



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en

Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Efecto de los tratamientos tecnológicos en la digestión gastrointestinal *in vitro* de las proteínas bioactivas de la leche de vaca

Effect of technological treatments on the *in vitro* gastrointestinal digestion of bioactive cow's milk proteins

Autora

Laura Serrano Luna

Directoras

M^a Lourdes Sánchez Paniagua

Inés Abad Chamorro

Facultad de
Veterinaria

2020/2021

Agradecimientos:

En primer lugar, agradecer a M^a Lourdes Sánchez Paniagua por haber confiado en mí para formar parte de esta investigación, por su apoyo y consejos a lo largo de la realización de este Trabajo Fin de Máster.

En segundo lugar a Inés Abad Chamorro, por su enorme paciencia y explicarme todos los procedimientos de los ensayos, por las ganas y el empeño que ha puesto durante toda la investigación. Por enseñarme que no hay que rendirse y por ello sé que conseguirás todo aquello que te propongas.

En tercer lugar, agradecer a todo el grupo de investigación, por la buena convivencia en el laboratorio y ayudarme con mis dudas.

Y por último, agradecer a mi familia, amigos y compañeros de clase, por hacer este año especial, apoyarme y animarme en todo momento.

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abreviaturas.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. La leche.....	3
3.2. Composición de la leche.....	4
3.2.1. Caseínas.....	5
3.2.2. Proteínas del lactosuero.....	6
3.2.2.1. Lactoferrina.....	7
3.2.3. Proteínas de la MFGM.....	8
3.3. Digestión gastrointestinal de las proteínas.....	9
3.4. <i>Cronobacter sakazakii</i>	11
4. Objetivos.....	13
5. Materiales y métodos.....	13
5.1. Obtención de las fracciones lácteas.....	13
5.2. Aislamiento y purificación de la lactadherina.....	14
5.3. Aislamiento de mucina.....	16
5.4. Técnicas electroforéticas.....	16
5.4.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).....	16
5.4.2. Tinción de geles con azul de Coomassie.....	17
5.4.3. Tinción de geles con ácido peryódico de Schiff (PAS).....	17
5.5. Preparación de muestras y fórmulas lácteas.....	18
5.6. Ensayos de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	19
5.7. Análisis de actividad de la tripsina.....	21
5.8. Determinación del grado de hidrólisis tras la digestión.....	21
5.9. Cultivo de <i>Cronobacter sakazakii</i>	22
5.10. Ensayo de actividad antibacteriana frente a <i>C. sakazakii</i>	22
5.11. Análisis estadístico.....	23
6. Resultados y discusión.....	24
6.1. Aislamiento y purificación de la lactadherina.....	24
6.2. Aislamiento y purificación de la mucina.....	25
6.3. Análisis de actividad de la tripsina.....	26
6.4. Grado de hidrólisis tras la digestión gastrointestinal <i>in vitro</i>	27
6.5. Actividad antibacteriana frente a <i>C. sakazakii</i>	29
7. Conclusiones.....	40
8. Bibliografía.....	41

1. Resumen/Abstract

La leche es una fuente de proteínas con alto valor nutricional y algunas de ellas con actividades biológicas. Estas proteínas bioactivas son esenciales para el desarrollo del recién nacido y también pueden utilizarse como ingredientes de alimentos especiales. Así, algunas proteínas de la leche tienen una función antimicrobiana, como la lactoferrina y las inmunoglobulinas del lactosuero, y la lactadherina y la mucina de la membrana del glóbulo graso. Estas proteínas se utilizan para suplementar las leches de fórmula, con el fin de fortalecer las defensas del bebé frente a algunas bacterias patógenas como *Cronobacter sakazakii*. Se trata de un patógeno emergente que preocupa a la salud pública, puesto que puede producir infecciones en niños y personas inmunodeprimidas. Los principales casos notificados de infecciones causadas por *C. sakazakii* en lactantes se han relacionado con el consumo de leches de fórmula en polvo contaminadas, que aunque tienen un tratamiento térmico no son estériles. Por ello, es necesario estudiar el efecto de los tratamientos tecnológicos y de la digestión gastrointestinal en la actividad antibacteriana de las proteínas lácteas defensivas.

Milk is a source of proteins with high nutritional value and some of them with biological activities. These bioactive proteins are essential for the development of the newborn and can also be used as ingredients for special food products. Thus, some milk proteins have an antimicrobial function, such as lactoferrin and immunoglobulins from whey, and lactadherin and mucin from the milk fat globule membrane. These proteins are used to supplement formula milk, in order to strengthen baby's defences against some pathogenic bacteria, such as *Cronobacter sakazakii*. This is an emerging pathogen of public health concern, since it can cause infections in children and immunosuppressed people. The main reported cases of *C. sakazakii* infections in infants have been associated with the consumption of contaminated powdered formula, which are not sterile although they receive heat treatment. Therefore, it is necessary to study the effect of technological treatments and gastrointestinal digestion on the antibacterial activity of defensive milk proteins.

2. Abreviaturas

ANOVA: Analysis of Variance (Análisis de Varianza)

BSA: albúmina de suero bovino

DG: digerido gástrico

DI: digerido intestinal

DS: digerido salivar

ECN: enterocolitis necrotizante

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGF: epidermal grow factor (factor de crecimiento epidérmico)

Igs: inmunoglobulinas

LD: lactadherina

LF: lactoferrina

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

PAS: periodic acid Schiff (ácido peryódico de Schiff)

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

SGS: solución gástrica simulada

SIS: solución intestinal simulada

SSS: solución salivar simulada

TAME: p-tolueno-sulfonil-L-arginina-metil-éster

TNBS: ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico

TSA: tryptic soy agar (agar tripticasa de soja)

TSB: tryptic soy broth (caldo tripticasa de soja)

UFC: unidades formadoras de colonias

YE: yeast extract (extracto de levadura)

3. Introducción

3.1. La leche

De acuerdo con el Codex Alimentarius (1999), la leche se define como la secreción mamaria normal obtenida de animales lecheros mediante uno o más ordeños, sin ningún tipo de adición o extracción, destinada al consumo como leche líquida o a su procesamiento. De forma similar, según el Reglamento (CE) n° 853/2004, la leche es la secreción de la glándula mamaria de animales de abasto que no haya sido calentada a una temperatura superior a 40 °C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente. En función de la especie animal existen diferentes tipos de leche (Tabla 1), pero todas coinciden en sus componentes principales, aunque en diferentes proporciones. Estos componentes son: agua, proteína, materia grasa y lactosa (Hazard, 1997).

La leche se caracteriza por ser un alimento muy completo, por ello cuenta con una gran demanda y es considerada un elemento básico en la dieta. Su principal proteína, la caseína, contiene los aminoácidos esenciales y es fuente de calcio, fósforo y riboflavina (vitamina B12), contribuyendo significativamente a los requerimientos de vitamina A y B1 (tiamina) (Gómez y Mejía, 2005).

Tabla 1. Composición general de la leche en diferentes especies (por cada 100 g de leche) (Gómez y Mejía, 2005).

Especie	Agua (g)	Energía (Kcal)	Proteína (g)	Grasa (g)	Lactosa (g)	Minerales (g)
Bovina	88	61	3,2	3,4	4,7	0,72
Búfala	84	97	3,7	6,9	5,2	0,79
Humana	87,5	7,0	1,0	4,4	6,9	0,20

La leche materna es la mejor fuente de nutrición para el recién nacido, ya que contiene una gran cantidad de agentes bioactivos. Sin embargo, esta lactancia no es posible en todos los casos, por lo que se fabrican fórmulas lácteas que la sustituyen o la complementan. Las leches más utilizadas como base para elaborar estas fórmulas son la de vaca y la de soja, a las que se les añaden otros ingredientes para parecerse lo máximo posible a la leche materna. Estos ingredientes son, principalmente, hierro, nucleótidos y mezclas de grasas más parecidas en el grado de saturación a la grasa de la leche materna (Maathuis *et al.*, 2017).

3.2. Composición de la leche

El agua es el componente principal de la leche, tratándose del medio de dispersión. En ella, los glóbulos grasos se encuentran en emulsión, algunas proteínas y otros componentes en solución y las caseínas en suspensión coloidal (Gómez y Mejía, 2005).

La lactosa es el principal carbohidrato de la leche de los mamíferos. Se trata de un disacárido compuesto por D-glucosa y D-galactosa (Figura 1). La leche contiene trazas de otros azúcares, incluyendo glucosa, fructosa, glucosamina, galactosamina y ácido N-acetilneuramínico, como componentes de glicoproteínas y glicolípidos. La concentración de lactosa en la leche varía entre especies, representando en la leche de vaca alrededor del 4,8%. La concentración de lactosa en la leche es inversamente proporcional a las concentraciones de lípidos y proteínas (Fox *et al.*, 2015a).

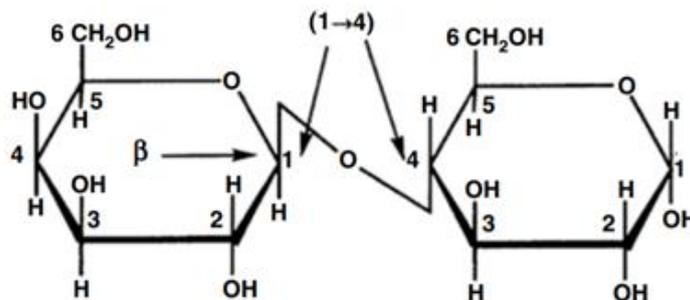


Figura 1. Estructura de la lactosa (Fox *et al.*, 2015a).

La leche bovina contiene aproximadamente un 3,5% de grasa, que se encuentra en forma de partículas emulsionadas denominadas glóbulos grasos, con un tamaño de entre 0,1 a 15 μm . Los glóbulos grasos están compuestos por un núcleo de triglicéridos apolares y están cubiertos por una envoltura de material tensioactivo, que es necesaria para mantener su estabilidad en la emulsión y protegerlos de la degradación enzimática y la coalescencia (Manoni *et al.*, 2020). Esta envoltura es conocida como la membrana del glóbulo graso (MFGM, de su nombre en inglés) y está compuesta por proteína, fosfolípidos, colesterol y glicéridos, principalmente. Los lípidos de la leche son una fuente importante de ácidos grasos esenciales y vitaminas liposolubles (A, D, E, K), además de contribuir al sabor y a las propiedades reológicas de los productos lácteos (Fox *et al.*, 2015b).

La proteína total que contiene la leche representa un 3,5% aproximadamente, y se divide en dos grupos: las caseínas y las proteínas séricas (Gómez y Mejía, 2005). La proporción de caseína con respecto a las proteínas del suero muestra claras diferencias entre especies, siendo en el caso de la leche de vaca de aproximadamente 80:20, y en la humana de 20:80. Además de estos dos grupos de proteínas, la MFGM contiene algunas proteínas únicas que representan aproximadamente el 1% de las proteínas totales de la leche (Fox *et al.*, 2015c).

Los principales minerales que encontramos en la leche son el calcio, fosfatos, citratos, cloruros, sulfatos, carbonatos, potasio y magnesio (Fox *et al.*, 2015d).

La leche contiene vitaminas como la A, D, E, K, B1, B2, B6, B12, C, carotenos, nicotinamida, biotina y ácido fólico, pero su concentración está sujeta a grandes oscilaciones. Por lo general, es la concentración de las vitaminas hidrosolubles la que se conserva constante (Gómez y Mejía, 2005).

En la leche existen dos grupos de enzimas. Por un lado las hidrolasas, entre las cuales se encuentran las lipasas, proteasas y esterasas y, por otro lado, las enzimas oxido-reductasas, entre las cuales destacan la catalasa y la lactoperoxidasa (Gómez y Mejía, 2005).

3.2.1. Caseínas

Las micelas de caseína son estructuras sólidas y esponjosas dispersas en un medio acuoso y presentan un diámetro medio de 160 nm. Las caseínas están formadas por un 92% de caseína y un 8% de sales, y constituyen el 80% de la proteína total de la leche de vaca (Ferrandini *et al.*, 2006). Las caseínas son las proteínas lácteas que se han identificado como la principal fuente de péptidos bioactivos tras su hidrólisis. Estos péptidos se obtienen mediante digestiones *in vitro* e *in vivo*. La mayor parte de la proteína es absorbida en forma de péptidos y no como aminoácidos libres. Además de la acción de las enzimas proteolíticas, los péptidos sufren una digestión adicional mediante las peptidasas. Se ha descubierto que determinados péptidos ejercen un efecto protector sobre el organismo, potenciando el sistema inmune o mostrando un efecto antimicrobiano. Además, dichos péptidos presentan efectos positivos en el sistema digestivo y en el sistema cardiovascular (Baró *et al.*, 2001).

Existen varios modelos que describen la estructura de la caseína, como el modelo submicelar, el cual consiste en que la micela de caseína está dividida en subunidades individuales. La estructura interna de la submicela se debe a las interacciones hidrofóbicas que se establecen entre las moléculas de caseína individuales α_s y β y a los puentes de fosfato cálcico. En la parte externa encontramos la κ -caseína con la parte hidrofílica del grupo carboxilo terminal sobresaliendo de la superficie micelar, en forma de vellosidad (Ferrandini *et al.*, 2006).

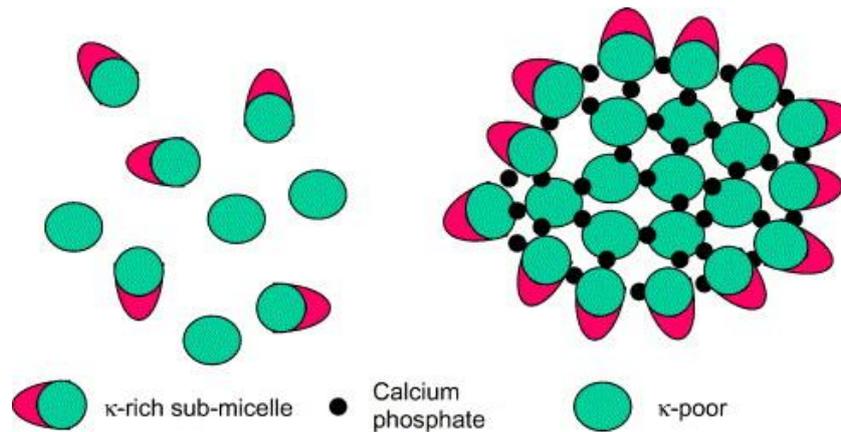


Figura 2. Modelo submicelar de la estructura de la caseína (Horne, 2006).

3.2.2. Proteínas del lactosuero

Las proteínas del lactosuero tienen un papel importante como aporte de aminoácidos, y pueden tener efectos biológicos y fisiológicos. Entre ellas, encontramos la α -lactalbúmina, la β -lactoglobulina, las inmunoglobulinas y la lactoferrina, entre otras (Baró *et al.*, 2001).

