



Fdo.: Miguel Calvo Rebollar




Escuela de Doctorado  
Universidad Zaragoza

## RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Semen	Nombre: Zeynep	
DNI/Pasaporte/NIE: U14970378	Teléfono +905665034078	Correo electrónico zeynepsemen@hotmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: Estudio de las proteínas con actividad antirrotavirus presentes en las fracciones y derivados lácteos para su utilización en productos funcionales
Autor: José Antonio Parrón Quesada (DNI 76918492-Y)
Programa de doctorado: Calidad, seguridad y tecnología de los alimentos

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Antirrotaviral potential of lactoferrin from different origin: effect of thermal and high pressure treatments. Biometals (2018). DOI: 10.1007/s10534-018-0088-4).

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Ankara a 4 de junio de 2018
Firma: Zeynep Semen 




Escuela de Doctorado  
Universidad Zaragoza

## RENUNCIA DE LOS COAUTORES DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS COMO PARTE DE UNA TESIS DOCTORAL EN LA MODALIDAD DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES

1.- Datos personales del coautor		
Apellidos: Sánchez Sánchez	Nombre: Ana Cristina	
DNI/Pasaporte/NIE: SNSNAN90032909M900	Teléfono 4626213188	Correo electrónico ana.san.sanchez@hotmail.com

2.- Tesis Doctoral
Título: Estudio de las proteínas con actividad antirrotavirus presentes en las fracciones y derivados lácteos para su utilización en productos funcionales
Autor: José Antonio Parrón Quesada (DNI nº 76918492-Y)
Programa de doctorado: Calidad, seguridad y tecnología de los alimentos

3.- Publicaciones que formarán parte de la tesis y de las que el firmante es coautor
Antirrotaviral activity of bovine milk components: Extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. Journal of Functional Foods (2018, 44, 103-111. DOI: 10.1016/j.jff.2018.03.002).

RENUNCIA:
Renuncio a que las publicaciones anteriores puedan ser presentadas como parte de otra tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.
<lugar>, <fecha> Cuernavaca a 4 de junio de 2018
 Firma: Ana Cristina Sánchez



*“Post nubila phoebus”*

*“Después de las nubes, el sol”*

*“Patientia vincit omnia”*

*“La paciencia todo lo vence”*