La α -lactalbúmina constituye aproximadamente el 17% de las proteínas del suero en la leche bovina. Está constituida por 123 aminoácidos y posee un peso molecular próximo a 14 kDa (Albis *et al.*, 2009). Tiene una composición rica en aminoácidos esenciales. Por ello, debido a su perfil de aminoácidos único, tiene un interesante potencial para múltiples usos: como componente de fórmulas infantiles, suplemento para promover la salud gastrointestinal y modular la función neurológica y como agente terapéutico (Layman *et al.*, 2018).

La β -lactoglobulina es una proteína globular perteneciente a la familia de las lipocalinas. Está constituida por 162 residuos de aminoácidos. La masa del monómero es de aproximadamente 18,3 kDa. Es la proteína de suero bovino más abundante y

representa más del 50% de la proteína de suero total. Posee propiedades antioxidantes además de ser un agente de transporte de ligandos, en particular compuestos hidrófobos (Gołębiowski *et al.*, 2020).

Las inmunoglobulinas forman un componente importante de la actividad inmunológica que posee la leche, y especialmente el calostro, donde están en elevados niveles. Las inmunoglobulinas se dividen en varias clases: IgM, IgA, IgG, IgE e IgD. Las principales clases de inmunoglobulinas presentes en las secreciones mamarias son las IgG, IgA e IgM, destacando las IgG por su mayor cantidad. Existen varias subclases de IgG, siendo las IgG1 y las IgG2 las principales inmunoglobulinas en el lactosuero. Todas las inmunoglobulinas monoméricas tienen la misma estructura molecular básica, y están compuestas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas, con una masa molecular total de aproximadamente 160 kDa (Hurley y Theil, 2011).

El lactosuero contiene otras proteínas minoritarias, como la lactoferrina, que aunque se encuentran en bajos niveles en la secreción láctea madura, están en niveles más elevados en el calostro y desempeñan funciones biológicas importantes para el recién nacido.

3.2.2.1. Lactoferrina

La lactoferrina (LF) es una glicoproteína fijadora de hierro, con un peso molecular de 80 kDa (Figura 3). Pertenece a la familia de las transferrinas, que participan en diversas funciones fisiológicas y protectoras, entre las que se encuentran las actividades antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorias y antimicrobianas (Sánchez *et al.*, 1992). Por tanto, esta proteína permite mejorar la inmunidad, la resistencia a las infecciones, la absorción de hierro y, en general, la salud humana (Superti, 2020).

La LF es fundamental en la dieta del lactante, puesto que desempeña funciones tanto protectoras de infecciones como promotoras de la maduración del sistema inmunológico innato y adaptativo (Superti, 2020). Basándose en las diversas funciones de la LF, en particular las antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias, en el estudio realizado por Superti (2020) se observó que la adición de LF a las fórmulas infantiles tenía importancia en la prevención de infecciones en recién nacidos, así como en la reducción de la mortalidad. El efecto antimicrobiano fue la primera actividad protectora identificada de la LF, y se ha demostrado ampliamente tanto *in vitro* como *in vivo*.

La actividad bacteriostática y bactericida de la LF frente a un gran número de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas se debe a dos mecanismos distintos. La actividad principal de la LF implica la unión y el secuestro del hierro libre en los sitios de infección, privando así a los microorganismos de este sustrato esencial para su crecimiento e induciendo un efecto bacteriostático. En cambio, la actividad bactericida implica una interacción directa con el agente infeccioso. Se han descrito interacciones específicas tanto con el ácido lipoteicoico en las bacterias Gram-positivas, como con los lipopolisacáridos en las bacterias Gram-negativas. Otros mecanismos de acción antimicrobiana son la ruptura de la membrana celular de los patógenos, la proteólisis de factores de virulencia microbiana, la inhibición de la adhesión microbiana a las células del huésped mediante la unión con los glicosaminoglicanos de las membranas y la mejora del crecimiento de la microbiota probiótica comensal normal en el intestino (Superti, 2020).

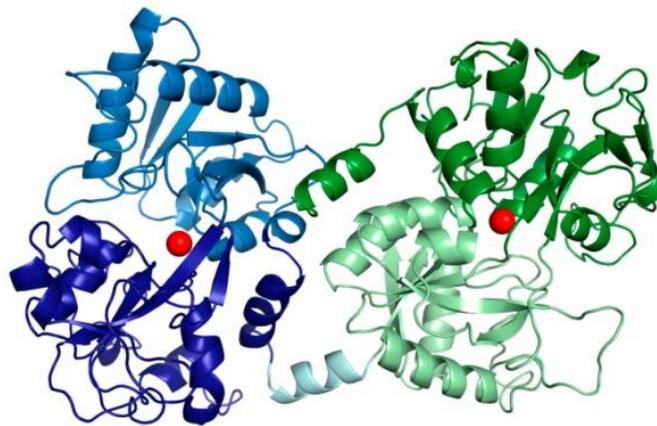


Figura 3. Estructura de la LF bovina. Las esferas rojas representan los átomos de hierro (Superti, 2020).

3.2.3. Proteínas de la MFGM

Las principales proteínas que encontramos en la MFGM son la mucina, la lactadherina (LD) y la butirofilina (Fox *et al.*, 2015b).

Las mucinas son proteínas altamente glicosiladas, con un peso molecular que puede variar desde 100 a 250 kDa (Gésime *et al.*, 2009). La estructura de la proteína contiene unidades repetidas en tándem de longitud variable, que consisten en los aminoácidos prolina, serina y treonina (Grondin *et al.*, 2020). Son moléculas de larga extensión que contienen un dominio extracelular N-terminal fuertemente *O*-glicosilado, un dominio transmembrana único y un dominio citoplásmico C-terminal (Chatterjee *et al.*, 2020).

Se clasifican en mucinas formadoras de geles y mucinas transmembrana (Grondin *et al.*, 2020). Para que un microorganismo pueda colonizar una célula, éste debe unirse a su superficie, proceso en el que la mucina podría desempeñar un papel específico, actuando de inhibidor competitivo. De esta forma, podría unirse a los microorganismos inhibiendo así su adherencia a las células de la pared intestinal (Patton y Muller, 1992).

Otra de las glicoproteínas que se encuentra en la MFGM es la LD, que es capaz de inhibir la infección por rotavirus cuando es de origen humano, mientras que la LD bovina no es activa contra el rotavirus humano (Civra *et al.*, 2015). La LD tiene una estructura con diferentes dominios, EGF1-EGF2-C1-C2 (Figura 4), representando EGF los dominios con homología con el factor de crecimiento epidérmico, y C los dominios carboxilo terminales, que comparten homología con los factores de coagulación sanguínea V y VIII. El dominio EGF2 muestra un motivo Arg-Gly-Asp (RGD) responsable de la unión a células y el C2 facilita la unión a fosfolípidos (Shi *et al.*, 2004).

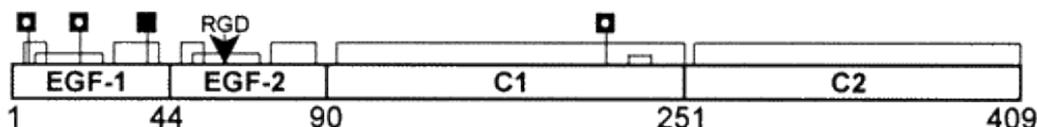


Figura 4. Representación de los dominios de la LD bovina. Los símbolos ■ indican los sitios de glicosilación. Las líneas muestran los sitios de unión de los puentes disulfuro (Andersen *et al.*, 2000).

3.3. Digestión gastrointestinal de las proteínas

La digestión es el proceso de descomposición mecánica y enzimática de los alimentos en sustancias para su absorción en el torrente sanguíneo. Los alimentos contienen tres macronutrientes que requieren digestión antes de poder ser absorbidos: grasas, carbohidratos y proteínas. A través del proceso de digestión, estos macronutrientes se descomponen en moléculas que pueden atravesar el epitelio intestinal y entrar al torrente sanguíneo para su uso en las células del cuerpo (Patricia y Dhamoon, 2021).

La ingesta proteica diaria es de 70 a 100 g de proteína dietética. Se necesita una variedad de enzimas proteolíticas para descomponer las proteínas de la dieta en péptidos pequeños y aminoácidos. Las proteínas o polipéptidos consumidos comienzan a

descomponerse en el estómago bajo la acción de la pepsina. La secreción gástrica (compuesta por HCl) altera la conformación del pepsinógeno producido para que pueda convertirse en pepsina activa en el estómago. Este ácido también desnaturaliza las proteínas, desplegándolas parcialmente para que las proteasas tengan un mejor acceso a sus enlaces peptídicos. La pepsina en el estómago comienza a hidrolizar las proteínas. Conforme el alimento avanza en el tracto digestivo, las proteasas pancreáticas se excretan junto con el bicarbonato pancreático, para neutralizar el ácido del estómago y elevar el pH a un nivel más óptimo para la actividad de dichas proteasas. Las proteasas pancreáticas (tripsina, quimotripsina, elastasa y carboxipeptidasa) escinden los polipéptidos en oligopéptidos y aminoácidos. La tripsina es la más específica y escinde los enlaces peptídicos. Los oligopéptidos que quedan después de la acción de estas endopeptidasas son atacados por las exopeptidasas, que escinden un aminoácido de un extremo de la cadena (Goodman, 2010).

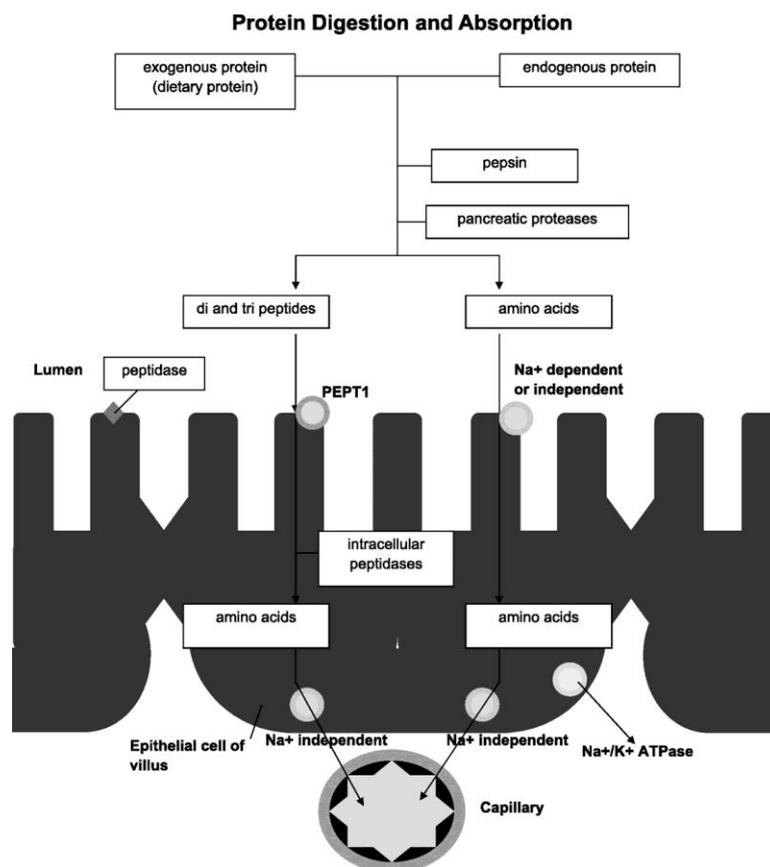


Figura 5. Etapas básicas de la digestión y absorción de proteínas con las principales enzimas y transportadores implicados (Goodman, 2010).

La leche es única en su cinética de digestión debido a que sus proteínas presentan propiedades diferentes a otras proteínas alimentarias. La coagulación de las caseínas en el compartimento gástrico, inducida por la pepsina y las condiciones ácidas, conduce a una digestión gástrica prolongada. Por el contrario, se ha demostrado que las proteínas solubles del lactosuero llegan al compartimento intestinal mucho más rápido (Egger *et al.*, 2019).

De igual manera, se debe señalar que las diferencias en la digestión no se deben únicamente a la naturaleza de las proteínas. De hecho, una proteína se puede digerir de manera diferente si se ha sometido a modificaciones durante el procesamiento industrial. Se sabe que procesos como el calentamiento desnaturalizan las proteínas del lactosuero, de forma que son más fácilmente digeribles. En el caso de la obtención de las caseínas para su uso como ingredientes, los procesos de acidificación afectan a su conformación, convirtiéndolas en caseinatos de sodio, mientras que la filtración por membranas consigue mantenerlas intactas (Atallah *et al.*, 2020).

3.4. *Cronobacter sakazakii*

Cronobacter es un bacilo Gram-negativo, móvil, con un tamaño de 1-3 μm aproximadamente. Se trata de un microorganismo anaerobio facultativo, no formador de esporas y generalmente tiene flagelos. Es catalasa positivo y oxidasa negativo (Luján Medina *et al.*, 2014).

C. sakazakii pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Este género consta de 7 especies: *C. sakazakii*, *C. condimenti*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis* y *C. universalis*. *C. sakazakii* se ha aislado de varios entornos, entre ellos alimentos y animales (Lepuschitz *et al.*, 2019).

Se trata de un patógeno termotolerante ya que el rango de temperatura para su crecimiento es de 6 a 45 °C, siendo el rango óptimo de 37 a 43 °C (Chenu y Cox, 2009). Las colonias producidas por este patógeno tienen una coloración amarillenta en agar de soja triptica (TSA) (Figura 6). Las colonias que pueden aparecer son de dos tipos: gomosas con bordes ondulados y colonias lisas con menos pigmento (Lehner y Stephan, 2004).

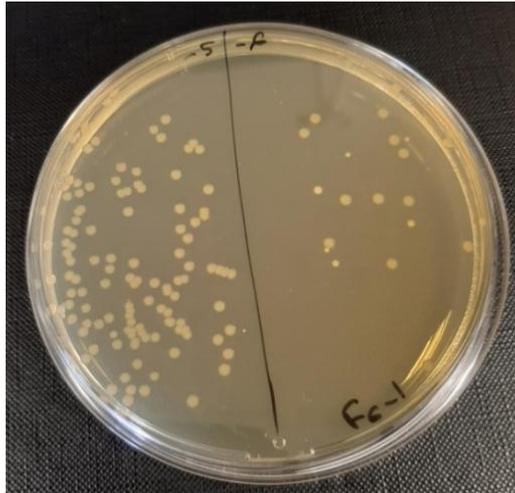


Figura 6. Crecimiento de colonias de *C. sakazakii* en placa de TSA, donde se observa su morfología característica.

Los principales casos notificados de enfermedad causada por *C. sakazakii* se dan en lactantes menores de 2 meses. Estos casos están relacionados con la contaminación de las leches de fórmula en polvo que, aunque tienen un tratamiento térmico, no son estériles. En el caso de que la leche de fórmula esté contaminada, la capacidad de *C. sakazakii* para tolerar las condiciones de baja humedad le permite sobrevivir durante largos períodos de tiempo en estos productos en polvo (Lepuschitz *et al.*, 2019).

Recientemente, se ha estudiado la resistencia de *Cronobacter* spp. a entornos adversos, especialmente en los que está sometido a la desecación y al estrés osmótico. Las características de *Cronobacter* que le permiten tolerar estas condiciones favorecen su persistencia a largo plazo en fórmulas infantiles y en productos que se encuentran en otras condiciones desfavorables (Du *et al.*, 2018).

Las infecciones causadas por *Cronobacter* spp. se han asociado con casos esporádicos de enfermedades potencialmente mortales como meningitis, enterocolitis necrotizante (ECN) y septicemia en lactantes. Los síntomas incluyen un tipo de meningitis que conduce a ventriculitis, absceso cerebral, hidrocefalia y formación de quistes, así como ECN caracterizada por necrosis intestinal y neumatosis intestinal; infecciones pulmonares, urinarias y del torrente sanguíneo (Chenu y Cox, 2009).

4. Objetivos

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster ha sido la evaluación de la actividad biológica de las proteínas lácteas y de sus péptidos generados tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Los objetivos parciales propuestos en el presente trabajo para alcanzar el objetivo general han sido:

1. Aislamiento de la lactadherina y mucina del glóbulo graso de la leche de vaca.
2. Preparación de fórmulas lácteas con lactosuero, mazada y proteínas bioactivas.
3. Evaluación del efecto de la digestión gastrointestinal *in vitro* en la lactoferrina y las fórmulas lácteas preparadas.
4. Evaluación del efecto de los tratamientos tecnológicos, como la pasteurización y la homogeneización, en la digestión de las fórmulas lácteas.
5. Estudio de la actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii* de las proteínas lácteas tras la digestión y después de los tratamientos tecnológicos.

5. Materiales y métodos

5.1. Obtención de las fracciones lácteas

La leche bovina cruda, proporcionada por la empresa Villacorona (El Burgo de Ebro, España), fue sometida a un control de calidad y a un posterior procesado en la Planta Piloto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza. En el control de calidad se valoró su pH, acidez, temperatura, porcentaje de materia grasa, la actividad de la fosfatasa alcalina y de la lactoperoxidasa. Esta leche se calentó a 45-50 °C durante 30 min en una cuba quesera. Tras este calentamiento, se realizó un proceso de desnatado de la leche, para lo que se introdujo dos veces consecutivas en una centrífuga desnatadora modelo ARR-DES 125 (Suministros Químicos Arroyo, Santander, España), obteniendo así la mayor cantidad de nata posible.

Esta nata se sometió a agitación mecánica con una batidora Philips Cucina (Philips, Ámsterdam, Holanda). El batido produjo la aglomeración de los glóbulos grasos y la inversión de fases. Así, se obtuvieron los granos de mantequilla y se produjo

la liberación de la mazada. Para eliminar los restos de grasa, se realizó una filtración de la mazada con gasas queseras y, posteriormente, se conservó en congelación.

El *butterserum*, que es la mazada retenida entre los granos de mantequilla, se obtuvo mediante agitación de los granos de mantequilla, previo calentamiento en una estufa durante 25 min a 40 °C, y centrifugación a 3.000 g a 20 °C durante 15 min, recogiendo la fase acuosa, correspondiente al *butterserum*.

5.2. Aislamiento y purificación de la lactadherina

El proceso de aislamiento empleado está basado en el protocolo de Kim *et al.* (1992), con algunas modificaciones. El aislamiento de la LD consta de tres fases: obtención de la fracción enriquecida en MFGM, delipidación de la misma y procesado de la fracción delipidada.

Para la primera fase de obtención de la fracción enriquecida en MFGM, se mezcló mazada y *butterserum* en una proporción 7:1 (v/v). Esta mezcla se ajustó a pH 4,8 con HCl 1 M y se dejó en agitación suave durante 30 min a 4 °C. Tras este periodo de incubación, se centrifugó a 40.000 g durante 30 min a 4 °C, obteniendo un precipitado correspondiente a la fracción enriquecida en MFGM. Este precipitado se resuspendió con agua mili-Q y se ajustó su pH a 6,8 con NaOH 0,1 M.

Para la delipidación de la fracción enriquecida en MFGM, se añadió una mezcla cloroformo-metanol (2:1, v/v) en una proporción 9:1 (mezcla:muestra, v/v) y se incubó en agitación toda la noche a 4 °C. Tras este periodo, se rompió la emulsión generada con un volumen de agua mili-Q y se centrifugó a 3.400 g, durante 15 min a 10 °C. Se recuperó la fracción intermedia, formada entre el metanol y el cloroformo, y se le añadió agua destilada. Esta fracción se llevó al rotavapor Laborota 4000 (Heidolph, Schwabach, Alemania) para eliminar los residuos de los solventes orgánicos. Tras la evaporación del líquido, la fracción delipidada de MFGM sin residuos se resuspendió en 12 mL de tampón NaCl 0,02 M y se centrifugó a 25.000 g durante 1 h a 4 °C. El precipitado formado se resuspendió en tampón Tris-HCl 0,1 M, KCl 1 M, pH 8,2, urea 5 M, y benzamidina 0,2 mM, que permite que la membrana se disgregue y se inhiban las proteasas presentes, facilitando la separación de la LD. Esta mezcla se dejó en agitación durante 12 h a 4 °C. Para conseguir una mayor concentración de LD, la

mezcla se centrifugó a 40.000 g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se concentró con una membrana de punto de corte de 10 kDa.

La purificación de las fracciones enriquecidas en LD se realizó mediante una cromatografía de filtración en gel. El gel utilizado en la columna fue el Sephacryl S-200 equilibrado con el tampón Tris-HCl descrito anteriormente. Se añadió la muestra concentrada a la columna, se le aplicó tampón a un flujo de 0,5 mL/min, y se recogieron fracciones de 1,6 mL. Una vez finalizada la cromatografía, las fracciones se analizaron en el espectrofotómetro modelo 6505 UV/Vis (Jenway, Stone, Reino Unido), midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 280 nm.

Los valores obtenidos se representaron gráficamente en un cromatograma y los picos con mayor absorbancia se caracterizaron mediante electroforesis para confirmar la presencia de LD. Las fracciones con LD se concentraron y se pasaron por una segunda purificación mediante una columna de Concanavalina A-Sepharose, que es una cromatografía de afinidad con una lectina que une glicoproteínas. Para ello, las muestras se dializaron frente al tampón de unión (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,5 M, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, pH 7,4) mediante ultrafiltración con una membrana de punto de corte de 10 kDa. La columna utilizada fue la Hi Trap Concanavalina A-Sepharose 4B de 1 mL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) en el equipo ÄKTA start (GE Healthcare), usando el programa UNICORN start v 1.1.

El flujo se ajustó a 1 mL/min para lavar la columna con 8 mL de agua destilada estéril y, posteriormente, se equilibró con otros 8 mL del tampón de unión anteriormente descrito. Una vez equilibrada la columna, se pasó la muestra con recirculación a un flujo de 0,5 mL/min durante 1 h. Después, se lavó la columna; primero con 10 mL del tampón de unión a un flujo de 1 mL/min para eliminar las proteínas no unidas a la columna, y después con 30 mL de tampón de elución, compuesto por Tris-HCl 0,02 M, pH 7,4 y metil- α -D-manopiranosido (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), para liberar la LD retenida en la columna. Este tampón de elución se aplicó sobre la columna creando un gradiente de 0 a 0,5 M del metil- α -D-manopiranosido. La absorbancia de las fracciones recogidas se determinó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm. Una vez realizada la elución, se regeneró la columna, para su posterior almacenamiento, con 10 mL de acetato de sodio 0,01 M, pH 6, NaCl 1 M, MnCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM y etanol al 20%.

La absorbancia de las fracciones se representó gráficamente y, aquellas que contenían una mayor absorbancia y teóricamente mayor cantidad de LD, se dializaron frente a agua destilada y se concentraron mediante ultrafiltración. Las muestras se caracterizaron mediante electroforesis, como se describirá en el apartado 5.4., para comprobar la presencia de LD.

5.3. Aislamiento de mucina

Basándonos en los protocolos de Gallier *et al.* (2012) y Le *et al.* (2012), se realizó el aislamiento de la mucina. Para ello, se partió de una fracción de mazada, obtenida con el proceso descrito en el punto 5.1. Esta mazada se sometió a una degradación enzimática, eliminando la presencia de otras proteínas y manteniendo únicamente la mucina, que persiste ante la proteólisis por su alto contenido en glicanos. Para ello, se mezclaron 1,5 mL de mazada y 18,5 mL de ácido fórmico al 5%, alcanzando un pH menor a 2. Seguidamente, se adicionó la pepsina gástrica porcina (Sigma-Aldrich) en una proporción 0,4:100 (p/p) y se incubó durante 2 h a 37 °C, con agitación suave. Para inactivar la pepsina, se ajustó el pH a 7 con NaOH 4 M. A continuación, la mezcla se concentró mediante una célula de ultrafiltración con una membrana de punto de corte de 30 kDa, dejando un volumen final de 2 mL de proteína concentrada.

La muestra obtenida por el procedimiento anterior se sometió a una cromatografía de filtración en gel con Sepharose CL-2B (Sigma-Aldrich), según el protocolo descrito por Kodama y Kimura (2004). Se añadió la muestra a la columna, equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8, con NaCl 0,15 M, EDTA 2 mM y 0,02% de ázida sódica. Se aplicó un flujo de 0,5 mL/min y se recogieron fracciones de 3 mL, cuyas absorbancias se determinaron a una longitud de onda de 280 nm, y se caracterizaron por electroforesis.

5.4. Técnicas electroforéticas

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

Mediante este método, que separa las proteínas por su diferente peso molecular, se caracterizaron las fracciones y las proteínas aisladas por cromatografía, así como las muestras tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

Para ello, se utilizó el equipo Mini-Protean Tetra Cell y los geles comerciales Mini-Protean de poliacrilamida 4-20% (ambos de la marca Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, EE.UU.). Las muestras a caracterizar se diluyeron en una proporción 1:1 (v/v) con un tampón compuesto por Tris-HCl 126 mM, pH 6,8, con 20% de glicerol, 4% de SDS, 0,02% de azul de bromofenol y un 10% de 2-mercaptoetanol. El proceso de electroforesis se desarrolló con un *running buffer* compuesto por Tris base 250 mM, glicina 1,92 M y 1% de SDS, pH 8,3. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se cargaron 15 µL de cada muestra en los pocillos del gel. El marcador de pesos moleculares empleado fue el Page Ruler Prestained Protein Ladder (GE Healthcare). A continuación, se aplicó un voltaje de 180 V utilizando el equipo Gene Power Supply GPS 200/400 (Pharmacia, Estocolmo, Suecia).

5.4.2. Tinción de geles con azul de Coomassie

Tras finalizar la electroforesis, se cubrió el gel con una solución de colorante azul de Coomassie, compuesto por 0,65 g/L de azul R-250 de Coomassie (Serva, Heidelberg, Alemania) disuelto en una mezcla de metanol, ácido acético, glicerol y agua destilada en proporciones 30:10:10:50 (v/v/v/v), respectivamente. El gel se incubó con el colorante durante una hora en agitación suave a temperatura ambiente. Pasada la hora se retiró el colorante y se añadió decolorante formado por metanol, ácido acético, glicerina y agua destilada en las proporciones 25:8:2:65 (v/v/v/v), respectivamente, en agitación suave hasta que se observaron las bandas de proteína y péptidos teñidas sobre un fondo incoloro. Por último, se escaneó el gel utilizando un escáner modelo Image Scanner III (GE Healthcare) y el programa Labscan v 6.0 para analizar los resultados.

5.4.3. Tinción de geles con ácido peryódico de Schiff (PAS)

Este método permite la tinción de glicoproteínas como la mucina y la LD. Para ello, el gel se dejó una noche en agitación suave con una solución de fijación, compuesta por ácido acético, metanol y agua destilada en las proporciones 10:35:55 (v/v/v), respectivamente. A continuación, se retiró la solución de fijación y el gel se cubrió con ácido acético al 5% y ácido peryódico (7 mg/mL), durante 1 h en agitación suave. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró esta solución y se añadió una solución de metabisulfito sódico (2 mg/mL) en ácido acético al 5% hasta observar en el gel un color amarillento; en ese momento, se retiró la solución y se cubrió el gel con la misma solución hasta que se decoloró. Una vez decolorado, se añadió el reactivo de Schiff y se incubó durante 2 h en agitación. Posteriormente, se retiró el reactivo y se adicionó, en

dos incubaciones de 7 min cada una, la solución de fijación empleada anteriormente. Una vez acabado este proceso, se escaneó el gel para analizar los resultados.

5.5. Preparación de muestras y fórmulas lácteas

Las muestras preparadas para los ensayos de digestión y posterior evaluación de actividad antimicrobiana fueron:

1. **LF bovina comercial:** donada por Tatua Nutritionals (Morrinsville, Nueva Zelanda) a una concentración de 10 mg/mL en agua destilada.
2. **Fórmula láctea 1 (F1):** compuesta por 4 mL de lactosuero reconstituido (0,068 g/mL), LF 10 mg/mL y MFGM obtenida a partir de una centrifugación a 40.000 g durante 30 min (4 °C) de 4 mL de mazada no homogeneizada.
3. **Fórmula 2 (F2):** compuesta por 4 mL de mazada no homogeneizada, LF 10 mg/mL y MFGM obtenida, como se ha indicado anteriormente, a partir de 4 mL de mazada no homogeneizada.
4. **Fórmula 3 (F3):** compuesta por 4 mL de lactosuero (0,068 g/mL), LF 10 mg/mL y MFGM obtenida a partir de 4 mL de mazada homogeneizada en una fase a 250 bar.
5. **Fórmula 4 (F4):** compuesta por 4 mL de mazada homogeneizada con los mismos parámetros descritos anteriormente, LF 10 mg/mL y MFGM obtenida a partir de 4 mL de la mazada homogeneizada.
6. **Fórmula 5 (F5):** compuesta por 4 mL de lactosuero (0,068 g/mL), LF 10 mg/mL y MFGM obtenida a partir de 4 mL de mazada no homogeneizada, sometida toda la fórmula a un tratamiento térmico de pasteurización de 72 °C/20 s.
7. **Fórmula 6 (F6):** compuesta por 4 mL de mazada no homogeneizada, LF 10 mg/mL y MFGM obtenida a partir de 4 mL de mazada no homogeneizada; sometida toda la fórmula a un tratamiento térmico de pasteurización de 72 °C/20 s.

Para el tratamiento térmico de pasteurización de las muestras F5 y F6, se alicuotaron en viales de 1 mL y se colocó una sonda térmica conectada a un *data logger* (Almemo 2409, Ahlborn, Ilmenau, Alemania) en su interior para el control de la temperatura. En primer lugar, se atemperaron dos baños de agua (Unitronic 200 y Precistern S-138, ambos de J.P. Selecta, Barcelona, España) a 60 °C y 72 °C. Las muestras se introdujeron en el baño a 60 °C y, al alcanzar esa temperatura, se transfirieron al baño a 72 °C. Durante este proceso, se cronometró el tiempo que tardaron las muestras en alcanzar la temperatura final y los 20 s de tratamiento una vez alcanzados los 72 °C. Transcurrido el

tiempo de tratamiento, las muestras se introdujeron rápidamente en un recipiente con hielo y se guardaron a -20 °C hasta su posterior digestión.

5.6. Ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro*

El método de digestión empleado está basado en el protocolo de Mackie y Rigby (2015) con algunas modificaciones. En primer lugar, se prepararon las soluciones simuladas de digestión: solución salivar (SSS) a pH 7, solución gástrica (SGS) a pH 3 y solución intestinal (SIS) a pH 7. Estas soluciones se prepararon de acuerdo a las concentraciones de sales indicadas en la Tabla 2, y se esterizaron con un filtro Millipore de 0,22 µm de baja unión de proteínas (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Se llevaron a cabo las digestiones *in vitro* de todas las muestras cuya composición se indica en el punto 5.5. Para ello, se tomó un volumen inicial de 4 mL de la muestra, al que se le adicionaron 3,2 mL de SSS, 20 µL de CaCl₂ y 780 µL de agua mili-Q, dando lugar a un volumen final de 8 mL que se ajustó a pH 7. Esta primera digestión salivar se incubó durante 2 min a 37 °C en agitación. Transcurrido el tiempo, se tomó una alícuota de 4 mL de esta muestra, que se congeló con nitrógeno líquido, y el volumen restante fue sometido a la siguiente fase.

Tabla 2. Composición de las soluciones salinas simuladas para las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*, indicando la concentración de las distintas sales empleadas.*Añadido en el momento de la digestión para evitar la precipitación. **Volumen empleado para el ajuste del pH de las distintas soluciones.

Componente	Concentración		Volumen (mL)		
	g/L	mol/L	SSS	SGS	SIS
KCl	37,7	0,5	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	68	0,5	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	84	1,0	6,8	12,5	42,5
NaCl	117	2,0	-	11,8	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30,5	0,15	0,5	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0,5	0,06	0,5	-
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂ *	44,1	0,3	1,5	0,15	0,6

Para la digestión gástrica se añadieron 3 mL de SGS, 2 μ L de CaCl_2 , 0,8 mL de pepsina gástrica porcina (Sigma-Aldrich) (3,2 mg/mL) y 118 μ L de agua mili-Q y se ajustó a pH 3. Esta fase se incubó durante 2 h a 37 $^\circ\text{C}$. Al finalizar la incubación, se extrajeron 4 mL y se congelaron con nitrógeno líquido para detener la reacción enzimática. El volumen sobrante fue sometido a la siguiente fase de digestión.

En la digestión intestinal se añadieron 2,2 mL de SIS, 8 μ L de CaCl_2 , 1 mL de pancreatina (Sigma-Aldrich, 8 x USP) (3 mg/mL con respecto al volumen final), 0,5 mL de extracto de bilis porcina (Sigma-Aldrich) (53,5 mg/mL) y 262 μ L de agua mili-Q y se ajustó a pH 7. Esta última fase se incubó 2 h a 37 $^\circ\text{C}$. Al finalizar la incubación, la muestra se congeló con nitrógeno líquido y todos los extractos de las fases de digestión se mantuvieron a -20 $^\circ\text{C}$ hasta su posterior análisis.

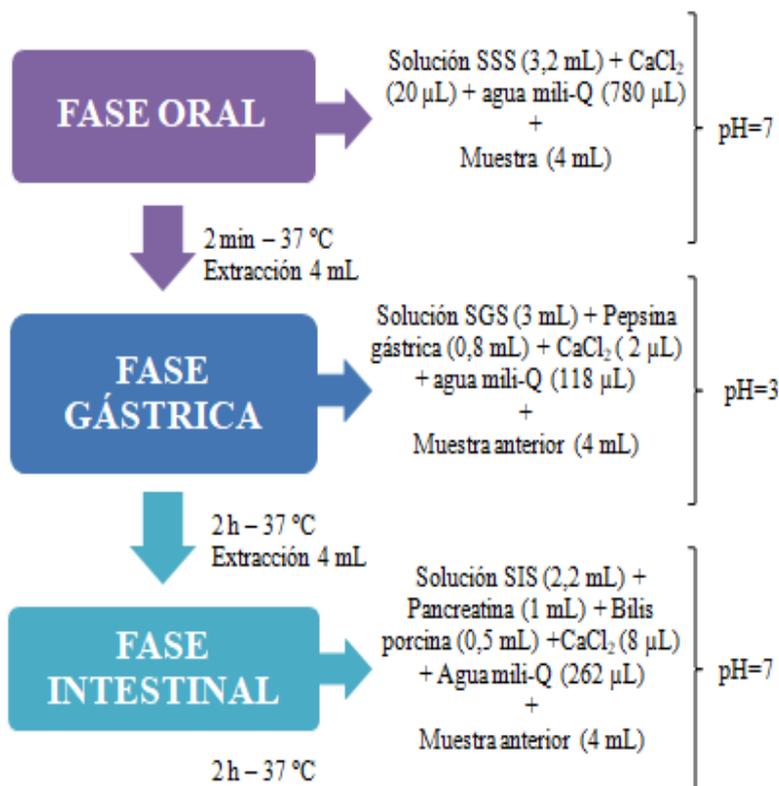


Figura 7. Esquema representativo de las digestiones *in vitro* a las que se sometieron las muestras lácteas, en el que se indican las composiciones de cada mezcla, así como el pH, tiempo y temperatura de incubación para cada fase de la digestión.

5.7. Análisis de actividad de la tripsina

Este análisis, descrito por Brodkorb *et al.* (2019), se llevó a cabo para valorar la actividad de la tripsina presente en la pancreatina utilizada en las digestiones.

Para ello, se emplearon p-tolueno-sulfonil-L-arginina-metil-éster (TAME) (Sigma-Aldrich) 10 mM como sustrato de la tripsina, una solución enzimática de tripsina a diferentes concentraciones: 10 µg/mL, 15 µg/mL y 20 µg/mL en HCl 1 mM y un tampón Tris-HCl 46 mM con CaCl₂ 11,5 mM a pH 8,1.

Se mezclaron 2,6 mL del tampón Tris-HCl con 300 µL de sustrato y 100 µL de tripsina y se realizó una medición de absorbancia en continuo a 247 nm durante 10 min. Posteriormente, se realizó el mismo ensayo con la pancreatina utilizada en el proceso de digestión intestinal detallado en el punto anterior.

5.8. Determinación del grado de hidrólisis tras la digestión

El grado de hidrólisis de las proteínas de las muestras lácteas tras las digestiones se determinó por el método del ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) basado en el protocolo de Spellman *et al.* (2003). Este ácido se diluyó al 0,1% (p/v) en agua destilada y las muestras y estándares se diluyeron en SDS al 1% (p/v). Los estándares se realizaron a partir de L-leucina (Sigma-Aldrich) a distintas concentraciones, entre 15 y 250 µM. En el caso de los digeridos gástricos e intestinales, estos se diluyeron adecuadamente para asegurar que los valores obtenidos entraran en la recta patrón de la L-leucina. Se analizaron 0,25 mL, tanto de las muestras como de los estándares, por duplicado. Cada muestra se adicionó a un tubo con 2 mL de tampón fosfato de sodio 0,2 M, pH 8,2 y, posteriormente, se añadieron 2 mL del reactivo TNBS. A continuación, las muestras se incubaron a 50 °C durante 1 h en oscuridad. Tras la incubación y para detener la reacción, se añadieron 4 mL de HCl 0,1 N a cada tubo y se dejaron enfriar durante 30 min. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 340 nm.

5.9. Cultivo de *Cronobacter sakazakii*

La valoración de la actividad antibacteriana tanto de las proteínas lácteas como de las fracciones tras las digestiones se realizó sobre la cepa CECT 853 de *C. sakazakii*, procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). Se partió de la activación del microorganismo que se encontraba fijado en crioperlas contenidas en crioviales mantenidos a -80 °C.

Para el cultivo se transfirió una crioperla a 10 mL de caldo TSB con extracto de levadura (YE) al 0,6% (v/v). Se incubó durante 24 h a 37 °C y se sembró por agotamiento en placa de agar tripticasa de soja (TSA) (Merck KGaA) enriquecido con YE al 0,6% (v/v) para obtener colonias aisladas. Esta placa se incubó 24 h a 37 °C y se conservó en refrigeración a 4 °C. Tanto el cultivo de *C. sakazakii* como los posteriores ensayos se realizaron en un ambiente estéril en una campana de flujo laminar modelo PV-30/70 marca Telstar (Thermo Fisher Scientific).

5.10. Ensayo de actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*

En este ensayo se analizó la actividad antibacteriana de las muestras de proteína láctea procedentes de las distintas etapas de digestión, frente a *C. sakazakii* en fase estacionaria de crecimiento. En primer lugar, se cultivó una colonia aislada de esta bacteria en 10 mL de TSB enriquecido en YE al 0,6% y se incubó entre 18 y 20 h a 37 °C. La suspensión bacteriana obtenida se diluyó en agua de peptona al 1% para obtener una concentración aproximada de 10^5 ufc/mL.

En una placa de 96 pocillos estéril se sembraron 100 µL de las muestras a analizar, previamente esterilizadas con filtros Millipore de 0,22 µm, junto con 100 µL de la suspensión de *C. sakazakii* (Figura 8). Como control de crecimiento de la bacteria se añadieron 100 µL de agua de peptona a la suspensión bacteriana. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

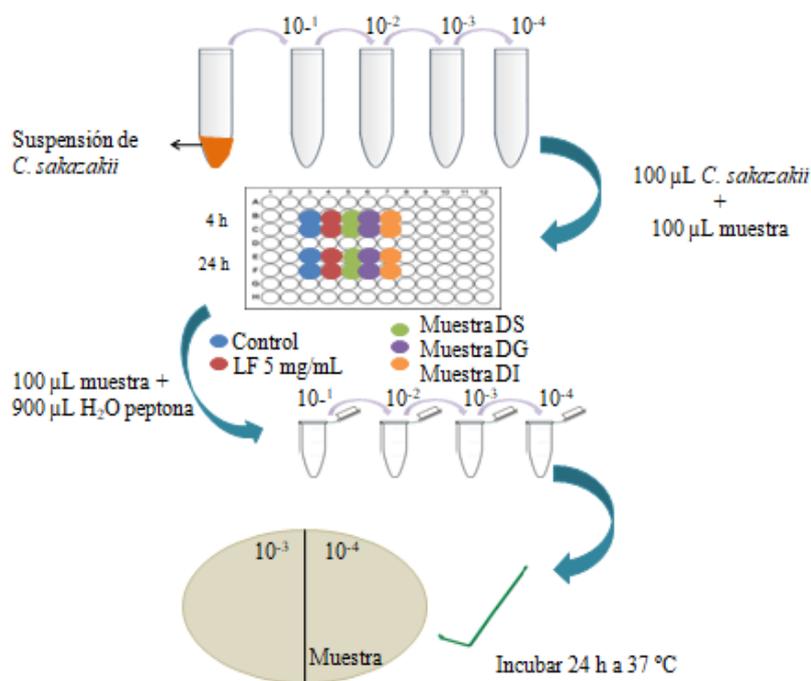


Figura 8. Esquema de la preparación de la suspensión bacteriana y de la placa de 96 pocillos empleada para el ensayo de actividad antibacteriana de las muestras lácteas previamente sometidas a digestión enzimática. Elaboración de diluciones y siembra en placas de TSA de cada muestra tras la incubación a los tiempos correspondientes (4 y 24 h). LF: lactoferrina, DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico y DI: digerido intestinal.

La placa se incubó a 37 °C y la actividad antibacteriana se valoró a dos tiempos de incubación: 4 y 24 h. Para ello, se tomaron 100 μ L de cada pocillo y se hicieron las diluciones necesarias para una correcta siembra y recuento en las placas de TSA (Figura 8). Estas placas se incubaron durante 24 h a 37 °C para realizar, posteriormente, el recuento de las colonias.

5.11. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad Prism v 8.0.2 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.). En primer lugar, se comprobó la normalidad de los datos con el test de Saphiro-Wilk. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA, del nombre en inglés *Analysis of Variance*) y se utilizó la prueba de Dunnett como test de comparación múltiple. Los datos que no seguían una distribución normal se sometieron al test no paramétrico Kruskal-Wallis y el test de Dunn como test de comparación múltiple. Se consideraron estadísticamente significativas aquellas diferencias con un valor $p \leq 0,05$, que se indican por asteriscos en las gráficas.

6. Resultados y discusión

6.1. Aislamiento y purificación de la lactadherina

El proceso de aislamiento de la LD se basó en el protocolo de Kim *et al.* (1992). El perfil cromatográfico tras la última etapa de purificación por filtración en gel en la columna de Sephacryl S-200 presentó dos picos, siendo el primero de mayor absorbancia, con un mayor contenido de LD (Figura 9A). Las fracciones correspondientes al primer pico se sometieron a una segunda purificación, mediante cromatografía de afinidad con Concanavalina A (resultados no mostrados). Las fracciones obtenidas en este proceso de purificación se caracterizaron mediante una electroforesis con SDS, que se muestra en la Figura 9B, identificando la banda correspondiente a la LD entre los pesos moleculares de 40 y 55 kDa.

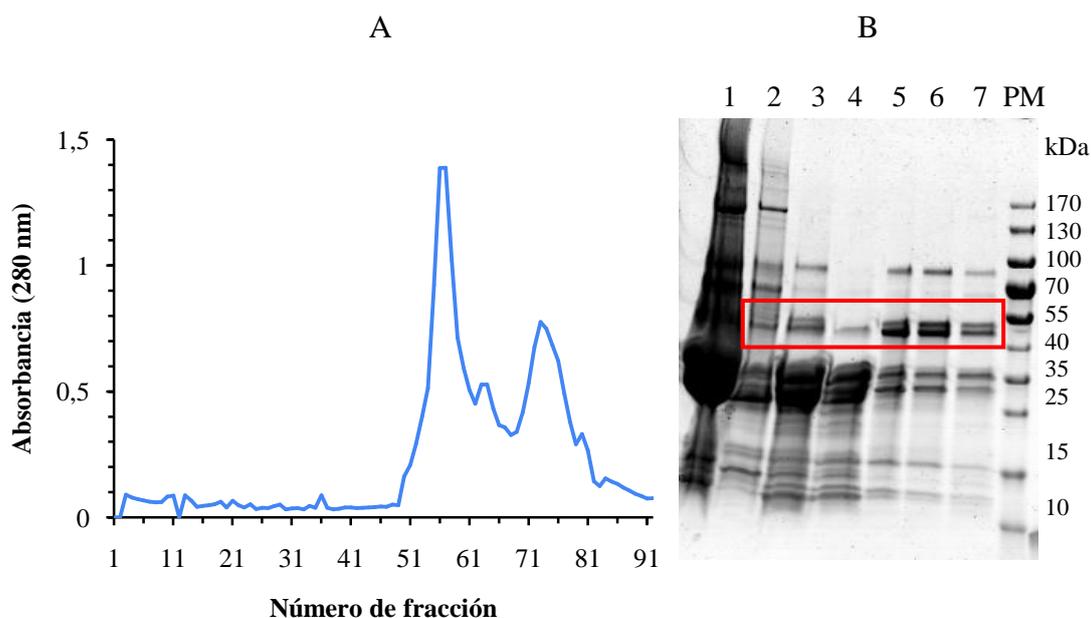


Figura 9. (A) Perfil de la cromatografía en Sephacryl S-200 High Resolution de la fracción de LD obtenida de la MFGM. Las fracciones recogidas fueron de 1,6 mL. (B) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de las fracciones obtenidas en las cromatografías, teñida con azul de Coomassie. (1) Fracción enriquecida en LD antes de su purificación, (2) fracciones 50-68 de la cromatografía en Sephacryl S-200, (3) fracciones 69-85 de Sephacryl S-200, (4) excluido de la cromatografía con Concanavalina A, (5) fracciones 16-23 de Concanavalina A, (6) fracciones 24-34 de Concanavalina A, (7) fracciones 35-44 de Concanavalina A, (PM) marcador de pesos moleculares. El recuadro rojo indica las bandas correspondientes a la LD.

En el estudio realizado por Ripollés *et al.* (2018) se aislaron algunas proteínas lácteas de la MFGM, entre ellas la LD, con el mismo procedimiento utilizado en el presente trabajo y con resultados similares. En dicho estudio también se observó que la intensidad de las bandas correspondientes a la LD disminuía con el tratamiento térmico.

El rendimiento de obtención de la LD ha sido muy bajo debido a la dificultad de extraer esta proteína de la MFGM y a la baja concentración en la que se encuentra (Ripollés *et al.*, 2018). Por ello, en este trabajo no se han podido realizar los ensayos antibacterianos con esta proteína y únicamente se ha utilizado como referencia para su identificación en el análisis de la composición de las fórmulas lácteas que contenían MFGM.

6.2. Aislamiento y purificación de la mucina

El aislamiento de la mucina se basó en los protocolos de Gallier *et al.* (2012) y Le *et al.* (2012). El perfil cromatográfico que presentó la mucina tras la purificación por filtración en gel en la columna de Sepharose CL-2B presentó tres picos, siendo en el segundo pico y en la fase intermedia entre el segundo y el tercero donde se encontró más cantidad de mucina (Figura 10).

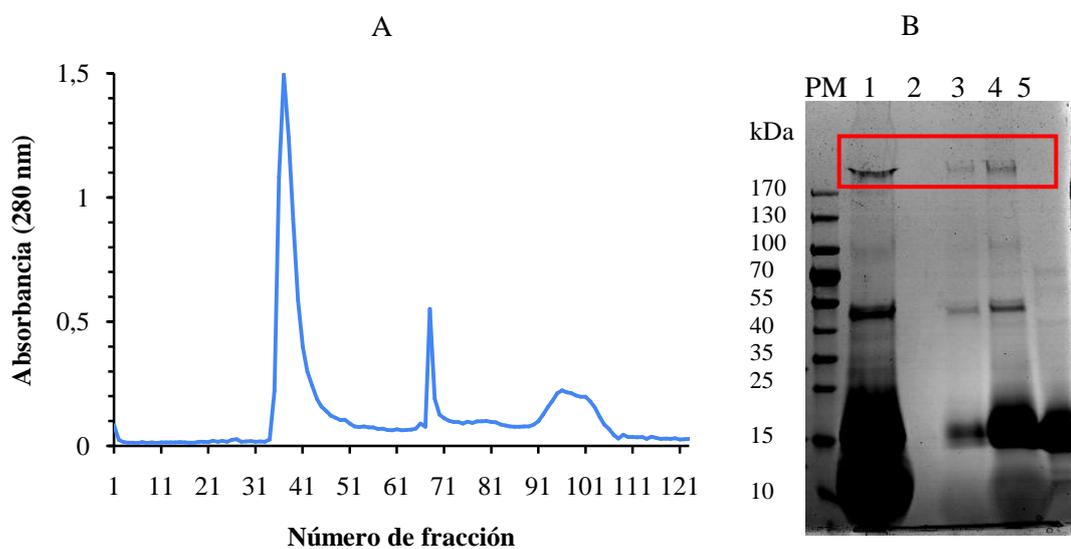


Figura 10. (A) Perfil de la cromatografía en Sepharose CL-2B de la fracción de mucina obtenida de la MFGM. Cada fracción eluida fue de 3 mL. (B) Electroforesis con SDS en gel de poliacrilamida (4-20%) de las fracciones obtenidas en las cromatografías, teñida con PAS. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) mucina previa a la cromatografía en Sepharose CL-2B, (2) fracción 35-50 de Sepharose CL-2B, (3) fracción 68-74 de Sepharose CL-2B, (4) fracción 75-91 de Sepharose CL-2B y (5) fracción 92-105 de Sepharose CL-2B. El recuadro rojo indica las bandas correspondientes a la mucina.

Como se ha explicado anteriormente, la mucina es una glicoproteína que está presente en la membrana plasmática apical de las células epiteliales mamarias y posteriormente se secreta en la leche como un componente de la MFGM. La leche contiene varias proteínas antimicrobianas, que presumiblemente protegen la glándula mamaria y el intestino de las crías lactantes de infecciones, uniéndose a una gran variedad de especies bacterianas (Sando *et al.*, 2009). Como se ha indicado para la LD, debido al bajo rendimiento en la obtención de la mucina no se pudieron realizar los ensayos antibacterianos correspondientes y se utilizó como referencia en los análisis electroforéticos de las fórmulas lácteas.

6.3. Análisis de actividad de la tripsina

La tripsina es una enzima peptidasa que hidroliza los enlaces peptídicos de las proteínas para formar péptidos y aminoácidos. Se produce en el páncreas, se secreta en el duodeno y participa en la digestión gastrointestinal. Esta enzima es muy utilizada en los procesos de digestión de muestras de proteína para transformarlas en péptidos (Perutka y Šebela, 2018).

En este estudio se realizó un ensayo enzimático, basado en el protocolo de Brodkorb *et al.* (2019), para poder valorar la actividad de la tripsina presente en la pancreatina utilizada en los ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro*. Los resultados obtenidos indicaron un aumento de la absorbancia debida al producto de la reacción enzimática con respecto al tiempo (Figura 11).

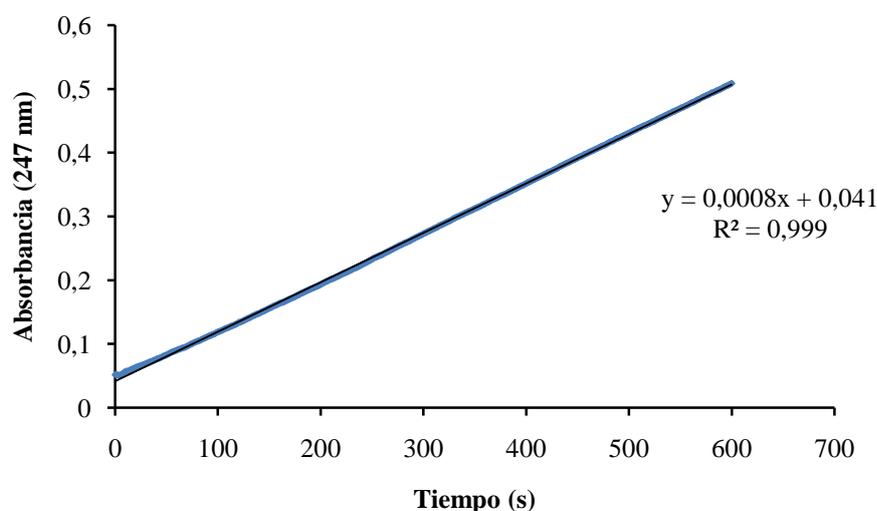


Figura 11. Representación gráfica de la actividad de la tripsina presente en la pancreatina (1 mg/mL) empleada en los ensayos de digestión gastrointestinal *in vitro*.

Tras este procedimiento se realizó el siguiente cálculo, para determinar la actividad de la tripsina por mg de pancreatina:

$$Unidades/mg = \frac{[(\Delta A_{247} Test - \Delta A_{247} Blanco) * Vf]}{(\epsilon * X)}$$

ΔA_{247} : Incremento de la absorbancia por minuto

ϵ : Coeficiente de extinción molar del TAME a 247 nm (L/(mol x cm))

Vf: Volumen final de la reacción (L)

X: Cantidad de pancreatina analizada (mg)

El incremento de la absorbancia (pendiente de la recta) corresponde con la actividad de la tripsina, expresada en $\Delta Abs/min$. En este caso, la pendiente fue de $0,0008 Abs/s = 0,048 Abs/min$

$$\frac{Unidades}{mg} = \frac{[(\Delta A_{247} Test - \Delta A_{247} Blanco) * Vf]}{(\epsilon * X)} = \frac{0,048 * 3 \cdot 10^{-3}}{540 \cdot 10^{-6} * 1} =$$

$$= 0,267 \text{ unidades TAME/mg pancreatina}$$

Por tanto, la actividad específica de la pancreatina utilizada fue de 0,267 unidades TAME/mg de pancreatina, que equivalen a 5,12 USP. El producto comercial empleado indica una actividad de 8 USP, algo mayor a la determinada en nuestro ensayo. Algunos autores aconsejan el uso de la pancreatina con una actividad de entre 4 (Le *et al.*, 2012) y 8 USP (Sek *et al.*, 2001) para una óptima digestión enzimática.

6.4. Grado de hidrólisis de las proteínas tras la digestión gastrointestinal *in vitro*

El grado de hidrólisis de las proteínas de las muestras lácteas tras las digestiones realizadas *in vitro* se determinó por el método de Spellman *et al.* (2003). Para ello se empleó el reactivo TNBS, que reacciona con los aminoácidos libres. Se realizaron estándares con soluciones de L-leucina a concentraciones de entre 0 y 250 μM y se compararon con las muestras digeridas, analizando su absorbancia a 340 nm. El valor máximo representado en la recta estándar que se muestra como ejemplo en la Figura 12 corresponde a una concentración de 93 μM , punto a partir del cual la curva se estabilizó debido a la saturación con el reactivo TNBS.

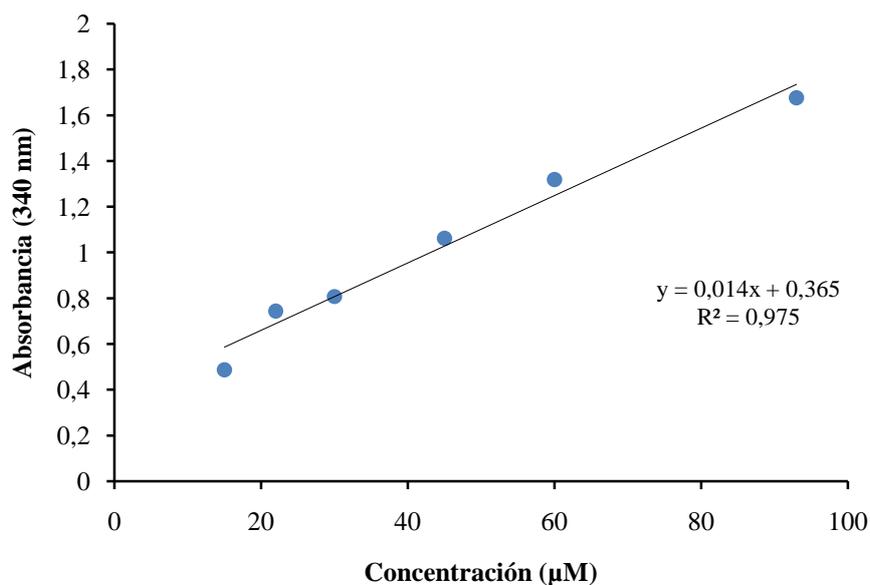


Figura 12. Recta estándar de L-leucina para la determinación del grado de hidrólisis por el método del TNBS de las muestras tras la digestión gastrointestinal *in vitro*.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del grado de hidrólisis de la muestra de LF nativa y las fórmulas lácteas tras las tres etapas de la digestión. Cada muestra se analizó por duplicado y se obtuvo un valor de absorbancia medio, que se llevó a la recta estándar de la L-leucina, para determinar la concentración de aminoácidos libres presentes en cada digerido.

Tabla 3. Valores de concentración de los aminoácidos libres producidos tras la hidrólisis de la lactoferrina (LF) y las fórmulas lácteas (F1-F6) en cada etapa de digestión gastrointestinal *in vitro* en relación a la concentración de L-leucina. DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico y DI: digerido intestinal.

	Concentración (μM)		
	DS	DG	DI
LF	13,77	83,02	94,86
F1	92,64	123,46	446,90
F2	98,24	120,29	342,72
F3	86,56	144,78	431,00
F4	97,98	-	428,99
F5	92,92	152,87	424,33
F6	97,64	161,05	421,17

Los valores de la concentración de aminoácidos libres de los digeridos salivares se pueden considerar como basales, ya que el simulado salivar no contiene ninguna proteasa, por lo que no tendría que haberse producido hidrólisis. Si comparamos los valores de concentración de los aminoácidos libres del digerido gástrico con los valores basales se observa un incremento de entre 1,2 a 1,7 veces, salvo para la LF que es 6 veces superior. Es posible que la cantidad de pepsina presente no sea suficiente para hidrolizar el alto contenido de proteína de las fórmulas lácteas. Cuando se comparan los valores de concentración de los aminoácidos libres del digerido intestinal con los valores basales se observa un incremento mayor que en la etapa gástrica, de entre 3 y 7 veces superior. En el estudio realizado por Corrochano *et al.* (2019) se analizó el grado de hidrólisis de las proteínas del lactosuero bovino mediante el método del TNBS. Los resultados que obtuvieron indicaron que el grado de hidrólisis era mayor para una proteína pura como la albúmina que para el aislado de proteína del suero.

6.5. Actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*

En este estudio se realizaron diferentes ensayos para evaluar la actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*, tanto de la LF bovina nativa como de las fórmulas lácteas compuestas por distintas fracciones lácteas bioactivas, tras una digestión gastrointestinal simulada *in vitro*. Asimismo, se evaluó el efecto de tratamientos como la pasteurización y la homogeneización en la actividad de dichos preparados tras la digestión.

Previamente a los ensayos de actividad de todas las fórmulas lácteas, se comprobó si las soluciones simuladas empleadas para las diferentes etapas de la digestión tenían algún tipo de efecto en el crecimiento de *C. sakazakii*. Se observó que dichas soluciones por sí mismas no tenían un efecto antibacteriano significativo frente a esta bacteria (Figura 13).

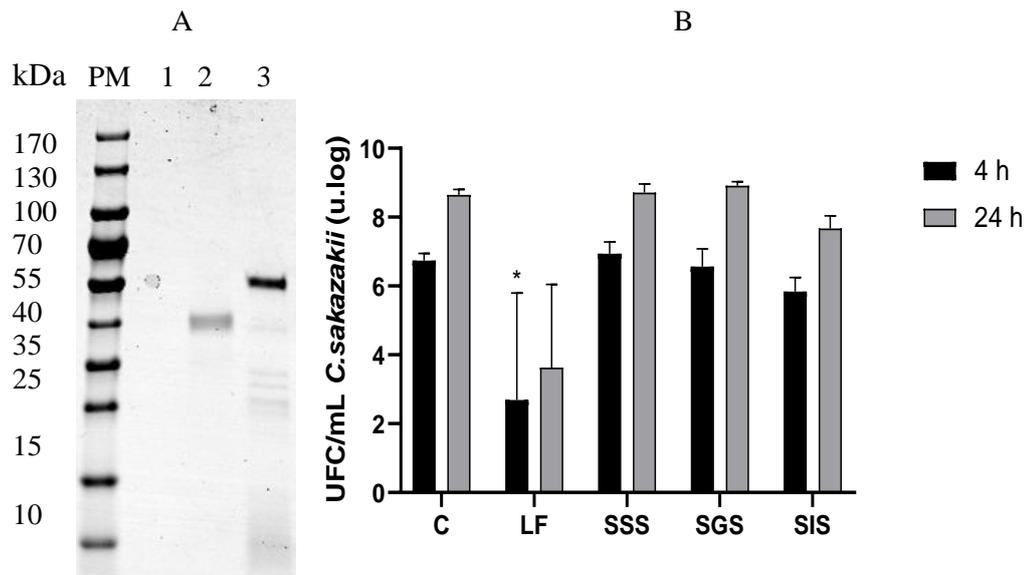


Figura 13. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de las soluciones de digestión, teñida con azul de Coomassie. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) SSS, (2) SGS, (3) SIS. (B) Efecto antibacteriano de las soluciones simuladas para la digestión frente a *C. sakazakii* tras incubación durante 4 y 24 h. C: control, LF: LF a 5 mg/mL, SSS: solución salivar simulada, SGS: solución gástrica simulada, SIS: solución intestinal simulada. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p < 0,05).

Para la valoración de los resultados de este ensayo antibacteriano, se utilizó como control positivo la LF nativa comercial, de la cual se conoce que posee un efecto antibacteriano frente a *C. sakazakii* a la concentración utilizada (Harouna *et al.*, 2015). El efecto antibacteriano de la LF se debe a su capacidad para secuestrar el hierro del medio necesario para la supervivencia de las bacterias y/o a una interacción directa entre la LF y el lipopolisacárido de las bacterias Gram-negativas o el ácido lipoteicoico de las bacterias Gram-positivas (Berlutti *et al.*, 2011). De esta manera, se analizó también el efecto sobre la bacteria de la LF tras su digestión gastrointestinal.

Los resultados que se muestran en la Figura 14B, indican que el efecto antibacteriano que posee la LF a las 4 h de incubación con la bacteria se mantiene tras todas las etapas de la digestión gastrointestinal. Sin embargo, la significación estadística de la diferencia de actividad antibacteriana respecto al control, disminuye en el caso del digerido gástrico e intestinal. Si analizamos la electroforesis (Figura 14A), en el digerido gástrico se observa una leve banda correspondiente a la LF, mientras que en el intestinal no se observa ningún resto de proteína intacta, por lo que la actividad antibacteriana podría deberse a los péptidos generados, que son muy evidentes en el digerido gástrico. Estos

resultados coinciden con los estudios en los que se ha evidenciado la mayor actividad antibacteriana de algunos péptidos derivados de la LF bovina como la lactoferricina (Bellamy *et al.*, 1992) y la lactoferrampina (Van der Kraan *et al.*, 2004), respecto a la proteína intacta.

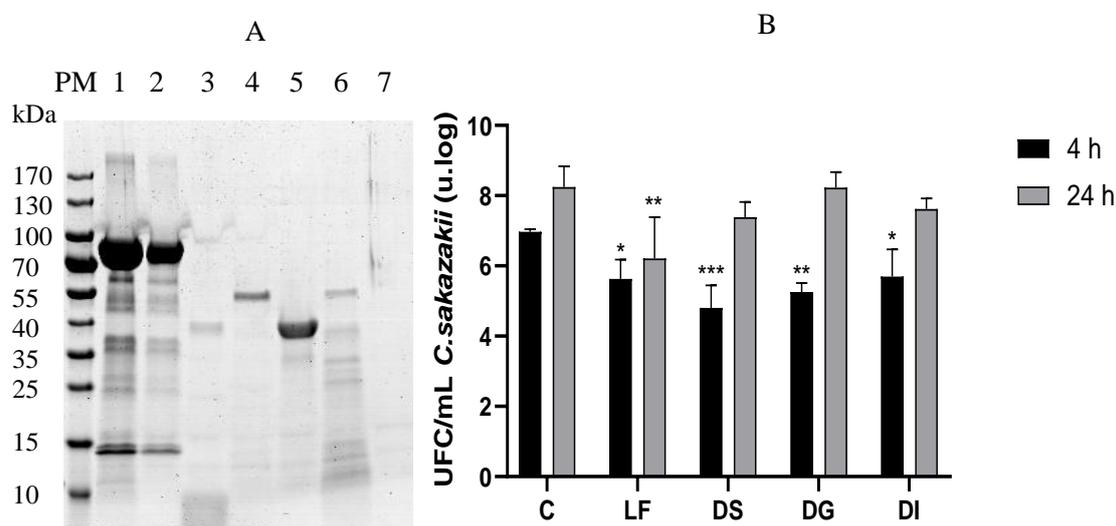


Figura 14. (A) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de la digestión de la LF nativa, teñida con azul de Coomassie. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) LF nativa (1 mg/mL), (2) digerido salivar de la LF, (3) digerido gástrico de la LF, (4) digerido intestinal de la LF, (5) pepsina gástrica porcina (1 mg/mL), (6) pancreatina (1 mg/mL) y (7) extracto de bilis porcina (1 mg/mL). (B) Efecto antibacteriano de las distintas fases de digestión de la LF nativa. C: control, LF: LF sin digerir a 5 mg/mL, DS: digerido salivar de la LF, DG: digerido gástrico de la LF, DI: digerido intestinal de la LF. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes ($n = 4$). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

De igual manera, se evaluó la actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii* de los digeridos de las diferentes fórmulas lácteas preparadas como se ha descrito anteriormente.

Tras la digestión de estas fórmulas, los extractos procedentes de cada etapa fueron analizados por electroforesis para determinar su composición. Se observó que la fase salivar no tenía efecto sobre las proteínas, debido a que la SSS no cuenta con enzimas. En los digeridos gástricos sí se observaron diferencias, puesto que se produjo una hidrólisis por acción de la pepsina, apreciándose unas bandas de un tamaño menor a 15 kDa, correspondientes a pequeños péptidos producidos por la proteólisis. En el digerido intestinal se observaron varias bandas correspondientes a la lipasa y proteasas, y los péptidos que aparecían en la fase gástrica desaparecieron. Esto puede deberse a

que las proteasas de la pancreatina, como la tripsina, interactúan rompiendo los enlaces de estos pequeños péptidos y continúan su hidrólisis. Los péptidos obtenidos tras la digestión intestinal son tan pequeños que no quedan retenidos en el gel de la electroforesis. Estos resultados fueron bastante generalizados, independientemente de la fórmula láctea de la que se tratase.

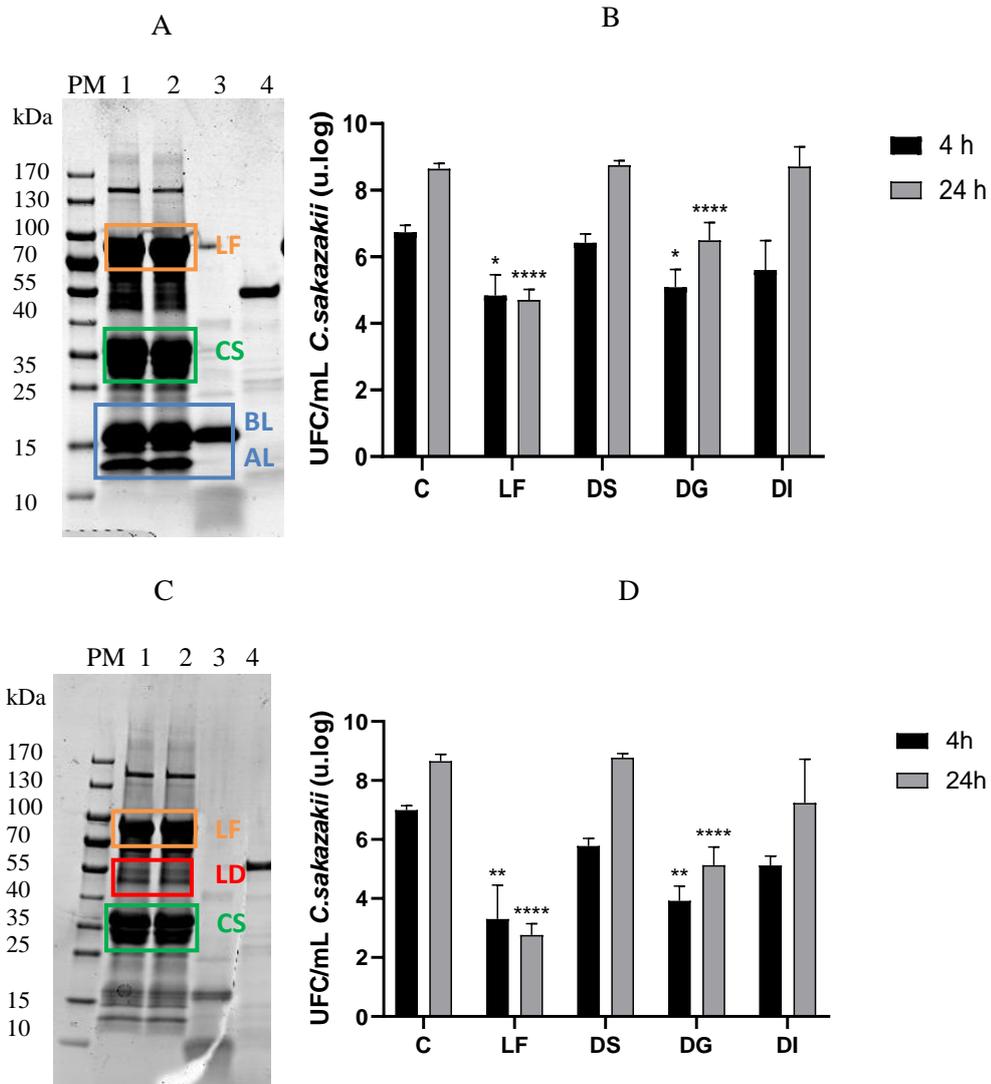


Figura 15. (A, C) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de las digestiones de F1 (A) y F2 (C), teñidas con azul de Coomassie. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) F1: lactosuerum/LF/MFGM no homogeneizada (A) o F2: mazada no homogeneizada/LF/MFGM no homogeneizada (C); (2) digerido salivar, (3) digerido gástrico y (4) digerido intestinal. LF: lactoferrina, CS: caseínas, BL: β -lactoglobulina, AL: α -lactalbúmina, LD: lactadherina. (B, D) Actividad antibacteriana de las distintas fases de digestión de la fórmula láctea F1 (B) y F2 (D) frente a *C. sakazakii*. C: Control, LF: LF a 5 mg/mL, DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico, DI: digerido intestinal. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001).

Como se observa en la Figura 15, en la que se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de las fórmulas lácteas F1 y F2 tras la digestión, el digerido de la fase salivar no mostró actividad. Sin embargo, se observa actividad del digerido gástrico de las dos fórmulas, siendo mayor en la F2 (Figura 15B y 15D). La actividad antibacteriana de las dos fórmulas disminuyó tras la digestión intestinal, permitiendo un mayor crecimiento bacteriano, posiblemente debido a la pérdida de los péptidos bioactivos.

La mayor actividad antibacteriana de la F2 se podría explicar por el alto contenido de MFGM, puesto que además de la añadida a la fórmula, contiene también la MFGM naturalmente presente en la mazada. Además de las proteínas bioactivas presentes en la MFGM con propiedades antimicrobianas (Parrón *et al.*, 2018), también se están investigando otros componentes como los glicoesfingolípidos y fosfolípidos, que funcionan como moléculas de señalización intracelular en una gran variedad de procesos biológicos (Fuller *et al.*, 2013). Por ello, en los últimos años se está llevando a cabo la adición de MFGM o fracciones enriquecidas en ella a las fórmulas infantiles.

En el caso de las fórmulas F3 y F4, la MFGM fue sometida previamente a un proceso de homogenización, que causó algunas pequeñas diferencias en los resultados (Figura 16). Se observó que durante la fase salivar no se produjo hidrólisis de las proteínas (Figura 16A y 16C) y que el digerido de la fórmula F3, que contenía lactosuero, no tuvo actividad frente al crecimiento del patógeno. Sin embargo, en la fórmula F4, que contenía mazada, se observó algo de actividad antibacteriana con una pequeña diferencia significativa respecto al control de crecimiento de *C. sakazakii* (Figura 16B y 16D). Sí que se observaron diferencias significativas respecto al control en la actividad de ambas fórmulas en la fase gástrica a las 4 y 24 h de incubación, teniendo una mayor actividad la F4. La actividad antibacteriana disminuyó tras la fase intestinal, siendo la F4 la única que mantuvo actividad hasta las 4 h de incubación. Por ello, se puede concluir que la fórmula F4, compuesta por mazada homogeneizada, presenta una mayor actividad frente a *C. sakazakii* que la fórmula F3 con lactosuero.

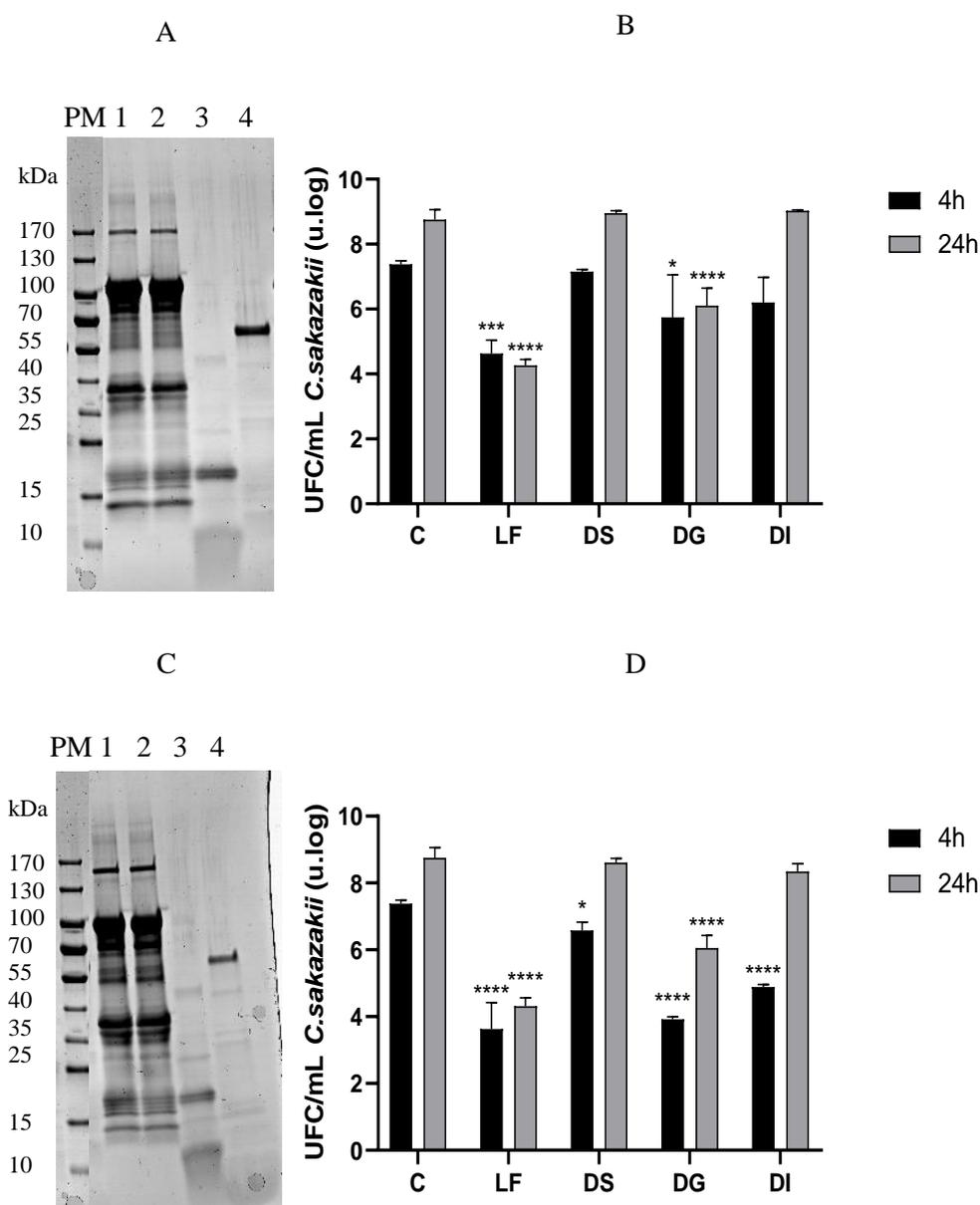


Figura 16. (A, C) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de las digestiones de F3 (A) y F4 (C), teñidas con azul de Coomassie. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) F3: lactosuero/LF/MFGM homogeneizada (A) o F4: mazada homogeneizada/LF/MFGM homogeneizada (C); (2) digerido salivar, (3) digerido gástrico y (4) digerido intestinal. (B, D) Actividad antibacteriana de las distintas fases de digestión de la fórmula láctea F3 (B) y F4 (D) frente a *C. sakazakii*. C: Control, LF: LF a 5 mg/mL, DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico, DI: digerido intestinal. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p < 0,05, ***p < 0,001, ****p < 0,0001).

Las fórmulas F5 y F6 sufrieron un tratamiento térmico de pasteurización de 72 °C/20 s. El digerido de la fase salivar de F5 no mostró actividad antibacteriana, mientras que el digerido de la F6 sí que la presentó, con diferencias significativas respecto al control, a las 4 h de incubación (Figura 17B y 17D). Los digeridos procedentes de la fase gástrica mostraron actividad antibacteriana, con diferencias significativas a las 4 y 24 h.

La actividad antibacteriana de los digeridos intestinales de las dos fórmulas se mantuvo a las 4 h, aunque con menor actividad que el digerido gástrico, y desapareció a las 24 h de incubación.

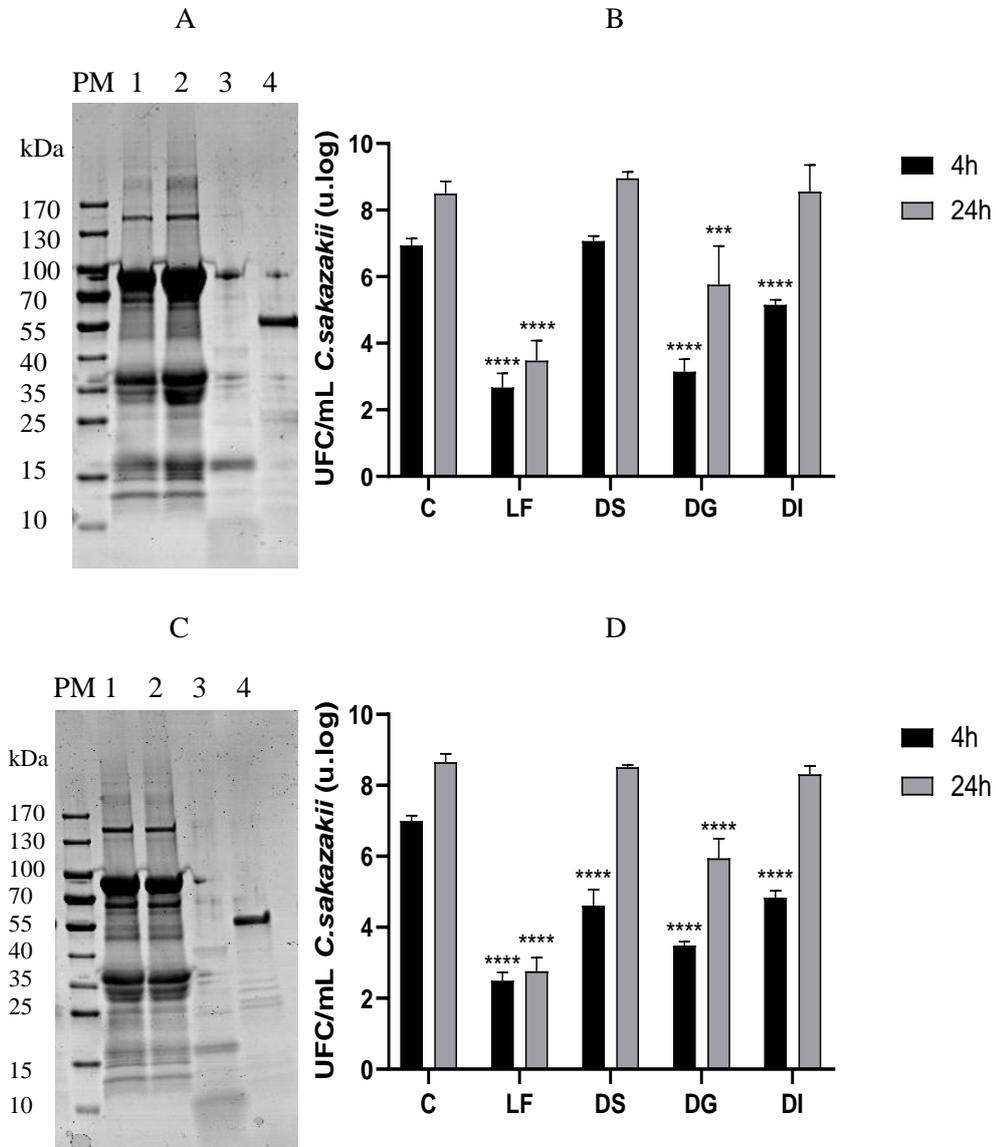


Figura 17. (A, C) Electroforesis en gel de poliacrilamida (4-20%) con SDS de las digestiones de F5 (A) y F6 (C), teñidas con azul de Coomassie. (PM) Marcador de pesos moleculares, (1) F5: lactosuero/LF/MFGM no homogeneizada (A) o F4: mazada no homogeneizada/LF/MFGM no homogeneizada (C), ambas con tratamiento térmico de 72 °C/20 s; (2) digerido salivar, (3) digerido gástrico y (4) digerido intestinal. (B, D) Actividad antibacteriana de las distintas fases de digestión de la fórmula láctea F5 (B) y F6 (D) frente a *C. sakazakii*. C: control, LF: LF a 5 mg/mL, DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico, DI: digerido intestinal. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4). Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (***) $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento térmico tiene efectos positivos en la actividad antibacteriana que presentan las fórmulas lácteas, posiblemente porque favorece la liberación de péptidos activos. En el estudio realizado por Halabi *et al.* (2020) se observó que el tratamiento térmico de las fórmulas infantiles elaboradas con lactosuero, aumentó la susceptibilidad de algunas proteínas a la hidrólisis con pepsina. La resistencia de la α -lactalbúmina y la β -lactoglobulina a la hidrólisis, no se modificó por el calentamiento, mientras que la LF aumentó su susceptibilidad en comparación con la forma nativa. Los resultados también indicaron que la cinética de la hidrólisis de la LF en la digestión intestinal de las fórmulas infantiles tratadas térmicamente fue mayor que las no tratadas. La pérdida de actividad de la LF desnaturalizada e hidrolizada podría compensarse con la liberación de péptidos de mayor actividad antimicrobiana.

A modo de resumen, en la Tabla 4 se muestran los porcentajes respecto al control del crecimiento de *C. sakazakii* en los ensayos de actividad antibacteriana de la LF y las fórmulas lácteas tras las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal *in vitro*. Las soluciones simuladas salivar y gástrica no tuvieron actividad por sí mismas frente a *C. sakazakii*, mientras que la solución intestinal disminuyó el crecimiento, si bien esta disminución no fue estadísticamente significativa respecto al control. En el caso de la LF se observó cómo fue perdiendo la actividad antibacteriana a lo largo de la digestión. Esto se debe a que durante la fase gástrica la LF se hidroliza menos que durante la fase intestinal, ya que las proteasas que contiene la pancreatina la hidrolizan con más efectividad (Goulding *et al.*, 2021). En general se observó que, en todas las fórmulas lácteas, el digerido salivar no tuvo acción antibacteriana, mientras que la mayor actividad se observó en los digeridos de la fase gástrica y se mantuvo, en mayor o menor medida, tras la fase intestinal. De manera general, existe un mayor efecto antibacteriano frente al patógeno a las 4 h de incubación que a las 24 h, principalmente en la fase intestinal. Se observó que las fórmulas compuestas por mazada (F2, F4 y F6) tuvieron un mayor efecto antibacteriano que las elaboradas a base de lactosuero (F1, F3 y F5). Asimismo, las fórmulas tratadas térmicamente (F5 y F6) presentaron mayor actividad que las tratadas por homogenización (F3 y F4) y que las que no sufrieron ningún tipo de tratamiento (F1 y F2), principalmente en la fase gástrica. También se observó que el tratamiento térmico podría tener un efecto beneficioso en la fórmula F5,

elaborada con lactosuero, ya que de las fórmulas con lactosuero, es la que mayor actividad presentó frente a *C. sakazakii*.

Por lo tanto, son los digeridos gástricos los que presentan una mayor actividad antibacteriana. Esta actividad frente a *C. sakazakii* puede deberse a la liberación de péptidos bioactivos mediante la proteólisis enzimática que ocurre durante la digestión. Tras su hidrólisis, las proteínas pueden volverse bioactivas incrementando su efecto inhibitorio de agentes patógenos (McEvoy *et al.*, 2016).

Por ello, se realizó el fraccionamiento del digerido gástrico de la fórmula láctea F2, a modo representativo de todas ellas, para identificar el peso molecular de los péptidos presentes tras la digestión gástrica y comprobar cuáles eran los principales responsables del efecto antibacteriano. Tras el fraccionamiento, se diferenciaron péptidos con un tamaño de entre 3 y 10 kDa y péptidos con un tamaño menor de 3 kDa.

Tabla 4. Representación de los valores obtenidos en los ensayos antibacterianos frente a *C. sakazakii* de las soluciones simuladas y los digeridos de la lactoferrina (LF) y de las fórmulas lácteas (F1-F6), expresados en porcentaje con respecto al control. SS: soluciones simuladas, SSS: solución salivar simulada, SGS: solución gástrica simulada, SIS: solución intestinal simulada, DS: digerido salivar, DG: digerido gástrico, DI: digerido intestinal.

Muestras	4 h			24 h		
	SSS	SGS	SIS	SSS	SGS	SIS
SS	103,01	97,33	86,53	100,80	103,14	88,78
	DS	DG	DI	DS	DG	DI
LF nativa	68,95	75,32	82,30	89,63	99,79	92,45
F1	95,27	75,50	83,22	101,27	75,13	100,37
F2	82,63	56,03	73,19	101,35	59,31	83,68
F3	96,97	77,82	84,06	102,25	69,73	103,17
F4	89,14	57,59	66,28	98,35	69,19	95,38
F5	101,87	45,35	74,34	105,40	67,88	100,73
F6	65,99	49,89	69,13	98,42	68,69	96,02

En la electroforesis de los péptidos de entre 3 y 10 kDa (resultados no mostrados) se observó una pequeña banda en la parte final del gel, mientras que en la electroforesis de los péptidos menores de 3 kDa, al tener un tamaño tan pequeño, no se observó ninguna banda. Para completar el análisis, se evaluó la actividad antibacteriana de las dos fracciones peptídicas. Se observó que ambas tenían un efecto antibacteriano y que la fracción de entre 3 y 10 kDa presentaba mayor actividad que la de menos de 3 kDa

(Tabla 5). La fracción de 3 a 10 kDa mantuvo su actividad antibacteriana a las 24 h, mientras que en la fracción de 3 kDa disminuyó notablemente.

Tabla 5. Representación de los valores obtenidos en los ensayos antibacterianos de los péptidos generados en la digestión gástrica de la F2. Los valores representan la media \pm desviación estándar de dos réplicas en dos ensayos independientes (n = 4) y se expresan también en porcentaje con respecto al control. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control (*p < 0,05, ****p < 0,0001).

Incubación 4 h		Incubación 24 h	
Péptidos 3-10 kDa		Péptidos 3-10 kDa	
Media \pm SD	4,09 \pm 0,356 ****	Media \pm SD	5,34 \pm 0,311 ****
Porcentaje	59,1	Porcentaje	65,1
Péptidos < 3 kDa		Péptidos < 3 kDa	
Media \pm SD	5,42 \pm 0,03 ****	Media \pm SD	7,44 \pm 0,355 *
Porcentaje	78,3	Porcentaje	90,7

El proceso de digestión gastrointestinal tiene una gran influencia en la liberación de secuencias peptídicas encriptadas en las proteínas alimentarias. Los péptidos bioactivos liberados pueden ejercer varias funciones biológicas diferentes, tanto en la luz intestinal como si se absorben y se dirigen hacia diferentes órganos diana del cuerpo (Aspri *et al.*, 2018).

En este estudio realizado por Aspri *et al.* (2018), se observó que la leche fermentada de burra tenía actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* antes de la digestión. Tras la digestión *in vitro* de estas muestras fermentadas, la actividad frente a *L. monocytogenes* aumentó y también apareció actividad frente a *S. aureus* y *B. cereus*. Esta actividad antibacteriana en la leche de burra podría deberse, en parte, al alto nivel de LF y lisozima que contiene. Además, los autores destacaron que la leche de burra fermentada con bacterias ácido lácticas contenía diferentes factores antimicrobianos protectores, además de los péptidos liberados durante el proceso de su digestión. Estos factores pueden ejercer un impacto beneficioso en la salud intestinal, particularmente para el sistema de defensa inmunológico de niños, ancianos y convalecientes.

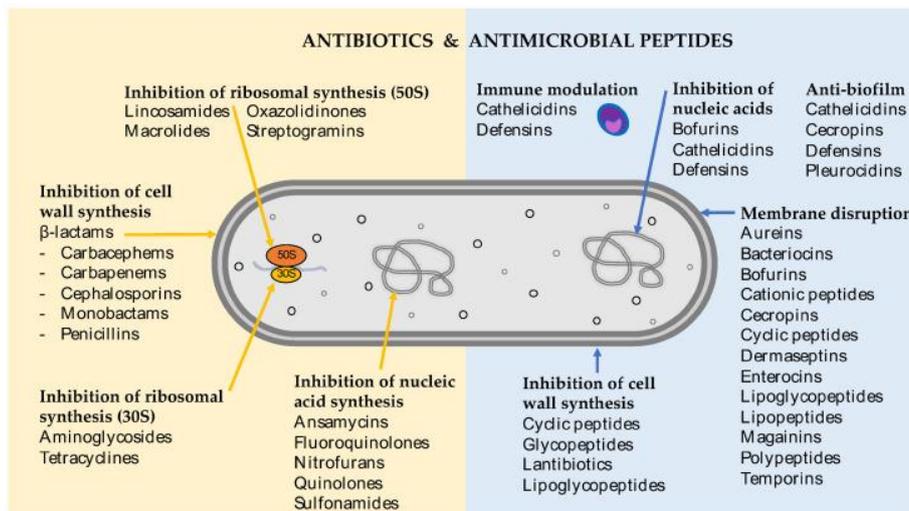


Figura 20. Mecanismos de acción de los antibióticos y péptidos antimicrobianos (Browne *et al.*, 2020).

En las últimas décadas, ha surgido un gran interés por los péptidos antimicrobianos. Estos suelen tener menos de 100 aminoácidos y su composición incluye residuos cargados positivamente, como lisina, arginina e histidina, y una gran proporción de residuos hidrofóbicos (> 50%). Los péptidos con estas características antimicrobianas a menudo se dirigen directamente a la membrana celular bacteriana, donde pueden afectar a sus funciones. Además pueden internalizarse en la bacteria alterando algunos de sus orgánulos y condicionando su viabilidad (Figura 20) (Browne *et al.*, 2020).

En el estudio realizado por Nielsen *et al.* (2018), se analizaron los péptidos liberados durante la digestión gástrica en bebés prematuros de las proteínas tanto de la leche humana como de la bovina. Los péptidos identificados se compararon en la *Milk Bioactive Peptide Database*. Se revelaron 58 idénticos a péptidos bioactivos a los ya conocidos: 5 derivados de proteínas de la leche humana, 50 de proteínas de la leche bovina y 3 que no pudieron distinguirse entre las dos especies debido a tener secuencias idénticas. Se identificaron péptidos con secuencias estrechamente relacionadas con péptidos que muestran diferentes actividades: antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, cito e inmunomoduladora, opioide y ansiolítica. Los resultados de Nielsen *et al.* (2018) y los del presente trabajo indican el interés que tiene la investigación en los péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas como potenciales ingredientes de alimentos funcionales.

7. Conclusiones

Los resultados obtenidos en el presente trabajo han llevado a concluir que:

1. La lactoferrina bovina comercial tiene actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii* reduciendo el crecimiento del patógeno, tanto en estado nativo como después de la digestión gastrointestinal *in vitro*.
2. Los digeridos de todas las fórmulas lácteas procedentes de la etapa gástrica son los que tiene más actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*.
3. Las fórmulas lácteas que contienen mazada presentan, en general, una actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii* mayor que las que contienen lactosuero.
4. Las fórmulas lácteas sometidas a un tratamiento, ya sea homogenización o pasteurización, presentan una mayor actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*, siendo el tratamiento térmico el que tiene mayor efecto.
5. La digestión gástrica *in vitro* permite liberar péptidos de bajo peso molecular que presentan elevada actividad antibacteriana frente a *C. sakazakii*.

8. Bibliografía

- Albis, A., Lozano, J., Romero, C., 2009. Estabilización de holo-alfa-lactoalbúmina en presencia de polioles. *Revista Colombiana de Química* 38, 209–219.
<http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>
- 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. <https://doi.org/10.1021/bi992221r>
- Aspri, M., Leni, G., Galaverna, G., Papademas, P., 2018. Bioactive properties of fermented donkey milk, before and after *in vitro* simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 268, 476–484.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.119>
- Atallah, N., Deracinois, B., Boulier, A., Baniel, A., Jouan-Rimbaud Bouveresse, D., Ravallec, R., Flahaut, C., Cudennec, B., 2020. *In vitro* assessment of the impact of industrial processes on the gastrointestinal digestion of milk protein matrices using the INFOGEST Protocol. *Foods* 9, 1580.
<https://doi.org/10.3390/foods9111580>
- Baró, L., Jiménez, J., Martínez-Férez, A., Bouza, J., 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars Pharmaceutica* 42, 135–145.
<https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5691>
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K., Tomita, M., 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Journal of Applied Bacteriology* 73(6), 472-479.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb05007.x>
- 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. <https://doi.org/10.3390/molecules16086992>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., ... Recio, I., 2019. INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocol* 14, 991–1014.
<https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>

- Browne, K., Chakraborty, S., Chen, R., Willcox, M.D., Black, D.S., Walsh, W.R., Kumar, N., 2020. A new era of antibiotics: the clinical potential of antimicrobial peptides. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 7047.
<https://doi.org/10.3390/ijms21197047>
- Chatterjee, M., van Putten, JPM., Strijbis, K., 2020. Defensive properties of mucin glycoproteins during respiratory infections-relevance for SARS-CoV-2. *mBio* 11(6), e02374-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02374-20>
- Chenu, J.W., Cox, J.M., 2009. *Cronobacter* ('*Enterobacter sakazakii*'): current status and future prospects. *Letters in Applied Microbiology* 49, 153–159.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02651.x>
- Civra, A., Giuffrida, M.G., Donalizio, M., Napolitano, L., Takada, Y., Coulson, B.S., Conti, A., Lembo, D., 2015. Identification of equine lactadherin-derived peptides that inhibit *rotavirus* infection via integrin receptor competition. *Journal of Biological Chemistry* 290, 12403–12414.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.620500>
- Codex Alimentarius, 1999. Norma del Codex para el uso de términos lecheros. (CODEXSTAN 206-1999).
- Corrochano, A.R., Sariçay, Y., Arranz, E., Kelly, P.M., Buckin, V., Giblin, L., 2019. Comparison of antioxidant activities of bovine whey proteins before and after simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Dairy Science* 102, 54–67.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14581>
- Deng, Y., Gruppen, H., Wierenga, P.A., 2018. Comparison of protein hydrolysis catalyzed by bovine, porcine, and human trypsins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 4219–4232. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00679>
- Du, X., Wang, X., Dong, X., Li, P., Wang, S., 2018. Characterization of the desiccation tolerance of *Cronobacter sakazakii* strains. *Frontiers in Microbiology* 9, 2867.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02867>
- Egger, L., Ménard, O., Baumann, C., Duerr, D., Schlegel, P., Stoll, P., Vergères, G., Dupont, D., Portmann, R., 2019. Digestion of milk proteins: Comparing static and dynamic *in vitro* digestion systems with *in vivo* data. *Food Research International* 118, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.049>
- Ferrandini, E., Castillo, M., López, M.B., Laencina, J., 2006. Modelos estructurales de la micela de caseína. *Anales de Veterinaria de Murcia* 22, 5–18.
<https://revistas.um.es/analesvet/article/view/771>

- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015a. Lactose. En: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 21–68. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_2
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015b. Milk Lipids. En: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 69–144. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_3
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015c. Milk Proteins. En: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 145–239. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_4
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A., 2015d. Salts of Milk. En: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing, Cham, pp. 241–270. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2_5
- 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. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6122>
- Gallier, S., Ye, A., Singh, H., 2012. Structural changes of bovine milk fat globules during *in vitro* digestion. Journal of Dairy Science 95, 3579–3592. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-5223>
- Gésime, J.M., Acevedo, A.M., Lalaguna, F., 2009. Las mucinas salivales y sus implicaciones en la reología de la saliva humana y los sustitutos salivales. Acta Odontológica Venezolana 47, 446–452.
- Gołębiowski, A., Pomastowski, P., Rodzik, A., Król-Górniak, A., Kowalkowski, T., Górecki, M., Buszewski, B., 2020. Isolation and self-association studies of beta-lactoglobulin. International Journal of Molecular Science 21, 9711. <https://doi.org/10.3390/ijms21249711>
- Gómez, D.A.A., Mejía, O.B., 2005. Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. Revista Lasallista de Investigación 2, 38-42.
- Goodman, B.E., 2010. Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. Advances in Physiology Education 34, 44–53. <https://doi.org/10.1152/advan.00094.2009>

- Goulding, D.A., Vidal, K., Bovetto, L., O'Regan, J., O'Brien, N.M., O'Mahony, J.A., 2021. The impact of thermal processing on the simulated infant gastrointestinal digestion, bactericidal and anti-inflammatory activity of bovine lactoferrin – An *in vitro* study. *Food Chemistry* 362, 130142. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130142>
- Grondin, J.A., Kwon, Y.H., Far, P.M., Haq, S., Khan, W.I., 2020. Mucins in intestinal mucosal defense and inflammation: learning from clinical and experimental studies. *Frontiers in Immunology* 11, 2054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02054>
- Halabi, A., Croguennec, T., Bouhallab, S., Dupont, D., Deglaire, A., 2020. Modification of protein structures by altering the whey protein profile and heat treatment affects *in vitro* static digestion of model infant milk formulas. *Food & Function* 11, 6933–6945. <https://doi.org/10.1039/D0FO01362E>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.061>
- Hazard T.S., 1997. Variación de la composición de la leche. *Serie Carillanca* 33-44. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/32524>.
- Horne, D.S., 2006. Casein micelle structure: models and muddles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.11.004>
- Hummel, B.C., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 1393–1399. <https://doi.org/10.1139/o59-157>
- Hurley, W.L., Theil, P.K., 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients* 3, 442–474. <https://doi.org/10.3390/nu3040442>
- 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 BBA - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1122, 203–211. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(92\)90325-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90325-8)
- Kodama, Y., Kimura, N., 2001. Inhibitor of *Helicobacter pylori* colonization (U.S. Patent No. US 6235709B1). Ghen Corporation. <https://patents.justia.com/patent/6235709>

- Layman, D.K., Lönnerdal, B., Fernstrom, J.D., 2018. Applications for α -lactalbumin in human nutrition. *Nutrition Reviews* 76, 444–460.
<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy004>
- Le, T. T., Van de Wiele, T., Do, T. N. H., Debyser, 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(5), 2307–2318.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4947>
- Lehner, A., Stephan, R., 2004. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *Journal of Food Protection* 67, 2850–2857.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.12.2850>
- Lepuschitz, S., Ruppitsch, W., Pekard-Amenitsch, S., Forsythe, S.J., Cormican, M., Mach, R.L., Piérard, D., Allerberger, F., 2019. Multicenter study of *Cronobacter sakazakii* infections in humans, Europe, 2017. *Emerging Infectious Disease* 25, 515–522. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181652>
- Luján Medina, G., Treviño, A., Aguilar, C., 2014. *Cronobacter sakazakii*: a food borne emergent pathogen. *Acta Química Mexicana* 6, 24–29.
- Maathuis, A., Havenaar, R., He, T., Bellmann, S., 2017. Protein digestion and quality of goat and cow milk infant formula and human milk under simulated infant conditions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 65, 661–666.
<https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001740>
- Mackie, A., Rigby, N., 2015. InfoGest Consensus Method. En: The impact of food-bioactives on gut health. Eds: Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H. Springer International Publishing, Cham, pp. 13–22.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_2
- Manoni, M., Di Lorenzo, C., Ottoboni, M., Tretola, M., Pinotti, L., 2020. Comparative proteomics of milk fat globule membrane (MFGM) proteome across species and lactation stages and the potentials of MFGM fractions in infant formula preparation. *Foods* 9, 1251. <https://doi.org/10.3390/foods9091251>
- 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*. *Journal of Applied Microbiology* 121, 873–882. <https://doi.org/10.1111/jam.13212>

- Nielsen, S.D., Beverly, R.L., Underwood, M.A., Dallas, D.C., 2018. Release of functional peptides from mother's milk and fortifier proteins in the premature infant stomach. PLoS ONE 13, e0208204.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208204>
- Patricia JJ, Dhamoon AS., 2020. Physiology, Digestion. En: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544242/>
- Patton, S., Muller, L. D. (1992). Genetic polymorphism of the epithelial mucin, PAS-I, in milk samples from the major dairy breeds. Journal of Dairy Science, 75(3), 863-867.
- Parrón, J.A., Ripollés, D., Sánchez, A.C., Pérez, M.D., Calvo, M., López, S., Arias, C.F., Sánchez, L., 2018. Antirotaviral activity of bovine milk components: extending the list of inhibitory proteins and seeking a better understanding of their neutralization mechanism. Journal of Functional Foods 44, 103-111. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.002>
- Perutka, Z., Šebela, M., 2018. Pseudotrypsin: a little-known trypsin proteoform. Molecules 23(10), 2637. <https://doi.org/10.3390/molecules23102637>
- 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. Journal of Dairy Science 101, 912–923. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13608>
- Sánchez, L., Calvo, M., Brock, J.H., 1992. Biological role of lactoferrin. Archives of Disease Childhood 67, 657–661. <http://dx.doi.org/10.1136/adc.67.5.657>
- Sando, L., Pearson, R., Gray, C., Parker, P., Hawken, R., Thomson, P.C., Meadows, J.R.S., ... Tellam, R.L., 2009. Bovine Muc1 is a highly polymorphic gene encoding an extensively glycosylated mucin that binds bacteria. Journal of Dairy Science 92, 5276–5291.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2216>
- Sek, L., Porter, C.J., Charman, W.N., 2001. Characterisation and quantification of medium chain and long chain triglycerides and their *in vitro* digestion products, by HPTLC coupled with *in situ* densitometric analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 25(3-4), 651-661.
[https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00528-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00528-8)

- Shi, J., Heegaard, C.W., Rasmussen, J.T., Gilbert, G.E., 2004. Lactadherin binds selectively to membranes containing phosphatidyl-l-serine and increased curvature. *Biochimica et Biophysica Acta BBA - Biomembranes* 1667, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.09.006>
- Spellman, D., McEvoy, E., O’Cuinn, G., FitzGerald, R.J., 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *International Dairy Journal* 13, 447–453. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(03\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(03)00053-0)
- Superti, F., 2020. Lactoferrin from bovine milk: a protective companion for life. *Nutrients* 12, 2562. <https://doi.org/10.3390/nu12092562>
- Van der Kraan, M. I., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Bolscher, J. G., Amerongen, A. V. N. 2004. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 25(2), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.12.006>